

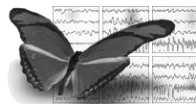
INFLAMMATIE EN EPILEPTOGENESE: EEN ROL VOOR URINEZUUR?

Pieter VAN LOO

Promotor: Prof. Dr. Kristl VONCK
Co-promotor: Dr. Robrecht RAEDT

Onderzoeksrapport 4^{de} proef geneeskunde
Voor "STAGE Wetenschappelijk onderzoek voor de ziekenhuisarts"
in het kader van de opleiding tot
ARTS

Reference Centre for Refractory Epilepsy



Laboratory for Clinical and Experimental Neurophysiology

INFLAMMATIE EN EPILEPTOGENESE: EEN ROL VOOR URINEZUUR?

Pieter VAN LOO

Promotor: Prof. Dr. Kristl VONCK
Co-promotor: Dr. Robrecht RAEDT

Onderzoeksrapport 4^{de} proef geneeskunde
Voor "STAGE Wetenschappelijk onderzoek voor de ziekenhuisarts"
in het kader van de opleiding tot
ARTS

Reference Centre for Refractory Epilepsy



Laboratory for Clinical and Experimental Neurophysiology

“De auteur en de promotor geven de toelating dit onderzoeksrapport voor consultatie beschikbaar te stellen en delen ervan te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting uitdrukkelijk de bron te vermelden bij het aanhalen van resultaten uit dit onderzoeksrapport.”

28 mei 2010

Pieter Van Loo

Prof. Dr. Kristl Vonck

Voorwoord

Eerst en vooral wil ik Prof. Dr. Boon en Prof. Dr. Vonck bedanken om mij de kans te bieden om aan dit onderzoek mee te werken.

Daarnaast zou ik graag Dr. Robrecht Raedt bedanken voor de uitstekende begeleiding en hulp bij het opzetten van dit experiment. Ook de andere medewerkers van het labo voor klinische en experimentele neurofysiologie waren steeds bereid om uitleg te verstrekken en een helpende hand toe te steken.

Vervolgens zou ik graag nog enkele mensen bedanken voor de technische ondersteuning bij het bepalen van de urinezuurconcentratie zoals Dr. Mirjam Kool (Labo Immunologie) voor de begeleiding bij het gebruik van de Amplex Red Uricase/ Uric Acid Assay en mevrouw Maria Van Landschoot en mevrouw Maria Waterloos (Labo Nefrologie) voor het uitvoeren van urinezuurmetingen met High Performance Liquid Chromatography.

Tot slot wil ik nog meneer Conor McGuire (Vlaams Instituut voor Biotechnologie) vermelden voor zijn hulp bij de bepaling van inflammatoire merkers ter hoogte van de hippocampus.

Inhoudstafel

Abstract.....	1
1. Inleiding en doelstellingen.....	2
1.1. Epilepsie.....	2
1.1.1. Epidemiologie en indeling.....	2
1.1.2. Etiopathogenese.....	2
1.1.3. Behandeling.....	3
1.2. Mesiale temporale kwab epilepsie.....	3
1.2.1. Algemeen.....	3
1.2.2. Epileptogenese bij MTLE.....	4
1.2.3. Diermodel voor temporale kwab epilepsie.....	4
1.3. De rol van inflammatie bij epilepsie en epileptogenese.....	5
1.3.1. Klinische studies.....	5
1.3.2. Interleukines in het centraal zenuwstelsel.....	5
1.3.3. Het inflammasoom.....	6
1.4. Urinezuur als merker van ziekte.....	7
1.4.1. Diermodellen.....	8
1.4.2. Klinische studies.....	9
1.4.3. Mogelijke fysiologische effecten.....	9
1.4.4. Hypothese over de fysiologische effecten van urinezuur.....	10
1.5. Effect van allopurinol.....	11
1.5.1. Diermodellen.....	11
1.5.2. Klinische studies.....	12
1.5.3. Mogelijke werkingsmechanismen.....	13
1.6. Doelstellingen.....	14
2. Materialen en methoden.....	15
2.1. Proefdieren.....	15
2.2. Operatieprotocol.....	15
2.2.1. Operatie en protocol voor in vitro bepaling van urinezuur.....	15
2.2.2. Operatie en protocol voor in vivo bepaling van urinezuur.....	16
2.3. Microdialyse en video-EEG opstelling.....	18
2.4. Verwijderen van de hippocampus.....	18
2.5. Homogenisatie hippocampus en bepaling eiwitconcentratie.....	18
2.6. Bepaling urinezuurconcentratie.....	18
2.6.1. Amplex Red Uric Acid/Uricase Assay Kit.....	18
2.6.2. High performance liquid chromatography (HPLC).....	19
2.7. q-PCR voor de bepaling van inflammatoire parameters.....	19
2.8. Data-analyse en statistiek.....	19

3. Resultaten.....	21
3.1. In vitro bepaling van urinezuur op gepreleveerde hippocampi....	21
3.2. In vivo bepaling van urinezuur met meting van inflammatoire merkers	22
3.2.1. Aantal en gemiddelde duur epileptische aanvallen.....	22
3.2.2. Overzicht wijzigingen in urinezuurconcentratie.....	23
3.2.3. Optreden van spontane aanvallen.....	24
3.2.4. Inflammatie.....	25
4. Discussie en toekomstperspectieven.....	26
5. Referenties.....	32

Abstract

Inleiding. Mesiale temporale kwab epilepsie ('Mesial Temporal Lobe Epilepsy', MTLE) is één van de meest voorkomende vormen van refractaire epilepsie en wordt gekenmerkt door het ontstaan van een epileptische aanval ter hoogte van de hippocampus. Recent werd de rol van inflammatie bij epilepsie en epileptogenese vastgesteld in een diermodel voor MTLE, waarbij er vooral een rol werd toegeschreven aan IL-1 β . Bij inflammatie kan IL-1 β maar ook IL-18 geactiveerd worden door caspase-1 dat op zijn beurt wordt geactiveerd door het inflammasoom NALP-3. NALP-3 kan geactiveerd worden door verschillende endogene gevaarsignalen zoals urinezuur in associatie met TNF- α . Onderzoek naar de precieze fysiologische functie van inflammatie bij MTLE kan nieuwe perspectieven openen voor de behandeling van MTLE en kan mogelijk ook een invloed uitoefenen op epileptogenese.

Doelstellingen. We zullen nagaan of er een effect optreedt bij het blokkeren van het gevaarsignaal urinezuur op de aanwezigheid van inflammatie ter hoogte van de hippocampus na kinaat geïnduceerde status epilepticus. De hoeveelheid inflammatie zal worden nagegaan onder de vorm van de aanwezigheid van de cytokines IL-1 β en IL-18 gezien zij geactiveerd worden door het inflammasoom NALP-3 en TNF- α dat een rol speelt bij activatie van NALP-3 zelf.

Methoden. Bij C57BL/6 muizen (n = 14) worden er een microdialyse canule, een bipolaire diepte-elektrode, een scalpelektrode en een aardingselektrode ingeplant. Eén week na de ingreep worden deze muizen aan de microdialyse-opstelling en video/EEG-registratie-eenheid bevestigd. Microdialysetalen worden gecollecteerd aan een flowrate van 1,25 μ l/min gedurende 50 minuten. Na 3 baselinestalen wordt de controlegroep (n = 7) intraperitoneaal geïnjecteerd met 220 μ l 10 % Tween oplossing en de experimentele groep (n = 7) met 100 mg/kg allopurinol opgelost in 220 μ l 10 % Tween oplossing. Dertig minuten na deze injectie wordt 4 μ l kinaatoplossing (2 mM) geïnfuseerd via de microdialyseprobe waarna er opnieuw stalen gecollecteerd worden. Vierentwintig uur na de start van de status epilepticus worden de muizen geëuthanaseerd en de hippocampi verwijderd en bewaard in vloeibare stikstof.

Resultaten. Tijdens de eerste 2 microdialyse staalnames na kinaatinfusie wordt er een sterke stijging waargenomen van de urinezuurconcentratie in de controlegroep. In de experimentele groep wordt deze stijging effectief onderdrukt door allopurinol 100 mg/kg. Er wordt voor de drie cytokines een daling vastgesteld in de behandelde groep. Deze daling is echter enkel statistisch significant bij TNF- α (P < 0.05). Zowel bij IL-1 β als bij IL-18 wordt er wel een duidelijke trend waargenomen, met P-waarden van respectievelijk 0.08 en 0.08.

1. Inleiding en doelstellingen

1.1. Epilepsie

1.1.1. Epidemiologie en indeling

Epilepsie is een van de meest voorkomende neurologische aandoeningen na cerebrovasculaire acciden-
danten (CVA's) en treft ongeveer 0,8 % van de populatie. De diagnose epilepsie wordt slechts gesteld
bij het herhaaldelijk voorkomen van een epileptische aanval. Deze kunnen we definiëren als een
stoornis van het gedrag en/of bewustzijn door abnormaal overmatige of synchrone ontladingen van
een groep neuronen. Afhankelijk van de lokalisatie van deze groep neuronen kan een aanval variëren
van een korte bewustzijnsdaling tot een gegeneraliseerd tonisch-clonisch insult (Pitkänen en Lukasiuk,
2009).

Epileptische aanvallen worden geclassificeerd in twee categorieën, namelijk partiële en gegenerali-
seerde aanvallen, gebaseerd op de klinische symptomen. Partiële aanvallen ontstaan vanuit een
groep neuronen gelokaliseerd in één hersenhemisfeer en worden onderverdeeld in enkelvoudige of
complex partiële aanvallen. In tegenstelling tot complex partiële aanvallen veroorzaken enkelvoudig
partiële aanvallen geen stoornissen van het bewustzijn. Zowel enkelvoudig als complex partiële aan-
vallen kunnen een secundair gegeneraliseerde aanval veroorzaken die niet meer dan enkele minuten
aanhoudt. Primair gegeneraliseerde aanvallen daarentegen ontstaan door paroxysmale ontladingen
van neuronen gelokaliseerd in beide hemisferen die zich kunnen manifesteren als tonisch-clonische
aanvallen met bewustzijnsverlies (grand mal). Status epilepticus (SE) ten slotte, die zowel partieel als
gegeneraliseerd kan zijn, is een toestand van continue aanvalsactiviteit die vijf minuten of langer
duurt (Sharma et al., 2007).

1.1.2. Etiopathogenese

In een aantal gevallen is epilepsie aangeboren en spreekt men van idiopathische epilepsie. In een
beperkt aantal gevallen wordt deze veroorzaakt door genetische afwijkingen. In ongeveer 30% van
de patiënten met epilepsie is er echter een identificeerbare oorzaak terug te vinden en spreken we
over symptomatische epilepsie. Mogelijke oorzaken zijn CVA's, hersentraumata, infecties en langdu-
rige koortsstuipen. Bij 30% van de patiënten neemt men aan dat er een hersenpathologie aan de
basis ligt die nog niet aangetoond kan worden. In dit geval spreekt men van cryptogene of veronder-
steld symptomatische epilepsie.

De periode tussen het oorspronkelijk hersenletsel en het optreden van symptomatische epilepsie
wordt epileptogenese genoemd. Onze kennis van epileptogenese komt voornamelijk van studies bij
proefdieren waar onderzoek werd verricht naar status epilepticus geïnduceerde epileptogenese.
Deze modellen geven immers aanleiding tot veranderingen die gelijkaardig zijn aan deze die men

terugvindt in geresceerd temporale kwabweefsel bij patiënten die een chirurgische ingreep hebben ondergaan omwille van refractaire temporale kwab epilepsie. Uit deze studies blijkt dat verschillende moleculaire mechanismen tijdens epileptogenese aanleiding geven tot cellulaire veranderingen. Zo heeft men onder meer aangetoond dat er neurodegeneratie optreedt ter hoogte van de hilus, de CA1 en CA3 pyramidale cellaag en de interneuronen. Naast deze neurodegeneratie treffen we ook neurogenese, gliose, axonale groei onder de vorm van mossy fiber sprouting, axonale schade, dendritische plasticiteit, angiogenese, veranderingen in de extracellulaire matrix en verworven afwijkingen aan de ionenkanalen aan. Wat de precieze rol is van deze verschillende factoren tijdens epileptogenese dient nog verder onderzocht te worden (Pitkänen en Lukasiuk, 2009).

1.1.3. Behandeling

De behandeling van epilepsie is puur symptomatisch. Er bestaan namelijk nog geen geneesmiddelen die curatief zijn of die epileptogenese verhinderen. Voor de behandeling wordt gebruik gemaakt van verschillende anti-epileptica (anti-epileptic drugs, AEDs). Ondanks deze symptomatische behandeling is ongeveer 20 tot 30 procent van de patiënten refractair aan de ingestelde therapie. Dit betekent dat er geen aanvalsreductie kan worden waargenomen bij accurate inname van ten minste twee verschillende anti-epileptica. In bepaalde gevallen kan men dan opteren voor epilepsiechirurgie, wanneer er een duidelijke epileptogene focus kan geïdentificeerd worden. Een andere optie is het gebruik van neurostimulatie die de aanvalsactiviteit onderdrukt ter hoogte van de linker nervus vagus of ter hoogte van diepe hersenkernen (Deep Brain Stimulation, DBS). Daarenboven moeten de patiënten ook rekening houden met een aantal preventieve maatregelen zoals onder andere het voorkomen van slaapttekort, overmatig alcoholgebruik, lawaai en sterke variaties in lichtintensiteit.

