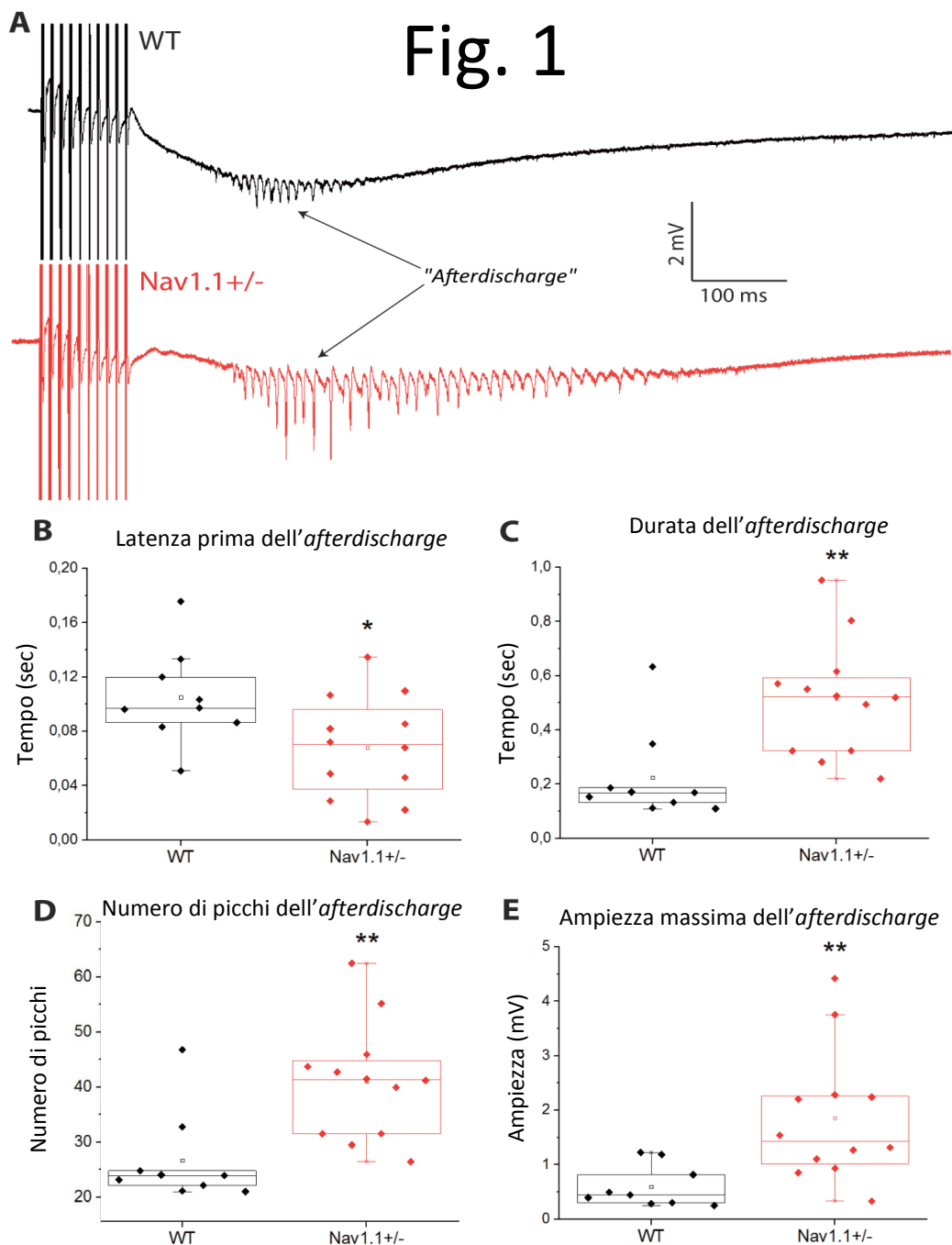


Ipereccitabilità indotta dell'ippocampo nel periodo pre-epilettico

Per il primo set di esperimenti abbiamo scelto di applicare un'intensa stimolazione elettrica, chiamata "stimolazione tetanica", per osservare l'eccitabilità della rete neurale. In effetti, tale stimolazione provoca una scarica di potenziali d'azione (PA) che si susseguono uno dopo l'altro. Ogni PA provoca il rilascio di neurotrasmettitori a causa dell'accumulo pre-sinaptico di calcio, il successivo PA provoca un ulteriore accumulo di calcio che si somma a quello dell'impulso precedente aumentando così il rilascio di neurotrasmettitori. Questo fenomeno di plasticità è chiamato "potenziamento tetanico" e può variare a seconda dell'eccitabilità della rete. Abbiamo quindi eseguito una stimolazione tetanica (100Hz) sui collaterali di Schaffer, negli animali WT (controllo) e Nav1.1+/- (Dravet) e registrato la risposta che consiste in una raffica di picchi (ogni picco corrisponde alla scarica di PA di diversi neuroni vicino all'elettrodo di registrazione, *population spike*) chiamata "scarica post-tetanica" (*Afterdischarge*), (Fig1A).



