

INDICE	pg. i
CAPITOLO I	1
INTRODUZIONE	2
ASPETTI GENERALI E DEFINIZIONI	3
FASE ACUTA: CORE E PENOMBRA	4
Ischemia e depolarizzazioni ischemiche	
Ischemia e depolarizzazioni peri-infartuali	
FASE SUB-ACUTA	7
Formazione di radicali liberi	
Infiammazione ed espressione genica	
Il danno da ri-perfusione	
Edema Vasogenico	
Danno cellulare	
MODELLI SPERIMENTALI DI ISCHEMIA CEREBRALE	11
Ischemia cerebrale globale transitoria	
Ischemia cerebrale focale	
<i>Modello embolico</i>	
<i>Modelli di occlusione intraluminale</i>	
<i>Modelli di occlusione del microcircolo</i>	
<i>Modelli di occlusione con craniotomia</i>	
Modelli in vitro	
RILEVANZA DEI MODELLI ANIMALI NELLA PATOLOGIA UMANA	19
METODICHE DI ANALISI DEL DANNO ISCHEMICO	19
La risonanza magnetica durante le fasi iperacute dell'ischemia	
Tecniche istologiche	
OBIETTIVI DELLO STUDIO	23
MATERIALI E METODI	25
IL CERVELLO ISOLATO DI CAVIA	25
Vantaggi e svantaggi del preparato	
La preparazione del cervello isolato di cavia	
Il sistema di perfusione in vitro	
STRUTTURE ANALIZZATE	30
La corteccia piriforme	
Il tubercolo olfattorio	
PROTOCOLLI DI OCCLUSIONE	32
LE REGISTRAZIONI ELETTROFISIOLOGICHE	33
Risonanza magnetica del cervello isolato	
IMMUNOISTOCHEMICA E COLORAZIONI ISTOLOGICHE	35
Microtubule-associated protein - MAP-2	
Ematossilina-eosina e tionina	

ANALISI DELLE IMMAGINI ISTOLOGICHE	36
RISULTATI	38
VALUTAZIONE DEI PARAMETRI ELETTROFISIOLOGICI	38
Elettrofisiologia di un evento ischemico focale	
OSSERVAZIONI ANATOMICHE	43
Istologia	
Studio di risonanza magnetica (MR)	
DISCUSSIONE	49
CAPITOLO II	53
INTRODUZIONE	54
EPILESSIA	54
Classificazione	
Epilessia ed epilettogenesi	
Stroke ed Epilessia	
MODELLI DI EPILESSIA E CRISI EPILETTICA	58
Modelli ischemici di crisi epilettica ed epilessia	
OBIETTIVI E CARATTERE GENERALE DELLO STUDIO	67
MATERIALI E METODI	68
PROTOCOLLI DI ISCHEMIA	69
PROTOCOLLI DI STIMOLAZIONE	69
REGISTRAZIONI ELETTROFISIOLOGICHE	70
Analisi dati elettrofisiologici	
RISONANZA MAGNETICA	70
Analisi delle immagini di risonanza	
IMMUNOISTOCHEMICA E COLORAZIONI ISTOLOGICHE	72
Microtubule-associated protein - MAP-2	
Ematossilina-eosina	
RISULTATI	74
DEFINIZIONE ISTOLOGICA E ANATOMICA (MR) DELLE AREE ISCHEMICHE	74
CORRELATI ELETTROFISIOLOGICI DELL' AREA DI PENOMBRA	77
MODULAZIONE DELL'ECCITABILITA NEURONALE NELL' AREA DI PENOMBRA	78
DISCUSSIONE	81
ABBREVIAZIONI	84
BIBLIOGRAFIA	85

CAPITOLO I

CORRELATI STRUTTURALI E FUNZIONALI DELLE ALTERAZIONI VISIBILI ALLA RISONANZA MAGNETICA IN UN MODELLO *IN VITRO* DI ISCHEMIA FOCALE

Gian Luca Breschi, Laura Librizzi, Chiara Pastori, Ileana Zucca, Alfonso Mastropietro,
Alessandro Cattalini, e Marco de Curtis

Publicato in "*Neurobiology of Disease*". 2010, 39: 181-191

INTRODUZIONE

L'ischemia, o infarto cerebrale, viene definita dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) come sindrome clinica caratterizzata dall'improvviso sviluppo di sintomi e segni neurologici focali dovuti alla perdita di una o più funzioni cerebrali non attribuibile ad altra causa se non quella vascolare. Questa condizione patologica è classificata in due grandi gruppi: *stroke* ischemico e *stroke* emorragico. L'occlusione di un vaso cerebrale può essere dovuta a diverse possibili cause tromboemboliche o traumatiche. Nello *stroke* ischemico può essere dovuto alla formazione di un trombo vascolare (corpo sessile intravascolare) che può originare da uno stato di aterosclerosi delle arterie extra o intracraniche, da disordini pro trombotici, arteriti, dissezione della parete delle arterie cerebrali. Nell'infarto di tipo embolico, l'embolo può: i) distaccarsi da lesioni aterosclerotiche, ii) derivare da frammenti trombotici cardiaci durante eventi di fibrillazione atriale o infarto del miocardio, iii) essere formato da cellule neoplastiche presenti nel sistema circolatorio (per esempio dai mixomi), iv) essere formato da frammenti adiposi entrati nel flusso sanguigno a seguito di una frattura ossea oppure v) avere natura gassosa come nella sindrome da decompressione (Gorelick 1993; Moossy 1993).

Lo *stroke* emorragico può essere riconducibile a un'emorragia intraparenchimale o subaracnoidea. Il meccanismo più comune è dato dalla malattia dei piccoli vasi, che porta a sviluppo di piccoli aneurismi lipoidali con conseguente rottura (Auer & Sutherland, 2005). Circa i due terzi dei pazienti con emorragia cerebrale primaria hanno una condizione d'ipertensione preesistente o di nuova diagnosi; la rimanente quota potrebbe mostrare, attraverso indagini più dettagliate, la presenza di malformazioni vascolari intracraniche (angiomi cavernosi, malformazioni arterovenose), angiopatia amiloide cerebrale oppure infarti in cui si è poi verificato sanguinamento. L'emorragia subaracnoidea viene classificata come un tipo di *stroke*, ed è responsabile di circa il 5% di essi (van Gijn & Rinkel, 2001).

L'ischemia cerebrale può anche verificarsi in seguito ad eventi traumatici, compressione da parte di masse neoplastiche o emorragie intracraniche e vasospasmo, che compromettono la struttura e la funzionalità del sistema vascolare, oppure in conseguenza d'ipotensione cardiaca, arresto o diminuzione della gittata cardiaca successiva a una forte diminuzione del volume sanguigno o durante shock setticemico.

I fenomeni di anossia/ipossia cerebrale di origine non strettamente ischemica sono generalmente dovuti alla compromissione del sistema respiratorio a seguito di sindromi da affogamento, altitudine, etc. Queste condizioni non provocano danni di entità comparabile a quelli conseguenti all'ischemia embolica o emorragica, ma se si accompagnano a una situazione d'ipoperfusione, e danno luogo a una condizione d'ipossiemia/ipoperfusione, si ha un peggioramento della morbilità soprattutto delle zone circostanti alla regione ischemizzata.

La diversità nelle cause che portano a una riduzione della perfusione di specifiche aree cerebrali, comporta la necessità di poterle distinguere velocemente. La diagnosi in tal senso è stata rivoluzionata dall'avvento di tecniche di *imaging*: la tomografia computerizzata (TC) prima e poi la Risonanza Magnetica (RM).

Quest'ultima si è dimostrata utile nell'evidenziare le prime fasi del processo patofisiologico provocato dall'ischemia stessa. Rimangono però ancora molti quesiti riguardo al significato funzionale e strutturale degli indizi osservabili alla risonanza magnetica e soprattutto grazie ad alcune sue applicazioni di cui parlerò nel corso dell'introduzione.

ASPETTI GENERALI E DEFINIZIONI

L'ischemia cerebrale definisce una condizione nella quale si ha un flusso sanguigno insufficiente a mantenere le normali funzioni cellulari del parenchima cerebrale. I neuroni sono le cellule con la più alta richiesta d'ossigeno dell'organismo, e sono pertanto i primi a soffrire, seguiti dagli oligodendrociti, dagli astrociti e dalle cellule dell'endotelio vascolare, in caso di riduzione di flusso ematico.

Nei modelli animali è definita come zona ischemica, o *core* ischemico, quel territorio che subisce una drastica riduzione di flusso sanguigno cerebrale (*cerebral blood flow*; CBF). Questa a sua volta è inclusa in una zona perifocale, detta penombra ischemica, caratterizzata da una ridotta perfusione, garantita da vasi anastomotici collaterali (Astrup et al., 1981).

In modelli sperimentali d'ischemia focale sono stati stabiliti (e poi verificati anche sull'uomo) quei valori di flusso sanguigno che caratterizzano il diverso grado e il tipo di compromissione nelle due diverse aree ischemiche di *core* e penombra (Symon et al., 1977). Procedendo dalla periferia al *core* ischemico, o procedendo dalle fasi iniziali dell'evento ischemico al suo avanzare, il parametro più sensibile di sofferenza neuronale è la sintesi proteica, la quale è ridotta del 50% a valori di CBF pari a $0,55 \text{ mLg}^{-1}\text{min}^{-1}$, ed è abolita al di sotto di $0,35 \text{ mLg}^{-1}\text{min}^{-1}$. Il consumo di glucosio mostra dapprima un aumento, intorno ad un flusso pari a $0,35 \text{ mLg}^{-1}\text{min}^{-1}$, per poi precipitare quando viene superato un valore pari a $0,25 \text{ mLg}^{-1}\text{min}^{-1}$. Questo intervallo corrisponde all'inizio dell'acidificazione intracellulare, dovuta inizialmente a un aumento della glicolisi anaerobica e poi all'accumulo di lattato, che riduce ulteriormente il valore di pH extracellulare.

Alla compromissione metabolica segue un declino della concentrazione di ATP, che comporta la perdita dell'omeostasi ionica cellulare e quindi la perdita dei gradienti ionici responsabili del mantenimento del potenziale di membrana fisiologico. A valori di perfusione al di sotto di $0,15 \text{ mLg}^{-1}\text{min}^{-1}$ le cellule cerebrali (neuroni e glia) sono quindi depolarizzate, condizione che determina la condizione chiamata Depolarizzazione Anossica o Ischemica (Heiss 1992; Hossmann 1994).

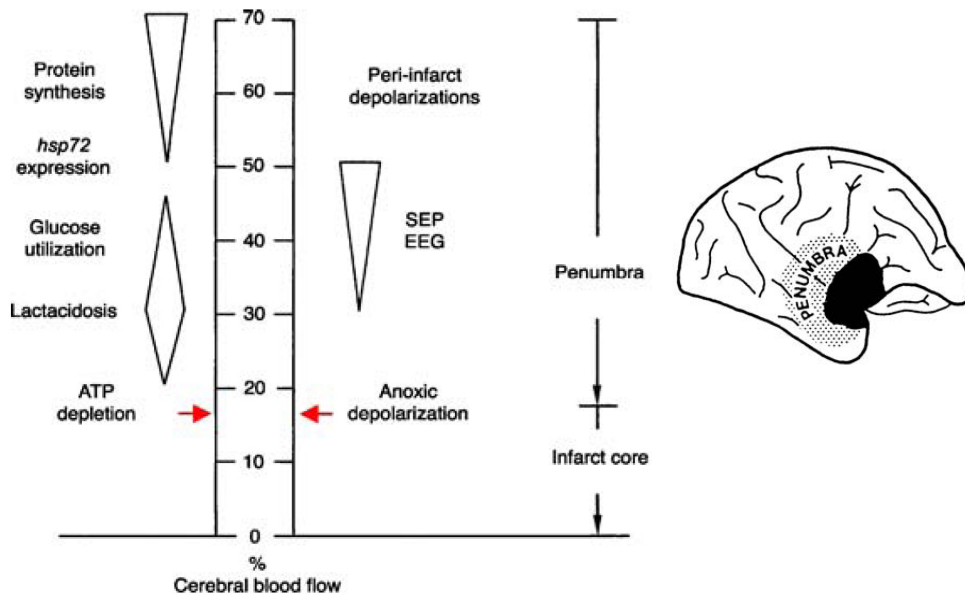


Figura 1. Discriminazione tra l'area di "core" da quella di penombra in funzione del grado di perfusione (Cerebral Blood Flow). Per ogni intervallo di CBF sono indicati gli effetti sulla fisiologia cellulare (adattato da Hossmann 2006).

