



Evaluatie van nervus vagus stimulatie in het motor cortex model voor epilepsie

Annelies GRIMONPREZ

Verhandeling ingediend tot
het verkrijgen van de graad van
Master in de Biomedische Wetenschappen

Promotor: Prof. Dr. *Paul Boon*
Vakgroep *Inwendige ziekten*
Academiejaar 2010-2011



Evaluatie van nervus vagus stimulatie in het motor cortex model voor epilepsie

Annelies GRIMONPREZ

Verhandeling ingediend tot
het verkrijgen van de graad van
Master in de Biomedische Wetenschappen

Promotor: Prof. Dr. *Paul Boon*
Vakgroep *Inwendige ziekten*
Academiejaar 2010-2011

“De auteur en de promotor geven de toelating deze masterproef 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 deze masterproef.”

Datum 20 mei 2011

Annelies Grimonprez

Prof Dr. Paul Boon

Voorwoord

Graag had ik van deze gelegenheid gebruik gemaakt om iedereen te bedanken die mij geholpen heeft om deze masterproef tot een goed einde te brengen.

Prof. Dr. Paul Boon, u heeft mij kennis laten maken met de boeiende wereld van de neurologie en mij de kans gegeven om deze masterproef te schrijven.

Ook Prof. Robrecht Raedt en Prof. Dr. Kristl Vonck wil ik graag bedanken voor de goede opvolging van het voorbije jaar en het vele nalees werk. Samen met jullie kwamen de ideeën en de hypotheses voor de proeven tot stand.

In het bijzonder wil ik Lies Mollet bedanken voor de enthousiaste begeleiding gedurende het afgelopen jaar. Lies leerde mij hoe ik een vagus-elektrode moest implanteren, hoe ik stimulaties moest toedienen, hoe je een swivel herstelt, maar ook dat in wetenschappelijk onderzoek niet altijd alles verloopt zoals je het plant. Bedankt Lies, ik kon mij geen betere begeleidster voorstellen!

Ook Ine Buffel wil ik heel erg hard bedanken voor alle tips en tricks die ik het afgelopen jaar van haar geleerd heb over het corticale stimulatiemodel en de hulp bij de statistische verwerking van de resultaten. Samen met Lies en Lynn hebben we heel wat afgelachen in ons veel te kleine kotje, ten minste als er geen stressgevoelige proef bezig was!

Ook Diëgo wil ik van harte bedanken. Solderen, installeren van camera's, computers en zelfs het werken met de oscilloscoop hebben voor mij 'bijna' geen geheimen meer. Dat dacht ik toch steeds tot ik je weer eens moest roepen om het nog één laatste keer voor te tonen.

Verder wil ik ook Ine, Bregt, Tine en Julie bedanken alsook mijn klasgenoten Delphine, Lynn, Liesbeth, en de twee Jokes! Bedankt voor alle hulp en leuke momenten die we samen beleefden in het labo!

Ook wil ik graag mijn beste Rekkemse vriendinnen Jolle, Linde en Abbie bedanken voor de nodige ontspanning en flipmomentjes! En het is niet omdat Abbie en ik nu afgestudeerd zijn dat de koffiekletsen daardoor niet meer zullen doorgaan in de examens he!

Sofie, Lisl, Djules en Florence a.k.a 'the biomedical chicks' draag ik ook een warm hart toe. Merci voor de vijf leuke jaartjes op het UZ en natuurlijk ook daar naast in Gent!

De allergrootste dank gaat uit naar mijn ouders, broer (Tom, merci voor het vele naleeswerk!) en vriend voor de onvoorwaardelijke steun en het geloof die jullie de voorbije vijf jaar in mij stelden. Naast de financiële steun hebben jullie mij ook altijd emotioneel gesteund en opgekrikt als ik het even niet meer zag zitten, **BEDANKT VOOR ALLES!**

Inhoudsopgave

Samenvatting	1
1 Inleiding.....	2
1.1 Definitie van epilepsie.....	2
1.2 Oorzaken van epilepsie	2
1.3 Aanvalsclassificatie	3
1.3.1 Partiële of focale aanvallen	3
1.3.2 Veralgemeende of gegeneraliseerde aanvallen	3
1.4 Behandelingen voor epilepsie	4
1.4.1 Anti-epileptica	4
1.4.2 Epilepsiechirurgie.....	5
1.4.3 Neurostimulatie: Nervus vagus stimulatie en diepe hersenstimulatie.....	5
1.4.3.1 De anatomie van de nervus vagus	5
1.4.3.2 Nervus vagus stimulatie: algemeen.....	6
1.4.3.3 Efficiëntie van nervus vagus stimulatie	7
1.4.3.4 Het werkingsmechanisme van nervus vagus stimulatie.....	8
1.4.3.4.1 Desynchronisatie van de neuronale discharge	9
1.4.3.4.2 Neurotransmitters	9
1.4.3.4.3 Modulatie van de exciteerbaarheid.....	10
1.4.3.5 Voordelen	11
1.4.3.6 Nadelen.....	12
1.4.3.7 Stimulatieparameters	13
1.5 Proefdiermodel voor corticale exciteerbaarheid: het corticale stimulatiemodel	13
1.6 Rationale van de masterproef	15
2. Materialen en methoden	17
2.1 Dieren	17
2.2 Materiaal.....	17
2.2.1 Voorversterkers	17
2.2.2 Epidurale elektrodes	17
2.2.3 Nervus vagus elektrodes.....	18
2.3 Operatie: plaatsing van de NVS-elektrode en de epidurale elektrodes	18
2.4 Instellen van een stabiele aanvalsdrempel in het corticaal stimulatiemodel	21
2.5 Effect van verschillende NVS intensiteiten op de aanvalsdrempel.....	22

2.6 Video-EEG monitoring	25
2.6.1 Het EEG	25
2.6.2 Videobeelden.....	25
2.7 Stabiliteit van de aanvalsdrempel na een lange tijd	25
2.8 Langdurige NVS	25
2.9 Statistische analyse.....	25
2.10 Histologie	26
3. Resultaten.....	27
3.1 Instellen van een stabiele aanvalsdrempel in het corticaal stimulatiemodel	27
3.2 Effect van NVS intensiteiten op de aanvalsdrempel	28
3.3 Video-EEG monitoring	29
3.3.1 Het EEG	29
3.3.2 Videobeelden.....	30
3.3.2.1 Stimulatiegerelateerde neveneffecten.....	30
3.3.2.2 Het syndroom van Horner	30
3.4 Stabiliteit van de aanvalsdrempel na een lange tijd	31
3.5 Langdurige nervus vagus stimulatie.....	31
3.6 Histologie	31
4. Bespreking.....	33
4.1 Instellen van een stabiele aanvalsdrempel in het corticale stimulatiemodel	33
4.1.1 Klinische variabiliteit van de gedragsveranderingen	33
4.1.2 Variatie in de stabiele drempelwaarden	33
4.1.3 Vergelijking van de drempelwaarden met de literatuur	34
4.2 Effect van verschillende NVS intensiteiten op de aanvalsdrempel.....	35
4.3 Het EEG	38
4.4 Neveneffecten.....	39
4.4.1 Stimulatiegerelateerde neveneffecten.....	39
4.4.2 Het syndroom van Horner	39
4.4 Bepalen van de stabiliteit van de aanvalsdrempel na een lange periode.....	40
4.5 Langdurige NVS	42
4.6 Histologie	42
5. Algemeen besluit.....	44
6. Referenties.....	45

Samenvatting

Deze studie kadert binnen de activiteiten van het Laboratorium voor Klinische en Experimentele Neurofysiologie (LKEN) onder leiding van Prof. Dr. Paul Boon.

Nervus vagus stimulatie (NVS) is een efficiënte, breed spectrum ‘add-on’ behandeling voor patiënten met refractaire epilepsie. Het aanvalsonderdrukkend werkingsmechanisme en de optimale stimulatieparameters zijn tot op vandaag nog onvoldoende gekend. In deze masterproef werden 4 NVS intensiteiten (0.25 mA, 0.25 mA, 0.50 mA en 1.00 mA) getest in het corticale stimulatiemodel. In dit ratmodel voor corticale exciteerbaarheid worden lokale motorische aanvallen uitgelokt door stimulatie van de motorische cortex. Er werd onderzocht welke van de 4 NVS intensiteiten de aanvalsdrempel verhoogt en dus de exciteerbaarheid van de cortex verlaagt. Er kon geconcludeerd worden dat NVS aan een intensiteit van 0.25 mA en 0.50 mA de exciteerbaarheid van de hersenen significant meer reduceert dan NVS aan een intensiteit van 0.00 mA ($p=0.001$ en 0.021 respectievelijk). NVS aan een intensiteit van 0.25 mA reduceert de exciteerbaarheid het meest, maar er werd geen significant verschil gevonden met NVS aan een intensiteit van 0.50 mA ($p=0.300$). Voor NVS aan een intensiteit van 1.00 mA konden geen significante verhogingen van de aanvalsdrempel worden aangetoond.

Trefwoorden: nervus vagus stimulatie, stimulatieparameters, corticaal stimulatiemodel

1 Inleiding

1.1 Definitie van epilepsie

Epilepsie is een chronische neurologische aandoening die gekenmerkt wordt door terugkerende, spontaan optredende epileptische aanvallen. De diagnose van epilepsie kan maar gesteld worden nadat minstens twee epileptische aanvallen zijn opgetreden. Een epileptische aanval is een stoornis in het gedrag en/of het bewustzijn veroorzaakt door overmatige, abnormale hypersynchrone ontladingen van neuronen in de cortex. De corticale regio waar deze abnormale activiteit ontstaat, wordt de epileptische focus genoemd. De lokalisatie en grootte van deze epileptische focus bepalen het klinisch uitzicht van de aanvallen [1, 2]. Met een prevalentie van 0,5 tot 1% is epilepsie de tweede meest voorkomende neurologische aandoening na cerebrovasculaire accidenten (CVA). De incidentie van epilepsie is het hoogst gedurende de eerste levensmaanden, het laagst op volwassen leeftijd en verhoogt weer bij ouderen door een hoge prevalentie van CVA boven de 55 jaar [1].

1.2 Oorzaken van epilepsie

Epileptogenese is het proces verantwoordelijk voor het veranderen van het neuronale netwerk naar een hyperexciteerbaar netwerk. Dit proces kan maanden tot jaren in beslag nemen en ligt aan de basis van het ontstaan van epilepsie. De precieze veranderingen in de hersenen geassocieerd met epileptogenese zijn nog niet volledig begrepen [3].

Bij epilepsie is er een verstoring in het excitatie-inhibitie evenwicht in de hersenen. Een aanval ontstaat ten gevolge van abnormale excessieve en synchrone neuronale activiteit in de hersenschors. Er zijn heel veel onderliggende oorzaken voor epilepsie en patiënten met epilepsie vormen bij gevolg een heterogene populatie. Risicofactoren voor epilepsie zijn onder andere hersentraumata, CVAs, hersentumoren, infecties van het centraal zenuwstelsel, neurodegeneratieve aandoeningen, ontwikkelingsstoornissen, intra-uteriene infecties of intoxicaties, langdurige anoxie bij de geboorte, abstinantie van alcohol en psychofarmaca, degeneratieve ziekten en familiale factoren (zo zijn bepaalde genen betrokken in het ontstaan van epilepsie) [2, 3].

1.3 Aanvalsclassificatie

Afhankelijk van lokalisatie en spreiding, kunnen epileptische aanvallen partieel (focaal) of veralgemeend zijn. Deze classificatie (partieel versus veralgemeend) is gebaseerd op de klinische symptomen en de electroencefalografische (EEG) karakteristieken. Epileptische syndromen kunnen ook onderverdeeld worden naargelang de onderliggende oorzaak. Enerzijds onderscheiden we primair veralgemeende epilepsie (of ideopatische epilepsie) waarbij men geen anatomische afwijkingen vindt in de hersenen. De oorzaak van idiopatische epilepsie is onbekend, maar men weet wel dat erfelijke factoren een rol spelen. Vaak gaat het bij genetische defecten om genen die ionkanalen vormen (natrium-, kalium- en calciumkanalen). Vormen van epilepsie waarbij deze defecten de oorzaak zijn, worden ‘channelopathieën’ genoemd. Anderzijds onderscheiden we symptomatische epilepsie waarbij men op basis van neurologische, psychiatrische, psychische en EEG veranderingen cerebrale schade kan veronderstellen [1, 2].

1.3.1 Partiële of focale aanvallen

Bij partiële of focale aanvallen ontstaat de epileptische activiteit in een welomlijnd gebied van de hersenschors. De vroegste klinische en EEG veranderingen tonen dat er initieel activatie is van een groep neuronen in een deel van één cerebrale hemisfeer. Er is een grote variatie in de klinische manifestaties en de ernst van de aanvallen. Deze focale aanvallen worden verder onderverdeeld in *enkelvoudige aanvallen* (met behoud van het bewustzijn) en *complexe aanvallen* (met bewustzijnsverlies). Zowel enkelvoudige als complex partiële aanvallen kunnen secundair veralgemenen [2, 3, 4].

1.3.2 Veralgemeende of gegeneraliseerde aanvallen

Veralgemeende of gegeneraliseerde aanvallen zijn het resultaat van abnormale paroxysmale ontladingen van de volledige cerebrale cortex. Hierbij onderscheiden we onder andere tonisch-clonische aanvallen, absences, atone en myoclone aanvallen. *Een veralgemeende tonisch-clonische aanval* wordt onder andere gekenmerkt door bewustzijnsverlies en veralgemeende tonisch-clonische convulsies. *Absence aanvallen* kunnen gedefinieerd worden als typische periodes van bewustzijnsverlies waarbij de patiënt voor zich uit staart. *Atone aanvallen* zijn aanvallen waarbij er plots een verlies is van spiertonus, wat vaak resulteert in het vallen van de patiënt. *Myoclone aanvallen* uiten zich als onvrijwillige contracties van de spieren of van spiergroepen, waarbij het bewustzijn bewaard blijft [2, 3].

1.4 Behandelingen voor epilepsie

Het doel van een anti-epileptische behandeling is het bereiken van aanvalsvrijheid zonder klinisch significante neveneffecten. De standaardbehandeling voor epilepsie is anti-epileptische medicatie. In 30-40% van de gevallen kunnen epilepsiepatiënten echter niet voldoende geholpen worden met anti-epileptica of ervaart de patiënt te veel neveneffecten en in dat geval spreekt men van refractaire of moeilijk behandelbare epilepsie.

Ongeveer 40% van de patiënten met refractaire epilepsie zijn geschikte kandidaten voor chirurgie, terwijl de overige 60% hiermee niet geholpen kan worden omdat men geen eenduidig afgelijnde epileptogene zone kan vinden of omdat deze zone zich in functioneel hersenweefsel bevindt zoals aangetoond door de Wada-test of functional magnetic resonance imaging (fMRI). Deze patiënten komen wel in aanmerking voor neurostimulatie [1].

1.4.1 Anti-epileptica

Anti-epileptica werken in op verschillende processen die de exciteerbaarheid van het neuron beïnvloeden. Op deze manier kunnen ze het begin of de spreiding van een aanval onderdrukken [5].

Bij medicamenteuze behandelingen maken we een onderscheid tussen acute behandelingen van het epileptische insult en onderhoudsbehandelingen. Indien een patiënt een acuut tonisch-clonisch insult doormaakt dat niet vanzelf ophoudt, kan men een benzodiazepine (bvb diazepam of valium) intrathecaal of intramusculair toedienen [2]. Een onderhoudsbehandeling met anti-epileptische medicijnen is de standaardbehandeling voor epilepsie. In eerste instantie probeert men de aanvallen onder controle te krijgen met één medicijn (monotherapie), waarvan de effectiviteit voor dat soort epilepsie gekend is. Deze aanpak benadrukt het belang van een correcte diagnose. Indien deze aanpak echter geen aanvalsreductie bewerkstelligt of indien het geselecteerde medicijn teveel neveneffecten veroorzaakt, kan men overschakelen op een ander medicijn of op een combinatie van medicijnen (polytherapie). Bij polytherapie zijn er vaak meer neveneffecten zoals, slaperigheid of duizeligheid [2, 3, 6].

Verder wordt patiënten met epilepsie ook aangeraden om een aantal leefregels te respecteren. Factoren die aanvallen kunnen bevorderen of uitlokken, dienen vermeden te worden. Voorbeelden van dergelijke factoren zijn stresssituaties, een tekort aan slaap en alcoholgebruik of -misbruik [2].

1.4.2 Epilepsiechirurgie

Voor patiënten die niet kunnen worden geholpen met medicatie, kan epilepsiechirurgie een goed alternatief vormen. Deze behandeling bestaat uit het wegnemen van het deel van de cortex dat verantwoordelijk is voor de aanvallen. Het percentage aanvalsreductie is afhankelijk van het soort ingreep. Chirurgische procedures zijn erg invasief en complicaties en neveneffecten treden op bij 1 à 2% van de ingrepen waarbij een voorbijgaande of blijvende verlamming van een lidmaat de meest gevreesde bijwerking is [3].

