



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Η ΑΝΟΣΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ GABA ΣΕ ΤΟΜΕΣ
ΙΠΠΟΚΑΜΠΙΟΥ IN VITRO

ΔΗΜΗΤΡΑ ΙΩΣΗΦΙΝΑ Δ. ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ

ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΟ ΕΤΟΣ 2011-2013

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΕΥΤΥΧΙΑ ΑΣΠΡΟΔΙΝΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2013

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Εισαγωγή	3
Ο ιππόκαμπος	3
Ανατομία του ιπποκάμπειου σχηματισμού και κυττοαρχιτεκτονική	3
Συνδέσεις του ιπποκάμπου	6
Υποδοχείς αμινοξέων στον ιππόκαμπο	8
Διαφοροποίηση μεταξύ κοιλιακού και ραχιαίου ιπποκάμπου	12
Προετοιμασία του ιστού για ανοσοϊστοχημικές μελέτες	13
Βλάβες που προκαλεί η ισχαιμία στον εγκέφαλο	19
Σκοπός	24
Υλικά και Μέθοδοι	25
Αποτελέσματα	29
Ιστολογική εκτίμηση των τομών ιπποκάμπου, E&H χρώση	29
Ανοσοϊστοχημική μελέτη των λεπτών τομών ιπποκάμπου	37
Συμπεράσματα και Συζήτηση	41
Περίληψη	44
Abstract	45
Βιβλιογραφία	46

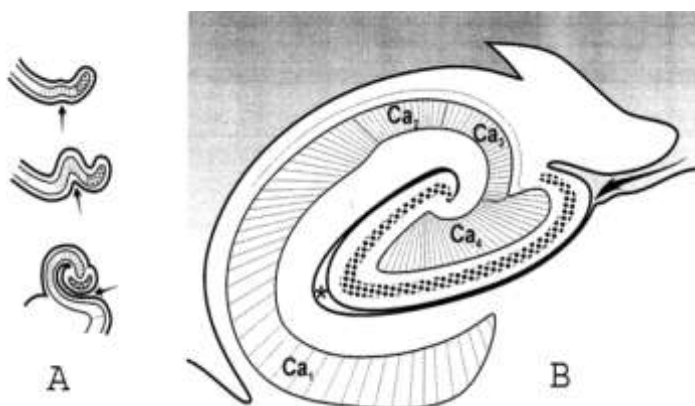
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο ιππόκαμπος

Ο ιπποκάμπειος σχηματισμός του εγκεφάλου αποτελεί μέρος του μεταιχμιακού συστήματος. Παρόλο που εντοπίζεται κάτω από τον εγκεφαλικό φλοιό δεν αποτελεί μια υποφλοιώδη δομή, αλλά ένα τμήμα του αρχαιοφλοιού που αυταναδιπλώνεται (Εικόνα 1). Κατά τη διαδικασία ανάπτυξης του πρόσθιου λοβού, ο αρχαιοφλοιός προβάλλει προς το εσωτερικό του εγκεφάλου και εφάπτεται με τον κροταφικό λοβό και σύρεται προσθίως, σχηματίζοντας μια καμπυλωτή δομή από το ραχιαίο πρόσθιο εγκέφαλο προς τον κροταφικό λοβό και καταλήγοντας εξ' ολοκλήρου μέσα στον κροταφικό λοβό. Ο ιππόκαμπος παραμένει συνδεδεμένος με το διάφραγμα μέσω μιας παχιάς ταινίας, που ονομάζεται ψαλίδα (fornix), της οποίας το σχήμα περιγράφει την τροχιά της ανάπτυξης του ιπποκάμπου. Ο ιππόκαμπος εμφανίζεται ως μία επιμηκυσμένη δομή, η οποία μοιάζει με μισοφέγγαρο (C) και εκτείνεται οπισθίως του διαφράγματος και αφού κυρτωθεί καταλήγει στον κροταφικό λοβό. Για το λόγο αυτό διακρίνεται σε ραχιαίο και κοιλιακό ή οπίσθιο και πρόσθιο αντίστοιχα, όσον αφορά στον άνθρωπο (Nieuwenhuys et al., 1997). Ο ρόλος του στην παγίωση της μνήμης θεωρείται θεμελιώδης αφού μαζί με τους κροταφικούς λοβούς και με άλλες δομές του μεταιχμιακού συστήματος εμπλέκεται σε διαδικασίες μνήμης και μάθησης.

Ανατομία του ιπποκάμπειου σχηματισμού και κυτταοαρχιτεκτονική

Στον ιπποκάμπειο σχηματισμό διακρίνονται οι εξής περιοχές: η οδοντωτή έλικα (dentate gyrus), το Αμμώνιο Κέρας (Cornu Ammonis) το οποίο υποδιαιρείται σε 3 πεδία (CA1, CA2 και CA3), το υπόθεμα (subiculum), το προϋπόθεμα (presubiculum), το παραϋπόθεμα (parasubiculum) και ο ενδορινικός φλοιός (entorhinal cortex). Παρόλο που η οδοντωτή έλικα διαφέρει από το αμμώνιο κέρασ ως προς την αρχιτεκτονική των κυττάρων της, αναφέρεται μερικές φορές η πύλη της οδοντωτής έλικας (hilus) σαν πεδίο CA4. Σε εγκάρσια τομή ως προς τον επιμήκη άξονα του ιπποκάμπου παρατηρούνται δύο δομές σχήματος "C", οι οποίες έχουν αντίθετη φορά μεταξύ τους. Το ένα "C" αποτελεί την οδοντωτή έλικα, ενώ το άλλο "C" το Αμμώνιο Κέρας (Εικόνα 1). Αυτή η μορφολογία παρατηρείται σε όλο το μήκος του ιπποκάμπου (Amaral and Witter, 1989).



Εικόνα 1. Α. Σχηματισμός του ιπποκάμπου κατά την αναδίπλωση του αρχαιοφλοιού. Β. Σε εγκάρσια τομή ο ιππόκαμπος αποτελείται από δύο δομές σχήματος "C", οι οποίες έχουν αντίθετη σχέση μεταξύ τους. CA1, CA2, CA3 πεδία αμμώνιου κέρατος, CA4: πύλη της οδοντωτής έλικας (hilus). (Barboriak D.P et al., 2000)

Το Αμμώνιο Κέρας

Το αμμώνιο κέρας καθ' όλο το μήκος του αποτελείται από τα έξω προς τα έξω από τις ακόλουθες στιβάδες (Εικόνα 2):

- 1) το επένδυμα (ependyma),
- 2) τη σκάφη (alveus), η οποία είναι μια λευκή στοιβάδα αποτελούμενη από προσαγωγές και απαγωγές ίνες. Οι απαγωγές ίνες αποτελούνται από τους άξονες των πυραμιδικών κυττάρων και του υποθέματος και συγκλίνουν, σχηματίζοντας την παρυφή και την ψαλίδα,
- 3) τη στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων (stratum oriens), όπου βρίσκονται οι βασικοί δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων και περιέχει και ενδονευρώνες. Διασχίζεται από απαγωγές και προσαγωγές ίνες,
- 4) την πυραμιδική στιβάδα (stratum pyramidalis), που περιλαμβάνει τα κυτταρικά σώματα των πυραμιδικών νευρώνων, των κυρίως νευρώνων του αμμωνίου κέρατος. Οι κορυφαίοι δενδρίτες των κυττάρων διασχίζουν την ακτινωτή στιβάδα για να καταλήξουν στην βοθριώδη-μοριώδη στιβάδα, ενώ οι άξονες κατευθύνονται προς τη σκάφη και συνεχίζουν στη ψαλίδα,
- 5) τη διαφανή στιβάδα (stratum lucidum), η οποία είναι παρούσα μόνο στη CA3 περιοχή και καταλαμβάνεται από τις βρυώδεις ίνες, οι οποίες προβάλλουν στους εγγύς δενδρίτες των πυραμιδικών νευρώνων,
- 6) την ακτινωτή στιβάδα (stratum radiatum), η οποία αποτελείται από τους κορυφαίους και έγγυς δενδρίτες των πυραμιδικών νευρώνων και από ενδονευρώνες,
- 7) τη βοθριώδη-μοριώδη στιβάδα (stratum lacunosum-moleculare), η οποία αποτελείται από τους άνω δενδρίτες των πυραμιδικών νευρώνων καθώς και από ενδονευρώνες (Shepherd, 1990).

Το αμμώνιο κέρας αποτελείται από διεγερτικούς και ανασταλτικούς νευρώνες. Η πυραμιδική στιβάδα του ιπποκάμπου περιέχει τους πυραμιδικούς νευρώνες, οι οποίοι είναι διεγερτικοί νευρώνες και περιέχουν ως κύριο νευροδιαβιβαστή το γλουταμικό. Αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων του ιπποκάμπου. Το κύτταρο έχει σώμα σχήματος πυραμίδας και αποτελείται από έναν βασικό δενδρίτη που εκτείνεται στη στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων και έναν κορυφαίο δενδρίτη που εκτείνεται μέχρι την ιπποκάμπειο σχισμή. Στα πυραμιδικά κύτταρα του CA3 πεδίου καταλήγουν οι βρυώδεις ίνες των κοκκωδών κυττάρων από την οδοντωτή έλικα, οι οποίες σχηματίζουν τη διαφανή στιβάδα.

Σε όλες τις στιβάδες του ιπποκάμπου βρίσκονται ανασταλτικοί νευρώνες, οι ενδονευρώνες, οι οποίοι εκλύουν γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA). Αποτελούν περίπου το 10% των νευρώνων του ιπποκάμπου και αναστέλλουν τα πυραμιδικά κύτταρα σχηματίζοντας GABAεργικές συνάψεις σε διαφορετικά τμήματα της μετασυναπτικής μεμβράνης. Οι ενδονευρώνες είναι μια ετερογενής ομάδα κυττάρων. Κάποιοι από αυτούς σχηματίζουν ανασταλτικές συνάψεις στα σώματα, στο αρχικό τμήμα του άξονα και στους δενδρίτες των πυραμιδικών νευρώνων. Ενώ αρχικά είχε θεωρηθεί ότι οι ενδονευρώνες ασκούν ανασταλτική δράση μόνο στους εγγύς πυραμιδικούς νευρώνες, πλέον υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι οι ενδονευρώνες στον ιπποκάμπο έχουν και πιο απομακρυσμένους στόχους, όπως το υπόθεμα και η ετερόπλευρη οδοντωτή έλικα (Losonczy et al., 2002; Jinno, 2009). Οι ενδονευρώνες του ιπποκάμπου διακρίνονται σε υποομάδες ανάλογα με την εντόπισή τους και τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά. Στο αμμώνιο κέρας απαντώνται οι παρακάτω κατηγορίες ενδονευρώνων: 1. τα καλάθοειδή κύτταρα (basket cells), τα οποία εντοπίζονται στη στιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων. Οι άξονές τους διακλαδίζονται γύρω από τα σώματα των πυραμιδικών κυττάρων σε τέτοιο βαθμό,

ώστε οι διακλαδώσεις τους να μοιάζουν με καλάθια. 2. τα άξονο-αξονικά κύτταρα (axono-axonic cells), τα οποία βρίσκονται στα όρια της πυραμιδικής στιβάδας και συνάπτονται με το αρχικό τμήμα του άξονα των πυραμιδικών κυττάρων. 3. τα διστιβαδωτά κύτταρα (bistratified cells), των οποίων τα σώματα βρίσκονται κοντά στη πυραμιδική στιβάδα και οι δενδρίτες και οι άξονές τους εντοπίζονται στην ακτινωτή και την πολυμορφική στιβάδα. 4. τα O-LM κύτταρα (lacunosum-moleculare cells), των οποίων τα σώματα και οι δενδρίτες εντοπίζονται στην πολυμορφική στιβάδα και οι άξονές στη μοριώδη-βοθριώδη στιβάδα. Συνάπτονται στους άπω δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων. 5. τα τριστιβαδωτά κύτταρα (trilaminar cells), των οποίων οι άξονες, ανεξάρτητα από τη θέση του κυτταρικού σώματος, εντοπίζονται σε τουλάχιστον τρεις στιβάδες. 6. τα κύτταρα της ακτινωτής στιβάδας (stratum radiatum cells), των οποίων τα σώματα, οι δενδρίτες και οι άξονες εντοπίζονται στην ακτινωτή στιβάδα. 7. τα κύτταρα της μοριώδους-βοθριώδους στιβάδας (stratum lacunosum-moleculare cells), των οποίων οι άξονες εντοπίζονται στη βοθριώδη-μοριώδη στιβάδα ή και στην ακτινωτή και συνάπτονται με τους άπω δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων. 8. τα IS νευρώνες (interneuron specific cells), οι οποίοι εντοπίζονται σε όλες τις στιβάδες και συνάπτονται μόνο με άλλους ενδονευρώνες και ποτέ με πυραμιδικούς νευρώνες (Freud and Buzaki, 1996; Svoboda et al., 1999).

Η οδοντωτή έλικα

Η οδοντωτή έλικα διατηρεί ίδια τη δομή της καθ' όλο το μήκος της. Σε εγκάρσια διατομή ως προς τον επιμήκη άξονα στην κοιλιακή της μοίρα έχει σχήμα "U", ενώ στην ραχιαία μοίρα έχει σχήμα "V". Αποτελείται από τα έξω προς τα έσω από τις ακόλουθες τρεις στιβάδες (Εικόνα 2):

1) τη μοριώδη στιβάδα (molecular layer), η οποία είναι μια ακυτταρική στιβάδα που υποδιαιρείται σε έξω, μέση και έσω μοίρα. Περιλαμβάνει τους δενδρίτες των κοκκοειδών κυττάρων των καλαθοειδών κυττάρων και διαφόρων πολυμορφικών κυττάρων και τα αξονικά δίκτυα από τον ενδορρινικό φλοιό

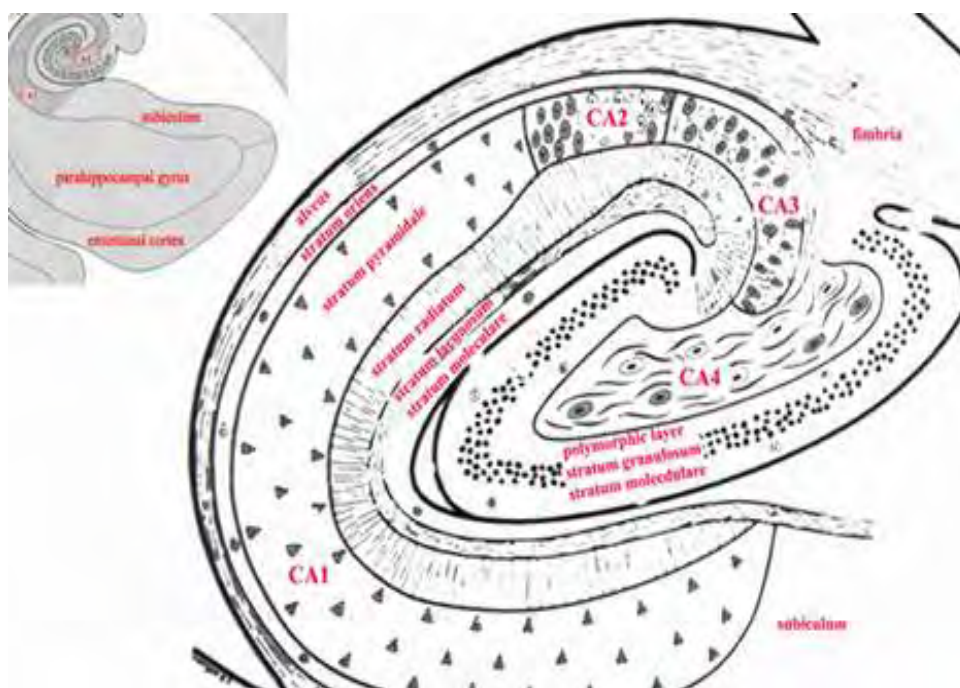
2) τη κοκκώδη στιβάδα (granular layer), η οποία είναι η κύρια στιβάδα της οδοντωτής έλικας. Έχει πάχος περίπου 60μm και αποτελείται από σφιχτά «πακεταρισμένα» μεταξύ τους κοκκώδη κύτταρα. Οι κορυφαίοι δενδρίτες τους επεκτείνονται και εντός της μοριώδους στιβάδας μέχρι την υποκάμπειο σχισμή,

3) την πολύμορφη στιβάδα (polymorphic layer) ή πύλη της οδοντωτής έλικας (hilus), η οποία αποτελείται κυρίως από βρυώδη κύτταρα (mossy cells). Στο όριο μεταξύ κοκκώδους και πολύμορφης στιβάδας εντοπίζονται και τα πυραμιδικά καλαθειδή κύτταρα της οδοντωτής έλικας (pyramidal basket cells). Είναι ανασταλτικοί νευρώνες, έχουν σχήμα πυραμίδας και ο άξονας τους περιελίσσεται γύρω από το σώμα του κυττάρου και δημιουργεί συνάψεις με τα κοκκώδη κύτταρα (Sharfman, 2007).

Η οδοντωτή έλικα αποτελείται από διεγερτικούς και ανασταλτικούς νευρώνες. Στους διεγερτικούς Νευρώνες συμπεριλαμβάνονται τα κοκκώδη κύτταρα (granule cells) και τα βρυώδη κύτταρα (mossy cells). Τα κοκκώδη κύτταρα αποτελούνται από ένα κυτταρικό σώμα ελλειπτικού σχήματος με πλάτος 10μm και ύψος 18μm. Έχουν κορυφαίους ακανθώδεις δενδρίτες, οι οποίοι επεκτείνονται στη μοριώδη στιβάδα. Οι άξονες σχηματίζουν τις βρυώδεις ίνες, οι οποίες εκτείνονται στη πολύμορφη στιβάδα της οδοντωτής έλικας και στη συνέχεια κατευθύνονται προς τη CA3 περιοχή του υποκάμπου όπου σχηματίζουν συνάψεις με τα πυραμιδικά κύτταρα της περιοχής. Τα

βρυώδη κύτταρα της πολύμορφης στιβάδας έχουν κυτταρικό σώμα τριγωνικού σχήματος και μεγάλου μεγεθους. Αποτελούνται από τρεις ή περισσότερους δενδρίτες, οι οποίοι φέρουν μεγάλες άκανθες στα εγγύς τμήματα. Οι άξονες τους νευρώνουν το εσωτερικό 1/3 της κοκκώδους στιβάδας και προβαλλουν σε κοκκώδη κύτταρα και σε ενδονευρώνες (Sharfman, 2007).

Στην οδοντωτή έλικα συναντάται πληθώρα ανασταλτικών νευρώνων που εκλύουν γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA). Στη μοριώδη στιβάδα εντοπίζονται τα MOPP κύτταρα (molecular layer perforant path associated cells) και στο όριο μεταξύ μοριώδους και κοκκώδους στιβάδας συναντώνται τα άξονο-αξονικά κύτταρα (axo-axonic cells). Στο όριο μεταξύ κοκκώδους και πολύμορφης στιβάδας συναντώνται τα πυραμιδικά καλαθοφόρα κύτταρα (pyramidal basket cells) και τα HICAP κύτταρα (hilar comisural-associated pathway related cells). Τέλος, στην πολύμορφη στιβάδα εντοπίζονται τα HIPP κύτταρα (hilar perforant path associated cells) (Sharfman, 2007).



Εικόνα 2. Στοιβάδες Αμμόνιου κέρατος και Οδοντωτής έλικας (www.medsience.us).

Συνδέσεις του Ιπποκάμπου

Τρισυναπτικό Κύκλωμα

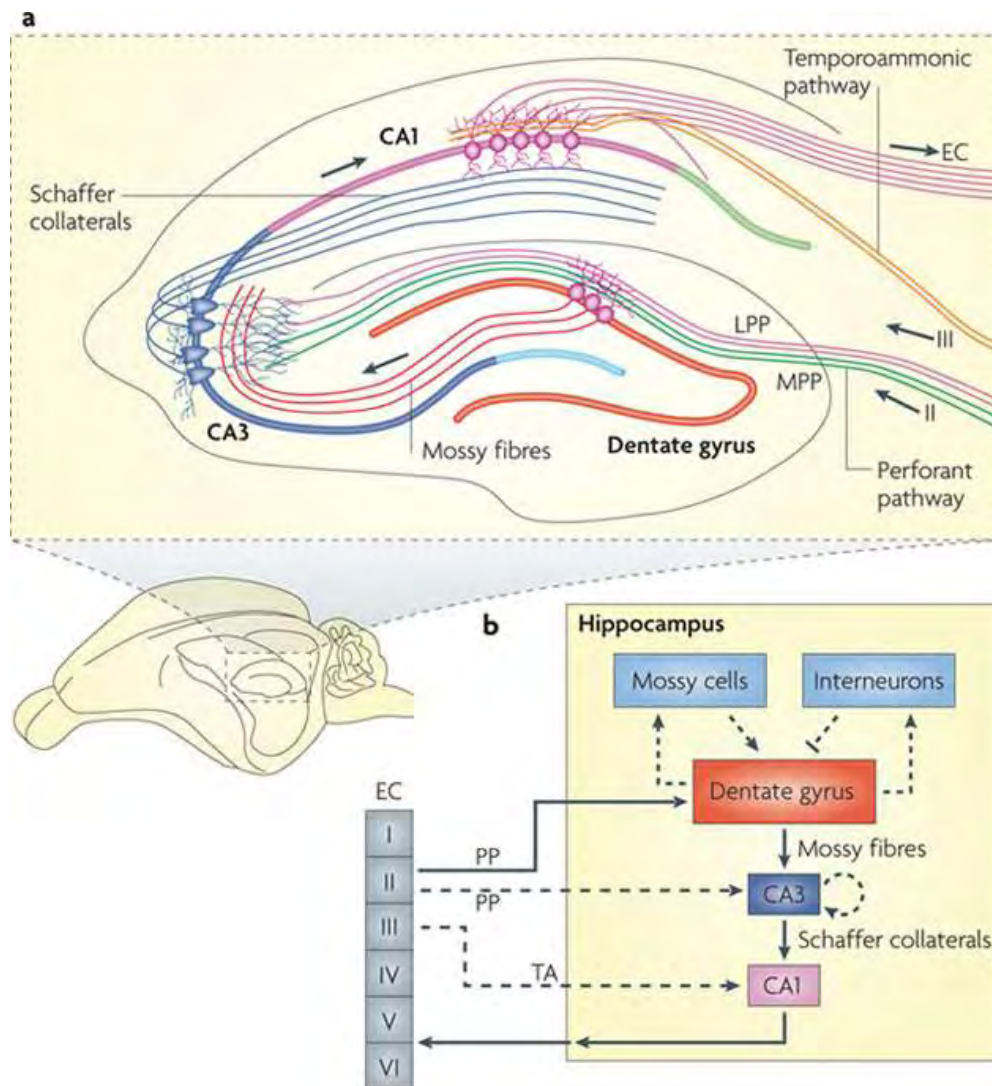
Είναι ένα πολύπλοκο εσωτερικό μονοπάτι, το οποίο αποτελείται από τρία συνεχόμενα και μεταξύ τους συνδεδεμένα νευρωνικά μονοπάτια στο εσωτερικό και εξωτερικό του ιπποκάμπου. Το τρισυναπτικό κύκλωμα δημιουργείται ως εξής:

- 1) Οι στιβάδες I και II του ενδορρινικού φλοιού προβάλλουν στα κοκκώδη κύτταρα της οδοντωτής έλικας μέσω του διατηρητικού μονοπατιού (perforant path).
- 2) Τα κοκκώδη κύτταρα της οδοντωτής έλικας προβάλλουν στα πυραμιδικά κύτταρα του CA3 πεδίου μέσω των βρυωδών ινών. Οι βρυώδεις ίνες σχηματίζονται από τους μη μυελινοποιημένους άξονες των κοκκωδών κυττάρων και κατόπιν πλούσιας διακλάδωσης συνάπτονται με τα βρυώδη κύτταρα της

πολύμορφης στιβάδας της οδοντωτής έλικας, τους βασικούς δενδρίτες των πυραμιδικών καλαθοφόρων κυττάρων και τα πυραμιδικά κύτταρα του CA3 πεδίου.

