
Evaluări experimentale și clinice ale lichidului cefalorahidian cu impact în unele neuropatii centrale canine

(REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT)

Doctorand Cecilia-Gabriella Danciu

Conducător de doctorat Prof. Univ. Dr. Ognean Laurenț



INTRODUCERE

Lichidul cefalorahidian (LCR) este un ultrafiltrat plasmatic, care ocupă ventriculii cerebrali și spațiul subarahnoidian al sistemului nervos central (SNC), fiind în contact intim cu sistemul glimfatic, o structură mai puțin cunoscută a barierei hemato-encefalice (LEE, 2021).

Testele LCR sunt mai puțin elocvente pentru diagnosticul specific al bolilor neurologice, dar cu toate acestea s-au dovedit a fi analize complementare valoroase în caracterizarea acestora (BAILEY, 1985; LAMPE, 2020). Utilitatea clinică a analizelor LCR a fost evaluată în studii recente, privind boala discului intervertebral, mielopatia degenerativă, meningo-arterite, epilepsie idiopatică, tumori cerebrale primare, meningoencefalite autoimune sau infecțioase. Aceste teste s-au dovedit relevante în diagnosticul neuropatiilor preponderent inflamatorii și mai puțin utile în cele epileptice sau tumorale (SRUGO, 2011; OJI, 2007; AIOLINI, 2012; GONCALVES, 2010; NEILL, 2005). În medicina omului, evaluarea LCR este recomandată în grupuri de boli mai restrânse, precum: hemoragiile intracraniene, leucemia, meningita asociată cu encefalită/mielită sau scleroza multiplă.

Pornind de la cunoștințele de fiziologie și patologice consultate, precum și dorința continuă de a îmbunătăți practica în clinica veterinară, am ales să evaluăm experimental, distribuția în SNC a unor markeri, cu nanotuburi de carbon și utilitatea clinică a testelor LCR în anumite boli neurologice.

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI

Scopul cercetărilor întreprinse în capitolele acestei teze de doctorat, se poate rezuma la implementarea unui model leporid în investigarea sistemului glimfatic la mamifere, respectiv la evaluarea experimentală și clinică a testării LCR, în unele neuropatii și sindroame vestibulare canine.

Obiectivele generale care conturează studiile acestei lucrări se pot rezuma la:

- Evaluarea potențialului de utilizare a nanotuburilor de carbon, ca marker în investigarea sistemului glimfatic la mamifere;
- Elaborarea unor proceduri de detectare macroscopică și caracterizare prin microscopie optică a spectrului de distribuție a nanotuburilor de carbon în spațiul subarahnoidian;
- Investigarea prin proceduri imunohistochimice a toxicității nanotuburilor de carbon și caracterizarea biocompatibilității acestora;
- Analiza relevanței examenului LCR, ca test complementar în investigarea funcțională a SNC și diagnosticarea unor neuropatii centrale canine;
- Asocierea testelor diagnostice specifice cu analize LCR, pentru caracterizarea

- evoluției clinice a unor neuropatii centrale;
- Analizarea modificărilor LCR la câinii cu boală vestibulară și utilizarea acestora în caracterizarea unor forme clinice de sindroame vestibulare;
 - Evaluarea nivelului de sensibilitate și specificitate a LCR , în diferențierea unor forme clinice de boală vestibulară periferică și centrală.

STRUCTURA TEZEI

Această lucrare doctorală intitulată „**Evaluări experimentale și clinice ale lichidului cefalorahidian cu impact în unele neuropatii centrale canine**” este redactată și structurată după recomandările Școlii Doctorale USAMV și a Facultății de Medicină Veterinară din Cluj-Napoca, fiind avizată pozitiv și de Comisia de bioetică în domeniu, prin Decizia 226/03.08.2020. Teza include un număr total de 120 de pagini, dintre care 39 (32.5%) revin primei părți, compuse din 3 capitole, și 81 (67.5%) părții a doua, desfășurată pe 4 capitole.