1.4.3 Neurostimulatie: Nervus vagus stimulatie en diepe hersenstimulatie

Neurostimulatie is gebaseerd op elektrische stimulatie van zenuwweefsel. Hierbij kunnen onder andere intracraniale diepe hersenstimulatie (DHS) en extracraniale nervus vagus stimulatie (NVS) onderscheiden worden. Er worden elektrische pulsen toegediend in het omliggende zenuwweefsel om zo het pathologische substraat te manipuleren en om een symptomatisch of zelfs genezend effect te bekomen [7].

1.4.3.1 De anatomie van de nervus vagus

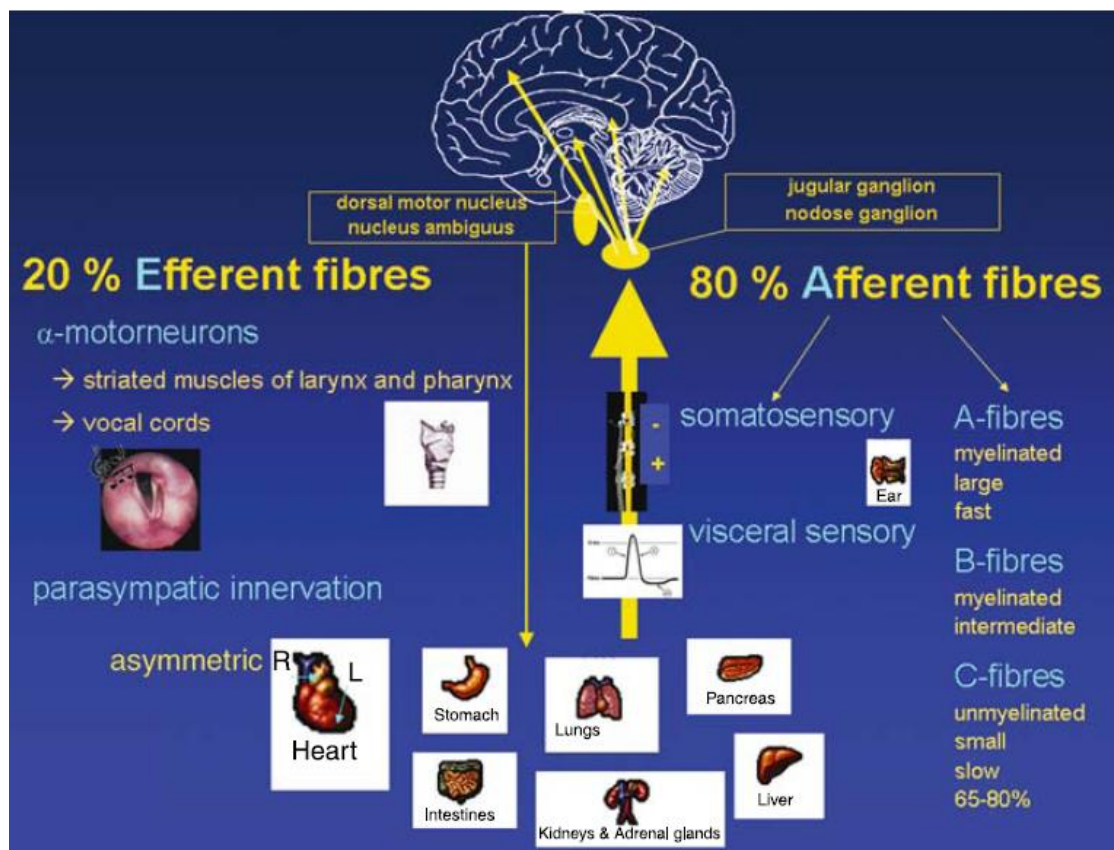
De tiende craniale zenuw wordt de n. vagus of zwervende zenuw genoemd omwille van zijn wijdverspreide projecties over het hele lichaam. De nervus vagus bestaat uit 80% afferente en 20 % efferente zenuwvezels. De *afferente* vagale zenuwvezels vervoeren sensorische impulsen vanuit de viscerale organen in het abdomen en de thorax, de larynx, de farynx en de aorta. De cellichamen van de afferente vezels zijn gelokaliseerd in twee parasympatische ganglia, het ganglion jugularis superior en het ganglion nodosum inferior. De nucleus van de tractus solitarius (NTS) krijgt het grootste aantal vagale afferente synapsen en elke n. vagus neemt bilateraal synaps op de NTS. Vanuit de NTS vertrekken wijdverspreide projecties naar hogere centra in het brein. De vagale afferenten projecteren onder andere naar de locus coeruleus (LC), de voornaamste bron van noradrenaline (NA) van de hersenen en naar de raphe nucleus, de voornaamste bron van serotonine. Verder zijn er ook connecties naar de cerebrale hemisferen, de thalamus en de amygdala. De NTS krijgt via zijn projecties naar de amygdala toegang tot de amygdala-hippocampus-entorhinale cortex-lus van het limbisch systeem, wat vaak plaatsen zijn voor het ontstaan van complex partiële aanvallen.

De *efferente parasympatische vezels* voorzien motorische vezels naar alle interne organen. De cellichamen van de efferente vezels bevinden zich in twee kernen in het verlengde merg, namelijk de dorsale motor nucleus en de nucleus ambiguus. Vagale parasympatische

neuronen nemen synaps in de parasympatische ganglia die in of bij de doelorganen liggen. Verder controleert de n. vagus ook enkele skeletspieren die gelegen zijn in de larynx en de farynx.

Net zoals de andere perifere zenuwen worden de vezels van de n. vagus onderverdeeld op basis van hun grootte, myelinisatie en geleidingsnelheid. Op cervicaal niveau bestaat de n. vagus voornamelijk uit dunne, ongemyeliniseerde C-vezels (60-85%) en voor een kleiner deel uit intermediaire gemyeliniseerde B-vezels en grote gemyeliniseerde A-vezels.

De n. vagus is verantwoordelijk voor de controle van de bloeddruk, hartsnelheid, gastro-intestinale peristaltische bewegingen, braken, transpiratie, hoesten en respiratie [8] (figuur 1).



Figuur 1: Overzicht van de voornaamste afferente en efferente vezels van de nervus vagus [8].

1.4.3.2 Nervus vagus stimulatie: algemeen

NVS is een efficiënte, breed spectrum ‘add-on’ behandeling voor patiënten met refractaire epilepsie waarbij epilepsiechirurgie niet kan uitgevoerd worden of geen effect heeft. Elektrische stimulatie van de tiende craniale zenuw werd ontwikkeld in de jaren ‘80 en wordt vandaag de dag op regelmatige basis gebruikt in epilepsiecentra over de hele wereld. Jacob

Zabara en Joan Lockard waren de eersten die een abstract publiceerden in *Epilepsia* in 1985 en 1986 over experimenten die een reductie aantoonde in aanvalsfrequentie en -ernst wanneer men de vagale afferenten stimuleerde bij honden en apen respectievelijk [8, 9,10]. Sindsdien werden wereldwijd al meer dan 40.000 patiënten behandeld met NVS [2].



Figuur 2: Positie van de geïmplanteerde nervus vagus stimulator [12].

Bij NVS wordt intermittente stimulatie toegediend ter hoogte van de linker nervus (n.) vagus (de tiende craniale zenuw) in de nek door middel van geïmplanteerde elektrodes verbonden met een subcutane generator onder de clavicula [11] (figuur 2). Door de configuratie van de elektroden worden vooral de afferente vagale vezels gestimuleerd en worden zo efferente stimulatie neveneffecten geminimaliseerd. Het is niet gekend of de stimulatie van efferente vezels

ook betrokken is in het werkingsmechanisme van NVS door de parasympathische effecten op de hartfunctie [8]. Aangezien laesies in de n. vagus onder het niveau van stimulatie het aanvalsonderdrukkend effect niet veranderden, zijn waarschijnlijk toch vooral afferente vezels van de zenuw verantwoordelijk voor het onderdrukken van de aanvallen [8]. Via functionele beeldvormingstudies (PET, SPECT en fMRI) kon men besluiten dat unilaterale stimulatie de beide cerebrale hemisferen beïnvloedt [7, 8]. Aanvankelijk koos men ervoor de linker nervus vagus te stimuleren, omdat de dichtere innervatie van het hart door de rechter nervus vagus het risico op brachycardie vergroot. Krahl et al. hebben echter aangetoond dat stimulatie van de rechter n. vagus even effectief is in het onderdrukken van aanvallen in ratten en dat bij de gebruikte stimulatieparameters, de cardiopulmonaire trage C-vezels niet geactiveerd worden [13]. Bovendien verlaagt destructie van deze C-vezels door capsaïcine de efficiëntie van NVS niet in ratten, wat bijkomende ondersteuning levert voor de stelling dat de C-vezels niet betrokken zijn in het werkingsmechanisme van NVS [14].

1.4.3.3 Efficiëntie van nervus vagus stimulatie

Ongeveer 1/3^{de} van de patiënten die behandeld worden met NVS heeft een aanvalsreductie van meer dan 50% (responders), bij 1/3^{de} van de patiënten bedraagt de aanvalsreductie 30 tot 50% en bij het overige derde heeft NVS geen of heel weinig voordeel (non-responder). Een kleine minderheid (5 tot 10%) wordt volledig aanvalsvrij [7]. De factoren die bepalen of een

patiënt responder of non-responder is op de NVS therapie, zijn momenteel niet gekend. De efficiëntie van de behandeling verhoogt met een langere follow-up. De gemiddelde aanvalsfrequentie verlaagt met 35% na 1 jaar en met 44% na twee jaar, waarna het verbeteren van de aanvalscntrole een plateau bereikt [8].

Tot nu toe is er nog maar weinig onderzoek gedaan naar het type epilepsie dat het best reageert op NVS, maar uit de literatuur blijkt dat zowel complex partiële aanvallen, eenvoudig partiële aanvallen als secundair veralgemeende aanvallen kunnen worden beïnvloed [7, 8]. De identificatie van zo'n predictieve factoren zou een beter inzicht kunnen geven in het werkingsmechanisme van NVS. Posttraumatische epilepsie en epilepsie door occipitale laesies blijken uit de literatuur potentiële indicatoren te zijn voor een goede outcome na NVS [15]. Ook de afwezigheid van bilaterale epileptiforme ontladingen en de aanwezigheid van misvormingen van de corticale ontwikkeling zijn potentiële factoren voor een aanvalsvrije outcome [16].

De meerderheid van de patiënten behandeld met NVS heeft complex partiële aanvallen (met of zonder secundaire generalisatie). Dit is waarschijnlijk een reflectie van het feit dat de meeste patiënten initieel geëvalueerd worden voor resectieve chirurgie maar hiervoor geen geschikte kandidaten blijken te zijn. In Gent waren er in een studie van professor Vonck en collega's geen patiënten die eenvoudig partiële aanvallen als voornaamste aanvalstype hadden. Mogelijks is dit de wijten aan sampling bias of aan het feit dat er nog steeds een negatieve houding is van patiënten alsook van de arts om meer invasieve behandelingen te gebruiken bij patiënten die aanvallen hebben waarbij het bewustzijn bewaard blijft [1].

Het feit dat minder patiënten met veralgemeende epilepsie behandeld worden in Gent, is waarschijnlijk het gevolg van referral bias. Vele verwijzende artsen zijn er zich van bewust dat resectieve chirurgie alleen een optie is voor patiënten met focale epilepsie, maar langzamerhand groeit het besef dat NVS een vergelijkbare efficiëntie heeft bij veralgemeende epilepsie. Waarschijnlijk zullen er in de toekomst meer patiënten met veralgemeende epilepsie worden doorverwezen [1].

1.4.3.4 Het werkingsmechanisme van nervus vagus stimulatie

Het precieze aanvalsonderdrukkend werkingsmechanisme van NVS is nog onvoldoende gekend, maar wel staat vast dat het multifactorieel is. Een beter inzicht in dit werkingsmechanisme zou aanvalstypes of epileptische syndromen kunnen identificeren die

beter reageren op NVS en zou bovendien kunnen zorgen voor betere stimulatieparameters om de klinische efficiëntie te optimaliseren. Mogelijke pathways die bijdragen aan het werkingsmechanisme zijn desynchronisatie van de neuronale discharge, veranderde vrijstelling van neurotransmitters, modulatie van de exciteerbaarheid en het verhogen van de elektrische threshold voor aanvallen [8].

1.4.3.4.1 Desynchronisatie van de neuronale discharge

NVS kan desynchronisatie of synchronisatie veroorzaken in het EEG en geïnduceerde epileptische pieken verhogen of verlagen afhankelijk van de gebruikte stimulatieparameters [8, 11]. Deze duale effecten kunnen worden verklaard door de activatie van verschillende vagale afferenten als verschillende stimulatieparameters worden gebruikt. Voor het aanvalsonderdrukkend effect veronderstelt men dat NVS zorgt voor een desynchronisatie van het EEG via het reticulair activerend systeem [11]. In meer dan 80% van de patiënten verminderen de interictale ontladingen significant gedurende de stimulatie [8]. Dergelijke effecten op het EEG kunnen echter niet duidelijk genoeg worden aangetoond, wat suggereert dat de corticale activiteit niet in zijn geheel wordt beïnvloed [17].

1.4.3.4.2 Neurotransmitters

Het intracraniale effect van NVS is mogelijks gebaseerd op lokale of regionale verhoging van de inhibitorische neurotransmitter gamma-aminoboterzuur (GABA) of een vermindering van de excitatoire neurotransmitters glutamaat en aspartaat. Ook de inhibitorische neurotransmitter glycine zou een rol kunnen spelen, daar NVS strychnine-geïnduceerde aanvallen kan onderdrukken en strychnine interfereert met de inhibitorische functies van glycine. Er kunnen ook andere neurotransmitters betrokken zijn die de aanvalsthreshold kunnen moduleren, zoals serotonine en noradrenaline [7, 8, 11, 18, 19]. Of deze veranderingen in neurotransmitterconcentraties een primaire of een secundaire rol spelen in het werkingsmechanisme van nervus vagus stimulatie is nog niet gekend [11].

De locus coeruleus (LC) wordt onrechtstreeks beïnvloed (via de NTS) door de n.vagus. Deze pontine kern is de belangrijkste bron van noradrenaline (NA) voor de hersenen. NVS veroorzaakt, via activatie van de LC neuronen, de vrijstelling van NA in corticale en limbische gebieden (afhankelijk van de stimulatie-intensiteit), wat bijdraagt tot de onderdrukking van de aanvallen [18, 19, 20]. Sterke ondersteuning voor deze stelling werd ook gevonden in een studie van Krahl en collega's waarbij aangetoond werd dat door een laesie in de LC het aanvalsonderdrukkend effect van NVS verloren ging [8]. Dorr en collega's

toonden aan dat NVS naast de activatie van de LC ook de vuursnelheid van de dorsale raphe nucleus, de belangrijkste bron van serotonine in de hersenstam, verhoogt [18].

1.4.3.4.3 Modulatie van de exciteerbaarheid

De vagale afferenten hebben heel veel projecties binnen het centraal zenuwstelsel, waardoor signalen gegenereerd in de vagale afferenten het volledige organisme kunnen beïnvloeden. Zo heeft de n.vagus via de NTS diffuse projecties naar onder andere de LC, de raphe nucleus, de thalamus, de amygdala en verschillende corticale gebieden. NVS lijkt de corticale exciteerbaarheid te moduleren via thalamo-corticale projectieneuronen en relay neuronen. Op deze manier beïnvloedt NVS het ontstaan en de spreiding van epileptische aanvallen [7, 21]. De exciteerbaarheid kan ook worden beïnvloed door de gemyeliniseerde vezels te activeren via NVS en zo trage vagale hyperpolariseerbaarheid te induceren, waardoor de aanvalsactiviteit niet kan spreiden [17]. Ook de regionale cerebrale bloedstroom past zich aan door NVS. Een veranderde regionale bloedstroom wijst mogelijks op een plaatselijke vermindering in corticale activiteit waardoor propagatie van de epileptische activiteit wordt verhinderd [22].

Het werkingsmechanisme van NVS in epilepsie blijkt gebaseerd te zijn op een gecombineerd mechanisme van:

- 1) Een *acuut anti-aanvals effect* dat resulteert in onmiddellijke interferentie met een aanval. Patiënten of hulpverleners kunnen via een magneet de stimulator aanschakelen op het moment dat een aanval begint of wanneer de patiënt een aura heeft. Op deze manier kan de aanval voorkomen worden. Dit anti-aanvals effect werd ook bevestigd in dierexperimenten waarin de dieren geïnjecteerd worden met een proconvulsant bestanddeel (een stof die een aanval kan uitlokken), gevolgd door een toediening van de behandeling die men wil testen [7, 8].
- 2) Een *anti-epileptisch effect* dat toelaat dat de behandeling wordt toegediend op een intermitterende manier en waarbij aanvallen ook worden beïnvloed als er niet gestimuleerd wordt (off-time). Deze intermitterende stimulatie is noodzakelijk voor de veiligheid en het verlengen van de levensduur van de batterij. Sommige medicatie wordt eveneens een anti-epileptische werking toegeschreven, maar omdat die behandelingen dagelijks worden toegediend en er dus een steady state van de actieve component in het bloed ontstaat, kan het effect ook berusten op een continu anti-aanvals effect [8].

