



Diepe hersenstimulatie als behandeling voor epilepsie: multifocale versus unifocale stimulatie

Patricia CLEMENT

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

Promotor: **Prof. Dr. Paul Boon**

Copromotor: **Prof. Dr. Robrecht Raedt**

Begeleider: **Bregt Van Nieuwenhuysse**

Vakgroep: **Inwendige ziekten**

Academiejaar 2011-2012



Diepe hersenstimulatie als behandeling voor epilepsie: multifocale versus unifocale stimulatie

Patricia CLEMENT

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

Promotor: **Prof. Dr. Paul Boon**

Copromotor: **Prof. Dr. Robrecht Raedt**

Begeleider: **Bregt Van Nieuwenhuysse**

Vakgroep: **Inwendige ziekten**

Academiejaar 2011-2012

“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 14 mei 2012

Patricia Clement

Prof Dr. Paul Boon

Prof. Dr. Robrecht Raedt

Voorwoord

In dit voorwoord wil ik graag aantal mensen bedanken. Als eerste Prof. Dr. Paul Boon, de bezieler van het LKEN die ons allen de kans gaf om rond deze interessante onderwerpen te werken. Ook Prof. Dr. Kristl Vonck en Prof. Dr. Robrecht Raedt wil ik graag bedanken voor de opvolging doorheen de twee jaar en het enthousiasme tijdens de tussentijdse vergadering.

Daarnaast wil ik de doctoraatstudenten in het LKEN bedanken. Jullie stonden altijd klaar om te helpen indien het nodig was. De babbeltjes tussendoor, het samen lunchen, smullen van die heerlijke verjaardagstaarten... Dit alles maakt het LKEN tot een enorm aangename plaats om te werken. Dank jullie daarvoor! Ook mijn medestudenten Valerie, Elsemiek, Lien, Lindsay, Laurence, Tineke en Annelien hebben hiertoe bijgedragen. Valérie, een betere en lievere labopartner kon ik me niet wensen! Ook Eliene wil ik bedanken voor de vriendschap, de hulp bij mijn opmaak en de brainstormmomenten die me telkens tot nieuwe ideeën konden brengen. En ik mag haar begeleidster, Femke, daarbij niet vergeten, voor die enkele dagen ervaring in hun labo.

Wie ik zeker in het bijzonder wil bedanken is Bregt. Niet alleen was hij een uitstekende begeleider die altijd klaarstond, maar hij maakte ons rattenkotje ook een plaats waar we konden bijpraten, lachen, uitrazen en raad vragen. Bregt, je was er altijd om onze vragen te beantwoorden, ons te helpen met het EEG, statistische uitleg te verlenen en zoveel meer.

Tot slot bedank mijn ouders die mij in alles steunen wat ik doe en er altijd voor me zijn en mijn vriend Tim om zijn onvoorwaardelijke steun en geduld. Ook zijn familie bedankt voor de interesse in wat ik doe en de steun die ik van hen krijg. Mijn kameraden van Laetitia, onze vrienden van Kortrijk en Ilse wil ik ook graag bedanken voor de nodige ontspanning tussendoor.

Inhoudstafel

Samenvatting	1
1. Inleiding	2
1.1. <i>Epilepsie</i>	2
1.2. <i>Classificatie en etiologie</i>	2
1.2.1. Aanvalsclassificatie	2
1.2.2. Etiologie	3
1.3. <i>Mediale temporale kwab epilepsie</i>	4
1.4. <i>Behandelingen</i>	5
1.4.1. Anti-epileptica	6
1.4.2. Refractaire epilepsie: behandelingen	6
Neurochirurgie	7
Ketogeen dieet	7
Neurostimulatie	7
Overige experimentele behandelingen	8
1.5. <i>Diepe hersenstimulatie</i>	8
1.5.1. Algemene werking DHS	8
1.5.2. Efficiëntie van hippocampale DHS	9
1.5.3. Werkingsmechanisme van diepe hersenstimulatie	10
1.5.4. Voor- en nadelen van DHS	11
1.5.5. Optimalisatie stimulatieprotocol	11
Stimulatieparameters	11
Stimulatielocatie	12
1.6. <i>Proefdieronderzoek</i>	14
1.6.1. Proefdiermodellen	14
1.6.2. Modellen voor MTLE	14
Het kindling model	14
Het kinaat-geïnduceerde post status epilepticus model	15
1.7. <i>Rationale van de masterproef</i>	16
2. Materialen en methoden	18
2.1. <i>Dieren</i>	18
2.2. <i>Materiaal</i>	18
2.2.1. Epidurale elektroden	18
2.2.2. Diepte-elektroden	18
2.3. <i>Experimenteel protocol</i>	19
2.4. <i>Inductie van de status epilepticus</i>	20
2.5. <i>Implantatie van de elektroden</i>	20
2.6. <i>Continue EEG monitoring</i>	23
2.6.1. Opstelling	23
2.6.2. Outcome parameters	23
2.7. <i>Diepe hersenstimulatie</i>	24
2.8. <i>Histologie</i>	27
2.9. <i>Statistische verwerking</i>	28
3. Resultaten	29

3.1.	<i>Stimulatie-intensiteit</i>	29
3.2.	<i>Inclusiecriteria</i>	29
3.2.1.	Ectopische elektrodepositie	30
3.3.	<i>Effect op aanvalsfrequentie</i>	30
3.4.	<i>Responders</i>	32
3.5.	<i>Multifocale versus unifocale stimulatie</i>	32
4.	Bespreking	34
4.1.	<i>Inclusiecriteria</i>	34
4.1.1.	Histologische weefselschade	34
4.1.2.	Elektrodepositie	35
4.2.	<i>Effect op aanvalsfrequentie en responders</i>	36
4.3.	<i>Multifocale versus unifocale stimulatie</i>	38
4.3.1.	Multifocale hippocampale stimulatie	38
4.3.2.	Extrahippocampale multifocale stimulatie	38
4.4.	<i>Mogelijke werkingsmechanismen</i>	39
4.4.1.	Stimulatievolume	39
4.4.2.	Omliggende netwerken	40
4.4.3.	Asynchroniteit van het netwerk	42
4.5.	<i>Toekomstperspectieven</i>	42
5.	Algemeen besluit	44
6.	Referenties	45

Samenvatting

Epilepsie is een chronisch neurologische aandoening waaraan wereldwijd meer dan 50 miljoen patiënten lijden. Eén van de moeilijkst te behandelen vormen hiervan is temporale kwab epilepsie, aangezien één op drie patiënten niet geholpen kan worden met de huidige beschikbare anti-epileptica. Diepe hersenstimulatie is een alternatieve experimentele behandeling voor deze patiënten. De interesse naar deze behandeling blijft stijgen, maar de ideale stimulatieparameters, ideale locaties en de werkingsmechanismen voor het gebruik bij epilepsie zijn nog niet gekend.

In deze masterproef wordt het effect van multifocale hippocampale stimulatie onderzocht in het kainaat-geïnduceerde post status epilepticus ratmodel, dat model staat voor patiënten met temporale kwab epilepsie. Vier ratten die zowel in de ventrale als dorsale hippocampus werden gestimuleerd, vertoonden een sterke, gemiddelde aanvalsreductie van 99,75% tijdens stimulatie. Alle ratten reageerden op deze behandeling, 75% werd aanvalsvrij tijdens stimulatie. Tijdens het vergelijken van deze resultaten met de resultaten van de unifocale dorsale of ventrale stimulatie, werd duidelijk dat multifocale stimulatie een sterker, extra effect vertoont, zelfs bij dieren die non-responder zijn op unifocale stimulatie. Deze behandeling kan dus een oplossing bieden voor non-responders en het effect van diepe hersenstimulatie bij responders verhogen.

1. Inleiding

1.1. *Epilepsie*

Epilepsie is, na cerebrovasculaire accident, de tweede meest voorkomende neurologische aandoening, met een prevalentie van ongeveer 0.8% (meer dan 50 miljoen patiënten wereldwijd) en pieken in incidentie tijdens de kindertijd en na de leeftijd van 50 jaar. [1, 2] Deze aandoening wordt gekarakteriseerd door terugkerende, spontaan optredende epileptische aanvallen. Pas na het optreden van minstens twee aanvallen, kan de diagnose van epilepsie worden gesteld. [2, 3] Dergelijke aanvallen worden veroorzaakt door abnormale excessieve of synchrone neuronale activiteit in de hersenen, waardoor een stoornis in het gedrag en/of bewustzijn optreedt. Deze hyperexciteerbaarheid is het gevolg van een verstoring in het evenwicht tussen excitatie (glutamaterg) en inhibitie (GABAerg) in de hersenen. [4, 5]

1.2. *Classificatie en etiologie*

1.2.1. **Aanvalsclassificatie**

Epileptische aanvallen kunnen worden geclassificeerd aan de hand van klinische eigenschappen en elektroencefalografische (EEG) karakteristieken volgens de indeling van de International League Against Epilepsy (ILAE). Zo kan men onderscheid maken tussen partiële en veralgemeende aanvallen, afhankelijk van de lokalisatie van de oorsprong van de aanval en de spreiding. Deze indeling speelt een belangrijke rol in diagnose en behandeling. [3, 4]

Partiële of focale aanvallen enerzijds vinden hun oorsprong in een bepaalde, welomlijnde zone in de hersenen. Deze aanvallen kunnen wel secundair generaliseren doordat de abnormale elektrische activiteit zich over het gehele cerebrum verspreidt. [2, 3] De symptomen bij partiële aanvallen zijn afhankelijk van de geactiveerde zone. Het ILAE splitst deze aanvallen verder op in enkelvoudig partiële aanvallen (met het behoud van het bewustzijn) en complex partiële aanvallen (met bewustzijnsindaling). Deze opdeling is nu echter verworpen, maar het herkennen van een verandering in het bewustzijn is nog steeds belangrijk bij de evaluatie, diagnose en de behandelingskeuze van patiënten. [4]

Aanvallen die de volledige cerebrale cortex innemen, worden daarentegen geclassificeerd als gegeneraliseerde aanvallen. Hieronder vallen absence, myoclonie aanvallen, atone aanvallen en tonisch-clonische aanvallen. [3] Absence aanvallen worden gekarakteriseerd door typische, korte perioden van bewustzijnsverlies en staren, voornamelijk bij kinderen. Myoclonie aanvallen zijn enkelvoudige of onregelmatig terugkerende trekkingen van spieren of spiergroepen, zonder verlies van bewustzijn. Het plotse verlies van de spiertonus, waardoor de patiënt plots kan vallen, worden atone aanvallen genoemd. Een tonisch-clonische aanval uit zich in bewustzijnsverlies en bestaat uit een tonische fase waarbij alle spieren van het lichaam zich opspannen, gevolgd door een fase van clonische, schokkende bewegingen. Hierna volgt een postictale fase, waarbij de patiënt volledig hypotoon is. [2, 4] Indien de aanvallen zich kort na elkaar herhalen zonder dat het bewustzijn tussen de aanvallen terug keert, spreekt men over een status epilepticus. [3]

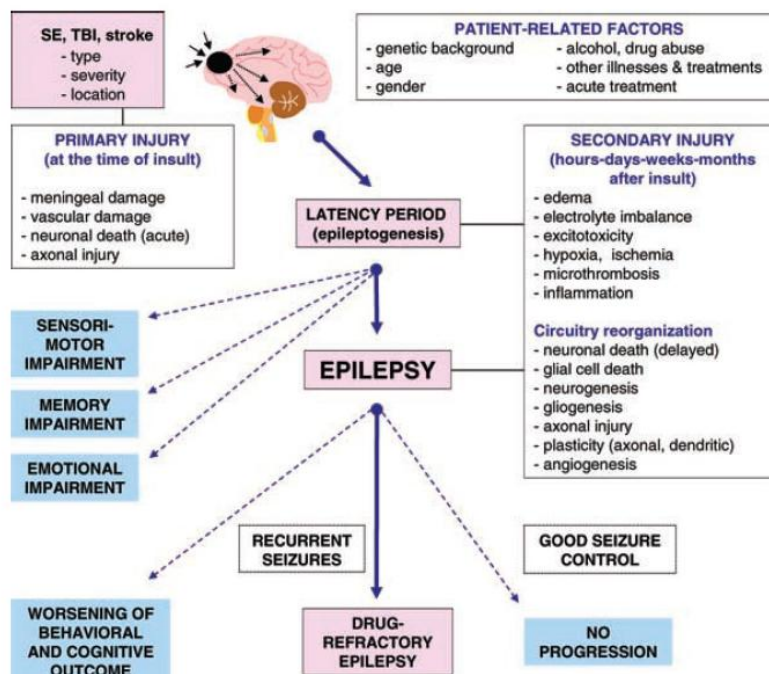
1.2.2. Etiologie

Epilepsie werd daarnaast ook onderverdeeld in drie grote categorieën op basis van de etiologie: idiopatische, symptomatische en cryptogene epilepsie. [1, 4] Deze classificatie werd echter recent herzien door het ILAE, gebaseerd op nieuw verworven informatie. De huidige classificatie omvat genetische, structureel/metabole en ongekende oorzaken. Epilepsie veroorzaakt door een gekend of verondersteld genetisch defect is een genetische vorm van epilepsie. De kennis van deze genetische defecten kan een basis vormen voor diagnostische testen. Natuurlijk mag de mogelijkheid dat omgevingsfactoren ook een bijdrage leveren aan de expressie van de aandoening niet uitgesloten worden. Aan de basis van structurele/metabole epilepsie ligt een duidelijke structurele of metabole aandoening. Structurele laesies omvatten onder andere trauma, cerebrovasculair accident en infectie. Ook structurele problemen waarbij genetica aan de basis ligt, zoals ontwikkelingsstoornissen kunnen hieronder vallen. De laatste categorie is epilepsie met ongekende oorzaak, waarmee bedoeld wordt dat het onderliggende mechanisme nog niet gekend is. Zowel een fundamenteel genetisch defect of een ongekende aandoening kan aan de oorzaak liggen van deze epilepsie. [4] Door deze grote variëteit aan oorzaken, is de groep epilepsiepatiënten enorm heterogeen. [1]

1.3. Mediale temporale kwab epilepsie

De meest voorkomende vorm van epilepsie bij volwassenen is mediale temporale kwab epilepsie (MTLE), waarbij de focus zich bevindt ter hoogte van de temporale kwab, waarin onder andere de hippocampus gelegen is. [5, 6] Klinisch gaan deze aanvallen vaak gepaard met aura's, bewustzijnsveranderingen, amnesie, afasie, automatismen en motorische symptomen. Indien deze vorm van epilepsie niet goed onder controle kan worden gehouden, is er een progressieve achteruitgang van cognitieve functies en geheugen op te merken. [1, 7]

MTLE wordt vaak veroorzaakt door een insult zoals een trauma, status epilepticus, koortsstuipen en encefalitis, waarna een latente periode volgt die jaren kan duren. Deze periode is aanvalsvrij en wordt gekenmerkt door het proces van epileptogenese. Dit proces blijft doorgaan, ook na het ontstaan van de eerste epileptische aanvallen. Tijdens de epileptogenese vinden naast veranderingen in ionkanalen en neurotransmitter receptoren, ook een groot aantal cellulaire veranderingen plaats, getriggerd door het initiële insult: celdood, gliose, neurogenese, axonale en dendritische plasticiteit, herschikkingen van de extracellulaire matrix en angiogenese. Patiëntgerelateerde factoren zoals genetische achtergrond, leeftijd en alcoholgebruik spelen een rol in dit proces. [1, 8] (figuur 1)



Figuur 1: Overzicht van het verloop van het epileptogeen proces met factoren die hierop een invloed spelen. Na het initiële insult zoals een cerebrovasculair accident of een status epilepticus, volgt een latente periode waarin de epileptogenese plaats vindt. Dit proces leidt tot het ontstaan van epileptische aanvallen. Het verloop van dit proces is afhankelijk van patiënt-gerelateerde factoren zoals genetica en leeftijd.[1]

De epileptogenese vindt bij MTLE plaats ter hoogte van de mesiale temporale kwab waarin onder andere de hippocampus, amygdala en parahippocampale gyrus gelokaliseerd zijn. Een frequent voorkomende histopathologische bevinding bij deze patiënten is hippocampale sclerose, dat wordt gekarakteriseerd door weefselinkrimping en celverlies in het hippocampaal circuit, met als reactie hierop gliose en mossy fiber sprouting in de binnenste moleculaire laag van de gyrus dentatus. [6, 8] Een mogelijke verklaring voor het ontstaan van epileptische aanvallen in MTLE is een hyperexciteerbaarheid van de gyrus dentatus granulaire cellen die het gevolg zou zijn van veranderingen in het hippocampale neuronale circuit door het verlies van inhibitorische interneuronen en het ontstaan van nieuwe excitatorische verbindingen door mossy fiber sprouting. [6]

