

**Proiect de cercetare postdoctoral**

**PN II – PD 628/2010**

**Titlul proiectului**

**Relatia de predictibilitate evolutivă între activitatea  
bioelectrică si comportamentul neuroimagistic al  
parenchimului cerebral la câinii epileptici**

**Sinteza lucrării – etapa unica I/2010**

## **A1. Constituirea grupului de pacienti conform criteriilor de admitere in studiu**

Pentru alcătuirea grupului de câini cu epilepsie care vor fi investigați ulterior pe parcursul celorlalte etape au fost investigați **21 pacienți** canini prezentați la consultație sau referați pentru investigație în cadrul Clinicii Medicale a FMV Iași care au prezentat atacuri de tip convulsiv epileptiform.

Criteriile de admitere în grupul de interes au fost reprezentate de: **a)** examen neurologic normal interictal sau cu deficite postictale tranzitorii, **b)** profil hematologic și biochimic seric normal (hepatic – ALT, PAL, Bilirubina directă indirectă, proteine totale, albumina; renal – uree, creatinina; glicemie; Ca, Mg, P) sau cu modificări care nu au justificat expresia clinică; **c)** profil biochimic urinar normal; **d)** examen al lichidului cefalorahidian negativ ( $< 5$  celule roșii/ $\mu$ l,  $< 5$  celule nucleate/ $\mu$ l, glicorahie 40-100 mg/dl, proteinorahie  $< 30$  mg/dl); **e)** examen computer tomografic nativ și cu substanță de contrast negativ.

Din cei 21 de pacienți 3 au fost diagnosticați cu patologie tumorală cu localizare cerebrală (1 primară, 2 metastatic), 5 cu encefalite (3 Carre, 2 encefalite nespecifice), 2 cu epilepsie reactivă pe fond de insuficiență hepatică și 2 cu epilepsie reactivă pe fond de insuficiență renală. În grupul de studiu au fost incluși **9 pacienți** ce vor fi investigați ulterior.

## **A2. Alcatuirea modelului experimental. Identificarea metodologiei optime de examinare electroencefalografică si a potențialelor evocate auditive (latențe medii si lungi) la câinii fără patologie neurologică**

### **Identificarea metodologiei optime de înregistrare a potențialelor auditive cu unde medii**

Spre deosebire de medicina omului, în practica curentă veterinară, înregistrarea potențialelor auditive cu unde medii (MLR) nu este folosită, testul fiind efectuat de obicei de către centre de cercetare. Literatura de specialitate raportează diferite protocoale de lucru pentru înregistrarea MLR cu ajutorul electrozilor tip ac cu implantare subcutanată. Studiul nostru urmărește descrierea tehnicii de recoltare a MLR cu ajutorul electrozilor de suprafață și analiza morfologiei undelor înregistrate.

#### ***Material și metodă***

Studiul a fost realizat pe 6 câini fără patologie neurologică din rase diferite (4 metiși, 1 Fox terrier, 1 Husky) cu o medie de vârstă de  $4 \pm 1,5$  ani. Câinii au fost aneștizați general prin administrare inj.iv. de medetomidină 0,03 mg/kgc. Procedura de recoltare, comparare și stocare a traseelor electrice a fost limitată la maxim 60 de minute.

Traseele au fost înregistrate cu sistemul de electrodiagnostic Neuropack S, MEB 9400 K (Nihon Kohden) cu ajutorul programului MLR. Electrozii folosiți au fost de suprafață și au fost plasați după cum urmează: electrodul activ pe vertex, electrozii de referință la baza fiecărei urechi iar electrodul împământare retrooccipital pe linia mediană. Aria pe care au fost plasați electrozii a fost rasă, degresată și acoperită cu pastă adezivă specială.

Înainte de fiecare examinare a fost verificată impedanța dintre electrozi ( $5\Omega$ ).