3) Een *chronisch anti-epileptisch effect* dat zich uit in een verhoogde efficiëntie na verlengde stimulatie. Deze effecten zijn waarschijnlijk een reflectie van modulatorische veranderingen in subcorticale synapsen die grotere corticale gebieden kunnen beïnvloeden. Het opbouwen van deze neuromodulatorische veranderingen vraagt naar alle waarschijnlijkheid tijd, maar eens ze geïnstalleerd zijn, kunnen bepaalde anti-epileptische neuronale netwerken gemakkelijker gerekruteerd worden door bijvoorbeeld de stimulatieparameters aan te passen aan de individuele noden van elke patiënt [7,8].

Aanwijzingen die er op wijzen dat er een *anti-epileptogeen effect* is, werden afgeleid uit voorlopige dierstudies, maar zijn nog niet klinisch bevestigd omdat na batterij depletie (na 4 tot 12 jaar) de aanvallen terugkeren. NVS moet dus toch nog steeds beschouwd worden als een symptomatische behandeling [1]. De basis voor gecombineerde acute en meer chronische effecten van NVS is waarschijnlijk dat er verschillende neuronale pathways en netwerken betrokken zijn. Het ultieme doel van anti-epileptische behandeling is het genezen van epilepsie. Dit houdt in dat de behandeling de ontwikkeling van de pathologische processen omkeert [8].

1.4.3.5 Voordelen

NVS is een veilige behandeling en heeft niet de typische cognitieve neveneffecten die geassocieerd zijn met vele andere anti-epileptische behandelingen zoals sufheid, geheugenproblemen en concentratiestoornissen. In tegenstelling tot vele farmacologische bestanddelen ontwikkelt zich geen tolerantie voor NVS. Integendeel, de efficiëntie wordt beter naarmate de behandeling langer duurt [7, 15, 8]. Daarenboven ervaren vele patiënten een positief effect op het geheugen, het gemoed (mood-responders) en de alertheid [11, 15]. Het positieve effect op het geheugen kan verklaard worden doordat NVS de NA concentratie verhoogt, wat long term potentiatie faciliteert in de gyrus dentatus [20]. Het effect op het gemoed wordt veroorzaakt doordat de vuursnelheid van de neuronen in de LC en de dorsale raphe nucleus verhoogd worden door NVS. Deze twee kernen stellen respectievelijk NA en serotonine vrij, twee stoffen die een belangrijke invloed hebben op het gemoed. Bovendien hebben deze structuren wijdverspreide projecties naar limbische structuren (zoals de amygdala) die het gemoed kunnen beïnvloeden [18]. De effecten van NVS op de alertheid kunnen verklaard worden door de connecties tussen vagale afferenten, de reticulaire formatie en de thalamus [8].

Daarenboven beschikken de patiënten over een magneet waarmee ze zelf (of een hulpverlener) de stimulator kunnen aanschakelen op het moment dat de aanval begint of er zich een aura voordoet. Dit verschaft patiënten een gevoel van controle over hun ziekte [1, 15]. Tenslotte is ook het feit dat de stimulatie vanzelf gebeurt een groot voordeel. Non-compliance is immers een van de grootste problemen bij de behandeling met anti-epileptische medicatie, vooral bij patiënten met mentale retardatie of kinderen [1].

1.4.3.6 Nadelen

Het grootste nadeel van therapie met NVS is het feit dat slechts een derde van de patiënten responders zijn (aanvalsreductie van meer dan 50 %) en slechts 5 à 10 procent volledig aanvalsvrij wordt. Het zou een grote vooruitgang betekenen als responders voorafgaand aan de operatie kunnen worden geïdentificeerd [7].

De meest voorkomende neveneffecten van NVS zijn een tintelend gevoel in de keel, pijn in het gezicht en heesheid als de stimulator aan staat. De tintelende sensatie wordt veroorzaakt door secundaire stimulatie van de n. laryngealis superior, die aftakt van de nervus vagus superieur aan de locatie van de geïmplanteerde elektrode. De n. laryngealis superior draagt sensorische vezels naar de mucosa van de larynx. Ook de nervus laryngeus recurrens die distaal van de locatie van de elektrode aftakt, wordt secundair gestimuleerd. Deze zenuw bevat motorische vezels die de laryngeale spieren bezenuwen, waardoor de linker stemband vibreert tijdens de aan-time en zo stimulatiegerelateerde heesheid ontstaat [7, 8]. Zelden ervaren patiënten ook psychiatrische neveneffecten, maar deze kunnen succesvol behandeld worden met antidepressiva. Deze psychiatrische neveneffecten kunnen verklaard worden door een toegenomen alertheid bij patiënten die behandeld worden met NVS. De neveneffecten zijn meestal van korte duur, wat van NVS een goed verdragen therapie maakt. In sommige gevallen ervaart de patiënt ook slikproblemen tijdens het eten. Deze problemen kunnen opgelost worden door de stimulator tijdelijk uit te schakelen tijdens de maaltijd door de magneet boven de generator te bevestigen [1, 11]. De stimulatiegerelateerde neveneffecten zijn dosisafhankelijk. Hogere amplitudes, hogere frequenties en bredere pulsbreedtes zijn geassocieerd met een intensere gewaarwording van de neveneffecten [7, 14].

Ten slotte doen zich ook in een kleine minderheid van de gevallen chirurgische of postchirurgische complicaties voor, zoals het syndroom van Horner, bloedingen en wondinfecties [15, 21].

Ondanks een significante reductie van het aantal aanvallen kan het aantal anti-epileptische drugs maar bij de minderheid van de patiënten afgebouwd worden. NVS kan bijgevolg niet gebruikt worden als monotherapie [1].

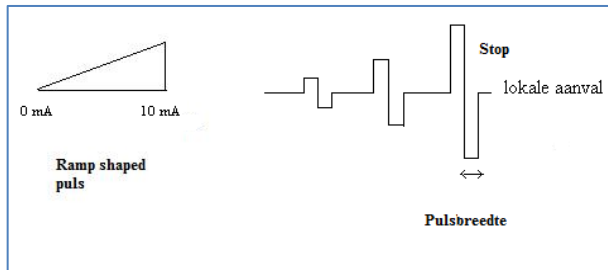
1.4.3.7 Stimulatieparameters

De klinisch gebruikte parameters zijn gebaseerd op veiligheid en potentiële efficiëntie. Tot nu toe is nog maar weinig onderzoek gedaan naar optimalisatie van deze parameters. Onder de standaard omstandigheden wordt gestimuleerd met een frequentie van 30Hz, een pulsbreedte van 250-500 μ s en een aan/af periode van 30s/300s [1]. Binnen deze range van typische waarden blijkt elke individuele patiënt best te reageren op verschillende combinaties van de parameterinstellingen. Per patiënt moet gezocht worden naar de combinatie van stimulatieparameters die zorgt voor een maximaal effect, die zo weinig mogelijk neveneffecten veroorzaakt en die bovendien de batterij niet overmatig belast [23]. De stroom wordt langzaam aan verhoogd, startend bij 0.25 mA tot op het tolerantieniveau van de patiënt, tot aanvalsvrijheid wordt bereikt of tot een maximum van 3.5 mA wordt bereikt. Typische therapeutische waarden variëren tussen 1.00 mA en 1.50 mA. De patiënten krijgen ook een magneet waarmee ze zelf (of een zorgverlener) extra kunnen stimuleren als er zich een aura of aanval voordoet. De output current van de magneet is 0.25 mA hoger dan de automatisch geleverde stimulatie, met een pulsbreedte van 250 tot 500 μ s en een duur van 60 seconden. Standaard stimulatieparameters worden vervangen door rapid cycle stimulatie (aan/af periodes: 7s/14s) in patiënten die niet reageren op de standaard stimulatieparameters (non-responders) [1, 15]. De keuze voor periodieke stimulatie is gebaseerd op veiligheidsstudies over stimulatie van neurale weefsel, onderzoeken die aantonen dat het effect van de stimulatie langer duurt dan de duur van de stimulus en het feit dat periodieke stimulatie geassocieerd is met een langere levensduur van de batterij [1, 7, 11].

1.5 Proefdiermodel voor corticale exciteerbaarheid: het corticale stimulatiemodel

Om epilepsie te onderzoeken *in vivo* zijn diermodellen nodig. Vroegere modellen waren gebaseerd op het toedienen van pentylenetetrazol (PTZ) of elektroshocks om aanvallen uit te lokken. Hieraan zijn veel nadelen verbonden, bv: de dieren overleven deze procedures vaak niet (waardoor er meer dieren gebruikt worden), men kan de tests niet meer dan één maal per dag uitvoeren en de methodes voor het uitlokken van een aanval zijn pijnlijk. Een valabel alternatief die deze nadelen niet heeft, is het corticale stimulatiemodel (CSM). Bovendien moet men de ratten niet restrainen of verdoven, waardoor ze minder stress hebben (wat de

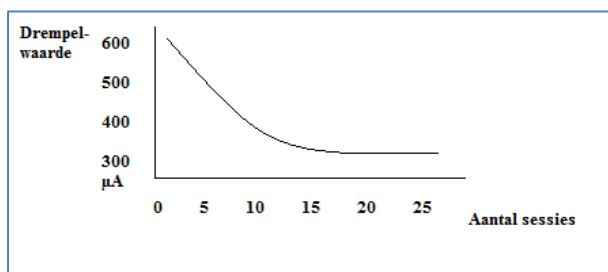
resultaten kan beïnvloeden). Een ander groot voordeel van dit model is dat men op verschillende tijdstippen de invloed van een behandeling kan meten in hetzelfde dier en dat men heel snel informatie kan bekomen over een exact punt in de tijd, wat van belang kan zijn als men bijvoorbeeld medicatie bestudeert met een korte halfwaardetijd.



Figuur 3: Bifasische, ladingsgebalanceerde pulsen voor de stimulatie van de sensorimotorische cortex.

In dit ratmodel worden aanvallen uitgelokt door directe elektrische stimulatie van de sensorimotorische cortex via epidurale elektrodes. Hierbij wordt een trein van elektrische bifasische, lading-gebalanceerde pulsen (0.1s) toegediend aan een frequentie van 50 Hz en met een maximale duur van

150 seconden (figuur 3). De intensiteit van de pulsen stijgt geleidelijk van 0.00 mA tot 10.00 mA. Bij een bepaalde drempelintensiteit zullen de dieren gedragsveranderingen vertonen die gekenmerkt wordt door een trekking van de voorpoot of een clonische achterwaartse beweging. Bij deze intensiteit wordt de stimulatie onmiddellijk stopgezet en dit punt wordt gedefinieerd als de drempel voor het uitlokken van een lokale aanval (of de aanvalsdrempel).



Figuur 4: Stabilisatie van de drempelwaarde via 20 corticale stimulatiesessies.

Bij het herhaaldelijk stimuleren van de sensorimotorische cortex in eenzelfde dier, zal de aanvalsdrempel initieel dalen tot ze een stabiel niveau bereikt (van 600 μ A tot ongeveer 350 μ A). Eens een stabiele drempelwaarde bereikt is, kan op verschillende tijdstippen en bij hetzelfde

proefdier het effect van een anti-epileptische behandeling op de drempelwaarde getest worden (figuur 4).

Het gebruik van dit model stelt ons in staat de efficiëntie van anti-epileptica, maar ook van NVS te beoordelen zowel in acute als in chronische experimenten. Een anti-epileptische behandeling wordt als effectief beschouwd als ze een verhoging van de aanvalsdrempel induceert [24]. Onderzoek uitgevoerd in het Laboratorium voor Klinische en Experimentele Neurofysiologie (LKEN, Universiteit Gent) heeft aangetoond dat NVS de aanvalsdrempel verhoogt in het corticaal stimulatie model. Deze data tonen aan dat NVS de corticale

exciteerbaarheid kan moduleren [7,25]. In dit eindwerk zal het CSM worden gebruikt voor het bepalen van de optimale stimulatie intensiteit voor NVS.

1.6 Rationale van de masterproef

In deze masterproef wordt onderzocht of er een optimale stimulatie-intensiteit voor NVS bestaat in het corticale stimulatiemodel. Vier intensiteiten werden gekozen op basis van een artikel van Roosevelt et al. Deze onderzoeksgroep onderzocht het verband tussen vier NVS intensiteiten en de stijging van de noradrenaline (NA) concentratie in de cortex en de hippocampus. Deze twee structuren krijgen enkel noradrenerge input van de locus coeruleus die via de NTS in contact staat met de n. vagus. NA heeft anti-convulsieve eigenschappen en de stijging van de monoaminerge transmissie ten gevolge van NVS speelt waarschijnlijk een rol in het anti-convulsieve effect van NVS. Stimulatie bij 0.00 mA en 0.25 mA had geen effect op de NA concentraties, terwijl stimulatie bij 0.50 mA de concentratie van NA significant verhoogde in de hippocampus (23%), maar niet in de cortex. Stimulatie bij 1.00 mA verhoogde de NA concentratie significant in zowel de cortex (39%) als in de hippocampus (28%) bilateraal. De stijgingen van de NA concentratie waren van voorbijgaande aard en keerden terug naar de baseline condities in de inter-stimulus periode [20]. In dit project wordt nagegaan of NVS met deze vier verschillende stimulatieparameters naast de NA concentratie ook de corticale exciteerbaarheid, en dus de aanvalsdrempel in het corticale stimulatiemodel kan beïnvloeden. De hypothese is dat er inderdaad een optimale amplitude bestaat, die de exciteerbaarheid van de hersenen significant meer doet dalen dan de andere intensiteiten, wat zich uit in een stijging van de drempel voor het uitlokken van een lokale aanval. Deze amplitude zou dan waarschijnlijk 0.50 mA of 1.00 mA zijn, daar deze intensiteiten de concentratie van NA verhogen en NA de exciteerbaarheid van neuronen kan beïnvloeden. De alternatieve hypothese is dat er een individuele optimale amplitude van de stimulatiepuls bestaat, dit wil zeggen dat er per dier een verschillende optimale amplitude van de stimulatiepuls bestaat, ten gevolge van de individuele verschillen in een populatie zoals lokale anatomische verschillen van de nervus vagus.

In een studie van Zagon et al. werd gevonden dat stimulatie intensiteiten die voornamelijk de gemyeliniseerde A- en B-vezels activeren (minder dan 0.20 mA) het meest effectief zijn om de trage vagale hyperpolarisatie te induceren. Als een hogere intensiteit wordt gebruikt, worden ook niet gemyeliniseerde vagale C-vezels gerekruteerd wat de efficiëntie van NVS om trage vagale hyperpolarisatie te induceren reduceert. Er werd voorgesteld dat trage

hyperpolarisatie een van de mechanismen zou kunnen zijn die aan de basis liggen voor het verminderen van de aanvalsfrequentie met NVS, door de exciteerbaarheid in de neuronen te verlagen die betrokken zijn in de propagatie van de aanvalsactiviteit. Dit fenomeen werd onderzocht in neuronen van de pariëtale associatiecortex, die afferenten geeft aan onder andere de temporale cortex. De temporale cortex is vaak betrokken is bij de initiatie van de aanvallen [17].

Bij het vergelijken van de resultaten van deze twee studies is het opvallend dat in het onderzoek van Roosevelt en collega's de optimale intensiteiten 0.50 en 1.00 mA zijn, terwijl in de studie van Zagon et al. de trage vagale hyperpolarisatie (die zorgt voor het onderdrukken van de verspreiding van aanvallen) wordt uitgelokt bij intensiteiten van minder dan 0.20 mA. Dit verschil in intensiteiten zou kunnen verklaard worden door het feit dat er andere mechanismen aan de basis liggen van het onderdrukken van aanvallen [8, 17, 20].

Het vinden van optimale stimulatie parameters is een belangrijke stap in de zoektocht naar het werkingsmechanisme van NVS en het identificeren van responders voor de therapie [5]. Bovendien kan het gebruik van een lagere (optimale) stroom de levensduur van de batterij verlengen en de neveneffecten voor de patiënten verminderen [26].

2. Materialen en methoden

2.1 Dieren



Figuur. 5: Rat met voorversterker

Er wordt gebruik gemaakt van gezonde mannelijke Wistar ratten (Harlan, Nederland) van 250-300 gram (figuur 5). De dieren worden gehuisvest in een normaal 12/12 uur licht/donker cyclus, bij een temperatuur van 22-23° Celsius en een luchtvochtigheid van 40-60%. De ratten verblijven in hun eigen kooi (afmetingen 25*25*50 cm), die geplaatst werd in het centraal animalarium. Voor de proef verblijven ze drie weken in de proefopstelling (hogere kooi type 3, Macrolon Technilab BMI). De proefdieren hebben voedsel en water *ad libitum* ter beschikking en hun kooien worden wekelijks verversd. De kooien worden verrijkt met een prop watten. Het studieprotocol werd goedgekeurd door het dier experimenteel ethisch comité van de Gentse Universiteit (ECP 08/47).