3) Τα πυραμιδικά κύτταρα του CA3 πεδίου προβάλλουν σε αυτά του CA1 πεδίου μέσω του συστήματος των παράπλευρων κλάδων του Shaffer (Shaffer collaterals).

Τα πυραμιδικά κύτταρα του CA1 πεδίου προβάλλουν μέσω του υποθέματος στις στιβάδες V ή VI του ενδορρινικού φλοιού και έτσι κλείνει το κύκλωμα. Οι νευρώνες από τη στιβάδα II του ενδορρινικού φλοιού προβάλλουν μέσω της διατριαινουσας οδού απευθείας στη CA3 περιοχή του ιπποκάμπου. Επιπλέον, από τη στιβάδα III του ενδορρινικού φλοιού εκφύονται άξονες που προβάλλουν απευθείας στην CA1 περιοχή και στο υπόθεμα (Εικόνα 3) (Swanson, 1982).



Nature Reviews | Neuroscience

Εικόνα 3. α. Το τρισυναπτικό κύκλωμα, β. Διαγραμματική αναπαράσταση του τρισυναπτικού κυκλώματος του ιπποκάμπου. Τα συμπαγή βέλη απεικονίζουν τις κύριες διεγερτικές συνδέσεις (EC→DG→CA3→CA1→EC). Τα διακεκομμένα βέλη απεικονίζουν τις

επιπρόσθετες συνδέσεις του ιπποκάμπου. Στα πυραμιδικά κύτταρα της CA3 προβάλλουν νευρώνες της στιβάδας II του ενδορρινικού φλοιού (EC) μέσω του διατρητικού μονοπατιού (PP) και στα πυραμιδικά κύτταρα της CA1 προβάλλουν νευρώνες της στιβάδας III του ενδορρινικού φλοιού μέσω του temporoammonic pathway (TA). Τα κοκκώδη κύτταρα της οδοντωτής έλικας (DG) προβάλλουν στα βρυώδη κύτταρα και σε ενδονευρώνες της πύλης της οδοντωτής έλικας, τα οποία στέλνουν διεγερτικές και ανασταλτικές συνδέσεις αντίστοιχα στα κοκκώδη κύτταρα της οδοντωτής έλικας (Deng et al., 2010).

Προσαγωγές Ίνες

Ο ιππόκαμπος δέχεται προσαγωγές ίνες, οι οποίες προέρχονται από τον ενδορρινικό φλοιό. Οι ίνες του ενδορρινικού φλοιού προβάλλουν στον ιππόκαμπο μέσω του διατρητικού μονοπατιού (perforant path). Άλλες προσαγωγές ίνες προέρχονται από 1. την αμυγδαλή (κυρίως από τους έξω και βασικούς αμυγδαλικούς πυρήνες), 2. τον έσω πυρήνα του διαφράγματος (χολινεργικοί νευρώνες που απολήγουν στην οδοντωτή έλικα και στο CA3 πεδίο), 3. τον θάλαμο (ίνες από τους πρόσθιους πυρήνες που απολήγουν στο υπόθεμα και ίνες από τους θαλαμικούς πυρήνες της μέσης γραμμής του θαλάμου που απολήγουν στον ενδορρινικό φλοιό, στο φλοιό του υποθέματος και στην CA1 περιοχή), 4. την υπερμαστική περιοχή (μέσω της ψαλίδας οι ίνες απολήγουν στην οδοντωτή έλικα και στην CA3 περιοχή), 5. τον υπομέλανα τόπο (νοραδρενεργικές ίνες) και 6. τους μεσεγκεφαλικούς πυρήνες της ραφής (σεροτονινεργικές ίνες) (Nieuwenhuys et al., 1997).

Απαγωγές Ίνες

Ο ιππόκαμπος αποστέλλει απαγωγές ίνες σε διαφορετικούς προορισμούς. Η ψαλίδα είναι ο κύριος προορισμός των ιών. Οι ίνες της προσυνδεσμικής μοίρας της ψαλίδας εκφύονται από το υπόθεμα του ιπποκάμπου και καταλήγουν στον έξω πυρήνα του διαφράγματος, στον επικλινή πυρήνα, στον προσυνδεσμικό ιππόκαμπο και στην έσω μοίρα του μετωπιαίου φλοιού. Οι ίνες της μετασυνδεσμικής μοίρας της ψαλίδας εκφύονται από το υπόθεμα του ιπποκάμπου και καταλήγουν στα μαστία, ενώ μερικές διανέμονται στον πρόσθιο πυρήνα του θαλάμου και στην περιοχή του κοιλιακού έσω πυρήνα του υποθαλάμου. Επίσης, υπάρχει μεγάλος αριθμός ιών που κατευθύνονται προς τον ενδορρινικό φλοιό, την αμυγδαλή και προς περιοχές του γειτονικού έσω κροταφικού φλοιού (Nieuwenhuys et al., 1997).

Υποδοχείς αμινοξέων στον Ιππόκαμπο

Στον ιππόκαμπο οι δύο κυριότερες κατηγορίες υποδοχέων είναι α) οι υποδοχείς του γλουταμικού οξέος και β) οι υποδοχείς γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA).

A) Υποδοχείς γλουταμικού οξέος

Ο κύριος διεγερτικός νευροδιαβιβαστής του ιπποκάμπου είναι το γλουταμικό οξύ. Οι μετασυναπτικοί υποδοχείς διακρίνονται 1. στους ιονότροπους υποδοχείς και 2. στους μεταβολότροπους υποδοχείς. Οι ιονότροποι υποδοχείς ταξινομούνται στους NMDA υποδοχείς και στους μη-NMDA υποδοχείς, οι οποίοι ονομάζονται και AMPA υποδοχείς (Kandel et al, 1999).

B) Υποδοχείς γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA)

Κύριος ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής του ιπποκάμπου, αλλά και ολόκληρου του κεντρικού νευρικού συστήματος, είναι το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA). Συντίθενται από το γλουταμικό οξύ με τη δραστηριότητα του ενζύμου δεκαρβοξυλάση του γλουταμικού οξέος (glutamic acid decarboxylase-GAD). Με τον τρόπο αυτό ο κύριος διεγερτικός νευροδιαβιβαστής (γλουταμικό) μετατρέπεται στον

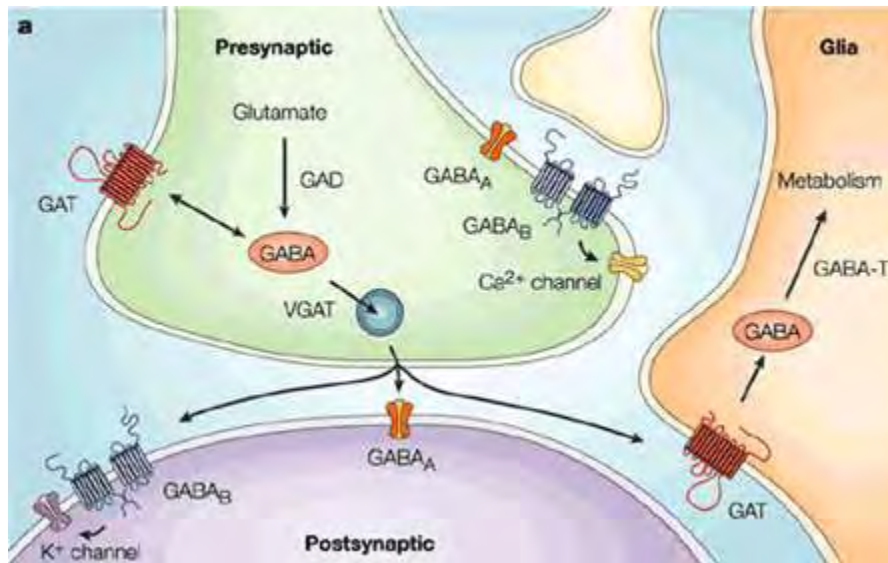
κύριο ανασταλτικό νευροδιαβαστή του ΚΝΣ. Μετά τη σύνθεσή του απελευθερώνεται στη συναπτική σχισμή και δεσμεύεται στους μετασυναπτικούς ή /και στους προσυναπτικούς υποδοχείς του μέσω των οποίων δρα προκαλώντας ανασταλτικά δυναμικά. Το GABA που δεν δεσμεύεται σε κάποιο υποδοχέα επαναπροσλαμβάνεται μέσω των GAT1-4 υποδοχέων (GABA transporter 1-4), οι οποίοι συναντώνται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των πυραμιδικών κυττάρων, των ενδονευρώνων και των αστροκυττάρων. Ο μεταβολισμός του GABA γίνεται μέσω του ενζύμου GABA-τρανσαμινάση (GABA-transaminase), το οποίο μετατρέπει το GABA σε σουκινικό οξύ, το οποίο εισέρχεται στον κύκλο του Krebs (Εικόνα 4) (Owens and Kriegstein, 2002).

Το GABA ασκεί τη δράση του συνδεδεμένο με υποδοχείς που βρίσκονται είτε στην προσυναπτική είτε στη μετασυναπτική κυτταρική μεμβράνη. Οι υποδοχείς του GABA χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: GABA_A, GABA_B, και GABA_C (Εικόνα 5). Οι GABA_A και GABA_C ανήκουν στην κατηγορία των ιοντοτρόπων υποδοχέων, δηλαδή στους υποδοχείς που είναι οι ίδιοι τους διάλυτοι ιόντων. Οι GABA_A είναι διαμεμβρανικές ετερο-πενταμερείς πρωτεΐνες και με τη σύνδεση του GABA επιτρέπουν την είσοδο αρνητικά φορτισμένων ιόντων χλωρίου στο κύτταρο, οδηγώντας σε υπερπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης, μειώνοντας την πιθανότητα δημιουργίας δυναμικού ενέργειας. Ενεργοποιούνται από το GABA και τους αγωνιστές μουσκιμόλη, προγκαμπίνη, και ισογκουβακίνη, ενώ αναστέλλονται από τους ανταγωνιστές μικουκουλίνη, γκαμπαζίνη και (+)-β-υδραστίνη. Οι βενζοδιαζεπίνες, τα βαρβιτουρικά, τα νευροστεροειδή, η αιθανόλη και τα πηκτικά αναισθητικά αλληλεπιδρούν με αυτούς τους υποδοχείς. Οι GABA_A υποδοχείς αποτελούνται από υπομονάδες, οι οποίες κωδικοποιούνται από 19 διαφορετικά γονίδια υπομονάδων. Κάποια γονίδια υφίστανται τη διαδικασία του εναλλακτικού ματίσματος και κωδικοποιούν για περισσότερες της μία υπομονάδας. Η πιο συχνά εκφραζόμενη ισομορφή των GABA_A υποδοχέων στον ιππόκαμπο αποτελείται από 2α, 2β και 1γ ή 1δ υπομονάδες. Η παρατεταμένη δέσμευση του GABA στον υποδοχέα συνεπάγεται την απευαισθητοποίηση αυτού και αυτό προκύπτει γρηγορότερα όταν η συγκέντρωση του GABA είναι μεγάλη (Owens and Kriegstein, 2002).

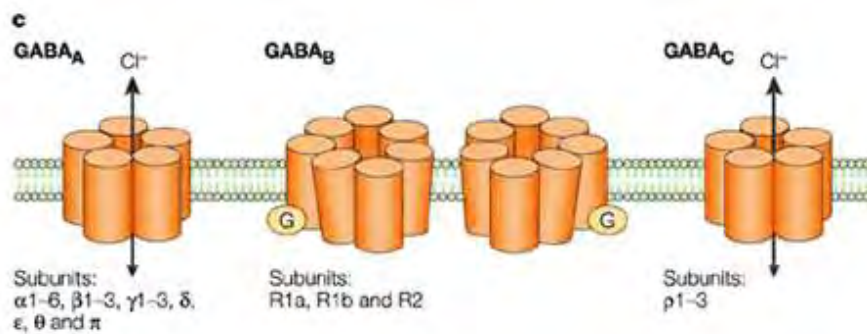
Οι υποδοχείς GABA_C είναι και αυτοί πενταμερή συμπλέγματα υπομονάδων γύρω από έναν κεντρικό πόρο. Συνίστανται από τις υπομονάδες ρ(1-3) και εντοπίζονται στον αμφιβληστροειδή χιτώνα του οφθαλμού. Η παρουσία των υποδοχέων στον ιππόκαμπο των νεαρών και ώριμων αρουραίων είναι πεδίο συνεχούς μελέτης. Ενεργοποιούνται από το GABA και από άλλα βασικά δομικά ανάλογά του όπως το cis-4-αμινοκροτονικό οξύ (CACO), ενώ αναστέλλονται από το τετραυδροπυριδινό-4-μεθυλοφωσφονικό οξύ (TPMPA). Η λειτουργία τους δεν επηρεάζεται από τις βενζοδιαζεπίνες και τα βαρβιτουρικά και δεν είναι ευαίσθητοι στην μικουκουλίνη και στη βακλοφαίνη. Είναι περίπου 10 φορές πιο ευαίσθητοι στο GABA από ότι οι GABA_A υποδοχείς, δεν απευαισθητοποιούνται ακόμη και με παρατεταμένη δράση των αγωνιστών και εμφανίζουν πιο αργή και παρατεταμένη απάντηση στη σύνδεση του GABA σε σύγκριση με τους GABA_A υποδοχείς (Alakuijala et al., 2006).

Οι υποδοχείς GABA_B ανακαλύφθηκαν το 1980 από τον Bower και τους συνεργάτες του, ενώ μελετούσαν τη δράση της βακλοφαίνης στο ΚΝΣ (Bower et al., 1980). Ανήκουν στην κατηγορία των μεταβολοτρόπων υποδοχέων. Είναι διμερείς υποδοχείς, αποτελούμενοι από δύο υπομονάδες, τις GABA_{B1} και GABA_{B2}, οι οποίες είναι επταμερείς διαμεμβρανικές πρωτεΐνες (Εικόνα 6). Οι δύο υπομονάδες έχουν διαφορετικές λειτουργίες. Η GABA_{B1} υπομονάδα φέρει τη θέση πρόσδεσης του αγωνιστή ή ανταγωνιστή στο αμινοτελικό εξωκυττάριο άκρο της, ενώ η GABA_{B2}

υπομονάδα είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση της G πρωτεΐνης. Οι GABA_B υποδοχείς είναι συζευγμένοι με κανάλια ιόντων Ca⁺⁺ και K⁺ μέσω G-πρωτεϊνών και ενεργοποιούν συστήματα δευτέρου αγγελιοφόρου μηνύματος (μονοπάτι αδενυλικής κυκλάσης και φωσφολιπάσης A2) μέσα στο κύτταρο (Εικόνα 7). Οι GABA_B υποδοχείς εντοπίζονται στους μετασυναπτικούς νευρώνες, στους οποίους συνδέονται με διαλύτες K⁺ (G-πρωτεΐνες) οδηγώντας σε διάνοιξη των καναλιών K⁺ και έξοδο των ιόντων από το κύτταρο. Επίσης, εντοπίζονται και στους προσυναπτικούς νευρώνες, στους οποίους αναστέλλονται οι διάλυτοι Ca⁺⁺ (Padgett and Slesinger, 2010). Οι υποδοχείς ενεργοποιούνται από το GABA και τον αγωνιστή βακλοφαΐνη, ενώ αναστέλλεται η δράση τους από τη σακλοφαΐνη και τη φακλοφαΐνη.

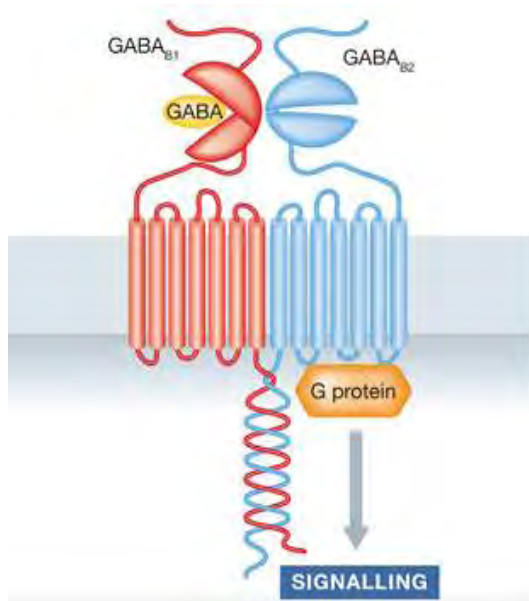


Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης του GABA από γλουταμικό οξύ μέσω GAD (glutamic acid decarboxylase). Το GABA μεταφέρεται μέσα σε κυστίδια με τη βοήθεια του vesicular neurotransmitter transporter (VGAT) και απελευθερώνεται στη μετασυναπτική σχισμή. Δεσμεύεται στους υποδοχείς GABA, οι οποίοι εντοπίζονται είτε προσυναπτικά είτε μετασυναπτικά. Οι GABA_B υποδοχείς προκαλούν 1. προσυναπτική αναστολή, αναστέλλοντας την εισροή Ca⁺⁺ στο κύτταρο (συνεπώς αναστέλλεται η έκλυση νευροδιαβιβαστών) και 2. μετασυναπτική αναστολή μέσω ενεργοποίησης των καναλιών K⁺ (υπερπολλωνεται η κυτταρική μεμβράνη). Η επαναπρόσληψη του GABA από τα γύρω γλοιακά κύτταρα και τους νευρώνες γίνεται μέσω του μεταφορέα GAT (GABA transporters) και ο μεταβολισμός μέσω της GABA-τρανσαμινάσης (GABA-T) (Owens and Kriegstein, 2002).

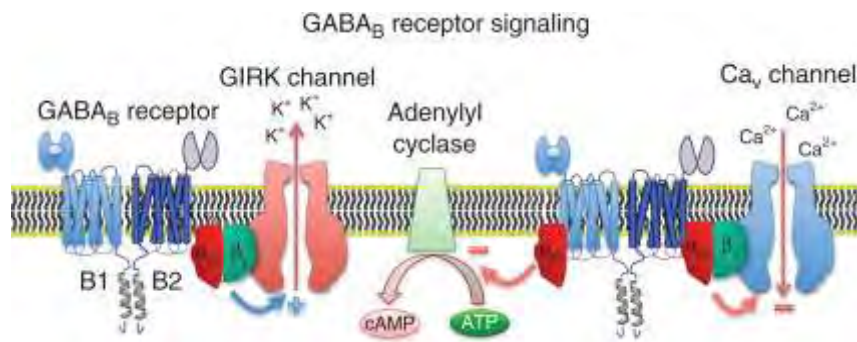


Εικόνα 5. Αναπαράσταση των κατηγοριών των GABA υποδοχέων. Οι GABA_A και GABA_C είναι πενταμερείς υποδοχείς και είναι διάλυτοι ιόντων χλωρίου. Οι GABA_A αποτελούνται από έναν συνδυασμό υπομονάδων α, β, γ, δ, ε, θ, π, ενώ οι GABA_C υποδοχείς αποτελούνται από

τις ρ (1-3) υπομονάδες. Οι $GABA_B$ υποδοχείς είναι διμερείς και αποτελούνται από δύο υπομονάδες R1 και R2, οι οποίες είναι επταμερείς διαμεμβρανικές πρωτεΐνες συνδεδεμένες με G πρωτεΐνες (Owens and Kriegstein, 2002).



Εικόνα 6 . Ο $GABA_B$ υποδοχέας αποτελείται από 2 υπομονάδες· Οι $GABA_{B1}$ και $GABA_{B2}$, οι οποίες είναι επταμερείς διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και συνδεδεόνται με G πρωτεΐνες (http://www.nature.com/emboj/journal/v31/n15/fig_tab/emboj2012174a_F1.html#figure-title).



Εικόνα 7. Η πρόσδεση του GABA (σηματοδοτικό μόριο) στον υποδοχέα $GABA_B$ ενεργοποιεί τον υποδοχέα και επιτρέπει στην πρωτεΐνη G (αποτελούμενη από τρεις υπομονάδες: α , β και γ) να αλληλεπιδράσει με τον υποδοχέα. Η πρόσδεση ωθεί την α υπομονάδα της πρωτεΐνης G να ανταλλάξει το GDP με GTP και αυτό οδηγεί σε διάσπαση της πρωτεΐνης G σε μια ενεργοποιημένη α υπομονάδα και ένα σύμπλοκο $\beta\gamma$. Οι υπομονάδες (α και $\beta\gamma$) διαχέονται κατά μήκος της εσωτερικής επιφάνειας της κυτταρικής μεμβράνης έως ότου συναντήσουν τις πρωτεΐνες στόχους. Η α υπομονάδα αναστέλλει τη δραστηριότητα της αδενυλικής κυκλάσης και συνεπώς ελαττώνεται το cAMP. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την καθυστέρηση της συγκέντρωσης των κυστιδίων υπεύθυνων για την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών. Το $\beta\gamma$ σύμπλοκο ασκεί ανασταλτική δράση στους διαύλους Ca^{++} και διάνοιξη των καναλιών K^+ . Όταν η α υπομονάδα αποδεσμευτεί από την αδενυλική κυκλάση, τότε το σύμπλεγμα $\beta\gamma$ αποδεσμεύεται από τους διαύλους Ca^{++} και τα κανάλια K^+ (Padgett and Slesinger, 2010).

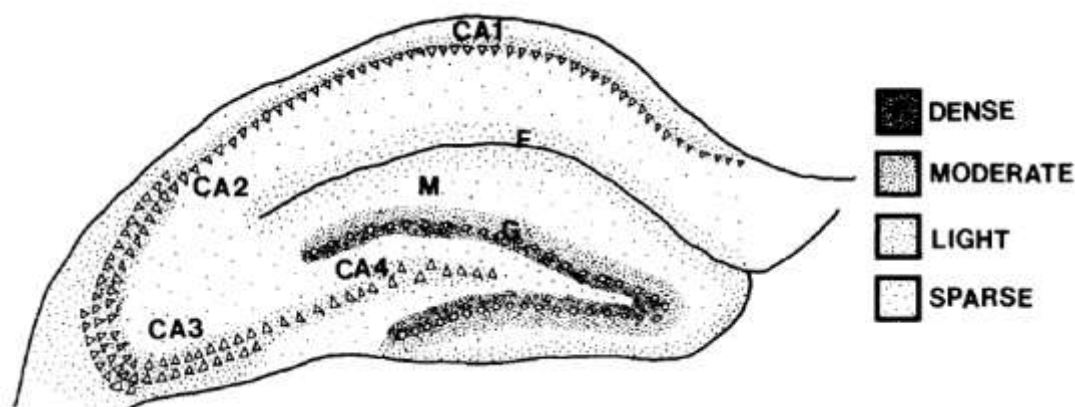
Διαφοροποίηση μεταξύ ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου

A. Σε βιοχημικό επίπεδο

Σύμφωνα με μελέτες η κοιλιακή μοίρα του ιπποκάμπου εμφανίζει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις GABA και περισσότερους GABAεργικούς νευρώνες από ότι η ραχιαία μοίρα. (Hortnagl et al., 1991).

Όσον αφορά στην κατανομή των GABAεργικών νευρώνων ανά περιοχή του ιπποκάμπου, παρατηρείται ότι στην οδοντωτή έλικα εντοπίζεται μεγαλύτερος αριθμός GABAεργικών νευρώνων από ότι στον κυρίως ιππόκαμπο. Η οδοντωτή στιβάδα της κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου έχει μεγαλύτερη πυκνότητα ανασταλτικών GABA νευρώνων από ότι η ραχιαία μοίρα. Επίσης, στην κοκκώδη στιβάδα αυτής της περιοχής οι νευρώνες παρουσιάζουν μεγαλύτερη πυκνότητα από ότι στη μοριώδη στιβάδα και στην πολυμορφική στιβάδα (Εικόνα 8) (Anderson et al., 1986).

Στο CA1 πεδίο παρατηρείται μεγαλύτερη πυκνότητα GABAεργικών νευρώνων στην πυραμιδική στιβάδα, τόσο του ραχιαίου όσο και του κοιλιακού ιπποκάμπου. Στο CA3 πεδίο ο μεγαλύτερος αριθμός GABAεργικών νευρώνων απαντάται επίσης στην πυραμιδική και στην διαφανή στιβάδα και παρατηρείται αριθμητική υπεροχή στην κοιλιακή μοίρα σε σχέση με την ραχιαία μοίρα (Jinno et al., 1998).