Questi, sono i principali effetti che provoca l'occlusione, dai quali si scatena poi una sequenza di eventi patofisiologici, non più determinata dal solo valore locale del CBF. Per comprendere la patofisiologia dell'ischemia cerebrale è quindi necessario, non solo distinguere tra aree di *core* e penombra, peraltro dinamicamente variabili e tempo dipendenti, ma anche riconoscere quale sia la dinamica temporale dei processi che determinano l'evoluzione del danno ischemico nelle ore e nei giorni successivi all'occlusione.

FASE ACUTA: CORE E PENOMBRA

Ischemia e depolarizzazioni ischemiche

Nel *core*, la perdita del potenziale di membrana dovuto alla riduzione del metabolismo energetico, si osserva a pochi minuti dall'occlusione. La depolarizzazione di neuroni e glia provoca un aumento della permeabilità al potassio (K) e quindi promuove un suo progressivo accumulo nell'ambiente extracellulare fino a valori di potassio extracellulare ($[K^+]_o \geq 50\text{mM}$) (Menna et al., 2000; Katsura et al., 1994). Questo comporta l'attivazione di canali del Ca^{2+} voltaggio dipendenti

somatodendritici e presinaptici presenti nelle cellule vicine, che attivano a loro volta il rilascio di aminoacidi eccitatori quali il glutammato. Allo stesso tempo, i sistemi di *reuptake* dei medesimi neurotrasmettitori, ATP-dipendenti, divengono inattivi e il glutammato si accumula nello spazio extracellulare. L'attivazione dei recettori NMDA e metabotropici del glutammato contribuiscono all'entrata ulteriore in cellula di Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_o \leq 0,1\text{mM}$; (Nicholson 1984; Park et al., 1989), mentre canali per ioni monovalenti quali AMPA o i canali della corrente di Na persistente ($\text{Na}_v\alpha 1.1$) favoriscono l'accumulo di Na^+ e Cl^- in cellula (Hille 1992; French et al., 1990; Somjen & Muller 2000). L'aumentata osmolarità del citoplasma, provoca l'edema citotossico (Hansen, 1985).

La glicolisi anaerobica, attivata dalle condizioni anossiche, è esacerbata dall'aumentata richiesta di ATP da parte dei trasportatori attivi primari Na^+/K^+ ATPasi, Ca^{2+} ATPasi, e si ha quindi un aumento della produzione di CO_2 e metaboliti acidi, soprattutto lattato (Scheller et al., 1992; Cruz, 1999; Kraig et al., 1983; Tombaugh, 1994). Questo comporta una riduzione del pH extracellulare, che segue perciò un andamento bifasico: dapprima aumenta lentamente per poi accelerare all'instaurarsi della completa depolarizzazione cellulare. In realtà, la caduta di potenziale extracellulare coincide con una repentina basificazione, la cui origine è ancora dibattuta. Per esempio si sa che in tessuti sani un aumento dell'attività sinaptica è accompagnata da una lieve alcalinizzazione mediata da un'attivazione dei canale-recettore GABA_A permeabili al (HCO_3^-) e dall'ingresso di protoni H^+ attraverso un controtrasportatore calcio dipendente ($\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$; Kaila, 1994; Smith & Chesler 1999). Il correlato elettrofisiologico delle depolarizzazioni anossiche o depolarizzazioni ischemiche (*Ischemic Depolarizations*, ID) è rappresentato durante le registrazioni in DC (*Direct Current*), da profonde cadute di potenziale, anche di 30 mV, alle quale generalmente segue un'onda positiva più lunga ma di minor ampiezza (Leao 1951, 1986 e 1944). Il *DC-shift* è generalmente preceduto da un'attività veloce, detta prodromica, dovuta all'attivazione sincrona di popolazioni neuronali (Herrerias et al., 1994).

Infine, la durata di questi eventi è determinata dalla durata dell'occlusione, e se il ripristino della perfusione avviene entro 1 h o 3 h dall'occlusione, si osserva un lento recupero del potenziale verso i valori iniziali.

Ischemia e depolarizzazioni peri-infartuali

La penombra viene definita come quella regione che soffre a causa dell'ischemia, ma dove il metabolismo energetico rimane preservato. Dato che non è mai stata fatta un'analisi puntuale dello stato metabolico delle zone di penombra, si è soliti usare una definizione più generale che considera la penombra come quella porzione di tessuto il cui danno ischemico è potenzialmente o parzialmente reversibile (Hossmann, 1994; Ginsberg, 2003). Nella penombra il flusso ematico scende a livelli compresi tra i 23 e 15 $\text{mLmin}^{-1}\text{g}^{-1}$, intervallo nel quale scompare l'attività neuronale

spontanea ed evocata. Studi sperimentali, hanno dimostrato che durante il periodo di occlusione in quest'area di ridotta perfusione si hanno fenomeni di depolarizzazione (*Peri-Infarct Depolarizations*, PID) simili nella forma a quelle che si registrano nella zona focale, ma reversibili, di durata minore e ripetibili (Nallet et al., 1999; Dijkhuizen et al., 1999). Queste caratteristiche fanno supporre che questi fenomeni siano analoghi alle *Spreading Depressions* (SD), descritte da Leao (1944) come risposta stereotipata del cervello a una serie di stimoli nocivi. Queste SD, in condizioni normossiche sono caratterizzate da onde elettrochimiche di depolarizzazione della membrana neuronale che propagano attraverso il tessuto nervoso alla velocità di 2–5 mm/min, durano 1–5 min, e correlano con la cessazione dell'attività spontanea neuronale. Queste SD sono registrate a livello extracellulare come ampi potenziali lenti di 10-20 mV. Gli eventi molecolari, le correnti ioniche, la redistribuzione degli ioni a cavallo della membrana che accompagnano sia le SD che le PID sono simili a quelle descritte nel paragrafo precedente. (Somjen, 2001). Secondo vari autori l'aumento di $[K^+]_o$ che si verifica nella zona di *core* ischemico diffonde nella penombra modulando le PID (Gorji et al., 2001). Le SD si possono distinguere dalle PID in funzione dell'aumento del $[K^+]_o$: nelle prime questo segue un andamento monotonicamente nelle seconde è bifasico come accade nel *core* ischemico (Hansen, 1985; Nedergaard & Hansen 1993).

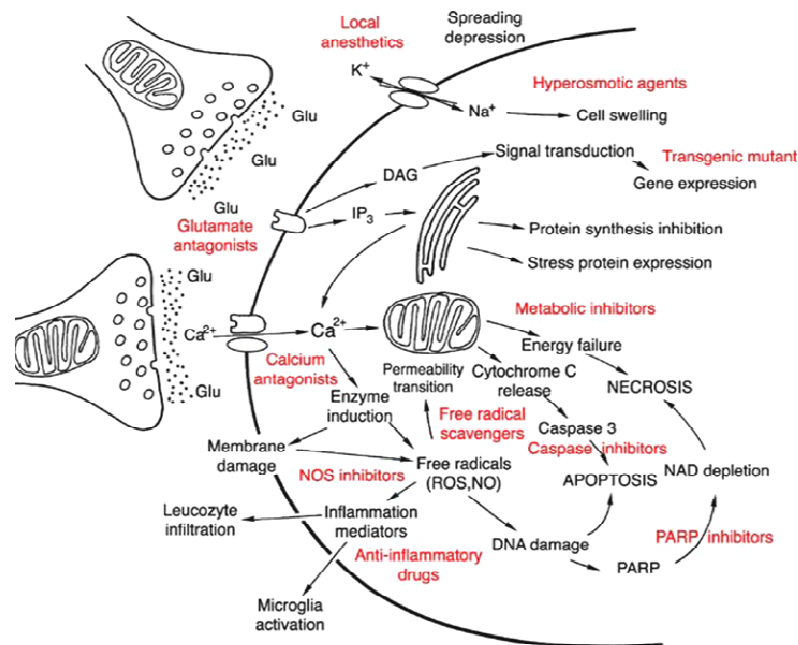


Figura 2. Rappresentazione schematica dei meccanismi molecolari implicati nella morte cellulare a seguito di un evento ischemico. In rosso sono segnati i possibili inibitori di tale processo, e il loro livello d'azione (adattato Hossmann 2006)

Inoltre, gli antagonisti dei recettori NMDA (come l'MK801) sono più efficaci nel bloccare le SD che non sulle PID (Aitken et al., 1988; Lauritzen & Hansen, 1992) e allo stesso modo si comportano l'eptanolo e l'ottanolo, bloccanti per le *gap junctions* presenti a livello degli astrociti e probabilmente dei neuroni. L'aspetto più rilevante dal punto di vista patofisiologico è che queste veloci depolarizzazioni impongono alla cellula un notevole stress metabolico. In condizioni normossiche, le variazioni di Ca^{2+} , di pH che si verificano durante una SD, vengono presto normalizzate, mentre nella penombra ischemica si crea una discrepanza tra la richiesta di substrati energetici e la reale offerta, ragion per cui molti studi hanno evidenziato la correlazione tra numero di PID e aumento del danno cellulare, avvallando l'ipotesi che queste depolarizzazioni siano un meccanismo con cui il tessuto cerebrale della penombra ischemica progressivamente divenga parte del *core* ischemico(Iijima et al., 1992; Mies et al., 1993; Nedergaard, 1996).

FASE SUB-ACUTA

Formazione di radicali liberi

Durante l'ischemia cerebrale si formano radicali liberi che possono avere un ruolo negativo nell'evoluzione del danno ischemico. L'aumento di radicali liberi può derivare da varie fonti: da processi enzimatici Ca^{2+} mediati quali la conversione dell'acido arachidonico in prostanoide a opera della ciclossigenasi, dall'attivazione della fosfolipasi A_2 . Queste specie chimiche reagiscono con numerose macromolecole come le proteine, i fosfolipidi e il DNA, e promuovono quindi la formazione di pori nella membrana cellulare e in quella interna dei mitocondri, i quali rilasciano a loro volta l'anione superossido (O_2^-) e il citocromo C implicato nella regolazione della morte cellulare per apoptosi. Mediano inoltre la risposta infiammatoria (Dirnagl et al., 1999; Mergenthaler et al., 2004).

Infiammazione ed espressione genica

L'aumento intracellulare del Ca^{2+} , attraverso l'attivazione di secondi messaggeri, l'ipossia stessa e la produzione di radicali liberi regolano l'espressione di un certo numero di geni pro-infiammatori come il fattore nucleare NF- κ B, il fattore inducibile in ipossia (HIF-1) (O'Neill & Kaltschmidt 1997; Ruscher et al., 1998; Iadecola et al., 1999).