PARTEA a I-a: Stadiul actual al cunoașterii

Prima parte constituie un ansamblu bibliografic deosebit de concis, care sintetizează și analizează comparativ noutăți de mare actualitate în domeniile abordate în teză, care au fost axate pe morfofiziologia sistemului glimfatic, respectiv pe relevanța și metodologia analizei LCR, în diagnosticul unor neuropatii centrale cu impact clinic major în neurologia veterinară canină. Aceste date bibliografice conturează o veritabilă monografie, structurată în următoarele trei capitole.

Capitolul 1, intitulat “**Actualități și perspective privind studiul sistemului glimfatic**”, prezintă, în două subcapitole, cunoștințele privind morfofiziologia sistemului glimfatic, ca structură nou definită a barierei hemato-encefalice, detaliind metodologia și rezultatele obținute în studiul acestuia la leporide și alte specii de mamifere.

Capitolul 2, “**Actualități morfofiziologice ale lichidului cefalorahidian la canine**”, este compus de asemenea din două subcapitole, în care sunt analizate comparativ noutățile privind morfologia și compoziția LCR, actualizând valorile fiziologice ale parametrilor de bază, precum numărul total de celule sau nivelul proteic, respectiv cunoștințele actuale privind mecanismele formării și funcțiile LCR.

Capitolul 3, intitulat “**Bazele și principiile metodologiei generale utilizate în analiza LCR**”, detaliază, în două subcapitole, bazele și principiile metodologiei generale utilizate în analiza LCR, dezbătând tehnicile și procedurile de investigare a LCR și relevanța clinică a acestora, precum și modificările LCR cu impact major în unele mecanisme neuropatologice.

PARTEA a II-a: Contribuția personală

Partea a II-a include, conform cerințelor privind redactarea tezelor doctorale, contribuțiile personale; acestea fiind grupate în patru capitole axate pe cele trei studii abordate care reies din obiectivele stabilite.

Contribuția personală debutează prin formularea ipotezei, scopului și obiectivelor generale, locațiile, precum și particularitățile în care s-au realizat cercetările, efectuate în vederea obținerii rezultatelor estimate.

Capitolul 4 este destinat materialelor și metodelor utilizate în această teză. Acest capitol descrie în detaliu materialul biologic necesar, urmat de investigarea "sistemului glimfatic" prin implementarea modelului leporid. S-a descris protocolul experimental de evaluare cu nanotuburi de carbon, urmat de tehnica de infuzie a acestor nanotuburi intratecal, conform modelului leporid adoptat. Concomitent, s-a detaliat și procedura de analiză histopatologică a sistemului nervos central. Nu în ultimul rând, în acest capitol sunt prezentate detaliat și procedurile utilizate în selecția pacienților canini. Așadar am descris în detaliu, metodologia aplicată în prelevarea și investigarea LCR, urmat de teste aplicate în analiza cito-morfologică și biochimică a acestuia. Pe lângă acestea, am elaborat protocoalele aplicate în evaluarea și caracterizarea imagistică a LCR. În final, sunt redată și explicate metodele utilizate în analiza biostatistică a datelor obținute.

Capitolul 5, include primul studiu intitulat "*Impactul neurologic al investigării sistemului glimfatic*", bazat pe utilizarea nanotuburilor de carbon și modelului leporid în investigarea sistemului glimfatic, care facilitează schimbul dintre lichidul interstitial și LCR. Component al barierei hemato-encefalice acest sistem este de mare interes, deoarece poate contribui la înțelegerea mecanismului multor boli neurodegenerative, în care se suspicionează alterarea acestuia. Menționăm că, astfel de cercetări au fost efectuate pe rozătoare de laborator și recent pe suine (BECHET, 2021), urmând studiul nostru pe leporide.