Εικόνα 8. Απεικόνιση της κατανομής των GABAεργικών νευρώνων στις διάφορες περιοχές του ιπποκάμπου. Στην οδοντωτή έλικα και μάλιστα στην κοκκώδη στιβάδα (G) παρατηρείται μεγαλύτερη πυκνότητα των GABAεργικών νευρώνων σε αντίθεση με τα CA1, CA2 και CA3 πεδία (Anderson et al., 1986).

B. Στην ισχαιμία

Οι διάφοροι πληθυσμοί νευρώνων διαφέρουν ως προς την αντοχή τους στην ισχαιμία και ως προς την ικανότητα τους να αναρρώσουν από την ισχαιμία. Επίσης, οι διάφορες περιοχές του εγκεφάλου παρουσιάζουν διαφορετική αντοχή στην ισχαιμία. Αυτή η διαφοροποίηση ονομάζεται *εκλεκτική ευαισθησία* (selective vulnerability). Ο ιππόκαμπος χρησιμοποιείται συχνά για τη μελέτη της ισχαιμίας διότι αποτελεί μια κλασική περίπτωση εκλεκτικής ευαισθησίας. Το CA1 πεδίο είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στην ισχαιμία σε αντίθεση με το CA3 πεδίο και την οδοντωτή έλικα (Εικόνα 9). Αυτό το διαφορετικό πρότυπο ευαισθησίας στην ισχαιμία σε μια τόσο μικρή περιοχή του εγκεφάλου, καθιστά τον ιπποκάμπειο σχηματισμό μια ιδανική περιοχή για τη μελέτη της ισχαιμίας (Shmidt-Kastner and Freund, 1991).



Εικόνα 9. Στεφανιαία τομή ραχιαίου ιπποκάμπου αρουραίου, ο οποίος υποβλήθηκε σε 15λεπτά ισχαιμίας του πρόσθιου εγκεφάλου μέσω αποκλεισμού 4 αρτηριών. Ο ιστός επεξεργάστηκε με άργυρο (silver-impregnated) και εξετάστηκε σε οπτικό μικροσκόπιο. Οι μαύρες εναποθέσεις αργύρου επισημαίνουν τη μη αναστρέψιμη βλάβη του ιστού λόγω της ισχαιμίας. Η CA1 περιοχή είναι η πιο ευαίσθητη στην ισχαιμία σε αντίθεση με την CA3 περιοχή και την οδοντωτή έλικα (DG). Το σημείο μετάβασης από την CA1 στην CA3 περιοχή επισημαίνεται με το βέλος. Δεν παρατηρούνται εναποθέσεις στην CA3 περιοχή και στην κοκκώδη στιβάδα της οδοντωτής έλικας. Λίγες εναποθέσεις συναντώνται στην πύλη της οδοντωτής έλικας (hilus) (Shmidt-Kastner and Freund, 1991).

Μια άλλη ιδιαιτερότητα του ιπποκάμπου είναι ότι παρατηρείται σημαντική διαφοροποίηση της ευαισθησίας του στην ισχαιμία κατά τον διαμήκη άξονά του. Η ραχιαία μοίρα του ιπποκάμπου είναι περισσότερο ευαίσθητη από την κοιλιακή μοίρα. Τα αίτια αυτής της διαφοροποίησης κατά τον επιμήκη άξονα δεν έχουν πλήρως διασαφηνιστεί. Η διαφορά στην αγγείωση των δύο μοιρών του ιπποκάμπου πιθανώς σχετίζεται με τη διαφορετική τους αντοχή στην ισχαιμία (Shmidt-Kastner and Freund, 1991). Συγκεκριμένα έχει δειχθεί ότι ο κοιλιακός ιπποκάμπος παρουσιάζει μεγαλύτερη πυκνότητα αγγείων μεγάλης διαμέτρου σε σχέση με τον ραχιαίο, μικρότερη πυκνότητα λεπτών τριχοειδών αγγείων και ίδια πυκνότητα αγγείων μεσαίας διαμέτρου (Grivas et al., 2003).

Διαφοροποίηση προκύπτει και σε επίπεδο νευρώνων. Η παροδική ισχαιμία του εγκεφάλου επιλεκτικά καταστρέφει τα πυραμιδικά κύτταρα της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου, αλλά δεν επηρεάζει τους νευρώνες στην CA3 περιοχή και στην οδοντωτή έλικα. Οι διάμεσοι νευρώνες του ιπποκάμπου είναι περισσότερο ανθεκτικοί στην ισχαιμία από ότι οι πυραμιδικοί νευρώνες. Συγκεκριμένα, οι διάμεσοι GABAεργικοί νευρώνες της CA1 και CA3 περιοχής αντέχουν περισσότερο κάτω από συνθήκες ισχαιμίας (Nikonenko et al., 2009).

Προετοιμασία του ιστού για ανοσοϊστοχημικές μελέτες

Η ανοσοϊστοχημεία είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως ως διαγνωστικό και προγνωστικό εργαλείο. Συνδυάζει ιστολογικές, ανοσολογικές και βιοχημικές τεχνικές με στόχο την ανίχνευση ενός αντιγόνου στόχου *in situ*. Ένα αντίσωμα κατευθύνεται προς ένα ειδικό αντιγόνο-στόχο και ένα δεύτερο μη ειδικό αντίσωμα σεσημασμένο με χρωστική κατευθύνεται προς το ειδικό αντίσωμα. Η σήμανση του αντισώματος με την κατάλληλη ουσία καθιστά το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος ορατό. Έτσι, με αυτή την τεχνική είναι δυνατή η μελέτη της κατανομής και της εντόπισης ενός αντιγόνου στο κύτταρο και/ ή στον ιστό. Όπως

κάθε άλλη τεχνική η ανοσοϊστοχημεία για να αποβεί χρήσιμη πρέπει να πραγματοποιείται υπό κατάλληλες συνθήκες. Μια απαραίτητη συνθήκη, λοιπόν, είναι η κατάλληλη μονιμοποίηση, καθώς τα προβλήματα που μπορεί να προκύψουν σε αυτό το στάδιο μπορεί να επηρεάσουν το τελικό αποτέλεσμα της ανοσοϊστοχημείας (Javois, 1999).

Τεχνικές Μονιμοποίησης

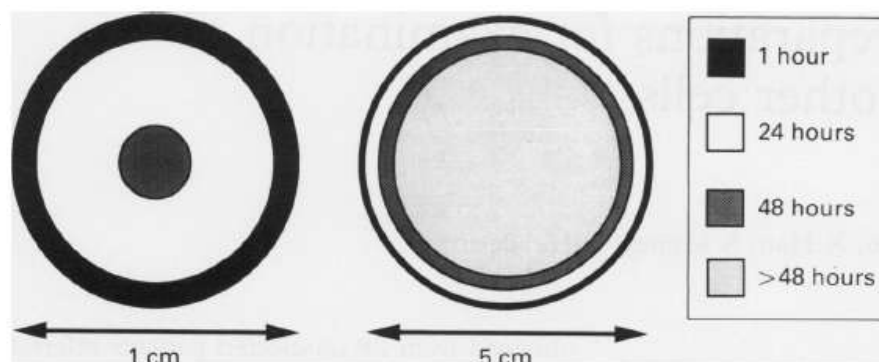
Ο κλασικός τρόπος μονιμοποίησης του νευρικού ιστού με στόχο τη μελέτη της μορφολογίας και της βιοχημείας αυτού περιλαμβάνει τη μονιμοποίηση του εγκεφάλου μέσω της κυκλοφορίας του αίματος (perfusion fixation). Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η μονιμοποίηση όλου του πειραματόζωου, ενώ αυτό είναι ακόμη εν ζωή. Αυτή η τεχνική είναι μέθοδος εκλογής για τη μονιμοποίηση του κεντρικού νευρικού συστήματος, καθώς εκμηδενίζεται η περίοδος ανοξίας του ιστού. Το μονιμοποιητικό μέσο διαχέεται γρήγορα σε όλο τον ιστό με τη βοήθεια της καρδιάς, η οποία δεν έχει χάσει ακόμη την ιδιότητα της να λειτουργεί σαν αντλία και μέσω του άθικτου αγγειακού συστήματος. Αφού το μονιμοποιητικό μέσο φτάσει σε κάθε περιοχή του εγκεφάλου, τότε διαχέεται σταδιακά από τα αιμοφόρα αγγεία στο γύρω παρέγχυμα. Η διάχυση του μονιμοποιητικού στο παρέγχυμα εξαρτάται από το βαθμό αγγείωσης της περιοχής που μελετάται, από το τοίχωμα και το ενδοθήλιο των αγγείων. Η τεχνική αυτή είναι αρκετά χρονοβόρα και δύσκολη και δεν εγγυάται την αποτελεσματική μονιμοποίηση του ιστού (Εικόνα 10). Πολλοί οι παράμετροι που μπορούν να επηρεάσουν τη διαδικασία και σχετίζονται με την κατάσταση υγείας του πειραματόζωου και την δυνατότητα του να ανταπεξέλθει στην καρδιογενή καταπληξία, με την εξοικείωση του προσωπικού με την τεχνική και με το βαθμό αγγείωσης της περιοχής που μελετάται (Gregory et al., 2012).



Εικόνα 10. Απεικόνιση τριών εγκεφάλων αρουραίων. Από τα αριστερά προς τα δεξιά φαίνεται: 1. ένας εγκέφαλος πριν τη μονιμοποίηση, 2. ένας εγκέφαλος που έχει μονιμοποιηθεί επιτυχώς με perfusion και έχει αποκτήσει λευκό χρώμα και 3. ένας εγκέφαλος ο οποίος δεν μονιμοποιήθηκε επιτυχώς με την τεχνική του perfusion και κατά τόπους διατηρεί ροδαλό χρώμα (www.leicabiosystems.com).

Μια άλλη τεχνική μονιμοποίησης η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στην παθολογωναταμική και ιδίως όταν μελετάται ανθρώπινος ιστός είναι η τεχνική της εμβύθισης (immersion fixation). Ο ιστός βυθίζεται στο μονιμοποιητικό μέσο και η μονιμοποίηση πραγματοποιείται μέσω διάχυσης από την εξωτερική επιφάνεια προς στο εσωτερικό του ιστού. Μια σημαντική διαφορά μεταξύ μονιμοποίησης με perfusion και immersion είναι η ύπαρξη ενός post-mortem χρονικού διαστήματος. Αυτό το διάστημα που παρεμβάλλεται από τη στιγμή εκτομής του ιστού μέχρι τη στιγμή εισόδου του στο μονιμοποιητικό μέσο αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως post-mortem interval ή prefixation time. Κατά το χρονικό αυτό διάστημα λαμβάνει χώρα η αυτόλυση του ιστού, η οποία μπορεί να επηρεάσει τη μορφολογία, τη βιοχημεία και την ανοσοδραστικότητα του ιστού. Επίσης, όταν μονιμοποιείται ο ιστός με immersion,

μια άλλη σημαντική παράμετρος είναι το μέγεθος του ιστού. Για να διεισδύει το μονιμοποιητικό εγκαίρως μέχρι το εσωτερικό του ιστού, πριν να αυτολυθεί πλήρως ο ιστός, οι τομές του ιστού θα πρέπει να έχουν μικρό όγκο και οι διαστάσεις τους να μην ξεπερνούν το 1cm (Εικόνα 11) (Start et al., 1992).



The predicted diffusion of 4% formaldehyde solution into 10 mm and 50 mm diameter specimens.

Εικόνα 11. Αναπαράσταση του βάθους διείσδυσης του μονιμοποιητικού με την πάροδο του χρόνου σε ιστό με διάμετρο 1cm και 5cm. Παρατηρείται ότι όσο αυξάνουν οι διαστάσεις του ιστού, τόσο καθυστερεί η διείσδυση του μονιμοποιητικού στο εσωτερικό του ιστού (Start et al., 1992).

Εδώ και δεκαετίες γίνεται συνεχής προσπάθεια σύγκρισης των δύο βασικών τεχνικών μονιμοποίησης (perfusion έναντι immersion) για την ανάδειξη της μονιμοποίησης με εμφύθιση ως εξίσου αποτελεσματική μέθοδο με αυτήν του perfusion. Από την βιβλιογραφία προκύπτουν αρκετά συμπεράσματα, μερικές φορές αντικρουόμενα. Έχει αναφερθεί ότι, κατά την μονιμοποίηση ολόκληρου του εγκεφάλου με immersion, η εξωτερική επιφάνεια του φλοιού του εγκεφάλου μέχρι βάθους 1,5 mm, η οποία εκτίθεται πιο άμεσα στο μονιμοποιητικό διάλυμα, μονιμοποιείται επαρκώς και παρουσιάζει εξίσου καλή διατήρηση της μορφολογίας της με αυτή που αυτή που προκύπτει μετά από μονιμοποίηση με perfusion. Αντίθετα, οι περιοχές του εγκεφάλου που βρίσκονται πιο εσωτερικά, καθυστερούν να μονιμοποιηθούν, καθώς αργεί το μονιμοποιητικό να διεισδύσει στο εσωτερικό τους. Συνεπώς, δεν παρουσιάζουν τόσο καλή διατήρηση μορφολογίας (Beach et al., 1987). Αξίζει να σημειωθεί, ότι στη μονιμοποίηση περιορισμένου όγκου ιστού, όπως στην περίπτωση μονήρων περιφερικών νεύρων, το immersion αποτελεί μια εξίσου καλή εναλλακτική τεχνική μονιμοποίησης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη νευροεκφυλιστικών παθήσεων των περιφερικών νεύρων (Kasukurthi et al., 2009).

Από τη βιβλιογραφία προκύπτει ότι για τη μελέτη της ανοσοδραστικότητας κάποιων αντιγόνων είναι προτιμότερη η μονιμοποίηση του ιστού με τη μέθοδο του perfusion. Βέβαια, από μελέτη σε υποκάμπους επίμυος, προκύπτει ότι η ανοσοιστοχημική μελέτη των υπομονάδων του NMDA ήταν ανώτερης ποιότητας στον ιστό μονιμοποιημένο με εμφύθιση από αυτόν μονιμοποιημένο με perfusion (Yoneyama et al., 2003). Επίσης, υπάρχει και πιο πρόσφατη μελέτη όπου οι εγκεφαλοι των αρουραίων μονιμοποιούνται με την τεχνική του immersion fixation και στη συνέχεια μελετάται η ανοσοδραστικότητα των πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού των νεύρων του υποκάμπου (Glial Fibrillary Acidic Protein & Activity regulated cytoskeletal-associated protein) (Amin et al., 2013). Συνεπώς, η τεχνική της μονιμοποίησης του εγκεφάλου με immersion, παρά τους περιορισμούς της,

δεν έχει εγκαταληφθεί. Αντιθέτως, είναι ένα πεδίο υπό συνεχή διερεύνηση και μέχρι στιγμής το γενικότερο συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι ανάλογα με τον ιστό και το αντιγόνο-στόχος για την ανοσοϊστοχημεία πρέπει να επιλέγεται η κατάλληλη τεχνική μονιμοποίησης, καθώς κάποια αντιγόνα δεν μπορούν να διατηρηθούν επαρκώς όταν υπάρχει post-mortem interval (Hilbig et al., 2004; Lavenex et al., 2009).

Η μονιμοποίηση του εγκεφάλου με τη μέθοδο της εμβύθισης μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους ανάλογα με τον ερευνητικό σκοπό. Πιο συγκεκριμένα:

1. μπορεί να τοποθετηθεί ολόκληρος ο ιστός μέσα στο μονιμοποιητικό μέσο και αφού ολοκληρωθεί η μονιμοποίηση του να σκληνωθεί σε παραφίνη,
2. μπορεί να γίνει εξαγωγή μιας δομής του εγκεφάλου (π.χ ιππόκαμπος), ώστε να μονιμοποιηθεί ολόκληρη η δομή με εμβύθιση στο μονιμοποιητικό και
3. μπορούν να ληφθούν τομές από ολόκληρο τον εγκέφαλο ή από μια συγκεκριμένη δομή του εγκεφάλου (π.χ ιππόκαμπος) και στη συνέχεια αυτές οι τομές να μονιμοποιηθούν με εμβύθιση.

Οι μελέτες σε τομές εγκεφάλου ξεκίνησαν το 1924 από τον Warburg (Warburg et al., 1924). Οι τομές εγκεφάλου χρησιμοποιούνται στις ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες, καθώς διευκολύνουν τη μελέτη της συναπτικής μετάδοσης μεταξύ των νευρώνων στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Ο τρόπος προετοιμασίας των τομών εγκεφάλου περιγράφηκε αναλυτικά από τον McIlwain το 1961. Το ζώο θυσιάζεται με αποκεφαλισμό, διανοίγεται το κρανίο και αποκαλύπτεται ο εγκέφαλος. Αφαιρούνται οι μήνιγγες, ανασηκώνεται ο εγκέφαλος και απομακρύνεται από κρανίο. Στη συνέχεια, από το τμήμα του εγκεφάλου που προορίζεται για τη μελέτη λαμβάνονται τομές είτε με μικροτόμο McIlwain tissuechopper είτε με vibratome. Για να μπορούν να διατηρηθούν οι συνάψεις, οι τομές πρέπει να είναι λεπτές (0,4mm) (Yamamoto and McIlwain, 1966).

Οι τομές ιπποκάμπου και οι μεταβολές που προκαλεί η ισχαιμία σε αυτές

Οι τομές ιπποκάμπου είναι ένα σημαντικό εργαλείο για τη μελέτη των νευρώνων, αλλά κατά την προετοιμασία τους παρατηρούνται αρκετές μεταβολές στον ιστό τόσο σε βιοχημικό όσο και σε λειτουργικό και μορφολογικό επίπεδο. Συγκεκριμένα παρατηρούνται: αυξημένα επίπεδα γλουταμικού στη συναπτική σχισμή που οδηγούν σε βλάβη των νευρώνων, ενδοκυττάρια αύξηση των ιόντων Ca^{++} , αποδιάταξη των πρωτεϊνών του κυτταρσκελετού των δενδριτών και μείωση των ενεργειακών υποθεμάτων (ATP & γλυκογόνο) με αποτέλεσμα την παροδική απώλεια της συναπτικής μετάδοσης (Kiron et al., 1999; Taubenfeld et al., 2002). Πολλές από αυτές τις μεταβολές αποδίδονται στην ισχαιμία του ιστού και μοιάζουν με τις μεταβολές που παρατηρούνται σε in vivo μοντέλα ισχαιμίας. Για αυτό το λόγο οι τομές ιπποκάμπου είναι ένα καλό μοντέλο για τη μελέτη της ισχαιμίας in vitro (Whittingham et al., 1983). Όσον αφορά στη μορφολογία, η διαδικασία της παρασκευής των τομών φαίνεται ότι επιφέρει τραυματισμούς στα εξωτερικά τμήματα των τομών. Έτσι, ο ανέπαφος ιστός περιβάλλεται από δύο επιφάνειες που έχουν υποστεί βλάβη. Η έκταση της βλάβης εξαρτάται από το μέγεθος των κυττάρων. Για παράδειγμα, στην περίπτωση του ιπποκάμπου οι νευρώνες έχουν μέγεθος 50-100μm. Συνεπώς, φυσιολογικά κύτταρα συναντώνται περίπου σε βάθος 50μm από την επιφάνεια τομής και ο ιστός είναι μορφολογικά ανέπαφος σε βάθος 100-300μm από την επιφάνεια τομής (Εικόνα 12) (Reid et al., 1988).



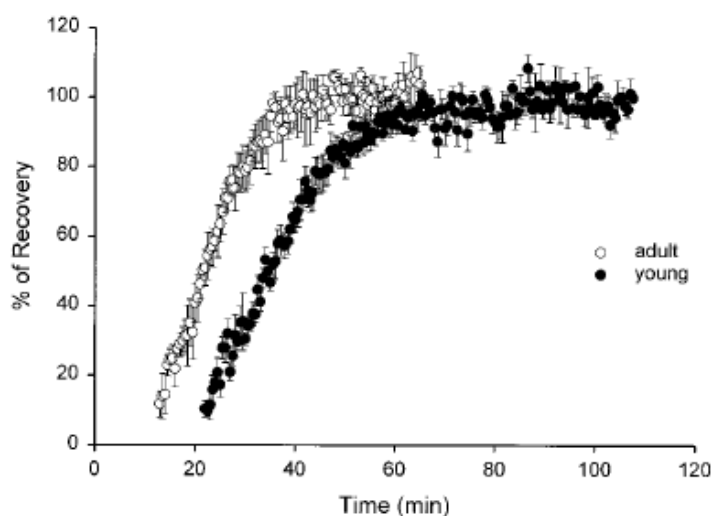
Εικόνα 12. Τομή ιπποκάμπου αρουραίου πάχους 400µm. Τα σκουρόχρωμα κύτταρα (a) είναι νεκρά κύτταρα ή κύτταρα που πεθαίνουν. Τα πιο ανοιχτόχρωμα κύτταρα (b) είναι κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη, αλλά είναι ακόμη μεταβολικά ενεργά. Bar(1cm)=5µm (Reid et al., 1988)

Από τότε που άρχισε να χρησιμοποιείται η τεχνική των τομών εγκεφάλου γίνονται συνεχώς προσπάθειες για να βρεθούν οι πιο κατάλληλες συνθήκες διατήρησης των τομών κάτω από τις οποίες ο ιστός θα υποστεί τις λιγότερες μεταβολικές και μορφολογικές αλλοιώσεις και θα ανακάμψει λειτουργικά. Για αυτό το λόγο, λοιπόν, οι τομές αμέσως μετά τη λήψη τους τοποθετούνται σε ένα τεχνητό περιβάλλον που περιέχει ένα διάλυμα ίδιας σύστασης με το εγκεφαλονωτιαίο υγρό και το οποίο οξυγονώνεται. Από πολλές μελέτες προκύπτουν διαφοροποιήσεις όσον αφορά στη σύσταση του μέσου επώασης των τομών, δηλαδή του τεχνητού εγκεφαλονωτιαίου υγρού (TENY) (artificial cerebrospinal fluid, ACSF). Σε κάποια πρωτόκολλα, το TENY περιέχει NaCl, KCl, MgSO₄, CaCl, NaH₂PO₄, NaHCO₃ και γλυκόζη σε pH 7,4 και συνεχώς οξυγονώνεται με μείγμα αερίου σύστασης 95% O₂-5% CO₂ (Richerson and Messer, 1995).