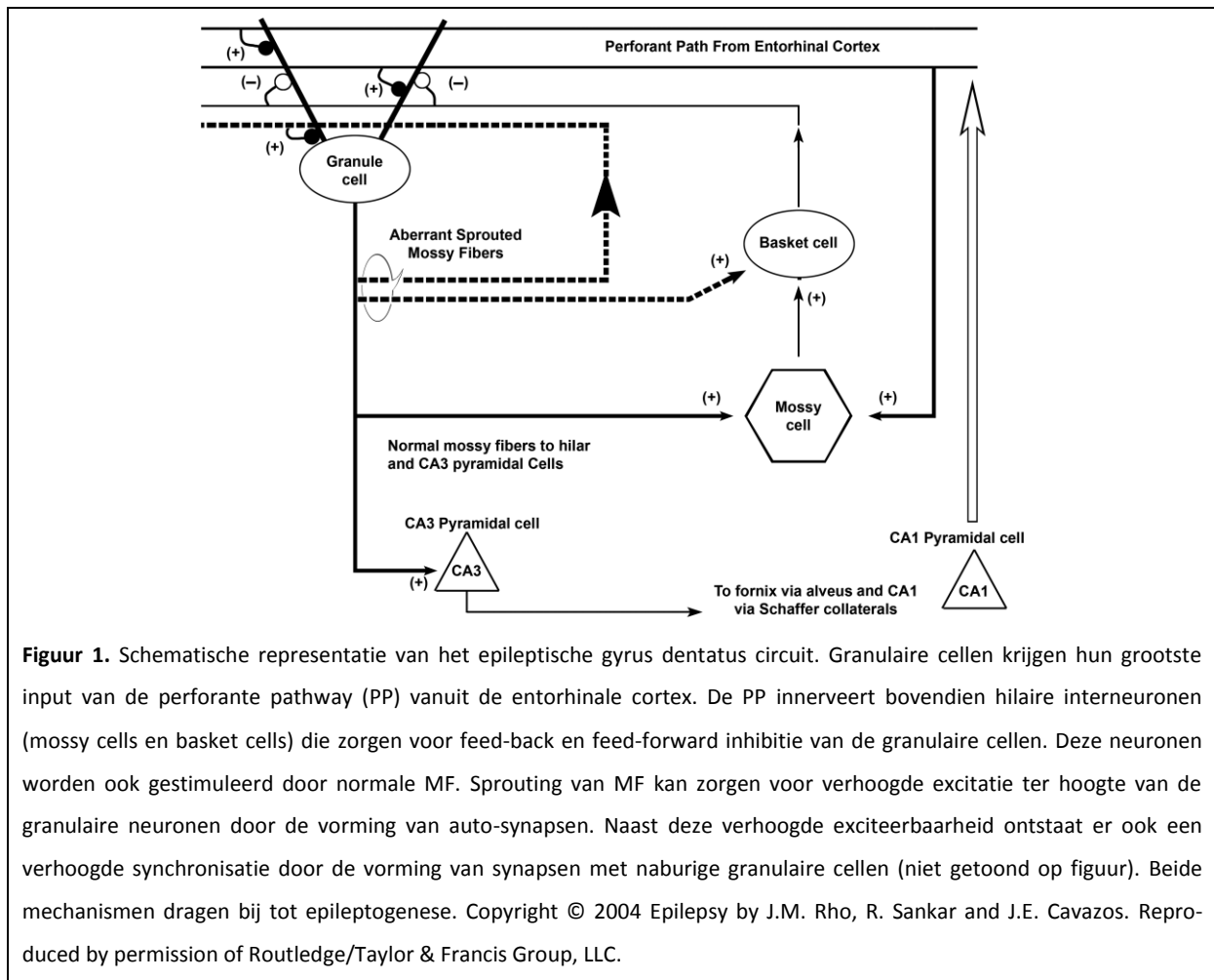
1.2. Mesiale temporale kwab epilepsie

1.2.1. Algemeen

Temporale kwab epilepsie (Temporal Lobe Epilepsy, TLE) is de meest voorkomende vorm van epilepsie bij volwassenen en manifesteert zich onder de vorm van partiële aanvallen met of zonder secundaire generalisatie. Mesiale temporale kwab epilepsie (MTLE) is één van de meest voorkomende vormen van TLE en wordt gekenmerkt door het ontstaan van een epileptische aanval ter hoogte van de mesiale temporale kwab in de hippocampus. In de meeste gevallen wordt er aangenomen dat MTLE een vorm is van symptomatische epilepsie die optreedt 5 tot 10 jaar na een initiële schadelijke gebeurtenis (Sharma et al., 2007). Patiënten met MTLE vormen de grootste groep van patiënten met partiële epilepsie die refractair zijn aan behandeling. Tot 75% van de patiënten met MTLE reageren namelijk niet of onvoldoende op de toediening van AEDs. MTLE wordt door sommige auteurs dan ook beschouwd als een chirurgische aandoening, gezien 60 tot 80% van de patiënten aanvalsvrij is na een heelkundige ingreep (Spencer, 2002).

1.2.2. Epileptogenese bij MTLE

Eén van de meest aanvaarde hypothesen over epileptogenese bij MTLE is de recurrente excitatie hypothese. Hierbij gaat men ervan uit dat spontane aanvallen ontstaan als gevolg van een overmatige excitatie van granulaire cellen ter hoogte van de gyrus dentatus. Deze hyperexcitabiliteit wordt veroorzaakt door wijzigingen in het hippocampale circuit ten gevolge van aberrante mossy fiber (MF) sprouting (figuur 1). Deze maken namelijk opnieuw synaps met de granulaire cellen van de gyrus dentatus en geven aanleiding tot het ontstaan van spontane aanvallen vanuit de hippocampus (Sharma et al., 2007).



Figuur 1. Schematische representatie van het epileptische gyrus dentatus circuit. Granulaire cellen krijgen hun grootste input van de perforante pathway (PP) vanuit de entorhinale cortex. De PP innerveert bovendien hilaire interneuronen (mossy cells en basket cells) die zorgen voor feed-back en feed-forward inhibitie van de granulaire cellen. Deze neuronen worden ook gestimuleerd door normale MF. Sprouting van MF kan zorgen voor verhoogde excitatie ter hoogte van de granulaire neuronen door de vorming van auto-synapsen. Naast deze verhoogde exciteerbaarheid ontstaat er ook een verhoogde synchronisatie door de vorming van synapsen met naburige granulaire cellen (niet getoond op figuur). Beide mechanismen dragen bij tot epileptogenese. Copyright © 2004 Epilepsy by J.M. Rho, R. Sankar and J.E. Cavazos. Reproduced by permission of Routledge/Taylor & Francis Group, LLC.

1.2.3. Diermodel voor temporale kwab epilepsie

De meest gebruikte diermodellen voor MTLE zijn post-status epilepticus modellen gezien deze sterke gelijkenissen vertonen met klinische manifestaties van MTLE bij mensen, waar een acute uitlokkende gebeurtenis gevolgd wordt door een latente periode met vervolgens het ontwikkelen van spontane aanvallen. Kainaat (KA) is één van de eerste gebruikte chemoconvulsiva in modellen voor MTLE. Het is een cyclisch analoog van L-glutamaat en een agonist van ionotrope, non-NMDA glutamaat AMPA en KA-receptoren. KA heeft een ongeveer 100 maal hogere affiniteit dan L-glutamaat voor deze twee

receptoren. Het wordt voornamelijk systemisch of intracerebraal toegediend en veroorzaakt een aanhoudende neuronale depolarisatie die een status epilepticus uitlokt. Deze SE geeft ook aanleiding tot veranderingen ter hoogte van de hippocampus die gelijkaardig zijn aan deze die men terugvindt in geresceerde hippocampi van patiënten met MTLE. Er zijn dus zowel klinisch als histologisch voldoende overeenkomsten om te besluiten dat het kainaamodel representatief is voor patiënten met MTLE (Sharma et al., 2007).

1.3. De rol van inflammatie bij epilepsie en epileptogenese

1.3.1. Klinische studies

Naast voorvernoemde factoren heeft recent onderzoek aangetoond dat er ook een niet onbelangrijke rol lijkt weggelegd te zijn voor inflammatie bij epilepsie. Experimentele en klinische studies bewijzen namelijk dat verschillende inflammatoire markers aanwezig zijn in het cerebrospinaal vocht en bloed van patiënten. Meer bepaald toont ook de analyse van hersenweefsel van individuen met epilepsie van verschillende etiologieën de aanwezigheid van een chronische inflammatoire toestand. Deze observaties, samen met het feit dat er een anticonvulsief effect kan worden waargenomen bij gebruik van sommige anti-inflammatoire geneesmiddelen, suggereren dat inflammatie betrokken kan zijn bij de etiopathogenese van epilepsie (Vezanni en Granata, 2005).

1.3.2. Interleukines in het centraal zenuwstelsel

Ravizza et al. (2008) hebben de rol van inflammatie nagegaan tijdens epileptogenese in een status epilepticus geïnduceerd model voor temporale kwab epilepsie. Zij hebben kunnen aantonen dat inflammatie persisteert tot lang na het verdwijnen van de status epilepticus en dus nog aanwezig is tijdens epileptogenese. Er lijkt vooral een rol weggelegd te zijn voor interleukine 1 β (IL-1 β) en IL-1 β receptor type I, die beiden opgereguleerd zijn tijdens epileptogenese en het optreden van epilepsie voorafgaan. Spontane aanvallen kunnen vervolgens deze inflammatoire toestand onderhouden. Bijkomende argumenten voor de rol van IL-1 β worden geleverd door het feit dat toediening van IL-1 β de totale aanvalsduur verlengt (Vezanni et al., 1999) en toediening van IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) (Vezanni et al., 2000) zorgt voor een vermindering van de totale aanvalsduur, een daling van de tonische aanvallen en het later optreden van de aanvallen. Dezelfde effecten worden waargenomen bij inhibitie van het enzym caspase-1, dat zorgt voor omzetting van pro-IL-1 β naar IL-1 β (Ravizza et al., 2006). Er zijn echter ook enkele studies die geen proconvulsieve rol maar een anticonvulsief effect aantonen van IL-1 β (Miller et al., 1991; Sayyah et al., 2005).

Naast IL-1 β lijkt er ook een rol weggelegd te zijn voor IL-18, dat deel uitmaakt van dezelfde IL-1 familie. Studies hebben namelijk aangetoond dat IL-18 tussenkomt bij neuro-inflammatie en neurodegeneratie onder pathologische omstandigheden zoals bacteriële en virale infecties, auto-immune aandoeningen, ischemie en trauma capitis (Felderhoff-Mueser et al., 2005). Er zijn ook reeds enkele on-

derzoeken uitgevoerd die nagaan of IL-18 een rol speelt bij kainaat geïnduceerde neurodegeneratie en inflammatie. Bij deze onderzoeken werd er in de hippocampus van muizen een toename van IL-18 vastgesteld drie dagen na toediening van kainaat (Jeon et al., 2007). Een andere onderzoeksgroep kon ook aantonen dat toediening van IL-18 voor injectie met kainaat de effecten verergerde. Bij IL-18 KO muizen bleek echter dat zij gevoeliger waren voor de toediening van kainaat dan wild type muizen gezien 1 week na deze toediening er meer neuronale degeneratie werd vastgesteld ter hoogte van de hippocampus. Deze tegenstrijdige resultaten werden verklaard door het feit dat de afwezigheid van IL-18 aanleiding gaf tot een compensatoire toename van IL-12 en IFN- γ (Zhang et al., 2007).

1.3.3. Het inflammasoom

Waar nog maar weinig onderzoek naar is verricht, is de initiële trigger van de inflammatoire respons tijdens epileptogenese en dus de activatie van verschillende cytokines wanneer de uitlokkende factor geen microbiologische oorzaak blijkt te zijn, zoals in het geval van trauma capitis of CVA. Een mogelijke verklaring kunnen we vinden bij het inflammasoom, dat een onderdeel vormt van het aangeboren immuunsysteem. Dit is naast de eerste verdedigingslinie tegen pathogenen namelijk ook betrokken bij het ontstaan van een inflammatoire reactie in steriele omstandigheden.

Dendritische cellen en macrofagen dragen bij tot de aangeboren immunerespons door het waarnemen van structuren van micro-organismen (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) en gevaarsignalen (damage-associated molecular patterns, DAMPs) die de synthese van pro-inflammatoire cytokines induceren. Bij een infectie wordt de inductie van deze pro-inflammatoire cytokines veroorzaakt door de activatie van receptoren, zoals extracellulaire Toll-like receptors (TLRs) en intracellulaire Nod-like receptors (NLRs), die in staat zijn om zowel geconserveerde microbiële structuren als gevaarsignalen te herkennen. Over het mechanisme waardoor inflammatie ontstaat en wordt onderhouden in een steriel milieu is minder geweten.

Recent onderzoek heeft echter aangetoond dat er bij inflammatie een belangrijke rol is weggelegd voor enkele leden van de NLR familie die in staat zijn om zonder tussenkomst van micro-organismen een immunerespons uit te lokken. Het gaat hier onder andere over Nlrc4 en Nlrp3. Deze twee NLRs kunnen een groot multi-proteïnecomplex vormen, inflammasoom genaamd, dat het enzym pro-caspase-1 omzet in zijn biologisch actieve vorm, caspase-1. Op zijn beurt zet dit vervolgens pro-IL-18 om naar IL-18 en pro-IL-1 β naar IL-1 β , één van de belangrijkste pro-inflammatoire cytokines. Vooral Nlrp3 (ook cryopyrine en NALP-3 genoemd) is belangrijk voor de activatie van caspase-1 bij macrofagen die gestimuleerd worden door DAMPs zoals ATP, urinezuurkristallen, asbest en silicaatpartikels. Het is echter onwaarschijnlijk dat al deze substanties op een directe manier het inflammasoom activeren. Het is veel waarschijnlijker dat NALP-3 geactiveerd wordt door een gemeenschappelijk intracellulair gevaarsignaal, zoals een lage intracellulaire kaliumconcentratie of een toename van het en-

dogeen gesynthetiseerde urinezuur. Beschadigde cellen degraderen namelijk snel het aanwezige RNA en DNA en de vrijgestelde purines worden omgezet naar urinezuur. De toegenomen hoeveelheid urinezuur leidt vervolgens niet enkel tot een toename van het aantal natriumuraatkristallen maar ook tot activatie van NALP-3. Bij inhibitie van dit endogene gevaarsignaal in vivo werd reeds aangetoond dat er minder inflammatie optreedt bij celschade (Trendelenburg, 2008; Martinon et al., 2009). Vrijstelling van urinezuur bij status epilepticus, hoofdtrauma of CVA kan dus leiden tot een inflammatoire respons.

De aanwezigheid van DAMPs zoals ATP en urinezuur is echter onvoldoende om caspase-1 te activeren in afwezigheid van PAMPs. Franchi et al. (2009) hebben aangetoond dat er voor ATP en silicaatpartikels een extra stimulus aanwezig dient te zijn onder de vorm van TNF- α . Het pro-inflammatoir effect van ATP wordt namelijk teniet gedaan door afwezigheid van TNF receptor I en II. Hun resultaten bewijzen ook dat TNF- α een effect uitoefent op de transcriptiefactor NF- κ B en genexpressie, gezien inhibitie van de eiwitsynthese na stimulatie met TNF- α geen aanleiding geeft tot activatie van caspase-1. Dit toont aan dat er dus een effect is op genen die een rol spelen bij de activatie van NALP-3. Naast TNF- α kunnen ook IL-1 α en IL-1 β zelf voor deze extra stimulus zorgen, vermoedelijk door een positief feedback mechanisme op TNF- α . Deze hypothese wordt afgeleid uit feit dat monocyten van patiënten met auto-immune aandoeningen veroorzaakt door mutaties in NALP-3 een toename van TNF- α vertonen na een initiële IL-1 β stijging. Waarschijnlijk geldt dit effect van TNF- α ook voor de activatie van het inflammasoom door urinezuur.

Rest nog de vraag hoe TNF- α geactiveerd wordt, gezien dit aanwezig is onder de vorm van een homotrimeer transmembranair eiwit, dat slechts wordt vrijgesteld door activatie van TNF- α convertase (TACE/ADAM17). Onderzoek heeft aangetoond dat dit eiwit ook aanwezig is in het centraal zenuwstelsel en daar niet enkel bij infectie een belangrijke rol speelt bij de vrijstelling van TNF- α . Er treedt namelijk ook een sterke upregulatie van TACE op bij in vitro glucose-zuurstof deprivatie en bij toediening van glutamaat aan corticale celculturen van ratten (Hurtado et al., 2002).

1.4. Urinezuur als merker van ziekte

Urinezuur is een zwak zuur dat in de extracellulaire ruimte voorkomt als natriumuraat. De hoeveelheid hangt af van de opname van purines via de voeding, urinezuur biosynthese en de snelheid van de renale urinezuurexcretie. Urinezuur wordt gesynthetiseerd uit purines door het enzym xanthineoxidase. In de meerderheid van de zoogdieren wordt urinezuur vervolgens omgezet tot allantoïne door uraat-oxidase (uricase). Allantoïne wordt dan via de urine uit het lichaam verwijderd (Waring et al., 2000). Tijdens het Mioceen (23 tot 6 miljoen jaar geleden) traden er twee verschillende mutaties op die resulteerden in een niet-functioneel uricasegen. Dit leidde dus tot het feit dat we bij mensen,

mensapen en enkele Nieuwe Wereld apen een hogere concentratie urinezuur terugvinden dan bij andere zoogdieren, gezien zij het enzym uricase missen (Wu et al., 1992).