Cu toate că, studii experimentale bazate pe modelul cu nanotuburi de carbon în procese neurodegenerative au fost efectuate cu mai bine de un deceniu, acestea nu au căpătat o atenție deosebită în evaluarea sistemului glimfatic până în prezent. În studiul nostru pe cinci iepuri, aprobat de Comisia de Bioetică, am ales nanotuburi de carbon, de tip MWCNT-PEG, pentru evaluarea dispersiei în SNC, după administrare intratecală, și a toxicității lor, prin metoda imunohistochimică, cu enolază de neuron specific (NSE) și S100, ca markeri.

Procedura a constat în injectarea, sub anestezie generală, în *Cisterna Magna*, a 0.5 mL de MWCNT-PEG, iar după 4 ore, efectuarea unui examen morfopatologic complet, incluzând preparate histologice din encefal (colorate cu hematoxilină-eozină și marcate imunohistochimic cu NSE și S100).

Rezultatele evaluării macroscopice au relevat acumulări de MWCNT-PEG în spațiul subarahnoidian, caudal de hipofiză, lateral de chiasma optică, la nivelul piramidelor bulbare, ventral de trunchiul cerebral, de vermisul cerebelos și emisferele cerebeloase (Fig. 1). Histologic, au fost evidențiate aglomerări clare cu MWCNT-PEG, acumulate subarahnoidian și periarterial, sub formă de conglomerate amorfe, brun-negriceose în diverse zone ale spațiilor subarahnoidiene (Fig.2). Imunohistochimic, a fost relevată lipsa oricărui tip de reacție tisulară la nivelul spațiului subarahnoidian (Fig. 3 și 4).



Fig. 1. Evidențierea acumulării de nanotuburi de carbon în zona ventrală a encefalului și a trunchiului cerebral. Săgețile evidențiază zona caudală a hipofizei, cercul arterial (Cercul Willis-prima săgeată; nivelul punții-a doua săgeată; piramidele bulbare-a treia săgeată).

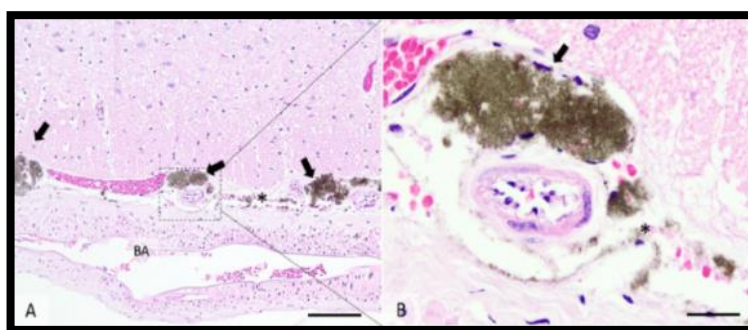


Fig. 2. Encefal (bulb și punte, zona ventrala). Acumularea de particule de carbon sub formă de agregate (amorse, granulare, brun-negriceose indicate de săgeți), la nivelul spațiilor subarahnoidiene, localizate periarterial (BA-artera bazilară). Acumularea periadventițială la nivelul colateralelor arterei bazilare (Imagine B-săgeată). (Col. H-E, x 20-A; x100-B).

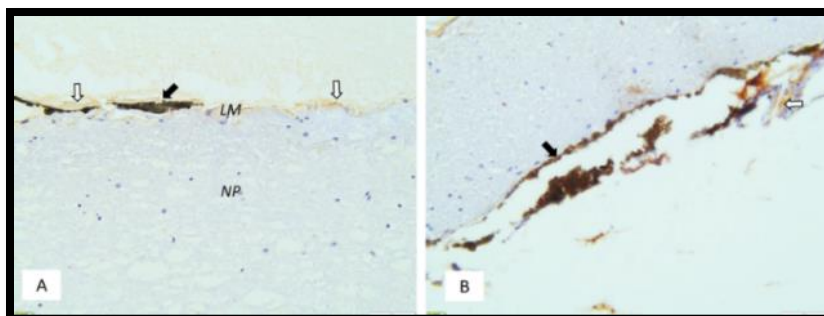


Fig.3. Imagini histologice ale imunoreacției țesutului nervos și al meningelui pentru proteina S100. La nivel submeningeal (LM), în proximitatea neuropilului (NP) (Imaginea A) se observă prezența multifocală a aglomeratelor de nanotuburi de carbon (săgeți negre) (Imaginea B). LM=leptomeninge; NP=Neuropil