1.4. *Behandelingen*

Voor de behandeling van epilepsiepatiënten, zijn er vandaag de dag een groot aantal mogelijke behandelingen voorhanden. Deze behandelingen richten zich exclusief op de preventie en onderdrukking van de aanvallen. Het identificeren van patiënten at risk en de preventie van het ontwikkelen van epilepsie (onder andere het tegenhouden of beïnvloeden van de epileptogenese) behoren tot de nieuwe uitdagingen. Toch mag het belang van verder onderzoek naar de optimalisatie van de huidige symptomatische behandelingen niet onderschat worden. [1] Niet alleen is een goede therapie belangrijk, maar ook een aanpassing in de levensstijl van de patiënt is nodig: absoluut alcoholverbod, regelmatig leven met voldoende slaap en een minimum aan fysieke en psychische stress. Ook moeten patiënten plaatsen en activiteiten vermijden die gevaarlijk kunnen zijn zoals autorijden, alleen gaan zwemmen en beklimmen van ladders. [3]

1.4.1. Anti-epileptica

Bij de klassieke behandeling met anti-epileptische drugs (AED's) wordt getracht op ionkanalen in te werken. [8] Epileptische aanvallen worden namelijk veroorzaakt door een verstoring in de balans tussen exciterende en inhiberende neurotransmitters, voornamelijk glutamaat en γ -aminoboterzuur (GABA). [5] Hierin spelen ionkanalen een belangrijke rol. Natriumkanalen bijvoorbeeld zijn essentieel voor de propagatie van actiepotentialen. Verhoogde intracellulaire calciumconcentraties zorgen niet enkel voor een hyperexcitatie van het neuron, maar spelen ook een belangrijke rol in neurotoxiciteit. Chloorkanalen zijn belangrijke regulatoren voor de vrijstelling van GABA. Kaliumkanalen tot slot regelen de vuurfrequentie van actiepotentialen. Afhankelijk van de aard van de aanvallen en de eventuele bijwerkingen zal een bepaald anti-epilepticum gekozen worden. Er kan geopteerd worden voor een monotherapie (slechts 1 anti-epilepticum) of een polytherapie. [1, 7]

Farmacologische behandeling van epilepsie berust tot nu toe voornamelijk op het inwerken van de ionkanalen om het effect van GABA te versterken en de vrijstelling van glutamaat tegen te houden. Anti-epileptica zoals fenobarbital, fenytoïne, carbamazepine, valproaat en andere benzodiazepines maken hier gebruik van, maar vaak treden er bijwerkingen op zoals slaperigheid, huidafwijkingen, cognitieve en stemmingstoornissen. Hoewel er de laatste decennia een enorme vooruitgang is geboekt naar het intomen van deze bijwerkingen, is er slechts een minimale verbetering op vlak van aanvalsonderdrukking. [7] Toch zal meer dan de helft van de nieuwe patiënten met behulp van AED's de aanvallen volledig kunnen onderdrukken zonder grote neveneffecten. [6] In de toekomst is het wel nodig om, bij de ontwikkeling van nieuwe anti-epileptica, zich ook te richten op de nieuwe inzichten in processen zoals gliose, inflammatie en neurodegeneratie en het epileptogeen proces aan te pakken. [7]

1.4.2. Refractaire epilepsie: behandelingen

Ondanks het ruime aanbod aan anti-epileptica, is het bij 30% van de patiënten onmogelijk om met farmacologische therapie de aanvallen onder controle te houden. Dit wordt refractaire epilepsie genoemd en gedefinieerd als het falen van twee of drie geneesmiddelen in het voorkomen van een aantal aanvallen over een bepaalde tijd. Voor deze patiënten bestaan een aantal alternatieven waarvan de meeste therapieën nog steeds experimenteel zijn, vaak in combinatie met AED's. [9]

Neurochirurgie

Neurochirurgie is een eerste alternatief voor refractaire patiënten en wordt toegepast bij partiële vormen van epilepsie waarbij de epileptogene focus (de oorsprong van de epileptische aanval) gekend is. Het doel van neurochirurgie is om deze focus volledig te verwijderen zonder permanente neurologische schade te veroorzaken. Vooraf ondergaat de patiënt een prechirurgische evaluatie op basis van een hele reeks niet-invasieve en invasieve testen zoals video EEG monitoring en MRI scans, om na te gaan of de patiënt geschikt is voor chirurgie. Bij gevaar voor complicaties wordt eerder geopteerd voor radiochirurgie met ‘gamma knife’. Bij deze radiochirurgische techniek wordt een kleine epileptogene zone met behulp van hoogenergetische gamma-stralen verwijderd. [9]

Ketogeen dieet

Refractaire epilepsie kan ook behandeld worden met behulp van het ketogeen dieet, wat een hoge vetinname, lage koolhydraten- en lage proteïne-inname inhoudt. [9] Dit resulteert in ketose en zorgt voor een aanvalsreductie van meer dan 50% bij 40% van de patiënten met syndromen met gegeneraliseerde aanvallen zoals het Doose syndroom, Rett syndroom, tuberose-sclerose syndroom en infantiele spasmen. [9, 10] Hoewel dit dieet voornamelijk bij kinderen met refractaire epilepsie wordt toegepast, wordt er meer en meer onderzoek gedaan naar het effect van dit dieet bij volwassenen. [10] Het ketogeen dieet is enorm onsmakelijk, als een smakelijker alternatief geldt het Atkinson-dieet: ook hier wordt ketose geïnduceerd maar zijn er geen beperkingen op calorieën, vloeistoffen en proteïnen. [9, 10]

Neurostimulatie

Er zijn twee types neurostimulatie: de elektrische en de magnetische stimulatie. Onder de elektrische stimulatie valt enerzijds de nervus vagus stimulatie (NVS), waarbij een geïmplanteerde pulsgenerator elektrische pulsen stuurt naar een elektrode die helicaal gewonden ligt rondom de nervus vagus, die langs de hals loopt. Deze zenuw heeft diffuse en wijdverspreide projecties in de hersenen naar onder andere de thalamus, amygdala en corticale regio's en kan zo het ontstaan en de spreiding van aanvallen beïnvloeden. Diepe hersenstimulatie (DHS) maakt gebruik van een stereotactisch geïmplanteerde elektrode in bepaalde nucleï in de hersenen. Met behulp van een pulsgenerator worden elektrische pulsen naar de hersenen gestuurd en het optreden van epileptische aanvallen wordt onderdrukt. [11] Een therapie die gebruik maakt van magnetische stimulatie is de niet-invasieve repetitieve transcraniale magnetische stimulatie (rTMS). Stimulatie ter hoogte van de correcte coördinaten

zorgt voor zwakke elektrische stromen met een verlagend effect op de exciteerbaarheid van de cortex. Hierdoor kan rTMS enkel gebruikt worden voor epilepsievormen met een corticale oorsprong zoals epilepsie gecorreleerd aan focale corticale dysplasie en corticale myoclonus. [11, 12]

Overige experimentele behandelingen

Daarnaast wordt er verder gezocht naar nieuwe behandelingen. Met behulp van celtransplantatie bijvoorbeeld zou men, na het inbrengen van foetale cellen in de hippocampus, de lokale inhibitorische functie kunnen versterken. Celtherapie zou kunnen aangewend worden bij idiopatische epilepsievormen waarbij een monogene mutatie de oorzaak is. [9] Daarnaast is het interessant om nieuwe mechanismen te creëren om de lokale concentratie van anti-epileptica ter hoogte van de epileptogene focus te verhogen. Met behulp van rechtstreekse toediening van een drug in de hersenen of in het ventriculaire systeem kan men onder andere de bloedhersenbarrière en andere mechanismen die zorgen voor drugsresistentie omzeilen. [7, 12] Ook inzichten over de rol van inflammatoire factoren bij epilepsie en epileptogenese kunnen nieuwe targets opleveren. [7]

1.5. Diepe hersenstimulatie

1.5.1. Algemene werking DHS

Een veelbelovende neurostimulatietechniek, voor de behandeling van refractaire epilepsiepatiënten is diepe hersenstimulatie. Hierbij wordt gebruik gemaakt van een elektrode die op stereotactische wijze geplaatst wordt ter hoogte van een bepaalde structuur in de hersenen en een pulsgenerator. Deze pulsgenerator bevindt zich subcutaan en stuurt elektrische stroom met bepaalde ingestelde parameters via de elektrode naar de epileptogene focus of naar structuren die betrokken zijn bij propagatie of generalisatie van de aanvallen of die de exciteerbaarheid van netwerken controleren, waardoor de epileptische aanvallen kunnen worden tegengehouden. [13]

In het geval van epilepsie kan DHS toegepast worden bij patiënten die voldoen aan bepaalde criteria. Het gaat om patiënten met epileptische aanvallen met een partiële onset, met of zonder secundaire generalisatie. Deze patiënten hebben frequent aanvallen, zijn refractair voor minstens één jaar en mogen niet aan systemische ziekten, neurologische aandoeningen, ventriculomegalie of coagulopathie (aandoening van de stollingsfactoren) lijden. [13]

Om een structuur in de hersenen te kiezen die men wil stimuleren, kan men drie strategieën volgen. De elektrode kan worden geplaatst in de epileptogene focus (waar de aanval zijn oorsprong kent), in een nucleus die betrokken is bij propagatie en/of generalisatie of een structuur die de activiteit van het epileptogene netwerk moduleert. Structuren die betrokken zijn bij de generalisatie en modulatie van het netwerk zijn onder andere de locus coeruleus, de thalamische nuclei, de basale ganglia, het cerebellum, de nucleus tractus solitarius en de piriforme cortex van de amygdala. In deze zones worden epileptische aanvallen onderbroken door DHS en wordt generalisatie tegengegaan. Bij MTLE is de aanvalsoorsprong ter hoogte van de hippocampale zone, waardoor DHS hier zorgt voor het tegenhouden van het ontstaan van een aanval en dus een verlaagde kans op het voorkomen van epileptische aanvallen. [14]

1.5.2. Efficiëntie van hippocampale DHS

Hippocampale diepe hersenstimulatie bij epilepsie krijgt steeds meer aandacht door het succes in klinische en dierexperimentele studies. In proefdieren werd reeds meermaals de doeltreffendheid van hippocampale DHS aangetoond. [15] Goodman et al. toonde bijvoorbeeld aan dat de epileptische aanvallen bij amygdala gekindelde ratten minder zwaar werden na stimulatie. [16] Ook Wyckhuys et al. kon bij gekindelde ratten aantonen dat de exciteerbaarheid van het epileptiform netwerk verlaagd werd door stimulatie in de hippocampus en stelde bij kainaat-geïnduceerde ratten een reductie in aanvalsfrequentie van meer dan 50% vast bij meer dan 50% van de dieren. [15, 17] Ook in klinische studies bleek DHS een goed alternatief. Velasco et al. zag een daling van interictale en ictale epileptiforme activiteit tijdens de stimulatie, een effect dat hij enkele jaren later kon bevestigen. [14] Boon et al. registreerde meer dan 50% reductie in de aanvalsfrequentie en een significante daling in de ernst van de aanvallen. Bij 20% van de patiënten steeg deze daling naar meer dan 90%. [18]

Het is belangrijk op te merken dat niet alle dieren en patiënten effect hebben van de DHS. Dergelijke onderverdeling in 'responders' en 'non-responders' zijn vaak geassocieerd met anti-epileptische behandelingen. [15] Dit fenomeen werd onder andere opgemerkt in de studie van Boon et al., waarbij ongeveer 70% van de patiënten een aanvalsreductie vertoonden van meer dan 50% en dus responders waren. [18]

1.5.3. Werkingsmechanisme van diepe hersenstimulatie

Hoe DHS precies werkt en welke mechanismen hier aan de basis liggen, is nog niet gekend en moeilijk te onderzoeken bij mensen. Toch bestaan er een aantal hypothesen die een mogelijke verklaring kunnen geven. Een hypothese die de efficiëntie van hippocampale DHS verklaart, is het optreden van homeostatische compensatie. [17] Dit fenomeen treedt normaal op als reactie op langetermijns potentiatie (LTP), namelijk het verhogen van de synaptische sterkte, en langetermijns depressie (LTD), het verzwakken van de synaptische sterkte. LTP en LTD komen voor als gevolg van respectievelijk simultane en aparte activatie van de neuronen onderling. [19] Dergelijke homeostatische compensatie kan plaats vinden op vlak van synaptische exciteerbaarheid of op het niveau van de intrinsieke exciteerbaarheid en heeft als doel de vuursnelheid van de neuronen binnen het functionele bereik te houden. LTP leidt dus tot een neerregulatie van de exciteerbaarheid en bij LTD ziet men een opregulatie. [17]

Dit mechanisme zou ook een rol spelen in het ontstaan van epilepsie. De degeneratie van hippocampale neuronen en het verlies van synaptische input wordt gecompenseerd door een shift naar een hogere exciteerbaarheid. DHS zou de verhoogde exciteerbaarheid opnieuw aanpassen naar zijn originele staat. [19] Een permanente achtergrond van hoge synaptische activiteit, zoals bij hoog frequentie stimulatie, zorgt voor een neerregulatie van de neuronale exciteerbaarheid waardoor de neuronen een trigger voor epileptische aanvallen niet meer kan onderscheiden. Er is een stijging in de aanvalsdrempel en dus een lagere kans op het ontwikkelen van epileptische aanvallen, zonder de functionaliteit van de neuronen te beïnvloeden. [5, 17]

Naast deze hypothese, wordt er ook gesuggereerd dat DHS (semi-permanente) synaptische plasticiteit (LTD) zou induceren. Dit werd echter recent tegengesproken door een studie van Wyckhuys et al. waar een hypoperfusie in de hippocampus geobserveerd wordt ten gevolge van DHS. Aangezien processen zoals LTD energie vragen lijkt de rol van LTD bij DHS minder waarschijnlijk. [20] Zo wordt de functionele organisatie van specifieke neuronale circuits beïnvloed. Een derde mogelijkheid is het creëren van een depolarisatieblok dat aanvallen onderdrukt vanaf het moment van initiatie of de synchronisatie onderbreekt. [17] En er is ook sprake van een aanpassing in de presynaptische vrijstelling van endocannabinoiden. [15] Alle mogelijke mechanismen sluiten elkaar niet noodzakelijk uit en kunnen eventueel op verschillende tijdschalen optreden. [17] Welke mechanismen precies plaatsvinden, kan afhangen van de aandoening, de gestimuleerde nucleï en voornamelijk van de gebruikte parameters. [19]

1.5.4. Voor- en nadelen van DHS

Hoewel neurochirurgie in het verleden meestal succesvol werd toegepast, biedt DHS toch een aantal voordelen. Niet alleen is het mogelijk om de parameters aan te passen en de elektrode opnieuw te verwijderen, waardoor eventuele ongewenste neveneffecten vermeden kunnen worden en er een optimale stimulatie toegepast kan worden. Ook een lagere mortaliteit bij de procedure en minder zware complicaties, zoals bloedingen of neveneffecten op vlak van cognitie, spraak en slikken zijn een belangrijk voordeel ten opzichte van chirurgie. [13]

Ondanks de voordelen is er bij deze techniek een licht verhoogd risico op infecties verbonden door de aanwezigheid van de elektrode en op complicaties die gerelateerd zijn aan langdurige operaties. Daarnaast zijn er ook risico's op een cerebrovasculair accident (1-3%), het verslechteren van de aanvallen (<1%), overlijden (0.1%), huiderosie en infectie (3%) verbonden aan DHS. Ook kan een breuk in de kabel die de elektrode met de stimulator verbindt optreden en herimplantatie van een stimulator elke één tot tien jaar is nodig. Bij patiënten die niet reageren op DHS is het verwijderen van de elektrode en de stimulator noodzakelijk. [13]

1.5.5. Optimalisatie stimulatieprotocol

Als sinds enkele decennia probeert men DHS als therapie voor epilepsie toe te passen. Toch zijn de optimale stimulatieparameters, de beste targets, de langetermijneffecten en de neveneffecten nog niet voldoende gekend. [5] Optimalisatie van het protocol is noodzakelijk om meer patiënten te kunnen behandelen.