Lo studio di diversi parametri delle scariche post-tetano ha rivelato diverse differenze significative nelle risposte post-tetaniche registrate, nella zona di CA1, nelle sezioni dell'ippocampo da topi WT e Nav1.1+/- . In effetti, la latenza tra lo stimolo tetanico e l'inizio della risposta è più breve nell'ippocampo dei topi portatori della mutazione rispetto ai controlli (WT: 105 ± 12 ms, Nav1.1+/-: 68 ± 11 ms Test U di Mann Whitney * $p = 0,04$) (Fig. 1B) e la durata è significativamente più lunga nelle fette di topi eterozigoti rispetto al WT (WT: 224 ± 56 ms, Nav1.1+/-: 515 ± 62 ms, test Mann Whitney U ** $p = 5.10^{-3}$) (Fig. 1C). Inoltre, il numero di picchi che compongono la scarica post-tetanica è significativamente maggiore in Nav1.1+/- rispetto al WT (WT: 23 ± 5 punti, Nav1.1+/-: 48 ± 5 punti, test Mann Whitney U). ** $p = 4.10^{-3}$) (Fig. 1D), risultato simile ai dati ottenuti nell'articolo di "Liautard et al., 2013". Le ampiezze dei picchi sono anche maggiori per le fette di topo eterozigoti Nav1.1+/- rispetto a WT (WT: $0,6 \pm 0,1$ mV, Nav1,1 +/-: $1,9 \pm 0,3$ mV; Test U di Mann Whitney ** $p = 3.10^{-3}$) (Fig 1E). La rete ippocampale nelle fette cerebrali di topi con una mutazione eterozigote KO del gene SCN1A ha quindi una maggiore ipereccitabilità indotta rispetto alle fette di topi di controllo durante il periodo pre-epilettico. Questi risultati suggeriscono quindi che nel modello murino di sindrome di Dravet, durante il periodo che precede l'insorgenza delle convulsioni, sono state osservate attività spontanee di maggiore rilievo rispetto ai topi WT. I risultati ottenuti mostrano come l'ippocampo sia coinvolto direttamente nell'insorgenza delle crisi nel periodo epilettico, come in parte precedentemente dimostrato nel lavoro "Liautard et al., 2013".

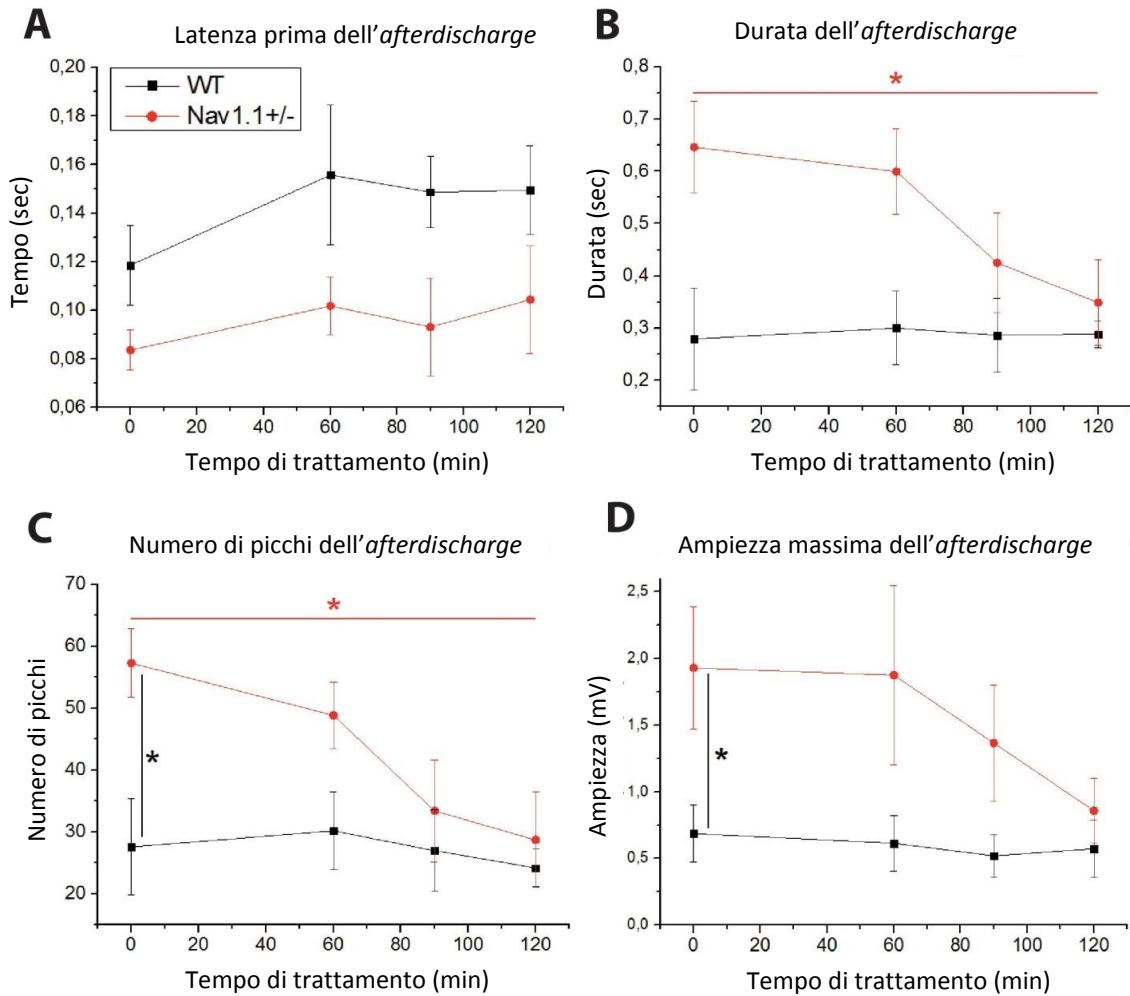
Effetto del peptide CCK sull'ipereccitabilità dell'ippocampo nel periodo pre-epilettico