Prin intermediul unor căști au fost aplicați în interiorul canalului auditiv extern stimuli acustici în click alternativ cu o durată de 0,1 ms. Pentru fiecare câine au fost înregistrate unde pentru stimularea monoauriculară cât și pentru stimularea biauriculară. Intensitatea standard a stimulului a fost stabilită la 80 dB SPL (0 dBnHL = 30). Au fost recoltate și analizate spre comparație și undele obținute la o stimulare cu stimuli auditivi de 70 dB SPL și 60 dB SPL. În cazul stimulării monoauriculare, în urechea contralaterală a fost administrat “zgomot alb” la o intensitate mai joasă cu 40 dB SPL. Fiecare undă stocată a fost media a 1000 de unde.

Artefactele apărute în timpul examinării au fost numărate separat și rejectate automat de către program. Dacă numărul de unde rejectate a fost mai mare de 5% din numărul total al undelor înregistrate atunci procedura a fost reluată. Intervalul de selecție al undelor a fost cuprins între 20 și 1000 Hz.

Pentru fiecare traseu s-a urmărit marcarea  $N_0$ ,  $P_0$ ,  $N_a$ ,  $P_a$  și, unde a fost posibil a  $N_b$ .

### Rezultate

Pentru toți subiecții luați în studiu au putut fi recoltate și stocate pentru marcarea și prelucrare traseele cu undele ce arată răspunsul generat de structurile nucleare și aria corticală auditivă la trecerea stimulului auditiv. (fig. 1)



Figura 2.1 - Traseu MLR obținut la stimularea biauriculară la 80, 70 și 60 dB SPL la un câine metis. Sunt marcate undele  $N_0$ ,  $P_0$ ,  $N_a$ ,  $P_a$  și  $N_b$ . Unda  $N_0$  este precedată de undele potențiale evocate auditive ale trunchiului cerebral (BAER). După unda  $N_b$  începe traseul potențialelor evocate auditive cu unde lungi (LLR/SVR). Succesiunea undelor reflectă traseul parcurs de stimulul auditiv de la nivelul colicuilor caudali spre cortexul auditiv. Se observă faptul că odată cu scăderea intensității stimulului auditiv amplitudinea undelor scade.

Valorile latențelor MLP obținute au fost:  $N_0 = 4,83 \pm 0,53$  ms,  $P_0 = 9,01 \pm 0,1$  ms,  $N_a = 14,38 \pm 2,52$  ms,  $P_a = 26,2 \pm 1,12$  ms,  $N_b = 42,93 \pm 3,96$  și  $P_b = 58,46 \pm 11,07$  ms. Analiza statistică a detaliilor de mai sus a arătat că există un grad foarte ridicat de corelație ( $r > 0,9$ ;  $p < 0,05$ ) între perechile de unde cu aceeași polaritate  $N_0N_a$  (0,97),  $N_0N_b$  (-0,982),  $N_aN_b$  (-0,99),  $P_0P_b$  (-0,99) și pentru perechile  $N_aP_a$  (-0,92),  $P_aN_b$  (0,91) și un grad înalt de corelație ( $r = 0,7-0,9$  la  $p < 0,05$ ) pentru  $P_0P_a$  (-0,74) și  $P_aP_b$  (0,78).

### Identificarea metodologiei optime de înregistrarea a potențialelor auditive cu unde lungi (slow vertex response)

#### Material și metodă

Studiul a fost realizat pe 5 câini fără patologie neurologică din rase diferite (4 metiși, 1 Husky) cu o medie de vârstă de  $4 \pm 0,5$  ani. Procedurile de anestezie, aparatul și montarea

electrozilor a fost identică cu cea folosită pentru MLR. Stimulii aplicați la o rată de 0,5 cu timp de platou de 50 ms în modul undă unică. Frecvența tonului a fost de 4 kHz. Fiecare undă stocată a reprezentat media a 100 de stimulări.

Pentru fiecare undă s-a urmărit marcarea  $P_1$ ,  $N_1$ ,  $P_2$  și  $N_2$

### Rezultate

Traseul undelor la praguri diferite de intensitate și marcarea  $P_1$ ,  $N_1$ ,  $P_2$  și  $N_2$  sunt prezentate în figura 2. Valorile medii obținute pentru undele analizate la 80 dB au fost:  $P_1 = 75,33 \pm 37,3$  ms,  $N_1 = 131,5 \pm 49,62$  ms,  $P_2 = 203,5 \pm 23,25$  ms și  $N_2 = 247 \pm 6,144$  ms.