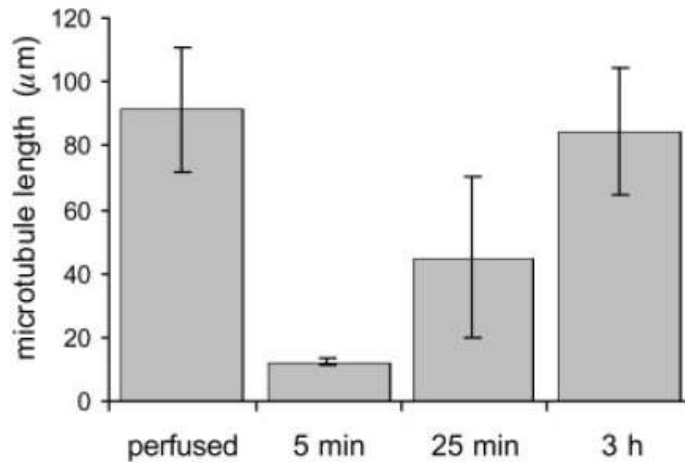
Σχετικά με τη λειτουργικότητα των νευρώνων, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, παρατηρείται απώλεια της συναπτικής μετάδοσης αμέσως μετά τη διακοπή της κυκλοφορίας του αίματος και της οξυγόνωσης του ιστού. Από ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες σε τομές ιπποκάμπου νέων και ενηλίκων αρουραίων προκύπτει ότι 10-15 λεπτά μετά τη λήψη των τομών δεν προκαλείται μετασυναπτική δραστηριότητα σε απάντηση ηλεκτρικού ερεθίσματος τόσο σε νεαρούς όσο και σε ενήλικους αρουραίους. Στα 15-20 λεπτά, και ενώ οι τομές οξυγονώνονται μέσα σε τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό, οι νευρώνες αρχίζουν να ανταποκρίνονται στο παραπάνω ερέθισμα και στα 30 λεπτά φαίνεται ότι στα ενήλικα πειραματόζωα ο ιστός έχει αναρρώσει πλήρως. Στα νεαρά πειραματόζωα το μετασυναπτικό δυναμικό του ιστού σταθεροποιείται πλήρως μέσα σε 1 ώρα (Kiron et al., 1999) (Εικόνα 13). Μια άλλη σημαντική μεταβολή που παρατηρείται σε επίπεδο μικροαρχιτεκτονικής είναι η αποδιάταξη των μικροσωληνίσκων των δενδριτών των νευρώνων. Ο κυτταροσκελετός είναι μια απαραίτητη δομή για την επιβίωση του νευρώνα, καθώς

παρέχει μηχανική στήριξη στο κύτταρο και ένα δίκτυο για τη μεταφορά πρωτεϊνών και οργανιδίων από το σώμα του νευρώνα προς την περιφέρεια αυτού. Μόλις επέλθει η ισχαιμία του ιστού, παρατηρούνται εκτεταμένες μεταβολές και στις πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, γεγονός που θέτει τον νευρώνα σε κίνδυνο. Μια από τις δομές του κυτταροσκελετού είναι οι μικροσωληνίσκοι. Η τουμπουλίνη είναι η κύρια δομική πρωτεΐνη και είναι άφθονη στους δενδρίτες, τους άξονες και το κυτταρόπλασμα. Η πρωτεΐνη MAP2 (microtubule-associated protein 2) ρυθμίζει τον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων. Η ισχαιμία του ιστού έχει ως αποτέλεσμα την αποδιάταξη των μικροσωληνίσκων των δενδριτών. Η ανίχνευση της MAP2 σε ανοσοϊστοχημικές μελέτες δεν είναι εφικτή στον ισχαιμιο ιστό πράγμα που επιβεβαιώνει την αποδιάταξη των μικροσωληνίσκων υπό συνθήκες ισχαιμίας (Buddle et al.,2003; Nikonenko et al., 2009).

Επίσης, από μια άλλη ερευνητική εργασία προκύπτει ότι όταν ο ιστός μονιμοποιείται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος (perfusion) του πειραματόζωου, τότε οι μικροσωληνίσκοι δεν καταστρέφονται. Αντιθέτως, παρατηρείται εκτεταμένη καταστροφή των μικροσωληνίσκων στις τομές εγκεφάλου. Οι μικροσωληνίσκοι αρχίζουν να επαναδιατάσσονται μετά από επώαση των τομών σε τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό και μετά από 3 ώρες επώασης ο ιστός αναρρώνει σε τέτοιο βαθμό που δεν παρατηρούνται διαφορές στις τομές από πειραματόζωα που μονιμοποιήθηκαν με perfusion και στις τομές που επώαστηκαν πρώτα σε τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό και μετά μονιμοποιήθηκαν με εμβύθιση (Εικόνα 14) (Fiala et al., 2003).



Εικόνα 13. Διαγραμματική απεικόνιση της ανάρρωσης των νευρώνων του ιπποκάμπου με την πάροδο του χρόνου. Η ανοιχτόχρωμη καμπύλη αφορά τα μετασυναπτικά δυναμικά από νευρώνες ιπποκάμπου ώριμων αρουραίων, ενώ η σκουρόχρωμη καμπύλη αφορά τα μετασυναπτικά δυναμικά από νευρώνες νεαρών αρουραίων (Kiron et al., 1999).



Εικόνα 14. Το μήκος των μικροσωληνίσκων των νευρώνων του ιπποκάμπου αυξάνει όσο περισσότερο επωάζεται ο ιστός στο τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Στις 3 ώρες επώασης οι μικροσωληνίσκοι έχουν το ίδιο μήκος με τους μικροσωληνίσκους των ιστών των ζώων που μονιμοποιήθηκαν με perfusion (Fiala et al., 2003).

Βλάβες που προκαλεί η ισχαιμία στον εγκέφαλο

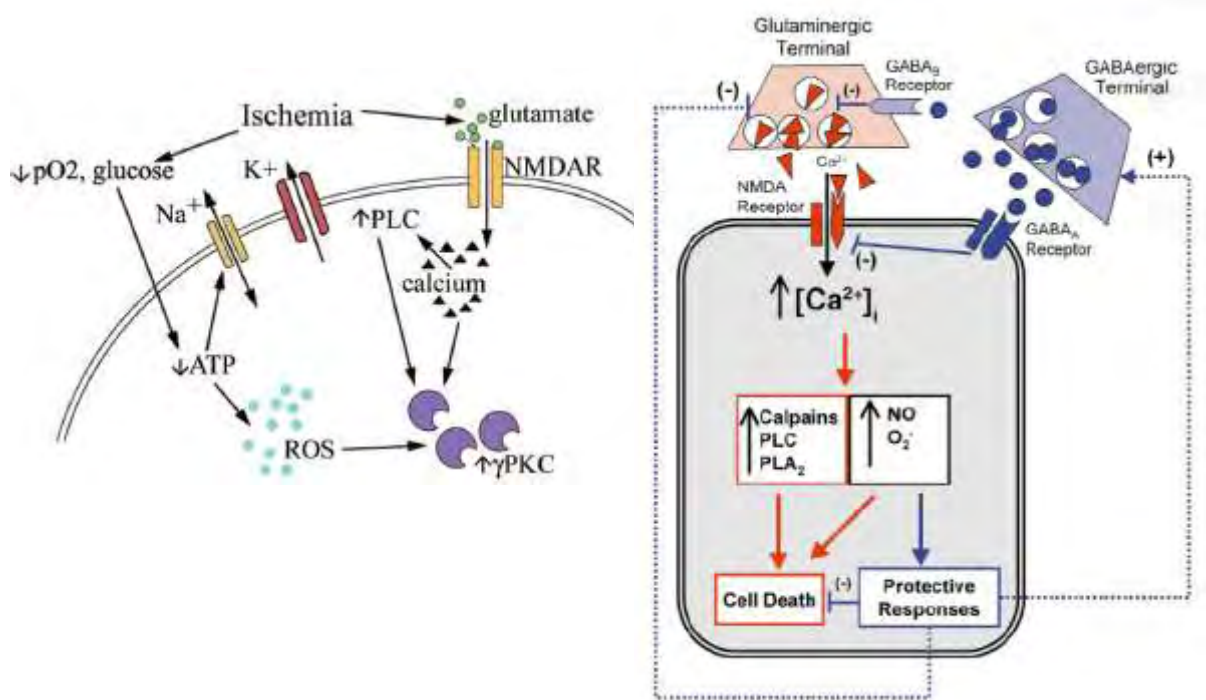
Ο εγκέφαλος είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος στην ισχαιμία. Η πλήρης διακοπή της αιμάτωσης του εγκεφάλου για 5 λεπτά έχει ως συνέπεια τη νέκρωση του ιστού και την καταστροφή των ευαίσθητων νευρώνων. Η ισχαιμία μπορεί να είναι παροδική, όπως στην περίπτωση ενός παροδικού εγκεφαλικού επεισοδίου ή μόνιμη και μπορεί να αφορά μια συγκεκριμένη περιοχή του εγκεφάλου, όπως στην περίπτωση των αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων ή να αφορά ολόκληρο τον εγκέφαλο, όπως στην περίπτωση της καρδιακής ανακοπής, της ασφυξίας και του σοκ. Από τη στιγμή που διακόπτεται η κυκλοφορία του αίματος στον εγκέφαλο, ξεκινάει η ισχαιμία του ιστού και πυροδοτούνται μηχανισμοί, οι οποίοι οδηγούν σε σημαντικές αλλοιώσεις σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο. Όταν δεν υπάρξει παρέμβαση για να αρθούν αυτοί οι μηχανισμοί, η βλάβη στον ιστό μπορεί να γίνει μη αναστρέψιμη με αποτέλεσμα τη νέκρωση τη νέκρωση του νευρικού ιστού.

Οι λειτουργικές αλλαγές εμφανίζονται εντός λίγων δευτερολέπτων από τη διακοπή της παροχής αίματος στο εγκέφαλο. Η λειτουργία των νευρώνων σταματάει λόγω εκροή ιόντων K^+ από τους νευρώνες (διάνοιξη των τασεο-εξαρτώμενων καναλιών καλίου και των ATP-εξαρτώμενων καναλιών καλίου). Αυτό οδηγεί σε υπερπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων. Μετά από λίγα λεπτά, η κυτταρική μεμβράνη εκπολώνεται μέσω της εκ νέου ανακατανομής των ιόντων. Ταυτόχρονα, σε μεταβολικό επίπεδο παρατηρείται υποξία του ιστού, η οποία συνεπάγεται την ελάττωση των ενεργειακών υποστρωμάτων του ιστού (π.χ γλυκόζης). Λόγω της υποξίας ελαττώνεται η παραγωγή ATP. Στην προσπάθεια παραγωγής ενέργειας κινητοποιείται ο μηχανισμός γλυκόλυσης, ο οποίος οδηγεί στην ενδοκυττάρια πτώση του pH και σε περαιτέρω επιδείνωση της λειτουργίας του κυττάρου.

Αυτή η δυσλειτουργία του ιστού σε λειτουργικό και μεταβολικό επίπεδο συνεπάγεται τη μαζική απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών (παρατηρείται αύξηση του εξωκυττάριου γλουταμικού και άλλων νευροδιαβιβαστών). Ο κύριος διεγερτικός νευροδιαβιβαστής στο ΚΝΣ είναι το γλουταμικό. Κατά την ισχαιμία του ιστού παρατηρείται μαζική απελευθέρωση γλουταμικού και αύξηση της συγκέντρωσης του

στον εξωκυττάριο χώρο. Αυτή η μαζική απελευθέρωση γλουταμικού είναι νευροτοξική για τους νευρώνες, καθώς παρατείνει την ελάττωση των ενεργειακών υποστρωμάτων και εκπόλωση τους. Η εξωκυττάρια συσσώρευση γλουταμικού υπό συνθήκες ισχαιμίας συνεπάγεται την υπερδιέγερση των NMDA (N-methyl-D-aspartate), των AMPA (alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) υποδοχέων και των υποδοχέων καϊνικού οξέως. Έτσι, εισρέουν ιόντα Na^+ και εκρέουν ιόντα K^+ μέσω των καναλιών των ενεργοποιημένων NMDA υποδοχέων. Επίσης, εισέρχονται ιόντα Ca^{++} εντός των νευρώνων, τα οποία ενεργοποιούν ασβεστιοεξαρτώμενους «κατάρκτες» δευτέρου αγγελιοφόρου μηνύματος με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C και την παραγωγή ελεύθερων ριζών και μονοξειδίου του αζώτου, τα οποία καταστρέφουν την κυτταρική μεμβράνη και τα μιτοχόνδρια (Εικόνα 15). Αυτή η αλληλουχία γεγονότων πυροδοτεί τον κυττάρικό θάνατο και είναι γνωστή ως excitotoxicity. Η εισροή ιόντων Ca^{++} και Na^+ συνοδεύεται από είσοδο την νερού και ιόντων Cl^- . Αυτό συνεπάγεται το οίδημα των σωμάτων των νευρώνων και των δενδριτών. Επίσης, όσον αφορά στην εσωτερική δομή των κυττάρων, παρατηρείται οίδημα των μιτοχονδρίων, αποδιάταξη των πολυριβοσωμάτων και ελάττωση του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου.

Κατά την ισχαιμία, εκτός από το γλουταμικό, ελευθερώνονται και άλλοι νευροδιαβιβαστές, οι οποίοι έχουν σημαντικό ρόλο στην επιβίωση του ιστού στην ισχαιμία. Το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA), η σεροτονίνη και η αδενοσίνη είναι νευροδιαβιβαστές που δρουν προστατευτικά στο ΚΝΣ. Η αδενοσίνη ενεργοποιεί στους A1-υποδοχείς στους νευρώνες με αποτέλεσμα την ελάττωση της διεγερσιμότητας της κυτταρικής μεμβράνης, την ελάττωση της απελευθέρωσης γλουταμικού και την αναστολή της φαγοκυτταρικής δράσης της μικρογλοίας. Οι A1 υποδοχείς είναι συζευγμένοι με Gi πρωτεΐνες, αναστέλλουν την αδενυλική κυκλάση και κατά συνέπεια την παραγωγή cAMP, καθώς και την ακόλουθη έκφραση τρίτων μηνυμάτων, όπως τα πρώιμα γονίδια. Οι A1 υποδοχείς εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στο ΚΝΣ, με μεγαλύτερη έκφραση στον ιππόκαμπο, στο φλοιό, στην παρεγκεφαλίδα και το θάλαμο. Η ενεργοποίηση των ενδονευρώνων και η απελευθέρωση του ανασταλτικού νευροδιαβιβαστή γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) είναι ένας ενδογενής νευροπροστατευτικός μηχανισμός ως απάντηση στην ισχαιμία, στο τραύμα, στην επιληψία και στην υπογλυκαιμία (Εικόνα 15) (Lee et al., 2000). Κατά την ισχαιμία αυξάνει το GABA συνολικά σε όλον τον εγκέφαλο και εντοπίζονται αυξημένα επίπεδα ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια. Το GABA προσδέεται στους GABA_A και GABA_B υποδοχείς και αναστέλλεται η εισροή ιόντων Ca^{++} στο κύτταρο και η έκλυση γλουταμικού αντίστοιχα. Από πρόσφατα δεδομένα προκύπτει ότι στον ιππόκαμπο οι GABA_A υποδοχείς δεν συμμετέχουν σε μεγάλο βαθμό στην προστασία του ιστού από την ισχαιμία που προκύπτει λόγω ενεργειακής εξάντλησης αυτού (Llorente et al., 2013). Κατά τη φάση ανάρρωσης του ιστού από την ισχαιμία, η εξωκυττάρια συγκέντρωση GABA επιστρέφει σε φυσιολογικά επίπεδα (Torp et al., 1993).



Εικόνα 15. Α. Σχηματική αναπαράσταση των μηχανισμών που πυροδοτεί η ισχαιμία. Λόγω της ισχαιμίας, μειώνεται η παροχή οξυγόνου και γλυκόζης στον εγκέφαλο και ελαττώνεται το ATP του κυττάρου. Η μείωση του ATP έχει ως αποτέλεσμα την διαταραχή της ενδοκυττάριας ομοιόστασης σε ιόντα και την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Η πρόσδεση του γλουταμικού στους NMDA υποδοχείς (NMDAR) συνεπάγεται αύξηση του ενδοκυττάρου Ca^{++} και συνεπώς την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C (PLC). Η ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C συνεπάγεται σε αύξηση της ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC). Πιστεύεται ότι η PKC και ιδίως η γ PKC ενισχύει τη λειτουργία των NMDAR, ενισχύοντας την εισροή ασβεστίου στο κύτταρο (Bright and Mochly-Rosen, 2005).

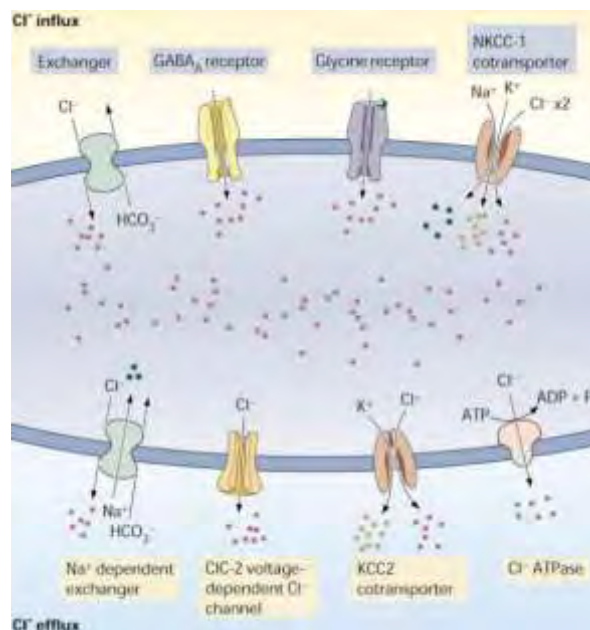
Β. Σχηματική αναπαράσταση των μηχανισμών εμπλεκόμενων στην ισχαιμική βλάβη των νευρώνων (με κόκκινο) και των νευροπροστατευτικών μηχανισμών (με μπλε). Κατά την ισχαιμία, ελευθερώνεται γλουταμικό στη συναπτική σχισμή, ενεργοποιούνται οι NMDA υποδοχείς και αυξάνει η εισροή ιόντων Ca^{++} στο κύτταρο. Το ασβέστιο δρα ως δεύτερο αγγελιοφόρο μήνυμα και μέσω της παραγωγής ελευθέρων ριζών και μονοξειδίου του αζώτου και της ενεργοποίησης καταβολικών ενζύμων προκύπτει βλάβη στον νευρώνα. Ως απάντηση στην ισχαιμική βλάβη, αυξάνεται η απελευθέρωση του νευροπροστατευτικού GABA νευροδιαβιβαστή. Το GABA δρα προσυναπτικά μέσω των $GABA_B$ υποδοχέων και αναστέλλει την απελευθέρωση γλουταμικού και μετασυναπτικά μέσω των $GABA_A$ υποδοχέων, εμποδίζοντας την εισροή ιόντων Ca^{++} στο κύτταρο (Lee et al., 2000).

Κατά την ισχαιμία αυξάνει το GABA συνολικά σε όλον τον εγκέφαλο και εντοπίζονται αυξημένα εξωκυττάρια επίπεδα. Αυτή η αυξημένη συγκέντρωση δεν αποδίδεται σε αυξημένη σύνθεση GABA, αλλά έχει αποδοθεί στους εξής τρεις μηχανισμούς: 1. στην αυξημένη απελευθέρωση του νευροδιαβιβαστή από κυστίδια, τα οποία εκπολώνονται λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης ιόντων Ca^{++} 2. στην ανάστροφη δράση των μεταφορέων των GABA (GAT) λόγω εκπόλωσης και μη εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση των ιόντων Ca^{++} και 3. στην εκροή του νευροδιαβιβαστή από τα «τραυματισμένα», διαπερατά άκρα (terminals) των νευρώνων (Phillis et al., 1994; Green et al., 2000).

Η παρατεταμένη έκθεση των $GABA_A$ υποδοχέων στο GABA έχει ως αποτέλεσμα την απευαισθητοποίηση του υποδοχέα στο εξωκυττάριο σηματοδοτικό μόριο. Ένας προτεινόμενος μηχανισμός απευαισθητοποίησης του $GABA_A$ υποδοχέα

είναι η ενδοκυττάρωση του υποδοχέα, μετά από 30-45 λεπτά συνεχόμενης έκθεσης στο GABA (Alicke B and Schwartz, 1995). Ταυτόχρονα, καθώς μειώνεται ο αριθμός των GABA_A υποδοχέων, παρατηρείται μειωμένη έκφραση των mRNAs των υπομονάδων α1 και β2 των υποδοχέων στα CA1, CA3 πεδία και στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου. Στο πεδίο CA3 και στην οδοντωτή έλικα η έκφραση του mRNA επανέρχεται στα φυσιολογικά επίπεδα μετά από 4 ώρες ανάρρωσης του ιστού, ενώ στην CA1 περιοχή η έκφραση δεν επανέρχεται στα φυσιολογικά επίπεδα (Li et al., 1993). Άλλοι μηχανισμοί που εξηγούν την μειωμένη λειτουργία των GABA_A υποδοχέων αμέσως μετά την επέλευση της ισχαιμίας είναι οι εξής: 1. η ελάττωση της κλίσης (gradient) ιόντων Cl⁻ μεταξύ του ενδοκυττάρου και εξωκυττάρου χώρου (Εικόνα 16) και 2. η ύπαρξη διαμεσολαβητών που αλλοιώνουν τη δομή και τη λειτουργία των υποδοχέων. Συγκεκριμένα, η αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ιόντων Ca⁺⁺ είναι ένα κομβικό σημείο στη βλάβη του νευρώνα κατά την ισχαιμία, καθώς ενεργοποιεί ένζυμα όπως οι πρωτεάσες, η φωσφολιπάση A2 και οι ενδονουκλεάσες, οδηγεί στη συσσώρευση ελεύθερων λιπαρών οξέων μη κορεσμένων (εικοσανοειδή), οδηγεί στη δημιουργία ελεύθερων ριζικών και στην καταστροφή των μιτοχονδρίων (Schwartz and Sah, 2001).

Η παρατεταμένη έκθεση των GABA_B υποδοχέων στο GABA έχει ως αποτέλεσμα την απευαισθητοποίηση του υποδοχέα. Σε παθολογικές καταστάσεις όπως η ισχαιμία, η οποία χαρακτηρίζεται από ενεργοποίηση των υποδοχέων γλουταμικού, η απευαισθητοποίηση των GABA_B υποδοχέων συνεπάγεται τη μειωμένη ανασταλτική δράση τους και την πιθανή επιτάχυνση της αυτόλυσης των νευρώνων (Benke et al., 2012). Από ένα in vitro μοντέλο ισχαιμίας παρατηρήθηκε διαφορετική απόκριση των δύο υπομονάδων των GABA_B υποδοχέων στο κυτταρικό στρες. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι η υπομονάδα GABA_{B1} είναι λιγότερο ευαίσθητη κατά την περίοδο ισχαιμίας του ιστού από ότι η υπομονάδα GABA_{B2}. Τα επίπεδα των πρωτεϊνών των GABA_{B2} ήταν σημαντικά ελαττωμένα 60 λεπτά μετά το ισχαιμικό συμβάν (Cimarosti et al., 2009).



Εικόνα 16. Σχηματική αναπαράσταση των μηχανισμών αύξησης της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ιόντων Cl⁻. Μετά την επέλευση της ισχαιμίας, συσσωρεύεται το Cl⁻ στον ενδοκυττάρου χώρο είτε λόγω αυξημένης εισροής των ιόντων είτε λόγω ελαττωμένης εκροής από το κύτταρο. Η αύξηση στην εισροή των ιόντων μπορεί να προκύψει λόγω 1. της

επαναλαμβανόμενης διάνοιξης των GABA_A-Cl⁻ διαύλων, 2. της αυξημένης Cl⁻/HCO₃⁻ ανταλλαγής και 3. της ενεργοποίησης συμμεταφορέων Na⁺/K⁺/2Cl⁻(NKCC-1). Η ελάττωση της εξόδου των ιόντων από το κύτταρο μπορεί να προκύψει λόγω 1. της αναστολής της ανταλλαγής Cl⁻/ HCO₃⁻ (εξαρτώμενο από το Na⁺), 2. της αναστολής των τασηο-εξαρτώμενων καναλιών Cl⁻ (ClC-2) , 3. αναστροφή της λειτουργίας ή υπολειτουργία των συμμεταφορέων K⁺/ Cl⁻ (KCC2) και 4. της μειωμένης λειτουργίας της Cl⁻-ATPase. Όλοι αυτοί οι μηχανισμοί οδηγούν σε ελάττωση της κλίσης των ιόντων Cl⁻ μεταξύ ενδοκυττάριου και εξωκυττάριου χώρου. Η ανασταλτική δράση του GABA εξαρτάται από το βαθμό ελάττωσης της κλίσης των ιόντων Cl⁻ μετά το ισχαιμικό συμβάν (Schwartz and Sah, 2001).