2.2 Materiaal

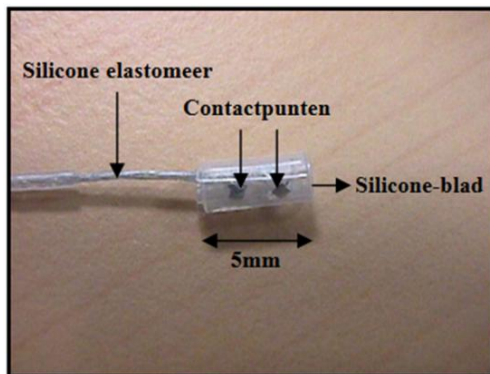
2.2.1 Voorversterkers

De voorversterker wordt via connectorpinnetjes geplaatst op de kop van de rat. Deze voorversterker vermindert de storing op de EEG signalen door hun weerstand te verlagen (figuur 7a).

2.2.2 Epidurale elektrodes

Epidurale elektrodes (of scalpelektrodes) worden gemaakt met een stukje koperdraad waarvan de beide uiteinden gestript worden. Aan het ene uiteinde wordt een juwelierschroefje gesoldeerd, aan het andere uiteinde een connectiepin. Met een multimeter wordt de integriteit van de elektrode geverifieerd. Deze elektrodes worden in de schedel van de rat geschroefd en dienen om EEG te registreren en om de motorische aanvallen uit te lokken (Figuur 7b).

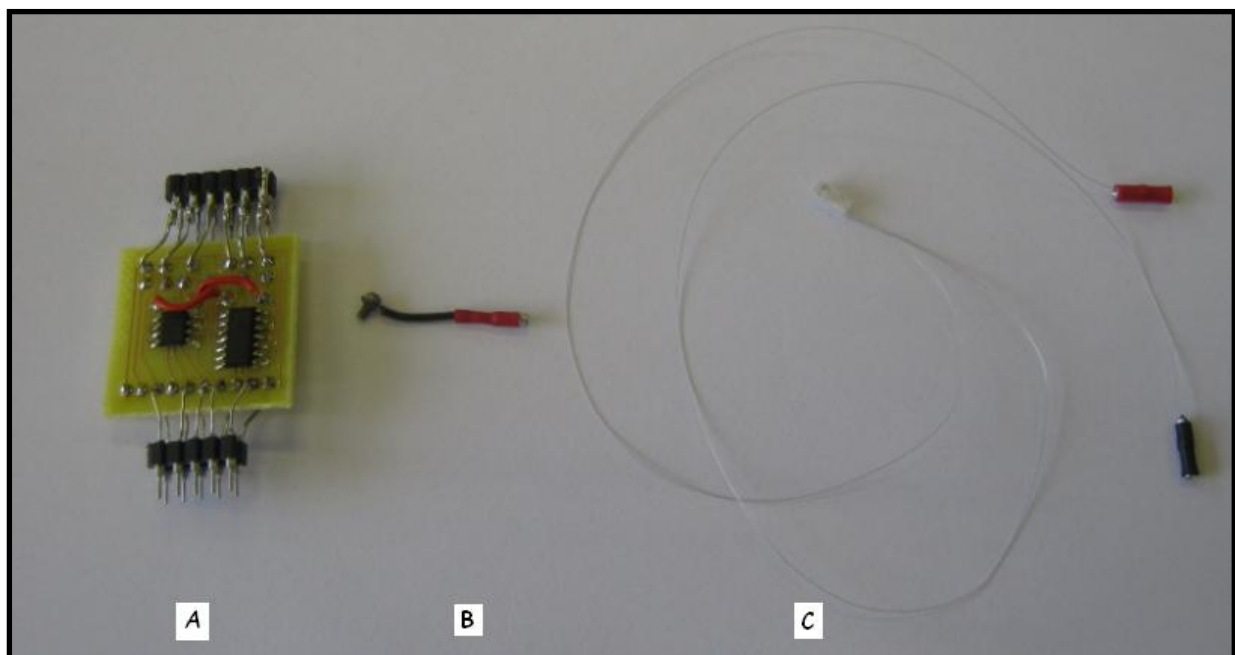
2.2.3 Nervus vagus elektrodes



Figuur 6: Onderdelen van een nervus vagus cuff-elektrode.

Twee contactpunten (1mm op 3mm) worden geknipt uit een platinaplaat (Alfa Aesar, USA). Beide contactpunten worden gelast aan een zilverdraad gecoat met een silicone elastomeer (MED-4210, Nusil Technology, USA) en dit geheel wordt gelijmd op een silicone blad (MED-4750, Statice Santé). Vervolgens wordt een tweede siliconeblad uitgerokken en bovenop het eerste gelijmd. Tot slot worden 2 rechthoekige vensters (0,7mm op 2mm)

vervaardigd in het bovenste siliconeblad ter hoogte van de contactpunten met behulp van een hypodermische naald. De miniatuur cuff-elektrodes worden afgesneden tot een lengte van 5 mm (figuur 7c) .



Figuur 7: (a) voorversterker; (b) scalpelektrode; (c) nervus vagus cuff-elektrode.

2.3 Operatie: plaatsing van de NVS-elektrode en de epidurale elektrodes

Voor de operatie wordt het operatiemateriaal minstens een half uur in ethanol gelegd teneinde het steriel te houden. Alle benodigdheden voor de operatie zoals dentaal cement, wattenstaafjes en de elektrodes worden klaargelegd (figuur 8a). Gezonde ratten worden

geïmplanteerd met zes epidurale registratie/stimulatie elektrodes en een silicone cuff-elektrode met platina contacten rond de linker nervus vagus. De ratten worden verdoofd met volatieve anesthesie (isofluraan; 5% voor inductie, 2% voor onderhoud). Met behulp van een stolp worden de ratten onder verdoving gebracht (figuur 8b) waarna via een pijnprikkel gecontroleerd wordt of de rat volledig verdoofd is (figuur 8c).



Figuur 8: (a) Operatiemateriaal; (b) verdoven van de rat; (c) pijnprikkel.

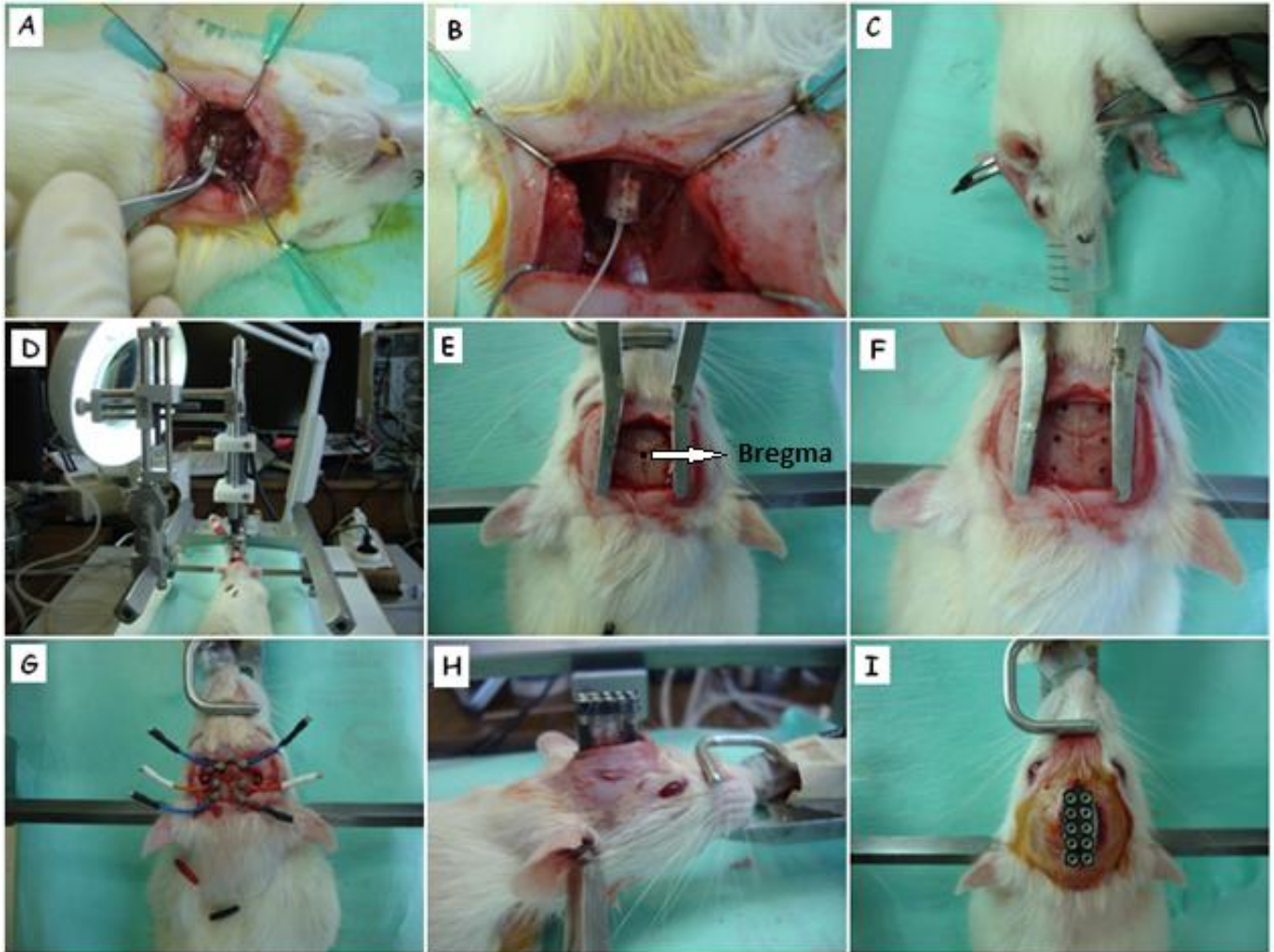
Voor de implantatie van de cuff-elektrode wordt de linker anterieure cervicale regio van de rat geschoren en steriel gemaakt met isobetadine. Hierna wordt een incisie gemaakt in de huid en worden de klieren en de spieren opengesperd. De linker n. vagus wordt voorzichtig vrijgemaakt en de cuff-elektrode wordt er rond gewonden met de anode naar de caudale zijde van het dier gericht en de kathode naar de rostrale zijde. Op deze manier wordt het extracellulair milieu aan de rostrale zijde meer negatief ten opzichte van het intracellulair milieu en ontstaan actiepotentialen. Aan de caudale zijde zorgt de anode ervoor dat het intracellulair milieu negatiever (en dus minder exciteerbaar) wordt. Dit fenomeen, waardoor hier geen actiepotentialen kunnen ontstaan noemen we een anodale blok. Dit is noodzakelijk omdat op deze manier enkel de afferente vezels (de vezels die naar de hersenen lopen) gestimuleerd worden (Figuur 9a).

nadat de cuff-elektrode rond de vagus zenuw is gewikkeld, wordt visueel gecontroleerd of de contactpunten van de elektrode goed contact maken met de zenuw (Figuur 9b). Hierna wordt de impedantie tussen de vaguszenuw en de platinaplaatjes van de elektrode gecontroleerd met behulp van de oscilloscoop. Deze impedantie mag maximaal 10 kOhm bedragen. Indien er een hogere impedantie gemeten werd, werd de elektrode verwijderd en opnieuw rond de zenuw gewikkeld, of werd er een nieuwe elektrode aangebracht. Hierna worden de spieren en klieren terug dichtgenaaid. De stimulatiedraden worden getunneld onder de huid over de

achterkant van de nek naar een incisie in de schedelhuid toe (Figuur 9c), waarna de huid van de nek terug wordt dichtgenaaid.

In het tweede deel van de operatie wordt de rat gefixeerd in een stereotactisch kader met behulp van een tandhouder en twee oorstaven (Figuur 9d). Met aceton wordt het referentiepunt bregma (het kruispunt van de coronale en de sagittale sutuur) goed zichtbaar gemaakt (figuur 9e). Met een tandboor worden aan de hand van vastgelegde coördinaten ten opzichte van bregma acht gaten geboord in de schedel van de rat (figuur 9f). Voor stimulatie van de motorische cortex worden twee epidurale elektrodes op stereotactische wijze gepositioneerd ter hoogte van het motorisch gebied van de linker en de rechter frontale cortex (3 mm links en rechts van de middenlijn, 1 mm posterieur t.o.v. bregma, oranje elektrodes op figuur 9g). Het is hierbij belangrijk dat de elektrodes steeds op dezelfde positie worden geïmplanteerd omdat de threshold voor het uitlokken van een lokale aanval (alsook de ernst en de duur van de aanval) verhoogt naarmate de elektrodes meer caudaal worden geïmplanteerd. Door de significant kleinere variabiliteit in de treshold werd geconcludeerd dat de frontoparietale cortex de meest geschikte plaats voor stimulatie is. Vier epidurale elektrodes uit roestvrij staal werden bilateraal geïmplanteerd ter hoogte van de cortex; drie ervan werden gebruikt als actieve registratie elektrodes (blauwe elektrodes figuur 9g) en de vierde werd gebruikt als referentie elektrode (bruine elektrode figuur 9g). Ten slotte worden ook nog twee ankerschroefjes in de zijkant van de schedel geschroefd om de stevigheid van het hoedje te verbeteren.

Alle elektrodes worden samen met de draden van de nervus vagus cuff-elektrode samengebracht in een connector en gefixeerd op de schedel van de rat met behulp van dentaal cement (figuur 9 h, i). De dieren krijgen voor de operatie een intramusculaire injectie met het pijnstillend middel Temgesic (0.05 mg/kg). De wonden zelf worden na de operatie lokaal verdoofd met xylocaïne. Na de operatie volgt een rustperiode van minstens 1 week, waarbij de ratten niet gemanipuleerd worden en kunnen recupereren.



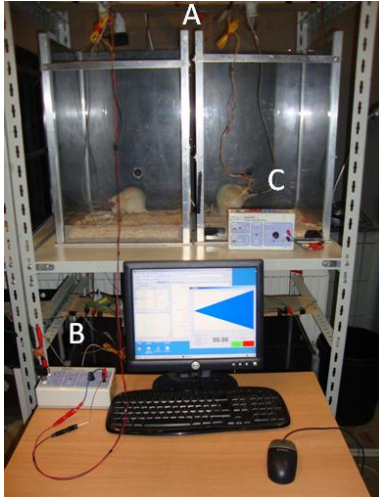
Figuur 9: Operatie. (a) implantatie cuff-elektrode; (b) visuele controle; (c) tunnelen; (d) stereotactisch kader; (e) bregma; (f) gaten in de schedel; (g) epidurale elektrodes; (h) zij aanzicht hoedje; (i) bovenaanzicht hoedje.

2.4 Instellen van een stabiele aanvalsdrempel in het corticaal stimulatiemodel

De aanvalsdrempel wordt gedefinieerd als de stimulus-intensiteit waarbij een clonus van de voorpoot of een clonische achterwaartse beweging wordt uitgelokt. Bij het herhaaldelijk testen zal de drempelwaarde initieel dalen tot een stabiel niveau bereikt is (van $600\mu\text{A}$ tot ongeveer $350\mu\text{A}$). Om deze stabilisatie van deze aanvalsdrempel te bewerkstelligen worden de dieren gedurende twee weken twee maal per dag gestimuleerd op vaste tijdstippen (om 9.00 uur en om 15.00 uur).

2.5 Effect van verschillende NVS intensiteiten op de aanvalsdrempel

Gedurende de experimenten worden de dieren in speciaal aangepaste kooien geplaatst. Deze kooien bevinden zich in een afgesloten, geconditioneerde ruimte. De ratten zijn gedurende het experiment verbonden met een multifunctionele opstelling (figuur 10):



A. Een digitaal video-EEG monitoring systeem dat toelaat om zowel gedragsveranderingen als het EEG tijdens de lokale aanvallen en de NVS te observeren en registreren;

B. een externe stimulator (digitimer) om corticale stimulatie te kunnen toepassen;

C. een externe stimulator (digitimer) om NVS toe te dienen.

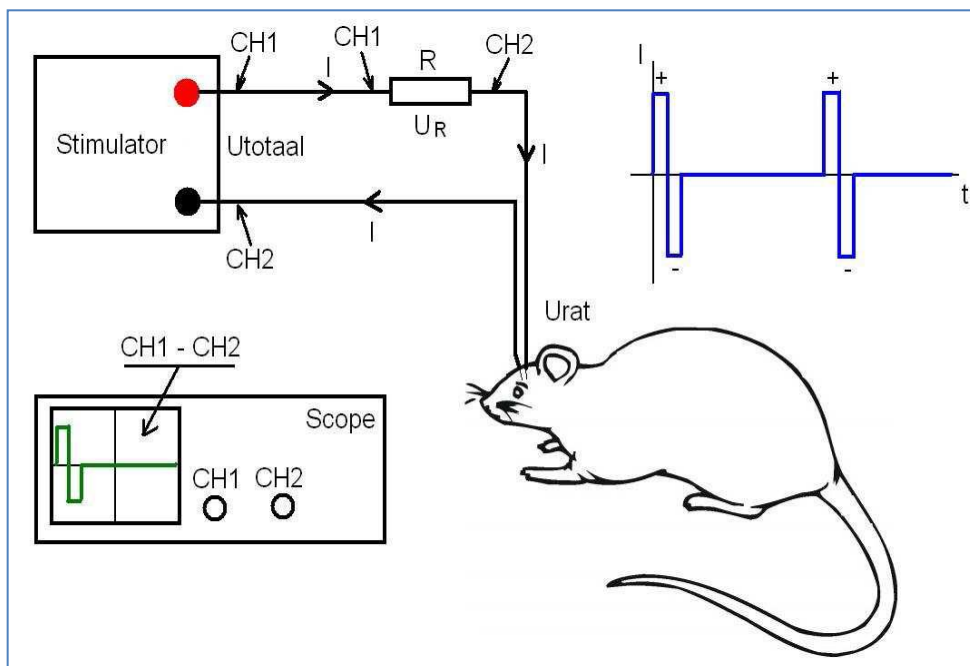
Figuur 10: Multifunctionele opstelling.