Stimulatieparameters

Wat de stimulatieparameters betreft, zijn variaties mogelijk op vlak van frequentie (Hz), stimulusintensiteit, stimulusduur, pulsbreedte, monofasische (een puls is ofwel positief of negatief) of bifasische stimulatie (een puls is verdeeld in een positief en een negatief deel), periodische of continue stimulatie en mono- (enkel een negatief (cathode) of positief (anode)) of multipolaire stimulatie (potentialverschil tussen de anodische als kathodische tippen). Deze parameters zijn sterk afhankelijk van de gestimuleerde structuur. [14] Het is belangrijk parameters te hanteren die zowel effectief zijn, als veilig voor de patiënt.

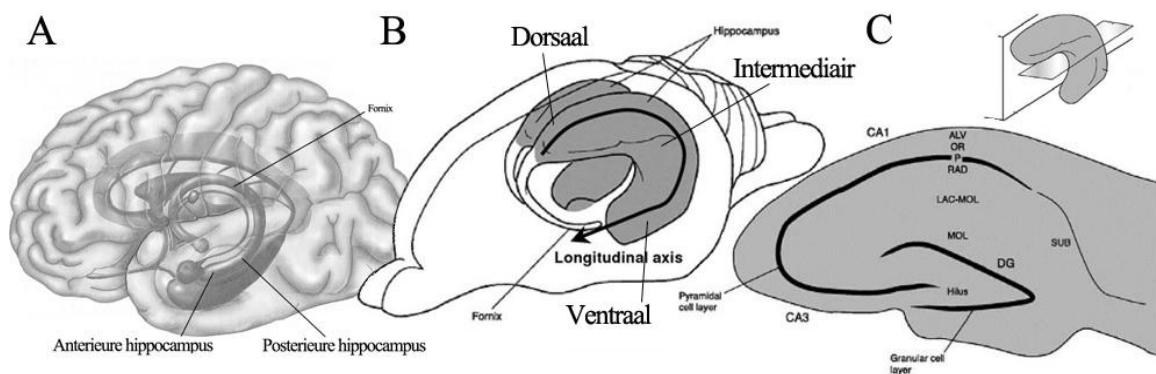
In klinische studies worden parameters gebruikt die gebaseerd zijn op deze gebruikt bij DHS voor de ziekte van Parkinson. Indien een patiënt hierop niet reageert, worden de parameters aangepast. [18, 19] Proefdieronderzoek is een goede manier om deze parameters verder te optimaliseren. Zo is er intussen al aangetoond dat lage frequentie stimulatie (LFS, 5 Hz) minder effectief is dan hoge frequentie stimulatie (HFS, 130 Hz) en dat bij het gebruik van hoog frequente Poisson verdeelde stimulatie een lagere intensiteit nodig is om hetzelfde resultaat als HFS te bereiken. [5, 15]

Stimulatielocatie

Een tweede onzekerheid in het stimulatieprotocol is de optimale locatie. In het verleden werden reeds structuren als het cerebellum, de anterieure en centromediane thalamische nucleus, de nucleus caudatus en de locus coeruleus, de nucleus subthalamicus (STN), de substantia nigra pars reticularis, het corpus callosum en de hersenstam gekozen als doelwit voor DHS bij verschillende vormen van refractaire epilepsie. [9, 11, 13] Deze structuren zijn betrokken bij de propagatie of generalisatie van epileptische aanvallen of moduleren de exciteerbaarheid van bepaalde netwerken. Een andere aanpak is het stimuleren van een structuur die betrokken is bij aanvalsgeneratie, namelijk de ictale oorsprong. Bij MTLE zijn dit onder andere de hippocampus en de amygdala. [13, 19]

De hippocampus bevindt zich ter hoogte van de temporale kwab en maakt deel uit van het limbisch systeem, afgebeeld op figuur 2A. Het speelt een belangrijke rol in geheugen en cognitie en als regulator van emoties. Ramón y Cajal beschreef reeds in het begin van de 20^e eeuw de cytoarchitecturale structuur van de hippocampus. [21] Deze bestaat uit een (voornamelijk) unidirectioneel, trisynaptisch circuit waarlangs informatie loopt om geconsolideerd te worden in het geheugen. Informatie vertrekt vanuit de entorhinale cortex, doorloopt achtereenvolgens de gyrus dentatus, cornu amonis 3 (CA3), CA 1 en het subiculum om opnieuw de hippocampus te verlaten via de entorhinale cortex. Dit intrinsiek patroon herhaalt zichzelf langs de longitudinale as van de hippocampus en is duidelijk te observeren op een coronale doorsnede van de hippocampus zoals te zien op figuur 2C. [21, 22]

Hoewel dit circuit de volledige hippocampus omvat, kan de hippocampus toch verdeeld worden in verschillende zones langs de longitudinale as: een rostrodorsale zone (de humane posterieure hippocampus), een intermediaire zone en een caudoventrale zone (de anterieure hippocampus). [21] Dit onderscheid is geobserveerd in verschillende studies. Studies waarin laesie toegebracht werden in specifieke delen van de hippocampus, fMRI studies en gedragsproeven bij dieren konden al een verschil in functionaliteit aantonen. Zo zou de dorsale hippocampus een grotere dichtheid voor ‘plaats cellen’ bevatten dan de ventrale hippocampus. [21, 22] Ook genetische merkers toonden een verschillende genexpressie aan langs de longitudinale as, welke ook gezien wordt in de subcorticale hersenregio’s die axonale projecties ontvangen vanuit deze afzonderlijke domeinen. Het dorsale deel van de hippocampus is onder andere verbonden met de corticale retrospleniale zone, corpora mammillaria en de anterieure thalamische nuclei. Deze zones zijn betrokken bij de cognitieve verwerking van visuele sensorische informatie voor het spatiale geheugen en navigatie. De ventrale hippocampus bevat onder andere connecties met de amygdala die een belangrijke rol speelt in emotioneel gedrag en de hypothalamische periventriculaire regio en mediale zone die de neuroendocriene, autonome en somatische motorische antwoorden voorzien op voedselinname, productieve en defensieve situaties. [21, 23] Deze informatie versterkt het vermoeden dat de dorsale zone van de hippocampus een belangrijke rol speelt in het spaciaal geheugen en navigatie, terwijl de ventrale hippocampus belangrijk is bij de autonome, endocriene, defensieve, sociale, reproductieve en emotionele controlesystemen. [22] De neuronale verbindingen en de rol van de intermediaire hippocampus zijn echter nog niet goed begrepen. [21]



Figuur 2: A) De ligging van de hippocampus bij de mens. [24] B) De ligging van de hippocampus bij de rat. De hippocampus kan onderverdeeld worden in een ventrale pool, een intermediair stuk en een dorsale pool. C) Doorsnede door de hippocampus waarin het neuronale circuit te zien is. [25]

1.6. Proefdieronderzoek

1.6.1. Proefdiermodellen

De optimale stimulatieparameters, effectieve targets, langetermijneffecten en neveneffecten van DHS zijn nog steeds niet volledig duidelijk. Proefdieronderzoek is hierbij een grote hulp om de toepassing van chronische DHS bij epilepsie te verbeteren, alsook om de mechanismen van drugresistentie en de efficiëntie van nieuwe therapieën te onderzoeken. [5, 26] Een goed diermodel moet voldoen aan een aantal criteria: de aanvallen moeten overeenkomen met de humane vorm en detecteerbaar zijn op EEG, het model moet subgroepen bevatten met een verschillende sensitiviteit ten opzichte van anti-epileptica en moet bruikbaar zijn in langetermijnstudies. [26] Een eerste mogelijkheid is het gebruik van genetische modellen zoals het GAERS model (*Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasbourg*). Dit zijn dieren met een aangeboren susceptibiliteit voor het ontwikkelen van aanvallen. Meestal zijn het modellen voor ‘reflexepilepsie’, wat slechts overeenkomt met 5% van de patiënten, voornamelijk met absencesepilepsie. Daarnaast kan men ook aanvallen induceren in gezonde dieren op chemische of elektrische wijze. Injectie van onder andere pilocarpine, kainaat en metalen kunnen epilepsie veroorzaken bij dieren. Het kindlingmodel is een model voor elektrische inductie. Tot slot kan epilepsie ook veroorzaakt worden door op een mechanische manier hersenschade te veroorzaken: het ‘traumatic brain injury’ model (TBI). Elk model heeft specifieke voor- en nadelen en overeenkomsten met humane vormen van epilepsie. [1, 26]

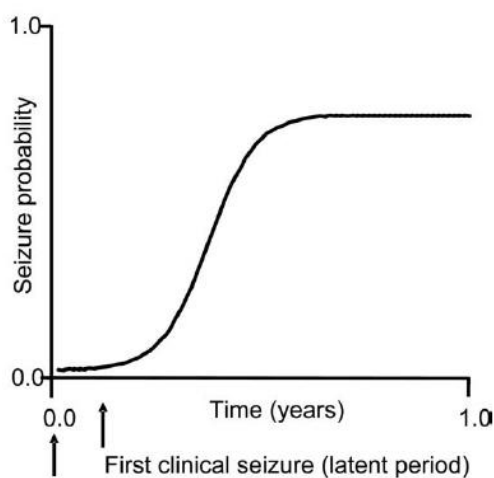
1.6.2. Modellen voor MTLE

Het kindling model

Het kindling model is gekarakteriseerd door de progressieve versterking van elektrografische en klinische aanvallen als antwoord op de herhaalde elektrische stimulatie van het limbische systeem. Elke stimulus leidt tot een elektrografische after-discharge waaruit de exciteerbaarheid van het neuronale netwerk kan worden afgeleid. [17] Hoewel dit systeem het grote voordeel biedt dat deze aanvallen naar wil kunnen uitgelokt worden, toont het niet het effect van continue stimulatie aan op de probabiliteit van het voorkomen van spontane aanvallen. Wat wel kan worden aangetoond is het effect op de eigenschappen van uitgelokte aanvallen zoals de drempelwaarde en duur van de after-discharge en het klinische effect. [5, 17]

Het kainaat-geïnduceerde post status epilepticus model

Injectie van het neurotoxine kainaat, een glutamaat analoog, veroorzaakt zowel klinische en elektrofysiologische aanvallen als neuropathologische schade ter hoogte van de hippocampus en amygdala. [6] Door de injectie van het kainaat wordt een initiële urenlange status epilepticus geïnduceerd. Hierop volgt een dagen- tot wekenlange aanvalsvrije latente periode met het ontstaan van spontane aanvallen tot gevolg. Tijdens dit laatste stadium blijft de epileptogenese doorgaan en is er een duidelijke stijging in aanvalsfrequentie te zien die uiteindelijk stagneert zoals afgebeeld in figuur 3. [27, 28]



Figuur 3: Het verloop van de epileptogenese in het kainaat geïnduceerde status-epilepticus model. Door het initiële insult op tijdstip 0.0 volgt een latente fase van enkele maanden. Onmiddellijk na het initiële insult is er al een lichte stijging in probabilliteit om aanvallen te ontwikkelen. Pas na een latente fase waarin de epileptogene processen plaatsvinden, zal een eerste epileptische aanval optreden. Hierna stijgen de aanvalsprobabiliteit en aanvalsfrequentie exponentieel, om dan uiteindelijk een steady state te bereiken. [27]

De inductie van dit diermodel gebeurt met behulp van kainaat. Dit is een agonist van de ionotrope, niet-NMDA receptoren: AMPA en KA (kainaat) receptor, en is honderd keer krachtiger dan L-glutamaat voor deze receptoren. Het wordt voornamelijk intracerebraal of intraperitoneaal geïnjecteerd en veroorzaakt een onderhouden neuronale depolarisatie. Bij intracerebrale injectie wordt de schade lokaal veroorzaakt in de geïnjecteerde hippocampus. Intraperitoneale injectie daarentegen veroorzaakt diffuse schade, zowel in beide hippocampi als daarbuiten, zoals in de piriforme en entorhinale cortex. Dit leidt tot het ontwikkelen van aanvallen die enkele uren blijven aanhouden, namelijk de status epilepticus. Hierdoor worden epileptogene processen in gang gezet die onder andere necrose en neuronaal verlies van CA1 en CA3 veroorzaken met mossy fiber sprouting als gevolg. Ook is er neuronaal verlies te zien buiten de hippocampus. Deze veranderingen komen overeen met de veranderingen geobserveerd bij patiënten met MTLE. [6, 28]

Door deze overeenkomsten op histologisch vlak, het voorkomen van spontaan optredende aanvallen en de gelijklopende stadia, wordt het kainaat model gezien als een ideaal diermodel voor MTLE. [6] Ook kan in dit model het effect van continue hippocampale stimulatie op de aanvalsfrequentie en probabiliteit bestudeerd worden. [15] Toch zijn er een aantal nadelen verbonden aan dit model. Een eerste nadeel is de hoge mortaliteit, veroorzaakt door de éénmalige hoge dosis die wordt toegediend. Door het toepassen van herhaalde lage dosissen kainaat is deze mortaliteit enorm gedaald. [6, 28] Ook is er een grote variabiliteit wat betreft de oorsprong, frequentie en ernst van de aanvallen. Bij dit laatste punt kunnen we echter argumenteren dat deze variabiliteit ook voorkomt bij patiënten met MTLE. [28]

1.7. Rationale van de masterproef

Hoewel er steeds meer aandacht wordt besteed aan diepe hersenstimulatie als therapie voor refractaire epilepsie, is er nog niet veel geweten over het exacte werkingsmechanisme en zijn de optimale parameters nog niet gekend. Net zoals bij andere anti-convulsieve therapieën is er een duidelijk onderscheid tussen responders en non-responders bij DHS. Optimalisatie van de stimulatieparameters en de stimulatietarget kan ervoor zorgen dat meer patiënten geholpen kunnen worden door deze therapie.

Deze masterproef kadert in een grotere studie, uitgevoerd in het laboratorium voor klinische en experimentele neurofysiologie (LKEN), waarbij twee belangrijke onderzoeksvragen worden gesteld:

1/ Wat is het effect van ventrale en dorsale (unifocale) stimulatie op epilepsie?

2/ Wat is het effect van multifocale (gecombineerde dorsale als ventrale) stimulatie op epilepsie?

De keuze voor stimulatie ter hoogte van de ventrale en dorsale hippocampus in plaats van de in eerder proefdieronderzoek gebruikte intermediaire hippocampus, is gebaseerd op aanwijzingen dat er een functioneel en neurofysiologisch verschil is tussen de verschillende domeinen in de hippocampus. [21, 22] Ook zou de ventrale hippocampus een lagere drempelwaarde bevatten voor epileptiforme activiteit, waardoor stimulatie in deze locus een beter effect zou teweegbrengen. [22] Rekening houdend met deze informatie, lijkt het nuttig om het effect van DHS op deze individuele zones na te gaan.

In deze masterproef wordt de tweede onderzoeksvraag behandeld. Multifocale, asynchrone stimulatie wordt nog niet gebruikt als parameter bij diepe hersenstimulatie. De keuze voor multifocale stimulatie is gebaseerd op de veronderstelling dat stimulatie op verschillende locaties een groter hersenvolume stimuleert, waardoor het aanvalsonderdrukkende effect uitgebreider zou zijn. Dit is gebaseerd op resultaten van een μ SPECT studie tijdens DHS, waarbij geobserveerd werd dat de stimulatieparameters, waarvan geweten was dat deze het best aanvallen onderdrukken, de grootste hypoperfusie veroorzaken in de hippocampus. [20] Dit leidde tot een hypothese dat een meer uitgebreide beïnvloeding van de hippocampus voor een betere aanvalsonderdrukking zorgt.

De stimulatie van deze loci laten we onregelmatig verlopen, asynchroon van elkaar, door gebruik te maken van twee onregelmatige Poisson verdeelde stimulaties. Dit heeft een asynchroniteit in het neuronale netwerk tot gevolg, wat de synchroniteit die aan de basis ligt van epileptische aanvallen verstoort en zo aanvalsgeneratie kan tegenhouden. Dit zou mogelijk verklaren waarom hoog frequente Poisson verdeelde stimulatie efficiënter is dan hoogfrequentie stimulatie. [15] Daarom luidt de hypothese dat door simultane, asynchrone stimulatie van meerdere targets, het effect op de aanvalsfrequentie groter zal zijn en meer patiënten baat zullen hebben bij de therapie. Om dit na te gaan passen we dit stimulatieprotocol toe in het kinaat model om de aanvalsfrequentie tussen baseline- en stimulatieperiode te vergelijken en na te gaan hoeveel ratten responder zijn.