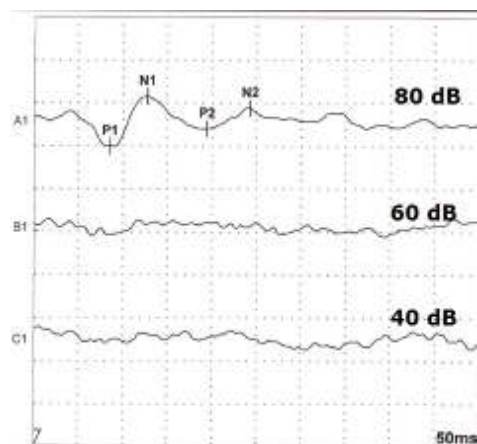


Figura 2.2 Traseul undelor SVR (slow vertex response) la un câine metis 4 ani. Se observă faptul că undele  $P_1$ ,  $N_1$ ,  $P_2$  și  $N_2$  sunt vizibile și au o morfologie netă doar la stimularea cu stimuli de 80 dB SPL. Odată cu scăderea pragului de intensitate se constată faptul că undele nu mai prezintă o morfologie caracteristică, fără posibilitatea de marcarea obiectivă a inflexiunilor pozitive și negative ale markerilor traseului. SVR ia naștere prin generarea de potențiale evocate la dispersarea pe ariile corticale nonauditive după părăsirea ariei cortexului auditiv.

Urmărind dacă între latențele obținute prin stimularea cu 80 dB SPL există o corelație statistică, la analiza datelor prin testul Pearson ( $p < 0,05$ ), coeficientul de corelație  $r$  a avut un grad foarte ridicat de corelație directă între perechile  $P_1N_1$  (0,952) și  $P_2N_2$  (0,947) și un grad ridicat pentru perechea  $P_1P_2$  (0,825).

Considerăm că înregistrarea MLR și SVR cu electrozi de suprafață la câinii sănătoși oferă o morfologie a undelor fidelă cu tehnica ce folosește electrozi tip ac cu implantare subcutanată. Aplicarea stimulilor a permis înregistrarea tuturor structurilor morfologice ale undelor oferind date concrete despre trecerea stimulului acustic prin structurile nucleare rostrale colicuilor caudali. Pentru MLR latențele obținute sunt mai mici decât cele raportate în literatură doar pentru  $N_0$  și  $P_0$ , fără a fi constatate diferențe pentru restul undelor. Răspunsurile generate pasajul cortical al stimulului acustic (indiferent dacă vorbim de MLR sau SVR) determină apariția unui răspuns vizibil și interpretabil, bine diferențiat pe traseele obținute ulterior aplicării unui stimul cu o intensitate de 80 dB SPL. Analiza morfologiei undelor este de cele mai multe ori subiectivă sau chiar imposibilă la intensități mai mici de 80 dB SPL undele având amplitudinea mult scăzută până la absența flexiunilor pozitiv/negativ pe traseul înregistrat.

Prin analiza morfologiei și latenței MLR și SVR putem concluziona că efectuarea acestui examen la câinii sănătoși a demonstrat statusul funcțional normal ale segmentelor de conducere și integrare ale sistemului auditiv. Undele MLR pot oferi informații pertinente asupra integrității morfofuncționale ale comportamentului bioelectric al cortexului auditiv. Prin urmare tehnica MLR poate fi folosit cu succes în interpretarea comportamentului bioelectric al parenchimului cerebral la câinii epileptici creând premisele depistării unor fenomene anteaccusale clinice sau subclinice (faza de aură ori atacuri parțiale nonconvulsive

fără pierderea conștienței) în care pot apare defecte de integrare ale informației auditive. Totodată traseul SVR poate fi folosit generic în toate cazurile de encefalopatii (epileptice sau nu) atâta vreme cât el este rezultatul „curgerii” și integrării impulsului auditiv în cortexul cerebral nonauditiv.