Si ha quindi la produzione da parte delle cellule sofferenti di mediatori dell'infiammazione come il fattore necrotico tumorale alfa (TNF- α) e l'interleukina 1β (Rothwell & Hopkins, 1995). Nelle fasi successive le cellule endoteliali esprimono sulla membrana molecole d'adesione quali: la molecola

d'adesione intercellulare 1 (ICAM-1), le P-selectine e le E-selectine (Lindsberg et al., 1996; Zhang et al., 1995; Lindsberg et al., 1996). Queste interagiscono con i recettori complementari esposti sul plasmalemma dei neutrofili. Questi aderiscono, quindi, all'endotelio, lo attraversano (diapedesi) ed entrano nel parenchima cerebrale; al loro seguito i macrofagi e i monociti. Nell'arco di cinque, sei giorni appaiono numerose cellule infiammatorie di origine ematica nel neuropilo cerebrale (Iadecola, 1997).

Anche le cellule immunocompetenti residenti nel sistema nervoso divengono parte attiva dopo quattro o sei ore dall'evento ischemico. Gli astrociti divengono ipertrofici, mentre la microglia assume l'aspetto ameboide tipica della microglia attivata (Giulian 1997). A distanza di ventiquattro ore dall'occlusione, la reazione infiammatoria è ben sviluppata, specialmente nella zona di penombra ischemica.

L'infiammazione può contribuire al danno ischemico, anche dopo ore dall'evento e durante la riperfusione. Questo può accadere attraverso vari meccanismi: l'adesione dei neutrofili alle pareti vascolari determina un fenomeno noto con il termine di *no-reflow*, ovvero si ha una riperfusione ridotta dovuta all'ostruzione che queste cellule provocano (del Zoppo et al., 1991); ii) le cellule infiammatorie attivate e i neuroni danneggiati producono una serie di mediatori tossici come: radicali liberi, prostanoidei e quantità elevate di NO Forster (Forster et al., 1999; Nogawa et al., 1997).

Il danno da riperfusione

La riperfusione ha nell'ischemia un ruolo paradossale, poiché se avviene in tempi vicini all'occlusione, per un verso riduce l'estensione della penombra, apportando ossigeno e nutrienti, dall'altro può aggravare il danno nel *core* ischemico (Schaller & Graf 2004). I meccanismi che sottintendono questo fenomeno sono molteplici: l'azione di radicali liberi (Traystman et al., 1991), meccanismi infiammatori (Okada et al., 1994), aumento della sintesi di prostaglandine e del rilascio di aminoacidi eccitatori (Okada et al., 1994), danni di barriera (Albayrak et al., 1997).

Edema Vasogenico

Un altro forte modulatore del danno ischemico è l'edema cerebrale. Nelle prime fasi dell'ischemia è di origine cellulare per le ragioni descritte in precedenza, dopo quattro - sei ore la barriera diventa permeabile a soluti e proteine seriche, con il conseguente afflusso d'acqua. Dal punto di vista clinico questa è una delle conseguenze più deleterie (Hossmann, 2006).

L'apertura della barriera sembra essere dovuta alla trascrizione di enzimi proteolitici, metalloproteinasi (MMP-9), le quali distruggono la lamina basale (Rosenberg et al., 1996;

Romanic et al., 1998) , all'aggressione di radicali liberi e alla diapedesi dei neutrofili (Durukan, 2007).

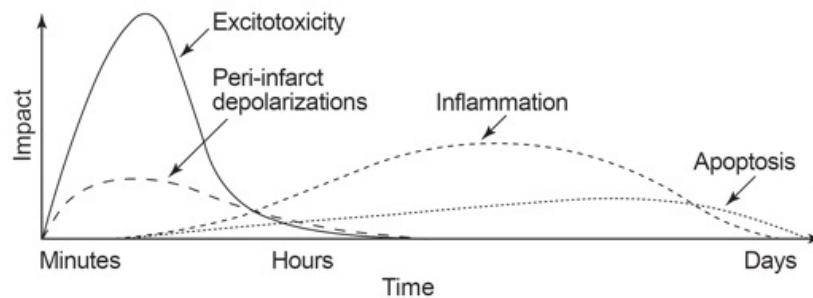


Figura 3. Cascata del danno ischemico. Sulle ascisse viene visualizzata l'evoluzione nel tempo del fenomeno ischemico. Sulle ordinate il grado d'impatto di ciascun evento sul danno ischemico (modificato da Iadecola C. et al., 1999)

Danno cellulare

Nei primi minuti dall'ischemia, i responsabili del danno biochimico e funzionale della cellula sono la perdita dell'omeostasi ionica e idrica, il danno istologico si manifesta a distanza di tempo, che dipende sia dalla durata dell'occlusione che dalla sua intensità, intesa come grado di perfusione residua attraverso rami collaterali al vaso occluso.

Dopo quattro, sei ore (fase sub-acuta) dall'inizio dell'ischemia la zona focale invade la zona di penombra fino a ricoprirne l'intera estensione. Questo avviene sempre a causa di meccanismi patologici iniziati nel *core* ischemico, quali fenomeni di eccitotossicità, PID, acidificazione intracellulare, meccanismi calcio-mediati, produzione di radicali liberi e di quantità tossiche di NO. Infine subentra una fase del danno tardiva che può durare anche più ore o giorni, mediata da meccanismi infiammatori, edema vasogenico e morte programmata delle cellule (Hossmann 2006).

Questi elementi, sommariamente descritti anche nei paragrafi precedenti, possono essere considerati attivatori e propagatori della morte cellulare per ischemia la quale può avvenire per apoptosi o per necrosi (Lipton 1999).

Dal punto di vista istologico, le cellule nelle ultime fasi della necrosi possono presentare varie modifiche strutturali. Una membrana irregolare ma intatta, un citoplasma rigonfio e privo di citoscheletro, vari mitocondri voluminosi e privi di creste interne, la mancanza dell'apparato di golgi e del reticolo endoplasmatico, e un nucleo che presenta segni di cromatolisi (Kalimo et al., 1982; Kalimo et al., 1977). In una fase successiva il citoplasma e il nucleo appaiono più scuri e raggrinziti mentre il nucleolo assume un aspetto a nido d'ape (Brown & Brierley 1972; Brown,

1977; Inamura et al., 1987). Il plasmalemma e la membrana nucleare assumono una forma triangolare, e nel citoplasma sono presenti numerosi vacuoli e ribosomi (Martin et al., 1998). Queste cellule viste al microscopio ottico sono intensamente acidofile (eosinofile), o argirofile a seconda (Crain et al., 1988; Heimer & Peters 1968).

Un terzo paradigma è rappresentato da cellule che mostrano una membrana plasmatica danneggiata, un citoplasma lievemente rappreso, ricco di piccole vescicole e corpi densi, la cromatina del nucleo addensato (Brown, 1977; Garcia et al., 1993). Al microscopio appaiono leggermente eosinofile, pallide tanto da essere chiamate “*ghost cells*”. I cambiamenti che presentano fanno ritenere che questo sia l'ultimo stadio della necrosi prima della completa perdita d'integrità cellulare, a cui segue l'attivazione della risposta infiammatoria (Love, 2003).

Le cellule apoptotiche, presentano modificazioni a livello strutturale quali: un citoplasma rappreso, cromatina addensata in forme regolari, una membrana dapprima convoluta e poi frammentata in piccoli corpi (corpi apoptotici) contenenti organelli intatti. Al termine del processo questi vengono fagocitati velocemente senza innescare alcuna risposta infiammatoria (Love, 2003; Mergenthaler et al., 2004).

Va inoltre sottolineato che l'apoptosi è un processo fisiologico regolatorio, nelle fasi di sviluppo, ma è patologico in seguito ad un insulto ischemico. Viene mediato dall'attivazione di caspasi (caspasi 3 e 9) e molecole proapoptogene quali il citocromo c, richiede energia per la trascrizione genica (geni appartenenti alla famiglia bcl: -2, -xL, -xs e p53), ragion per cui è un processo che verosimilmente si attua nelle aree di penombra, e può intensificarsi durante la riperfusione (Barber et al., 2003).

In realtà queste due situazioni rappresentano gli estremi di un processo biochimico comune. Di fatto, nonostante si consideri la necrosi come risultato di un danno cellulare severo o di un forte cambiamento dell'ambiente extracellulare, nel medesimo tessuto si possono osservare cellule che manifestano modificazioni strutturali tipiche dell'apoptosi (Charriaut-Marlangue & Ben-Ari, 1995). Quale percorso intraprenda una cellula può dipendere da fattori intrinseci quali il tipo di cellula o il suo stadio cellulare (Yue et al., 1997), come da fattori estrinseci, quali la natura e la severità dell'insulto (Bonfoco et al., 1995; Li et al., 1998). A complicare ulteriormente la possibilità di distinguere tra apoptosi e necrosi, concorre il fatto che entrambe, nell'ischemia, sono caratterizzate da fenomeni di eccitossicità e quindi aumento di Ca^{2+} , mediatore di pathways biochimici che possono portare ad una come all'altra (Choi, 1988; Samdani et al., 1997).

In conclusione, a prescindere dal tipo di percorso, ciò che caratterizza la morte cellulare nell'ischemia è anche l'intervallo di tempo che intercorre tra l'insulto e il manifestarsi dei danni strutturali. Questo ritardo può variare enormemente, dipendendo dalla natura dell'insulto e dalla regione coinvolta. A volte può essere di alcuni giorni (Du et al., 1996; Kirino et al., 1984), altre di poche ore o meno (McGee et al., 1970). E' ormai chiaro che, a parità di fattori, tanto maggiore è la deprivazione di energia, tanto minore è il tempo necessario alla maturazione del danno (Kirino & Sano 1984).

La durata di quest'intervallo dimostra come brevi compromissioni metaboliche possano dare inizio a durevoli modificazioni che si concludono con la morte cellulare dopo giorni o settimane. Si possono definire quindi letali, quegli insulti ischemici che spostano la cellula dal suo stato di equilibrio dinamico a tal punto da non poter essere recuperate dai normali meccanismi omeostatici. Sono sub-letali, invece, quelli che provocano un danno iniziale, velocemente ripristinato dalla cellula stessa.

Infine, l'estensione e la sede e il momento in cui il danno cellulare ischemico compare dipendono da ulteriori fattori quali le modalità di induzione dell'ischemia (globale, focale permanente o transiente), e la specie animale.

MODELLI SPERIMENTALI DI ISCHEMIA CEREBRALE

Come anticipato, l'ischemia cerebrale può essere causata da diversi fattori eziologici ed è caratterizzata da un processo patofisiologico assai variabile nelle sue manifestazioni, nelle cause e nei siti anatomici in cui avviene (Ginsberg & Busto, 1989). E' quindi difficile ottenere un modello animale capace di mimare quest'enorme variabilità d'eventi (Durukan, 2007). Sono quindi stati sviluppati diversi modelli sperimentali nel tentativo di studiare le varie cause e i meccanismi specifici di una condizione clinica che comporta una diminuzione parziale o completa, temporanea o permanente, del flusso sanguigno in un distretto cerebrale specifico piuttosto che nell'intero encefalo.

L'obiettivo di un modello sperimentale, nello studio di questa patologia, è indurre delle lesioni omogenee e riproducibili, tali da ridurre la variabilità e aumentare la riproducibilità dei fenomeni osservati e dei meccanismi sottostanti che vengono analizzati (de Lecinana et al., 2001). Questo comporta una conoscenza approfondita sia della fisiologia e dell'anatomia del sistema preso come modello e delle condizioni sperimentali, così da poter meglio rappresentare la condizione nell'uomo e favorire la traslazione in clinica delle osservazioni sperimentali.

Per tanto nella scelta del modello vanno considerate la possibilità di ripercuotere il tessuto ischemizzato, e la capacità di aumentare o ridurre i tempi di occlusione e quindi valutarne gli effetti. Per ottenere un modello riproducibile e rappresentativo della condizione clinica è inoltre molto importante i) monitorare e mantenere nella norma le variabili fisiologiche (temperatura, pressione, glicemia, ossigenazione); ii) monitorare la velocità con cui i campioni di tessuto sono mantenuti e preparati per le analisi istologiche, biochimiche e molecolari; iii) valutare quanto un modello si avvicini alla realtà patofisiologica osservabile nell'ischemia cerebrale dell'uomo (Li et al., 2001).