Lokale aanvallen worden uitgelokt door directe elektrische stimulatie van de motorische cortex via epidurale elektrodes. Er wordt een ramp-shaped (met continu oplopende amplitude) pulse trein met bifasische rectangulaire pulsen (0.1 s, 50 Hz, 0.00-10.00 mA in 150 s) toegediend om de motorische cortex te stimuleren.

Wanneer de drempelwaarde bereikt is, vertoont het dier een focale aanval (gekenmerkt door een clonus van de voorpoot, een tonische achterwaartse beweging van het lichaam of een axiale myoclonie aanval). Als de start van de voorpootclonus moeilijk te zien is door de positie van het dier, wordt er verder gestimuleerd tot een aanval met zekerheid kan worden vastgesteld. Deze aanvalsdrempel wordt bepaald met een nauwkeurigheid van 1/100 seconde om het exacte begin van de focale aanval te bepalen. Dit tijdstip wordt omgezet in de stimulatie intensiteit van de ramp-shaped puls trein op dat moment.

Vier nervus vagus stimulatie intensiteiten worden uitgetest nl. 0.00 mA (SHAM), 0.25 mA, 0.50 mA en 1.00 mA (met een pulsbreedte van 500 μ s, een frequentie van 30 Hz en een duur van 30 seconden aan/ 108 seconden uit). Tussen de proeven door wordt de impedantie van de elektrodes getest. De stroom die een proefdier krijgt wordt ook steeds gecontroleerd, door een gekende weerstand in serie met de rat te schakelen. Bij een serieschakeling gaat dezelfde

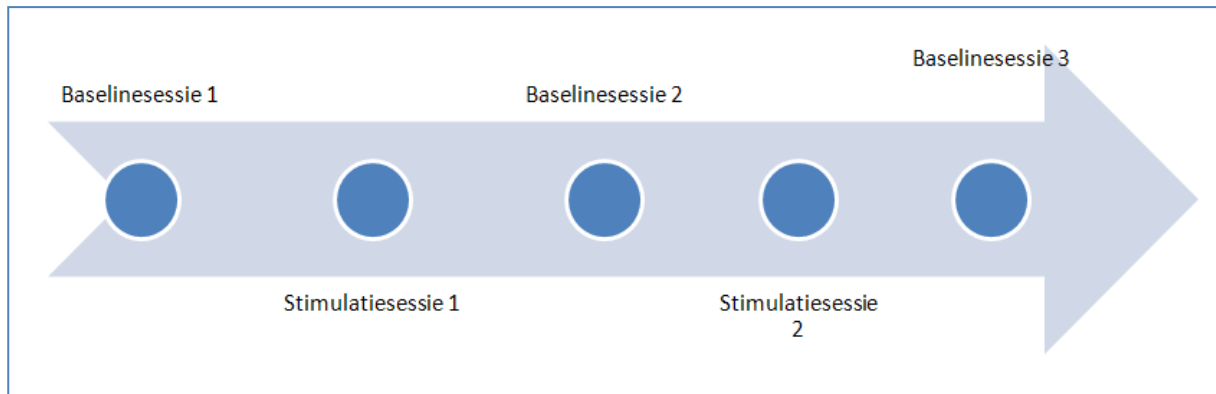
stroom door de in serie geschakelde componenten. De weerstand wordt zo gekozen dat er met de ingestelde stroom een spanning over zal staan van 1 tot enkele volt. Kiezen we een te kleine weerstand, dan zal de spanning niet nauwkeurig gemeten kunnen worden. Kiezen we een te grote weerstand, dan staat over de weerstand een grote spanning, waardoor we een groot deel van de compliance (het maximale voltage dat de stimulator kan leveren) “verliezen”. De stroom die door de rat gaat, gaat nu ook door de gekende weerstand en veroorzaakt een zogenaamde spanningsval U_r . Daaruit kan de stroom berekend worden via de formule $I = U_r/R$.



Figuur 11: Bepalen van de impedantie [28].

De impedantie van het weefsel kan berekend worden uit de stroom die er door gaat en de spanning die er over staat. De stroom hebben we ingesteld en gecontroleerd, de spanning meten we op de uitgang van de stimulator. Daarbij moeten we er wel rekening mee houden dat we ook de spanning over de meetweerstand meten. De weerstand die we berekenen is dus de totale weerstand: $R_{\text{totaal}} = U_{\text{totaal}}/I$. Als we van R_{totaal} nog R aftrekken, kennen we de weerstand van het weefsel rond de elektroden: $R_{\text{weefsel}} = R_{\text{totaal}} - R$ [28].

Elk dier krijgt per stimulatie-intensiteit een vijf uur durende sample periode (figuur 12):



Figuur 12: Sample periode: elke stip vertegenwoordigt een 1 uur durende sessie. Tijdens de baselinesessies werden de dieren niet gestimuleerd, tijdens de stimulatiesessies kregen de dieren NVS met een intensiteit van 0.00 mA, 0.25 mA, 0.50 mA of 1.00 mA. Na iedere sessie werd de aanvalsdrempel drie maal bepaald.

tijdens de baseline sessies wordt de n. vagus niet gestimuleerd terwijl tijdens de stimulatiesessies de n. vagus gestimuleerd wordt aan één van de vier bovenvermelde intensiteiten. Tijdens de stimulatiesessies werd live of via opgenomen videobeelden gekeken naar het gedrag van de ratten als respons op de NVS. De eventuele verandering van de drempelwaarde (de delta treshold of DTSH) wordt voor elk dier en voor elke stimulatie-intensiteit berekend door de eerste baseline drempelwaarde te vergelijken met de eerste drempelwaarde na stimulatie en de tweede baseline drempelwaarde met de tweede stimulatie drempelwaarde. Eveneens wordt de gemiddelde DTSH waarde berekend per stimulatie-intensiteit per dier. Ten slotte wordt ook de gemiddelde DTSH waarde berekend per intensiteit gepoold over alle ratten. Om te bepalen of NVS de drempelwaarde tussen de interstimulatie baseline periodes verandert, worden baseline twee en drie vergeleken met de eerste baseline via een student's t-test.

De volgorde van de vier stimulatie-intensiteiten werd gerandomiseerd om het sequentie-effect uit te schakelen. Bovendien wordt de volgorde van de stimulatie-intensiteiten blind gemaakt voor de observator.

2.6 Video-EEG monitoring

2.6.1 Het EEG

Het doel van de EEG registratie is om de focaliteit van de geïnduceerde aanval te bevestigen en om *post hoc* te controleren of de ratten gedurende de nervus vagus stimulatiesessies daadwerkelijk een volledig uur verbonden bleven met de stimulator.

2.6.2 Videobeelden

Via video opnames of live observatie wordt gekeken naar de reactie of de zichtbare ongemakken of neveneffecten ten gevolge van NVS. Ongemakken worden gedefinieerd als het hard krabben aan de linker kant van de nek (waar de elektrode is geïmplanteerd), het wild rondlopen tijdens de aan-tijd van de stimulator of het maken van ritmische bewegingen met de nek tijdens de aan-tijd.

2.7 Stabiliteit van de aanvalsdrempel na een lange tijd

Na 3 tot 4 maanden (afhankelijk van wanneer de rat gestabiliseerd werd voor de nervus vagus stimulatieproef) wordt bij de twaalf overgebleven ratten uit het de eerste fase nagegaan of er nog een lokale aanval kan worden uitgelokt en of de drempel voor het uitlokken van een lokale aanval nog steeds stabiel is.

2.8 Langdurige NVS

Uit de acht ratten van de tweede fase worden op basis van de impedantie en respons op de nervus vagus stimulatie de vier beste ratten uitgekozen om langdurige nervus vagus stimulatie toe te dienen. Concreet worden de ratten met de grootste stijging van de drempel en een impedantie lager dan 10 kOhm uitgekozen en wordt onderzocht of de drempel meer zal stijgen na 24 uur NVS dan na 2 uur NVS. De NVS start om 16.00 uur en ieder uur wordt de drempel voor het uitlokken van een lokale aanval drie maal bepaald (met intervallen van 2 tot 5 minuten) tot 19.00 uur. De ratten worden gedurende de nacht verder gestimuleerd en om 08.00 uur wordt de drempel terug ieder uur bepaald tot 16.00 uur.

2.9 Statistische analyse

Alle statistische analyses worden uitgevoerd met behulp van het SPSS softwarepakket, Windows versie 5.0. Er werd een ‘mixed model’ opgesteld waarbij de afhankelijkheid van de waarnemingen in rekening wordt gebracht. Aangezien verschillende metingen in eenzelfde rat worden uitgevoerd, zijn de metingen afhankelijk van elkaar. Het model neemt alle mogelijke

variabelen die aanwezig zijn in het experiment mee in de statistische berekeningen, waardoor het effect van alle variabelen (zoals de volgorde van de intensiteiten) nagegaan kan worden [29].

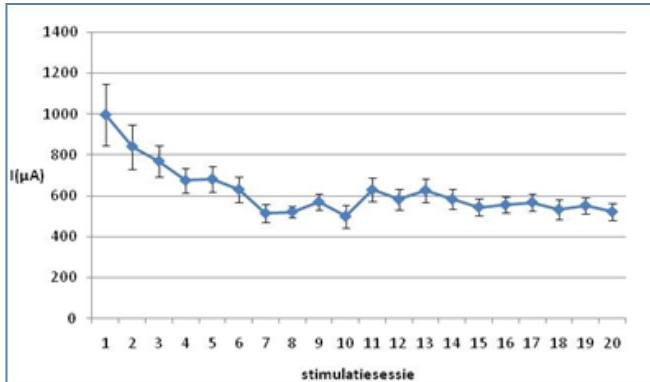
Om te bepalen of NVS de drempelwaarde tussen de interstimulatie baseline periodes veranderde, werden de drie baseline waarden met elkaar vergeleken via een student's t-test.

2.10 Histologie

Na afloop van de proef worden de ratten opgeofferd. De ratten worden eerst onder verdoving gebracht met isofluraan waarna ze met een overdosis pentobarbital (180 mg/kg Nembutal) geëuthanaseerd worden. Er wordt een incisie gemaakt ter hoogte van de cervicale regio en de linker nervus vagus wordt opnieuw blootgelegd. Er wordt nagegaan of de vagus-elektrode nog steeds rond de nervus vagus gewikkeld is en of de zenuw nog contact maakt met de twee platina contactpunten van de elektrode. Er wordt ook nagegaan of de elektrodedraden niet gebroken zijn.

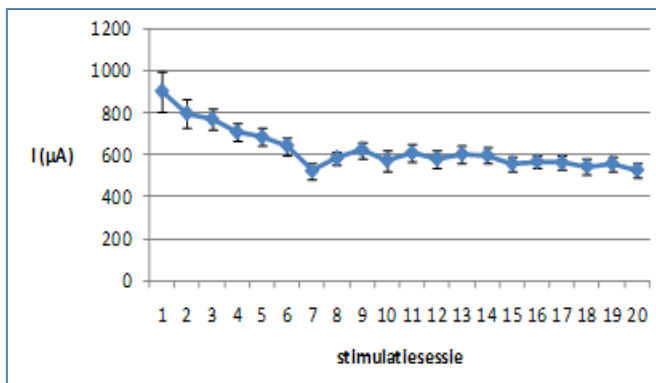
3. Resultaten

3.1 Instellen van een stabiele aanvalsdrempel in het corticaal stimulatiemodel



Figuur 13: Gemiddelde waarde van de aanvalsdrempel per stimulatiesessie met aanduiding van de standaard error of the mean (n=12).

vertoonden na twee weken een stabiele drempelwaarde. De lokale aanvallen waren gekenmerkt door een clonus van de voorpoot of een clonische achterwaartse beweging van het lichaam, zoals beschreven in de literatuur [24]. Sommige dieren vertoonden echter een atypische aanval gekenmerkt door het grijpen naar de achterpoot. Figuur 13 toont voor elke stimulatiesessie de gemiddelde drempelwaarde van de eerste twaalf ratten (A1 tot A14).



Figuur 14: Gemiddelde waarde van de aanvalsdrempel per stimulatiesessie met aanduiding van de standaard error of the mean (n=20).

interval van ongeveer 2 tot 5 minuten en het gemiddelde van deze drie waarden te weerhouden. Anderzijds werd nu ook een nieuwe, meer gestandaardiseerde techniek gebruikt bij de bepaling van de drempel: de ratten werden eerst wakker gemaakt via een auditieve of tactiele stimulus. Bovendien werd de stimulatie vanaf nu altijd in het donker uitgevoerd om de

In een eerste fase werden 14 ratten (A1-A14) geopereerd, waarvan er twee stierven (A2 en A13) in de loop van het experiment. Bij de overige 12 ratten werd de aanvalsdrempel gestabiliseerd met behulp van twintig corticale stimulatiesessies (twee per dag met zes uur tussen deze twee stimulaties, gedurende twee weken). Alle ratten vertoonden een daling van de drempel en

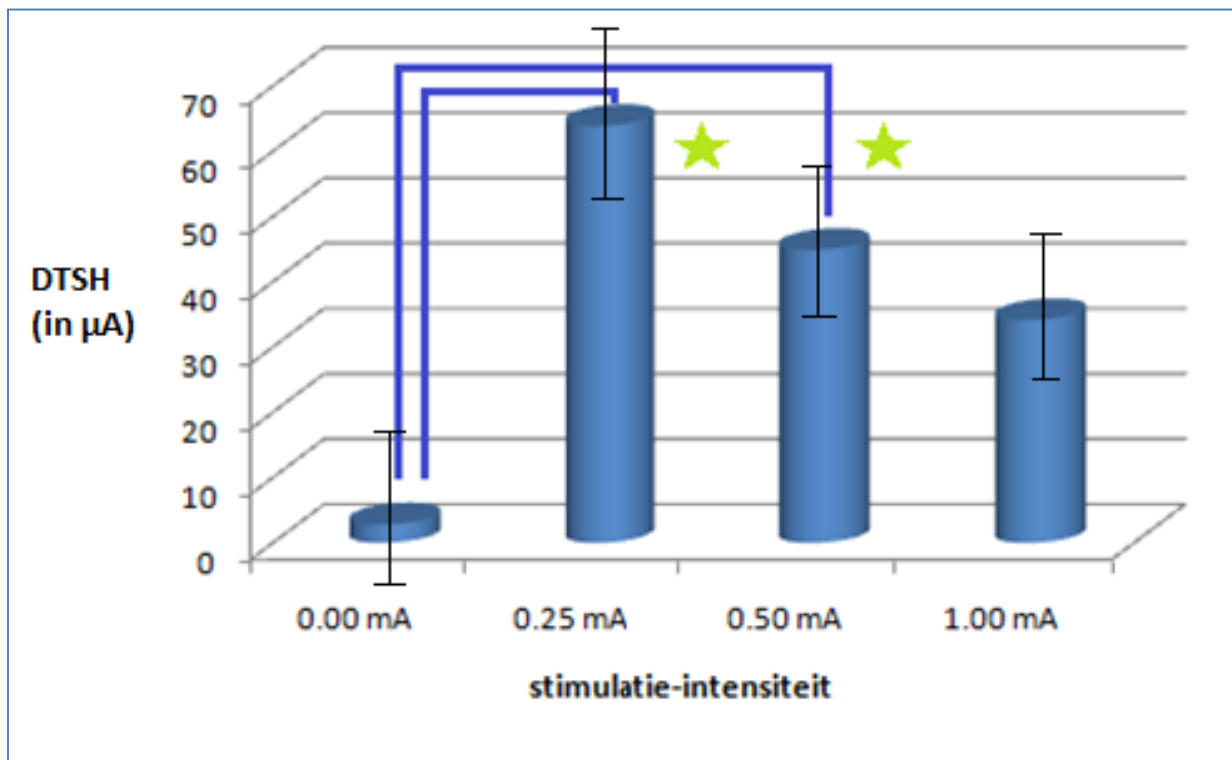
In de tweede fase van het experiment werden opnieuw 8 ratten (A15-A22) geopereerd. Door het feit dat de drempelwaarde beïnvloed wordt door enkele factoren (vb. diepe slaap), was er in de eerste fase soms veel variatie in de baseline waarden. Dit werd in de tweede fase van het experiment enerzijds opgelost door de drempel bij iedere meting drie maal te bepalen met een

variatie veroorzaakt door deze externe factor zoveel mogelijk te reduceren. Figuur 14 toont voor elke stimulatiesessie de gemiddelde drempelwaarde voor alle ratten met aanduiding van de standaard error of the mean (figuur 14).