### **Identificarea metodologiei optime de examinare electroencefalografică**

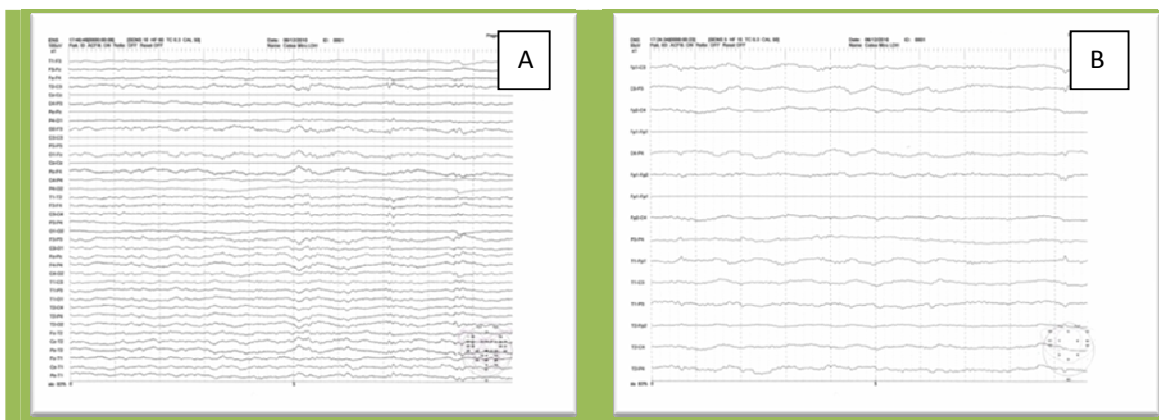
#### ***Material și metodă***

Studiul a fost realizat pe un lot de 5 câini de rasă comună fără patologii neurologice. Media de vârstă a fost de  $4 \pm 0,5$  ani. Liniștea examinatorie a fost asigurată prin constrângere chimică (inj.im. medetomidină 0,03 mg/kgc). Pacienții au fost așezați în decubit sternoabdominal. Examenul a fost realizat cu ajutorul Softului EEG computerizat Nihon Kohden. Parametrii de înregistrare au fost: impedanța  $< 10 \Omega$ , spectru de frecvență  $< 30$  Hz, high cut 60 Hz, sensibilitate 3. Electrozii folosiți au fost de tip cupă și au fost aplicați pe suprafața scalpului după tunderea, degresarea și aplicarea unei paste adezive speciale.

Inițial pentru fiecare pacient a fost realizată o EEG de ansamblu care a cuprins toate zonele encefalice (inclusiv rinencefalul) prin realizarea de canale între electrozi plasați pe lobiile prefrontali, frontali, temporali, parietali și occipitali. S-a urmărit realizarea de meridiane longitudinale (stânga, dreapta, central), transversale (rostral, central, aboral) precum și combinații între acestea. Ulterior, pentru o înregistrare mai fidelă a undelora fost restrânsă aria de colecție a semnalului doar pe ariile frontale/parietale/centrale/occipitale.

#### ***Rezultate***

Reprezentarea câtorva trasee înregistrate este prezentată în figura 2.1. În general, traseele înregistrate au caracterizat stadiu de somn cu tranziții de la stadiul de mișcare REM la non REM. Prin analiza traseelor înregistrate putem considera că anestezia cu medetomidină poate fi considerată o variantă viabilă ținând cont că nu au existat artefacte musculare iar liniștea operatorie este asigurată pentru cca 60 minute. De asemenea, previzualizarea inițială de ansamblu este favorabilă localizării pe când investigarea ulterioară cu un număr mai mic de canale de înregistrare dar care sunt plasate pe o arie cerebrală corespundentă mult mai specifică oferă posibilitatea de înregistrare mult mai fidelă a traseelor electrice din acel situs.