2. Materialen en methoden

2.1. Dieren

Tijdens de proef wordt gebruik gemaakt van gezonde mannelijke Sprague-Dawley ratten (Harlan, Nederland) met een gewicht van 350-500 gram. Het studieprotocol werd goedgekeurd door het dierexperimenteel ethisch comité van de Gentse Universiteit (ECP



Figuur 4: Sprague-Dawley rat in een EEG-monitoring setup.

09/16) en de dieren worden behandeld volgens de richtlijnen, goedgekeurd door de Europese Ethisch Commissie (decreet 86/609/EEC). Een individuele huisvesting wordt voorzien, zowel voor als tijdens het experiment. Voedsel en water is ad libitum ter beschikking, kooiverrijking is aanwezig en de kooien worden wekelijks ververs. Zowel voor als tijdens het experiment, verblijven de ratten in een gecontroleerde omgeving: 12/12 uur licht/donker cyclus, een temperatuur van 22-23°C en een luchtvochtigheid van 40-60%.

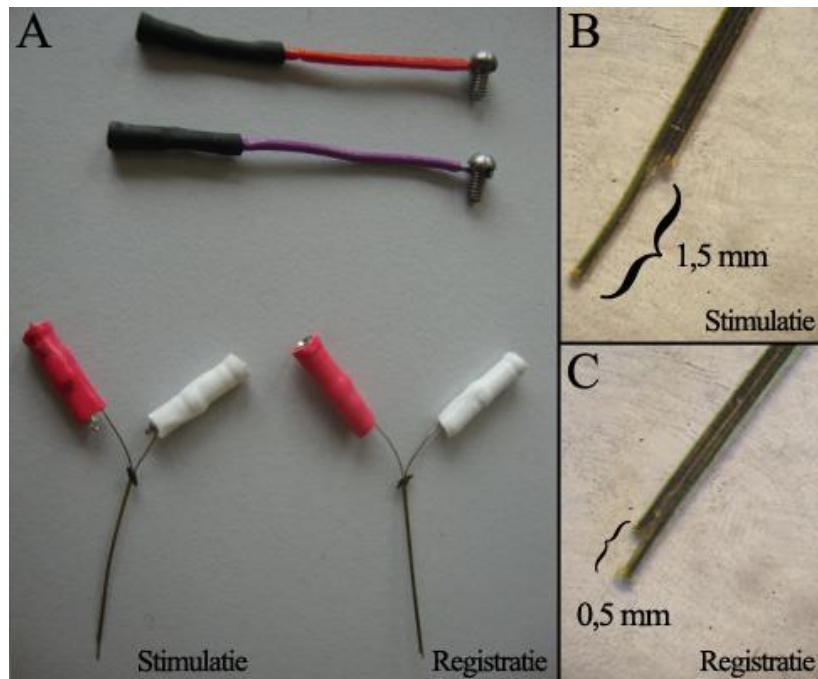
2.2. Materiaal

2.2.1. Epidurale elektroden

Epidurale of scalpelektroden worden gemaakt uit een dun stuk geïsoleerde metalen draad. Aan het ene uiteinde wordt een juweliersschroef (diameter 1.57 mm) gesoldeerd die tijdens de implantatie in de schedel wordt geschroefd. Aan het andere uiteinde wordt een connectiepinnetje gesoldeerd om de elektrode te verbinden met de rest van de opstelling. De integriteit van de elektrode wordt getest met behulp van een multimeter. Dit type elektrode wordt gebruikt als een referentie-elektrode voor de diepte-elektroden. (figuur 5)

2.2.2. Diepte-elektroden

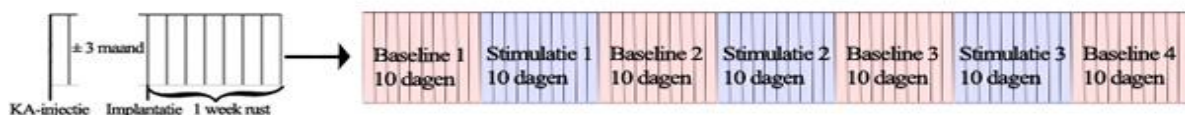
Diepte-elektroden worden zowel gebruikt voor EEG-registratie als diepe hersenstimulatie. Deze worden gemaakt door twee fijne, roestvrije stalen draden met polyimide coating (diameter 125µm) aan elkaar te lijmen. Onder een binoculaire microscoop worden de uiteinden op 0,5 mm (registratie elektroden) of 1,5 mm (stimulatie elektroden) van elkaar afgesneden. De losse uiteinden worden gesoldeerd aan connectiepinnetjes, om later te verbinden met de registratie- en stimulatieopstelling.



Figuur 5: A) Boven: scalpelektroden. Onder: diepte-elektroden: stimulatie- en registratie-elektrode. B) Detail stimulatie-elektrode: 1,5 mm verschil tussen uiteinden. C) Detail registratie-elektrode: 0,5 mm verschil.

2.3. Experimenteel protocol

Dit experiment kadert in een grote proef waarbij zowel het effect van ventrale, dorsale als multifocale diepe hersenstimulatie wordt getest. Na de implantatie van de elektroden, krijgen de ratten ($n = 40$) minstens één week rust. Het effect van de diepe hersenstimulatie op de aanvalsfrequentie wordt bepaald op basis van EEG monitoring door het vergelijken van het aantal aanvallen in de baselineperiode met deze tijdens de stimulatieperiode, telkens tien dagen durend. Om na te gaan of de stimulatie een blijvend effect heeft, wordt de stimulatieperiode vergeleken met de daaropvolgende baselineperiode, namelijk een wash-outperiode. Iedere rat doorgaat zowel een ventrale, dorsale als multifocale stimulatie, zoals afgebeeld op figuur 6. De volgorde waarin de ratten aan de verschillende stimulatieparadigma's onderworpen worden is gerandomiseerd.



Figuur 6: Schematische voorstelling van het experimentele protocol. Na de kainaatinjectie volgt een latente periode van ongeveer 3 maanden. Nadien worden de elektroden geïmplanteed. Na een rustperiode van een week volgt een opeenvolging van baseline- en stimulatieperioden. De baselineperiode na een stimulatieperiode wordt gezien als de wash-outperiode. Zo doorlopen de ratten zowel beide unifocale als multifocale stimulatie.

2.4. *Inductie van de status epilepticus*

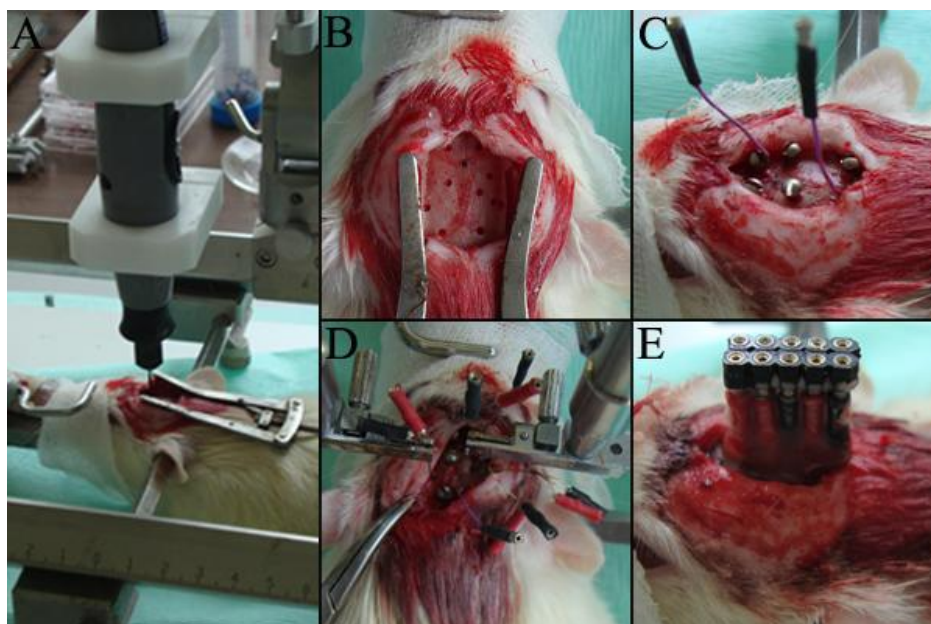
De ratten worden intraperitoneaal (IP) geïnjecteerd met herhaalde lage dosissen kinaaat (Tocris Bioscience, UK) volgens het protocol van Hellier et al., om de mortaliteit bij het induceren van een status epilepticus te reduceren. [29] Ieder uur wordt een IP kinaatinjectie (5 mg/kg) uitgevoerd tot een stabiele, zelfonderhoudende status epilepticus wordt waargenomen van minimum drie uur. Het definiëren van deze status epilepticus is gebaseerd op de schaal van Racine, waarbij enkel motorische aanvallen, beschreven in tabel 1, worden meegerekend. Bij ratten met overdreven motorische activiteit of overdreven lethargie, wordt de volgende dosis gehalveerd. Ratten worden gedefinieerd als ‘in status’ en worden niet meer verder geïnjecteerd met kinaaat wanneer ze gedurende het voorgaande uur meer dan 10 stage 4 of 5 aanvallen hebben gedaan. Na de laatste injectie worden de ratten verder geobserveerd om zeker te zijn dat de ratten minstens drie uur in status blijven.

Klasse III	clonus van één voorpoot + lordose
Klasse IV	clonus van beide voorpoten
Klasse V	clonus van beide voorpoten + omvallen

Tabel 1: Karakterisatie van de motorische aanvallen volgens de schaal van Racine.

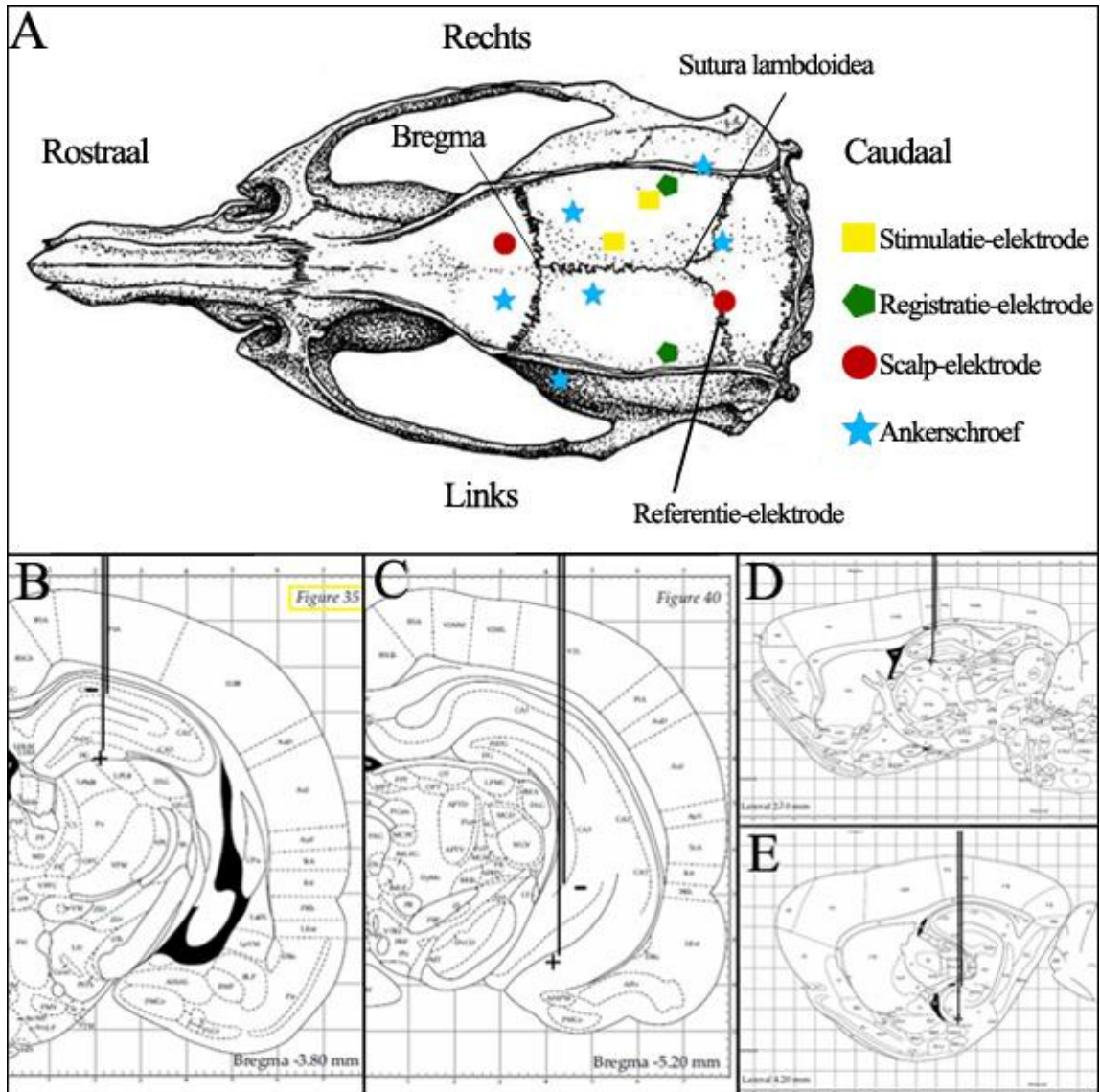
2.5. *Implantatie van de elektroden*

Het verloop van de operatie wordt afgebeeld in figuur 6. Voor de operatie wordt het operatieoppervlak en het stereotactisch kader gesteriliseerd met 70% ethanol. Het operatiemateriaal wordt voor de operatie geautoclaveerd. Op de operatietafel wordt een warmtekussen geplaatst om hypothermie tegen te gaan. De ratten worden verdoofd met behulp van een volatiel mengsel van isofluraan (5% bij inductie, 2% tijdens de operatie) met medische zuurstof en subcutaan geïnjecteerd met een pijnstillend middel Temgesic (0.03 mg/kg). Nadien wordt de rat geïmmobiliseerd in het kader door middel van twee oorstaven en een tandhouder. Op de ogen wordt een vochtig doekje aangebracht om uitdroging tegen te gaan.



Figuur 7: A) Immobilisatie van de rat in het kader. Na het blootleggen van de schedel, worden gaten geboord volgens vooropgestelde coördinaten ten opzichte van het bregma (zwarte stip). B) Twaalf gaten: twee scalpelektroden, vier diepte-elektroden en zes ankerschroeven. C) Plaatsing van de scalpelektroden. D) Plaatsing van de diepte-elektroden. E) De elektroden worden verbonden aan een connector en gefixeerd met dentaal cement.

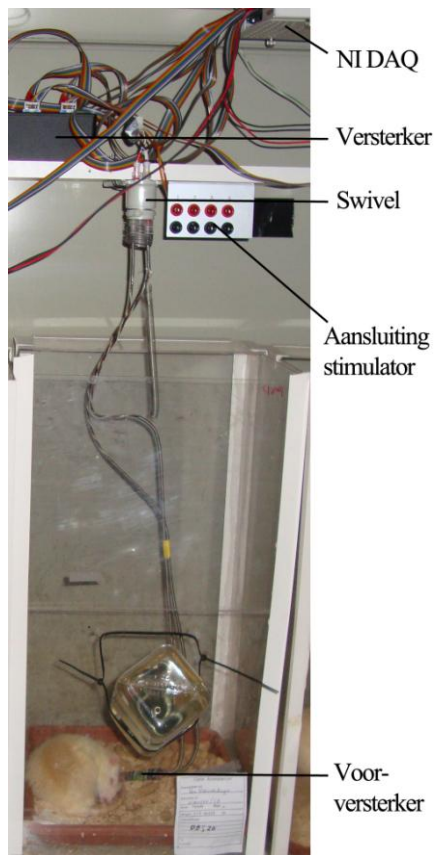
De schedel wordt door middel van een mediane snede blootgelegd. Met een tandboor worden twaalf gaten geboord in de schedel: twee voor de plaatsing van de scalpelektroden, vier voor de diepte-elektroden en zes ankerschroeven. Een eerste scalpelektrode - de referentie-elektrode - wordt gepositioneerd posterieur van de sutura lambdoidea aan de linkerzijde. De tweede scalpelektrode - een reserve referentie-elektrode - wordt geplaatst ter hoogte van de frontale cortex aan de rechterzijde. De diepte-elektroden worden op stereotactische manier geïmplantieerd op vastgelegde coördinaten ten opzichte van het bregma, het snijpunt tussen de sutura coronalis en de sutura sagittalis. Twee elektroden - de registratie-elektroden - worden bilateraal geplaatst ter hoogte van de intermediaire hippocampi ($-5,6$ AP, $\pm 5,10$ ML, $-6,4$ DV ten opzichte van het bregma). De twee resterende diepte-elektroden worden gebruikt als stimulatie-elektroden en worden aan de rechterzijde van de schedel gepositioneerd ter hoogte van de dorsale en de ventrale hippocampus (respectievelijk $-3,8$ AP, $+2,2$ ML, $-4,0$ DV en $-5,1$ AP, $+4,20$ ML, $-8,4$ DV ten opzichte van het bregma). De posities van de elektroden zijn afgebeeld in figuur 6. De connectiepinen van de elektroden worden vastgemaakt aan een connector en het construct wordt gefixeerd op de schedel met behulp van dentaal cement. Hierna volgt een rustperiode van minstens één week.