ΣΚΟΠΟΣ

Από τη βιβλιογραφία δεν προκύπτουν πρόσφατες μελέτες σχετικά με την ανοσοδραστικότητα του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA) σε τομές ιπποκάμπου αρουραίου μονιμοποιημένες με την τεχνική της εμβύθισης. Συνεπώς, σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της μεταβολής της ανοσοδραστικότητας του GABA σε τομές της ραχιαίας και κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου αρουραίου που μονιμοποιήθηκαν με τη μέθοδο της εμβύθισης.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Πειραματόζωα

Για τα πειράματα της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν ενήλικες αρσενικοί επίμυες Wistar, βάρους 250-300 γρ. Τα ζώα τοποθετούνταν σε κλουβιά ανά 3-4, σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας, είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό και σταθερής έντασης περιοδικό φωτισμό (12 ώρες φώς και 12 ώρες σκοτάδι). Οι συνθήκες διαβίωσης και χειρισμού των πειραματόζωων ήταν σύμφωνες με τον Ελληνικό Νόμο (Π.Δ. 160/91).

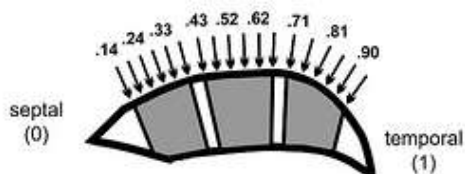
Παρασκευή τομών ιπποκάμπου

Τα πειραματόζωα αποκεφαλίστηκαν σε ειδική λαιμητόμο. Στη συνέχεια το κρανίο διανοίχθηκε και αποκαλύφθηκε ο εγκέφαλος του ζώου. Αφαιρέθηκαν οι μήνιγγες και με τη χρήση ειδικών εργαλείων, ο εγκέφαλος ανασηκώθηκε από τον πρόσθιο κρανιακό βόθρο. Αποκόπηκαν τα υποκείμενα οπτικά νεύρα και έγινε εξαγωγή του εγκεφάλου από το κρανίο. Καθ' όλη τη διαδικασία εξαγωγής ο εγκέφαλος ήταν εκτεθειμένος στον αέρα και για να μην στεγνώσει διαβρέχονταν με κρύο ($t=0-4^{\circ}\text{C}$) τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό (TENY) σύστασης (σε mM): 124 NaCl, 4 KCl, 2 MgSO₄, 2 CaCl, 1.25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 10 γλυκόζη σε pH 7.4, το οποίο είχε οξυγονωθεί με μείγμα αερίου σύστασης 95% O₂-5% CO₂.

Μετά την απομάκρυνση της παρεγκεφαλίδας διαχωριζόταν τα δύο ημισφαίρια με τομή στο ύψος της μέσης γραμμής (midline). Από τα δύο ημισφαίρια μόνο το ένα από τα δύο προορίζονταν για περαιτέρω επεξεργασία. Το άλλο ημισφαίριο δεν επεξεργάζονταν διότι παρεμβάλλονταν ένα χρονικό διάστημα 3 λεπτών από τη στιγμή που ξεκινούσε η επεξεργασία του πρώτου ημισφαιρίου. Στη συνέχεια, ο ιπποκάμπος του ημισφαιρίου αποχωριζόταν από τις παρακείμενες δομές (φλοιός, θάλαμος) και τοποθετούνταν στην έδρα μικροτόμου (McIlwain tissue chopper, Εικόνα 17). Κατόπιν, λαμβάνονταν τομές πάχους 500 μm εγκάρσιες στον επιμήκη άξονα του ιπποκάμπου, τόσο από τη ραχιαία όσο και από την κοιλιακή του μοίρα (Εικόνα 18).



Εικόνα 17. Μικροτόμος McIlwain (www.immunohistochemistry.us).



Εικόνα 18. Σχηματική αναπαράσταση των γωνιών τομής του ιπποκάμπου εγκάρσιως στον επιμήκη άξονα στη ραχιαία (septal), μέση και κοιλιακή (temporal) του μοίρα (www.sciencetis.com).

Τόσο από την ραχιαία, όσο και από την κοιλιακή μοίρα του ιπποκάμπου προέκυψαν δύο ομάδες τομών: η **πρώτη ομάδα** ($t=0$ h, **ομάδα 0**) αποτελούνταν από τομές οι οποίες τοποθετούνταν αμέσως σε δοχείο που περιείχε κρύο ($T=0-4^{\circ}\text{C}$) μονιμοποιητικό διάλυμα παραφορμαλδεΰδης (4% PFA σε 0,1M PB [0,1M

NaH₂PO₄/0,1M Na₂HPO₄] pH=7,4), ενώ η δεύτερη ομάδα (t=1 h, ομάδα 1) αποτελούνταν από τομές οι οποίες μεταφέρονταν σε ειδικό δοχείο το οποίο περιείχε κρύο (T=0-4°C) τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό (TENY) οξυγονωμένο με μείγμα αερίου σύστασης 95% O₂-5% CO₂. Μετά από μια ώρα επώασης στο TENY, οι τομές τοποθετούνταν σε δοχείο που περιείχε κρύο (T=0-4°C) μονιμοποιητικό διάλυμα παραφορμαλδεΐδης (4% PFA, ως άνω). Οι μονιμοποιούμενες τομές διατηρούνταν στο ψυγείο. Η μονιμοποίηση στο διάλυμα παραφορμαλδεΐδης διαρκούσε 24-36 ώρες.

Η διαδικασία από τον αποκεφαλισμό του πειραματόζωου μέχρι τη λήψη των τομών διαρκούσε για σύντομο χρονικό διάστημα που δεν ξεπερνούσε τα 5 λεπτά προκειμένου να διασφαλισθεί η βιωσιμότητα του ιστού.

Απομάκρυνση των υπολειμμάτων του μονιμοποιητικού

Μετά το πέρας της μονιμοποίησης οι τομές τοποθετήθηκαν σε ειδικές πλαστικές κασέτες. Απομακρύνθηκαν τα υπολείμματα του μονιμοποιητικού με το ξέπλυμα των τομών κάτω από τρεχούμενο νερό βρύσης για 15 λεπτά. Το ξέπλυμα από την παραφορμαλδεΐδη εμποδίζει τον περαιτέρω σχηματισμό δεσμών (γέφυρες μεθυλενίου) μετά το πέρας της μονιμοποίησης.

Αφυδάτωση των τομών και Διαύγαση

Οι τομές αφυδατώθηκαν σε μια σειρά φρέσκων διαλυμάτων αιθανόλης με αύξουσα συγκέντρωση αιθανόλης (50%, 70%, 80%, 95% και 100%) και παρέμειναν στο κάθε διάλυμα για 30 λεπτά. Αυτή η διαδικασία ήταν απαραίτητη για να απομακρυνθεί το νερό από τον ιστό και για να μπορεί στη συνέχεια να εγκλειστεί στην παραφίνη, η οποία δεν αναμειγνύεται με το νερό. Η αφυδάτωση έγινε σε διαλύματα με σταδιακή αύξουσα συγκέντρωση αιθανόλης και όχι κατευθείαν σε 100% αιθανόλη, ώστε να αποφευχθεί η γρήγορη αφυδάτωση και συνεπώς η συρρίκνωση του ιστού, η οποία θα επηρέαζε τη μορφολογία των κυττάρων.

Επειδή η αιθανόλη δεν αναμειγνύεται με την παραφίνη, ο ιστός έπρεπε να περάσει από ένα ενδιάμεσο διάλυμα, το οποίο αναμειγνύεται και με τις αλκοόλες και με την παραφίνη. Συνεπώς, οι τομές τοποθετήθηκαν σε δυο διαλύματα ξυλινίου και παρέμειναν από μια ώρα στο καθένα.

Παραφίνωση και Σκλήνωση των τομών

Οι τομές επώαστηκαν σε δύο δοχεία με υγρή παραφίνη (T=60°C) για μια ώρα στο καθένα. Στο τέλος, οι τομές σκηνώθηκαν σε στερεή παραφίνη και προέκυψαν κύβοι (block) παραφίνης μέσα στο οποία ήταν εγκλεισμένες οι τομές ιπποκάμπου.

Από κάθε κύβο παραφίνης ελήφθησαν λεπτές τομές πάχους 4 μm, οι οποίες εχρώσθησαν με εοσίνη-αιματοξυλίνη (E&H) και μελετηθήκαν ιστολογικά. Ελέγχθηκε η ανατομική ακεραιότητα μέσω της μελέτης της επιμέρους αρχιτεκτονικής του ιστού. Από τους ίδιους κύβους παραφίνης ελήφθησαν λεπτές τομές πάχους 4 μm, στις οποίες μελετήθηκε ποιοτικά η μεταβολή της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του γ-αμινοβουτυρικού οξέος.

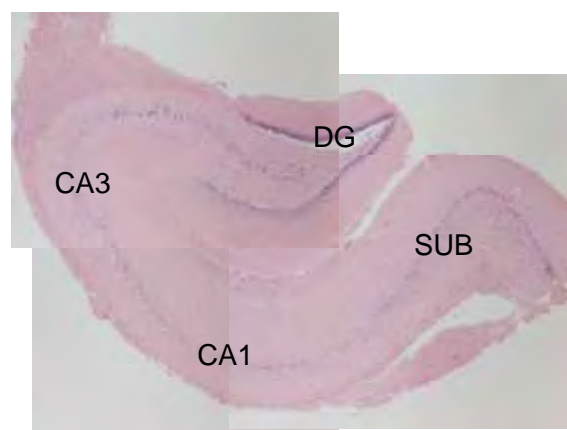
Ιστολογική Μελέτη των τομών ιπποκάμπου

Οι λεπτές τομές χρώστηκαν με εοσίνη-αιματοξυλίνη (E&H) για να μελετηθεί η μορφολογία των κυττάρων. Οι παραφινωμένες λεπτές τομές επώαστηκαν σε κλίβανο και στη συνέχεια ενυδατώθηκαν σε διαλύματα ξυλινίου και μειούμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης (100%, 95%, 80%, 70%, 50%). Στη συνέχεια έγινε χρώση με την αιματοξυλίνη, η οποία εβάψε τη χρωματίνη εντός των πυρήνων μωβ. Οι τομές ξεπλύθηκαν από τα υπολείμματα της αιματοξυλίνης και χρώστηκαν με την εοσίνη

(counterstain), η οποία έβαψε το κυτταρόπλασμα των κυττάρων και τον υπόλοιπο ιστό ροζ. Στη συνέχεια οι τομές αφυδατώθηκαν πάλι (διαλύματα αιθανόλης και ξυλενίου) και καλύφθηκαν με καλυπτρίδες.

Οι λεπτές τομές χρωσμένες με εοσίνη-αιματοξυλίνη μελετήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο και η λήψη των φωτογραφιών έγινε με τη χρήση κάμερας συνδεδεμένης με το μικροσκόπιο.

Ελήφθησαν αντιπροσωπευτικές εικόνες από κάθε υπο-περιοχή του ιπποκάμπου (Εικόνα 19). Ελέγχθηκαν η ακεραιότητα του πυρήνα, η ύπαρξη πυρηνίσκου, η ευκρινής διάκριση της ευχρωματίνης εντός του πυρήνα, η απόχρωση του κυτταροπλάσματος και η συρρίκνωση πέριξ των κυττάρων και των αγγείων (vacuolation) ως ένδειξη της ισχαιμίας ή μη του ιστού. Δημιουργήθηκε μια κλίμακα βάση της οποίας βαθμολογήθηκαν οι τομές ανάλογα με τη σοβαρότητα της αυτόλυσης του ιστού. Οι τομές που βαθμολογήθηκαν με μεγαλύτερο σκορ δεν προχώρησαν στο στάδιο της ανοσοϊστοχημείας. Η ποιοτική ανάλυση των εικόνων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού ανάλυσης εικόνας ImageJ 1.41o.



Εικόνα 19. Ραχιαία μοίρα ιπποκάμπου. E&H (4x). Στη φωτογραφία επισημαίνονται οι περιοχές του ιπποκάμπου που μελετήθηκαν (Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή Λάρισα, 2013).

Ανοσοϊστοχημική μελέτη των λεπτών τομών ιπποκάμπου

Για τον κυτταρικό εντοπισμό και τη μελέτη της μεταβολής των επιπέδων έκφρασης του ανασταλτικού νευροδιαβιβαστή GABA πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική μελέτη με τη χρήση ειδικού πολυκλωνικού αντισώματος ανεπτυγμένου σε κουνέλι έναντι του GABA σε τελική συγκέντρωση 1/500 (Sigma Γερμανίας, A 2052). Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε αναφέρεται παρακάτω.

Πρώτη μέρα: αποπαραφίνωση των λεπτών τομών με εμβύθιση σε ξυλένιο (2φορές από 6 λεπτά) και ενυδάτωση σε διαλύματα αιθανόλης μειούμενης συγκέντρωσης (100%, 95%, 80%, 70% και 50%) για 5 λεπτά μέσα στο καθένα. Ακολούθησε επώαση σε κιτρικό ρυθμιστικό διάλυμα 0,01M, pH=6.0 και θέρμανση με τη χρήση μικροκυμάτων σε κιτρικό ρυθμιστικό διάλυμα 0,01M, pH=6.0, 3 λεπτά στα 750W, και μετά 7 λεπτά στα 350W. Ακολούθησε επώαση με 10% Normal Goat Serum σε PBS (blocking) και επώαση με το διάλυμα του 1^{ου} αντισώματος (Ab rabbit anti-GABA) σε συγκέντρωση 1:500 (0,5% Triton X σε PBS) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και μετά στους 4^ο overnight.

Δεύτερη μέρα: αφού έγινε έκπλυση με PBS του πρώτου αντισώματος, οι λεπτές τομές επωάστηκαν με το διάλυμα του 2^{ου} αντισώματος (Ab anti-rabbit Alexa 555) σε συγκέντρωση 1:400 σε PBS για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Το δεύτερο αντίσωμα ήταν φθορίζον. Τέλος, έγινε έγκλειση σε γλυκερόλη και τοποθετήθηκαν οι καλυπτρίδες.

Για την οπτικοποίηση του ιστού χρησιμοποιήθηκε μικροσκόπιο φθορισμού AxioImager Z1 (Carl Zeiss, Jena, Germany) εξοπλισμένο με φίλτρα κατάλληλου μήκους κύματος και λογισμικό AxioVision software, 4.7.1 και αντικειμενικός φακός Plan-Neofluar 10x. Για την λήψη των εικόνων χρησιμοποιήθηκε ασπρόμαυρη κάμερα AxioCam CCD (Carl Zeiss, Jena, Germany). Ελήφθησαν αντιπροσωπευτικές εικόνες από κάθε περιοχή του υποκάμπου και έγινε ποιοτική ανάλυση της έντασης ανοσοφθορισμού των εικόνων. Η ανάλυση των εικόνων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού ανάλυσης εικόνας ImageJ 1.41o.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 8 πειραματόζωα, από τα οποία τα 4 προχώρησαν έως και το στάδιο της ανοσοϊστοχημείας. Σε αυτά τα 4 πειραματόζωα παρασκευάστηκαν τομές ιπποκάμπου πάχους 500μm από τη ραχιαία και κοιλιακή μοίρα. Από τον κάθε ιπποκάμπο λαμβάνονταν περίπου 6 τομές από τη ραχιαία και 6 από την κοιλιακή μοίρα. Δημιουργήθηκαν 2 ομάδες τομών. Η πρώτη ομάδα τομών ονομάστηκε «Ομάδα 0» καθώς περιείχε τομές οι οποίες μονιμοποιούνταν αμέσως (t=0 h) μετά τη λήψη τους. Η δεύτερη ομάδα ονομάστηκε «Ομάδα 1» διότι οι τομές επώαζονταν για 1 ώρα σε οξυγονωμένο τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό πριν την μονιμοποίηση (t=1 h). Η μονιμοποίηση των τομών έγινε με την τεχνική της εμβύθισης, όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Ενώ συνολικά ελήφθησαν 48 τομές από τους 4 ιπποκάμπους, μόνο οι 39 φτάσανε μέχρι το στάδιο της μονιμοποίησης (Πίνακας 1). Κάποιες τομές της «Ομάδας 1» καταστράφηκαν κατά το στάδιο της επώασης.

No Ζώου	Αριθμός Τομών Ιπποκάμπου			
	Ραχιαία Μοίρα «Ομάδα 0»	Κοιλιακή Μοίρα «Ομάδα 0»	Ραχιαία Μοίρα «Ομάδα 1»	Κοιλιακή Μοίρα «Ομάδα 1»
1	3	3	2	1
2	3	2	1	2
3	3	3	3	2
4	4	3	2	2
Σύνολο Τομών	13	11	8	7

Πίνακας 1. Αριθμός των τομών που έφτασαν στο στάδιο της μονιμοποίησης ανά πειραματόζωο, ανά μοίρα του ιπποκάμπου και ανά ομάδα.

Ιστολογική εκτίμηση των τομών ιπποκάμπου, E&H χρώση

Οι τομές που ελήφθησαν από κάθε μοίρα του ιπποκάμπου αξιολογήθηκαν μορφολογικά με σκοπό τον αποκλεισμό από την ανοσοϊστοχημική μελέτη τομών με σημαντικό βαθμό αυτόλυσης. Οι τομές, ανάλογα με το βαθμό αυτόλυσης του ιστού, βαθμολογήθηκαν με την παρακάτω κλίμακα: **0**, μη ανιχνεύσιμη κυτταρική βλάβη, **1**, ήπια έως μέτρια κυτταρική αυτόλυση με μέτρια πυκνωτικό πυρήνα και ασαφή όρια πυρηνικής μεμβράνης και κυτταροπλάσματος, **2**, σημαντική αυτόλυση με σημαντικά πυκνωτικό και ρικνωτικό πυρήνα και ρίκνωση των δενδριτών (corkscrew-like processes). Επίσης, στις τομές αξιολογήθηκε η ύπαρξη συρρίκνωσης πέριξ των κυττάρων και των αγγείων (vacuolation), οποία δημιουργεί κενοτοπιώδη εμφάνιση στον ιστό. Οι λεπτές τομές που είχαν στοιχεία συρρίκνωσης βαθμολογούνταν με έναν σταυρό (+). Στον Πίνακα 2 παρατίθεται ο μέσος όρος της βαθμολογίας των τομών ανά περιοχή και ανά μοίρα ιπποκάμπου των δύο ομάδων.

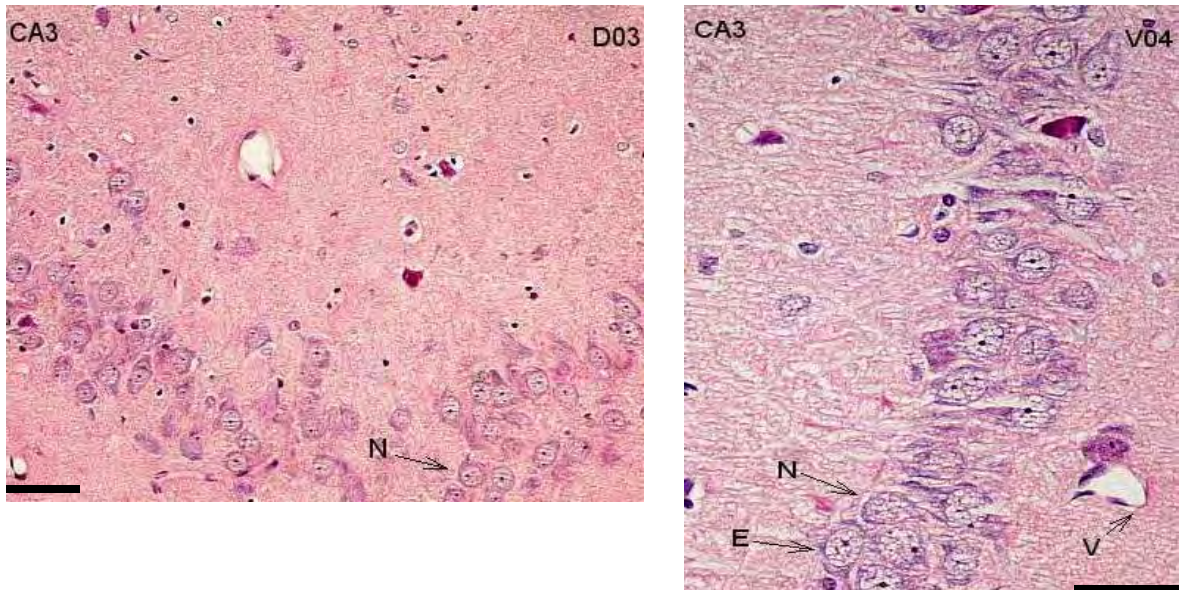
No Ζώου	Ραχιαία Μοίρα Ιπποκάμπου				Κοιλιακή Μοίρα Ιπποκάμπου			
«Ομάδα 0»	Περιοχές Ιπποκάμπου							
	CA1	CA3	DG	SUB	CA1	CA3	DG	SUB
1	1	0	0	1	1+	0	0	1
2	2	0	1	1	2	1	1	1
3	0	0	0	0	1	1	1	1
4	1+	0	0	1	1	0	0	1
No Ζώου	Ραχιαία Μοίρα Ιπποκάμπου				Κοιλιακή Μοίρα Ιπποκάμπου			
«Ομάδα1»	Περιοχές Ιπποκάμπου							
	CA1	CA3	DG	SUB	CA1	CA3	DG	SUB
1	2+	0+	1+	0+	1+	0+	1+	2+
2	1+	1+	1+	2+	1+	0	0+	-
3	0+	0	1+	-	0+	1+	2+	1+
4	0+	0+	1+	2+	-	0	1+	-

Πίνακας 2. Οι λεπτές τομές κάθε κύβου παραφίνης αξιολογήθηκαν και βαθμολογήθηκαν με την εξής κλίμακα (0): μη ανιχνεύσιμη κυτταρική βλάβη, (1): ήπια έως μέτρια κυτταρική αυτόλυση με μέτρια πυκνωτικό πυρήνα και ασαφή όρια πυρηνικής μεμβράνης και κυτταροπλάσματος, (2): σημαντική αυτόλυση με σημαντικά πυκνωτικό και ρικνωτικό πυρήνα και ρίκνωση των δενδριτών (corkscrew-like processes), (+): vacuolation του ιστού, (-): μη διαθέσιμος ιστός για μελέτη. Στον πίνακα φαίνεται ο μέσος όρος της βαθμολογίας κάθε μοίρας ιπποκάμπου και των επιμέρους περιοχών.

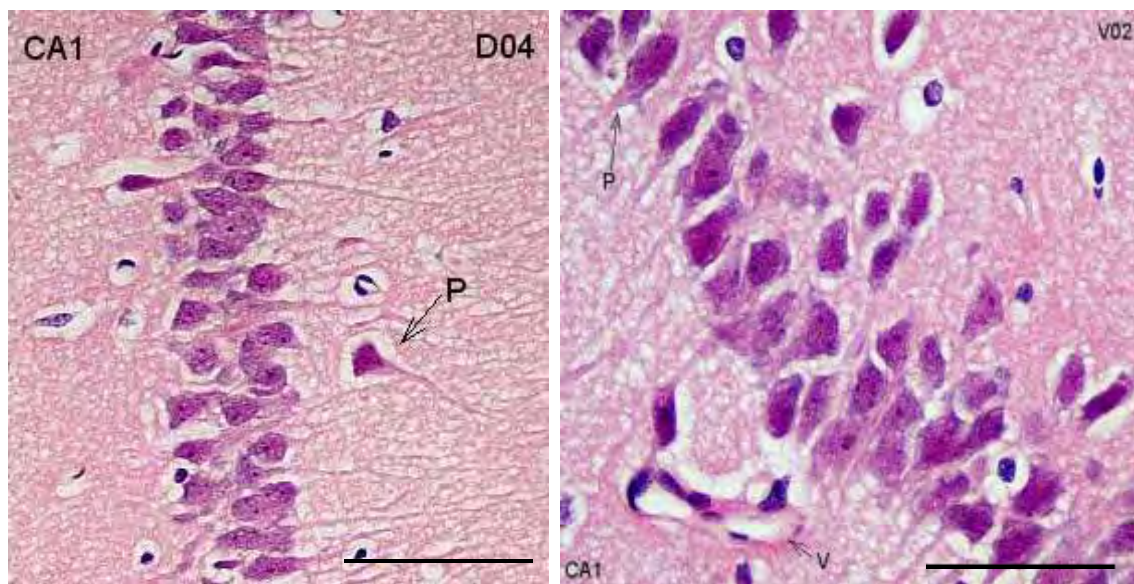
Στην «Ομάδα 0» υπήρχαν αναγνωρίσιμα στοιχεία αυτόλυσης κυρίως στις περιοχές CA1 (Εικόνα 21) και στο υπόθεμα (SUB) (Εικόνες 24, 25) σε τομές της ραχιαίας και κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου. Στην περιοχή CA3 (Εικόνα 22) παρατηρήθηκαν ελάχιστες βλάβες και στην περιοχή της οδοντωτής έλικας (DG) (Εικόνες 22, 23) οι βλάβες ήταν λίγες. Ο ιστός είχε ομαλή υφή, με λίγες εξαιρέσεις, και δεν είχε στοιχεία συρρίκνωσης που να προσδίδουν στον ιστό κενοδοπιώδη εμφάνιση. Επίσης, η παρουσία ρωγμών περιοριζόταν στα περιφερικά τμήματα του ιστού.