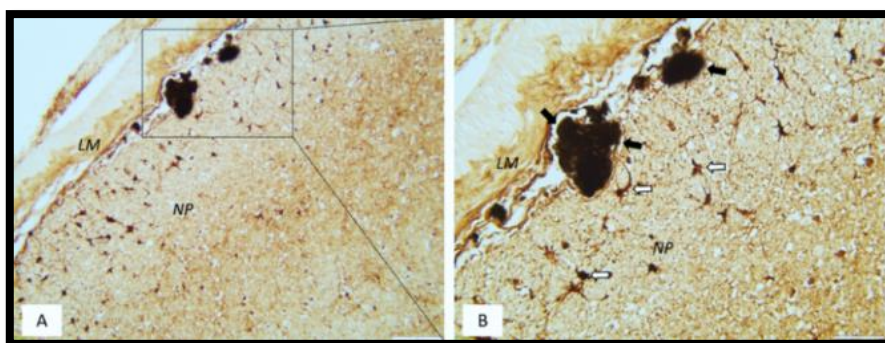


Fig. 4. Imagini histologice ale imunoreacției țesutului nervos pentru NSE (Enolaza Neuron-Specifică) (săgeți albe). La nivel submeningeal (LM) (Imaginea A), se observă prezența multifocală a aglomeratelor de nanotuburi de carbon (săgeți negre), înconjurate focal de neuroni imunomarcați de NSE (săgeți albe) (Imaginea B). LM=leptomeninge; NP=Neuropil

La finalizarea acestui studiu am concluzionat că, modelul leporid și nanotuburile se pretează pentru implementarea ca procedură nouă în investigarea sistemului glimfatic, acești markeri fiind identificabili macroscopic și histologic în urma infuziei în spațiul subarahnoidian, respectiv lipsiți de toxicitate locală.

Capitolul 6, denumit **„Evaluarea corelativă a LCR la câini cu neuropatii centrale”**, grupează un ansamblu de evaluări microscopice analizate în al doilea studiu axat pe investigarea complexă a șase pacienți canini cu patologii neurologice complexe.

Ipoteza acestui studiu reiterează caracterul paraclinic nespecific al evaluărilor LCR și necesitatea corelării lui cu investigațiile imagistice complementare.

Studiul a fost efectuat pe parcursul unei perioade de 6 luni în clinicile și laboratoarele FMV Cluj-Napoca, grupând câini meșiși (n=3), Bulldog Francez (n=1), Dog Argentinian (n=1) și Ciobănesc Mioritic (n=1), între 1.5 și 7 ani. Aceștia au prezentat la examenul neurologic simptome relevante, precum: alterarea stării de conștiență, torticolis, lipsa răspunsului de amenințare, lipsa reflexului palpebral, mers în manej și hiperestezie cervicală.

Coroborarea simptomelor semnalate a indicat localizări neurologice multifocale și focale, iar imagistic a fost observată o masă hiperatenuantă în ventricolul lateral drept la un singur câine. Rezultatele testelor LCR au relevat, creșteri ale mediilor numărului total de celulele nucleate (NTCN) la 105 (20-358) Cel./ μ L și nivelurilor proteinei totale (PT) la 50 (30-100) mg/dL., în cazul pacienților analizați.