Verscheidende studies hebben aangetoond dat wijzigingen in de urinezuurconcentratie een rol spelen bij enkele ziekten. Zo komt een verhoging van de concentratie urinezuur voor bij jicht, hypertensie en cardiovasculaire en renale aandoeningen en een verlaagde concentratie bij multiple sclerose (MS), de ziekte van Alzheimer en optische neuritis. Lange tijd heeft men gedacht dat urinezuur enkel een merker was van deze aandoeningen. Recente onderzoeken tonen echter aan dat er voor urinezuur ook een rol is weggelegd bij de ontwikkeling of progressie van deze ziekten (Kutzing en Firestein, 2008). Bijgevolg is de manipulatie van de serum urinezuurconcentratie een mogelijke strategie voor de behandeling van deze aandoeningen (tabel 1).

Urinezuurconcentratie verminderen als behandeling	Urinezuurconcentratie verhogen als behandeling	Ziekten geassocieerd met een verhoogde urinezuurconcentratie	Ziekten geassocieerd met een verlaagde urinezuurconcentratie
Jicht	Ruggenmergletsel	Jicht	Multiple sclerose
Cardiovasculaire aandoeningen	Multiple sclerose	Nierziekten	Ziekte van Parkinson
Hypertensie	Andere neurodegeneratieve aandoeningen	Hypertensie	Alzheimer
Nierziekten		Cardiovasculaire aandoeningen	Kanker

Tabel 1. Behandelingen met en veranderingen in urinezuur concentratie.

Naar de rol van urinezuur bij epilepsie is nog maar weinig onderzoek verricht. Resultaten van Layton et al. (1997) wijzen erop dat bij het optreden van aanvallen geïnduceerd door een injectie met kaina, er een verdubbeling van de urinezuurconcentratie kan vastgesteld worden ter hoogte van de piriforme cortex bij ratten. Wanneer er echter tegelijk met kaina, midazolam werd toegediend, was er geen stijging van de urinezuurconcentratie waar te nemen. Dit toont aan dat deze stijging niet enkel te wijten is aan de kaina toediening, maar vooral aan het optreden van aanvallen.

1.4.1. Diermodellen

Experimenten bij proefdieren bewijzen dat urinezuur inderdaad een protectieve rol kan spelen bij neurodegeneratieve aandoeningen. Zo is aangetoond dat urinezuur hippocampale neuronen beschermt tegen glutamaat gemedieerde excitotoxiciteit in celculturen (Yu et al., 1998) en corticale neuronen tegen peroxynitriet veroorzaakte celschade (Trackey et al., 2001). Ook behandeling met urinezuur in een muismodel van MS vertraagt de progressie van deze ziekte (Hooper et al., 1998) en bij schade aan neuronen van het ruggenmerg wordt er een positief effect opgemerkt (Scott et al., 2005; Du et al., 2007). Guerreiro et al. (2009) ten slotte, tonen een beschermend effect aan van uri-

nezuur ten opzichte van dopaminerge neuronen in het mesencephalon, die een rol spelen bij de ziekte van Parkinson.

1.4.2. Klinische studies

Uit onderzoeken die reeds werden uitgevoerd bij patiënten met neurodegeneratieve aandoeningen en cerebrovasculaire accidenten (CVA's) blijkt dat de rol van urinezuur niet eenvoudig te verklaren is. Zoals eerder vermeld is er vastgesteld dat een hogere concentratie urinezuur eerder neuroprotectief werkt in diermodellen. Dit werd bevestigd bij patiënten met MS gezien er een beschermend effect werd waargenomen door de toediening van inosine, een precursor van urinezuur (Markowitz et al., 2009). Dit bewijst echter niet dat een tekort aan urinezuur bijdraagt tot de ontwikkeling van MS, gezien het ook enkel een secundaire merker van oxidatieve stress kan zijn. Er zijn namelijk verschillende studies die de urinezuurconcentratie bepalen bij patiënten met MS en er wordt niet altijd een gedaalde concentratie vastgesteld (Koch en De Keyser, 2006). Ook bij CVA's is er geen eenduidig antwoord. Slechts een kleine studie toont een betere outcome na een CVA bij een hoge concentratie urinezuur (Chamorro et al., 2002). Er zijn echter twee grotere studies die een negatief effect aantonen van een hoge concentratie urinezuur na een CVA (Cherubini et al., 2000; Weir et al., 2003).

Specifiek bij epilepsie zijn er slechts enkele kleine studies die de urinezuurconcentratie bepalen bij patiënten. Een studie naar glutamaat-gemedieerde excitotoxiciteit toont aan dat er bij patiënten na een eerste gegeneraliseerde tonisch-clonisch insult een hogere concentratie urinezuur in het cerebrospinaal vocht aanwezig is (Stover et al., 1997). Hamed et al. (2004) gingen de serumconcentratie na in het kader van een algemene bepaling van sporenelementen, elektrolyten, anti-oxidanten en merkers van oxidatieve stress bij patiënten met epilepsie. Zij kwamen tot de conclusie dat er een hyperuricemie is bij onbehandelde patiënten. Zij schrijven dit niet direct toe aan de epileptogenese zelf maar eerder aan een adaptieve respons van het lichaam op oxidatieve stress. Het feit dat bij de behandelde groep de urinezuurconcentratie lager ligt verklaren zij door een effect van valproaat en carbamazepine op de renale excretie. Twee studies die het effect nagaan van allopurinol op het optreden van epilepsieaanvallen toonden dat er voor de start van de behandeling met allopurinol geen hyperuricemie aanwezig was. De patiënten werden wel reeds behandeld met carbamazepine of valproaat (Tada et al., 1991; Zagnoni et al., 1994).

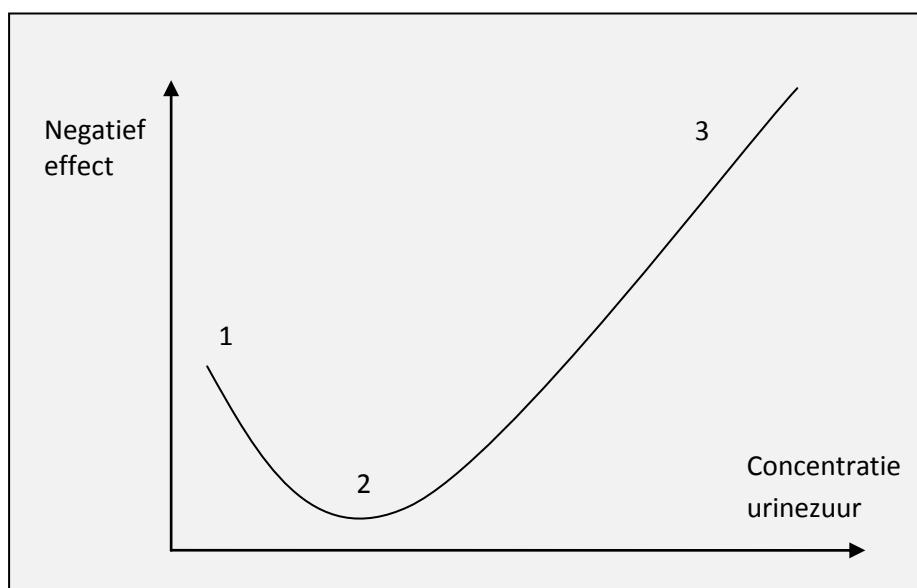
1.4.3. Mogelijke fysiologische effecten

Over de manier waarop urinezuur zijn werking uitoefent, lopen de meningen uiteen. De meest geformuleerde hypothese is dat de schade door urinezuur veroorzaakt wordt door peroxy-nitriet dat ontstaat door de reactie van stikstofdioxide met een superoxide anion. Deze twee moleculen ontstaan bij inflammatie die voorkomt bij neurodegeneratieve aandoeningen. Peroxy-nitriet is een sterke oxidant die schade toebrengt aan biologische moleculen zoals DNA, maar ook wijzigingen tot stand

brenkt in structurele proteïnen en de mitochondriale membraan verstoort. Deze afwijkingen dragen allen bij tot celdood. Urinezuur is een natuurlijke anti-oxidant die instaat voor ongeveer 60% van de vrije radicaalverwijdering in menselijk bloed en volgens sommigen speelt het een belangrijke rol in het tegengaan van de schadelijke effecten van peroxynitriet (Trackey et al., 2001; Scott et al. 2005). Squadrito et al. (2000) toonden echter aan dat CO_2 bij normale plasmaspiegels superoxide 920 maal sneller bindt dan urinezuur waardoor dit dus niet meer beschikbaar is voor de vorming van peroxynitriet. Dit doet de vraag rijzen of urinezuur wel een rol speelt in het tegengaan van peroxynitriet gerelateerde celschade. Du et al. (2007) leverden vervolgens een alternatieve verklaring. Zij toonden aan dat de aanwezigheid van astrocyten noodzakelijk is om urinezuur een protectief effect te laten uitoefenen ter hoogte van het ruggenmerg. Hun resultaten suggereren dat urinezuur zorgt voor de upregulatie van de glutamaat transporters EAAT-1 en EAAT-2 ter hoogte van de astrocyten en dat het op die manier de neuronen kan beschermen. Ten slotte zou urinezuur de peroxidatie van de lipidenmembraan kunnen tegengaan en zo het doorgeven van extracellulaire oxidatieve stress naar het intracellulair milieu met de ontwikkeling van intracellulaire reactive oxygen species (ROS) tegengaan en zo celschade verhinderen, zonder de tussenkomst van astrocyten (Guerreiro et al., 2009).

1.4.4. Hypothese over de fysiologische effecten van urinezuur

Hoe kunnen we nu deze twee sterk uiteenlopende eigenschappen van urinezuur verklaren? Enerzijds is er vermoedelijk een neuroprotectief effect, zoals beschreven bij MS, en anderzijds een neurodegeneratief effect, zoals bij CVA en volgens onze hypothese ook bij epilepsie. Bij cardiovasculaire aandoeningen wordt het verband tussen de concentratie urinezuur en nadelige effecten meestal weergegeven door een J-curve. Indien we deze J-curve nu ook toepassen op de neurologische effecten van urinezuur kunnen we de volgende hypothese formuleren (figuur 4).



Figuur 4. Hypothese over de fysiologische effecten van urinezuur.

Bij diermodellen kunnen we stellen dat, gezien de aanwezigheid van uricase, de meeste dieren (o.a. muizen en ratten) zich in zone 1 bevinden waar de lage concentratie urinezuur minder bescherming biedt. Toediening van een dosis urinezuur verplaatst deze dieren naar zone 2 waar de hogere concentratie urinezuur bescherming biedt door een van de drie hierboven beschreven mechanismen (i.e. minder peroxynitriet vorming, meer glutamaat transporters, verlaagde intracellulaire productie van ROS). Het feit dat bij een kainaat geïnduceerde aanval het negatief effect overheerst kunnen we verklaren door de grotere hoeveelheid urinezuur die hierbij vrijkomt waardoor de dieren zich dus in zone 3 zullen bevinden. Hier wordt het positief effect van urinezuur teniet gedaan door de sterkere activatie van het inflammasoom.

Bij mensen is het enzym uricase niet aanwezig. Zij hebben dus standaard een hogere concentratie urinezuur in vergelijking met de meeste andere zoogdieren waardoor ze zich in zone 2 bevinden. Bij een tekort aan urinezuur, zoals beschreven wordt bij MS, kunnen we dus stellen dat deze personen zich in zone 1 bevinden. Toediening van urinezuur of een precursor kan dan een oplossing zijn. Ook toediening van een kleine hoeveelheid urinezuur bij personen die zich in zone 2 bevinden kan nog nuttig zijn. De grote hoeveelheden urinezuur die echter vrijkomen bij een CVA of bij een epileptische aanval zouden kunnen zorgen voor activatie van het inflammasoom dat de protectieve eigenschappen van urinezuur teniet doet waardoor hoge concentraties urinezuur in dit geval geassocieerd kunnen zijn met een slechter verloop.

1.5. Effect van allopurinol

Een bijkomend argument voor de rol van urinezuur bij epilepsie is het gebruik van allopurinol in klinische en experimentele studies naar nieuwe AEDs. Het belangrijkste fysiologisch effect van allopurinol is de inhibitie van het enzym xanthine oxidase dat de omzetting van hypoxanthine naar xanthine en urinezuur katalyseert. Het gebruik van allopurinol resulteert dus in een daling van de hoeveelheid gesynthetiseerd urinezuur.

1.5.1. Diermodellen

Het anticonvulsief effect van allopurinol werd aangetoond in verschillende diermodellen. Bij een experiment uitgevoerd bij ratten werden elektroden geïmplanteerd in de dorsale hippocampus en toediening van allopurinol intraperitoneaal (ip) in een dosis van 25 en 50 mg/kg toonde een verminderde activiteit van penicilline geïnduceerde epileptische foci (Mikhailov and Gusel, 1983). Onderzoek naar het gebruik van allopurinol in een dosis van 5 en 50 mg/kg ip bij hippocampaal gekindelde katten toonden bij de hoogste dosis een significante vermindering van de ernst van de aanvallen (Wada et al., 1992). Bij EL muizen, een mutant muismodel van epilepsie, konden geen aanvallen opgewekt worden na toediening van allopurinol dat werd toegediend aan 75 mg/kg per os (Murashima

et al., 1998). Hoppe et al. (1984) konden daarentegen geen effect aantonen van de toediening van allopurinol op zuurstofgeïnduceerde aanvallen bij muizen.

1.5.2. Klinische studies

Verschillende klinische studies leveren tegenstrijdige resultaten op. Enkele tonen een gunstig effect wanneer allopurinol wordt toegevoegd aan traditionele anti-epileptica (AEDs). Zo hebben onder meer Coleman et al. (1974, 1986) aangetoond dat allopurinol een gunstig effect heeft op het aantal aanvallen bij patiënten met hyperuricosurie. Ook uit de studie van De Marco en Zagnoni (1988) blijkt dat er bij 64 epilepsiepatiënten een daling was van 50-100% in aanvalsfrequentie bij 68,74% van hun patiënten met een normale plasmaspiegel van urinezuur. Een andere studie bij 31 patiënten met refractaire epilepsie was effectief bij 17 patiënten. Er was echter geen statistisch significant verschil in de daling van de concentratie urinezuur tussen diegenen die wel of niet reageerden op de toediening van allopurinol (Tada et al., 1991). In tegenstelling tot de vorige 3 ongecontroleerde studies zijn er ook 2 studies ontworpen die dubbelblind, gerandomiseerd en placebo-gecontroleerd zijn. Eén daarvan is een cross-over studie bij 80 patiënten met refractaire epilepsie waar werd aangetoond dat de toediening van allopurinol in een dosis van 150-300 mg/kg significant het aantal aanvallen en de secundaire generalisaties doet afnemen bij respectievelijk 10,5% en 27,9% van de proefpersonen. Er werd een daling van 32% vastgesteld van de plasma urinezuurconcentratie maar men kon geen verband ontdekken tussen de frequentie van de aanvallen en deze daling (Zagnoni et al., 1994). De tweede is de studie van Togha et al. (2007) die uitgevoerd werd bij 32 proefpersonen. Er werden significante verschillen vastgesteld in het aantal aanvallen gedurende het verloop van deze studie. Er was namelijk een reductie van het aantal aanvallen van meer dan 30% bij 66% van de patiënten, meer dan 50% bij 55% van de patiënten en meer dan 60% bij 44% van de patiënten. Er werd echter niet vermeld wat het effect was op de urinezuurconcentratie in het plasma.