Va poi ricordato che il fine ultimo della ricerca sull'infarto cerebrale è lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche, che vanno pianificate e calibrate in relazione al modello di ischemia

adottato. Negli ultimi anni sono prevalsi due approcci d'intervento terapeutico con diversi risultati sul piano dell'efficacia clinica. Uno di tipo neuroprotettivo, rivolto a preservare la regione di penombra bloccando differenti meccanismi coinvolti nella cascata biochimica successiva all'evento ischemico mediante, per esempio, l'uso di antagonisti dei recettori NMDA, antagonisti del calcio, *free-radical scavengers*, simvastatina, ipotermia, etc. L'altra strategia è tesa a riaprire il vaso occluso attraverso l'uso di farmaci trombolitici o mezzi meccanici all'interno di una finestra temporale ben definita attraverso sistemi di *imaging*. Il primo approccio ha mostrato benefici clinici solo nei modelli animali, e si è dimostrato fallimentare nell'applicabilità all'ischemia dell'uomo. Il secondo approccio è stato utilizzato con successo in diversi *trials* clinici (Durukan & Tatlisumak 2007; Gotti, 1990; Backhauss, 1992). Storicamente i primi studi sono stati svolti su animali di grossa taglia come cani e gatti o su primati non umani. Questi ultimi hanno diverse caratteristiche che li rendono più vicini all'uomo in termini comportamentali e di integrazione delle funzioni sensorimotorie, in quanto hanno un cervello girencefalico simile a quello umano. Ma motivazioni di tipo etico, ecologico ed economico ne hanno notevolmente ridotto l'uso di questa specie animale.

L'utilizzo di animali più piccoli, quali ratti e topi, è stato preferito per molte ragioni: un buon grado di somiglianza nella fisiologia e nell'anatomia cerebrovascolare con l'uomo (Macrae, 1992), soprattutto se raffrontati con altre specie quali il gerbillo, il cane ed il gatto. Queste specie non mostrano una grande variabilità negli effetti a parità di tipo di occlusione, mostrano una certa omogeneità genetica all'interno di un *pedegree* e per converso le crescenti potenzialità derivate dall'ingegneria genetica permettono modificazioni *ad hoc* per lo studio dei meccanismi patologici (Fujimura et al., 1999). La piccola taglia permette di monitorare facilmente vari parametri fisiologici (Takizawa et al., 1991) così come la dimensione del cervello rende più veloci le operazioni di estrazione, fissaggio e taglio per studi anatomici e fisiologici. Infine gli animali di taglia inferiore hanno minori costi di allevamento.

Ischemia cerebrale globale transitoria

I modelli d'ischemia globale mimano l'ischemia globale che si manifesta a seguito di un arresto cardiaco, che rappresenta la forma più grave di ischemia. Differiscono dagli altri modelli sperimentali di stroke per almeno tre motivi: i) l'interruzione del flusso sanguigno è completo, ii) la riperfusione dopo l'infarto, soprattutto nelle prime fasi di rianimazione, avviene ad una pressione sanguigna ridotta, e iii) la composizione del sangue è decisamente alterata a causa delle profonde modificazioni sistemiche a seguito dell'arresto; iv) il valore del flusso ematico a cui compaiono cellule necrotiche è più alto rispetto agli altri modelli di occlusione, queste sono evidenti soprattutto a distanza di giorni dall'insulto, e solo in determinate aree del cervello come CA1 nell'ippocampo (morte selettiva). Questo fa supporre che i anche i meccanismi molecolari,

che sottendono tali processi siano distinti da quelli osservati nei modelli di ischemia focale (Hossmann 1998a; Katz et al., 1995; Iijima et al., 1993; Pulsinelli & Buchan 1988; Smith et al., 1984).

Ischemia cerebrale focale

Il sangue arriva al cervello attraverso due coppie principali di arterie: la carotide interna e l'arteria vertebrale.

La prima origina dalla carotide esterna, la quale all'altezza del chiasma ottico, si divide in due rami principali: l'arteria cerebrale anteriore, dalla quale origina la comunicante anteriore, che crea un'anastomosi con l'arteria cerebrale anteriore controlaterale, e la cerebrale media (MCA).

La MCA, passato il solco rinale si divide in tre rami: rostrale, caudale e corticale, ed irrorata il prosencefalo (porzioni caudali del nucleo caudato e del putamen, il claustrum e il putamen); la parte rostrale del sistema limbico (viene quindi escluso l'ippocampo), la regione olfattoria (corteccia piriforme, tubercolo olfattorio, entorinale laterale e mediale, c.peririnale e postrinale, l'amigdala); infine caudalmente vascularizza le parti rostrali della corteccia parietale e temporale. La MCA è il vaso più comunemente coinvolto nelle sindromi ischemiche nell'uomo (Berkowicz et al., 1994; Karpiak, 1989).

Le arterie vertebrali all'altezza del ponte si uniscono per formare l'arteria basilare, dalla quale si distaccano varie collaterali (le arterie cerebellari inferiori, medie e superiori; le cerebrali posteriori rostrale e caudale) che proseguono nelle comunicanti posteriori fino a collegarsi al sistema vertebro-basilare della MCA. Si forma così un anello anastomotico completo posto alla base del cervello chiamato circolo di Willis (*circulus arteriosus cerebri*). Questo può essere considerato una struttura che garantisce un'uniforme distribuzione del sangue attraverso i suoi rami, per dare un certo margine di sicurezza in caso di eventi ischemici che colpiscano uno dei 4 vasi principali. Le arterie ed il letto capillare che origina dalle suddette arterie formano una complessa e continua struttura tridimensionale che perfonde l'intero sistema nervoso centrale, e la sua modulazione attraverso recettori endoteliali specifici e la sovrapposizione dei territori serviti dalle singole arterie, formano un sistema dinamico capace di vicariare in parte la funzionalità di un vaso qualora questo sia occluso.

Il circolo di Willis della cavia (la specie animale utilizzata nello studio qui descritto) è caratterizzato da un'ampia connessione tra il circolo posteriore (vertebro-basilare) e anteriore (carotideo), garantito dalla presenza di arterie comunicanti posteriori di grosso calibro.

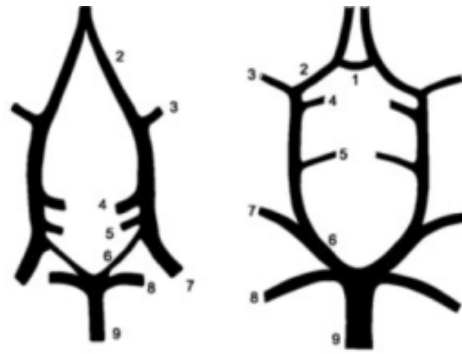


Figura 4. Struttura del circolo di Willis nel ratto (sinistra) e nella cavia (destra). 1. arteria comunicante anteriore; 2. arteria cerebrale anteriore; 3. arteria cerebrale media; 4. arteria carotide; 5. arteria ipofisaria; 6. arteria comunicante posteriore; 7. arteria cerebrale posteriore; 8. arteria cerebellare superiore; 9. arteria basilare. (Adattato da Craigie's Neuroanatomy of the rat, W.Zeman, J.R.M.Innes, 1963 Academic Press).

Modello embolico

In questa categoria rientrano due tipologie di modelli: quelli tromboembolici propriamente detti e quelli in cui non si utilizza un coagulo per mimare l'embolo.

I primi rappresentano meglio la patologia umana, caratterizzata dall'alta incidenza di ischemie dovute ad emboli. Storicamente studiati su animali di taglia maggiore, poi adattati ai roditori, in questi modelli trombi (<100 µm) formati dal sangue dell'animale stesso (autologo) sono iniettati attraverso la carotide esterna per poi raggiungere vasi intracranici. In alcuni studi (Papadopoulos et al., 1987) sono stati utilizzati coaguli formati da sangue umano così da testare l'efficienza dell'attivatore del plasminogeno ricombinante umano.

Uno dei grossi limiti di questo modello è la difficoltà di controllo nel posizionare il trombo e quindi di selezionare un'area ischemica precisa e riproducibile. Inoltre non è infrequente che il coagulo si dissolva spontaneamente ed è quindi difficile ottenere una riperfusione controllata temporalmente. Per quest'ultima ragione sono stati realizzati dei trombi ricchi in fibrina resistenti all'autolisi (Overgaard et al., 1992; Takano et al., 1996; Busch et al., 1997). Al pari di questo sistema sono utilizzati vari tipi di materiale artificiale per mimare il trombo: silicone viscoso, (Lauer et al., 2002) collagene (Purdy et al., 1989) polivinilsilossano (Yang et al., 2002).

Il secondo gruppo di modelli (non-clot embolous) si avvale di microsferi (35-50 µm) in carbonio o in polietilene iniettate attraverso la carotide esterna. Il danno si sviluppa lentamente, raggiungendo la sua estensione massima 24 h dopo la preparazione, ed è di tipo multifocale ed eterogeneo nella sua natura. Una dinamica così lenta potrebbe rendere questo modello utile per testare farmaci neuroprotettivi. (Zivin et al., 1987; Fukuchi et al., 1999; Roos et al., 2003).

Modelli di occlusione intraluminale

Questo è il modello sperimentale maggiormente utilizzato nei topi e nei ratti, e offre maggiori possibilità di controllo delle variabili indotte da occlusioni permanenti o transienti, in modo controllato e poco invasivo. Consiste nell'inserire un monofilamento da sutura in silicone attraverso la carotide (esterna nel modello di Longa, comune in quello di Koizumi) fino al punto in cui occlude il flusso nella MCA. Questa metodica provoca un danno ischemico riproducibile nell'area della corteccia frontoparietale e del caudato-putamen laterale e permette la riperfusione una volta retratta la sonda occludente. L'occlusione e/o la riapertura del vaso, monitorate all'interno di una risonanza magnetica (Li et al., 1998) oppure controllate attraverso sistemi di monitoraggio del flusso sanguigno locale (Laser Doppler Flowmetry) e dell'ossigenazione (Johannes. et al., 2005), permettono di avere una certa confidenza nella riproducibilità dell'operazione.

Da quando venne pubblicato (Koizumi, 1986) sono state apportate varie modifiche nella forma e nel diametro della testa del filamento utilizzato (Longa et al., 1989), così come nel materiale per ricoprirne l'estremità introdotta (silicone o poly-lisina). In un lavoro recente (Johannes. et al., 2005) è stata confrontata l'efficacia di due tipi di suture: uno con l'estremità ricoperta di silicone per una lunghezza di 19 mm, l'altro con la testa arrotondata dal calore. Dopo aver indotto un'ischemia permanente di 8 ore in un gruppo di ratti Sprague-Delewey e di 24 in un altro gruppo di animali, gli autori hanno confrontato il danno neurologico attraverso test comportamentali semplici ed il volume di tessuto infartuato con metodiche autoradiografiche. Hanno notato come il volume necrotico e quindi l'estensione e la localizzazione del danno siano direttamente relazionati al numero di vasi occlusi insieme alla MCA: tanto più alto quanto più lungo è il filamento introdotto.

Differenze nell'estensione del territorio irrorato dalla MCA, la variabile disposizione dei suoi rami, le differenze nella distribuzione sanguigna collaterale alla suddetta arteria o la presenza e l'estensione delle anastomosi presenti nella pia (anastomosi di Haubner; (Hossmann 1998b) sono le principali cause delle differenze interspecifiche in relazione al danno ischemico, e di conseguenza all'*outcome* postischemico e in ultima analisi alla reazione di farmaci neuroprotettivi e trombolitici. (Oliff, 1997; Herz,1996; Fox, 1993; Bardutzky, 2005).