Citogramele din LCR au relevat predominarea pleocitozei monocitare și limfocitare la trei dintre cazuri, iar la alte trei cazuri a pleocitozei mixte. Conform bibliografiilor consultate, pleocitoza monocitară și limfocitară poate fi asociată cu meningoencefalită granulomatoasă sau cu unele infecții virale, precum jigodia (O'NEILL, 2005). În acest context amintim, că virusul jigodiei a fost confirmat prin testul de imunofluorescență la unul dintre pacienți. Amintim de asemenea că, în cazul pacientului cu formațiunea intraventriculară și pleocitoza mixtă (Fig. 5), s-a confirmat histologic, papilomul de plex coroid. Modificările LCR ale acestuia au relevat pleocitoză mixtă cu macrofage active, formând conglomerate, alături de neutrofile și limfocite.

Menționăm totodată că, la ceilalți pacienți canini am suspiciat evoluția unor forme de meningoencefalite mediate imun, după cum au relevat modificările celularității LCR, fapt constatat și de alți cercetători în domeniu (O'NEILL, 2005).

Rezultatele acestui studiu au permis formularea unor concluzii, care conturează condițiile aplicării analizelor cito-morfologice și biochimice ale LCR în clinica veterinară. În acest context reamintim, probabilitatea ca pleocitoza monocitară și/sau limfocitară evidențiată în citogramele LCR să fie corelată, cu evoluția unei meningoencefalite granulomatoase sau a unei meningoencefalite cauzate de virusul jigodiei. Se consideră de asemenea că, coroborarea datelor furnizate de investigații CT și LCR poate fi utilă și în clarificarea suspiciunii de neoplazie SNC.

Apreciem că informațiile furnizate de acest studiu sunt comparabile cu multe dintre cele consultate în literatura de specialitate, argumentând că analizele LCR sunt utile în caracterizarea bolilor inflamatorii ale SNC. Toate acestea sub rezerva că, testele LCR sunt examene fără valoare diagnostică de certitudine, acestea necesitând o interpretare corelativă, cu cât mai multe teste clinice și paraclinice (MAIOLINI, 2012; GONCALVES, 2010).

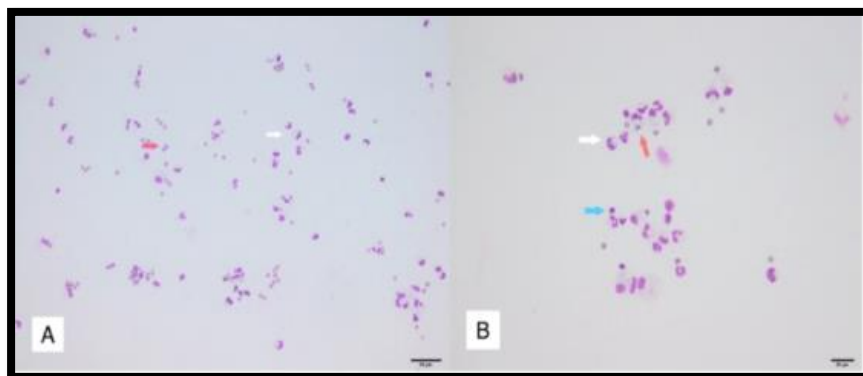


Fig. 5. Modificări citologice ale LCR indicând: A. Pleocitoză mixtă cu macrofage active (săgeată albă) formând conglomerate alături de neutrofile (săgeată roșie); colorație Diff-Quik, x50; B. Pleocitoză mixtă cu material eritrocitar fagocitat (săgeată roșie), cu predominarea macrofagelor (săgeată alba), alături de limfocite (săgeată albastră) (Col. Diff-Quik, x100).