Στην «Ομάδα 1» ήταν αναγνωρίσιμα περισσότερα στοιχεία αυτόλυσης στις περιοχές CA1, στο υπόθεμα (SUB) και στην οδοντωτή έλικα (DG) (Εικόνα 28, 29). Η CA3 περιοχή παρουσίαζε τις λιγότερες βλάβες στις τομές και της ραχιαίας και της κοιλιακής μοίρας (Εικόνα 26, 27). Ο ιστός είχε περισσότερα vacuoles σε όλες τις περιοχές είτε αυτές προέρχονταν από τη ραχιαία είτε από την κοιλιακή μοίρα. Τέλος, παρατηρήθηκαν αρκετές ρωγμές στην περιφέρεια και σε εσωτερικά σημεία του ιστού. Οι ρωγμές που προέκυψαν πριν τη μονιμοποίηση των τομών συνοδεύονταν από αρκετά στοιχεία αυτόλυσης σε αντίθεση με αυτές που προέκυψαν μετά τη μονιμοποίηση (κατά την παρασκευή των λεπτών τομών), οι οποίες δεν συνοδεύονταν από στοιχεία αυτόλυσης (Εικόνα 28, 29).

Από τη σύγκριση των τομών των δύο ομάδων προέκυψε ότι οι τομές της «Ομάδας 1» δεν είχαν σημαντικά σοβαρότερες βλάβες σε σύγκριση με αυτές της «Ομάδας 0». Ακόμη, παρατηρήθηκε ότι οι περιοχές CA1 των τομών της «Ομάδας 1» είχαν λιγότερα στοιχεία αυτόλυσης σε σύγκριση με αυτές των τομών της «Ομάδας 0» (Εικόνες 30-32). Οι τομές που βαθμολογήθηκαν με (2) ή με (2+) αποκλείστηκαν από την ανοσοϊστοχημική μελέτη λόγω βαριών αυτολύτικων βλαβών. Οι τομές που αποκλείστηκαν προέρχονταν και από τις δυο ομάδες τομών.



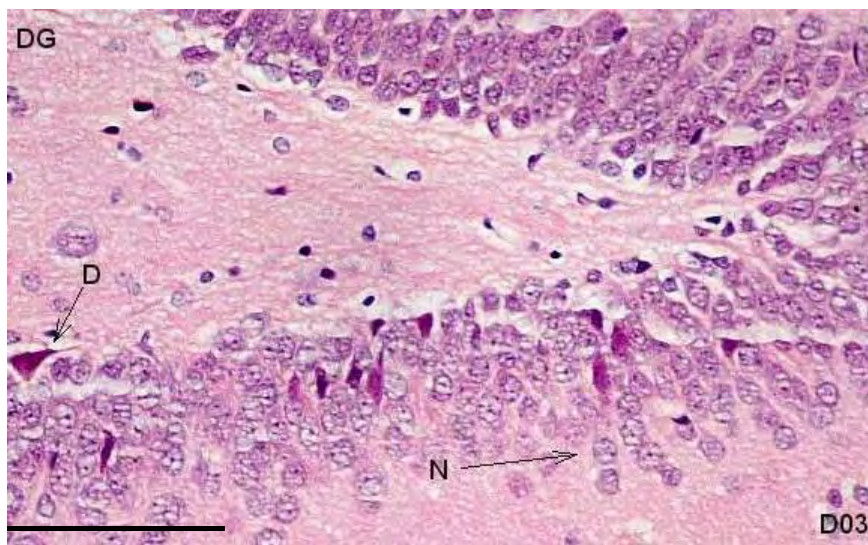
Εικόνα 20. Λεπτές τομές ιπποκάμπου χρωσμένες με εοσίνη-αιματοξυλίνη. Απεικονίζεται η CA3 περιοχή της ραχιαίας (D03) και κοιλιακής (V04) μοίρας του ιπποκάμπου της «Ομάδας 0». D03: η τομή βαθμολογήθηκε με (0), καθώς είναι ορατός ο πυρήνας (N) και είναι σαφής η διαφοροποίηση του από το περίξ κυτταρόπλασμα (10x). V04: η τομή βαθμολογήθηκε με (0). Είναι ορατή η ευχρωματίνη του πυρήνα (E), η οποία προσφύεται κατά τόπους στην πυρηνική μεμβράνη και εντός του πυρήνα είναι ορατός ο πυρηνίσκος. Στη φωτογραφία (20x) απεικονίζεται ένα διατεταμένο αγγείο (V) και εσωτερικά το ενδοθήλιο του Κλίμακα: 75μm. (D03: Dorsal, 0h, ζώο 3; V04: Ventral, 0h, ζώο 4)



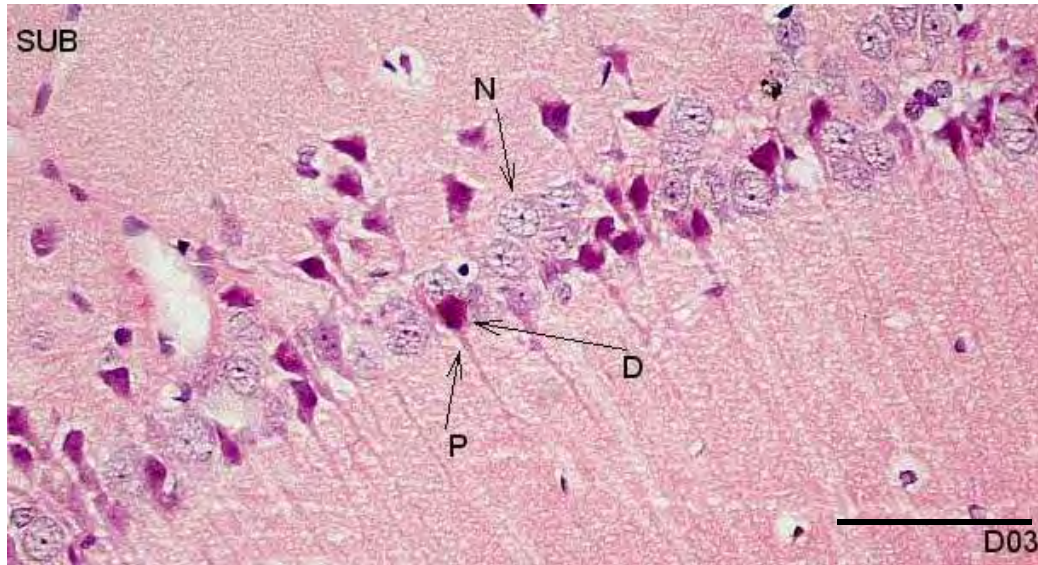
Εικόνα 21. Λεπτές τομές ιπποκάμπου χρωσμένες με εοσίνη-αιματοξυλίνη. Απεικονίζεται η CA1 περιοχή της ραχιαίας (D04) και κοιλιακής (V02) μοίρας του ιπποκάμπου της «Ομάδας 0». D04: η τομή βαθμολογήθηκε με (1+), καθώς οι πυρήνες και το κυτταρόπλασμα είναι έντονα βασεόφιλα και δεν διακρίνεται η πυρηνική μεμβράνη. Ωστόσο, οι νευρώνες δεν έχουν ρικνωθεί και σε κάποιους είναι διακριτός ο πυρηνίσκος. Επίσης, σε κάποιους νευρώνες είναι ορατοί οι δενδρίτες (P) οι οποίοι λόγω ρίκνωσης έχουν το χαρακτηριστικό σχήμα δίκην τριμπουσόν (corkscrew-like processes). Τέλος, παρατηρείται κενοτοπιώδης εμφάνιση του ιστού (vacuolation) (20x, κλίμακα: 75μm). V02: η τομή βαθμολογήθηκε με (1). Στη φωτογραφία απεικονίζεται ένα διατεταμένο αγγείο (V) και εσωτερικά το ενδοθήλιο του και λόγω ρίκνωσης είναι ορατοί οι δενδρίτες (P) (40x, κλίμακα: 150μm).



Εικόνα 22. Λεπτή τομή ιπποκάμπου χρωσμένη με εοσίνη-αιματοξυλίνη. Απεικονίζεται η οδοντωτή έλικα (DG) της κοιλιακής μοίρας (V02) του ιπποκάμπου της «Ομάδας 0». Η τομή βαθμολογήθηκε με (1), καθώς παρατηρούνται μεικτοί πληθυσμοί νευρώνων, κάποιοι πυρήνες διακρίνονται σαφώς από το κυτταρόπλασμα, ενώ κάποια κύτταρα είναι έντονα ρικνωτικά και βασεόφιλα. (10x, κλίμακα: 75μm).



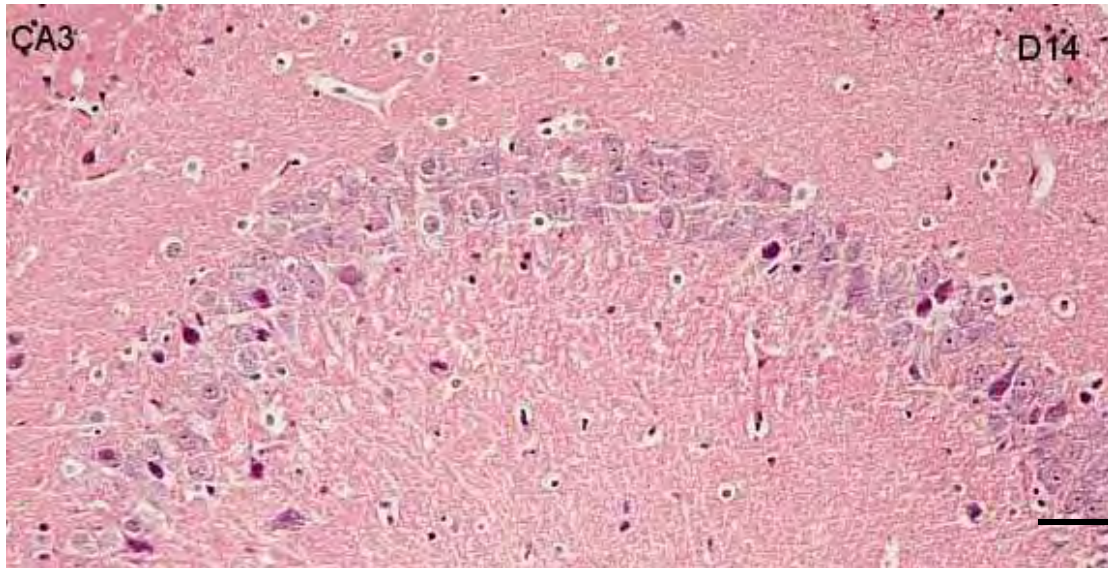
Εικόνα 23. Λεπτή τομή ιπποκάμπου χρωσμένη με εοσίνη-αιματοξυλίνη. Απεικονίζεται η οδοντωτή έλικα (DG) της ραχιαίας μοίρας (D03) του ιπποκάμπου της «Ομάδας 0». Η τομή βαθμολογήθηκε με (0), καθώς στη μεγαλύτερη της επιφάνεια οι πυρήνες (N) διακρίνονται σαφώς από το κυτταρόπλασμα. Κατά τόπους παρατηρούνται λίγα κύτταρα έντονα ρικνωτικά και βασεόφιλα (D, Dark Neurons) (20x, κλίμακα: 75μm).



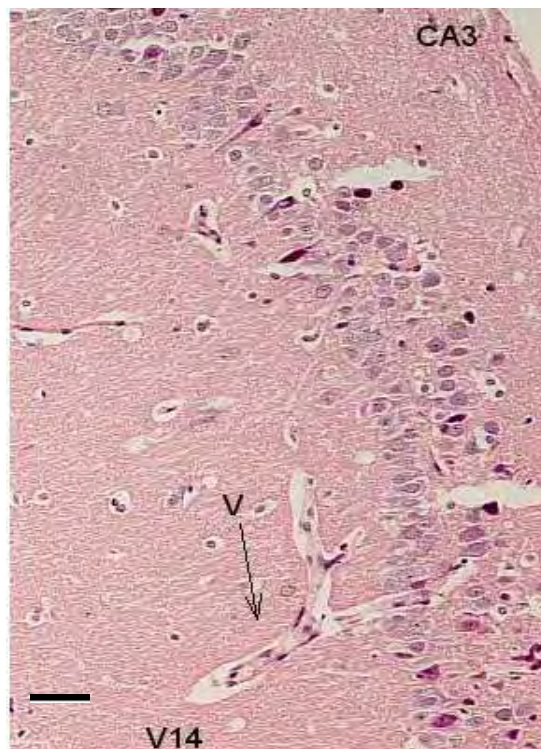
Εικόνα 24. Λεπτή τομή υποκάμπου χρωσμένη με εοσίνη-αιματοξυλίνη. Απεικονίζεται το υπόθεμα (SUB) της ραχιαίας μοίρας του υποκάμπου (D03) της «Ομάδας 0». Η φωτογραφία απεικονίζει νευρώνες των οποίων οι πυρήνες (N) είναι εύκολα διακριτοί από το κυτταρόπλασμα και είναι μορφολογικά ανέπαφοι. Ανάμεσα σε αυτούς τους νευρώνες, υπάρχουν και νευρώνες των οποίων οι πυρήνες και το κυτταρόπλασμα είναι έντονα βασεόφιλα (D). Επίσης, σε κάποιους νευρώνες είναι ορατοί οι δενδρίτες (P-corkscrew-like processes) (20x, κλίμακα: 75μm).



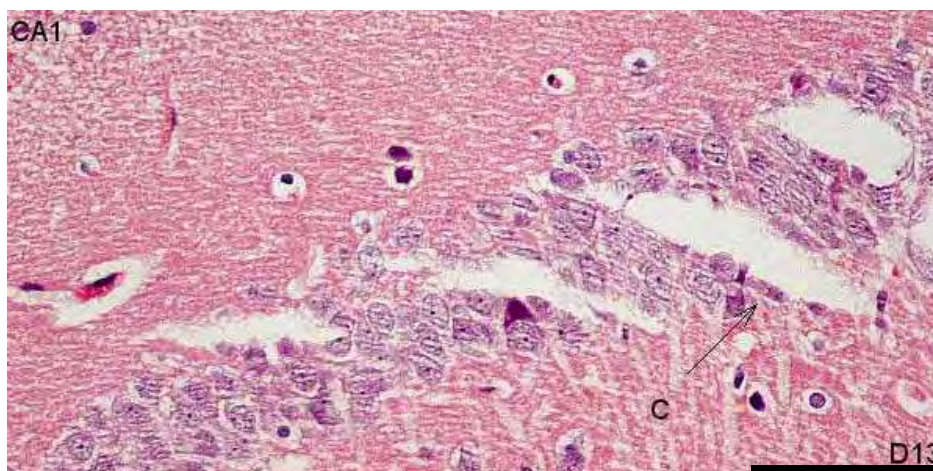
Εικόνα 25. Λεπτή τομή υποκάμπου χρωσμένη με εοσίνη-αιματοξυλίνη. Απεικονίζεται το υπόθεμα (SUB) της κοιλιακής μοίρας του υποκάμπου (V04) της «Ομάδας 0». Η φωτογραφία βαθμολογήθηκε με (1), καθώς απεικονίζει βασεόφιλους νευρώνες. Οι πυρηνικές μεμβράνες δεν είναι εύκολα διακριτές από το κυτταρόπλασμα. Ανάμεσα σε αυτούς τους νευρώνες, υπάρχουν και νευρώνες των οποίων οι πυρήνες και το κυτταρόπλασμα είναι έντονα βασεόφιλα (D). Επίσης, σε κάποιους νευρώνες είναι ορατοί οι δενδρίτες (P-corkscrew-like processes) (20x, κλίμακα: 75μm).



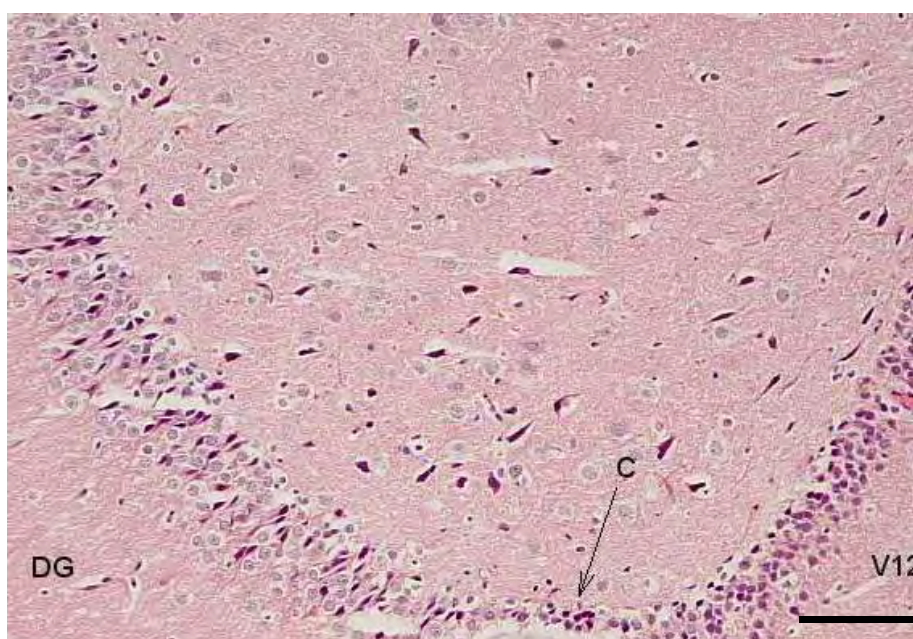
Εικόνα 26. Λεπτή τομή ιπποκάμπου χρωσμένη με εοσίνη-αιματοξυλίνη. Απεικονίζεται η CA3 περιοχή της ραχιαίας μοίρας του ιπποκάμπου (D14) της «Ομάδας 1». Η φωτογραφία βαθμολογήθηκε με (0+). Οι πυρήνες είναι διακριτοί, παρατηρείται κενοδοπιώδης εμφάνιση του ιστού (vacuolation). Ανάμεσα σε αυτούς τους νευρώνες, υπάρχουν και νευρώνες των οποίων οι πυρήνες και το κυτταρόπλασμα είναι έντονα βασεόφιλα (10x, κλίμακα: 75μm).



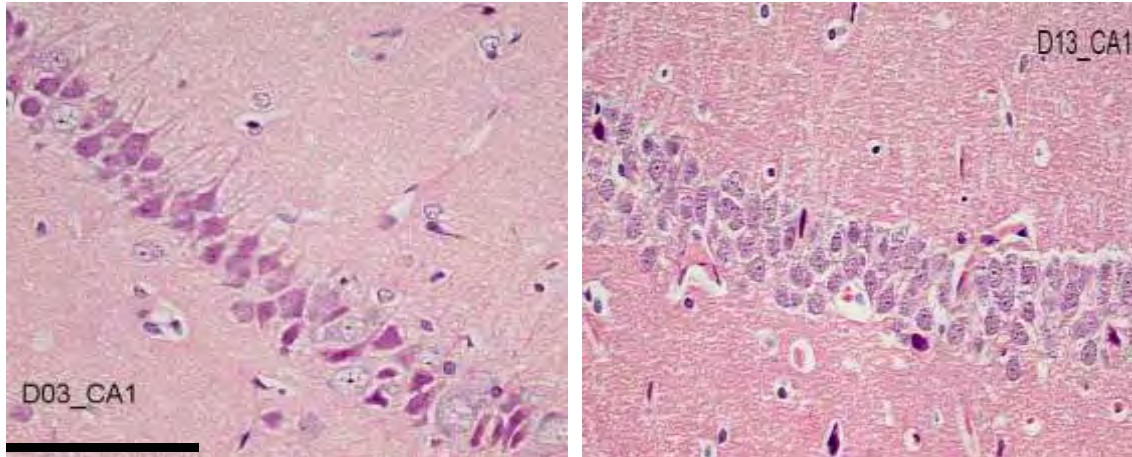
Εικόνα 27. Λεπτή τομή ιπποκάμπου χρωσμένη με εοσίνη-αιματοξυλίνη. Απεικονίζεται η CA3 περιοχή της κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου (V14) της «Ομάδας 1». Η φωτογραφία βαθμολογήθηκε με (0+). Οι πυρήνες είναι διακριτοί, παρατηρείται κενοδοπιώδης εμφάνιση του ιστού (vacuolation) και διάταση του χώρου γύρω από τα αγγεία (V) (10x, 75μm).



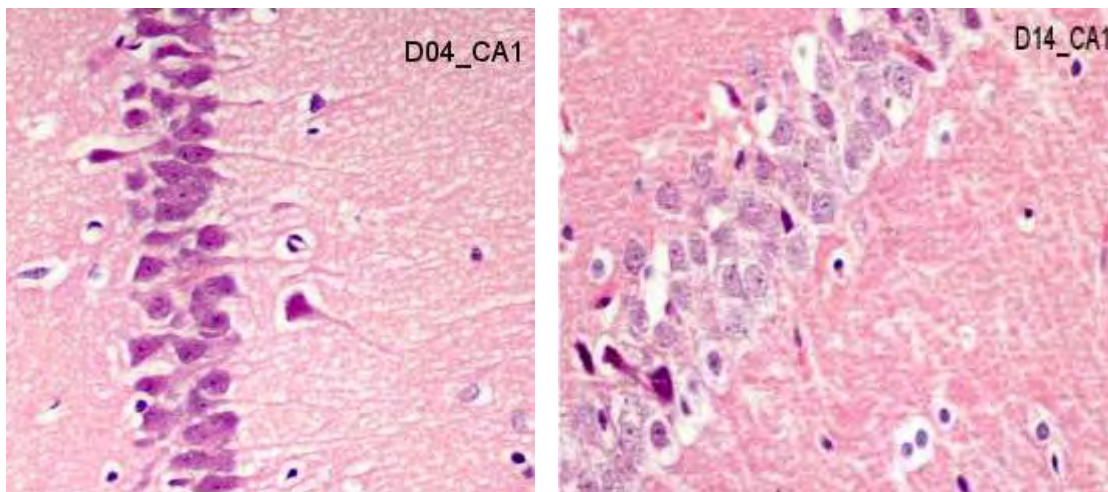
Εικόνα 28. Λεπτή τομή ιπποκάμπου χρωσμένη με εοσίνη-αιματοξυλίνη. Απεικονίζεται η CA1 περιοχή της ραχιαίας μοίρας του ιπποκάμπου (D13) της «Ομάδας 1». Η φωτογραφία βαθμολογήθηκε με (0+). Οι πυρήνες είναι διακριτοί, παρατηρείται κενοδοπιώδης εμφάνιση του ιστού (vacuolation). Η τομή φέρει ρωγμές (C), οι οποίες πιθανώς προέκυψαν μετά τη μονιμοποίηση καθώς γύρω από τη ρωγμή ο ιστός δεν φέρει στοιχεία αυτόλυσης (20x, κλίμακα: 75μm).