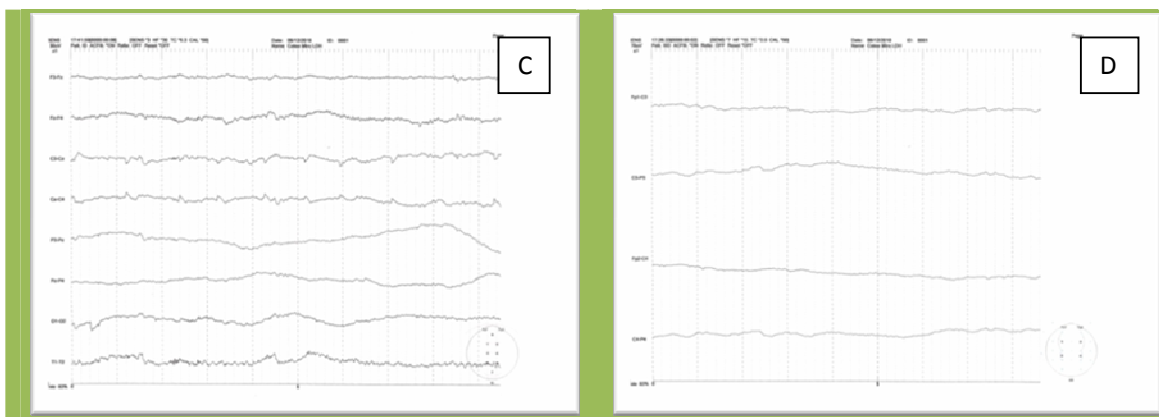


Figura 2.3. – Reprezentarea traseelor EEG obținute. A/B – vedere de ansamblu în 38/18 canale. C – traseu EEG cu 8 canale ale meridianelor transversale cerebrale. D – Traseu EEG 4 canale longitudinale (stânga, dreapta)

### A3. Identificarea metodologiei optime de apreciere a volumului cerebral la caine prin imagistica computer tomografica. Compararea datelor obtinute cu masuratori necropsice. Stabilirea relatiei de corespondenta intre imaginile CT si masuratorile necropsice

#### *Material și metodă*

#### *Aprecierea volumului cerebral prin examenul CT*

Au fost investigați 8 câini care nu prezentau simptomatologie neurologică cu afectare cerebrală. Câinii au fost adulți cu o medie de vârstă ( $4,25 \pm 2,18$  ani) de rase diferite: Bichon (3), Husky (2), Cocker (2), Ciobănesc German (1).

Examenul CT a fost realizat cu câinii poziționați sternoabdominal, sub anestezie generală indusă cu medetomidină 0,03 mg/kgc administrat inj. im. Imaginile CT au fost stocate și prelucrate după administrarea substanței de contrast în doză de 480 mg iod/kg cu o viteză de maxim 2 ml/s (Ohlerth S.,2007). Pentru fiecare câine a fost selectată secțiunea corespondentă ariei encefalice suprașelare unde atât diencefalul cât și creierul în întreg au avut diametrul cel mai mare. Atât pentru diencefal cât și pentru creier au fost măsurate manual cu ajutorul cursorului electronic și a softului Efilm înălțimea (I), lățimea (L) exprimate în cm și aria (A) exprimată în  $\text{cm}^2$ . Fiecare măsurătoare a fost efectuată de 3 ori.

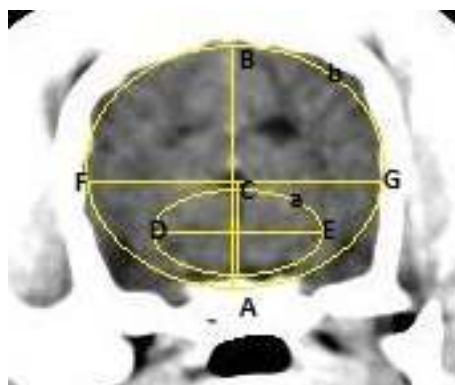


Figura 3.1. - Bichon, mascul, 2 ani.

Captură CT encefal transversal suprașelar după administrarea substanței de contrast.

Pe imagine sunt trasate liniile de măsurare.