Figuur 8: A) Schematische voorstelling van de posities van de elektroden en ankerschroeven. B) Positie van de dorsale stimulatie-elektrode. C) Positie van de ventrale stimulatie-elektrode. D) Positie van de dorsale stimulatie-elektrode op laterale doorsnede. E) Positie van de ventrale stimulatie-elektrode op laterale doorsnede. (Aangepast uit Paxinos and Watson, 1998) [30]

2.6. Continue EEG monitoring

2.6.1. Opstelling



Figuur 9: Setup voor EEG-monitoring

Na een rustperiode van minimum één week, worden de ratten gehuisvest in een EEG-monitoring opstelling. De hersenactiviteit wordt gedetecteerd door de elektroden, en door middel van een voorversterker gefilterd. Hierna worden de signalen 510 maal versterkt door de versterker en worden deze signalen gedigitaliseerd door een NI-DAQ-kaart (National Instruments, USA), en doorgestuurd naar een computer en opgeslagen. De verbinding tussen de voorversterker en versterker gebeurt via een swivel, waardoor de ratten vrij kunnen bewegen in hun kooien. De EEG-registratie gebeurt met een samplingrate van 200 Hz tijdens de baselineperioden, en met een samplingrate van 2000 Hz tijdens stimulatie. De monitoring gebeurt continu: 24/24u, 7/7 dagen zowel tijdens de baseline- als stimulatieperioden. De analyse van het EEG gebeurt offline met in MATLAB 2007 huisgeprogrammeerde software.

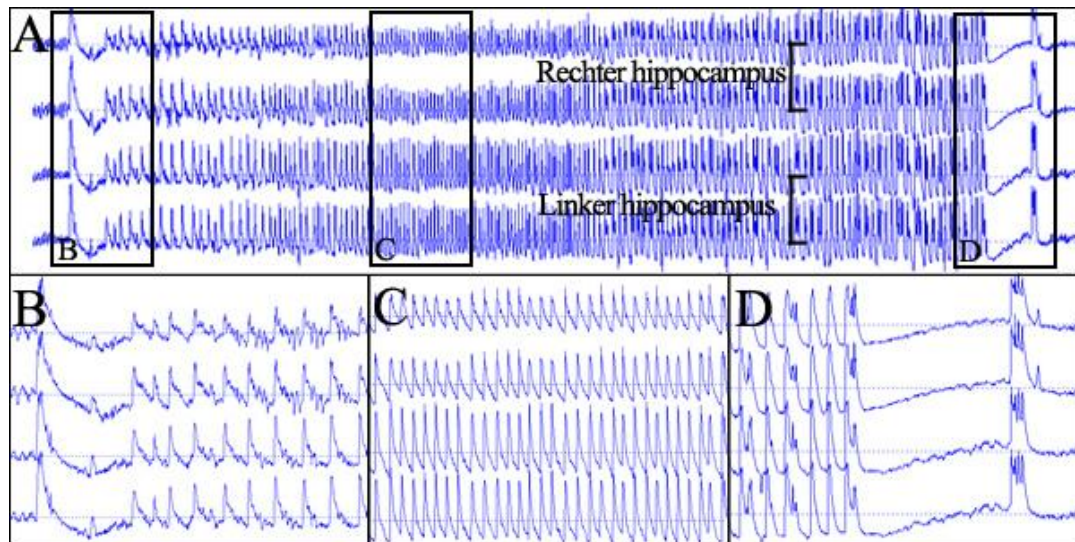
2.6.2. Outcome parameters

De resulterende EEG-montage bestaat uit vier verschillende diepte EEG-kanalen voor elke rat. De vier kanalen geven de signalen uit de twee registratie diepte-elektroden weer, één kanaal per uiteinde. Signalen op de eerste twee kanalen komen uit de rechterhippocampus, de twee laatste uit de linkerhippocampus.

Om een epileptische aanval aan te duiden maken we gebruik van de volgende werkdefinitie van een elektrografische epileptische aanval:

‘Abnormale hypersynchrone piekactiviteit die langer dan 15 seconden aanhoudt op alle 4 de EEG registratiekanalen, waarbij de frequentie van de pieken groter is dan 5 Hz en een amplitude van minstens 2x tot 3x ruis.’

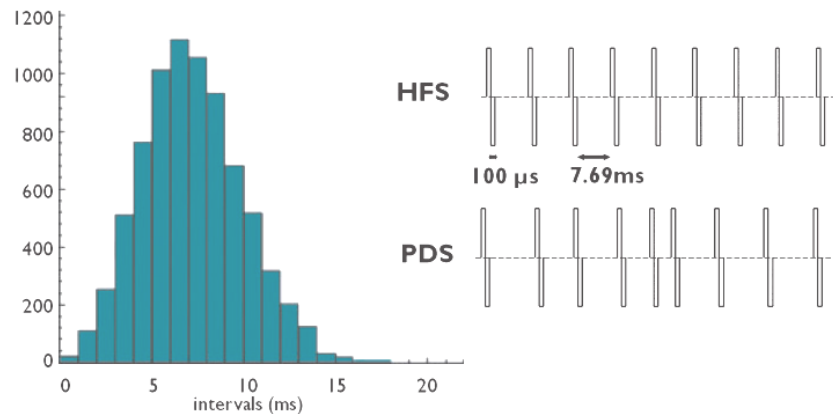
Een typische epileptische aanval wordt afgebeeld in figuur 10. Het begin van een aanval wordt typisch gekarakteriseerd door een grote positieve of negatieve potentiaal. Hierna volgt een stijging in oscillatiefrequentie en/of daling van de amplitude, gevolgd door een stijging in zowel amplitude als frequentie. Na de aanval volgt vaak een post-ictale fase waarbij er weinig basisactiviteit te zien is door uitputting van de neuronen.



Figuur 10: A) Een typische epileptische aanval. B) Deze aanval begint met een grote positieve (of negatieve) potentiaal ten opzichte van de basisactiviteit. Hierna volgt een stijging in oscillatiefrequentie met een gedaalde amplitude. C) Nadien is zowel een stijging in amplitude en frequentie te zien. D) Na de aanval volgt een post-ictale fase met lage basisactiviteit. Kanalen: 1 & 2 – Diepte registratie rechter hippocampus, 3 & 4 – Diepte registratie linker hippocampus.

2.7. *Diepe hersenstimulatie*

Tijdens de stimulatieperioden worden de ratten telkens tien dagen continu gestimuleerd. De stimulatieparameters worden ingesteld op bipolaire, bifasische, ladings-gebalanceerde rechthoekige Lilly golfpulsen, met een pulsbreedte van 100 μ s. Met bifasische ladings-gebalanceerde pulsen wordt bedoeld dat de lading die geleverd wordt tijdens de positieve fase gelijk is aan de lading geleverd in de negatieve fase. Hierdoor worden geen ladingen opgehoopt in het neuronale weefsel en wordt er dus geen neuronale schade veroorzaakt. Daarnaast wordt gebruikt gemaakt van een hoog frequente Poisson verdeelde stimulatie (PVS) met een frequentie van 130 Hz. Bij hoog frequente Poisson verdeelde stimulatie is er, in tegenstelling tot hoogfrequente stimulatie, een variatie in de interpulsen intervallen, verdeeld volgens een Poisson verdeling. Figuur 11 toont de gebruikte Poisson verdeling met een gemiddeld interpulsinterval en variantie die beide 7,69 ms bedragen.

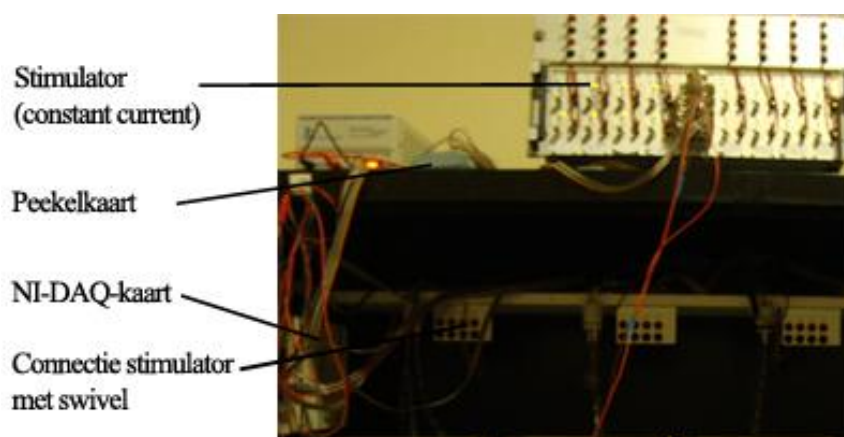


Figuur 11: Verdeling van stimulatieintervallen van hoog frequente Poisson verdeelde stimulatie. In tegenstelling tot HFS waarbij het interpulsinterval telkens 7,69 ms bedraagt, is er bij PVS (PDS) een variatie in interpulsen. De gemiddelde interpulstijd en variantie bedragen 7,69 ms (130 Hz). [15]

De stimulatie-intensiteit wordt individueel berekend uit de drempelwaarde waarbij epileptiforme activiteit wordt veroorzaakt. Om deze te kunnen bepalen wordt een hoogfrequente stimulatie van 130 Hz over 120 s gegeven, waarbij de amplitude stijgt van 0 naar 2000 μ A. De stimulatie wordt gestopt vanaf het moment dat epileptiforme activiteit op verschillende kanalen van het EEG wordt waargenomen of klinisch epileptische aanvallen worden gezien. Uit deze drempelwaarde wordt de stimulatie-intensiteit berekend: drempelwaarde * 40%. Deze waarde van 40% werd gekozen na het toedienen van continue hoogfrequente stimulatie met een intensiteit van 10%, 20%, 30%, 40% en 50% van de gemeten drempelwaarde, telkens onderbroken met 5 minuten rust. Bij intensiteiten van 50% van de gemeten drempelwaarde werden epileptische aanvallen geobserveerd bij 50% van de gestimuleerde dieren. Bij continue hoogfrequente stimulatie met stimulatie-intensiteiten van 40% van de gemeten drempelwaarde vertoonde geen enkele rat epileptiforme activiteit. Deze individuele drempelwaarden en stimulatie-intensiteiten worden vijf maal bepaald tijdens het experiment. Eénmaal voor elke stimulatievorm, éénmaal in het begin van de proef (voor de eerste baselineperiode), en éénmaal op het eind van de proef (na de laatste baselineperiode).

De stimulatiepulsen worden geleverd door constante stroombronnen (NPIelectronics, Duitsland). Constante stroombronnen leveren een constante stimulatie-intensiteit door de geleverde spanning aan te passen aan de impedantie. Vuurfrequentie en pulsduur worden bepaald door dezelfde NI-DAQ-kaart (National Instruments, USA) die ook betrokken is bij EEG-registratie en de intensiteit wordt bepaald door de spanning op de USB-DAQ-kaart (Peekel, België). Bij multifocale stimulatie worden beide elektroden door een verschillende stimulator gestimuleerd waardoor de vuurfrequentie ter hoogte van beide elektroden een verschillende Poisson verdeling volgen. Zo vallen de stimulatiepulsen ter hoogte van de dorsale hippocampus en de stimulatiepulsen ter hoogte van de ventrale hippocampus niet samen en worden beide foci asynchroon gestimuleerd. Deze opstelling wordt afgebeeld in figuur 12.

Tot slot wordt telkens samen met het bepalen van de drempelwaarde, de impedantie van het weefsel rond zowel de ventrale als dorsale stimulatie-elektrode gemeten met behulp van een oscilloscoop. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van de wet van Ohm: spanning (U) = stroom (I) * weerstand (R). Met een gekende stroom ($100 \mu A$) wordt de spanning (U) gemeten over een gekende weerstand ($10 k\Omega$). Door nadien de spanning over het volledige circuit ($10 k\Omega +$ onbekende weerstand) te meten, kan de weerstand over het volledige circuit en dus ook de impedantie ter hoogte van het gestimuleerde weefsel berekend worden: $R(\text{weefsel}) = R(\text{totaal}) - R(10 k\Omega)$. Het meten van deze impedantie is belangrijk om na te gaan of het stimulatiecircuit gesloten is en/of er geen kortsluiting is in het stimulatiecircuit. Dieren met een oneindig grote weerstand, en zonder weerstand worden uit de proef gehaald.



Figuur 12: Belangrijke componenten in de stimulatieopstelling: stimulator, Peekelkaart en NI-DAQ-kaart.

2.8. *Histologie*

Na de laatste baselineperiode, worden de ratten verdoofd met isofluraan en vervolgens diep geanestheiseerd door intraperitoneale toediening van een overdosis pentobarbital (180 mg/kg, Nembutal). De ratten worden transcardiaal geperfuseerd met phosphate-buffered saline (PBS), gevolgd door een perfusie met een 4% paraformaldehyde oplossing. Na perfusie worden de hersenen uit de schedel verwijderd en worden deze minstens twee dagen verder gefixeerd in de 4% paraformaldehyde oplossing. Nadien worden de hersenen achtereenvolgens in een 10%, 20% en 30% sucroseoplossing gebracht voor cryoprotectie, telkens minstens één dag, en nadien ingevroren in vloeibaar stikstof (-80°C). Daags voor het snijden van de coupes worden de hersenen overgebracht en bewaard in een diepvries (-20°C). Coronale coupes van 70 µm worden gesneden met een vriesmicrotoom (Leica CM3050 S, Leica Microsystems) in het Innovative Flemish IN vivo TechnologY lab (INFINITY-Ugent). Op deze coupes wordt een Nissl kleuring uitgevoerd (0,1% cresyl violet acetaat) en onder de binoculaire microscoop wordt de locatie van de stimulatie-elektroden geverifieerd, geblindeerd voor de responsen op de stimulatie. Daarnaast worden de coupes ook nagekeken op mogelijke weefselschade rondom de elektroden. Deze schade werd gescoord volgens tabel 2 en ratten die een ++ of + score hadden, werden uit de resultaten gehaald. Enkel dieren waarvan zowel de dorsale als ventrale elektrode op de juiste plaats zitten en waarbij er geen schade is rondom de elektroden, worden in rekening gebracht.

++	grote schade (volledige of deel van hippocampus weg)
+	grote laesie rondom de stimulatie-elektroden
+/-	kleine laesie rondom de stimulatie-elektroden
-	(quasi) geen schade rondom de elektroden

Tabel 2: Scoringssysteem van de geobserveerde weefselschade.

Om de resultaten bekomen bij multifocale stimulatie te vergelijken met het effect van unifocale stimulatie worden de gegevens gebruikt uit de masterproef van Valérie Du Caju waarin unifocale DHS in de dorsale hippocampus vergeleken wordt met deze in de ventrale hippocampus. De inclusiecriteria in deze unifocale proef verschillen met deze in de multifocale studie. Dieren waarvan slechts één elektrode op de correcte plaats zit, worden ook geïnccludeerd in de resultaten wat ons toelaat het effect van multifocale stimulatie, waarbij één van beide stimulatie-elektroden niet in de hippocampus zit, te vergelijken met unifocale stimulatie.