Capitolul 7, este dedicat celui de-al treilea studiu, intitulat **“Relevanța analizei LCR în caracterizarea bolii vestibulare”**, bazat de asemenea, pe datele publicate într-o lucrare științifică valoroasă (DANCIU și colab., 2020). Acest studiu este axat pe evaluarea valorii investigațiilor LCR în diferențierea unor disfuncții ale sistemului vestibular de anumite neuropatii SNC, respectiv a sindroamelor vestibulare centrale de cele periferice. În investigațiile întreprinse se mizează, în principal, pe evaluarea sensibilității și specificității analizelor LCR în diferențierea unor forme clinice de boală vestibulară și implicit, a celor cu localizare periferică de cele cu localizare centrală. Realizarea acestor studii s-a bazat pe ipoteza, că anomaliile LCR sunt mai frecvente în sindroamele vestibulare inflamatorii simple sau complicate. Acest studiu are caracter retrospectiv și este realizat în clinicile și laboratoarele facultății Royal Veterinary College, pe o perioadă de 8 ani.

Pacienții incluși în studiu au fost distribuiți în opt grupe, în funcție de diagnostic: boală vestibulară idiopatică, otită medie/internă, neoplazii extinse la urechea medie și internă, meningoencefalită autoimună (MUO), neoplazie cerebrală, infarct ischemic, empiem intracranian și toxicitate cu metronidazol. Astfel, un total de 102 câini au îndeplinit criteriile de includere în studiu. Dintre aceștia, 53, cu vârstă medie de 69 (10–192) luni, au fost diagnosticați cu sindrom vestibular central și 49, cu vârsta medie de 101 (21-163) luni, au fost diagnosticați cu sindrom vestibular periferic. Între vârsta și sexul câinilor diagnosticați cu sindrom vestibular central sau periferic, nu am găsit diferențe semnificative statistic ($p > 0.05$).

Frecvența afecțiunilor diagnosticate a avut următoarea distribuție: boala vestibulară idiopatică (44; 43.13%), MUO (36; 35.29%), infarct ischemic (8; 7.84%), otită medie/internă (4; 3.92%), neoplazie cerebrală (4; 3.92%), empiem intracranian (3; 2.94%), intoxicație cu metronidazol (2; 1.96%) și neoplazie a urechii medii și/sau interne (1; 0.98%).

Numărul total de celule nucleate din LCR a variat între 0 și 2480/ μ L. Conform așteptărilor, câinii diagnosticați cu sindrom vestibular central au avut medii ale NTCN semnificativ mai mari ($p=0.001$), atingând 201 (0-2480) Cel./ μ L, comparativ cu cei cu sindrom vestibular periferic, la care media a fost de doar 2 (0-14) Cel./ μ L. S-a identificat de asemenea, pleocitoză la 26 de câini (49%) cu sindrom vestibular central și la 5 câini (10%) cu sindrom vestibular periferic. Statistic, pleocitoza a fost semnificativ crescută ($p=0.003$) la câinii cu sindrom vestibular central.

Proteina totală din LCR a variat între 0 și 253 mg/dL, iar valoarea la câinii cu sindrom vestibular central (50; 12-253 mg/L) a fost semnificativ mai mare ($p=0.004$), decât la cei cu sindrom vestibular periferic (23; 9-66mg/dL). PT din LCR a înregistrat creșteri la 31 (58%) dintre câinii cu sindrom vestibular central și la 19 (38%) dintre cei cu sindrom vestibular periferic, diferența între cele două categorii fiind statistic semnificativă ($p=0.046$). La estimarea sensibilității și specificității testului NTCN din LCR, pentru a diferenția sindromul vestibular central de cel periferic, am atribuit valori de 49%, respectiv de 90%, bazate pe nivelul de creștere al acestui parametru. Comparativ s-a estimat și sensibilitatea/specificitatea testului PT din LCR pentru a diferenția aceste două sindroame la 58% și respectiv 39%, bazate de asemenea, pe creșterea acestuia.