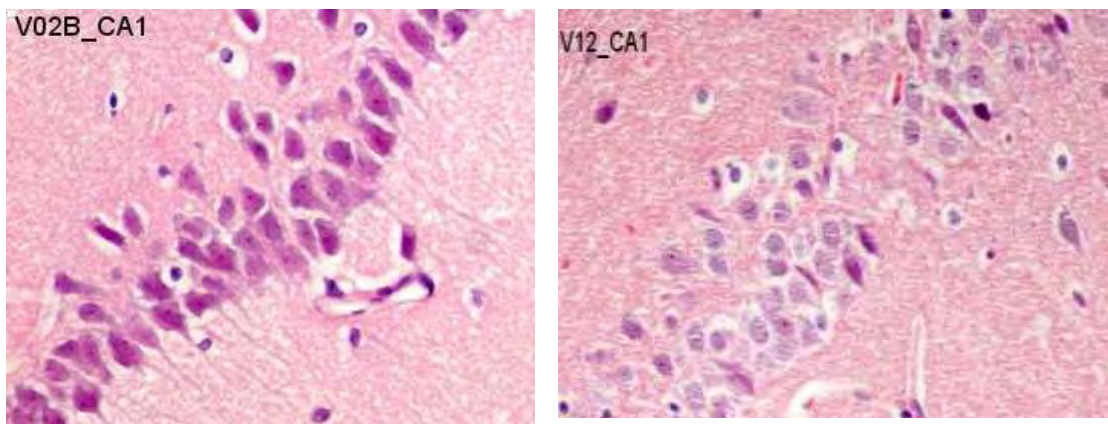
Εικόνα 29. Λεπτή τομή ιπποκάμπου χρωσμένη με εοσίνη-αιματοξυλίνη. Απεικονίζεται η οδοντωτή έλικα (DG) της κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου (V12) της «Ομάδας 1». Η φωτογραφία βαθμολογήθηκε με (1+). Οι πυρήνες είναι διακριτοί αν και διάσπαρτα παρατηρούνται βεσεόφιλοι ρικνωτικοί νευρώνες. Επίσης, παρατηρείται κενοδοπιώδης εμφάνιση του ιστού (vacuolation). Η τομή φέρει ρωγμές (C), οι οποίες πιθανώς προέκυψαν πριν τη μονιμοποίηση καθώς γύρω από τη ρωγμή ο ιστός φέρει στοιχεία αυτόλυσης, δηλαδή έντονα βεσεόφιλους νευρώνες (10x, κλίμακα: 75μm).



Εικόνα 30. Λεπτές τομές ιπποκάμπου χρωσμένες με εοσίνη-αιματοξυλίνη. Απεικονίζεται η CA1 περιοχή. Στην τομή D13 παρατηρούνται λιγότερα στοιχεία αυτόλυσης του ιστού σε σύγκριση με την τομή D03 (20x, κλίμακα: 75μm).



Εικόνα 31. Λεπτές τομές ιπποκάμπου χρωσμένες με εοσίνη-αιματοξυλίνη. Απεικονίζεται η CA1 περιοχή. Στην τομή D14 παρατηρούνται λιγότερα στοιχεία αυτόλυσης του ιστού σε σύγκριση με την τομή D04.



Εικόνα 32. Λεπτές τομές ιπποκάμπου χρωσμένες με εοσίνη-αιματοξυλίνη. Απεικονίζεται η CA1 περιοχή. Στην τομή D12 παρατηρούνται λιγότερα στοιχεία αυτόλυσης του ιστού σε σύγκριση με την τομή D02 (E&H, 20x).

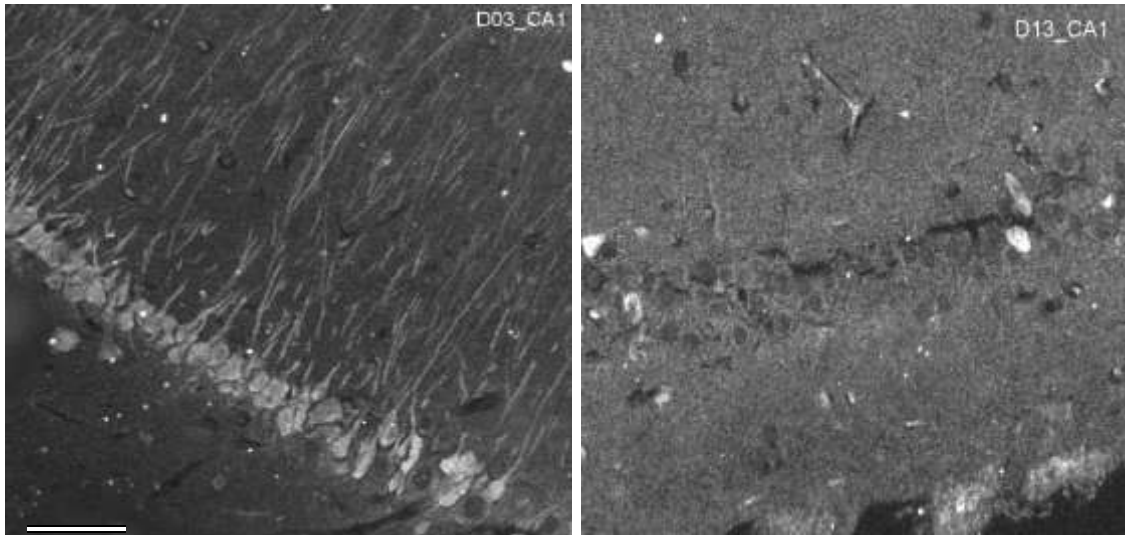
Ανοσοϊστοχημική μελέτη των λεπτών τομών ιπποκάμπου

Για τη μελέτη της ανοσοδραστικότητας του GABA στις τομές που επωάστηκαν για μία ώρα στο τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό, πραγματοποιήθηκαν ανοσοϊστοχημικές μελέτες τόσο στις τομές της «Ομάδας 0», οι οποίες μονιμοποιήθηκαν αμέσως μετά την κοπή τους, όσο και στις τομές της «Ομάδας 1», οι οποίες επωάστηκαν για μια ώρα στο οξυγονωμένο τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό πριν μονιμοποιηθούν. Έγινε ποιοτική αξιολόγηση της έντασης φθορισμού μεταξύ των δύο ομάδων τομών. Από τις 39 τομές, οι 30 προχώρησαν στο στάδιο της ανοσοϊστοχημείας. Από αυτές, 2 τομές αποκολλήθηκαν από τις αντικειμενοφόρες πλάκες κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας. Επίσης, από 12 τομές δεν μπόρεσαν να ληφθούν φωτογραφίες λόγω πολλών artifacts (Πίνακας 3). Στην πληθώρα των artifacts πιθανώς να συνέβαλε το γεγονός ότι οι λεπτές τομές δεν επωάστηκαν σε κλίβανο.

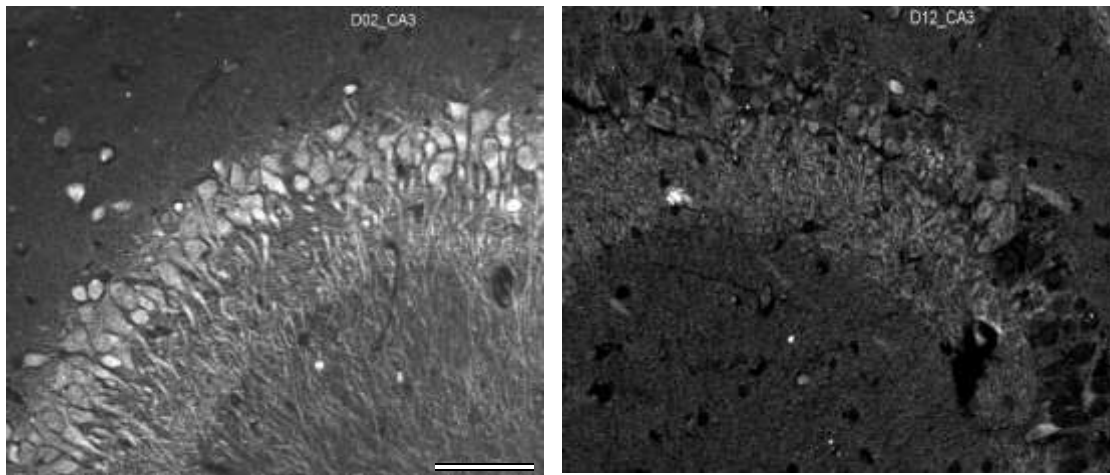
No Ζώου	Αριθμός Λεπτών Τομών Ιπποκάμπου			
	Ραχιαία Μοίρα «Ομάδα 0»	Κοιλιακή Μοίρα «Ομάδα 0»	Ραχιαία Μοίρα «Ομάδα 1»	Κοιλιακή Μοίρα «Ομάδα 1»
1	1	1	-	-
2	1	1	1	2
3	1	2	2	1
4	1	-	1	1
Σύνολο Τομών	4	4	4	4

Πίνακας 3. Αριθμός των λεπτών τομών που φωτογραφήθηκαν μετά την ανοσοϊστοχημεία (ανά πειραματόζωο, ανά μοίρα του ιπποκάμπου και ανά ομάδα).

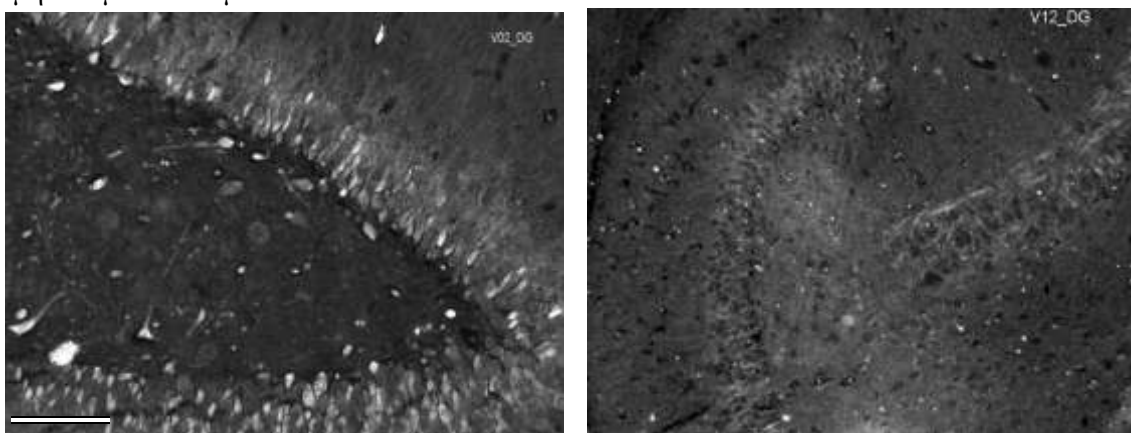
Από την επεξεργασία των φωτογραφιών προκύπτει ότι οι λεπτές τομές της «Ομάδας 0» έχουν αυξημένη ένταση φωτεινότητας σε σύγκριση με τις τομές της «Ομάδας 1» στις οποίες παρατηρείται καθολική ελάττωση της έντασης της ανοσοδραστικότητας του GABA. Η ένταση του ανοσοφθορισμού ήταν αυξημένη σε όλες τις περιοχές των τομών της «Ομάδας 0» σε σύγκριση με αυτές των τομών της «Ομάδας 1» (Εικόνες 33-36).



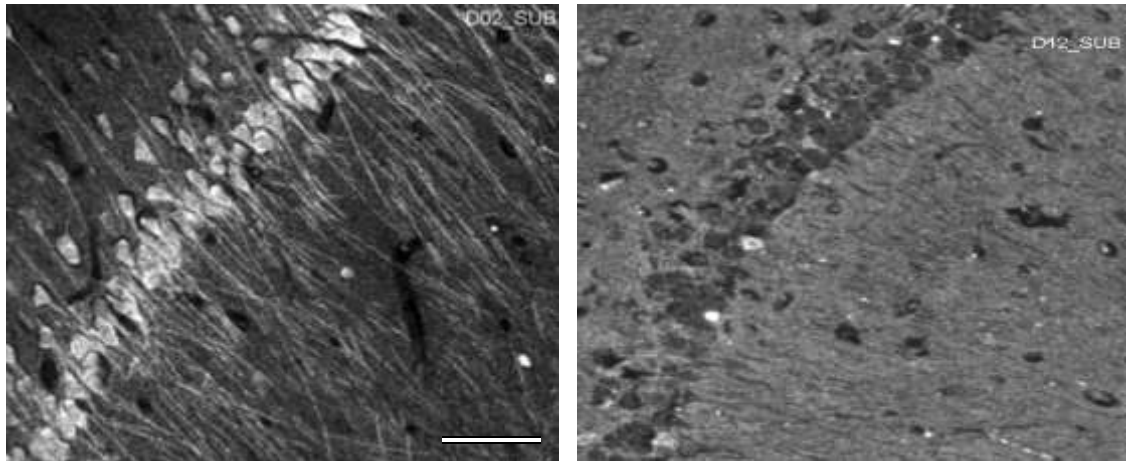
Εικόνα 33. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός του GABA στην CA1 περιοχή του ιπποκάμπου σε τομή της «Ομάδας 0» και σε τομή της «Ομάδας 1». Αυξημένη ένταση σήματος στην D03 τομή. Κλίμακα: 75μm



Εικόνα 34. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός του GABA στην CA3 περιοχή του ιπποκάμπου σε τομή της «Ομάδας 0» και σε τομή της «Ομάδας 1». Αυξημένη ένταση σήματος στην D02 τομή. Κλίμακα: 100μm

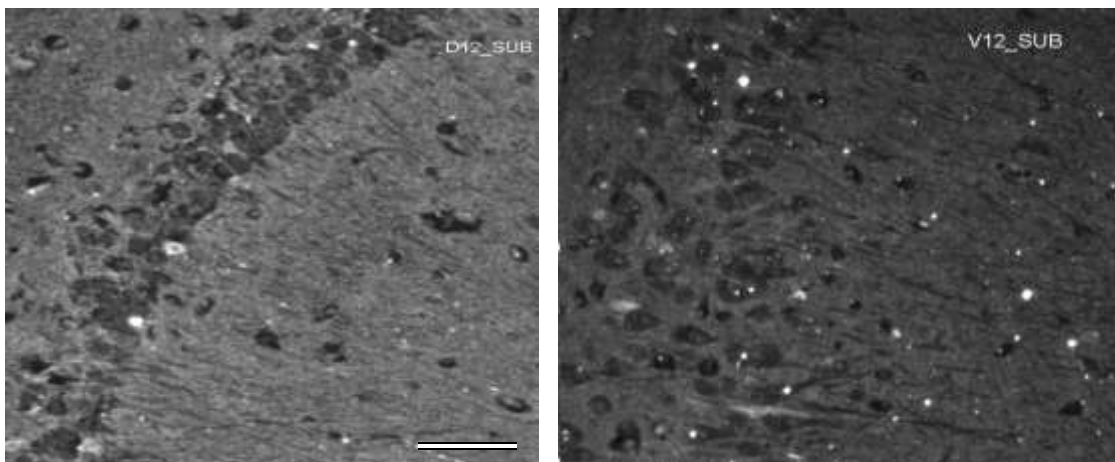


Εικόνα 35. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός του GABA στην οδοντωτή έλικα (DG) του ιπποκάμπου σε τομή της κοιλιακής μούρας. Παρατηρείται αυξημένη ένταση σήματος στην V02 τομή (Ομάδα 0) σε σύγκριση με την V12 τομή (Ομάδα 1). Κλίμακα:75μm

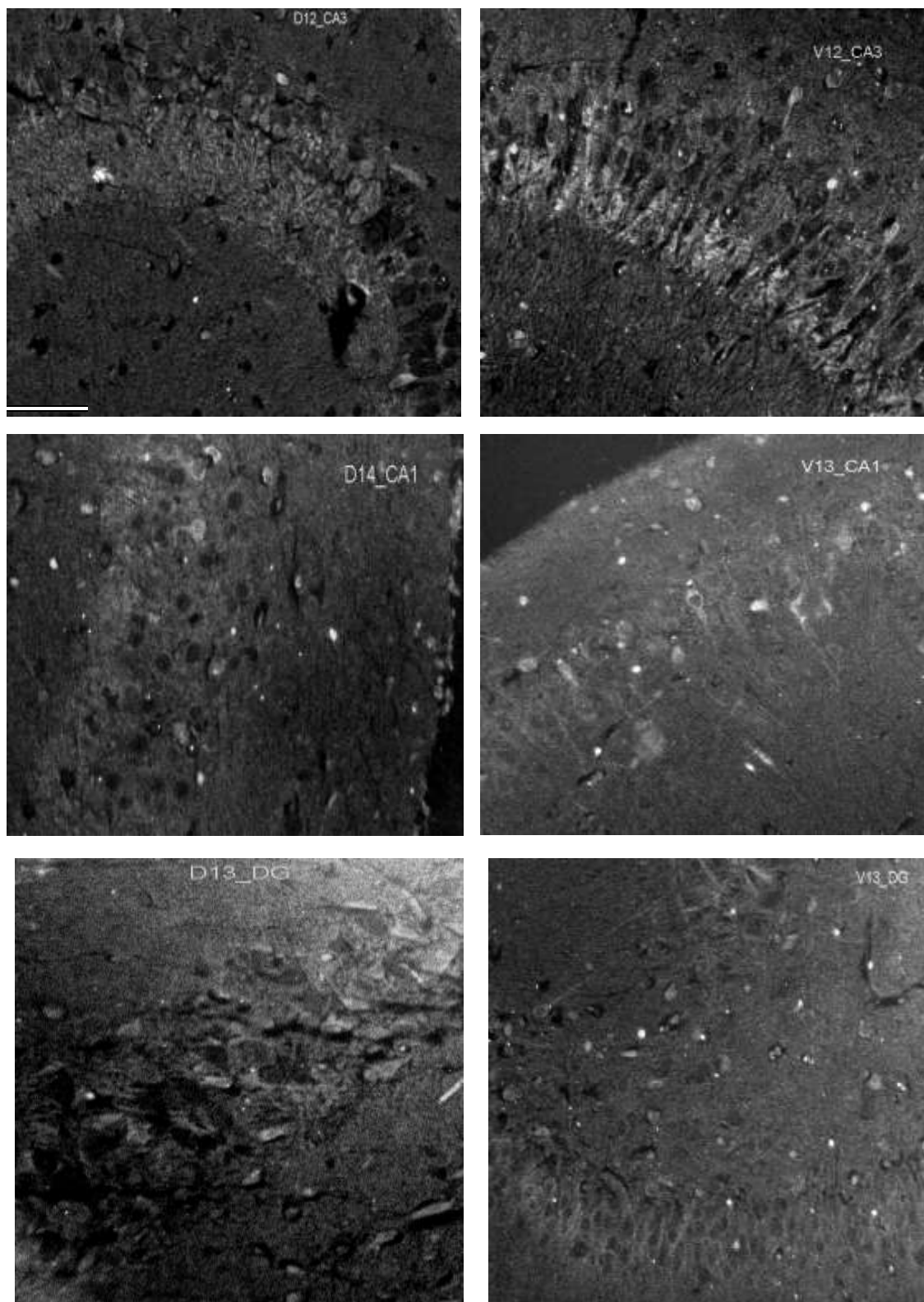


Εικόνα 36. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός του GABA στο υπόθεμα (SUB) του ιπποκάμπου σε τομή της ραχιαίας μοίρας. Παρατηρείται αυξημένη ένταση σήματος στην D02 τομή (Ομάδα 0) σε σύγκριση με την D12 τομή (Ομάδα 1). Κλίμακα: 75μm

Έγινε σύγκριση της έντασης του ανοσοφθορισμού του GABA μεταξύ ραχιαίας και κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου. Στις τομές της «Ομάδας 1» παρατηρήθηκε ότι μεταξύ των δυο μοιρών δεν υπήρχε ουσιαστική διαφορά στην ένταση του ανοσοφθορισμού. Παρατηρήθηκε καθολική ελάττωση της έντασης, σε σχέση με την ένταση της «Ομάδας 0», σε όλες τις περιοχές τόσο της ραχιαίας όσο και της κοιλιακής μοίρας (Εικόνα 37, 38).



Εικόνα 37. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός του GABA σε τομές ιπποκάμπου της ραχιαίας και κοιλιακής μοίρας που επώαστηκαν για 1 ώρα στο τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Δεν παρατηρείται διαφορά στην ένταση του ανοσοφθορισμού μεταξύ κοιλιακής και ραχιαίας μοίρας. Κλίμακα: 75μm.



Εικόνα 38. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός του GABA σε τομές ιπποκάμπου της ραχιαίας και κοιλιακής μοίρας που επώαστηκαν για 1 ώρα στο τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Δεν παρατηρείται διαφορά στην ένταση του ανοσοφθορισμού μεταξύ κοιλιακής και ραχιαίας μοίρας. Κλίμακα:100μm

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι τομές εγκεφάλου χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά από τον Warburg και τους συνεργάτες του το 1924. Από τότε η τεχνική των τομών εγκεφάλου εξελίχθηκε σε ένα πολύ χρήσιμο *in vitro* «εργαλείο» στα χέρια των νευροεπιστημόνων. Η χρήση τους επεκτάθηκε περαιτέρω από τότε που διαπιστώθηκε ότι στις τομές ιπποκάμπου, κατάλληλου μεγέθους (400μm), διατηρείται η συναπτική δραστηριότητα των νευρώνων (Yamamoto and McIlwain, 1966). Έκτοτε, οι τομές ιπποκάμπου χρησιμοποιούνται για τη διερεύνηση των μηχανισμών της συναπτικής διαβίβασης και πλαστικότητας.

Κατά την προετοιμασία των τομών ιπποκάμπου, παρατηρούνται αρκετές μεταβολές στον ιστό τόσο σε βιοχημικό όσο και σε λειτουργικό και μορφολογικό επίπεδο. Όσον αφορά στη λειτουργία των νευρώνων, παρατηρήθηκε σε τομές ιπποκάμπου ενήλικων αρουραίων παροδική απώλεια της συναπτικής διαβίβασης για τα πρώτα 15-20 λεπτά μετά τη λήψη των τομών και πλήρη αποκατάσταση της διαβίβασης 30 λεπτά μετά τη λήψη των τομών (Kiron et al., 1999). Επίσης, παρατηρήθηκε ότι και ο κυτταροσκελετός του νευρώνα αλλοιώνεται αμέσως μετά τη λήψη των τομών. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι οι μικροσωληνίσκοι των δενδριτών αποδιατάσσονται. Ο κυτταροσκελετός αρχίζει να επαναδιατάσσεται περίπου μετά από 30 λεπτά επώασης του ιστού σε οξυγονωμένο τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό (Fiala et al., 2003). Οι προαναφερθείσες μεταβολές αποδίδονται στην ισχαιμία του ιστού λόγω της διακοπής της αιμάτωσης του κατά το *post mortem* διάστημα. Ως απάντηση στην ισχαιμία απελευθερώνεται ο ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής GABA. Κατά την ισχαιμία αυξάνει το GABA συνολικά σε όλον τον εγκέφαλο και εντοπίζονται αυξημένα επίπεδα ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια. Κατά τη φάση ανάρρωσης του ιστού από την ισχαιμία, η εξωκυττάρια συγκέντρωση GABA επιστρέφει σε φυσιολογικά επίπεδα (Toip et al., 1993).

Στην παρούσα εργασία, για την ενεργειακή υποστήριξη του ιστού, τον περιορισμό των μορφολογικών αλλοιώσεων και τη λειτουργική ανάκαμψη του ιστού, οι τομές αμέσως μετά τη λήψη τους τοποθετήθηκαν σε ένα τεχνητό περιβάλλον που περιείχε ένα διάλυμα ίδιας σύστασης με το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (TENY) και το οποίο οξυγονώνονταν. Αυτό στηρίχθηκε σε ιστολογικές μελέτες από τις οποίες προκύπτει ότι μετά την επώαση των τομών στο TENY παρατηρείται ανάρρωση του ιστού σε λειτουργικό επίπεδο (Kiron et al., 1999, Fiala et al., 2003).