3.2 Effect van NVS intensiteiten op de aanvalsdrempel

Ratten werden niet meegenomen in de analyse wanneer één van de volgende problemen zich voordeed: 1) een te hoge (hoger dan 10 kOhm) impedantie van de cuff-elektrode en de vaguszenuw (rat A9, A16, A18 en A20); 2) post mortem histologische bevindingen zoals lead-breakage (rat A18) en 3) het vertonen van clonische schokjes na het bepalen van de aanvalsdrempel (rat A11). Na uitsluiten van deze 5 ratten, werden 15 ratten weerhouden voor de analyse.

De delta threshold (DTSH) werd gedefinieerd als de aanvalsdrempel (in μA) na NVS verminderd met de aanvalsdrempel (in μA) na de baselinesessie. Via mixed model analyse werd een paarsgewijze vergelijking gemaakt op basis van de gemiddelde ($n=15$) DTSH van de vier NVS intensiteiten (statistische output zie bijlage 4).



Figuur 15: Gemiddelde stijging van de aanvalsdrempel (DTSH in μA) per stimulatie-intensiteit ($n=15$) met aanduiding van de standaard fout. De groene ster duidt een statistisch significant verschil in DTSH waarde aan.

Uit deze analyse blijkt dat NVS (30 Hz, 500 μ A, 30/300 on/off) met een intensiteit van 0.25 mA en 0.50 mA de aanvalsdrempel significant (respectievelijk $p=0,001$ en $0,021$) meer verhogen dan SHAM stimulatie (0.00 mA). NVS met een amplitude van 0.25 mA verhoogt de aanvalsdrempel het meest, maar het verschil met de DTSH bij stimulatie met 0.50 mA is niet statistisch significant ($p=0,300$). NVS aan 1.00 mA verhoogt de aanvalsdrempel niet significant ten opzichte van de baseline.

De mixed model analyse toont bovendien aan dat de volgorde van de stimulatie-intensiteiten (de dag waarop met een bepaalde intensiteit gestimuleerd werd) geen invloed had op de uitkomst ($p=0,922$).

Met een student's t-test kon bovendien aangetoond worden dat de gemiddelde interstimulatie baseline waarden niet statistisch significant van elkaar verschillen (tabel 1). Dit is een vereiste aangezien de drempel stabiel dient te blijven als de dieren geen behandeling krijgen.

	1 VS 2	1 VS 3	2 VS 3
P-waarde	0,35	0,34	0,96

Tabel 1: De gemiddelden van alle eerste (B1), tweede (B2) en derde (B3) baseline stimulaties werden paarsgewijs vergeleken via een student t-test. Uit de p-waarde blijkt dat de aanvalsdrempels niet significant verschillen van elkaar.

3.3 Video-EEG monitoring

3.3.1 Het EEG

Het doel van de EEG opnames was onder andere om de focaliteit van de geïnduceerde aanval te bevestigen. Door het stimulatieartefact was echter weinig te zien van de lokale aanvallen op het EEG. Als de stimulatie onderbroken werd, stopten de klinische aanvalssymptomen onmiddellijk wat er op wijst dat de aanvalsactiviteit zich niet verspreidde en er dus waarschijnlijk geen afterdischarges (ADs) op het EEG waarneembaar zouden zijn.

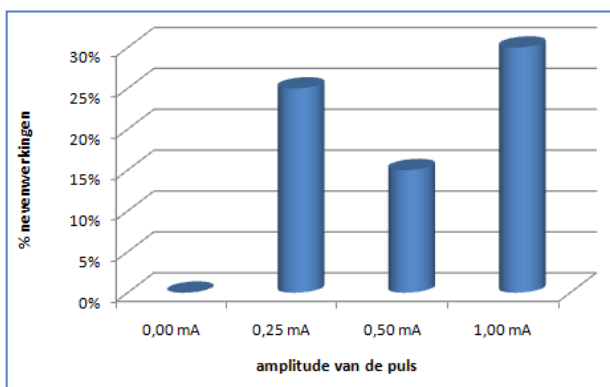
Daarnaast werd via het EEG *post hoc* gecontroleerd of de ratten gedurende de NVS daadwerkelijk een volledig uur verbonden bleven met de stimulator. Aangezien het belang hiervan en het feit dat het gedrag geobserveerd moest worden, werd echter al snel geopteerd om de ratten live te observeren zodat meteen kon worden ingegrepen indien ze los kwamen.

3.3.2 Videobeelden

Het doel van de video-opname was om *post hoc* het gedrag van de dieren te kunnen observeren tijdens NVS. Aangezien de gedragsveranderingen van de dieren tijdens de aan-tijd van de stimulator soms heel subtiel waren, konden die veel nauwkeuriger live geobserveerd worden en werden er geen video-opnames meer gemaakt. Er werd vooral gekeken naar gedragsveranderingen tussen de aan- en af-tijd van de stimulator.

3.3.2.1 Stimulatiegerelateerde neveneffecten

Neveneffecten en ongemakken als gevolg van NVS werden gedefinieerd als het wild



Figuur 17: Percentage neveneffecten bij de verschillende intensiteiten

rondlopen, krabben aan de linkerkant van de nek en/of het uitvoeren van ritmische bewegingen met de nek (head-nodding) tijdens de aan-tijd van de stimulator. Bij SHAM stimulatie (0.00 mA) vertoonde geen enkele rat ongemakken. Bij NVS met een intensiteit van 0.25 mA, 0.50 mA en 1.00 mA vertoonde respectievelijk 25, 15 en 30 % van de ratten ongemakken.

3.3.2.2 Het syndroom van Horner



Figuur 18: Horner syndroom, ptose en enoftalmie van het linker oog.

Bij twee van de twintig ratten kon ook een Horner syndroom geobserveerd worden, waarbij er een duidelijke ptose (het afhangen van het ooglid) en enoftalmie (het wegzakken van het oog in de oogholte) van het linker oog te zien was (figuur 18). Dit syndroom is gekend als een chirurgische complicatie van NVS.

3.4 Stabiliteit van de aanvalsdrempel na een lange tijd

Na 3 tot 4 maanden (afhankelijk van wanneer de rat gestabiliseerd werd voor de NVS proef) werd bij de twaalf ratten uit de eerste fase van het experiment nagegaan of er nog steeds een lokale aanval kon worden uitgelokt en of deze aanvalsdrempel nog steeds stabiel was. Twee van de twaalf ratten kregen na de lokale aanval nog schokjes voor ongeveer een minuut en werden bijgevolg niet meer gestimuleerd. Eén rat was heel zwak en werd daarom geëuthanaseerd. Twee andere ratten konden niet meer gestimuleerd worden door technische problemen zoals het verslijten van de connector of het afbreken van een of meerdere connectiepinnetten.

Alle overige ratten (n=7) vertoonden bij de stimulatie nog steeds een lokale aanval. De eerste waarde was bij alle ratten veel lager dan de initiële stimulatiewaarde. De waarden waren niet meer stabiel. De aanvalsdrempels werden na vijf tot tien stimulatiesessies terug stabiel maar hadden doorgaans een lagere waarde dan bij de eerste stabilisatieperiode.

3.5 Langdurige nervus vagus stimulatie

Na langdurige (24 uur) NVS konden bij drie van de vier ratten (A15, A17 en A21) veel grotere stijgingen van de aanvalsdrempel worden waargenomen dan na 2 uur NVS. De grootste procentuele stijgingen werden in de individuele ratten bereikt na een variabele duur van NVS. De procentuele stijging van de aanvalsdrempel vertoonde geen duidelijke trend in de tijd (bijvoorbeeld een lineair verband tussen de stijging van de drempel en de duur van de stimulatie).

Rat	Procentuele stijging na 2 uur NVS	Grootste procentuele stijging na X uur NVS
A15	29,25%	63,2% (na 16 uur NVS)
A17	32,2%	137% (na 3 uur NVS)
A21	45%	62,2% (na 19 uur NVS)
A22	18,8%	19,9% (na 12 uur NVS)

Tabel 2: procentuele stijging van de drempel na 2 uur NVS en na X uur NVS tijdens 24-uurs NVS.

3.6 Histologie

Bij alle ratten werd veel fibreus weefsel gezien in en rond de elektrode. De cuff-elektrode zat bij alle ratten nog steeds rond de nervus vagus gewikkeld. Bij rat A18 was 1 stimulatiedraad

gebroken ter hoogte van de kop, waardoor deze rat niet kon meegenomen worden in de analyse van de resultaten.

Bij drie van de vier ratten waarbij 24 uur NVS werd toegediend, waren lokale veranderingen van de zenuw merkbaar. De n. vagus zag er licht verkleurd uit ter hoogte van de elektrode. De resultaten van deze ratten konden echter wel nog gebruikt worden, omdat deze veranderingen naar alle waarschijnlijkheid veroorzaakt waren door de 24 uur NVS en dus nog niet aanwezig waren tijdens eerste proef.

4. Bespreking

4.1 Instellen van een stabiele aanvalsdrempel in het corticale stimulatiemodel

4.1.1 Klinische variabiliteit van de gedragsveranderingen

Alle ratten vertoonden na twintig corticale stimulatiesessies een stabiele aanvalsdrempel. De klinische expressie van die aanvallen was echter licht verschillend tussen de individuele ratten. In deze proef werd geobserveerd dat bij de ratten die zwaarder wogen bij de operatie (de ratten uit de eerste fase), de lokale aanvallen vaker gekenmerkt waren door het grijpen naar de achterpoot. Bij de ratten die minder wogen (de ratten uit de tweede fase) werden de lokale aanvallen daarentegen vaker gekenmerkt door een clonische trekking van de voorpoot of een achterwaartse beweging. De meest aannemelijke verklaring hiervoor zijn kleine variaties in de plaatsing van de elektrodes in de cortex. Deze variaties kunnen verklaard worden doordat de coördinaten voor het plaatsen van de elektrodes afhankelijk zijn van het gewicht en het feit dat de ratten uit de eerste fase zwaarder wogen dan die uit de tweede fase. Voskuyl et al. toonden aan dat de ernst en de duur van de aanvallen verhoogde naarmate de elektrodes meer caudaal geïmplantieerd waren. Bovendien vond deze onderzoeksgroep dat de frontoparietale cortex de meest geschikte plaats voor stimulatie is omdat bij stimulatie op deze plaats de variabiliteit van de drempel significant kleiner is dan op andere plaatsen [24].

Bij de ratten die eerder naar de achterpoot grepen dan een trekking vertoonden van de voorpoot, waren de elektrodes waarschijnlijk eerder gepositioneerd ter hoogte van de sensorische cortex van de achterpoot, waardoor de rat bij stimulatie een sensatie krijgt en bijgevolg gaat grijpen naar de achterpoot. Deze variatie in de klinische expressie van de aanvallen, samen met het feit dat iedere observator een licht ander criterium gebruikt voor het aanduiden van een aanval, illustreren mijns inziens het belang van het feit dat telkens dezelfde observator de drempel bepaalt tijdens een proef. Voskuyl et al. spreken dit echter tegen en stellen dat de drempelwaarden bepaald door onafhankelijke observatoren weinig verschillen en suggereren dat de geobserveerde variaties dus de echte fluctuaties van de drempelwaarde reflecteren en geen methodologische artefacten zijn [30].

4.1.2 Variatie in de stabiele drempelwaarden

Uit de literatuur blijkt dat er een zekere random variatie in de drempel voor het uitlokken van een lokale aanval tussen dieren bestaat alsook een bepaalde graad van variatie bij herhaalde

testen in hetzelfde dier. De oorzaak van deze variaties is echter nog onduidelijk. De variabiliteit van de drempelwaarde kan niet toegeschreven worden aan een invloed van het seizoen (eerste semester versus tweede semester), aangezien Voskuyl et al. aantoonde dat er geen seizoenseffect op de drempel bestaat. De geobserveerde variabiliteit wordt volgens deze onderzoeksgroep voornamelijk veroorzaakt door de intrinsieke eigenschappen van het individuele dier [30].

Mijns inziens wordt deze variatie veroorzaakt door zowel interne als externe factoren. In deze proef werd bijgevolg geprobeerd om de variatie te reduceren door deze factoren beter te controleren.

Enerzijds werd een nieuwe, meer gestandaardiseerde techniek gebruikt. Aangezien de aanvalsdrempel in de meeste gevallen groter is wanneer het dier slaapt (interne factor), werden de ratten bij elke drempelbepaling wakker gemaakt via een auditieve of tactiele stimulus. Bovendien werd de stimulatie steeds uitgevoerd in het donker om de variatie veroorzaakt door deze externe factor, zoveel mogelijk te reduceren.

Anderzijds werd in de tweede fase de drempel bij iedere sessie drie maal bepaald met een interval van ongeveer 2 tot 5 minuten en werd het gemiddelde weerhouden. Het bepalen van de drempel met dergelijke korte intervallen blijkt uit de literatuur geen invloed te hebben op de drempel. Voskuyl et al. toonden immers aan dat de drempel niet beïnvloed wordt door te testen met intervallen van slechts 1 minuut op voorwaarde dat er geen zelfonderhoudende aanvallen geïnduceerd worden. Als de drempel voor het uitlokken van een veralgemeende aanval echter overschreden wordt, observeert men een hogere drempel voor het uitlokken van een lokale aanval in de daaropvolgende testen [30].

4.1.3 Vergelijking van de drempelwaarden met de literatuur

In het artikel van Voskuyl et al. werd beschreven dat de aanvalsdrempel tijdens de stabilisatieperiode daalt van een gemiddelde waarde van $600\mu\text{A}$ tot een waarde van ongeveer $350\mu\text{A}$ in 20 stimulatiesessies [24]. In deze studie echter daalde de waarde van gemiddeld $900\mu\text{A}$ tot ongeveer $500\mu\text{A}$ in 20 stimulatiesessies. Dit verschil is waarschijnlijk te wijten aan het gehanteerde criterium voor het aanduiden van een lokale aanval. In deze proef werd verder gestimuleerd tot met zekerheid kon gezegd worden dat een lokale aanval werd uitgelokt. Het aanduiden van een aanval op het moment dat het dier een beweging maakt met de voorpoot, leidt mijns inziens tot veel meer vals positieve metingen dan wanneer gestimuleerd wordt tot het dier een

duidelijke achterwaartse beweging maakt. Bovendien komt in ongeveer 5% van de dieren de eerste periode van milde clonische voorpootactiviteit nooit voor [30].

De aanvalsdrempel is de enige parameter die echt fluctueert, terwijl de progressieve ontwikkeling van de aanvalsactiviteit een vast patroon blijkt te volgen op vaste intensiteiten in alle dieren. Dit impliceert dat de resultaten van een experiment niet zullen aangetast worden door hoe de eindpunten precies gedefinieerd worden (trekking van de voorpoot vs. een duidelijke achterwaartse beweging), zolang ze maar consistent bepaald worden op dezelfde manier doorheen een experiment [30].

4.2 Effect van verschillende NVS intensiteiten op de aanvalsdrempel

De maximale spanning die door de gebruikte stimulators (digitimer DS4) kan geleverd worden is 48 volt (+48 voor de positieve puls en -48 voor de negatieve puls). Uit de wet van Ohm ($R=U/I$) blijkt dan dat de impedantie maximaal 48 kOhm mag bedragen indien men een stroom van 1.00 mA wil geven met een dergelijke stimulator. Als de impedantie tussen de cuff-elektrode en de zenuw echter hoger is dan 48 kOhm, kan de stimulator onvoldoende spanning leveren om de ingestelde stroom door de nervus vagus te sturen. Naar analogie met andere experimenten werd ervoor gekozen om de criteria nog te verstrengen en enkel de resultaten te gebruiken van ratten die een impedantie lager dan 10 kOhm vertoonden. Op basis van dit criterium konden de resultaten van vier ratten (A9, A16, A18 en A20) niet gebruikt worden.

Eén rat vertoonde na het beëindigen van de corticale stimulatie clonische schokjes gedurende ongeveer één minuut. Dit kan erop wijzen dat de drempel voor het uitlokken van een veralgemeende aanval overschreden werd. Voskuyl en collega's hebben aangetoond dat dit de drempel voor het uitlokken van nieuwe lokale aanvallen gedurende minstens 10 minuten verhoogt, terwijl compleet herstel verschillende uren kan duren. Corticale stimulatie die de drempel voor het uitlokken van een veralgemeende aanval overschrijdt, veroorzaakt dus een langdurige postictale verhoging van de drempel voor het uitlokken van een lokale aanval. Deze verhoging is vooral uitgesproken gedurende de eerste 10 minuten na de veralgemeende aanval [30]. Op basis van deze bevindingen konden ook de resultaten van deze rat niet verwerkt worden.