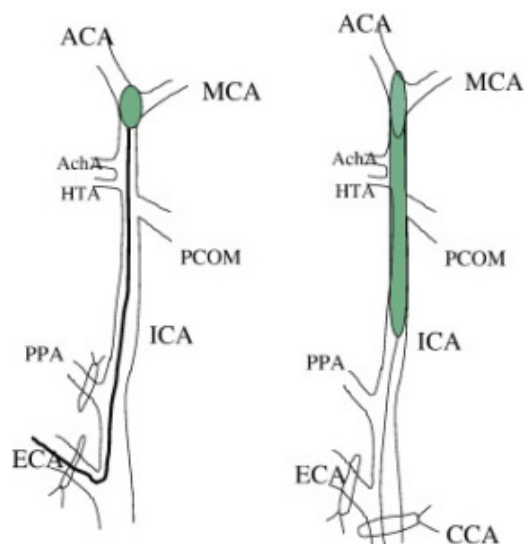


Figura 5. Occlusione intraluminale della MCA. Sulla sinistra il metodo di Longa, il quale consiste nell'inserimento di un filo da sutura nella carotide esterna, occludendo la sola MCA. Sulla destra è invece raffigurato il sistema utilizzato da Koizumi, che prevede l'inserimento nella carotide comune di un filo con l'estremità siliconata così da bloccare il flusso sanguigno anche nell'arteria coroidea e in quella ipotalamica. (adattato da Durukan et al., 2007)

Inoltre in alcuni modelli animali, come il gerbillo (Levine e Payan, 1966), e con una certa variabilità anche nei topi BALB/C (Barone et al., 1993), manca del tutto la comunicante posteriore; a parità d'insulto questi animali sviluppano un danno maggiore, e una mortalità più elevata.

La tecnica stessa ha poi delle limitazioni, date per esempio da situazioni anatomiche che ne rendono difficile l'attuazione. Ad esempio nei ratti Fisher-344 (Sprague-Delawey), studi di angiografia, hanno reso visibile il percorso tortuoso della carotide interna nel segmento osseo (segmento petroso; Dittmar, 2006) che rendono complicata l'introduzione del filamento occludente.

In questi modelli non è infrequente avere complicazioni, quali la rottura dei vasi e seguente emorragia subaracnoidea, o l'ipertermia causata dall'ipoperfusione del talamo (evento assai raro nell'uomo) (Li et al. 1999).

Modelli di occlusione del microcircolo

Nel tentativo di produrre lesioni ischemiche minime, Watson e collaboratori hanno sviluppato il modello di fototrombosi corticale (Wester et al., 1995a). In questo modello, viene dato all'animale

per iniezione venosa un colorante fotosensibile, il rosso bengala, che ha la caratteristica di indurre l'aggregazione delle piastrine se irraggiato ad una specifica lunghezza d'onda (Wester et al., 1995 b). Questa metodica prevede la sola esposizione del cranio ma non la craniotomia; regolando l'intensità del raggio laser utilizzato per la fotoinduzione, la durata dell'esposizione al raggio e la quantità di colorante, si possono variare la profondità e le dimensioni della lesione.

L'ischemia coinvolge i vasi della pia e del parenchima corticale, ma comporta anche lo sviluppo di specie chimiche fortemente ossidanti, come l'ossigeno singoletto, che causano un danno di barriera in pochi minuti e quindi un danno vasogenico rapido (Dietrich et al., 1987). Inoltre il modello produce una lesione all'intorno delle parti più distali delle arteriole, dove minore è il numero di afferenze collaterali (Ginsberg & Busto, 1989).

Sempre il gruppo di Watson (Wester, 1995a) ha apportato una modifica alla tecnica che produce una lesione a forma di anello al cui centro si riscontrano modifiche caratteristiche della penombra ischemica.

Un altro modello che stimola la formazione di trombi prevede l'uso di sali dell'acido arachidonico, ma non è ben documentato il danno ischemico dal punto di vista istopatologico (Furlow & Bass 1975).

Nei modelli di occlusione è annoverato anche il modello dell'endotelina-1. Questo è un peptide (21 AA) endogeno dell'endotelio, delle cellule muscolari lisce e dei neuroni del sistema nervoso centrale, con una forte azione vasocostrittrice (vasospasmo) sui vasi cerebrali (Yoshimoto et al., 1990). La durata dell'azione dell'endotelina è assai maggiore rispetto a quella della noradrenalina (Edvinsson et al., 1984; Robinson et al., 1990). L'endotelina può essere applicata direttamente sulla MCA (*abluminal application*) per generare un danno del tutto paragonabile a quello indotto da un occlusione chirurgica (Macrae, 1992); oppure, può essere applicata direttamente sulla corteccia, riducendo la perfusione locale al punto di danneggiare tutti i livelli della neocorteccia (Fuxe et al., 1997). Da una parte la modesta invasività e la relativa facilità nell'ottenere degli effetti considerevoli in zone ben specifiche del cervello, rendono questo un buon modello; per altri versi l'azione dose-dipendente riduce molto il controllo sulla durata dell'ischemia.

Recenti lavori hanno suggerito che l'uso di questo peptide induce astrocitosi e facilita la crescita assonale (*axonal sprouting*), rendendo quindi difficile l'interpretazione di quei lavori in cui si sono valutate la neurogenesi e la ricircuitazione postischemica (Carmichael, 2005b).

Modelli di occlusione con craniotomia

A questo gruppo appartengono quei modelli che riproducono un'ischemia globale incompleta (oligemia) dell'intero encefalo, o l'ischemia focale con occlusione mediante microclips (transiente) o cauterizzazione (permanente) diretta della MCA. Entrambi comportano una craniotomia moderatamente invasiva, quindi l'esposizione del tessuto cerebrale, la variazione della pressione

intracranica e modificazioni a livello della barriera ematoencefalica (Tamura et al. 1981; Chen ST et al., 1986). Infine va ricordato che in questi modelli, come l'occlusione bilaterale delle carotidi esterne (Two vessel occlusion), si raggiunge un buon grado di ipoperfusione solo imponendo un'ipotensione sistemica controllata. A tal proposito, per ovviare alle complicazioni sistemiche dovute a un calo di pressione, Levine propose di condizionare il soggetto esponendolo a un ambiente povero di ossigeno successivamente all'occlusione unilaterale delle carotidi (Levine 1960). Questa pratica determina lesioni variabili sia nella sostanza bianca che nella grigia, ma soprattutto nell'ippocampo. Studi successivi hanno evidenziato che in questo modello il disturbo provocato è dovuto più ad uno stato di ipossia che ad un problema di esaurimento di substrati fosforilabili e del loro successivo smaltimento. In altri termini, questo modello riproduce una condizione di oligemia nella quale il flusso sanguigno non è sufficiente ad apportare la quantità necessaria di ossigeno al tessuto cerebrale (Salford et al., 1973).

Modelli in vitro

McIlwain et al. (McIlwain 1951) riuscirono per primi a mantenere in vitro delle fettine di neocorteccia e dimostrare che queste, se stimolate elettricamente, evidenziavano cambiamenti metabolici. Fu poi comprovato che fettine di corteccia piriforme potevano essere mantenute *in vitro* ed esprimere un'attività elettrica simile a quella osservata nel preparato intatto (Yamamoto & McIlwain, 1966). Questa tecnica venne poi utilizzata per ottenere fettine da ippocampo e dalla neocorteccia fino a divenire uno dei modelli più utilizzati nel campo delle neuroscienze.

Questo preparato offre notevoli vantaggi, tra i quali: i) il controllo della composizione chimica e della temperatura del *milieu* d'incubazione, ii) la possibilità di manipolare il pH, la concentrazione ionica, la quantità di ossigeno e di ormoni ceduti al tessuto (Dingledine et al., 1980; Andersen et al., 1980), iii) l'assenza di artefatti dovuti al battito cardiaco e alla respirazione, e di risposte omeostatiche dell'organismo. In questi preparati si ha una completa e distinta visualizzazione del tessuto e, grazie a tecniche di *imaging*, è possibile analizzare modifiche a livello delle singole cellule così come neuriti, dendriti o spine dendritiche, facilitando così l'individuazione della struttura che interessa studiare.

Il modello delle fettine in vitro presenta anche alcune limitazioni. Il taglio dei processi cellulari può comportare un processo degenerativo retrogrado, che può inficiare lo studio della fisiologia anche di intere popolazioni cellulari. Sempre durante la preparazione, il tessuto va incontro ad una lieve anossia, seppure ridotta dalla bassa temperatura del bagno di incubazione e influenzata da fattori quali l'età dell'animale, la cura e la velocità della dissezione. Infine in questo modello in vitro non sono preservate funzionalmente la barriera ematoencefalica e del sistema vascolare (arteriole e capillari), strutture direttamente coinvolte negli eventi ischemici e quindi importanti

per lo studio dei meccanismi di tale insulto. Nello studio a lungo termine (giorni o settimane) dei meccanismi patologici si preferiscono le colture organotipiche di tessuto cerebrale (Vornow, 1994). La situazione di carenza energetica tipica dell'ischemia può essere riprodotta in colture primarie di neuroni, colture organotipiche (Vornow, 1994) e su fettine di cervello incubate (Whittingham et al. 1984), in assenza di ossigeno e glucosio (*oxygen-glucose deprivation*, OGD). I risultati ottenuti in queste condizioni sperimentali hanno poco in comune con la situazione in vivo, e vanno quindi interpretati con cautela (Hossmann 1998a). Nonostante ciò, questi modelli sono utili nel decifrare quei meccanismi intracellulari implicati nell'ischemia, difficilmente osservabili in altri modelli.

RILEVANZA DEI MODELLI ANIMALI NELLA PATOLOGIA UMANA

La rilevanza dei modelli animali nella fisiopatologia umana è stata discussa criticamente da quando si è osservato che potenziali farmaci neuroprotettivi efficaci nei modelli animali non avevano alcuna efficacia nei pazienti e mostravano gravi effetti collaterali.

La variabilità di localizzazione ed estensione del danno, oltre alle citate differenze anatomiche e lo scarso controllo d'importanti parametri fisiologici, come la temperatura, la glicemia, il pH, etc., possono essere tra le cause di questo insuccesso (Nedergaard et al., 1987; Huang, 1996; Durukan & Tatlisumak 2007; Mcilvoy, 2005).

Un passo in avanti nella comprensione delle variabili più rilevanti che determinano la sofferenza ischemica nell'uomo è stato fatto con l'introduzione delle metodiche di *imaging*, che permettono di visualizzare nel paziente i cambiamenti funzionali e morfologici di un processo in atto. Queste metodiche hanno confermato che almeno due aspetti derivati dallo studio sui modelli animali sono assolutamente rilevanti per lo sviluppo di terapie indirizzate a limitare il danno ischemico nell'uomo: le caratteristiche dell'evoluzione temporale dell'insulto ischemico dal punto di vista cellulare, ovvero quali destini si prospettano alla cellula nervosa durante l'ischemia; e il concetto di penombra come tessuto potenzialmente recuperabile se la riperfusione viene ripristinata all'interno di una precisa finestra terapeutica (Carmichael, 2005a).

METODICHE DI ANALISI DEL DANNO ISCHEMICO

I vari meccanismi molecolari attivati durante le prime fasi dell'ischemia sono collegati tra loro in maniera complessa, tanto che è difficile prevedere dalle premesse quale tipo di danno sarà preponderante. Inoltre il peso di un elemento in questa catena biochimica, può essere dato dal

modello d'ischemia preso in considerazione. Di fatto, come si è detto, esistono differenze nella tipologia del danno tra i modelli di occlusione globale e quelli focali. Ragion per cui solo l'uso di più metodiche d'indagine può essere determinante, oltre che a decifrare il processo ischemico, anche a stabilire analogie certe tra modelli differenti.