Er zijn echter ook twee studies die geen effect konden aantonen van het toevoegen van allopurinol aan klassieke AED bij de behandeling van refractaire epilepsie. Sander en Patsalos (1988) gingen het effect na in een ongecontroleerde studie bij twaalf patiënten gedurende twaalf weken. Deze gebruikten reeds één of meerdere AEDs. Het aantal aanvallen per week was gedaald bij 4 patiënten en gestegen bij 5 patiënten. Gezien deze bevindingen niet significant waren werden de verschillen toegeschreven aan toevallige variatie in het aantal aanvallen. Coppola en Pascotto (1996) kwamen tot dezelfde conclusie op basis van een dubbelblind, placebo-gecontroleerd cross-over onderzoek waarbij het nut van allopurinol als additieve therapie onderzocht werd bij 17 kinderen met refractaire epilepsie. Er was wel een tendens tot aanvalsreductie, doch deze was niet statistisch significant.

1.5.3. Mogelijke werkingsmechanismen

Er worden verschillende hypothesen naar voor geschoven met betrekking tot het werkingsmechanisme van allopurinol bij het beïnvloeden van epilepsie en epileptogenese. Recent werd er gesuggereerd dat er door de verminderde afbraak van hypoxanthine en xanthine door allopurinol er een stijging optreedt van deze twee stoffen die een hogere activiteit van het enzym hypoxanthine-guanine-fosforibosyltransferase veroorzaakt. Dit enzym is verantwoordelijk voor purine salvage en veroorzaakt dus een stijging van adenosine en guanosine (Togha et al., 2007). Studies tonen aan dat deze stijging van adenosine een neuroprotectieve en aanvalsmodulerende invloed kan hebben. Adenosine oefent namelijk via hoge affiniteit A_1 receptoren die verbonden zijn met inhibitorische G-proteïnen een inhiberend effect uit op adenylylcyclase (AC). De daarop volgende activatie van K^+ -kanalen verhindert de werking van Ca^{2+} kanalen en fosfolipase C wordt geactiveerd. Het gevolg daarvan is dat de vrijstelling van verschillende neurotransmitters, waaronder glutamaat, wordt geïnhibeerd waardoor adenosine leidt tot neuroprotectie en het onderdrukken van epileptische aanvallen. Naast deze directe invloed op neuronen heeft adenosine ook een effect op astrogliose. Men heeft aangetoond dat bij het ontstaan van een status epilepticus er initieel een upregulatie is van adenosine die neuroprotectief werkt, maar dat deze adenosinestijging vervolgens een verstoring veroorzaakt van de adenosinereceptoren ter hoogte van de astrocyten met astrogliose als gevolg. Deze astrogliose leidt op termijn tot een toename van het enzym adenosinekinase dat door afbraak van adenosine en verdwijnen van de neuroprotectieve invloed spontane epileptische aanvallen veroorzaakt (Boison, 2006). Deze hypothese over het werkingsmechanisme van allopurinol werd bevestigd door een studie van Schmidt et al. (2009) naar de rol van allopurinol als analgeticum. Men kon namelijk ter hoogte van het cerebrospinaal vocht zowel een daling van de urinezuurconcentratie als een stijging van de hoeveelheid adenosine vaststellen.

Murashima et al. (1998) gingen het effect na van allopurinol op het enzym superoxide dismutase (SOD). Zij konden aantonen dat er een gewijzigde activiteit is van dit enzym in de hersenen van mutante EL muizen na toediening van allopurinol. Meer bepaald is er een hogere concentratie van Cu,Zn-SOD met een significante daling van het aantal aanvallen gedurende 48 uur na toediening. Dit enzym speelt een rol in de eliminatie van vrije zuurstof radicalen, die onder pathologische omstandigheden sterk verhoogd zijn. Een direct effect van allopurinol op de generatie van vrije zuurstof radicalen door de inhibitie van xanthine oxidase werd uitgesloten gezien de toegediende dosis geen effect had op de urinezuurconcentratie in het plasma en er dus geen invloed was op de vorming van urinezuur door xanthine oxidase waardoor de vrije radicalen die tijdens dit proces ontstaan niet beïnvloed werden.

Een andere hypothese voor het werkingsmechanisme van allopurinol vinden we terug in kinurenine-quinolinezuur hypothese. Deze intermediaire producten in de oxidatieve cyclus van tryptofaan zijn

twee van de meest krachtige neuro-excitatorische stoffen. Gezien allopurinol ook een inhibitor is van tryptofaan pyrrolase (Badaway en Evans, 1973), kan toediening ervan aanleiding geven tot een daling van quinolinezuur en kan het op deze manier epileptogenese verhinderen.

Zoals reeds eerder vermeld, gaan wij ervan uit dat urinezuur bijdraagt tot de ontwikkeling van inflammatie door de activatie van het inflammasoom NALP-3 ter hoogte van de hippocampus en dat het op deze manier ook bijdraagt tot epileptogenese. Toediening van allopurinol veroorzaakt dus een daling van de hoeveelheid urinezuur en zou de inflammatoire respons kunnen verminderen.

1.6. Doelstellingen

Afgaande op voorgaande gegevens is er vermoedelijk een rol voor het inflammasoom bij de inductie van inflammatie bij epilepsie. Meer specifiek zal de rol van het gevaarsignaal urinezuur worden onderzocht gezien dit enerzijds zorgt voor activatie van het inflammasoom NALP-3 en omdat anderzijds uit de literatuur blijkt dat allopurinol in een aantal gevallen op een effectieve manier gebruikt wordt als anti-epilepticum en er een toenemende rol wordt toegeschreven aan urinezuur in de etiopathogenese van verschillende aandoeningen.

Om de rol van het inflammasoom en urinezuur bij epilepsie verder te onderzoeken, zullen we in een preliminair experiment nagaan of we na intrahippocampale kinaat injectie bij muizen een urinezuurstijging kunnen waarnemen ter hoogte van deze hippocampus. Vervolgens zullen we onderzoeken of er een effect optreedt bij het blokkeren van het gevaarsignaal urinezuur door middel van allopurinol op de aanwezigheid van inflammatie ter hoogte van de hippocampus na kinaat geïnduceerde status epilepticus. De hoeveelheid inflammatie zal worden weergegeven onder de vorm van de aanwezigheid van de cytokines IL-1 β en IL-18 gezien zij geactiveerd worden door het inflammasoom NALP-3 en TNF- α dat een rol speelt bij activatie van NALP-3 zelf. Als er een verband kan worden bewezen opent dit nieuwe perspectieven naar toekomstige behandelingen van epilepsie en mogelijk ook naar de vertraging of inhibitie van epileptogenese.

2. Materialen en methoden

2.1. Proefdieren

Er werd gebruikt gemaakt van wild type mannelijke C57BL/6 muizen met een gewicht van 20g (Harlan, Horst, Nederland) bij aanvang van het onderzoek. Alle dieren werden gehuisvest aan een temperatuur van 20-23°C en een relatieve luchtvochtigheid van 40-60%. Ze werden gevoed ad libitum. De dag/nachtcyclus volgde een vast patroon dat bestond uit 12 uur met lage lichtintensiteit en 12 uur in het donker. Dit experiment werd uitgevoerd conform de richtlijnen van de Council of Europe (decreet 86/609/EEC) en het studieprotocol werd goedgekeurd door het Ethisch Comité van het Universitair Ziekenhuis te Gent (ECP 09/61).

2.2. Operatieprotocol

Een half uur voor er gestart werd met de anesthesie werd er bij alle muizen (n=14) het analgeticum buprenorfine (Schering-Plough, Brussel, België) toegediend aan een dosis van 0,1 mg/kg, SC. De muizen werden verdoofd met 5% isoflurane (Abbott Laboratories Ltd., Queensborough, Kent, Engeland) met zuurstof als draaggas aan een debiet van 5l/min en de anesthesie werd verder onderhouden met isoflurane 1% aan een debiet van 0,6 l/min. De muizen werden gefixeerd in een stereotactisch kader (Stoelting Europe, Dublin, Ierland). Na scheren van het operatieveld werd dit grondig ontsmet met ethanol 70% en er werd zo steriel mogelijk gewerkt. Er werd een mediane incisie gemaakt en de schedel werd blootgelegd. De positie van het bregma werd opgezocht en gemarkeerd. Alle coördinaten die worden weergegeven werden bepaald ten opzichte van het bregma aan de hand van de stereotactische atlas van Franklin en Paxinos (Third Edition, 2008). Indien dit nodig werd geacht werd de pijnstilling met buprenorfine (0,1 mg/kg, SC) herhaald om de 12 uur tot maximum 48 uur na de ingreep. Er werd ook altijd minstens één week gewacht alvorens te starten met de experimenten, tenzij het experimenteel protocol anders was opgesteld.

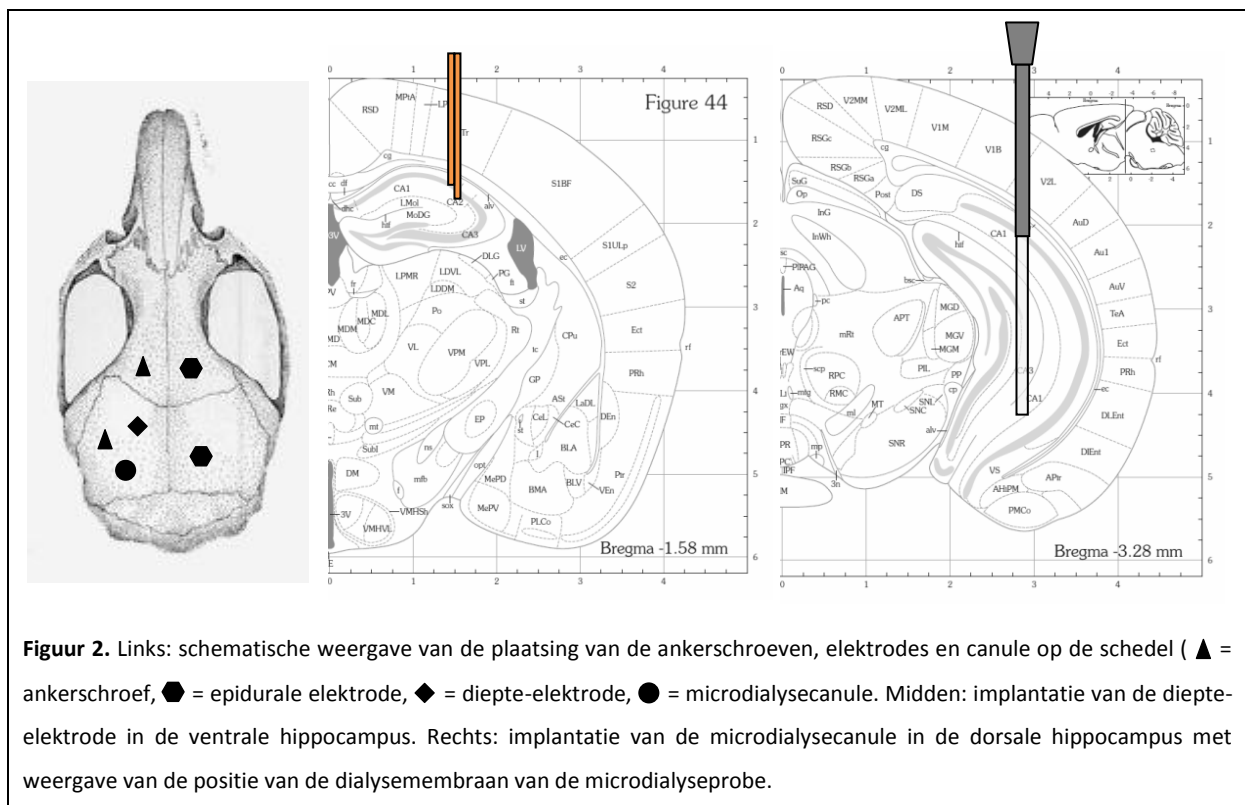
2.2.1. Operatie en protocol voor in vitro bepaling van urinezuur

In een preliminair experiment werd bij vier muizen een boorgat gemaakt ter hoogte van de linker hippocampus (AP = -1,9 mm, L = +1,5 mm). Twee muizen werden tijdens de ingreep intrahippocampaal (DV = -1,8 mm) geïnjecteerd met kainaat aan een dosis van 0,2 µg in 50 nl fysiologische oplossing (9% NaCl). De twee andere werden geïnjecteerd met 50 nl fysiologisch. Na de injectie werd de huid dichtgenaaid. Dit experiment werd uitgevoerd om na te gaan of we wel een urinezuurstijging konden kwantificeren ter hoogte van de hippocampus. De twee muizen die met kainaat geïnjecteerd werden, werden drie uur na het ontwikkelen van een status epilepticus geëthanaseerd met Nembutal. Op hetzelfde moment werden ook de twee muizen geëthanaseerd die geïnjecteerd werden met fysiologische oplossing en twee muizen die niet geïnjecteerd werden. Vervolgens werden de linker en

de rechter hippocampus verwijderd en bewaard bij -80°C . De linker hippocampi van deze muizen werden vervolgens gehomogeniseerd voor de bepaling van urinezuur.

2.2.2. Operatie en protocol voor in vivo bepaling van urinezuur

In een tweede experiment ($n=14$) werden er zes boorgaten gemaakt voor het plaatsen van 1 epidurale elektrode, 1 bipolaire diepte-elektrode, 1 microdialysecanule, 1 aardingsselektrode en 2 ankerschroeven. De epidurale elektrode en de aardingsselektrode werden ter plaatse vervaardigd. Aan inox schroeven (2,50 mm diameter, 2,40 mm lang, Bilaney, Duitsland) werd een geïsoleerde koperdraad gesoldeerd met een connectiepin en deze werden geplaatst ter hoogte van de rechter frontale cortex en de rechter sutura lambdae. Twee polyimide omhulde roestvrij stalen draden met een diameter van $70\mu\text{m}$ (California Fine Wire, VSA) werden aan elkaar gelijmd om één bipolaire elektrode te vormen. De afstand tussen de twee contactpunten bedraagt $200\mu\text{m}$. Deze diepte-elektrode werd in de linker ventrale hippocampus geplaatst (AP = $-1,6\text{ mm}$, L = $+1,5\text{ mm}$, DV = $-1,8\text{ mm}$). In de linker dorsale hippocampus (AP = $-3,3\text{ mm}$, L = $+2,8\text{ mm}$, DV = $-2,3\text{ mm}$) werd er een guide-canule ingebracht (CMA Microdialysis AB, Stockholm, Zweden) voor de microdialyseprobe. De guide-canule werd afgesloten met een dummy. De microdialyseprobe (CMA/7 7/2, CMA Microdialysis, Stockholm, Zweden), die pas bij het begin van het experiment werd ingebracht, bezit een dialysemembraan van 2 mm lang die precies onder de guide-canule ter hoogte van de hippocampale CA1 en CA3 regio's en de gyrus

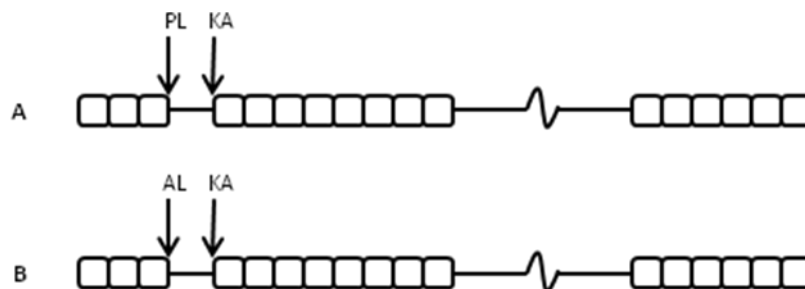


Figuur 2. Links: schematische weergave van de plaatsing van de ankerschroeven, elektrodes en canule op de schedel (▲ = ankerschroef, ● = epidurale elektrode, ◆ = diepte-elektrode, ● = microdialysecanule). Midden: implantatie van de diepte-elektrode in de ventrale hippocampus. Rechts: implantatie van de microdialysecanule in de dorsale hippocampus met weergave van de positie van de dialysemembraan van de microdialyseprobe.

dentatus uitkomt. De membraan van deze probe is doorlaatbaar voor stoffen met een moleculair gewicht tot 6 kDa. In de twee overblijvende boorgaten werden ankerschroeven bevestigd om de diepte-elektrode en de microdialysecanule aan de schedel te fixeren met dentale acrylcement (figuur 2). Alle elektroden en de aarding werden verbonden met een connector waarmee via de voorversterker een verbinding kon gemaakt worden met de EEG kabel.