De bevinding dat veel responders een significante aanvalsreductie vertonen bij NVS met een lage intensiteit (0.25 mA en 0.50 mA in dit experiment) is consistent met de kennis over de

anatomie van de nervus vagus. Zoals eerder beschreven is deze zenuw opgebouwd uit drie vezeltypes: A-, B- en C-vezels. A-vezels zijn de snelst geleidende vezels. Deze vezels zijn het grootst en bezitten een myelineschede, waardoor ze reeds geactiveerd worden bij een stimulatie-intensiteit van minder dan 0.20 mA. B-vezels hebben ook een myelineschede maar zijn iets kleiner. Ze worden geactiveerd bij een intensiteit van 0.40 mA. C-vezels ten slotte hebben de kleinste diameter en bezitten geen myelineschede. Deze worden geactiveerd bij een stroom met een intensiteit van 2.00 mA of hoger [7, 8, 26].

Initieel werd gedacht dat activatie van vagale C-vezels noodzakelijk is voor het anti-epileptisch effect van NVS. Krahl et al. vonden echter dat destructie van deze vezels in ratten het effect van NVS niet verminderde [8, 14]. Deze bevinding ondersteunt de vaststelling dat een hogere intensiteit (1.00 mA in dit experiment) niet automatisch correleert met een grotere aanvalsreductie. Daarenboven verhoogt C-vezel activatie de waarschijnlijkheid op neveneffecten en verkort het de levensduur van de batterij [8].

Verdere ondersteuning voor het gebruik van lagere NVS intensiteiten komt van experimenten die de locus coeruleus betrekken. De locus coeruleus is gelokaliseerd in de pons, produceert noradrenaline en heeft wijdverspreide projecties doorheen het centraal zenuwstelsel. Het is een kritische structuur voor de efficiëntie van NVS. Krahl et al. stelden vast dat het maken van chemische laesies in de locus coeruleus het anti-epileptisch effect van NVS in ratten blokkeerde [14]. Bovendien activeren stromen die te laag zijn om de C-vezels te stimuleren, maximaal de locus coeruleus [19]. Stromen van minder dan 1.00 mA, een range gelijkaardig aan diegene die de locus coeruleus activeert in ratten, zijn voldoende voor de meeste NVS responders. Verhogen van de stroom zal niet noodzakelijk de respons verbeteren, maar kan de ongemakken voortvloeiend uit het rekruteren van de C-vezels verhogen. Deze data tonen het gebrek aan correlatie aan tussen een hogere intensiteit en een efficiëntere therapie. Er is een groeiende consensus dat sommige patiënten een hogere aanvalsreductie kunnen bereiken middels een verhoogde stroom, hoewel de initiële NVS efficiëntie geen hoge output stroom nodig heeft [14].

In een studie van Zagon et al. werd bovendien vastgesteld dat stimulatie intensiteiten die voornamelijk de gemyeliniseerde A- en B-vezels activeren (minder dan 0.20 mA) het meest effectief zijn om de trage vagale hyperpolarisatie te induceren in de neuronen van de temporale associatiecortex in ratten. Bij een intensiteit hoger dan 0.20 mA, worden ook niet gemyeliniseerde vagale C-vezels gerekruteerd waardoor de efficiëntie van NVS om trage

vagale hyperpolarisatie te induceren wordt gereduceerd. Er werd voorgesteld dat trage hyperpolarisatie een van de mechanismen zou kunnen zijn die aan de basis liggen van het verminderen van de aanvalsfrequentie met NVS, door de exciteerbaarheid in de neuronen te verlagen die betrokken zijn in de propagatie van de aanvalsactiviteit [17].

33,3% van de ratten (5/15) vertoonde de grootste stijging van de aanvalsdrempel bij NVS met een intensiteit van 0.25 mA. Voor 0.50 mA en 1.00 mA bedroeg dit percentage respectievelijk 40% (6/15) en 27% (4/15). Deze individuele verschillen zouden kunnen te wijten zijn aan lokale anatomische verschillen ter hoogte van de zenuw-elektrode interface.

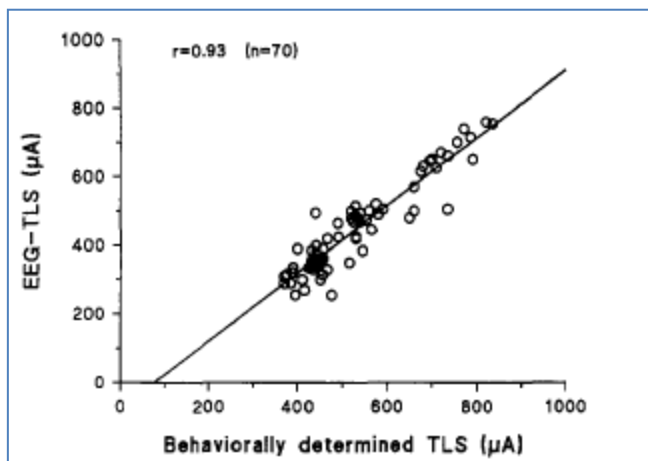
Binnen de range van typische waarden blijken individuele patiënten best te reageren op verschillende combinaties van parameterinstellingen. Per patiënt moet dus gezocht worden naar de combinatie van parameters die enerzijds zorgt voor een maximaal aanvalsonderdrukkend effect maar die anderzijds ook zo weinig mogelijk neveneffecten veroorzaakt en de batterij niet overmatig belast [23].

In een studie van Bunch et al. [26] in patiënten stelde men vast dat de amplitude van de NVS puls niet de belangrijkste of enige determinant is voor de acute anticonvulsieve respons op NVS. Er werd geen significant verschil gevonden in aanvalsreductie tussen de groep patiënten behandeld met NVS met lage intensiteit (< 1 mA) en de groep patiënten behandeld met NVS met een hoge intensiteit (> 1 mA). 87% van de initiële non-responders werden na het verhogen van de intensiteit toch responders. Men kon echter niet besluiten of dit kwam door het effect van de verhoging van de stroomsterkte of door het effect van de tijd [26]. Deze studie werd uitgevoerd in patiënten en dus kan de vraag gesteld worden of de resultaten vergeleken kunnen worden met de resultaten in ratten. In deze masterproef werd NVS met een amplitude van 1.00 mA gehanteerd als hoogste dosis, terwijl dit in de patiënten van het onderzoek van Bunch et al. de bovengrens was van de lage dosis-range. Bovendien volgde men de patiënten over een tijdspanne van drie maanden om het acute effect van NVS te beoordelen, terwijl in deze masterproef de ratten slechts vier dagen gestimuleerd werden. Zoals eerder besproken zijn mechanismen die de aanvallen acut onderdrukken waarschijnlijk verschillend van mechanismen die op lange termijn worden opgebouwd en tijd nodig hebben om zich in te stellen [8]. Mogelijks maakt dit beide studies moeilijk vergelijkbaar. Bunch et al. bespreken bovendien een onderzoek waaruit blijkt dat hoge stromen (hoger dan 2.25 mA) minder effectief zijn dan lage stromen. Er werd een aanvalsreductie van 38% gezien in de groep behandeld met hoge intensiteiten versus een aanvalsreductie van 64 % in de groep behandeld

met lage intensiteiten. Er kan hierbij wel confounding opgetreden zijn aangezien initiële responders waarschijnlijk geen verhoging van de intensiteit zullen nodig hebben in vergelijking met de non-responders [26].

4.3 Het EEG

Het corticaal EEG werd in de studie van Voskuyl et al. [30] gescreend op karakteristieke veranderingen die gerelateerd zijn aan de initiatie van de aanvalsactiviteit. Het EEG van de frontale motorische cortex vertoonde scherpe negatieve pieken met een groter wordende amplitude bij de start van de aanvalsactiviteit. Het verschijnen van deze pieken kon accuraat bepaald worden in 97% van de ratten en duidde de convulsieve drempel aan [30].



Figuur 19: correlatie tussen de klinisch bepaalde drempel en de drempel bepaald uit het EEG [28].

Er werd een sterke lineaire correlatie vastgesteld tussen de drempel bepaald via het gedrag (de klinisch bepaalde drempel) en de drempel die afgeleid werd uit het EEG van de frontale elektrodes (figuur 19). Dit bevestigt de validiteit van het gebruik van de klinische veranderingen als objectieve en accurate bepaling van de start van epileptische activiteit. De helling van 1 van de regressielijn betekent bovendien dat de verschillen

tussen de klinisch bepaalde drempel en de drempel bepaald op basis van het EEG, dezelfde zijn voor alle dieren, onafhankelijk van het feit of ze een hoge of een lage aanvalsdrempel hebben. De regressielijn sneed de X-as op 77 µA. Wanneer men terug keek in de video-opnames van de stimulatiesessies, kon men zien dat deze hogere drempelwaarde op basis van het gedrag kon verklaard worden door het feit dat het tevoorschijn komen van epileptiforme activiteit op het EEG overeenstemde met de eerste gedragsveranderingen nl. het bewegen van de snorharen en het knipperen van de ogen. Deze correlatie kon voorspeld worden aangezien de registratie elektrodes geplaatst werden in de motorische gebieden die de snorharen en oogleden representeren en de activiteit in deze gebieden dus overeenkomt met de allereerste faciale bewegingen. Deze tekenen worden niet op routinebasis gebruikt om de drempel te bepalen omdat ze veel te subtiel en bij gevolg heel moeilijk te detecteren zijn. Bovendien zou het gebruik van dergelijke subtiele veranderingen leiden tot te veel vals positieven. De

bepaling van de drempel is altijd gebaseerd op meer robuuste tekenen van aanvalsactiviteit die wat later beginnen (bijvoorbeeld een clonische beweging van de voorpoot of andere clonische activiteit die karakteristiek is voor een bepaald dier) [30].

4.4 Neveneffecten

4.4.1 Stimulatiegerelateerde neveneffecten

Bij SHAM stimulatie (0.00 mA) vertoonde geen enkele rat ongemakken. Bij NVS met een intensiteit van 0.25 mA, 0.50 mA en 1.00 mA vertoonde respectievelijk 25, 15 en 30 % van de ratten ongemakken. Aangezien de meeste NVS-gerelateerde neveneffecten dosisafhankelijk zijn, lijkt het heel vreemd dat een groter percentage van de ratten neveneffecten of ongemakken ervaart bij een stimulatie-intensiteit van 0.25 mA dan bij 0.50 mA. Dit kan echter verklaard worden door het feit dat de neveneffecten vaker voorkomen als de ratten voor de eerste keer gestimuleerd worden en dat nadien gewenning optreedt. Bij 80% (8/10) van de ratten waarbij ongemakken zichtbaar waren, zijn deze ongemakken waarschijnlijk te wijten aan het feit dat ze voor de eerste keer gestimuleerd werden, ongeacht de amplitude van de stimulatiepuls. Ook bij de mens kan stimulatie met een amplitude van 0.25 mA reeds neveneffecten veroorzaken bij het initieel aanzetten van de batterij. Bij patiënten manifesteren de neveneffecten zich ook vooral in het begin van de therapie, waarna snelle habituatie optreedt [11].

4.4.2 Het syndroom van Horner

Het Syndroom van Horner (oculosympatische palsy) is een klinisch syndroom dat gekenmerkt wordt door ptose, miose, enofthalmie en faciale anhidrose. Deze ziekte kan veroorzaakt worden door een tumor, een inflammatoir proces, trauma of een chirurgische ingreep ter hoogte van een anatomische regio waarlangs de vezels van het oculosympatisch systeem lopen. In dit laatste geval spreken we van een iatrogeen Horner syndroom. Er bestaat ook een ideopatische vorm, die erfelijk kan zijn [31].

Het syndroom wordt veroorzaakt door een verstoring van het oculosympatisch systeem. Dit systeem verzorgt in normale omstandigheden de sympatische innervatie van het oog.

In ratten kan de ptose en de enofthalmie gemakkelijk gezien worden. De miose en faciale anhidrose zijn veel moeilijker te bepalen. Waarschijnlijk zijn de enofthalmie en de ptose gerelateerd aan de schade aan het oculosympatisch systeem veroorzaakt door het implanteren van de nervus vagus stimulator in het gebied van de arteria carotis.

In een studie van Aalbers en collega's [31] ontwikkelden 66.8% van de ratten een postoperatief Horner syndroom. In deze masterproef ontwikkelden slechts 10% van de ratten het syndroom. Dit verschil kan te wijten zijn aan het feit dat Aalbers et al. de cuff-elektrode niet enkel rond de nervus vagus wikkelden, maar ook rond de arteria carotis communis. Deze procedure kan potentieel meer schade aan de vezels veroorzaken. Een andere verklaring is dat er in deze studie initieel niet gelet werd op het ontwikkelen van dit syndroom en dat bijgevolg subtielere symptomen werden gemist. Deze complicatie beïnvloedt de epileptogenese niet en heeft bijgevolg waarschijnlijk geen verdere invloed op de resultaten [31].

4.4 Bepalen van de stabiliteit van de aanvalsdrempel na een lange periode

Twee ratten vertoonden na een periode (3 tot 4 maanden) waarin niet gestimuleerd werd clonische schokjes wanneer elektrische stimulatie werd toegediend aan de motorische cortex. In een studie van Voskuyl et al. werden ratten verder gestimuleerd nadat de aanvalsdrempel bereikt was om potentieel nuttige veranderingen in het EEG te zoeken. In sommige gevallen zag men afterdischarges (ADs) nadat de stimulatie gestopt werd. In deze gevallen kon clonische activiteit gezien worden die exact overeen kwam met het tevoorschijn komen van de ADs. De clonische activiteit duurde 10 tot 40 seconden [30]. De geobserveerde schokjes in deze studie zijn waarschijnlijk ook het resultaat van ADs.

Voskuyl et al. vergeleken het corticale stimulatiemodel en het kindling model. In het kindling model worden ook epileptische aanvallen uitgelokt door het herhaaldelijk toedienen van elektrische stroom in de hersenen. Hoe meer er gestimuleerd wordt, hoe erger de aanvallen worden en hoe langer ze duren (seizures beget seizures). Het herhaaldelijk stimuleren van de motorische cortex zou misschien ook kunnen leiden tot zo'n epileptogeen proces en zou dan kunnen gezien worden als een milde vorm van kindling. Een argument die deze gedachtegang ondersteunt, is dat de stimulatieparameters voor het uitlokken van een lokale aanval in het corticaal stimulatiemodel heel sterk lijken op de parameters die optimaal zijn voor het produceren van ADs in het kindling model. Bovendien daalt de drempel voor het uitlokken van een aanval in beide modellen in functie van het aantal stimulatiesessies. In het kindling model is deze daling het resultaat van een verhoging van de doeltreffendheid van de synaptische responsen. Dit proces wordt ook synaptische potentiatie genoemd en komt tot stand door veranderingen in de glutamaterge en GABA-erge neurotransmissie, de twee dominante excitatorische en inhibitorische neurotransmitters in de motorische cortex. Deze verandering wordt gekenmerkt door enerzijds een toegenomen effectiviteit van glutamaat en

anderzijds het verlies van GABA-erge inhibitie. De toegenomen effectiviteit van glutamaat kan toegeschreven worden aan twee factoren. Ten eerste blijven de NMDA receptoren (receptoren voor glutamaat) langer open en ten tweede worden deze receptoren meer toegankelijk voor glutamaat ten gevolge van een daling in de affiniteit van Mg^{2+} in de kanaalporiën. Het verlies van de GABA-erge inhibitie is het gevolg van een onderdrukking van de GABA-erge synapsen.

Synaptische potentiatie kan dus beschreven worden als een toename van laterale glutamaterge excitatorische connecties gecombineerd met een reductie van de inhibitorische GABA-erge connecties. Deze verandering kan een functionele reorganisatie van de corticale motor map veroorzaken. De verandering in de corticale map zorgt ervoor dat een groter corticaal gebied kan gestimuleerd worden met als respons een trekking van de voorpoot. Deze veranderingen faciliteren de mogelijkheid om een clonie van de voorpoot uit te lokken wat zich vervolgens uit in een lagere aanvalsdrempel. Bij kindling duurt de AD langer en stijgt de ernst van de aanval totdat de rat volledig gekindeld is. In het CSM daalt de drempelwaarde door hetzelfde fenomeen. Het is ook mogelijk dat de neocortex gereorganiseerd wordt als compensatie voor de epileptiforme activiteit zodat de functionele bewegingsrepresentaties niet verloren gaan door een zich ontwikkelende pathologische focus [32].