2.9. *Statistische verwerking*

Het weergeven van data gebeurt onder de vorm gemiddelde \pm standaardafwijking van het gemiddelde (Standard Error of the Mean, SEM). Met behulp van de niet-parametrische '*Kruskall-wallis*' test, worden de aanvalsfrequenties van de drie perioden (baseline, multifocale stimulatie en wash-out) met elkaar vergeleken. Welke perioden statistisch significant verschillend van elkaar zijn, wordt nagegaan met een post hoc analyse met behulp van de niet-parametrische '*Mann-Whitney U*' test. Aangezien drie perioden met elkaar vergeleken worden, wordt gebruik gemaakt van een Bonferroni correctie die het significantieniveau van de individuele post hoc analyses corrigeert. Hierdoor wordt voor de individuele post hoc testen een p-waarde $< 0,017$ ($= 0.05/3$) beschouwd als statistisch significant verschillend. Verschil in de aanvalsfrequentie doorheen het verloop van de dag wordt aangetoond met behulp van een niet-parametrische '*Friedman*' test, gevolgd door een post hoc niet-parametrische '*Wilcoxon*' test met Bonferroni correct, waarbij een p-waarde $< 0,017$ significant wordt beschouwd. Deze statistische tests worden uitgevoerd met SPSS versie 19. Responders worden gedefinieerd als ratten met minstens 50% daling in aanvalsfrequentie door behandeling. Het effect van multifocale stimulatie wordt vergeleken met dat van unifocale stimulatie op basis van de individueel bekomen aanvalsreductie tijdens stimulatie. Deze masterproef bespreekt de eerste onderzoeksvraag die deel uitmaakt van dezelfde grotere studie waarin ook deze masterproef valt en vergelijkt het effect van unifocale dorsale met unifocale ventrale hippocampale DHS.

3. Resultaten

3.1. *Stimulatie-intensiteit*

De intensiteit van de Poisson verdeelde stimulatie werd bepaald volgende de methode beschreven in materialen en methoden. De gemiddelde stimulatieamplitude bedroeg 376 (± 176) μA met een minimale en maximale amplitude van 74 en 800 μA . Het gedrag van de ratten tijdens de multifocale stimulatie kon niet onderscheiden worden tijdens de dagelijkse zorg van het gedrag tijdens de baseline of wash-outperioden.

3.2. *Inclusiecriteria*

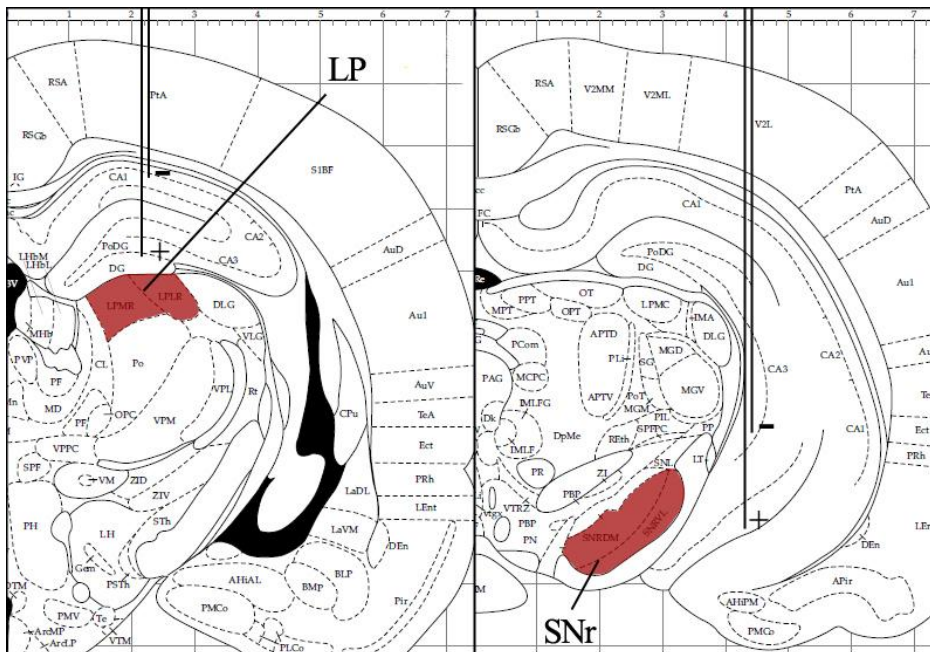
Bij de aanvang van de proef werden 40 ratten geïmplanteerd met elektroden waarvan de gegevens doorheen de proef werden geanalyseerd. Voor het verwerken van de resultaten werden echter enkel deze dieren geïnccludeerd die voldeden aan bepaalde voorwaarden.

Bij het meten van de impedantie tijdens de proef werden de ratten waarbij een oneindig grote impedantie (onderbreking in het elektrisch circuit) of geen impedantie (kortsluiting in het elektrisch circuit) werd waargenomen uit de proef gehaald. Tijdens de eerste stimulatieperiode stootten we op een tweede probleem: in totaal stierven twaalf dieren in groepen door een ongewenste lekstroom uit de NPI stimulators. Daarnaast stierven doorheen het 70 dagen durende experiment nog eens tien dieren ten gevolge van zware epileptische aanvallen. Enkel de ratten die de volledige proef doorlopen hebben en waarvan zowel de ventrale als de dorsale stimulatie-elektrode op de correcte plaats zat en waarbij er geen schade rondom de elektroden geobserveerd werd, werden in rekening gebracht. Uiteindelijk werden slechts vier ratten weerhouden voor de analyse van de resultaten.

Om het effect van multifocale stimulatie te vergelijken met unifocale stimulatie, worden gegevens gebruikt uit de unifocale hippocampale proef, beschreven in de masterproef van Valérie Du Caju. In deze proef worden ook dieren waarvan één van beide elektroden foutief gepositioneerd is, geïnccludeerd. Bij deze vergelijking werden acht ratten weerhouden die voldeden aan deze criteria en multifocale stimulatie hadden doorlopen.

3.2.1. Ectopische elektrodepositie

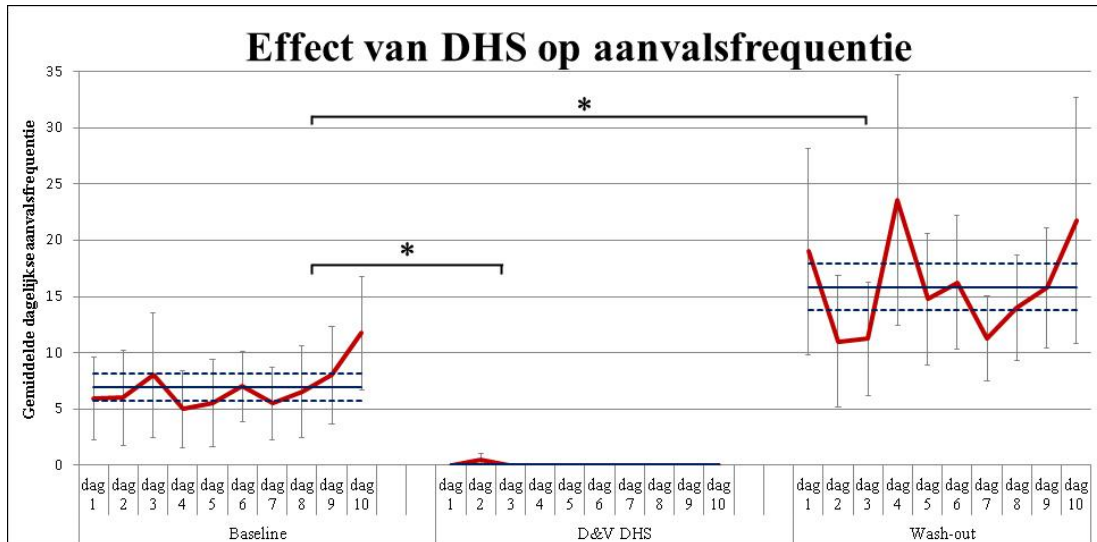
Bij de dieren waarbij één van beide stimulatie-elektroden zich niet in de hippocampus bevinden, werd opgemerkt dat deze elektrode zich in de buurt van omliggende hersenstructuren bevond. De ventrale stimulatie-elektroden bevonden zich in de buurt van de substantia nigra pars reticularis (SNr), de dorsale ter hoogte van de thalamus, meer bepaald de laterale posterieure thalamische nucleus (LP). Deze structuren worden afgebeeld in figuur 13 en bevinden zich dicht in de buurt van de hippocampus.



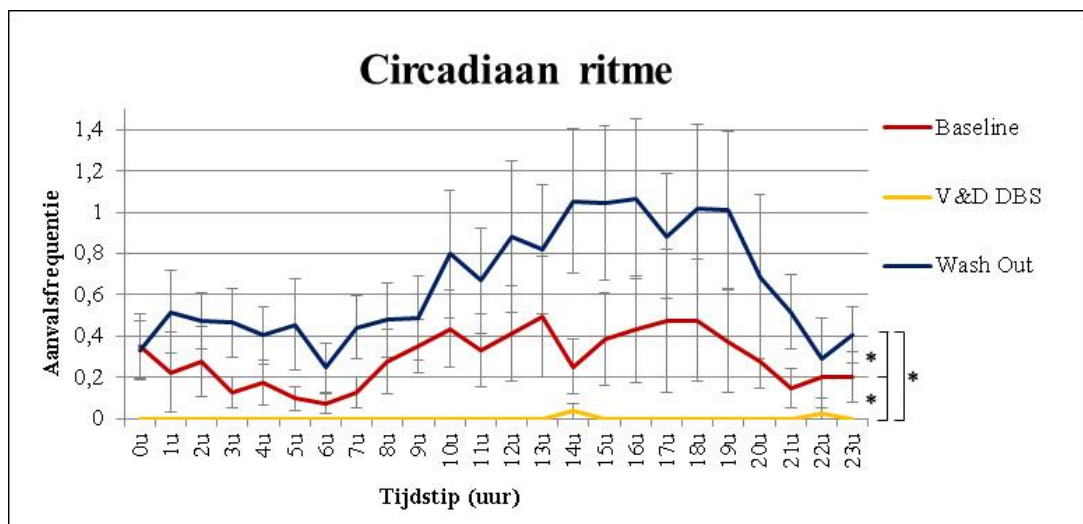
Figuur 13: Schema-tische voorstelling van de structuren waarin de foutief gepositioneerde elektroden zich bevinden bij dieren, geïncludeerd in de unifocale stimulatie proef. De ventrale stimulatie-elektrode bevonden zich in de buurt van de substantia nigra pars reticularis (SNr) terwijl de dorsale zich in de buurt van de laterale posterieure thalamische nucleus (LP) bevonden. (Aangepast uit Paxinos and Watson, 1998) [30]

3.3. *Effect op aanvalsfrequentie*

Met behulp van continue EEG-monitoring kon de gemiddelde dagelijkse aanvalsfrequentie van alle ratten vergeleken worden tussen de baseline-, stimulatie- en wash-outperiode (figuur 14). De gemiddelde aanvalsreductie veroorzaakt door de multifocale stimulatie, in vergelijking met de baselineperiode, bedraagt 99,75%. Deze daling is statistisch significant (p -waarde $< 0,01$) en werd onmiddellijk gezien vanaf de eerste stimulatie-dag. Vanaf de eerste dag waarbij de stimulatie werd stopgezet, was er opnieuw een stijging van de aanvalsfrequentie. Ook tussen de stimulatie- en wash-outperiode en de baseline- en wash-outperiode is een significant verschil gemeten (p -waarde $< 0,01$), met een gemiddelde stijging in aanvalsfrequentie van 106% tussen baseline en wash-out. Dit aanvalsonderdrukkend effect van multifocale stimulatie wordt doorheen de volledige dag bereikt zoals afgebeeld in figuur 15.



Figuur 14: De gemiddelde dagelijkse aanvalsfrequentie voor alle ratten (n=4) voor zowel de baseline-, stimulatie- als wash-outperiode. De blauwe horizontale lijnen geven het gemiddelde en de SEM weer voor elke periode (uitgemiddeld over 4 ratten). De ster (*) toont het significant verschil aan tussen baseline en stimulatie, en baseline en wash-outperiode (p-waarde <0,01).



Figuur 15: Het gemiddelde aantal aanvallen voor alle ratten (n=4) in functie van het uur zowel tijdens de baseline-, stimulatie- als wash-outperiode, met telkens significant verschil (*) p-waarde < 0,01). Multifocale stimulatie vertoont een duidelijk sterk aanvalsonderdrukkend effect gedurende de volledige dag.

3.4. *Responders*

De gemiddelde aanvalsfrequentie van alle ratten (n=4) tijdens de drie perioden worden getoond in tabel 3. Een responder wordt gedefinieerd als een rat met een daling in aanvalsfrequentie van minstens 50% tijdens multifocale stimulatie. Van de vier overgebleven ratten is 100% responder aan deze stimulatie, waarvan 3 van de 4 ratten volledig aanvalsvrij.

Rat	Aanvalsfrequentie (aantal aanvallen / dag)			Verschil Baseline en Stimulatie	
	Baseline	Stimulatie	Wash-out		
DHS 1	1 (± 1)	0	1 (± 1)	Sz free	responders
DHS 2	2 (± 1)	0	22 (± 2)	Sz free	
DHS 3	8 (± 2)	0	27 (± 5)	Sz free	
DHS 4	18 (± 1)	1 (± 1)	14 (± 1)	-99%	

Tabel 3: Aanvalsfrequentie van de ratten (n=4) tijdens de drie perioden. Deze waarden zijn weergegeven als gemiddelde (\pm SEM). Ratten met een aanvalsreductie van minstens 50% worden beschouwd als responders.

3.5. *Multifocale versus unifocale stimulatie*

De aanvalsreducties tijdens ventrale en dorsale unifocale stimulatie en multifocale stimulatie worden weergegeven voor acht ratten in tabel 4. DHS 1 tot en met 4 zijn ratten waarbij beide elektroden correct gepositioneerd zijn. 75% van deze dieren zijn reeds aanvalsvrij tijdens unifocale stimulatie. Eén dier daarentegen vertoont een stijging in aanvalsfrequentie tijdens ventrale stimulatie en een onveranderde frequentie tijdens dorsale stimulatie. Tijdens multifocale stimulatie is deze rat aanvalsvrij, wat wijst op een extra effect veroorzaakt door multifocale stimulatie ten opzichte van unifocale stimulatie.

Bij DHS 5 en 6 zit enkel de dorsale stimulatie-elektrode op de correcte positie. Dorsale unifocale stimulatie vertoont hier reeds een sterk aanvalsonderdrukkend effect, maar opnieuw is dit effect groter tijdens multifocale stimulatie. Tijdens ventrale unifocale stimulatie vertoont één dier een daling in aanvalsfrequentie, ondanks de foutieve elektrodepositie.

DHS 7 en 8 tot slot bezitten een correct gepositioneerde ventrale elektrode en een foutief geplaatste dorsale elektrode. Ventrale unifocale stimulatie vertoont een aanvalsonderdrukkend effect dat lager is in vergelijking met deze van dorsale unifocale stimulatie bij DHS 5 en 6. Ook hier vertoont multifocale stimulatie een sterker effect dan unifocale stimulatie met aanvalsvrijheid bij beide ratten als gevolg. Ondanks de foutieve dorsale elektrodepositie wordt één van beide ratten aanvalsvrij tijdens dorsale stimulatie.

Rat	Aanvalsfrequentie (aantal aanvallen / dag)			Correcte elektrode positie
	Ventrale	Dorsale	Multifocale	
DHS 1	1492%	0%	Sz free	Beide
DHS 2	Szfree	Szfree	Sz free	
DHS 3	Sz free	-99%	Sz free	
DHS 4	Sz free	-99%	-99%	
DHS 5	13%	-95%	Sz free	Dorsale
DHS 6	-44%	-88%	-93%	
DHS 7	-50%	Szfree	Sz free	Ventrale
DHS8	-85%	118%	Sz free	

Tabel 4: Aanvalsfrequentie van acht ratten tijdens ventrale, dorsale en multifocale stimulatie. Bij DHS 1 tot 4 zijn beide stimulatie-elektroden correct. DHS 5 en 6, en 7 en 8 zijn ratten die ook geïncubeerd werden bij de unifocale proef waarbij respectievelijk enkel de dorsale en ventrale stimulatie-elektrode correct zat. Bij alle dieren waarbij aanvalsvrijheid nog niet werd bereikt tijdens unifocale stimulatie, werd een verbetering in aanvalsfrequentie gezien tijdens multifocale stimulatie.