Het doel van dit tweede experiment was het uitlokken van een status epilepticus door toediening van kinaaat (Tocris Bioscience, Bristol, Engeland) via de microdialyseprobe. Er werden 7 muizen gebruikt als controlegroep. Bij 7 andere muizen werd allopurinol 100 mg/kg intraperitoneaal (Sigma Aldrich, Bornem, België) toegediend 30 minuten voor de toediening van kinaaat.

Voor dit experiment werden de muizen telkens per 2 om 17u00 aan de microdialyse-EEG opstelling gekoppeld. De microdialyse probes werden geperfuseerd met gewijzigde Ringer oplossing (0,126 g $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2,15 g NaCl en 0,075 g KCl in 250 ml millipore water) aan een debiet van 1,25 μl per minuut. De volgende ochtend gebeurden er vanaf 8u00 elke 50 minuten een collectie van 62,5 μl gedurende 150 minuten om de normale urinezuurconcentratie ter hoogte van de hippocampus te bepalen. Vervolgens werd bij de controlegroep 220 μl Tween 80 (10%, opgelost in fysiologisch) geïnjecteerd en bij de experimentele groep 2,2 mg allopurinol opgelost in 220 μl Tween 80 (10%, opgelost in fysiologisch). Dertig minuten later werd er gestart met de kinaaatinfusie. Er werd een oplossing van 2 mM toegediend gedurende 192 seconden, waardoor er getracht werd deze dosis zoveel mogelijk te laten overeenstemmen met degene die gebruikt werd bij intrahippocampale injectie. Er werden elke 50 min stalen genomen (62,5 μl) tot 7 uur na de toediening van kinaaat. De volgende dag werden er nog 6 stalen genomen van 8u tot 13u, 24 uur na het ontwikkelen van de status epilepticus. Op dat moment werden de muizen geëuthanaseerd en werden de linker en de rechter hippocampus verwijderd voor de bepaling van inflammatoire markers (figuur 3).



Figuur 3. Experimenteel protocol in vivo bepaling urinezuur. Na drie baseline collecties volgt injectie met placebo (PL) in de controlegroep (A) of allopurinol (AL) in de experimentele groep (B). Na dertig minuten start de kinaaat infusie (KA) en worden er nog 8 stalen geïncubated. De ochtend nadien worden de laatste zes stalen genomen.

2.3. Microdialyse en video-EEG opstelling

De muizen werden per 2 aan de microdialyse-opstelling bevestigd in speciaal daarvoor ontworpen kooien waarin ze vrij konden bewegen en continu werden gemonitord met behulp van video-EEG monitoring. De microdialyseprobe werd ingebracht onder lichte verdoving met isoflurane. Via een vloeistofswivel (Instech, Plymouth, VSA) werd er een verbinding tot stand gebracht met een spuitpomp (BASi, Warwickshire, Engeland) waarop een gasdichte spuit met een volume van 2,5 ml (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Zwitserland) werd bevestigd. Op hetzelfde moment werd er met flexibele EEG-kabels een verbinding tot stand gebracht met de computer voor de registratie van het EEG. Dit gebeurde via een voorversterker die de weerstand verlaagt en zo minder storing geeft op het EEG. Met een analoog-digitaal conversiekaart (National Instruments, Zaventem, België) werd dit signaal gedigitaliseerd en opgeslagen op de computer. Het EEG werd geregistreerd met behulp van een voorgeprogrammeerd protocol met de software Matlab 2007.

2.4. Verwijderen van de hippocampus

Op het einde van het experiment werden de muizen geëuthanaseerd met een intraperitoneale injectie van 0,4 ml Nembutal met een concentratie van 60 mg/ml (CEVA santé animale, Libourne, België). Vervolgens werden de hersenen zo snel mogelijk verwijderd en tijdelijk in ijskoude PBS oplossing bewaard. De linker en de rechter hippocampus werden gepreleveerd met behulp van een operatiemicroscoop en microdissectiemateriaal. Tijdens dit proces werd er voortdurend op ijs gewerkt. De verwijderde hippocampus werd onmiddellijk ingevroren in vloeibare stikstof.

2.5. Homogenisatie hippocampus en bepaling eiwitconcentratie

De hippocampi werden gehomogeniseerd met een weefselmixer na toevoegen van 200 µl volledige lysis buffer. Na homogenisatie werd 2% Igepal (Sigma-Aldrich, Bornem, België) toegevoegd aan het lysaat en werd er intensief gevortext. De stalen werden geïncubeerd op ijs gedurende 15 min tijdens dewelke er elke 5 minuten gevortext werd. Om het debris te verwijderen centrifugeerden we de stalen vervolgens bij 4°C voor 15 minuten. Het supernatant dat we op die manier bekomen hebben werd in een nieuwe eppendorf gepipetteerd en gebruikt voor de urinezuurbepalingen. Om de concentraties te normaliseren naar gelang de hoeveelheid eiwit die in het staal aanwezig was, werd de eiwitconcentratie van de stalen bepaald door middel van een NanoDrop (Thermo scientific, Wilmington, VSA).

2.6. Bepaling urinezuurconcentratie

2.6.1. Amplex Red Uric Acid/Uricase Assay Kit

De urinezuurconcentratie werd bepaald met behulp van de Amplex Red Uric Acid/Uricase Assay Kit (Invitrogen, Merelbeke, België). Deze test is gebaseerd op de omzetting van urinezuur door uricase

naar allantoïne, waterstofperoxide en koolstofdioxide. De H_2O_2 reageert, in de aanwezigheid van horseradish peroxidase (HRP) stoichiometrisch met Amplex Red reagens om het roodfluorescerend oxidatieproduct resorufin te vormen. Resorufin heeft absorptie en fluorescentie maxima van ongeveer 571 nm en 585 nm respectievelijk. Deze test kan zowel fluorometrisch als spectrofotometrisch uitgevoerd worden. De Amplex Red Uric Acid/Uricase Assay Kit heeft een detectielimiet van 100 nM urinezuur.

2.6.2. High performance liquid chromatography (HPLC)

De microdialysestalen werden geanalyseerd met behulp van een chromatografie-opstelling bestaande uit een scheidingsmodule (Waters 2690, Separation Module Alliance; Waters, Milford, MA) en twee detectoren in serie, namelijk een fotodiode detector (Waters 996, Photodiode Array Detector; Waters) en een spectrofluorimeter (474 Fluorescence Detector; Waters). In de scheidingsmodule werden de stalen op een constante temperatuur gehouden van 15°C en de kolom op 22°C. De analyses werden uitgevoerd op een reverse phase C18 kolom van 4,6 mm bij 25 cm bestaande uit 5 µm micropartikels (Ultrasphere ODS; Beckman Instruments, San Ramon, CA). Een guard kolom van 4,6 mm bij 5 cm werd gebruikt om de hoofdkolom te beschermen tegen contaminatie. Ammoniumformaat buffer, 50 mmol/L met pH 3,0 (oplossing A) en methanol (oplossing B) werden gebruikt als vloeibare fase in een sequentie van verschillende lineaire gradiënten om optimale scheiding te bekomen van de componenten aanwezig in het microdialysestaal. Gezien de microdialysemembraan niet doorlaatbaar is voor proteïnen was er geen voorbehandeling noodzakelijk. De stalen werden enkel één tweede verdund met HPLC water en nadien werd er 60 µl op de kolom geïnjecteerd. De oppervlakte van de pieken werd berekend en de concentratie urinezuur werd daaruit afgeleid op basis van een standaard urinezuur curve.

2.7. q-PCR voor de bepaling van inflammatoire parameters

RNA werd geïsoleerd uit de verschillende hippocampi met behulp van de Aurum total RNA mini kit (Biorad, België, Nazareth) volgens het spin protocol for animal tissue. Vervolgens werd de RNA concentratie bepaald met behulp van Nanodrop. De iScript cDNA synthesis Kit (Biorad, België, Nazareth) werd gebruikt voor de synthese van cDNA. De eigenlijk qPCR werd uitgevoerd met de Roche Sybr Green mix in de LightCycler 480 (Roche, Vilvoorde, België). Stalen werden steeds in triplicaat geladen.

2.8. Data-analyse en statistiek

De gegevens werden verwerkt met behulp van Microsoft Excel en het programma SPSS 17. Resultaten worden weergegeven als gemiddelden met standard error of the mean (SEM). Voor het tweede experiment zal naast de urinezuurconcentratie ook de gemiddelde aanvalsduur en het aantal aanvallen tijdens de status nagegaan worden en zullen we controleren of er een significant verschil is in het

optreden van inflammatie tussen de behandelde muizen en de controlegroep. Poweranalyse werd uitgevoerd met PS Power and Sample Size Calculation version 3.0 januari 2009 (Dupont en Plummer, 1990).

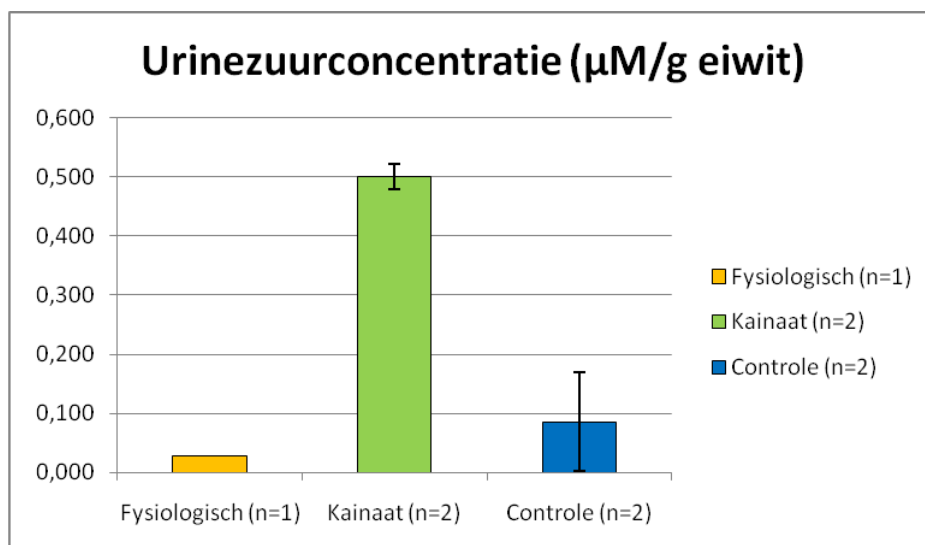
3. Resultaten

3.1. In vitro bepaling van urinezuur op gepreleveerde hippocampi

Er werden 6 stalen bekomen van de linker hippocampus van zes verschillende muizen waarvan er twee behandeld waren met fysiologische oplossing, twee met kinaat en twee controles. De bepaling van de urinezuurconcentratie bij 1 van de 2 hippocampi uit de eerste groep leverde geen resultaat op waardoor deze uit de analyse werd weggelaten. De resultaten in bijgevoegde tabel (tabel 2, figuur 5) tonen een duidelijke stijging van de urinezuurconcentratie bij de groep die behandeld werd met KA.

	Muis	[UZ]		Muis	[UZ]		Muis	[UZ]
Fysiologisch	T1	0,029	Kinaat	T3	0,521	Controle	T5	0,170
	T2	-		T4	0,479		T6	0,003
	mean	0,029		mean	0,500		mean	0,086
	SEM	-		SEM	0,021		SEM	0,083

Tabel 2. Resultaten urinezuurbepaling in vitro met gemiddelde en SEM ([UZ] = concentratie urinezuur in μM per gram eiwit).



Figuur 5. Grafische weergave van de gemiddelde concentratie urinezuur per gram eiwit met SEM.

Onderzoek naar significantie werd uitgevoerd met behulp van een non-parametrische test, namelijk de Kruskal-Wallis test. Er werd geen significant verschil vastgesteld tussen deze drie groepen ($P=0.223$), doch gezien we een duidelijk verschil opmerken tussen de kinaat groep en de anderen werd er beslist om verder te gaan met het tweede experiment.

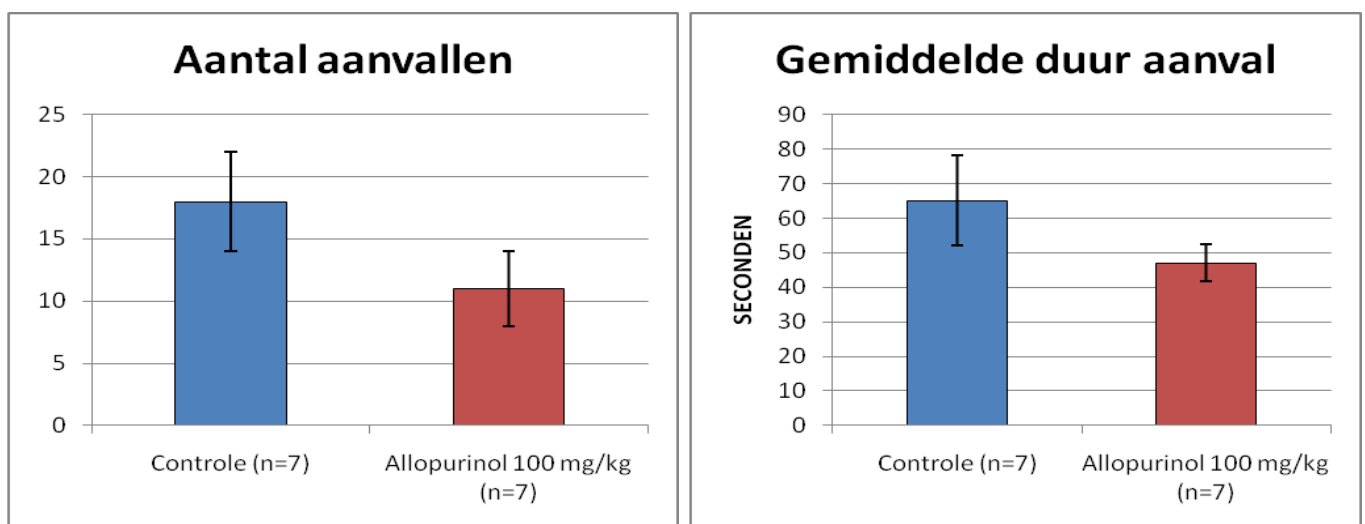
3.2. In vivo bepaling van urinezuur met meting van inflammatoire merkers

3.2.1. Aantal en gemiddelde duur epileptische aanvallen

Intrahippocampale toediening van KA veroorzaakt zowel bij de controle als bij de experimentele groep epileptische aanvallen. EEG analyse kan geen significant verschil aantonen in het aantal of de duur van de aanvallen tussen de twee groepen. In de controle groep veroorzaakte KA infusie 18 ± 4 aanvallen met een gemiddelde duur van 65 ± 13 seconden. In de experimentele groep werden er 11 ± 3 aanvallen gedetecteerd met een gemiddelde duur van 47 ± 5 seconden (tabel 3, figuur 6).