- AB – înălțimea creierului (IC) (cm)
- AC – înălțimea diencefalului (ID) (cm)
- DE – lățimea diencefalului (LD) (cm)
- FG – lățimea creierului, (LC) (cm)
- a – aria diencefalului (AD) ( $\text{cm}^2$ ),
- b – aria cerebrală (AC) ( $\text{cm}^2$ ).

### *Aprecierea volumului cerebral prin măsurători necropsice*

Măsurătorile au fost realizate pe creierul a 6 câini de rase diferite: Peckinez (2), Doberman (1), Caniche (1), Fox terrier (1), Cocker (1) cu o medie de vârstă de  $2,83 \pm 1,46$  ani. Câinii eutanasiați au suferit de o patologie non-neurologică față de care proprietarii au declinat continuarea tratamentului sau nu a existat alternativă terapeutică. Câinii au fost eutanasiați cu soluție T61® iar creierul a fost prelevat imediat și plasat în soluție de formaldehidă 10%. Secționarea creierului a fost efectuată după 24 de ore. Secțiunea a fost realizată la nivel suprașelar, cu punct de reper inserția hipofizară. Măsurătorile au fost realizate manual iar pentru calculul ariei s-a folosit formula  $A = \pi \times I \times L$  unde I este înălțimea și L lățimea.

### *Analiza statistică*

Analiza statistică a datelor din grupul CT și din grupul Necropsic au fost efectuate separat. Indiferent de grup pentru fiecare pacient au fost interpretate măsurătorile directe (ID, IC, LD, LC, AD, AC). Ulterior au fost calculate și analizate rapoartele ID/IC, LD/LC și AD/AC. Pentru testarea omogenității valorile individuale au fost comparate prin intermediul **testului t** cu prag de semnificație statistică  $p < 0,05$ . Valorile obținute au fost ulterior exprimate atât medie (AV) cu standard deviație (SEDV) și medie cu **coeficient de încredere** (Cf. Inc) cu prag de semnificație de 0,05. Testarea ipotezei precum că o relație de corelație semnificativă există între valorile formațiunilor măsurate a fost determinat coeficientul de corelație **r Pearson**. Gradul de semnificație urmărit a fost de  $r \geq 0,7$  și  $p \leq 0,05$ .

### *Rezultate*

Analiza statistică între dimensiunile obținute individual pentru fiecare câine au arătat un grad înalt de omogenitate a rezultatelor neînregistrându-se diferențe semnificative statistic ( $p > 0,05$ ) între indivizi. Indiferent de pacientul studiat (rasă Bichon sau Ciobănesc German) rezultatele s-au grupat intim în jurul valorii medii, lotul având un grad ridicat de omogenitate (vezi Tabel 1). Valorile tuturor măsurătorilor efectuate (atât prin examen CT cât și prin cel necropsic) sunt prezentate în tabelul 1.

*Tabel 1 – prezentarea comparativă a valorilor medii a măsurătorilor cerebrale obținute prin examen computer tomografic și examen necropsic. Valorile medii sunt prezentate cu standard deviație (SDEV) și cu coeficientul de încredere (Cf Inc.)*

	Computer tomografie		Necropsie	
	M ± SDEV	M ± Cf inc.	M ± SDEV	M ± Cf inc.
<b>ID</b>	1,362 ± 0,176	1,362 ± 0,122	1,4 ± 0,081	1,4 ± 0,08
<b>LD</b>	2,337 ± 0,213	2,337 ± 0,147	2,05 ± 0,191	2,05 ± 0,187
<b>AD</b>	2,762 ± 0,377	2,762 ± 0,261	2,24 ± 0,194	2,24 ± 0,190
<b>IC</b>	3,8 ± 0,407	3,8 ± 0,28	3,32 ± 0,170	3,32 ± 0,167
<b>LC</b>	4,56 ± 0,287	4,56 ± 0,199	4,72 ± 0,25	4,72 ± 0,244
<b>AC</b>	15,662 ± 2,01	15,662 ± 1,394	12,51 ± 0,838	12,51 ± 0,821
<b>ID/IC</b>	0,353 ± 0,025	0,353 ± 0,017	0,42 ± 0,035	0,42 ± 0,034
<b>LD/LC</b>	0,508 ± 0,058	0,508 ± 0,04	0,432 ± 0,051	0,432 ± 0,050
<b>AD/AC</b>	0,172 ± 0,03	0,172 ± 0,02	0,179 ± 0,025	0,179 ± 0,025