4. Bespreking

4.1. *Inclusiecriteria*

4.1.1. Histologische weefselschade

Het grootste probleem dat optrad tijdens het experiment was het plotse overlijden van een grote groep ratten. De hersenen van deze ratten werden bestudeerd en grote laesies waarbij de volledige hippocampus verdwenen was, werden geobserveerd. Een eerste mogelijke oorzaak voor deze hersenschade is het stimulatieprotocol. Deze overlijdens kwamen echter enkel voor tijdens de eerste stimulatieperioden, zowel bij stimulators die unifocale als multifocale stimulatie leverden. Hierdoor lijkt een invloed van het stimulatieprotocol eerder onwaarschijnlijk. Een tweede mogelijke oorzaak is een probleem in de opstelling. Er stierven enkel dieren tijdens de eerste stimulatieperioden en niet tijdens de baselineperioden, wat deed vermoeden dat de oorzaak te zoeken was bij de stimulators die toen voor het eerst gebruikt werden. De stimulatieopstellingen werden tijdens de proef nog gecontroleerd, waarbij bleek dat het probleem zich inderdaad voordeed ter hoogte van de stimulator. De specifieke oorzaak kon pas na de proef opgehelderd worden. Door de aanwezigheid van een kleine lekstroom – gelijkstroom, DC - wordt het milieu rond de ene elektrode acidisch en rond de andere alkalisch, wat hersenbeschadiging tot gevolg kan hebben. Deze lekstroom kan variëren afhankelijk van de omstandigheden en kan hoog oplopen met zware hersenschade en het overlijden van een aantal ratten tot gevolg. Hoewel de stimulators grondig werden uitgetest, werd dit probleem niet opgemerkt voor de start van dit experiment. Het is dus noodzakelijk een oplossing te vinden waarbij deze lekstroom onder controle kan gehouden worden bij volgende proeven.

Ook bij een deel van de dieren die de volledige proef doorlopen hebben, was een dergelijke hersenschade te zien. Deze laesionale schade zou de resultaten van dit experiment in vraag kunnen stellen. Een vaak gebruikte behandeling voor refractaire epilepsie is namelijk het chirurgisch verwijderen van de epileptogene focus, met een daling in aanvalsfrequentie tot gevolg. [9, 13] Om deze bias te elimineren, was het belangrijk enkel de gegevens van de dieren, waarbij nauwelijks tot geen schade in het weefsel rondom de elektroden te zien was, in rekening te brengen. Toch is het noodzakelijk deze proef te herhalen om te bevestigen dat multifocale stimulatie geen schade veroorzaakt en het aanvalsonderdrukkend effect effectief het gevolg is van deze stimulatie.

4.1.2. Elektrodepositie

Een tweede belangrijke inclusievoorwaarde was de correcte positie van zowel de dorsale als de ventrale stimulatie-elektrode. Bij de meeste dieren zat de dorsale stimulatie-elektrode correct in de dorsale hippocampus, de ventrale elektrode bevond zich echter vaak teveel mediaal, net op de rand van of naast de ventrale hippocampus. Hoewel de coördinaten voorgaande aan de proef geoptimaliseerd werden, bleken de elektroden niet altijd op de correcte plaats te zitten. Dit kan het gevolg zijn van individuele variaties in de grootte van de hersenen en de vorm van bepaalde structuren. Tussen de optimalisatie van de coördinaten en de implantatie van de elektroden bij een aantal gebruikte dieren zat een periode van een maand, waardoor verschil in ouderdom een invloed kan hebben op coördinaten door onder andere verdikking van de schedel. Deze foutieve elektrodeposities kunnen ook te wijten zijn aan de flexibiliteit van de elektrode. Aangezien de ventrale hippocampus een dieper gelegen structuur is moet de elektrode een langere weg doorheen het weefsel doorlopen. Hierdoor kan het gebeuren dat de elektrode wat afbuigt en ongewild schuiner geïmplanteerd wordt in de hersenen. Toch leek dit in eerdere studies waarbij elektroden diep in de hersenen werden geïmplanteerd geen probleem. [15, 17] Dit zou kunnen opgelost worden door een hulpmiddel te gebruiken dat reeds gebruikt wordt bij patiënten en onderzocht wordt bij primaten. Zowel met behulp van beeldvorming (MRI-begeleide implantatie) als elektrofysiologische begeleiding kan tijdens de operatie voorspeld worden of de elektrode zich op de correcte positie bevindt en indien nodig kan deze aangepast worden. [31]

4.2. *Effect op aanvalsfrequentie en responders*

Multifocale diepe hersenstimulatie werd voor deze proef enkel nog maar uitgetest bij een aantal dystoniepatiënten. Zowel Capelle et al. als Trottenberg et al. observeerden geen verbetering door toepassing van multifocale stimulatie in de GPi en respectievelijk de ventrolaterale thalamus en ventrale intermediaire thalamische nucleus bij een patiënt met dystonie. [32, 33] Woehrle et al. beschreef echter wel een effect van simultane stimulatie van de subthalamische nucleus (STN) en globus pallidus pars interna (GPi) bij een patiënt met dystonie-Parkinsonisme. De stimulatie van de STN onderdrukte de Parkinsonsymptomen, de stimulatie van de GPi verlichtte de dystoniesymptomen. Door continue bilaterale stimulatie van beide nuclei was een opmerkelijke verbetering van beide symptomen te zien waaruit bleek dat de stimulatie van een tweede nucleus een additief effect biedt. [34] Naast deze studies is multifocale stimulatie nog niet onderzocht.

Ook bij epilepsiepatiënten (en diermodellen) werd dit stimulatieprotocol nooit eerder uitgetest. In deze studie werd het effect op aanvalsfrequentie van continue multifocale stimulatie (10 dagen) van de dorsale en ventrale hippocampus onderzocht in het kainaatmodel. Een significante aanvalsreductie van 99,75% bij de geïncludeerde dieren (n=4) werd geobserveerd (p-waarde <0,01). Alle ratten zijn responder voor de therapie, waarvan 75% volledig aanvalsvrij.

Ter vergelijking, Wyckhuys et al. onderzocht eerder het effect van continue unifocale stimulatie in de intermediaire hippocampus bij hetzelfde diermodel. In deze studie werd het effect van hoogfrequente Poisson verdeelde stimulatie (PVS) vergeleken met hoog frequentie stimulatie met een vast interpuls interval (HFS). Een gemiddelde aanvalsreductie van 26% werd geobserveerd bij PVS, waarbij 54% van de ratten responder waren. Binnen deze respondergroep steeg de gemiddelde reductie naar 67% (p<0,01). Bij HFS stimulatie bleek het effect nog lager te zijn: 45,5% responders met een gemiddelde aanvalsreductie van 50% (p<0,01). [15] Zoals eerder vermeld, is bij hoogfrequente continue hippocampale DHS bij patiënten wel een aanvalsonderdrukkend effect op te merken, maar aanvalsvrijheid zonder gebruik van AED's wordt meestal niet bereikt. Ongeveer 70% van de patiënten bereikt een aanvalsreductie van meer dan 50% en is dus responder op continue hippocampale DHS. [14, 18] Ook in studies waarbij een andere hersenstructuur wordt gestimuleerd, is het effect iets minder indrukwekkend. Takebayashi et al. bijvoorbeeld toonde een aanvalsreducerend effect van 67% bij stimulatie van de anterieure thalamische nucleus. Door bilaterale stimulatie van deze structuur, wat ook beschouwd kan worden als multifocaal, werd deze aanvalsreductie verhoogd naar 86%. [35]

Onze hypothese dat multifocale stimulatie een groter hersenvolume zou stimuleren waardoor een groter aanvalsonderdrukkend effect veroorzaakt wordt, zou een verklaring kunnen zijn voor het verschil in resultaten met unifocale studies. Deze hypothese werd al eerder gesuggereerd door Rashid et al., die kon aantonen dat lage frequentiestimulatie van de ventrale hippocampale commissuur (VHC) een sterk aanvalsonderdrukkend effect vertoont bij post-status epilepticus model geïnduceerd door elektrische stimulatie van de amygdala. De VHC vormt bij de rat een commissurale verbinding tussen beide hippocampi. Het stimuleren van deze structuur zou een groot volume van beide hippocampi beïnvloeden, wat de gemiddelde aanvalsreductie van 90% zou kunnen verklaren. [36]

De effecten van multifocale stimulatie treden onmiddellijk op bij het aanschakelen van de PVS, en verdwijnen onmiddellijk na het uitschakelen. De aanvalsfrequentie stijgt onmiddellijk na het stoppen van de stimulatie, waaruit blijkt dat dit stimulatieprotocol geen outlasting effect veroorzaakt en dus geen langdurig modulerend effect induceert. Dit werd eerder ook geobserveerd en gesuggereerd door Wyckhuys et al. bij gebruik van hoog frequente PVS [15]. In tegenstelling tot de studie van Wyckhuys et al. is er in deze studie zowel tussen de stimulatie- en wash-outperiode, als tussen baseline- en wash-outperiode een significant verschil in aanvalsfrequentie. Tussen de baseline- en wash-outperiode werd zelfs een gemiddelde stijging van 106% geobserveerd, veroorzaakt door een enorme stijging in aanvalsfrequentie in de wash-outperiode van twee ratten (50% van de geïncubeerde dieren). Deze stijging kan verklaard worden aan de hand van het verloop van het kinaat-geïnduceerde diermodel, zoals eerder afgebeeld in figuur 3. Na de status epilepticus, geïnduceerd door de herhaaldelijke injectie van kinaat, volgt een latente fase zonder epileptische aanvallen. Pas vanaf een bepaald tijdstip na de injectie ontstaan de eerste spontane aanvallen. Vanaf dat moment stijgt de frequentie van deze aanvallen exponentieel in de tijd tot het dier een plateaufase bereikt waarop de frequentie van de aanvallen min of meer stabiel blijft. [27] Typisch voor dit model is de grote variabiliteit tussen dieren, zowel veroorzaakt door de intrinsieke eigenschappen van de individuele ratten als door het inductieprotocol. Hierdoor is het mogelijk dat een aantal dieren een langere latente periode en een tragere stijging in aanvalsfrequentie doormaken dan andere ratten, ondanks een inductie en status epilepticus op hetzelfde moment. [28, 29]

4.3. *Multifocale versus unifocale stimulatie*

Niet enkel het effect van multifocale stimulatie bij MTLE is belangrijk, maar ook wat dit stimulatieprotocol extra bijdraagt ten opzichte van de conventionele unifocale diepe hersenstimulatie kan interessant zijn. Hoewel het onmogelijk is hierop een afdoend antwoord te bieden in deze masterproef, kan toch een eerste observatie gebeuren op basis van deze gegevens. Om dit te kunnen doen, wordt verwezen naar de resultaten besproken in de masterproef van Valérie Du Caju.

4.3.1. Multifocale hippocampale stimulatie

Aan de hand van de inclusiecriteria eerder besproken zijn er slecht vier ratten weerhouden, waarvan beide stimulatie-elektroden op de correcte positie zitten. 75% van deze dieren vertonen reeds een aanvalsvrijheid bij unifocale stimulatie. Bij één dier echter werd geen verbetering gezien met behulp van dorsale noch ventrale unifocale stimulatie. Tijdens multifocale stimulatie werd deze rat toch aanvalsvrij. Dit kan gezien worden als een aanwijzing dat multifocale stimulatie in de dorsale en ventrale hippocampus een oplossing kan bieden voor non-responders of tot betere resultaten bij responders van unifocale hippocampale stimulatie. Een verklaring hiervoor kan opnieuw gelinkt worden aan onze hypothese die stelt dat de stimulatie van een groter hersenvolume een sterker aanvalsonderdrukkend effect veroorzaakt. Zo zal de kans dat de epileptogene focus beïnvloed wordt vergroten en dit kan resulteren in een grotere daling van aanvalsfrequentie.

4.3.2. Extrahippocampale multifocale stimulatie

Bij vier ratten waarvan één van beide elektroden zich niet in de hippocampus bevond, werd opnieuw een dergelijk sterker effect van multifocale stimulatie ten opzichte van unifocale hippocampale stimulatie opgemerkt. Ook hier werden 75% van deze dieren aanvalsvrij. Ook moet opgemerkt worden dat bij deze vergelijking gezien werd dat, ondanks een foute elektrodepositie, bij 50% van de dieren toch een zwak aanvalsreducerend effect veroorzaakt wordt door unifocale stimulatie in die elektrode.

Een eerste mogelijke verklaring voor deze waarnemingen kan opnieuw gevonden worden in de hypothese die suggereert dat door multifocale stimulatie een groter hersenvolume wordt gestimuleerd, waardoor de hippocampus mogelijks toch beïnvloed werd. Een andere mogelijkheid is de invloed door stimulatie van structuren in de buurt van de hippocampus die ook een rol spelen bij de generatie, propagatie of generalisatie van epileptische aanvallen. De structuren waarin deze elektroden zich bevonden, waren de substantia nigra pars reticulata (SNr) voor de ventrale stimulatie-elektroden en de laterale posterieure thalamische nucleus (LP) voor dorsale stimulatie-elektrode. Deze bevindingen suggereren dat multifocale stimulatie een oplossing kan bieden voor non-responders en misschien zelfs kan leiden tot aanvalsvrijheid.

4.4. *Mogelijke werkingsmechanismen*

Wat diepe hersenstimulatie precies veroorzaakt in de hersenen en hoe dit de neuronale netwerken exact beïnvloed is nog niet goed gekend. Hierboven werd reeds eerder vermeld dat lange termijn effecten bij PVS waarschijnlijk afwezig zijn, door het herstel van aanvalsfrequentie in de wash-outperiode. Dit werd eerder al gesuggereerd door Wyckhuys et al., waardoor de hypothese dat LTP aan de basis van de anticonvulsieve effecten ligt minder plausibel lijkt. [15] Wat wel mogelijke actiemechanismen van DHS zijn, werd reeds beproven in hoofdstuk 1.4.3 en valt buiten de scope van dit onderzoek. Wel kan het interessant zijn in deze studie te verklaren waarom multifocale stimulatie zo een sterk aanvalsonderdrukkend effect vertoont en een extra effect biedt ten opzichte van unifocale hippocampale stimulatie.

4.4.1. Stimulatievolume

De hypothese waarin wordt gesteld dat multifocale stimulatie een groter hersenvolume stimuleert en beïnvloed, wat zou leiden tot een daling in aanvalsfrequentie kan aan de basis liggen van dit effect. Deze hypothese is gebaseerd op een μ SPECT studie waarbij werd geobserveerd dat tijdens stimulatieprotocols, waarvan geweten was dat deze een groter aanvalsonderdrukkend effect veroorzaken, een grotere hypoperfusie veroorzaken in de hippocampus. [20]

Bij intrahippocampale injectie van kainaat kent men de exacte locatie van deze focus, maar in het geval van intraperitoneale injectie is de locatie van deze focus niet exact gekend. [28] Het gebruik van een groter stimulatievolume zal de kans dat deze epileptogene focus wordt gestimuleerd, vergroten. Dit zou niet alleen het extra effect van multifocale stimulatie bij dieren waarbij beide elektroden zich in de hippocampus bevinden, kunnen verklaren, maar ook indien deze elektrode in de buurt van de hippocampus zit bij ratten met een foutief gepositioneerde elektrode.

Welk volume exact beïnvloed wordt door deze multifocale stimulatie, is moeilijk te bepalen door de heterogeniteit van het weefsel rondom de stimulatie-elektrode. Butson et al. ontwikkelde reeds een mathematisch model waarbij het volume geactiveerd weefsel bij DHS ter hoogte van de STN als behandeling voor de ziekte van Parkinson wordt voorspeld. [37] Dergelijk model werd echter nog niet ontwikkeld voor DHS bij epilepsiepatiënten en proefdieren. Het kennen van het gestimuleerde volume bij multifocale stimulatie zou een enorme vooruitgang kunnen bieden in het inschatten van de effecten en het vermijden van mogelijke neveneffecten door het ongewild stimuleren van omliggende structuren.

4.4.2. Omliggende netwerken

Bij 50% van de dieren met een foutief gepositioneerde stimulatie-elektrode werd een zwak aanvalsreducerend effect geobserveerd bij unifocale stimulatie van deze elektrode. Multifocale stimulatie, waarvan één elektrode zich in de hippocampus bevindt, van deze dieren vertoonde een sterk aanvalsonderdrukkend effect. Tijdens histologie bleek dat deze foutief gelokaliseerde elektroden zich bevonden in de buurt van andere structuren rond de hippocampus, die al dan niet een rol spelen in de propagatie of generalisatie van de epileptische aanvallen. Deze structuren zouden dus een rol kunnen spelen in het waargenomen effect.