	Muis	Aantal aanvallen	Gemiddelde duur aanval (sec)		Muis	Aantal aanvallen	Gemiddelde duur aanval (sec)
Controle	M01	6	88,293	Allopurinol 100 mg/kg	M08	22	51,473
	M02	21	39,627		M09	2	31,170
	M03	23	44,636		M10	20	36,731
	M04	32	52,521		M11	5	72,819
	M05	3	134,464		M12	15	37,300
	M06	16	48,854		M13	14	53,359
	M07	25	47,445		M14	2	44,977
	mean	18	65,120		mean	11	46,833
SEM	4	13,048	SEM	3	5,303		

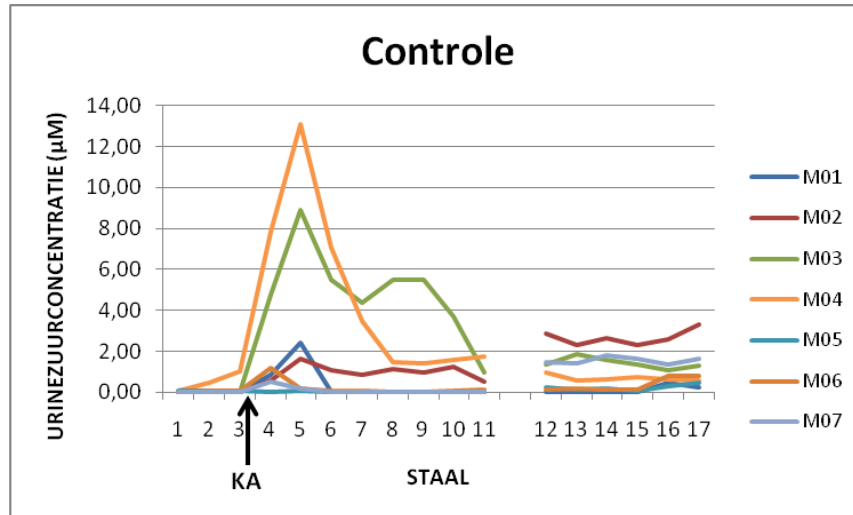
Tabel 3. Aantal en gemiddelde duur epileptische aanvallen met gemiddelde en SEM.



Figuur 6. Grafische weergave van de EEG analyse van het aantal en de gemiddelde duur van de aanvallen per groep. Resultaten worden voorgesteld als gemiddelde met SEM.

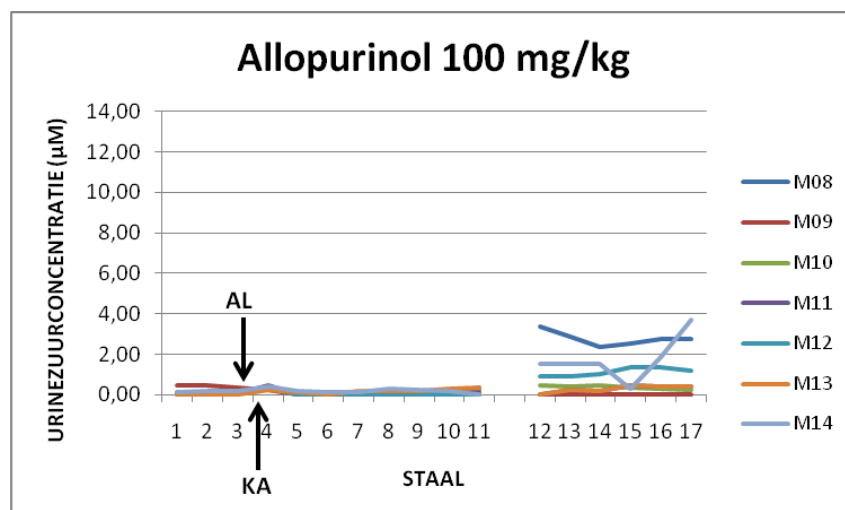
3.2.2. Overzicht wijzigingen in urinezuurconcentratie

In de controlegroep is er een duidelijke stijging in de hippocampale urinezuurconcentratie op te merken met de grootste toename tussen 1 en 2 uur na kainaatsinfusie (figuur 7).



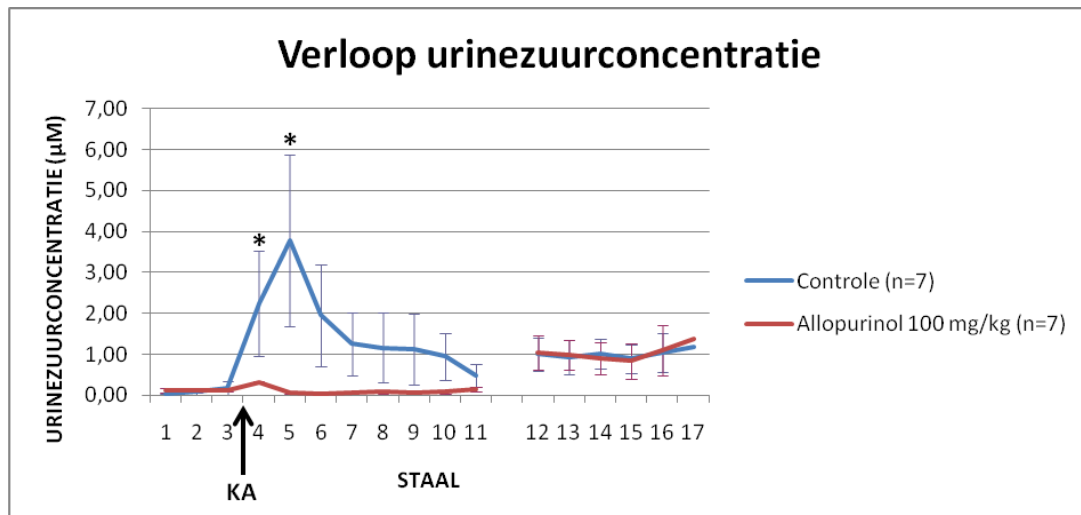
Figuur 7. Verloop urinezuurconcentratie in de controlegroep (KA = kainaatsinfusie).

In de experimentele groep daarentegen onderdrukt allopurinol deze stijging van de urinezuurconcentratie voor minstens zes uur. De ochtend na kainaatsinfusie zijn de waarden van de urinezuurconcentratie echter vergelijkbaar met deze die we waarnemen bij de controlegroep (figuur 8).



Figuur 8. Verloop urinezuurconcentratie in de experimentele groep (KA = kainaatsinfusie, AL = allopurinol toediening).

In figuur 9 worden de gemiddelde concentraties van deze twee groepen weergegeven tijdens het verloop van het experiment. Er werd een significant verschil opgemerkt bij de eerste en de tweede collectie na kainaatsinfusie. Voor staal 4 vinden we een P-waarde van 0.023 en voor staal 5 een P-waarde van 0.005 (Mann-Whitney U test).



Figuur 9. Effect van allopurinol 100 mg/kg op de urinezuurconcentratie na kainaatsgeïnduceerde status epilepticus. Deze grafiek toont een sterke stijging van de urinezuurconcentratie in de controlegroep, vooral in het 2^{de} staal na kainaatsinfusie (staal 5). In de experimentele groep wordt deze stijging effectief onderdrukt door allopurinol 100 mg/kg. Er is een significant verschil tussen de controlegroep en de experimentele groep in staal 4 en 5. Alle gegevens worden voorgesteld als gemiddelde met SEM (* = $P < 0,05$; KA = kainaatsinfusie).

3.2.3. Optreden van spontane aanvallen

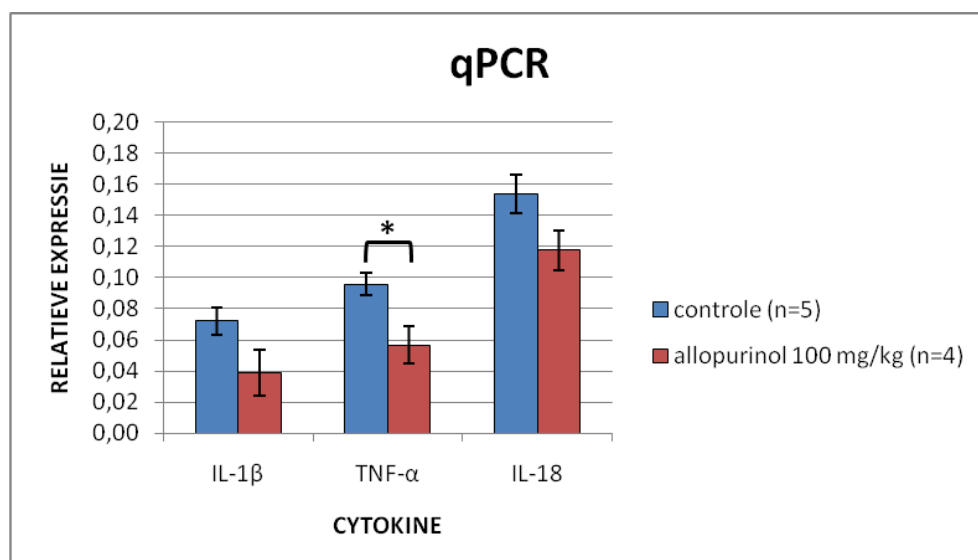
Bij één muis uit de controlegroep (M00) werd dezelfde dosis kainaats toegediend via de microdialyseprobe maar werd de hippocampus niet verwijderd na het microdialyse-experiment. Deze muis werd 1 maand na de status epilepticus voor 1 week aan een video/EEG registratie-eenheid gekoppeld. Tijdens deze week deden er zich acht gegeneraliseerde aanvallen voor.

3.2.4. Inflammatie

De relatieve expressie van drie inflammatoire merkers ter hoogte van de linker hippocampus werd bepaald ten opzichte van het huishoudgen actine. Er werden zowel uit de controlegroep als uit de experimentele groep de hippocampi geselecteerd van de muizen die een duidelijke status epilepticus hadden doorgemaakt, meer bepaald 10 of meer gegeneraliseerde aanvallen. De drie bestudeerde cytokines zijn IL-1 β , TNF- α en IL-18. De resultaten van deze q-PCR tonen voor de drie cytokines een daling aan in de experimentele groep (tabel 4, figuur 11). Deze daling is echter enkel statistisch significant voor TNF- α ($P = 0.02$, student t-test). Zowel bij IL-1 β als bij IL-18 wordt er een duidelijke trend waargenomen, met P-waarden van respectievelijk 0.08 en 0.08 (student t-test).

	Muis	IL-1 β	TNF- α	IL-18		Muis	IL-1 β	TNF- α	IL-18
Controle	M02	0,071	0,114	0,198	Allopurinol 100 mg/kg	M08	0,020	0,042	0,103
	M03	0,041	0,098	0,162		M10	0,020	0,042	0,103
	M04	0,069	0,070	0,132		M12	0,035	0,051	0,108
	M06	0,091	0,098	0,132		M13	0,081	0,093	0,156
	M07	0,088	0,099	0,145		mean	0,039	0,057	0,118
	mean	0,072	0,096	0,154		SEM	0,015	0,012	0,013
	SEM	0,009	0,007	0,012					

Tabel 4. Overzicht van de relatieve expressie van de inflammatoire merkers ter hoogte van de linker hippocampus in de controlegroep en de experimentele groep met gemiddelde en SEM.



Figuur 11. Bepaling van de inflammatoire merkers ter hoogte van de linker hippocampus. Er wordt voor de drie cytokines een daling vastgesteld in de behandelde groep. Deze daling is significant bij TNF- α (* = $P < 0.05$). De resultaten worden voorgesteld als gemiddelde waarden per groep met SEM.

4. Discussie en toekomstperspectieven

Mesiale temporale kwab epilepsie is één van de meest voorkomende vormen van TLE en wordt gekenmerkt door het ontstaan van een epileptische aanval ter hoogte van de mesiale temporale kwab in de hippocampus. In de meeste gevallen wordt er aangenomen dat MTLE een vorm is van symptomatische epilepsie die optreedt 5 tot 10 jaar na een initiële schadelijke gebeurtenis (Sharma et al., 2007). De periode tussen dit schadelijk voorval en het optreden van spontane aanvallen wordt epileptogenese genoemd. Patiënten met MTLE vormen de grootste groep van patiënten met partiële epilepsie die refractair zijn aan de ingestelde behandeling gezien tot 75% van de patiënten met MTLE niet of onvoldoende reageren op de toediening van AEDs (Spencer, 2002).

Recent werd de rol van inflammatie bij epilepsie vastgesteld in een diermodel voor temporale kwab epilepsie, waarbij er vooral een rol werd toegeschreven aan IL-1 β (Ravizza et al., 2006; Ravizza et al., 2008; Vezzani et al., 2000). Bij inflammatie kunnen IL-1 β en IL-18 geactiveerd worden door caspase-1 dat op zijn beurt wordt geactiveerd door het inflammasoom NALP-3. We hebben beschreven dat NALP-3 geactiveerd kan worden door verschillende DAMPs zoals urinezuur in associatie met TNF- α (Franchi et al., 2009). Onderzoek naar de precieze fysiologische functie van inflammatie bij MTLE kan nieuwe perspectieven openen voor de behandeling van MTLE en kan mogelijk ook een invloed uitoefenen op epileptogenese.

De resultaten van ons onderzoek tonen aan dat er na inductie van status epilepticus door infusie van kinaat via de microdialyseprobe een duidelijke stijging optreedt van de urinezuurconcentratie in de hippocampus van muizen tussen één en twee uur na kinaat toediening. Deze stijging wordt voor ten minste 6 uur onderdrukt door de intraperitoneale toediening van allopurinol 100 mg/kg en dit zorgt vierentwintig uur na het ontwikkelen van de status epilepticus voor een significant verschil in het expressiepatroon van TNF- α ($P < 0.05$) tussen de controlegroep en de experimentele groep. Er wordt ook een daling van IL-1 β en IL-18 vastgesteld, doch deze daling is niet statistisch significant. Een poweranalyse toont aan dat voor hetzelfde verschil tussen de twee groepen er een significant resultaat wordt waargenomen vanaf 6 muizen per groep voor IL-1 β en vanaf 10 muizen per groep voor IL-18. Indien we echter definitieve uitspraken willen doen over het effect van allopurinol bij inflammatie en epileptogenese, is het noodzakelijk om dezelfde inflammatoire parameters ook te bepalen bij een groep muizen die dezelfde ingreep en hetzelfde microdialyseprotocol ondergaan hebben, echter zonder kinaatinfusie of allopurinol toediening. Op die manier kunnen we nagaan in welke mate er stijging van de cytokines optreedt na kinaat infusie en hoe sterk deze stijging onderdrukt wordt door allopurinol rekening houdend met het aandeel van de operatie en het uitvoeren van microdialyse bij de geregistreerde cytokinewaarden.