Nei modelli animali in vivo fin qui descritti la valutazione e l'evoluzione dell'evento ischemico può essere seguita studiando le variazioni in vivo del flusso sanguigno locale e del consumo di ossigeno e glucosio utilizzando metodiche come la Positron Emission Tomography (PET), le variazioni neurofisiologiche attraverso l'uso dell'elettroencefalogramma (EEG).

La risonanza magnetica durante le fasi iperacute dell'ischemia

I primi cambiamenti nella struttura della cellula possono essere visualizzati utilizzando una tecnica di *imaging* in risonanza magnetica (RM), chiamata Diffusion Weighted Imagig (DWI). Questo tipo di acquisizione del segnale in RM permette, attraverso l'uso di più gradienti di diffusione e sequenze di impulsi in Radio Frequenza (RF), di osservare e quantificare il tensore di diffusione (TrD). Questo misura il moto diffusivo, in più direzioni, dei nuclei di idrogeno, ovvero dell'acqua, all'interno di un tessuto. In condizioni normali, prendendo in considerazione un tessuto isotropo quale può essere la materia bianca della corteccia, il movimento dei nuclei è casuale e segue un moto di tipo browniano, non si hanno quindi particolari cambiamenti di segnale nel tempo. All'instaurarsi dell'edema citotossico, e quindi a pochi minuti dall'occlusione, si ha un aumento del segnale che appare come un'iperintensità nelle immagini pesate in DWI o un'ipointensità a seconda che si osservi un'immagine parametrica del coefficiente apparente di diffusione (ADC; quest'ultimo viene calcolato partendo dalle acquisizioni in DWI, ndr) o TrD se osservato in più direzioni. Questo cambiamento è dato dal diverso grado di mobilità delle molecole d'acqua nel comparto extracellulare e intracellulare, motivo per cui la diffusione è definita apparente. In questo sistema le molecole possono trovarsi legate a macromolecole, a strutture citoscheletriche o organelli e in misura minore libere. Nello spazio extracellulare, le molecole d'acqua hanno invece un maggior grado di movimento. L'aumento d'acqua nello spazio intracellulare, dovuto ai cambiamenti di movimenti transmembranari che ne regolano l'osmolarità riduce quest'ultima frazione. Nelle aree in cui questo avviene non si avrà quindi un decremento di segnale lungo i gradienti di diffusione ma un aumento, in quanto i protoni sono meno liberi di muoversi. Per converso, il coefficiente apparente di diffusione calcolato sarà ridotto (Szafer et al., 1995; Moseley et al., 1990a; de Crespigny et al., 2001).

Il contrasto tra aree iperintense o ipointense, nel caso si osservi l'immagine pesata in diffusione (DWI) o di una mappa parametrica del tensore di diffusione (TrD), e quelle normali, definisce quindi l'area che per prima subisce il danno ischemico. Questo tipo di distinzione non è apprezzabile con le normali tecniche di RM (sequenze pesate in T1, T2), se non dopo ore

dall'evento ischemico e spesso sono indicative di un edema vasogenico o di lisi cellulare (Guerrini et al., 2002; Rudin et al., 2001).

La DWI è spesso associata, anche in ambito clinico, a un'altra applicazione dell'imaging RM, chiamata Perfusion Weighted Images (PWI). In questo caso viene iniettato un mezzo di contrasto paramagnetico per osservare in tempo reale il grado di perfusione del tessuto infartuato (*Cerebral Blood Flow*, CBF; *Cerebral Blood Volume*, CBV). Viene così determinata l'area di penombra, sottraendo l'area iperintensa in DWI all'area che mostra anomalie nel flusso sanguigno (Henninger et al., 2006). Secondo alcuni autori, questo criterio di valutazione è discutibile per due errori. Il primo è dato dal non aver considerato che il valore di perfusione in cui avviene la riduzione del coefficiente di diffusione (ADC) è sostanzialmente superiore a quelli tipici del core ($0.41 \text{ mLg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ vs. $0.15 \text{ mLg}^{-1} \text{ min}^{-1}$; Hossmann, 2006); e questo spiegherebbe perché in alcuni modelli animali di ischemia transiente si abbia un parziale recupero della situazione quando la riperfusione avviene nell'arco di 2 o 3 ore dall'occlusione (Minematsu, et al., Stroke 1992; Dijkhuizen, et al., 1997). L'altro errore è dovuto alla sovrastima dell'area di ipoperfusione per l'inclusione di aree di oligoemia benigna, ovvero la PWI indica una riduzione del flusso ematico che in realtà non interferisce col normale metabolismo cellulare (Hossmann, 2008)

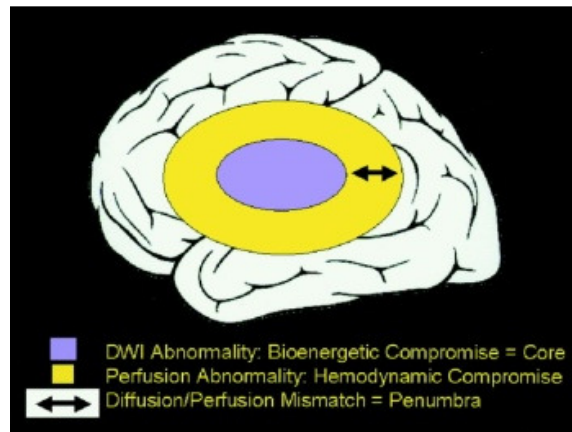


Figura 6. Il diagramma rappresenta due differenti regioni dell'area ischemica: in viola la zona focale, distinta in ragione della riduzione del coefficiente di diffusione (ADC). In giallo, l'area caratterizzata da un indice di perfusione basso, la differenza tra queste due aree definisce la penombra (adattato da Kidwell et al., 2003)

Tecniche istologiche

La misura del volume di tessuto infartuato può essere eseguita *post mortem* con varie metodiche istologiche come la colorazione con l'ematosilina ed eosina (*hematoxylin and eosin*, H&E) che

permettono di evidenziare l'area infartuata per il suo pallore e individuare le cellule sofferenti o necrotiche secondo le caratteristiche morfologiche precedentemente elencate (Christine et al., 1998; Garcia et al., 1993). La tecnica del TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase Biotin-dUTP Nick End Labelling) individua specificatamente le cellule apoptotiche, in quanto marca i frammenti di DNA prodotti dalle endonucleasi apoptotiche (Snider et al., 1999; Yi Li et al., 1995). Si possono poi utilizzare tecniche di ibridazione *in situ* per identificare le aree in cui vengono espressi "early genes" (hsp40, c-Fos, j-Bun; An, et al., 1993; Gass et al., 1992; Honkaniemi et al., 1996) così come evidenziare l'mRNA dei diversi geni coinvolti nell'apoptosi (Honkaniemi et al., 1996). Il trifeniltetrazolio cloruro (TTC), è un composto che viene ridotto dalle deidrogenasi (NADPH) presenti nei mitocondri vitali e assume un colore violaceo (Benedek et al., 2006) distinguendo così l'area ischemizzata.

OBIETTIVI DELLO STUDIO

Secondo quanto esposto nell'Introduzione, la penombra ischemica può essere considerata come un'area di tessuto cerebrale che potenzialmente potrebbe allargare l'area di *core* ischemico, divenendo di fatto un potenziale target terapeutico durante la fase acuta di un attacco ischemico. La regione di penombra è stata distinta dall'area di *core* irrimediabilmente danneggiata dall'ischemia, attraverso analisi *post-mortem* o test comportamentali nei modelli animali. Studi clinici hanno confermato e definito la penombra come l'area cerebrale che non ha subito un danno definitivo, se viene eseguita una manovra di ricanalizzazione prima di tre ore dall'evento ischemico. La penombra viene identificata applicando il concetto del *mismatch* tra immagini di DWI e PWI. I veloci e imprevedibili cambiamenti che avvengono nel parenchima e nei vasi cerebrali durante la fase acute dell'ischemia, introducono delle variabili a tutt'oggi difficili da quantificare attraverso quelle metodiche di *imaging*. Come riportato nell'introduzione, la RMI può sovrastimare l'area di penombra e includere aree di oligoemia benigna.

I modelli d'ischemia in vivo, in larga parte si focalizzano sui meccanismi e le conseguenze a livello molecolare-biochimico di un evento ischemico, e correlano le modificazioni a misure del flusso sanguigno, di glicemia e di altre variabili fisiologiche. Un numero minore di lavori si avvale di registrazioni elettrofisiologiche multiple da diverse regioni intra- e peri-ischemiche, che permettono di localizzare e distinguere le aree di penombra e di *core* con maggior precisione, in base al tipo di correlato elettrofisiologico tipico di queste zone (PID o ID).

Obiettivo principale del presente studio è di studiare la fenomenologia di tali eventi lenti, e utilizzarli per discernere precisamente le aree di *core* e di penombra nelle prime ore che seguono un insulto ischemico indotto nel modello *in vitro* di cervello di cavia.

Questo preparato offre il vantaggio di visualizzare facilmente l'arteria da occludere, e permette quindi una buona riproducibilità delle lesioni, e un controllo preciso dei tempi di occlusione e riapertura dell'arteria selezionata per indurre l'ischemia. Questi vantaggi sono difficilmente riscontrabili nei modelli di occlusione intraluminale, dove il filo da sutura utilizzato per l'occlusione può danneggiare il vaso e ostacolare la riperfusione (Belayev L, et al., 1997), o nei modelli trombo embolici in cui l'embolo può posizionarsi in sedi diverse da quella desiderata. Inoltre la maggior parte dei modelli utilizzati non permette di valutare in modo preciso l'evoluzione degli eventi durante le prime ore che seguono l'occlusione/riperfusione del territorio ischemizzato.

Il primo obiettivo specifico è distinguere, dal punto di vista funzionale, l'area ischemica da quella di penombra e dal tessuto sano peri-ischemico durante le fasi acute dell'occlusione. A questo scopo sono state eseguite delle registrazioni multiple per apprezzare la distribuzione delle ID nella zona di *core* e le PID nella penombra. Oltre alle variazioni nei potenziali extracellulari in DC sono stati utilizzati protocolli di stimolazione locale per distinguere ulteriormente la zona anossica,

incapace di rispondere, dalle aree non compromesse funzionalmente. Sono stati applicati protocolli di occlusione di diversa durata per stabilire: 1) se ad una maggiore durata della occlusione corrispondesse un maggior numero di PID nella zona di penombra, 2) se la frequenza delle PID correlasse con l'estensione del danno ischemico nella zona di penombra, e 3) se tempi diversi di riperfusion avessero effetti sul recupero delle aree infartuate.

Il secondo obiettivo è stato quello di evidenziare tramite metodi istologici (MAP2, tionina, ematossilina e eosina) e di imaging (RM) i possibili cambiamenti strutturali nelle medesime aree indagate con l'elettrofisiologia.

Fine ultimo è identificare in modo preciso le aree di core e di penombra, correlando le osservazioni ottenute con diverse metodiche di analisi anatomica, elettrofisiologica e di imaging RM

MATERIALI E METODI

IL CERVELLO ISOLATO DI CAVIA

Il preparato sperimentale di cervello isolato di cavia mantenuto *in vitro* tramite perfusione arteriosa nasce dall'esigenza di sviluppare un modello complesso per indagini funzionali e morfologiche, in cui le connessioni all'interno del SNC siano preservate integralmente (Muhlethaler, de Curtis et al., 1993). Il modello è stato sviluppato per tentativi successivi orientati a registrare da porzioni dell'encefalo più estese rispetto alle sezioni sottili incubate *in vitro* comunemente utilizzate per gli studi elettrofisiologici dall'inizio degli anni '80 (Llinas & Muhlethaler, 1998a; Llinas & Muhlethaler, 1988b; Llinas, Yarom et al., 1981; Bourque & Renaud, 1984). Negli anni sono state indagate non solo le proprietà elettrofisiologiche del preparato ma anche la preservazione della componente anatomo-morfologica, la funzionalità dinamica del sistema vascolare e le caratteristiche della barriera ematoencefalica, come dettagliato di seguito.