De substantia nigra pars reticulata (SNr) maakt deel uit van de basale ganglia en bevindt zich mediaal ten opzichte van de ventrale hippocampus. [14, 30] De SNr speelt een rol in de transmissie van GABA, waardoor deze, samen met onder andere de STN, een belangrijke rol speelt in de inhibitie en dus ook in de spreiding van de epileptische aanvallen. [38, 39] In eerdere studies werd het effect van diepe hersenstimulatie van de SNr onderzocht. Velíšek L et al. toonde aan dat hoog-frequente stimulatie van de SNr een anticonvulsief effect veroorzaakt bij ratten met flurothyl-geïnduceerde aanvallen. Er werd gesuggereerd dat dit inhiberend effect het gevolg is van de depolarisatie van de SNr en GABA-vrijstelling veroorzaakt door directe stimulatie. [38] Dit anticonvulsief effect kon ook aangetoond worden in het kinaat-geïnduceerde diermodel door Usui et al. In deze studie leek de unilaterale stimulatie in de SNr echter minder effectief te werken dan stimulatie van de STN. [39]

In de buurt van de dorsale hippocampus bevindt zich de thalamus die wordt gezien als een belangrijke structuur in de spreiding van epileptische aanvallen en is onderverdeeld in bepaalde nuclei. Tot op heden is enkel het effect van DHS onderzocht op de centromediane en anterieure thalamische nuclei en de nucleus reticularis. [14] Het effect op de laterale posterieure thalamische nucleus (LP), die het dichtst bij de bedoelde positie van de dorsale stimulatie-elektrode gelegen is, werd daarentegen nog niet onderzocht. [14, 30] Toch bestaat er enige evidentie dat deze structuur wel betrokken zou zijn bij de controle van epileptische activiteit. Zo zou deze connecties met de hippocampus vertonen en is er een stijging in cerebrale metabole activiteit geobserveerd bij het pilocarpine-geïnduceerde diermodel. [40]

De SNr en LP zijn hier uiteraard slechts een aantal voorbeelden van omliggende structuren die een rol kunnen spelen in epilepsie en effect zouden kunnen hebben van DHS. Stimulatie van deze structuren kan een verklaring zijn waarom er bij 50% van de ratten met foutieve elektrodepositie toch een zwak reducerend effect geobserveerd werd tijdens de unifocale stimulatie van deze niet-hippocampale elektrode. De bijdrage van deze structuur kan ook een verklaring zijn voor het extra effect van de multifocale stimulatie ten opzichte van unifocale hippocampale stimulatie bij deze ratten. Uiteraard is het niet zeker dat deze structuren effectief gestimuleerd werden in dit experiment. De exacte elektrodepositie van de foutief gelokaliseerde elektroden werd immers niet nagegaan en het exacte stimulatievolume is niet gekend. Hoewel in deze proef alle ratten met een verkeerde elektrodepositie weerhouden werden uit de resultaten, kan het dus toch interessant zijn het effect van multifocale stimulatie waarbij één van de elektroden buiten de hippocampus ligt, te vergelijken met unifocale stimulatie in de hippocampus.

4.4.3. Asynchroniteit van het netwerk

Wyckhuys et al. impliceerde dat het gebruik van een asynchrone PVS de synchroniteit, nodig voor het ontstaan en de spreiding van epileptische aanvallen, verstoort. [15] In deze studie werd gebruik gemaakt van twee stimulatie-elektroden, telkens met een Poisson verdeeld stimulatiepatroon, onafhankelijk van elkaar. Door de dorsale elektrode onafhankelijk van de ventrale elektrode te stimuleren werd een onregelmatigheid van het stimulatiepatroon gegenereerd. Het gevolg hiervan zou kunnen zijn dat het neuronale netwerk, dat door beide stimulatie-elektroden wordt beïnvloed, een sterkere asynchroniteit vertoont wat uiteindelijk zou kunnen leiden tot een sterkere aanvalsreductie.

4.5. Toekomstperspectieven

Uit de resultaten van deze studie blijkt multifocale stimulatie een enorm aanvalsonderdrukkend effect te veroorzaken. Hoewel deze resultaten statistisch significant zijn, is het toch noodzakelijk de proef te herhalen met een groter aantal dieren om de resultaten te bevestigen. Het volledig uitsluiten van hippocampale schade als oorzaak van de geobserveerde veranderingen in de aanvalsfrequentie is hierbij van groot belang. Daarnaast kan het interessant zijn verder na te gaan welke voordelen multifocale stimulatie biedt ten opzichte van unifocale stimulatie. Zoals eerder vermeld kan dit stimulatieprotocol een oplossing bieden voor non-responders, aangezien in deze studie een sterker effect geobserveerd werd in vergelijking met unifocale stimulatie in dezelfde ratten. Ook dit moet opnieuw bevestigd worden, zowel met multifocale hippocampale stimulatie als multifocale stimulatie waarbij één van beide elektroden zich in een andere structuur die bij het epileptogeen proces betrokken is, bevindt. Belangrijk hierbij is dat de positionering van de stimulatie-elektroden correct gebeurt, eventueel met behulp van elektrofysiologische methoden of beeldvorming. Ook zou het interessant zijn na te gaan welk volume wordt gestimuleerd bij dit protocol om meer te weten te komen over de ideale stimulatieparameters. Vooraleer de stimulators, die werden gebruikt in deze studie, opnieuw aangewend worden, is het nodig een oplossing te vinden voor de problemen die zich hebben voorgedaan en een correcte werking hiervan te valideren.

Indien deze studies de sterk aanvalsonderdrukkende effecten van multifocale stimulatie en het sterker effect ten opzichte van unifocale stimulatie bevestigen, is het noodzakelijk na te gaan welke neveneffecten dit stimulatieprotocol kan veroorzaken vooraleer over te gaan op klinische studies. Niet alleen de mogelijke weefselschade veroorzaakt op korte of lange termijn, maar ook neveneffecten in overeenstemming met de functie van de gestimuleerde structuren moeten worden onderzocht. Zo zal onder andere moeten worden nagegaan wat DHS doet met het geheugen bij multifocale hippocampale stimulatie. Voor de dorsale hippocampus zou dit voornamelijk het spatiaal geheugen en de navigatie kunnen beïnvloeden, de ventrale hippocampus daarentegen is belangrijk bij autonome, endocriene, defensieve, reproductieve, sociale en emotionele controlesystemen. [22] Veranderingen in deze systemen kan worden getest met behulp van gedragsproeven zoals de radial arm maze en Barnes maze. Stimulatie in de substantia nigra zou eventueel kunnen leiden tot extrapiramidale symptomen. [14] Het is dus belangrijk de kans op het voorkomen van dergelijke neveneffecten in te schatten vooraleer klinische studies worden uitgevoerd. Tot slot is verder onderzoek naar de mogelijk betrokken werkingsmechanismen bij DHS en meer specifiek multifocale DHS ook noodzakelijk.

5. Algemeen besluit

Multifocale stimulatie in de dorsale en ventrale hippocampus veroorzaakt een sterk aanvalsonderdrukkend effect in het kainaat-geïnduceerde post status epilepticus ratmodel wat model staat voor patiënten met temporale kwab epilepsie. In deze masterproef werd een aanvalsonderdrukkend effect van 99,75% geobserveerd met een respondersratio van 100%. Aanvalsvrijheid werd zelfs bekomen bij 75% van deze dieren. Dit stimulatieprotocol bleek ook een sterker effect te hebben dan unifocale stimulatie in de ventrale of dorsale hippocampus bij dezelfde dieren, waardoor dit eventueel een oplossing zou kunnen bieden voor non-responders of zou kunnen leiden tot het verder afbouwen van AED's bij responders van unifocale hippocampale stimulatie. Een mogelijke verklaring voor dit effect is gebaseerd op de hypothese dat multifocale stimulatie een groter hersenvolume stimuleert met een sterkere aanvalsreductie tot gevolg. Ook het stimulatieprotocol waarbij twee Poisson verdeelde stimulaties asynchroon van elkaar werden gebruikt, kan hier een verklaring bieden door het induceren van een sterke asynchroniteit in het neuronale netwerk.

Dit sterker effect werd ook waargenomen bij multifocale stimulatie waarvan één van beide stimulatie-elektroden niet in de hippocampus gelokaliseerd was. Betrokkenheid van omliggende structuren die betrokken zijn bij de propagatie van epileptische aanvallen, kan dit verklaren. Het kan dus interessant zijn deze resultaten te bevestigen in een opvolgproef en na te gaan of multifocale stimulatie in andere locaties, betrokken bij epileptische activiteit, dit effect ook veroorzaakt.

6. Referenties

- [1] Pitkänen A, Kharatishvili I, Harhunen H, Lukasiuk K, Immonen R, Nairismägi J, Gröhn O, Nissinen J (2007). Epileptogenesis in experimental models. *Epilepsia* 48 Suppl 2:13-20.
- [2] Banerjee PN, Filippi D, Hauser WA (2009). The descriptive epidemiology of epilepsy – a review. *Epilepsy Research* 85,31-45.
- [3] Boon P (2010). Hoofdstuk 17: Epilepsie. In: *Klinische neurologie*. Ugent, pp. 121-127.
- [4] Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, Boas WVE, Engel J, French J, Glauser TA, Mathern GW, Moshé SL, Nordli D, Plouin P, Scheffer IE (2010). Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia* 51(4):676-685.
- [5] Wuyckhuys T, Raedt R, Vonck K, Wadman W, Boon P (2009). Comparison of hippocampal Deep Brain Stimulation with high (130 Hz) and low frequency (5 Hz) on afterdischarges in kindled rats. *Epilepsy Research* 88:239-246.
- [6] Sharma AK, Reams RY, Jordan WH, Miller MA, Thacker HL, Snyder PW (2007). Mesial temporal lobe epilepsy: pathogenesis, induced rodent models and lesions. *Toxicologic Pathology* 35:984-999.
- [7] O'Dell CM, Das A, Wallace G IV, Ray SK, Banik NL (2012). Understanding the basic mechanisms underlying seizures in mesial temporal lobe epilepsy and possible therapeutic targets: a review. *Journal of Neuroscience Research* 90:913-924.
- [8] Dalby NO, Mody I (2001). The process of epileptogenesis: a pathophysiological approach. *Current Opinion in Neurology* 14:187-102.
- [9] Schuele SU, Lüders HO (2008). Intractable epilepsy: management and therapeutic alternatives. *The Lancet Neurology* 7:514-524.
- [10] Kossoff EH, Hartman AL (2012). Ketogenic diets: new advances for metabolism-based therapies. *Current Opinion in Neurology* 25(2):173-178.
- [11] Theodore WH, Fisher RS (2004). Brain stimulation for epilepsy. *The Lancet Neurology* 3:111-118.
- [12] Fisher RS (2012). Therapeutic devices for epilepsy. *Annals of Neurology* 71:157-168.
- [13] Pereira EAC, Green AL, Stacey RJ, Aziz TZ (2012). Refractory epilepsy and deep brain stimulation. *Journal of Clinical Neuroscience* 19:27-33.
- [14] Wyckhuys T, Geerts PJ, Raedt R, Vonck K, Wadman W, Boon P (2009). Deep brain stimulation for epilepsy: knowledge gained from experimental animal models. *Acta Neurologica Belgica* 109(2):63-80.
- [15] Wyckhuys T, Boon P, Raedt R, Van Nieuwenhuysse B, Vonck K, Wadman W (2010). Suppression of hippocampal epileptic seizures in the kainate rat by Poisson distributed stimulation. *Epilepsia* 51(11):2297-2304.
- [16] Goodman JH, Berger RE, Tchong TK (2005). Preemptive low-frequency stimulation decreases the incidence of amygdala-kindled seizures. *Epilepsia* 46:1-7.
- [17] Wyckhuys T, De Smedt T, Claeys P, Raedt R, Waterschoot L, Vonck K, Van den Broecke C, Mabilde C, Leybaert L, Wadman W, Boon P (2007). High frequency deep brain stimulation in the hippocampus modifies seizure characteristics in kindled rats. *Epilepsia* 48(8):1543-1550.

- [18] Boon P, Vonck K, De Herdt V, Van Dycke A, Goethals M, Goossens L, Van Zandijcke M, De Smedt T, Dewaele I, Achten R, Wadman W, Dewaele F, Caemaert J, Van Roost D (2007). Deep brain stimulation in patients with refractory temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 48(8):1551-1560.
- [19] Wyckhuys T (2004-2008). Deep brain stimulation in experimental animal models of epilepsy (dissertation). Gent: Universiteit Gent.
- [20] Wyckhuys T, Staelens S, Van Nieuwenhuysse B, Deleye S, Hallez H, Vonck K, Raedt R, Wadman W, Boon P (2010). Hippocampal deep brain stimulation induces decreased rCBF in the hippocampal formation of the rat. *Neuroimage* 52:55-61.
- [21] Fanselow MS, Dong HW (2010). Are the dorsal and ventral hippocamps functionally distinct structures? *Neuron* 65:7-19.
- [22] Moser MB, Moser EI (1998). Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus* 8:608-619.
- [23] Dong HW, Swanson LW, Chen L, Fanselow MS, Toga AW (2009). Genomic-anatomic evidence for distinct functional domains in hippocampal field CA1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(28):11794-11799.
- [24] Marieb EN, Mallatt J, Wilhelm PB (2008). The central nervous system. In: *Human anatomy*. 5th edition, San Francisco: Pearson Education, pp. 372-424.
- [25] Bernard C (2006). Hippocampal slices: designing and interpreting studies in epilepsy research. In: *Models of seizures and epilepsy*. Pitkänen A, Schwartzkroin P, Moshé SL, editors. Elsevier Academic Press, pp. 59-72.
- [26] Löscher W (1997). Animal models of intractable epilepsy. *Progress in Neurobiology* 53:239-258.
- [27] Williams PA, White AM, Clark S, Ferraro DJ, Swiercz W, Staley KJ, Dudek FE (2009). Development of spontaneous recurrent seizures after kainate-induced status epilepticus. *Neurobiology of Disease* 29(7):2103-2112.
- [28] Dudek FE, Clark S, Williams PA, Grabenstatter HE (2006) Kainate-induced status epilepticus: a chronic model of acquired epilepsy. In: *Models of seizures and epilepsy*. Pitkänen A, Schwartzkroin P, Moshé SL, editors. Elsevier Academic Press, pp. 415-432.
- [29] Hellier JL, Patrylo PR, Buckmaster PS, Dudek FE (1998). Recurrent spontaneous motor seizures after repeated low-dose systemic treatment with kainate: assesment of a rat model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research* 31:73-84.
- [30] Paxinos G, Watson C (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 4th edition, Academic Press, San Diego.
- [31] Miocinovic S, Zhang J, Xu W, Russo GS, Vitek JL, McIntyre CC (2007). Stereotactic neurosurgical planning, recording, and visualisation for deep brain stimulation in non-human primates. *Journal of Neuroscience Methods* 162:32-41.
- [32] Capelle HH, Grips E, Weigel R, Blahak C, Hansjorg B, Wohrle JC, Kraus JK (2006). Posttraumatic peripherally-induced dystonia and multifocal deep brain stimulation: Case report. *Neurosurgery* 59(3):702.
- [33] Trottenberg T, Paul G, Meissner W, Maier-Hauff K, Taschner C, Kupsch A (2001). Pallidal and thalamic neurostimulation in severe tardive dystonia. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry* 70(4):557-559.
- [34] Wohrle JC, Blahak C, Capelle HH, Fogel W, Bazner H, Krauss JK (2012). Combined pallidal and subthalamic nucleus stimulation in sporadic dystonia-parkinsonism Case report. *Journal of Neurosurgery* 116(1):95-98.

- [35] Takebayashi S, Hashizume K, Tanaka T, Hodozuka A (2007). Anti-convulsant effect of electrical stimulation and lesioning of the anterior thalamic nucleus on kainic acid-induced focal limbic seizure in rats. *Epilepsy Research* 74:163-170.
- [36] Rashid S, Pho G, Czigler M, Werz MA, Durand DM (2012). Low frequency stimulation of ventral hippocampal commissures reduces seizures in a rat model of chronic temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 53(1):147-156.
- [37] Butson CR, McIntyre CC (2008). Current steering to control the volume of tissue activated during deep brain stimulation. *Brain Stimulation* 1:9-15.
- [38] Velisek L, Veliskova J, Moshé SL (2002). Electrical stimulation of substantia nigra pars reticulata is anticonvulsant in adult and young male rats. *Experimental neurology* 173:145-152.
- [39] Usui N, Maesawa S, Kajita Y, Endo O, Takebayashi S, Yoshida J (2005). Suppression of secondary generalization of limbic seizures by stimulation of subthalamic nucleus in rats. *Journal of Neurosurgery* 102:1122-1129.
- [40] Scorza FA, Arida RM, Priel M, Calderazzo L, Cavalheiro EA (2002). The contribution of the lateral posterior and anteroventral thalamic nuclei on spontaneous recurrent seizures in the pilocarpine model of epilepsy. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria* 60(3A):572-575.