Het verschil in de mate van daling van cytokine-expressie kunnen we verklaren aan de hand van eerdere observaties bij arteria media cerebri oclusies bij ratten en muizen. Daaruit blijkt namelijk dat IL-1 β vooral belangrijk is bij de acute fase van ischemie en dat IL-18 later geactiveerd wordt of tot expressie komt (Jander et al., 2002; Wheeler et al., 2003). Indien we van eenzelfde verloop zouden uitgaan bij ons experiment verklaart dit mogelijk het feit dat IL-1 β 24 uur na de status minder tot expressie komt dan IL-18 gezien bij ischemie de piek van IL-1 β bereikt wordt na 6 uur en nadien afneemt. Daarenboven verklaart dit ook dat allopurinol een sterker effect uitoefent op IL-1 β in vergelijking met IL-18 gezien er maar één dosis werd toegediend die dus vooral werkzaam is in de vroege fase. Gezien IL-18 pas later tot expressie komt zal een eenmalige dosis allopurinol die toegediend wordt in het begin van het experiment dus minder effectief zijn in het onderdrukken van de IL-18 expressie. Dit klopt met onze bevindingen gezien ook uit het verloop van de urinezuurconcentratie blijkt dat de ochtend na kinaat toediening de urinezuurconcentraties vergelijkbaar zijn in beide groepen. Als we kijken naar de grootte van de daling in expressie is deze bij TNF- α het meest uitgesproken. Een verminderde feed forward stimulatie door IL- β en IL-18 kunnen hiervan de oorzaak zijn. Het bestaan van deze feed-forward stimulatie dient echter nog bevestigd te worden samen met het feit dat TNF- α naast zijn rol bij ATP en silicapartikels ook bij urinezuur een rol speelt bij de activatie van NALP-3. Het is verder nog interessant op te merken dat Jander et al. (2002) tot de ontdekking kwamen dat IL-18 enkel voorkomt ter hoogte van de ischemische zone, terwijl IL-1 β in de hele hemisfeer van de aangetaste regio tot expressie komt. Uit al deze gegevens kunnen we dus besluiten dat er voor IL-1 β eerder een rol lijkt weggelegd tijdens de acute fase van neuro-inflammatie bij ischemie en dat deze minder specifiek is dan IL-18 dat pas tussenkomt tijdens een latere fase en enkel voorkomt in de ischemische regio en onmiddellijke omgeving. Indien we een analoog effect verwachten bij status epilepticus zou een eenmalige toediening van allopurinol aan het begin van de status dus vooral een effect uitoefenen op de IL-1 β expressie en in mindere mate op IL-18. Uiteraard zijn al deze gegevens over tijds- en locatiegebonden expressie van IL-1 β en IL-18 afkomstig van gegevens bij arteria cerebri media oclusie en dienen deze nog geverifieerd te worden bij diermodellen voor MTL. Deze hypothese strookt echter niet met de waarnemingen dat IL-1 β ook tijdens epileptogenese in belangrijke mate aanwezig is na status epilepticus in epileptogeen weefsel (Ravizza et al, 2008). Er werd in deze studie echter geen bepaling van IL-18 uitgevoerd, zodat we deze niet kunnen vergelijken met de expressie van IL-1 β . Verder werd in dit onderzoek de status epilepticus na 90 minuten onderbroken en werd maar op 1 tijdstip tijdens epileptogenese de expressie van IL-1 β nagegaan. Uit analyse van het EEG blijkt dat er geen significant verschil is in het aantal en de duur van de aanvallen tussen de controlegroep en de experimentele groep. Dit is hetgeen we verwachten gezien we vermoeden dat de daling van de urinezuurconcentratie en de daarop volgende daling van inflammatoire markers geen grote rol spelen bij de status epilepticus gezien deze onderhouden wordt door

kainaat, maar dat zij vooral tussenkomen bij de daaropvolgende epileptogenese. Het toedienen van allopurinol kan volgens deze hypothese dus geen invloed hebben op het aantal en de duur van de aanvallen tijdens de status epilepticus. We moeten er echter wel rekening mee houden dat allopurinol ook een stijging van adenosine kan veroorzaken die wel een effect zou kunnen uitoefenen op de aanvallen. Gezien we dit effect hier niet waarnemen kunnen we vermoeden dat de extra stijging van adenosine door allopurinol, bovenop de toename die reeds bij elke status epilepticus aanwezig is, in dit experiment onvoldoende was om een waarneembaar effect uit te oefenen. Het zou dus nuttig zijn om tegelijk met urinezuur ook de wijzingen in adenosine concentratie na te gaan ter hoogte van de hippocampus. Andere studies (Mikhailov and Gusel, 1983; Wada et al., 1992; Murashima et al., 1998) tonen echter wel een effect van allopurinol, maar slecht één daarvan gaat dit effect na op het aantal aanvallen (Murashima et al., 1998). Er wordt een volledige afwezigheid van aanvallen vastgesteld, maar het is wel belangrijk op te merken dat er in deze studie gebruik gemaakt wordt van een mutant muismodel voor epilepsie (mutante EL muizen) waar aanvallen geïnduceerd worden door muizen 30 maal 10 cm omhoog te gooien. Deze muizen vertonen ook maar spontane aanvallen gedurende 48 uur. Dit model is slechts gevalideerd voor secundaire gegeneraliseerde aanvallen waarbij de epileptische focus gelegen is in de pariëtale cortex. Dit is dus geen goed model voor MTLE, gezien er geen onderscheid kan worden gemaakt in een acuut voorval, een latente epileptogene fase en een chronische fase met spontane aanvallen. Dit kan dus het verschil in bevindingen verklaren tussen ons experiment en het experiment uitgevoerd door Murashima et al. (2009).

De resultaten van ons experiment zijn echter ook tegenstrijdig met eerdere gegevens uit onderzoek naar de rol van IL-1 β bij epilepsie en epileptogenese (Ravizza et al., 2006). In dit onderzoek gaf knock-out van het gen caspase-1 bij muizen aanleiding tot een aanvalsreductie en een daling van de totale aanvalsduur. Gezien er een lagere concentratie urinezuur wordt waargenomen in de experimentele groep zouden we een gelijkaardig effect kunnen verwachten door de verminderde activatie van NALP-3 en dus ook caspase-1 in het door ons uitgevoerde experiment. Dat is echter niet het geval en dit kan enerzijds veroorzaakt worden door de afwezigheid van een significant verschil in IL-1 β en anderzijds door het feit dat er bij de experimenten van Ravizza et al. maar 0,065 nmol kainaat intra-hippocampaal werd geïnjecteerd. In het experiment met allopurinol wordt er namelijk een veel hogere dosis gebruikt gezien onderzoek aantoont dat een dosis van 1 nmol nodig is voor het genereren van spontane aanvallen na status epilepticus (Riban et al., 2002). We kunnen daarenboven nog opmerken dat Ravizza et al. (2006) geen stijging van IL-18 konden aantonen bij hun onderzoek. Zij verwijderden de hippocampi 90 minuten na de start van de status epilepticus. Deze bevindingen passen in onze hypothese dat IL-18 maar op een later tijdstip tot expressie komt.

Tot slot hebben we nog nagegaan of de status veroorzaakt door infusie van kainaat via de microdialyseprobe wel een goed model is voor MTLE, met andere woorden, treden er na een latentieperiode

spontane aanvallen op? Bij één muis uit de controlegroep werd de hippocampus niet verwijderd na het microdialyse- experiment en deze werd 1 maand na de status voor 1 week aan een video/EEG registratie-eenheid gekoppeld. Tijdens deze week deden er zich acht gegeneraliseerde aanvallen voor. Gezien we deze vaststellingen nog maar bij één muis gedaan hebben kunnen we hieruit nog niet besluiten dat dit een goed model is voor MTLE, maar deze resultaten zijn alleszins veelbelovend.

Zoals reeds vermeld, spitsen de meeste onderzoekers zich vooral toe op het effect van IL-1 β . In een groot aantal studies kan men namelijk aantonen dat dit cytokine een proconvulsief effect uitoefent (Ravizza et al., 2006; Ravizza et al., 2008; Vezzani et al., 1999; Vezzani et al., 2000). We mogen echter niet uit het oog verliezen dat er ook enkele studies zijn die geen of een neuroprotectief effect aantonen (Miller et al., 1991; Sayyah et al., 2005). Dit dubbel effect wordt niet enkel bij IL-1 β waargenomen. Verschillende studies wijzen namelijk op de dichotome rol van het immuunsysteem in het centraal zenuwstelsel. Enerzijds kunnen inflammatoire reacties een protectief effect uitoefenen en dus een gunstige endogene respons vormen. Anderzijds kunnen immunologische processen direct of indirect neurologische schade veroorzaken. Men gaat er meer en meer van uit dat het finale resultaat van dit proces en dus de celfunctie en overleving van neuronen sterk afhankelijk zijn van de mate waarin cytokines worden geproduceerd, de totale tijd waarin het weefsel is blootgesteld aan inflammatie en het evenwicht tussen de gesynthetiseerde neurotrope en inflammatoire factoren (Vezzani en Granata, 2005; Trendelenburg, 2008). Naast IL-1 β lijkt er ook een centrale rol te zijn voor IL-18, dat deel uitmaakt van dezelfde IL-1 familie. Onderzoek bij muizen heeft aangetoond dat toediening van IL-18 voor de injectie van kainaat neurodegeneratie versterkt (Jeon et al., 2007) doch deze resultaten konden niet bevestigd worden bij gebruik van IL-18 KO muizen waar men tegen de verwachtingen in een toename van neurodegeneratie vaststelde (Zhang et al., 2007). Deze tegenstrijdige resultaten kunnen enerzijds verklaard worden door een upregulatie van IFN- γ en IL-12 bij IL-18 KO muizen en anderzijds een verschillend tijdstip waarop neurodegeneratie werd nagegaan, namelijk 3 of 7 dagen na kainaat geïnduceerde status epilepticus. De tijds- en localisatiegebonden distributie van IL-1 β en IL-18 bij ischemie werden reeds hiervoor besproken. Deze gegevens wijzen nogmaals op de dichotome rol van het immuunsysteem in het centraal zenuwstelsel en het belang van het tijdstip en de plaats waarop deze cytokines vrijgesteld worden.

Bij inflammatie kan IL-1 β geactiveerd worden door caspase-1 dat op zijn beurt wordt geactiveerd door het inflammasoom NALP-3. We hebben beschreven dat NALP-3 geactiveerd wordt door DAMPs zoals urinezuur in associatie met TNF- α (Franchi et al., 2009). Het is echter belangrijk op te merken dat IL-1 β ook nog op andere manieren geactiveerd kan worden. Serine protease afkomstig van neutrofielen of enzymen vrijgesteld door pathogenen kunnen pro-IL-1 β omzetten tot IL-1 β . Hieruit volgt dus dat inflammatie veroorzaakt door neutrofielen zo goed als onafhankelijk verloopt van caspase-1.

Inflammasoom activatie is ook verschillend voor verschillende celtypes. Zo is bij circulerende monocytten één enkel signaal voldoende voor inflammasoom activatie terwijl er bij macrofagen twee signalen nodig zijn. Zo is één PAMP voldoende voor de activatie van monocytten terwijl macrofagen zowel een PAMP als DAMP nodig hebben. In het geval van steriele inflammatie wordt de rol van PAMP bij macrofagen overgenomen door TNF- α . Dit verschil vertegenwoordigt vermoedelijk een verschil in fysiologische functie, gezien monocytten vooral in een pathogeen-vrij milieu circuleren en snel op elk gevaarsignaal moeten kunnen reageren. Macrofagen bevinden zich daarentegen in een omgeving waarin ze continu worden blootgesteld aan microbiële stimuli en vereisen dus een tweede signaal om de inflammatoire reactie onder controle te houden. Tot slot zorgt niet enkel NALP-3 voor de activatie van caspase-1 in macrofagen, maar ook NALP-1, IPAF en AIM-2 (Netea et al., 2010). Enkel voor NALP-3 (Martinon et al., 2009) en NALP-1 (Abulafia et al., 2009) is er voorlopig een rol aangetoond bij steriele inflammatie.

Specifiek bij epilepsie zijn er slechts enkele studies die onderzoek verrichten naar de rol van urinezuur bij diermodellen van MTLE of de urinezuurconcentratie bepalen bij patiënten met epilepsie. Uit deze studies blijkt echter wel dat er bij patiënten met epilepsie wel degelijk een tendens is tot hyperuricemie, die lijkt te verdwijnen bij behandeling (Hamed et al., 2004; Stover et al., 1997). Bij ratten toonden experimenten aan dat er ter hoogte van de hippocampus een stijging van urinezuur wordt waargenomen na kainaats toediening (Layton et al., 1997).

Een bijkomend argument voor de rol van urinezuur bij epilepsie wordt geleverd door verschillende studies die het effect nagaan van allopurinol, een inhibitor van het enzym xanthine oxidase, bij patiënten met epilepsie. Deze studies leveren echter tegenstrijdige resultaten op, die verklaard kunnen worden door het klein aantal deelnemers en door de grote verscheidenheid aan epilepsiesyndromen die voorkomen in deze studies. Een ander probleem bij het vergelijken van deze studies is het feit dat sommige enkel bij kinderen werden uitgevoerd, terwijl er bij andere geen onderscheid gemaakt werd tussen kinderen en volwassenen. Het is ook belangrijk op te merken dat er in al deze studies geen interacties van allopurinol ten opzichte van de reeds bestaande AEDs werden waargenomen en de spiegel van deze AEDs constant bleef gedurende het verloop van de experimenten. Het effect van allopurinol kan dus met andere woorden niet worden toegeschreven aan wijzingen in de plasmaspiegel van verschillende AEDs. Er is echter wel een belangrijk verschil in gebruikte AEDs inter- en intra-experimenteel. Er worden in de literatuur verschillende verklaringen gegeven voor dit anti-epileptisch effect van allopurinol waarvan naast een vermindering van inflammatie een toename van adenosine ons de meest waarschijnlijke mogelijkheden lijken.

In verband met de dosis van allopurinol willen we nog opmerken dat de gebruikte dosis in deze studie, namelijk 100 mg/kg, veel hoger is dan deze die in de klinische praktijk gebruikt wordt voor de

behandeling van jicht waar 300 mg per dag wordt toegediend in één gift of de dosissen gebruikt bij de behandeling van epilepsie in de vermelde studies. Uiteraard moeten er aan kleine proefdieren hogere dosissen toegediend worden dan aan mensen, doch het kan interessant zijn na te gaan wat de laagste dosis allopurinol is die hetzelfde effect kan uitlokken.

De rol van urinezuur bij inflammatie tijdens epileptogenese is dus een interessant onderzoeksdomein gezien het enerzijds zorgt voor activatie van het inflammasoom en er anderzijds reeds een aantal studies gepubliceerd zijn die een urinezuurstijging aantonen bij patiënten met epilepsie en studies die een gunstig effect aantonen bij het gebruik van allopurinol. Er zijn daarenboven ook meer en meer onderzoeken die een rol toeschrijven aan urinezuur in de etiopathogenese van verschillende andere aandoeningen, zodat de mogelijkheid bestaat dat urinezuur ook bij epilepsie en epileptogenese een rol speelt.