La colecistochinina (CCK) è un peptide che regola l'assunzione di cibo nel tratto gastrointestinale, ma è presente anche nel cervello con funzione modulatoria dell'eccitabilità. Questo peptide viene rilasciato dagli interneuroni CCK+ ed esercita un effetto eccitatorio sugli interneuroni di parvalbumina (PV+) (Földy et al., 2007, Lee et al., 2011) che sono fortemente ipoeccitabili e compromessi dalla causa della mutazione nel gene SCN1A causante la sindrome di Dravet (Ogiwara et al., 2007). Noi ipotizziamo che l'ipereccitabilità degli interneuroni CCK+ possa essere il risultato di meccanismi di compensazione atti a controbilanciare l'ipoeccitabilità di altri interneuroni aumentandone l'effetto inibitorio. Abbiamo quindi ipotizzato che la CCK potesse potenziare l'attività dei neuroni PV+ e ridurre l'ipereccitabilità osservata nelle fette ippocampali di topi Nav1.1+/-.

Abbiamo valutato l'effetto della somministrazione di CCK sull'eccitabilità indotta nell'ippocampo. Per questo, le fette di cervello di ippocampo dei topi Nav1.1+/- e WT sono state perfuse con una soluzione contenente $100 \mu\text{M}$ di CCK e l'effetto sulle *Afterdischarge* post-tetaniche è stato analizzato a tempi diversi. È interessante notare che i risultati ottenuti, dopo 2 ore di trattamento con CCK, per le fette di cervello provenienti da topi Nav1.1+/-, mostrano una riduzione significativa della durata della risposta post-tetanica (Nav1.1+/- T = 0: 600 ± 90 ms, T = 2h: 349 ± 80 ms, test Mann Whitney U $p^* = 0,04$), paragonabile alla risposta ottenuta da topi WT (Nav1.1+/- T = 2h: 349 ± 80 ms, WT T = 2h, 289 ± 25 ms) (Fig. 2B). Risultato analogo si ottiene analizzando il numero di picchi che compone la scarica post-tetanica, che è significativamente ridotto nelle risposte dei topi mutanti (Nav1.1+/- T = 0: 57 ± 5 picchi; T = 2h: 29 ± 8 picchi, test Mann Whitney U $p^* = 0,01$), fino a raggiungere lo stesso numero del topo di controllo (Nav1.1+/- T = 2h: 29 ± 8 picchi, WT T = 2h: 29 ± 8 picchi) (Fig. 2C).

La latenza non sembra variare (Fig. 2A), mentre per quanto riguarda l'ampiezza, sembra esserci una riduzione della dimensione massima dei picchi registrati dai topi portanti la mutazione (Fig 2D).

Fig. 2



Non vediamo alcuna variazione nei parametri di risposta delle sezioni WT durante il tempo di somministrazione di CCK. Esperimenti di controllo hanno anche verificato che il tempo di incubazione della fetta non ha avuto alcun effetto sulle risposte post-tetaniche. Questi risultati mostrano che la CCK può ripristinare l'ipereccitabilità indotta a livello fisiologico nell'ippocampo del modello murino di Sindrome di Dravet durante il periodo pre epilettico.

Sono tuttora in corso gli esperimenti di microdialisi citati nel punto 1c del progetto e quelli dell'obbiettivo 2 di somministrazione intranasale di CCK. Tutti i risultati ottenuti verranno rendicontati alla fine del progetto ad aprile 2020.