1. **La funzionalità della componente neuronale.** Registrazioni extracellulari di potenziali di campo hanno dimostrato l'integrità di estesi circuiti neuronali polisinnaptici in diverse aree cerebrali (Muhlethaler et al., 1993; de Curtis et al., 1991b; Biella & de Curtis, 1995b; Biella & de Curtis, 2000b; Uva & de Curtis, 2003; Uva, et al., 2004). Registrazioni intracellulari indicano che è possibile ottenere risposte elettrofisiologiche stabili da neuroni le cui proprietà sinaptiche e di membrana sono paragonabili a quelle osservate sia *in vivo* sia su *slices* di cervello mantenute *in vitro* (de Curtis et al., 1991b; Forti et al., 1997b; de Curtis, 1999; Dickson, 2003). Il preparato è utilizzato come modello per lo studio di crisi epilettiche indotte farmacologicamente.

2. **Funzionalità vascolare:** La stimolazione dei vasi cerebrali con farmaci specifici somministrati intraluminalmente ha dimostrato l'integrità funzionale del sistema vascolare, in grado di modificare il tono arteriolare in base allo stimolo e di produrre sostanze vasoattive (de Curtis, et al., 1998b). La perfusione con l'agonista del recettore per il trombossano A₂, U46619, costrittore della muscolatura periarteriolare, induce un rapido aumento della resistenza alla perfusione, indice di vasocostrizione (21.89±8.7 mmHg superiore al basale), che rapidamente torna ai valori basali dopo riperfusione con soluzione di controllo. La vasocostrizione indotta dall'U46619 è totalmente annullata dal trattamento del preparato con uno specifico antagonista del recettore per TXA₂, il BAYU3405 (de Curtis, et al., 1998a). La perfusione per via arteriosa del preparato con una soluzione contenente acetilcolina (Ach), dopo aver raggiunto il plateau di vasocostrizione indotto da U46619, porta a una rapida vasodilatazione mediata dall'attivazione dei recettori muscarinici, che inducono nell'endotelio rilascio di ossido d'azoto (Librizzi, et al., 2000). Somministrando per via arteriosa un antagonista della NO-sintasi endoteliale questo meccanismo viene bloccato.

3. **Integrità morfologica:** Studi di microscopia ottica ed elettronica a livello del talamo, della corteccia somatosensoriale e delle cortecce limbiche (ippocampo, corteccia piriforme ed entorinale) compiuti a tempi diversi dalla messa in vitro del preparato, hanno evidenziato che nel cervello di cavia isolato gli elementi neuronali conservano le loro caratteristiche anatomiche sia a livello cellulare sia sub-cellulare (de Curtis, et al., 1994).

4. **Funzionalità della barriera emato-encefalica (BEE):** Il compartimento vascolare e la BBB sono stati caratterizzati nel cervello isolato di cavia (Mazzetti et al., 2004). Tramite tecniche di immunocitochimica sono stati valutati 1) il glicocalice delle cellule endoteliali (lectine); 2) la distribuzione delle giunzioni occludenti (occludine e ZO1) e aderenti (PECAM-1, vinculina); 3) distribuzione delle componenti della lamina basale (collagene IV, laminina, proteoglicano dell'eparan-solfato). I risultati ottenuti hanno dimostrato che la distribuzione di tutti i componenti della BEE considerati negli encefali mantenuti *in vitro* per 6 ore è sovrapponibile a quanto osservato nei cervelli di controllo ottenuti da animali perfusi *in situ* per via intracardiaca con il fissativo. La conservazione della funzionalità della BBB nel cervello di cavia isolato è stata investigata anche farmacologicamente, valutando la capacità di due distinti analoghi dell'atropina (antagonista competitivo per il recettore muscarinico dell'Ach), atropine-sulfate e methyl-atropine, rispettivamente permeabile e non-permeabile la BEE, a bloccare un tipo di attività elettrica, l'*attività gamma*, indotta dalla perfusione arteriosa del preparato con un agonista muscarinico (carbacolo). La perfusione arteriosa con l'antagonista muscarinico atropina-solfato si è dimostrata in grado di bloccare la suddetta attività *gamma*, dimostrando che nel preparato di cervello di cavia sono riprodotte le proprietà di permeabilità selettiva di BEE osservate *in situ* (Librizzi et al., 2001b).

I risultati sono stati confermati valutando la permeabilità della barriera al potassio. Attraverso l'utilizzo i elettrodi sensibili allo ione $[K]^+$, è stata valutata la variazione di concentrazione dello ione a livello del parenchima in seguito a perfusione arteriosa del preparato con una soluzione ad alta concentrazione di $[K]^+$. Nessun incremento significativo della concentrazione di $[K]^+$ intraparenchimale è stato registrato nelle due cortecce analizzate, corteccia piriforme ed entorinale, in seguito al bolo di soluzione ad alte concentrazioni di potassio, confermando ulteriormente l'integrità funzionale degli elementi cellulari costituenti la BEE (Librizzi et al., 2001a). Grazie alla preservazione delle relazioni esistenti tra compartimento neuronale, extracellulare e vascolare, il cervello isolato di cavia mantenuto *in vitro* tramite perfusione arteriosa si è dimostrato un valido modello per lo studio di funzioni elettrofisiologiche complesse (circuiti mono e poli sinaptici) e delle interazioni tra i diversi compartimenti.

Vantaggi e svantaggi del preparato

In relazione a questo tipo di studi in cui viene manipolata la componente vasale al fine di condizionare quella neuronale, è bene tener conto di alcune condizioni sperimentali che potrebbero condizionare gli effetti dei protocolli applicati.

Uno di questi è per esempio la pressione del flusso di perfusione, la quale potrebbe indurre, meccanicamente, la sintesi di NO da parte della NO-sintasi endoteliale a questo va aggiunto che il preparato è privo di scatola cranica oltre che della pachimeninge.

Un altro parametro che ha effetti neuroprotettivi è la temperatura, in quanto l'ipotermia riduce il metabolismo cellulare, ha effetti sul flusso sanguigno, aumenta la solubilità dell'ossigeno e abbassa il suo livello critico di scambio, rallenta i fenomeni di eccitotossicità calcio mediata, la sintesi proteica si mantiene, modula la risposta infiammatoria ed i processi apoptotici (Sahuquillo & Vilalta 2007). L'assenza, infine, di emoglobina nel perfusato da una parte priva il sistema di un importante tampone extracellulare, dall'altra occorre far gorgogliare nel plasma artificiale una miscela di O₂/CO₂ al 95% / 5%, immettendo quindi una fonte di radicali liberi (superossido e idrossile) e di perossido nel preparato che si formano attraverso vari sistemi enzimatici a fronte di un eccesso di ossigeno. Questi potrebbero aggredire il plasmalemma delle cellule endoteliali, degradandone la componente lipidica, dilatando le arteriole agendo sulla muscolatura liscia e inducendo quindi un danno vasogenico.

Va tuttavia ricordato, che nel lavoro precedentemente citato sulla preservazione delle componenti cellulari di tale modello, il numero di neuroni degenerati evidenziati in un cervello perfuso per oltre 10 ore, non era apprezzabilmente diverso rispetto ai cervelli di controllo. Una frazione di astrociti, quelli più prossimi ai vasi, mostrava segni evidenti di sofferenza, così come le cellule endoteliali, facendo presupporre che l'origine dell'edema risultante fosse vasogenica.

La preparazione del cervello isolato di cavia

Gli esperimenti sono stati effettuati su femmine di cavia Hartley di peso variabile tra 150 e 200 gr. L'animale viene anestetizzato con iniezione intraperitoneale di tiopentale sodico (80 mg/kg). La concentrazione di barbiturico scende al di sotto dei valori anestetici (2.03±0.56 mg/L; mean±SD) già dopo 30' dalla messa in vitro (Librizzi, et al.,2005). Questo permette di escludere ogni eventuale interferenza dell'anestetico sulla funzionalità del preparato e sui risultati ottenuti.

Dopo aver raggiunto uno stato profondo di anestesia, verificato dall'assenza del riflesso corneale e dei riflessi di flessione alla stimolazione cutanea, si procede ad una rapida toracotomia per esporre il cuore. Si introduce una cannula nel ventricolo sinistro e si spinge fino a raggiungere l'aorta ascendente e si procede alla perfusione intracardiaca per circa 3 minuti di una soluzione salina a 7-8 °C costituita da NaCl 126mM, NaHCO₃ 24.8mM, KH₂PO₄ 1.2mM, MgSO₄ 1.3mM, KCl 3mM,

glucosio 15mM, HEPES 2.1mM, CaCl₂ 2.4mM e destrano (PM 70.000) al 3% come plasma expander. La soluzione è ossigenata con una miscela gassosa 95% O₂ e 5% CO₂. Il pH finale, corretto con HCl glaciale, è di 7.1. Questo passaggio ha il duplice scopo di 1) ridurre il metabolismo cerebrale così che vengano rallentati i processi di degenerazione cerebrali indotti dalla breve anossia che si verifica durante la dissezione, e 2) rimuovere dai vasi il sangue, evitando la formazione di trombi. Il flusso durante la perfusione è di circa 6.5 ml/min e la pressione di 80-100 mmHg imposta da un sistema di perfusione a caduta.

Durante la perfusione intracardiaca si procede alla rimozione dello scalpo seguita poi dalla decapitazione. Sempre in condizioni di ipotermia si esegue una vasta e delicata craniotomia mediante ossivora, esponendo la porzione dorsale dei bulbi olfattori, la corteccia, il cervelletto, il tronco encefalico e la prima porzione del midollo spinale (fino a C1- C2). Se la perfusione cardiaca ha avuto successo il cervello appare bianco e privo di coaguli nei vasi. Con forbicine da iride viene rimosso lo strato meningeo dalla volta dorsale e si scolla delicatamente il cervello dalla base cranica, inserendo una spatolina ricurva a livello dei bulbi olfattori. Si recidono quindi le carotidi e il chiasma ottico, il peduncolo ipofisario insieme alle arterie ipofisarie, i nervi cranici, le arterie vertebrali e i primi nervi spinali.

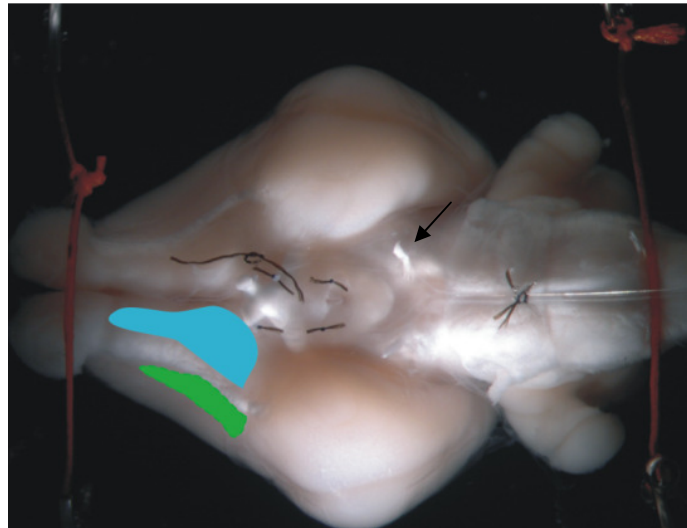


Figura 7. Fotografia ripresa dallo stereomicroscopio del cervello di cavia mantenuto “in vitro” nella vaschetta di perfusione. Vengono distinte la corteccia piriforme, in verde, e il tubercolo in azzurro. Nell'emisfero controlaterale si può notare il nodino posizionato attorno alla MCA (vd. freccia.)