Onze resultaten ondersteunen deze waarnemingen en tonen aan dat kinaat-geïnduceerde status epilepticus een belangrijke intrahippocampale urinezuurstijging veroorzaakt bij muizen die kan onderdrukt worden door een toediening van allopurinol aan een dosis van 100 mg/kg. Deze daling van de urinezuurconcentratie zorgt voor een daling van zowel IL-1 β , TNF- α als IL-18. Hoewel deze daling enkel significant is bij TNF- α , wordt er ook bij de twee andere cytokines een duidelijke trend vastgesteld. Zoals reeds eerder besproken kunnen we deze verschillen verklaren op basis van de hypothese dat deze cytokines op een verschillend tijdstip tot expressie komen en het in de tijd gelimiteerde effect van één dosis allopurinol.

Naar de toekomst toe lijkt het interessant om het experiment nog met enkele muizen verder te zetten om aan te kunnen tonen dat er een significante daling is van IL-1 β en IL-18. Daarnaast kunnen we de expressie van IL-1 β en IL-18 in een status epilepticus model voor MTLE nagaan in de tijd. Op deze manier kunnen we onderzoeken of we tot dezelfde vaststellingen kunnen komen als bij ischemie, namelijk dat IL-1 β vooral tussenkomt bij de acute fase van inflammatie en IL-18 pas later tot expressie komt. Bovendien kunnen we nagaan of meerdere toedieningen van allopurinol er ook in slagen om de toename van IL-18 te inhiberen en kunnen we op zoek gaan naar de minimale dosis allopurinol die noodzakelijk is om dit effect uit te oefenen.

Het lijkt ook aangewezen om het effect van allopurinol op de hoeveelheid adenosine ter hoogte van de hippocampus na te gaan, gezien een toename van adenosine een synergistisch effect kan uitoefenen met de daling van de cytokines bij het verhinderen van epileptogenese.

Tot slot kunnen we dan onderzoeken wat het effect is van chronische toediening van allopurinol gedurende de epileptogene fase op het optreden van spontane epileptische aanvallen. Dit is uiteraard het onderzoek met de meeste klinische relevantie.

5. Referenties

BADAWY A.A., EVANS M. The mechanism of inhibition of rat liver tryptophanpyrrolase activity by 4-hydroxypyrazolo(3,4-d)pyrimidine (Allopurinol). *Biochem J.* 1973, 133: 585-591.

BOISON D. Adenosine kinase, epilepsy and stroke: mechanisms and therapies. *Trends Pharmacol Sci.* 2006, 27: 652-658.

CHAMORRO A., OBACH V., CERVERA A., REVILLA M., DEULOFEU R., APONTE J.H. Prognostic significance of uric acid serum concentration in patients with acute ischemic stroke. *Stroke.* 2002, 33: 1048-1052.

CHERUBINI A., POLIDORI M.C., BREGNOCCHI M., PEZZUTO S., CECCHETTI R., INGEGNI T., DI IORIO A., SENIN U., MECOCCI P. Antioxidant profile and early outcome in stroke patients. *Stroke.* 2000, 31: 2295-3000.

COLEMAN M., LANDGREBE M., LANDGREBE A. Progressive seizures with hyperuricosuria reversed by allopurinol. *Arch Neurol.* 1974, 31: 238-242.

COLEMAN M., LANDGREBE M., LANDGREBE A. Purine seizure disorders. *Epilepsia.* 1986, 27: 263-269.

COPPOLA G., PASCOTTO A. Double-blind, placebo-controlled, cross-over trial of allopurinol as add-on therapy in childhood refractory epilepsy. *Brain Dev.* 1996, 18: 50-52.

DE MARCO P, ZAGNONI P. Allopurinol in severe epilepsy. A preliminary report. *Neuropsychobiology.* 1988, 19: 51-53.

DU Y., CHEN C.P., TSENG C.Y., EISENBERG Y., FIRESTEIN B.L. Astroglia-mediated effects of uric acid to protect spinal cord neurons from glutamate toxicity. *Glia.* 2007, 55: 463-472.

DUPONT W.D., PLUMMER W.D. Power and Sample Size Calculations: A Review and Computer Program. *Controlled Clinical Trials* 1990, 11: 116-128.

FELDERHOFF-MUESER U., SCHMIDT O.I., OBERHOLZER A., BÜHRER C., STAHEL P.F. IL-18: a key player in neuroinflammation and neurodegeneration? *Trends Neurosci.* 2005, 28: 487-493.

FRANCHI L., EIGENBROD T., NÚÑEZ G. Cutting edge: TNF-alpha mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3 inflammasome in the absence of microbial stimulation. *J Immunol.* 2009, 183: 792-796.

FRANKLIN K.B.J., PAXINOS G. *The mouse brain in stereotactic coordinates*, third edition 2008. Academic Press, Elsevier, New York.

GUERREIRO S., PONCEAU A., TOULORGE D., MARTIN E., ALVAREZ-FISCHER D., HIRSCH E.C., MICHEL P.P. Protection of midbrain dopaminergic neurons by the end-product of purine metabolism uric acid: potentiation by low-level depolarization. *J Neurochem.* 2009, 109: 1118-1128.

HAMED S.A., ABDELLAH M.M., EL-MELEGY N. Blood levels of trace elements, electrolytes, and oxidative stress/antioxidant systems in epileptic patients. *J Pharmacol Sci.* 2004, 96: 465-473.

HOOPER D.C., SPITSIN S., KEAN R.B., CHAMPION J.M., DICKSON G.M., CHAUDHRY I., KOPROWSKI H. Uric acid, a natural scavenger of peroxynitrite, in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998, 95: 675-680.

HOPPE S.A., TERRELL D.J., GOTTLIEB S.F. The effect of allopurinol on oxygen-induced seizures in mice. *Aviat Space Environ Med*. 1984, 55: 927-930.

HURTADO O., LIZASOAIN I., FERNÁNDEZ-TOMÉ P., ALVAREZ-BARRIENTOS A., LEZA J.C., LORENZO P., MORO M.A. TACE/ADAM17-TNF-alpha pathway in rat cortical cultures after exposure to oxygen-glucose deprivation or glutamate. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002, 22: 576-585.

JANDER S., SCHROETER M., STOLL G. Interleukin-18 expression after focal ischemia of the rat brain: association with the late-stage inflammatory response. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002, 22: 62-70.

JEON G.S., PARK S.K., PARK S.W., KIM D.W., CHUNG C.K., CHO S.S. Glial expression of interleukin-18 and its receptor after excitotoxic damage in the mouse hippocampus. *Neurochem Res*. 2008, 33: 179-184.

KOCH M., DE KEYSER J. Uric acid in multiple sclerosis. *Neurol Res*. 2006, 28: 316-319.

KUTZING M.K., FIRESTEIN B.L. Altered uric acid levels and disease states. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008, 324: 1-7.

LAYTON M.E., SAMSON F.E., PAZDERNIK T.L. Kainic acid causes redox changes in cerebral cortex extracellular fluid: NMDA receptor activity increases ascorbic acid whereas seizure activity increases uric acid. *Neuropharmacology*. 1998, 37: 149-157.

MARKOWITZ C.E., SPITSIN S., ZIMMERMAN V., JACOBS D., UDUPA J.K., HOOPER D.C., KOPROWSKI H. The treatment of multiple sclerosis with inosine. *J Altern Complement Med*. 2009, 15: 619-625.

MARTINON F., MAYOR A., TSCHOPP J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol*. 2009, 27: 229-265.

MIKHAILOV I.B., GUSEL V.A. Pharmacodynamic mechanisms for reducing the activity of an epileptogenic focus with allopurinol. *Zh Nevropatol Psikhiatr Im S S Korsakova*. 1983, 83: 870-873.

MILLER L.G., GALPERN W.R., DUNLAP K., DINARELLO C.A., TURNER T.J. Interleukin-1 augments gamma-aminobutyric acidA receptor function in brain. *Mol Pharmacol*. 1991, 39: 105-108.

MURASHIMA Y.L., KASAMO K., SUZUKI J. Antiepileptic effects of allopurinol on EL mice are associated with changes in SOD isoenzyme activities. *Epilepsy Res*. 1998, 32: 254-265.

NETEA M.G., SIMON A., VAN DE VEERDONK F., KULLBERG B.J., VAN DER MEER J.W., JOOSTEN L.A. IL-1beta processing in host defense: beyond the inflammasomes. *PLoS Pathog*. 2010, 6: e1000661.

PITKÄNEN A., LUKASIUK K. Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2009, 14, Suppl 1: 16-25.

RAVIZZA T., GAGLIARDI B., NOÉ F., BOER K., ARONICA E., VEZZANI A. Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis*. 2008, 29: 142-160.

RAVIZZA T., LUCAS S.M., BALOSSO S., BERNARDINO L., KU G., NOÉ F., MALVA J., RANDLE JC., ALLAN S., VEZZANI A. Inactivation of caspase-1 in rodent brain: a novel anticonvulsive strategy. *Epilepsia*. 2006, 47: 1160-1168.

RIBAN V., BOUILLERET V., PHAM-LÊ B.T., FRITSCHY J.M., MARESCAUX C., DEPAULIS A. Evolution of hippocampal epileptic activity during the development of hippocampal sclerosis in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*. 2002, 112: 101-111.

RIJKERS K., MAJOIE H.J., HOOGLAND G., KENIS G., DE BAETS M., VLES J.S. The role of interleukin-1 in seizures and epilepsy: a critical review. *Exp Neurol*. 2009, 216: 258-271.

SANDER J.W., PATSALOS P.N. Allopurinol as an add-on drug in the management of intractable epilepsy. *Epilepsy Res*. 1988, 2: 223-225.

SAYYAH M., BEHESHTI S., SHOKRGOZAR M.A., ESLAMI-FAR A., DELJOO Z., KHABIRI A.R., HAERI ROHANI A. Antiepileptogenic and anticonvulsant activity of interleukin-1 beta in amygdala-kindled rats. *Exp Neurol*. 2005, 191: 145-153.

SCHMIDT A.P., BÖHMER A.E., ANTUNES C., SCHALLENBERGER C., PORCIÚNCULA L.O., ELISABETSKY E., LARA D.R., SOUZA D.O.. Anti-nociceptive properties of the xanthine oxidase inhibitor allopurinol in mice: role of A1 adenosine receptors. *Br J Pharmacol*. 2009, 156: 163-172.

SCOTT G.S., CUZZOCREA S., GENOVESE T., KOPROWSKI H., HOOPER D.C. Uric acid protects against secondary damage after spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102: 3483-3488.

SHARMA A.K., REAMS R.Y., JORDAN W.H., MILLER M.A., THACKER H.L., SNYDER P.W. Mesial temporal lobe epilepsy: pathogenesis, induced rodent models and lesions. *Toxicol Pathol*. 2007, 35: 984-999.

SPENCER S.S. When should temporal-lobe epilepsy be treated surgically? *Lancet Neurol*. 2002, 1: 375-382.

SQUADRITO G.L., CUETO R., SPLENSER A.E., VALAVANIDIS A., ZHANG H., UPPU R.M., PRYOR W.A. Reaction of uric acid with peroxynitrite and implications for the mechanism of neuroprotection by uric acid. *Arch Biochem Biophys*. 2000, 376: 333-337.

STOVER J.F., LOWITZSCH K., KEMPSKI O.S. Cerebrospinal fluid hypoxanthine, xanthine and uric acid levels may reflect glutamate-mediated excitotoxicity in different neurological diseases. *Neurosci Lett*. 1997, 238: 25-28.

TADA H., MOROOKA K., ARIMOTO K., MATSUO T. Clinical effects of allopurinol on intractable epilepsy. *Epilepsia*. 1991, 32: 279-283.

TOGHA M., AKHONDZADEH S., MOTAMEDI M., AHMADI B., RAZEGHI S. Allopurinol as adjunctive therapy in intractable epilepsy: a double-blind and placebo-controlled trial. *Arch Med Res*. 2007, 38: 313-316.

TRACKEY J.L., ULIASZ T.F., HEWETT S.J. SIN-1-induced cytotoxicity in mixed cortical cell culture: peroxynitrite-dependent and -independent induction of excitotoxic cell death. *J Neurochem*. 2001, 79: 445-455.

TRENDELENBURG G. Acute neurodegeneration and the inflammasome: central processor for danger signals and the inflammatory response? *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008, 28: 867-881.

VEZZANI A., CONTI M., DE LUIGI A., RAVIZZA T., MONETA D., MARCHESI F., DE SIMONI M.G. Interleukin-1beta immunoreactivity and microglia are enhanced in the rat hippocampus by focal kainate application: functional evidence for enhancement of electrographic seizures. *J Neurosci.* 1999, 19: 5054-5065.

VEZZANI A., GRANATA T. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia.* 2005, 46: 1724-1743.

VEZZANI A., MONETA D., CONTI M., RICHICHI C., RAVIZZA T., DE LUIGI A., DE SIMONI M.G., SPERK G., ANDELL-JONSSON S., LUNDKVIST J., IVERFELDT K., BARTFAI T. Powerful anticonvulsant action of IL-1 receptor antagonist on intracerebral injection and astrocytic overexpression in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000, 97: 11534-11539.

WADA Y., HASEGAWA H., NAKAMURA M., YAMAGUCHI N. Anticonvulsant effect of allopurinol on hippocampal-kindled seizures. *Pharmacol Biochem Behav.* 1992, 42: 899-901.

WARING W.S., WEBB D.J., MAXWELL S.R. Uric acid as a risk factor for cardiovascular disease. *QJM.* 2000, 93: 707-713.

WEIR C.J., MUIR S.W., WALTERS M.R., LEES K.R. Serum urate as an independent predictor of poor outcome and future vascular events after acute stroke. *Stroke.* 2003, 34: 1951-1956.

WHEELER R.D., BOUTIN H., TOUZANI O., LUHESHI G.N., TAKEDA K., ROTHWELL N.J. No role for interleukin-18 in acute murine stroke-induced brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003, 23: 531-535.

WU X., MUZNY D.M., LEE C.C., CASHER C.T. Two independent mutational events in the loss of urate oxidase. *J Mol Evol* 1992, 34: 78-84.

YU Z.F., BRUCE-KELLER A.J., GOODMAN Y., MATTSO M.P. Uric acid protects neurons against excitotoxic and metabolic insults in cell culture, and against focal ischemic brain injury in vivo. *J Neurosci Res.* 1998, 53: 613-625.

ZAGNONI P.G., BIANCHI A., ZOLO P., CANGER R., CORNAGGIA C., D'ALESSANDRO P., DEMARCO P., PISANI F., GIANELLI M., VERZÉ L. Allopurinol as add-on therapy in refractory epilepsy: a double-blind placebo-controlled randomized study. *Epilepsia.* 1994, 35: 107-112.

ZHANG X.M., DUAN R.S., CHEN Z., QUEZADA H.C., MIX E., WINBLAD B., ZHU J. IL-18 deficiency aggravates kainic acid-induced hippocampal neurodegeneration in C57BL/6 mice due to an overcompensation by IL-12. *Exp Neurol.* 2007, 205: 64-73.