Rezultatele noastre sugerează că analiza LCR nu este destinată diferențierii, în mod expres, a celor două forme de sindrom vestibular, dar cu toate acestea, poate releva informații utile în clarificarea unor etiologii specifice. Astfel, valorile NTCN și PT au fost mai crescute, iar citograma LCR a evidențiat predominarea pleocitozei limfocitare la cazurile diagnosticate cu MUO și activarea macrofagică la cele diagnosticate cu boală idiopatică vestibulară și cu infarct ischemic. Considerăm că, testele LCR pot fi mai frecvent pozitive la câinii cu sindroame vestibulare centrale inflamatorii și rareori, la câinii cu cauze neinflamatorii ale bolii vestibulare.

Concluziile generale și recomandările desprinse pe baza analizei grupate a rezultatelor obținute, au constituit un ansamblu succint, care desăvârșește conținutul tezei.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei, sintetizează principalele noutăți și elemente de originalitate aduse de studiile întreprinse, analizând caracterul inovativ al experimentelor, testelor și evaluărilor clinice efectuate, precum și aportul adus la îmbogățirea și diversificarea cunoștințelor în domeniu.

Bibliografia include un ansamblu foarte bogat de titluri (221), adecvate documentărilor, rezultatelor obținute, discuțiilor și interpretărilor efectuate.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. BAILEY C. S., R.J. HIGGINS, 1985, Comparison of total white blood cell count and total protein content of lumbar and cisternal cerebrospinal fluid of healthy dogs. *American journal of veterinary research*, 46(5), 1162-1165.
2. BECHET, N.B., N.C. SHANBHAG, I. LUNDGAARD, 2021, Glymphatic pathways in the gyrencephalic brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 41(9), 2264-2279.
3. DICKINSON P.J., B.K. STURGES, P.H. KASS, R.A. LECOUTEUR, 2006, Characteristics of cisternal cerebrospinal fluid associated with intracranial meningiomas in dogs: 56 cases (1985-2004). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228(4), 564-567.
4. GONCALVES RITA, T.J. ANDERSON, G. INNOCENT, J. PENDERIS, 2010, Effect of seizures on cerebrospinal fluid analysis in dogs with idiopathic epilepsy. *The Veterinary Record*, 166(16), 497-498.
5. LAMPE R., K.D. FOSS, S. VITALE, D.W. HAGUE, A.M. BARGER, 2020. Comparison of cerebellomedullary and lumbar cerebrospinal fluid analysis in dogs with neurological disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 34(2), 838-843.
6. LEE, S., R.E. YOO, S.H. CHOI, S.H. OH, S. JI, J. LEE, K.Y. HUH, J.Y. LEE, I. HWANG, K.M. KANG, T.J. YUN, J.H. KIM, C.H. SOHN, 2021. Contrast-enhanced MRI T1 Mapping for Quantitative Evaluation of Putative Dynamic Glymphatic Activity in the Human Brain in Sleep-Wake States. *Radiology* 300 (3), 661-668.
7. MAIOLINI ARIANNA, CARLSON REGINA, M. SCHWARTZ, G. GANDINI, TIPOLD ANDREA, 2012, Determination of immunoglobulin A concentrations in the serum and cerebrospinal fluid of dogs: an estimation of its diagnostic value in canine steroid-responsive meningitis-arteritis. *The veterinary journal*, 191(2), 219-224.
8. O'NEILL EMMA, D. MERRETT, B. JONES, 2005, Granulomatous meningoencephalomyelitis in dogs: a review. *Irish Veterinary Journal* 58 (2), 1-7.
9. OJI T., Kamishina, H. CHEESEMAN, R.M. CLEMMENSONS, 2007, Measurement of myelin basic protein in the cerebrospinal fluid of dogs with degenerative myelopathy. *Veterinary clinical pathology*, 36(3), 281-284.
10. SRUGO I., I. AROCH, CHRISTOPHER MARY, CHAI ORIT, L. GORALNIK, T. BDOLAH-ABRAM, M.H. SHAMIR, 2011. Association of cerebrospinal fluid analysis findings with clinical signs and outcome in acute nonambulatory thoracolumbar disc disease in dogs. *Journal of veterinary internal medicine*, 25(4), 846-855.