Het is heel waarschijnlijk dat het mechanisme voor het uitlokken van een lokale aanval in het corticaal stimulatiemodel en het uitlokken van ADs (en dus kindling) in het kindling model, nauw met elkaar verwant zijn [24]. Het is echter niet zeker of deze twee fenomenen volledig identiek zijn, aangezien er ook belangrijke verschillen zijn tussen de twee procedures. Eén van de grootste verschillen is dat kindling gebeurt met elektrodes die zich bevinden in de diepe lagen van de hersenen, terwijl corticale stimulatie in deze studie gebeurt met elektrodes die zich op het oppervlak van de cortex bevinden. Een ander groot verschil is dat in het corticaal stimulatiemodel de grootste veranderingen van de drempel plaatsvinden in de eerste sessies (een sterke daling van de drempel), terwijl neocorticale kindling volledig ontwikkeld wordt na gemiddeld 16 tot 18 kindling sessies [24].

Twee ratten konden niet meer gestimuleerd worden door technische problemen zoals het verslijten van de connector of het afbreken van een of meerdere connectiepinen. Alle overige ratten ($n=7$) vertoonden bij de stimulatie nog steeds een lokale aanval. De eerste waarde was bij alle ratten veel lager dan de initiële stimulatiewaarde. De waarden waren niet meer stabiel. De drempels werden na vijf tot tien stimulatiesessies terug stabiel maar hadden doorgaans een

lagere waarde dan bij de eerste stabilisatie periode. Er kan dus besloten worden dat de drempel voor het uitlokken van een lokale aanval opnieuw gestabiliseerd moet worden indien de ratten gedurende een aantal maanden niet meer gestimuleerd worden. Het zou interessant zijn om na te gaan wat er gebeurt met de drempel in functie van de tijd na stabilisatie. De tijdsperiode van 3 tot 4 maanden was in geen enkele rat voldoende om de drempel terug te brengen naar de initiële waarde, maar indien het hierboven beschreven proces reversibel is zou dit na een langere periode misschien wel het geval kunnen zijn.

4.5 Langdurige NVS

In drie van de vier ratten werden veel grotere stijgingen van de aanvalsdrempel waargenomen na NVS (aan de intensiteit waarbij ze in de eerste proef de grootste stijging van de aanvalsdrempel vertoonden) van langere duur (langer dan twee uur). Dit zou kunnen verklaren waarom sommige ratten in dit proefopzet schijnbaar niet reageren op NVS. Misschien kan NVS de exciteerbaarheid van de hersenen daadwerkelijk beïnvloeden, maar nemen de processen die dit bewerkstelligen meer dan twee uur in beslag om opgebouwd te worden. Uit de literatuur blijkt bovendien dat NVS van een periode langer dan 60 minuten een cumulatief aanvalsonderdrukkend effect heeft [11], wat een verklaring zou kunnen zijn voor de grotere stijgingen van de aanvalsdrempel die werden waargenomen.

Na 24 uur NVS bleek uit het histologisch onderzoek van deze ratten dat de zenuw licht verkleurd was op de plaats waar de elektrode zat. Dit zou erop kunnen wijzen dat er schade toegebracht werd aan de zenuw door dergelijke langere periodes van stimulatie, wat een obstakel kan vormen wanneer men chronische experimenten zou willen uitvoeren. Mogelijks zijn er ten gevolge van langdurige stimulatie lokale biologische veranderingen zoals demyelinisatie van de zenuw opgetreden.

4.6 Histologie

Door het feit dat er bij alle ratten veel dens fibreus weefsel ontstaan was die de elektrode-zenuw interface omhulde, is het mogelijk dat er een minder goed contact was tussen de zenuw en de contactpunten van de elektrode.

Voskuyl en collega's onderzochten of de diepte van de elektrodes een invloed had op de variatie van de drempel. Zeventien ratten werden opgeofferd op het einde van het experiment en geperfuseerd met 4% paraformaldehyde. Histologische coupes, gekleurd met cresyl violet werden gebruikt om de diepte van de elektrodes te bepalen. Er werd geen correlatie gevonden

tussen de aanvalsdrempel en de diepte van de elektrodes. Het is wel mogelijk dat zeer oppervlakkig gepositioneerde elektrodes een hogere drempelwaarde veroorzaken, maar daar bestaat nog niet voldoende evidentie voor [30]. Gezien de diepte van de elektrodes geen invloed heeft op de resultaten, werd in dit experiment geopteerd om de ratten niet te perfuseren.

5. Algemeen besluit

In deze masterproef werd vastgesteld dat NVS met een amplitude van 0.25 mA en 0.50 mA de drempel voor het uitlokken voor een lokale aanval significant meer verhoogt dan NVS met een amplitude van 0.00 mA in het corticale stimulatiemodel. Deze bevindingen kunnen bijdragen tot het onderzoeken van het werkingsmechanisme van NVS in dit model, nl. het effect van NVS op de corticale exciteerbaarheid. Omgekeerd kan het bevestigen van de invloed van NVS op de corticale exciteerbaarheid ook helpen bij de identificatie van optimale behandelingsprotocols, het zoeken naar gepaste co-medicatie voor NVS en het identificeren van responders voor de therapie.

Deze resultaten ondersteunen de theorie dat NVS zijn effect uitoefent via het vrijstellen van noradrenaline uit de locus coeruleus, gezien de range van 0.25-0.50 mA voldoende is om deze kern in de hersenstam te activeren. De bevinding dat vele responders een significante aanvalsreductie hebben bij NVS met een lage stroom (0,25 mA en 0,50 mA in dit experiment) is bovendien consistent met de kennis over de anatomie van de nervus vagus. De A- en B-vezels van deze zenuw die een belangrijke rol spelen in het werkingsmechanisme van NVS, worden immers al geactiveerd bij deze lage stromen en kunnen bovendien de exciteerbaarheid van de hersenen verlagen door trage vagale hyperpolarisatie uit te lokken.

6. Referenties

- [1] Vonck K (2003). Neurostimulation for refractory epilepsy, clinical efficacy and mechanism of action 7-13.
- [2] Boon P (2009). Hoofdstuk 17: Epilepsie. Klinische neurologie (Ugent) 111-117.
- [3] Van Dycke A (2010). Local delivery strategies with adenosine in an animal model for refractory epilepsy 13-30.
- [4] De Herdt V (2009). Vagus nerve stimulation for refractory epilepsy: efficacy and mechanism of action in animal models and in patients. 13-59.
- [5] Lefebvre R.A. (2009). Anti-epileptica. Farmacologie (Ugent) 50-57.
- [6] Vonck K (2009). Neurobiologie (Ugent).
- [7] Boon P, Raedt R, De Herdt V, Wyckhuys T, Vonck K (2009). Electrical stimulation for the treatment of epilepsy. Neurotherapeutics: the journal of the american society for experimental neurotherapeutics 6: 218-227.
- [8] Vonck K, Boon P, Van Roost D (2007). Anatomical en physiological basis and mechanism of action of neurostimulation for epilepsy. Acta neurochirurgica supplementum 97: 321-328.
- [9] Zabara J (1992). Inhibition of Experimental Seizures in Canines by Repetitive Vagal Stimulation. Epilepsia 33 : 1005–1012.
- [10] Lockard JS, Congdon WC, DuCharme LL (1990). Feasibility and Safety of Vagal Stimulation In Monkey Model. Epilpsia 31: 20-26.
- [11] Binnie DC (2000). Vagus nerve stimulation for epilepsy: a review. Seizure 9: 161-169.
- [12] http://www.mst.nl/neurochirurgie/md_werkgroepen/epilepsie/
- [13] Krahl SE, Shayami, Senanayake SS, Handforth A (2003). Right-sided vagus nerve stimulation reduces generalized seizure severity in rats as effectively as left-sided. Elsevier 56: 1-4.
- [14] Krahl SE, Senanayake SS, Handforth A (2001). Destruction of peripheral C-fibers does not alter subsequent vagus nerve stimulation-induced seizure suppression in rats. Epilepsia 42: 586-589.
- [15] Scherrmann J, Hoppe C, Kral T, Schramm J, Elger CE (2001). Vagus nerve stimulation, clinical experience in a large patient series. Journal of clinical neurophysiology 18: 408- 414.
- [16] Janszky J, Hoppe M, Behne F, Tuxhorn I, Pannek HW, Ebner A (2005). Vagus nerve stimulation: predictors of seizure freedom. Journal of neurology, neurosurgery and psychiatry 76: 384-389.

- [17] Zagon A, Kemeny AA (2000). Slow hyperpolarisation in cortical neurons: A possible mechanism behind vagus nerve stimulation therapy for refractory epilepsy? *Epilepsia* 41: 1982-1389.
- [18] Dorr AE, Debonnel G (2006). Effect of vagus nerve stimulation on serotonergic and nordrenergic transmission. *The journal of pharmacology and experimental themapeutics* 318: 890-898.
- [19] Groves DA, Bowman M, Brown VJ (2005). Recordings from the rat locus coeruleus during acute vagal nerve stimulation in the anaesthetised rat. *Neuroscience letters* 379: 174-179.
- [20] Roosevelt RW, Smith DC, Clough RW, Jensen RA, Browning RA (2006). Increased extracellular concentrations of norepinephrine in cortex and hippocampus following vagus nerve stimulation in the rat. *Brain* 1119(1): 124-132.
- [21] Theodore WH, Fisher RS (2004). Brain stimulation for epilepsy. *The Lancet* 3: 111-118.
- [22] Vonck K (2003). Thalamic and limbic involvement in the mechanism of action of vagus nerve stimulation, a SPECT study. *Neurostimulation for refractory epilepsy, clinical efficacy and mechanism of action* 149-174.
- [23] Labiner DM, Ahern GL (2007). Vagus nerve stimulation therapy in depression and epilepsy: therapeutic parameter settings. *Acta Neurologica Scandinavia*: 115: 23–33.
- [24] Voskuyl RA, Dingemans J, Danhof M (1989). Determination of the threshold for convulsions by direct cortical stimulation. *Epilepsy research* 3: 120-129.
- [25] De Herdt V, De Waele J, Raedt R, Wyckhuys T, El Tahry R, Vonck K, Wadman W, Boon P (2007). Modulation of seizure threshold by vagus nerve stimulation in an animal model for motor seizures. *Acta neurologica scandinavica* [Epub ahead of print].
- [26] Bunch S, DeGiorgio CM, Krahl S, Britton J, Green P, Lancman M, Murphy J, Olejniczak P, Shih J, Heck CN (2007). Vagus nerve stimulation for epilepsy: is output current correlated with acute response? *Acta neurologica scandinavica* 116: 217-220.
- [27] El Rahry R, Raedt R, De Herdt V, Van Dycke A, Wyckhuys T, Hemelsoet D, Meurs A, Delbeke J, Vonck K, Wadman W, Boon P (2010). Implantation of self sizing cuff electrode around the vagus nerve in experimental rats for repeated assessment of compound action potentials in rodents. In preparation.
- [28] De Baere D (2010). *Neurophysiological monitoring unit* 43-44.
- [29] Buffel I (2010). Karakterisatie van het corticale stimulatiemodel. *Praktisch gedeelte* 25-33.
- [30] Voskuyl R.A., Hoogerkamp A., Danhof M. (1992). Properties of the convulsive threshold determined by direct cortical stimulation in rats. *Epilepsy Research* 12: 111-120.

[31] Aalbers M.W, Rijkers K., Van Winden L. A. A. P., Hoogland G., Vles J. S. H., Majoie H. J. M.(2009). Horner's syndrome: a complication of experimental carotid artery surgery in rats. *Autonomic neuroscience, basic and clinical*. 147: 64-69.

[32] Teskey GC, Monfils MH, Vandenberg PM, Kleim JA (2002). Motor map expansion following repeated cortical and limbic seizures is related to synaptic potentiation. *Cerebral cortex* 12: 98-105.

Bijlagen

Deze bijlagen bevatten:

1. Bijlage 1: Lijst van gebruikte afkortingen
2. Bijlage 2: Lijst van figuren
3. Bijlage 3: Lijst van tabellen
4. Bijlage 3: Statistische output

Bijlage 1: Lijst van gebruikte afkortingen

AD: afterdischarge

bvb: bijvoorbeeld

CVA: cerebrovasculair accident

CSM: corticaal stimulatiemodel

DHS: diepe hersenstimulatie

DTSH: delta threshold

EEG: electroencefalografie

fMRI: functional magnetic resonance imaging

GABA: gamma-aminoboterzuur

Hz: Hertz

kg: kilogram

kOhm: kilo Ohm

LC: locus coeruleus

LKEN: laboratorium voor klinische en experimentele neurofysiologie

mA: milliampere

NA: noradrenaline

NVS: nervus vagus stimulatie

NTS: nucleus tractus solitarius

n.: nervus

PET: positron emissie tomografie

PTZ: pentylenetetrazol

SPECT: single photon emissie tomografie

Bijlage 2: Lijst van figuren

Figuur 1: Overzicht van de voornaamste afferente en efferente vezels.

Figuur 2: Positie van de geïmplanteerde nervus vagus stimulator.

Figuur 3: Bifasische, ladingsgebalanceerde pulsen voor de stimulatie van de sensorimotorische cortex.

Figuur 4: Stabilisatie van de drempelwaarde via 20 corticale stimulatiesessies.

Figuur 5: Rat met voorversterker.

Figuur 6: Onderdelen van een nervus vagus cuff-elektrode.

Figuur 7: (a) Voorversterker, (b) scalpelektrode, (c) nervus vagus cuff-elektrode.

Figuur 8: (a) Operatiemateriaal; (b) verdoven van de rat; (c) pijnprikkel.

Figuur 9: Operatie. (a) implantatie cuff-elektrode; (b) visuele controle; (c) tunnelen; (d) stereotactisch kader; (e) bregma; (f) gaten in de schedel; (g) epidurale elektrodes; (h) zijaanzicht hoedje; (i) bovenaanzicht hoedje.

Figuur 10: Multifunctionele opstelling.

Figuur 11: Bepalen van de impedantie.

Figuur 12: Sample periode: elke stip vertegenwoordigt een 1 uur durende sessie. Tijdens de baselinesessies werden de dieren niet gestimuleerd, tijdens de stimulatiesessies kregen de dieren NVS met een intensiteit van 0.00 mA, 0.25 mA, 0.50 mA of 1.00 mA. Na iedere sessie werd de aanvalsdrempel drie maal bepaald.

Figuur 13: Gemiddelde waarde van de aanvalsdrempel per stimulatiesessie met aanduiding van de standaard error of the mean (n=12).

Figuur 14: Gemiddelde waarde van de aanvalsdrempel per stimulatiesessie met aanduiding van de standaard error of the mean (n=20).

Figuur 15: Gemiddelde stijging van de aanvalsdrempel (DTSH in μA) per stimulatie-intensiteit met aanduiding van de standaard fout. De groene ster duidt een statistisch significant verschil in DTSH waarde aan (n=15).

Figuur 16 : Grootste individuele DTSH.

Figuur 17 : Percentage neveneffecten bij de verschillende intensiteiten.

Figuur 18: Horner syndroom, ptose en enoftalmie van het linker oog.

Figuur 19 : Correlatie tussen de klinisch bepaalde drempel en de drempel bepaald uit het EEG.

Bijlage 3: Lijst van tabellen

Tabel 1: De gemiddelden van alle eerste (B1), tweede (B2) en derde (B3) baseline stimulaties werden paarsgewijs vergeleken met een student's t-test. Uit de p-waarde blijkt dat de aanvalsdrempels niet significant verschillen van elkaar.

Tabel 2: procentuele stijging van de drempel na 2 uur NVS en na X uur NVS tijdens 24-uurs NVS

Bijlage 4: Statistische output

Type III Tests of Fixed Effects

Source	Numerator df	Denominator df	F	Sig.
Intercept	1	228	35,150	,000
Intensity	3	228	4,155	,007
Day	3	228,000	,162	,922

a. Dependent Variable: DTHS.

Estimates^a

Intensity	Mean	Std. Error	df	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
0,00	2,813	12,570	228	-21,956	27,581
0,25	63,882	12,663	228	38,930	88,834
0,50	44,885	12,662	228	19,936	69,834
1,00	34,115	12,293	228	9,892	58,338

a. Dependent Variable: DTHS.

Pairwise Comparisons

(I) Intensity	(J) Intensity	Mean Difference (I-J)	Std. Error	df	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	
						Lower Bound	Upper Bound
0,00	0,25	-61,069*	17,768	228	,001	-96,079	-26,059
	0,50	-42,072*	18,083	228	,021	-77,703	-6,442
	1,00	-31,302	17,725	228	,079	-66,228	3,623
0,25	0,00	61,069*	17,768	228	,001	26,059	96,079
	0,50	18,997	18,274	228,000	,300	-17,010	55,004
	1,00	29,767	17,732	228,000	,095	-5,172	64,706
0,50	0,00	42,072*	18,083	228	,021	6,442	77,703
	0,25	-18,997	18,274	228,000	,300	-55,004	17,010
	1,00	10,770	17,611	228	,541	-23,931	45,471
1,00	0,00	31,302	17,725	228	,079	-3,623	66,228
	0,25	-29,767	17,732	228,000	,095	-64,706	5,172
	0,50	-10,770	17,611	228	,541	-45,471	23,931

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

b. Dependent Variable: DTHS