Analiza statistică a datelor de mai sus a arătat faptul că nu există diferențe statistic semnificative între mediile obținute pe fiecare grup ( $p = 0,217$ ). Pentru majoritatea

parametrilor valoarea necropsică a fost de regulă mai mare decât cea înregistrată prin CT. Aceasta poate fi pusă pe faptul că la examenul CT structurile osoase par mai groase decât în realitate în condițiile în care sunt analizate în fereastră pentru creier. Dimensiunea reală a formațiunilor osoase este cel mai bine vizualizată în fereastra de os, dar aceasta nu permite vizualizarea parenchimului cerebral. Totodată, faptul ca la examenul CT am obținut o medie a IC mai mare decât cea obținută necropsic ( $3,8 \pm 0,28$  cm față de  $3,32 \pm 0,167$  cm), în mod firesc așteptările fiind inverse, se explică prin aceea că odată cu pregătirea encefalului pentru studiul necropsic, condiționarea sa cu formoldehidă 10% determină o deshidratare moderată al parenchimului cerebral. Scoaterea encefalului din cutia craniană determină, de asemeni, o modificare ușoară a morfologiei prin pierderea suportului osos.

*Tabel 2 - Coeficienții de corelare Pearson a măsurătorilor cerebrale realizate prin computer tomografie (orizontal) și necropsic (vertical). Se consideră  $r > 0,7$  grad de corelație ridicată, semnificativă și  $r > 0,9$  grad de corelație foarte puernic, intens semnificativ.*

r	ID	LD	AD	IC	LC	AC	ID/IC	LD/LC	AD/AC
<b>ID</b>	-	0,572	0,36	<b>0,85</b>	<b>0,783</b>	0,361	0,477	0,078	- 0,3
<b>LD</b>	-0,426	-	0,48	0,213	0,072	0,373	0,676	<b>0,832</b>	0,094
<b>AD</b>	0,230	<b>0,781</b>	-	0,176	0,195	0,168	0,415	0,316	<b>0,712</b>
<b>IC</b>	-0,239	-0,662	<b>-0,884</b>	-	<b>0,927</b>	<b>0,802</b>	-0,041	-0,319	-0,442
<b>LC</b>	-0,326	-0,034	-0,275	0,683	-	<b>0,876</b>	-0,055	-0,490	-0,449
<b>AC</b>	-0,443	-0,289	-0,626	<b>0,899</b>	<b>0,916</b>	-	0,222	-0,162	0,636
<b>ID/IC</b>	<b>0,802</b>	0,097	0,663	<b>-0,767</b>	-0,674	<b>-0,862</b>	-	0,636	0,189
<b>LD/LC</b>	-0,239	<b>0,866</b>	<b>0,773</b>	<b>-0,885</b>	-0,526	-0,687	0,383	-	0,336
<b>AD/AC</b>	0,348	0,624	<b>0,917</b>	<b>-0,989</b>	-0,634	<b>-0,885</b>	<b>0,823</b>	<b>0,823</b>	-

Totuși, chiar dacă la examenul necropsic corelațiile între valorile structurilor măsurate sunt mult mai multe decât în cazul examenului CT se remarcă faptul că pentru ID la examenul CT există o corelație directă și ridicată cu IC și LC.

Privind aceste date, putem concluziona că simpla măsurare a ID pe imaginea CT poate oferi indicii pertinente asupra valorilor IC și LC. Prin urmare determinarea ID, chiar singular, oferă date certe și deosebit de valoroase în aprecierea instalării și evoluției atrofiei cerebrale globale (apreciat dificil și subiectiv prin examen direct al imaginii CT).