Ιστολογική μελέτη των τομών ιπποκάμπου

Οι τομές που προορίζονταν για ανοσοϊστοχημική μελέτη εξετάστηκαν ιστολογικά πριν προχωρήσουν στο στάδιο της ανοσοϊστοχημείας. Αυτό έγινε με σκοπό να αποκλειστούν από τη μελέτη όσες τομές είχαν υποστεί μη αναστρέψιμη βλάβη κατά το *post mortem* διάστημα. Από την ιστολογική μελέτη των τομών συμπεραίνεται ότι:

1. Συνολικά δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές όσον αφορά στο βαθμό αυτόλυσης του ιστού μεταξύ των τομών που μονιμοποιήθηκαν αμέσως και των τομών που επώαστηκαν στο TENY.
2. Οι περιοχές CA3 ήταν αυτές με τις λιγότερες αυτολυτικές βλάβες και στις δύο ομάδες τομών.
3. Οι περιοχές CA1 των τομών που επώαστηκαν στο TENY («Ομάδα 1», t=1 h) είχαν σημαντικά λιγότερες αυτολυτικές βλάβες από αυτές των τομών που μονιμοποιήθηκαν αμέσως («Ομάδα 0», t=0 h).

4. Δεν παρατηρήθηκαν αξιολογήσιμες διαφορές στο βαθμό αυτόλυσης του ιστού σε σχέση με την μοίρα του ιπποκάμπου από την οποία προέρχονταν η τομή.

Από τη βιβλιογραφία προκύπτει ότι η ραχιαία μοίρα του ιπποκάμπου είναι πιο ευαίσθητη στην ισχαιμία από ότι η κοιλιακή (Shmidt-Kastner and Freund, 1991). Τα ευρήματα της μελέτης δεν συμβαδίζουν με τα παραπάνω. Επίσης, προκύπτει από τη βιβλιογραφία ότι η CA3 περιοχή και η οδοντωτή έλικα είναι λιγότερο ευαίσθητες στην ισχαιμία από ότι η CA1 περιοχή (Shmidt-Kastner and Freund, 1991). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμφωνούν με τα παραπάνω. Όταν ο ιστός μονιμοποιείται με την τεχνική της εμβύθισης, τότε παρεμβάλλεται ένα χρονικό διάστημα (*post-mortem*) μεταξύ της εκτομής του ιστού και της μονιμοποίησης κατά το οποίο ξεκινάει η αυτόλυση του ιστού. Όσο μικρότερο είναι αυτό το χρονικό διάστημα, τόσο λιγότερες είναι οι βλάβες. Επίσης, από τη βιβλιογραφία προκύπτει ότι η παρασκευή τομών εγκεφάλου (*brain slice preparation*) επιφέρει αρκετές βλάβες στις επιπολής στιβάδες του ιστού (Reid et al., 1988). Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιελάμβανε την εξαγωγή του ιπποκάμπου, τη λήψη τομών πάχους 500μm και τη μονιμοποίησή τους με εμβύθιση. Θα ανέμενε κανείς ότι, δεδομένου του πρωτοκόλλου που ακολουθήθηκε, οι αυτολυτικές βλάβες θα ήταν εκτεταμένες τόσο στις τομές που μονιμοποιήθηκαν αμέσως όσο και σε αυτές που μονιμοποιήθηκαν μια ώρα μετά. Αντιθέτως, από την ιστολογική εξέταση των τομών προέκυψε ότι οι τομές και των δύο ομάδων ήταν καλής ποιότητας και ότι στις τομές που επώαστηκαν στο TENY η περιοχή CA1, η οποία είναι περισσότερο επιρρεπής στην ισχαιμία, είχε λιγότερες αυτολυτικές βλάβες. Αυτό παρατηρήθηκε σε τομές των 3 από τα 4 πειραματόζωα. Το μέγεθος του δείγματος δεν είναι αρκετά μεγάλο για να καταλήξουμε στο συμπέρασμα ότι η επώαση των τομών στο οξυγονωμένο τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό συνέβαλε στον περιορισμό των μορφολογικών αλλοιώσεων του ιστού. Ωστόσο, αυτό το εύρημα χρήζει περαιτέρω μελέτης.

Ανοσοϊστοχημική μελέτη των τομών ιπποκάμπου

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η μεταβολή της ανοσοδραστικότητας του GABA σε *in vitro* τομές ιπποκάμπου, οι οποίες μονιμοποιήθηκαν με εμβύθιση αμέσως μετά τη λήψη τους και σε τομές, οι οποίες πριν μονιμοποιηθούν επώαστηκαν σε οξυγονωμένο τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Από τα αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι:

1. Σχεδόν σε όλες τις περιοχές των τομών που μονιμοποιήθηκαν αμέσως μετά τη λήψη τους («Ομάδα 0») ανιχνεύεται ανοσοδραστικότητα στο GABA τόσο στην κοιλιακή όσο και στη ραχιαία μοίρα του ιπποκάμπου.
2. Η ένταση ανοσοφθορισμού στο GABA είναι σημαντικά ελαττωμένη στις τομές που επώαστηκαν για μια ώρα στο οξυγονωμένο τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό («Ομάδα 1») πριν μονιμοποιηθούν.
3. Η ελάττωση της ανοσοδραστικότητας στο GABA παρατηρείται σε όλες τις περιοχές του ιπποκάμπου και αφορά τόσο στην κοιλιακή όσο και στη ραχιαία μοίρα του ιπποκάμπου.

Από τη βιβλιογραφία προκύπτει ότι κατά την οξεία φάση της ισχαιμίας συσσωρεύεται στον εξωκυττάριο χώρο ο διεγερτικός νευροδιαβιβαστής γλουταμικό (Lee et al., 2000). Κατά την ισχαιμία, εκτός από το γλουταμικό, απελευθερώνεται και ο ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής, GABA ο οποίος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο

στην επιβίωση του ιστού. Κατά την ισχαιμία αυξάνουν τα επίπεδα του GABA συνολικά σε όλον τον εγκέφαλο τόσο ενδοκυττάρια όσο και εξωκυττάρια (Torp et al., 1993). Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την προετοιμασία των τομών περιλάμβανε το *post-mortem* διάστημα κατά το οποίο ο ιστός δεν οξυγονώνεται, δεν αιματώνεται και κινδυνεύει από βαριές αυτολυτικές βλάβες λόγω της ισχαιμίας. Συνεπώς, σύμφωνα με τα παραπάνω, η ανίχνευση ανοσοδραστικότητας στο GABA που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη, ήταν αναμενόμενη. Πράγματι, από την ανάλυση των εικόνων των τομών της «Ομάδας 0» επιβεβαιώθηκε η ανοσοδραστικότητα στο GABA. Επιπλέον, βρέθηκε ότι η ανοσοδραστικότητα στο GABA παρατηρείται εξίσου στην κοιλιακή και στη ραχιαία μοίρα του ιπποκάμπου. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η παρατεταμένη ισχαιμία μπορεί να βλάψει ακόμη και το GABAεργικό σύστημα του ιστού με αποτέλεσμα την απώλεια του προστατευτικού στην ισχαιμία μηχανισμού (Yasumoto et al., 1988). Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι η παρατεταμένη έκθεση των υποδοχέων στο GABA έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της ευαισθησίας τους στο εξωκυττάριο σηματοδοτικό μόριο και την μη προγραμματισμένη ενδοκυττάρωση τους (Alicke B and Schwartz, 1995; Benke et al., 2012). Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε καθολική ελάττωση του ανοσοφθορισμού σε όλες τις περιοχές του ιπποκάμπου. Θα μπορούσε κανείς να ισχυριστεί ότι η απώλεια της ανοσοδραστικότητας στο GABA μετά από μια ώρα είναι αποτέλεσμα μη αναστρέψιμης ισχαιμίας του ιστού. Ωστόσο, από την ιστολογική εξέταση των τομών της «Ομάδας 1» διαπιστώθηκε ότι δεν υπήρχαν σημαντικές αυτολυτικές βλάβες μετά από μια ώρα επώασης του ιστού. Η απώλεια του ανοσοφθορισμού θα μπορούσε να οφείλεται στο γεγονός ότι μετά από μια ώρα ο επίτοπος δεν είναι πλέον αναγνωρίσιμος από το αντίσωμα. Πράγματι, στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η καταστροφή των πρωτεϊνών έχει ως αποτέλεσμα την επικάλυψη επιτόπων τους ή ακόμα και την μετα-μεταφραστική τροποποίησή τους με αποτέλεσμα να μην είναι πλέον αναγνωρίσιμες από τα αντισώματα (Shmidt-Kastner, 1991).

Συμπερασματικά, από την μελέτη προκύπτει ότι οι τομές ιπποκάμπου μονιμοποιημένες με εμβύθιση δεν παρουσιάζουν σημαντικές μορφολογικές αλλοιώσεις. Ακόμη και όταν το *post-mortem* διάστημα είναι μιας ώρας (μέσα σε οξυγονωμένο TENY) μέχρι την έναρξη της μονιμοποίησης, ο ιστός διατηρεί καλή μορφολογία. Παρόλα αυτά από την ανοσοϊστοχημική μελέτη με anti-GABA προκύπτει μείωση της έντασης του φθορισμού στις εν λόγω τομές. Το φαινόμενο αυτό δεν μπορεί να αποδοθεί με ασφάλεια σε έναν παράγοντα, παρόλα αυτά υπάρχουν διάφορες πιθανές ερμηνείες από την διεθνή βιβλιογραφία. Η ανεύρεση του ακριβούς αιτίου βέβαια ξεφεύγει από τους σκοπούς της παρούσας μελέτης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Από τη βιβλιογραφία προκύπτει ότι η μελέτη της ανοσοδραστικότητας στο GABA στον ιππόκαμπο προϋποθέτει τη χρήση πειραματικών πρωτοκόλλων μονιμοποίησης του ιστού τα οποία περιλαμβάνουν τη μονιμοποίηση του εγκεφάλου μέσω της κυκλοφορίας. Καθώς ο στόχος είναι η ανάπτυξη ενός πειραματικού πρωτοκόλλου, το οποίο να επιτρέπει στην ίδια τομή ιπποκάμπου τη διενέργεια τόσο ανοσοϊστοχημικών, όσο και λειτουργικών-ηλεκτροφυσιολογικών μελετών, μελετήθηκε η ανοσοδραστικότητα στο GABA σε τομές ιπποκάμπου *in vitro*.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της μεταβολής της ανοσοδραστικότητας του GABA σε τομές της ραχιαίας και κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου αρουραίου που μονιμοποιήθηκαν με τη μέθοδο της εμβύθισης.

Για το λόγο αυτό παρασκευάστηκαν τομές (n=48) πάχους 500μm τόσο από τη ραχιαία, όσο και από την κοιλιακή μοίρα του ιπποκάμπου αρουραίων (n=4). Προέκυψαν δύο ομάδες τομών· η *πρώτη ομάδα* αποτελούνταν από τομές, οι οποίες μονιμοποιούνταν αμέσως μετά την λήψη τους, ενώ η *δεύτερη ομάδα* αποτελούνταν από τομές οι οποίες πριν μονιμοποιηθούν επωάζονταν για μία ώρα σε οξυγονωμένο τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό (TENY) στους 0-4°C. Οι τομές μονιμοποιήθηκαν με την τεχνική της εμβύθισης (4% PFA/0,1M PB στους 0-4°C) και στη συνέχεια χρώστηκαν με εοσίνη-αιματοξυλίνη για να μελετηθούν ιστολογικά. Ακολούθησε η μελέτη τους ως προς την ανοσοδραστικότητα στο GABA.

Από την ιστολογική μελέτη δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές όσον αφορά στο βαθμό αυτόλυσης του ιστού μεταξύ των τομών που μονιμοποιήθηκαν αμέσως και των τομών που επώαστηκαν στο TENY. Είναι αξιοσημείωτο ότι οι περιοχές CA1 των τομών που επώαστηκαν στο TENY είχαν σημαντικά λιγότερες αυτολυτικές βλάβες από αυτές των τομών που μονιμοποιήθηκαν αμέσως. Από την ανοσοϊστοχημική μελέτη των τομών προέκυψε ότι στις τομές της πρώτης ομάδας ανιχνεύεται ανοσοδραστικότητα στο GABA τόσο στην κοιλιακή όσο και στη ραχιαία μοίρα του ιπποκάμπου. Αντιθέτως, στις τομές της δεύτερης ομάδας η ένταση ανοσοφθορισμού στο GABA είναι σημαντικά ελαττωμένη.

Αν και το δείγμα ήταν περιορισμένο, από τα παραπάνω ευρήματα συμπεραίνεται ότι η τεχνική της μονιμοποίησης των τομών ιπποκάμπου με εμβύθιση δεν προκαλεί εκτεταμένες αυτολυτικές βλάβες στον ιστό. Επίσης, η επώαση των τομών στο οξυγονωμένο TENY πιθανώς να συμβάλλει στον περιορισμό των μορφολογικών αλλοιώσεων του ιστού. Τέλος, η καθολική ελάττωση της ανοσοδραστικότητας στο GABA στις τομές της δεύτερης ομάδας πιθανώς δεν αποδίδεται στην ισχαιμία του ιστού.

ABSTRACT

Since now it has been reported that perfusion fixation is the gold-standard method for the optimal study of GABA immunoreactivity in the hippocampal formation.

The aim of this thesis was to investigate the GABA-Li immunoreactivity by employing a preparation model used to study the synaptic transmission and plasticity of neurons. For this purpose we used an in vitro hippocampal slice preparation model.

Rat hippocampal (dorsal and ventral) brain slices 500 μ m in thickness were prepared. The brain slices (n=48) were divided into two experimental groups. Slices from the first group were immediately fixed by immersion fixation (4% PFA/0,1M PB at 0-4 $^{\circ}$ C) and slices from the second group were incubated for one hour in artificial cerebrospinal fluid (ACSF) bubbled with 95% O₂-5% CO₂ at 0-4 $^{\circ}$ C prior to fixation. Thin slices received an eosin and haematoxylin (E&H) stain and were assessed morphologically. Moreover, thin slices were assessed immunohistochemically.

The morphological assessment of E&H revealed that: slices from the second group were not severely damaged compared those from the first group and that the CA1 region of hippocampus was less damaged in the slices that were incubated in ACSF prior to fixation. GABA immunohistochemistry revealed lower GABA content in the incubated slices from the second group, while in the first group GABA immunoreactivity was well detectable.

Despite the limited number of slices, the above findings suggest that the in vitro slice preparation does not cause severe tissue injury and ACSF might contribute to neuron preservation. Finally, the reduction in GABA immunoreactivity might be due to other factors than to tissue injury.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Alakuijala A., Alakuijala J., Pasternack M. (2006) Evidence for a functional role of GABA_C receptors in the rat mature hippocampus. *Eur. J. Neurosci.*, 23:514–520
2. Alicke B., Schwartz-Bloom R.D. (1995) Rapid down-regulation of GABA_A receptors in the gerbil hippocampus following transient cerebral ischemia. *J Neurochem.*, 65 (6):2808-11
3. Amaral D.G., Witter M.P. (1989) The three dimensional organization of the hippocampus formation: A review of anatomical data. *Neuroscience*, 31: 571-591
4. Amin S.N., Younan S.M., Youssef M.F., Rashed L.A., Mohamady I. (2013) A histological and functional study on hippocampal formation of normal and diabetic rats. *F1000Research* 2:151
5. Barboriak D.P., Doraiswamy D. M., Krishnan K. R. R, Vidyarthi S., Sylvester J., Charles H.C. (2000) Hippocampal sulcal cavities on MRI: Relationship to age and apolipoprotein E genotype. *Neurology*, 54, (11): 2150-2153
6. Beach T. G., Tago H., Nagai T., Kimura H., McGeer P.L, McGeer E.G. (1987) Perfusion-fixation of the human brain for immunohistochemistry: comparison with immersion-fixation. *J Neurosci. Meth.* 19, 183-192.
7. Benke D., Zemoura K., Maier P.J (2012) Modulation of cell surface GABA(B) receptors by desensitization, trafficking and regulated degradation. *World J Biol Chem.*, 26, 3 (4):61-72
8. Bowery N.G., Hill D.R., Hudson A.L., Doble A., Middlemiss D.N., Shaw J., Turnbull M. (1980) (-)Baclofen decreases neurotransmitter release in the mammalian CNS by an action at a novel GABA receptor. *Nature*, 283 (5742):92-94
9. Bright R., Mochly-Rosen D. (2005) The Role of Protein Kinase C in Cerebral Ischemic and Reperfusion Injury, 36, 2781-2790
10. Buddle M., Eberhardt E., Ciminello L.H., Levin T., Wing R., DiPasquale K., Raley-Susman K.M. (2003) Microtubule-associated protein 2 (MAP2) associates with the NMDA receptor and is spatially redistributed within rat hippocampal neurons after oxygen-glucose deprivation. *Brain Res.* 978, 38-50
11. Cimarosti H., Kantamneni S., Henley J.M. (2009) Ischemia differentially regulates GABA_B receptor subunits in organotypic hippocampal slice culture. *Neuropharmacology*, 56 (8): 1088-1096
12. Deng W., James B., Gage A., Gage F. (2010) New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nature Reviews Neuroscience* 11, 339-350
13. Fiala J.C, Kirov S.A, Feinberg M.D, Petrak L.J, George P., Goddard A.C, Harris K.M. (2003) Timing of Neuronal and Glial Ultrastructure Disruption during Brain Slice Preparation and Recovery In Vitro. *J. Compar. Neurol.* 465:90–103
14. Freund T.F. and Buzaki G. (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6(4): 347-470
15. Gregory J.G., Daryl R.K., William S. (2012) Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents. *J. Vis. Exp.* 65, e3564
16. Green A.R., Hainsworth A.H., Jackson D.M. (2000) GABA potentiation: a logical pharmacological approach for the treatment of acute ischaemic stroke. *Neuropharmacology* 39, 1483-1493
17. Grivas H., Michaloudi C., Batzios C., et al. (2003) Vascular network of the rat hippocampus is not homogeneous along the septotemporal axis. *Brain Res.* 971, 2:245-249
18. Hilbig H., Bidmon HJ., Oppermann O.T., Remmerbach T. (2004) Influence of post-mortem delay and storage temperatures on the immunohistochemical detection on antigens in the CNS of mice. *Experimental and Toxicologic Pathology* 56, 159-171

- 19.Hortnagl H., Berge M. I.,Sperk G., Pifl C. (1991) Regional heterogeneity in the distribution of neurotransmitter markers in the rat hippocampus. *Neuroscience* 45(2): 261-271
- 20.Javois L.C. *Methods in Molecular Biology* (1999) Vol. 115: Immunocytochemical Methods and Protocols Edited by: L. C. Javois © Humana Press Inc.
- 21.Jinno S., Aika Y., Fukuda T., Kosaka T. (1998) Quantitative analysis of GABAergic neurons in the mouse hippocampus, with optical dissector using confocal laser scanning microscope. *Brain Res.* 814(1-2): 55-70.
- 22.Jinno S. (2009) Structural organization of long-range GABAergic projection system of the hippocampus. *Frontiers in Neuroanatomy* 3, 13
- 23.Johnston D., Amaral D. G. (1998) *The synaptic organization of the brain.* Oxford University press
- 24.Kandel E.R. Schwartz J.H., and Jessel T.M. (1999) *Νευροεπιστήμη και Συμπεριφορά. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης*, 687-688
- 25.Kirov S.A., Sorra K.E., Harris K.M. (1999) Slices have more synapses than perfusion-fixed hippocampus from both young and mature rats. *The Journal of neuroscience* 19 (8):2876-2886
- 26.Lee J.M., Grabb M., Zipfel G., Choi D. (2000) Brain tissue responses to ischemia. *The Journal of Clinical Investigation* 106, 6
- 27.Li H., Siegel R. E., Schwartz R.D. (1993) Rapid decline of GABA_A receptor subunit mRNA expression in hippocampus following transient cerebral ischemia in the gerbil. *Hippocampus* 3, 527-537
- 28.Llorente I.L., Perez-Rodriguez D., Martinez-Villayandre B., Dos-Anjos S., Darlison M.G., Poole A.V., Fernandez-Lopez A. (2013) GABA_A receptor chloride channels are involved in the neuroprotective role of GABA following oxygen and glucose deprivation in the rat cerebral cortex but not in the hippocampus. *Brain Research*, 1533,141-151
- 29.Losonczy A., Zhang L., Shigemoto R., Somogyi P., Nusser Z. (2002). Cell type dependence and variability in the short-term plasticity of EPSCs in identified mouse hippocampal interneurons. *J. Physiol.* 542, 193–210.
- 30.McIlwain H. (1961) *Techniques in tissue metabolism: 5. Chopping and slicing tissue samples.* *Biochem. J.* 78, 213-218
- 31.Nieuwenhuys R., Voogd J., Van Huijzen C. (1997) *Το κεντρικό νευρικό σύστημα του ανθρώπου. Σύνοψη και άτλαντας.* Εκδόσεις Κυριακίδη.
- 32.Owens D.F., Kriegstein A.R. (2002) Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Neuroscience*, 3,(9):715-727
- 33.Padgett C.L., Slesinger P.A. GABA_B Receptor Coupling to G-proteins and Ion Channels. (2010) *Advances in Pharmacology*, 58
- 34.Phillis J.W, Smith-Barbour M., Perkins L.M., O'Regan M.H. (1994) Characterization of glutamate, aspartate and GABA release from ischemic rat cerebral cortex. *Brain Res Bull.*, 34 (5): 457-466
- 35.Richerson G.B., Messer C. (1995) Effect of Composition of Experimental Solutions on Neuronal Survival during Rat Brain Slicing. *Experimental Neurology* 131, 133-143
- 36.Schwartz –Bloom R.D., Sah R. (2001) γ -Aminobutyric acid_A neurotransmission and cerebral ischemia. *Journal of Neurochemistry*, 77, 353-371
- 37.Sharfman H.E. (2007) *The dentate gyrus A comprehensive guide to structure, function and clinical implications.* Elsevier
- 38.Shepherd G. (1990) *Hippocampus*, Brown T., Zador A. In: *The Synaptic Organization of the Brain.* Ed: Oxford University Press, 346-388
- 39.Schmidt-Kastner R., Freund T.F.(1991) Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience*, 40, (3): 599-636
- 40.Start R.D., Layton C.M., Cross S.S., Smith J.H.F. (1992) Reassessment of the rate of fixative diffusion. *Jr Clin Pathol.* 45:1120-1121
- 41.Svoboda R.K., Adams E.C. Lupica R.C. (1999) Opioid receptor subtype expression defines morphologically distinct classes of hippocampal interneurons. *The Journal of Neuroscience.* 19, 1, 85-95

42. Swanson L.W. (1982) Normal hippocampal circuitry. *Neurosci. Res.* 20: 624-637
43. Torp R., Arvin B., Le Peillet E., Chapman A.G., Ottersen O.P., Meldrum B.S. (1993) Effect of ischemia and reperfusion on extra- and intracellular distribution of glutamate, glutamine, aspartate and GABA in the rat hippocampus, with a note on the effect of the sodium channel blocker BW1003C87. *Brain Res.* 96:365-376
44. Taubenfeld S.M., Stevens K.A., Pollonini G., Ruggiero J., Alberini C.M. (2002) Profound molecular changes following hippocampal slice preparation: loss of AMPA receptor subunits and uncoupled mRNA/protein expression. *J Neurochem* 81:1348–1360
45. Warburg, O., Posener, K., Negelein E. (1924) Ueber den Stoffwechsel der tumoren. *Biochem. Z.* 152, 319–344
46. Whittingham T.S., Lust W.D., Passonneau J.V. (1983) An in vitro model of ischemia: metabolic and electrical alterations in the hippocampal slice. *The Journal of Neuroscience* 4, (3): 793-802
47. Yamamoto C., McIlwain H. (1966) Electrical activities in thin sections from the mammalian brain maintained in chemically-defined media in vitro. *J Neurochem.* 13:1333–43
48. Yasumoto Y., Passonneau J.V., Feussner G., Lust W.D. (1988) Metabolic alterations in fiber layers of the CA1 region of the gerbil hippocampus following short-term ischemia: high -energy phosphates, glucose-related metabolites and amino acids. *Metab. Brain Dis.* 3, 133.-149
49. Yoneyama M., Kitayama T., Taniura H., Yoneda Y. (2003) Immersion Fixation With Carnoy Solution for Conventional Immunohistochemical Detection of Particular N-Methyl-D-Aspartate Receptor Subunits in Murine Hippocampus. *J Neurosci. Res.* 73:416–426