La scelta di animali giovani-adulti è giustificata dal fatto che la consistenza della teca cranica è tale da permetterne la rimozione con facilità. In animali più giovani la maggiore elasticità della teca può facilitare la dislocazione del cervello durante la craniotomia, mentre in cavie più vecchie l'aumento della consistenza ossea rallenta l'operazione di estrazione del cervello.

Il sistema di perfusione in vitro

Il cervello isolato viene rapidamente trasferito in una camera di perfusione/incubazione costituita da una vaschetta di alluminio (12x7cm x 4 cm di altezza) rivestita con un materiale siliconico inerte ed isolante (Sylgard), riempita con la stessa soluzione utilizzata per la riperfusione cardiaca 7.4 pH. La camera è termoregolata tramite sonde termiche inserite nella vaschetta collegate ad un termostato che agisce su un sistema di celle di Peltier alimentate da un generatore di corrente. La soluzione della vaschetta in queste fasi iniziali è mantenuto a 15° C.

Il cervello viene appoggiato sul lato dorsale così che la porzione ventrale dove si trovano il circolo di Willis e i grossi vasi sia facilmente accessibile, e viene stabilizzato da una struttura a ponte costituita da due fili di seta fissati al fondo della vaschetta.

Per ripristinare la perfusione cerebrale si procede immediatamente all'inserimento nell'arteria basilare di una canula di polietilene (200-300 µm di diametro alla punta) collegata a una pompa peristaltica (Gilson) tramite un sistema di tubi di TYGON impermeabili all'ossigeno (in cui sono intercalati un *bubble trapper* e un filtro di nitrocellulosa con pori di 22 µm). La soluzione (pH 7.4, ossigenata) viene perfusa con un flusso di 7.0 ml/min. la resistenza vasale opposta alla perfusione è di 34.26 ± 8.15 mmHg e 33.36 ± 10.80 mmHg, rispettivamente a 15° e 32°C. Il sistema è studiato in modo da garantire la perfusione e impedire che eventuali impurità e/o bolle d'aria giungano al sistema vascolare e abbiano effetto embolizzante. Dalla decapitazione alla riperfusione in vitro trascorrono meno di 10 minuti; si chiudono quindi i due monconi delle arterie carotidi interne e delle due ipofisarie con fili di seta ricostituendo così l'integrità funzionale del circolo di Willis e garantendo quindi una perfusione ottimale a tutto il cervello. Queste operazioni microchirurgiche sono effettuate con l'ausilio di uno stereomicroscopio (ingrandimento 30x) ed illuminando il campo operativo con una fibra ottica che crea un fascio di luce fredda tangenziale alla superficie del preparato.

Dopo aver controllato che non ci siano perdite arteriose si innalza gradualmente la temperatura della soluzione fino a 32° C con un incremento di 0.2° C/min. Gli esperimenti elettrofisiologici vengono effettuati a 32° C.

In queste condizioni, il cervello di cavia è funzionalmente e strutturalmente preservato per 6-8 ore (Llinas, 1981; de Curtis, et al., 1991a; Muhelethaler, et al., 1993; de Curtis, et al., 1994; de Curtis, 1994; Biella e de Curtis, 1995; Biella, et al., 1996; Forti, et al., 1997; de Curtis, et al., 1998; de Curtis, 1998; Librizzi, et al., 1999; Librizzi et al., 2001a).

STRUTTURE ANALIZZATE

La corteccia piriforme

La PC è una struttura filogeneticamente antica, palaeocorticale, disposta per tutta la lunghezza del LOT, sulla convessità ventrolaterale posta alla base della corteccia. Ha una struttura più complessa nella porzione posteriore rispetto a quella anteriore ed è divisa in tre strati principali.

Il primo strato (I), quello molecolare, è il più superficiale e ricco di fibre; nella parte più superficiale (Ia) si trovano di fatto gli assoni ed i bottoni presinaptici le fibre del LOT, che derivano dalle cellule mitrali del bulbo olfattorio; nella parte più profonda del I strato (Ib) si trovano le fibre intracorticali associative e le terminazioni provenienti dalla piriforme controlaterale ed ipsilaterali.

Il secondo strato è più sottile e presenta cellule piramidali densamente impacchettate i cui dendriti proiettano verso la superficie (I). Nello strato (IIa) si possono enumerare cellule piramidali più piccole, dette cellule semilunari e prive di dendriti prossimali. Il terzo (III) è più spesso ma più lasso, presenta un gradiente cellulare decrescente dalla superficie alla profondità, i dendriti di queste arrivano fino alla prima laminazione (Ia). Nella parte più profonda dello strato (III) si trovano anche cellule multipolari GABA-ergiche candidate a mediare l'inibizione feedback ed altri neuroni intrinseci quali le cellule lisce.

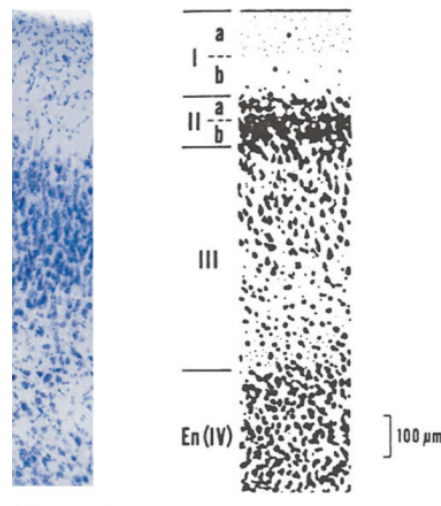


Figura 8. Microfotografia (barra di calibrazione 200 μm) della PC di un cervello di controllo, a destra sono schematizzate le lamine presenti nella medesima corteccia (modificato da G. M. Shepherd. *The synaptic organization of the brain*. III ed.)

La parte più profonda della piriforme secondo alcuni autori è da considerarsi un vero e proprio quarto strato, per altri identifica il nucleo endopiriforme (Haberly & Price 1978) In tutte le superfici fin qui descritte si trovano interneuroni GABAergici, che formano circuiti inibitori di tipo *feedforward* e *feedback* intracorticali (Kanter & Haberly 1990).

Il tubercolo olfattorio

Il tubercolo olfattorio (OT) è una struttura composta: da una parte caratteristiche istochimiche e morfologiche ricordano strutture quali lo striato, il pallido e il nucleo accumbens, dall'altra viene incluso tra le cortecce olfattorie, a causa delle afferenze dirette che riceve dal bulbo olfattorio (attraverso il LOT, come la PC), e da altre aree del sistema limbico (ippocampo, corteccia entorinale, subicolo).

Nei roditori, conigli ed altri animali macrosmati si presenta come una protuberanza posta appena caudale ai bulbi olfattori e compresa tra il tratto olfattorio (LOT) e la scissura mediale, è delimitato caudalmente all'altezza del chiasma ottico. E' formato, con le dovute differenze tra le specie, da due componenti: una zona "corticale" prossima al LOT, alla quale s'interpongono a intervalli regolari dei fasci di neuroni granulari disposti sull'asse rostro-caudale, che aumentano in dimensioni verso la parte mediale del OT.

La zona corticale e così chiamata poiché assomiglia molto alla PC, è di fatto organizzata in tre strati: uno strato plessiforme, uno piramidale, e uno polimorfo. La superficie molecolare è ricca di fibre mieliniche provenienti dal LOT, mentre neuroni multipolari dallo strato più profondo, proiettano al nucleo accumbens.

La componente mesiale dell'OT, invece non presenta una struttura laminare, assomiglia molto ad altre strutture presenti nell'OT più mediale, dette isole di Callejas, ed è formata per lo più da cellule piccole, granulari e simil piramidali i cui assoni proiettano anche verso il nucleo accumbens e il putamen.

Questa distinzione in una zona laterale a carattere "corticale" e una mediale "striatale" diviene ancor più evidente dal punto di vista funzionale in quegli animali (gatto, macrosmati) in cui l'innervazione proveniente dal LOT è predominante nella parte laterale corticale (Meyer & Wahle 1986; Heimer et al., 1987; Heimer, 1968; Carriero et al., 2010).

PROTOCOLLI DI OCCLUSIONE

Al termine della procedura di messa in vitro, la parte prossimale della MCA sinistra è stata esposta e liberata dalla sovrastante pachimeninge, in modo da potervi posizionare intorno un filamento di seta e legarlo attorno al vaso in modo lasso (Fig. 7). Questa procedura è stata effettuata ad una temperatura attorno ai 20° C, ed al termine vengono posizionati gli elettrodi registranti e stimolanti seguendo i criteri di posizionamento sopra citati. Quando la temperatura del preparato raggiunge 32°C, gli elettrodi sono stati inseriti nelle posizioni definitive in PC ed OT ad una profondità di 400 µm al di sotto della superficie cerebrale. E' stata poi testata la funzionalità della PC e dell'OT ipsilaterale all'emisfero in cui viene effettuata l'occlusione della MCA e della PC controlaterale (PCc), valutando la risposta evocata dalla stimolazione del LOT. Alla fine di tutti gli esperimenti, la morfologia dei potenziali evocati nella PC controlaterale è stata riesaminata per verificarne la preservazione funzionale.

Per l'analisi di ogni singolo parametro elettrofisiologico qui considerato, sono stati scelti quegli esperimenti che meglio garantivano una corretta interpretazione del fenomeno da studiare. Sono stati scartati a priori gli esperimenti che hanno sviluppato un edema evidente nel corso dell'esperimento o quelli in cui non sia stato possibile ottenere dei validi potenziali evocati dalla PC controlaterale alla fine dell'esperimento. Dopo avere posizionato gli elettrodi registranti (uno nella aPC e 3 nell'OT anteriore ipsilaterale), gli stimolanti (uno sul LOT (S1) ed uno direttamente nel OT (S2), il nodo attorno alla MCA viene stretto per indurre l'occlusione dell'arteria per diversi tempi. Nel primo protocollo 1 (P1) l'occlusione è stata mantenuta per 30 minuti, seguiti da 2 ore di ri-perfusione (n= 18). Nel protocollo 2 (P2) l'occlusione è durata 60 min e 1 ora di ri-perfusione (n= 7). Infine nel terzo (P3) la MCA è rimasta chiusa per 2 ore (n= 10) senza la riapertura del vaso. La riapertura della MCA è stata effettuata mediante il rilascio del nodo di occlusione. I potenziali sono stati registrati in continuo prima, e durante il periodo di occlusione e per tutto il periodo di ri-perfusione.

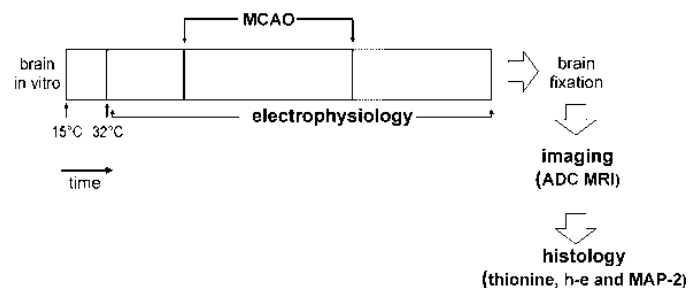


Figura 9. Schema del protocollo sperimentale. Dopo aver posto il cervello "in vitro" la temperatura viene portata a 32°C. Le registrazioni elettrofisiologiche vengono effettuate prima, durante e dopo l'occlusione della MCA. Al termine di queste (5h), il cervello viene fissato, vengono acquisite le immagini in MR e quindi condotte le analisi istologiche.

In seguito all'esperimento *in vitro* (5 h), i cervelli sono stati dapprima fissati in paraformaldeide, poi acquisite le immagini in MR e infine preparate le sezioni istologiche (Fig. 9).

LE REGISTRAZIONI ELETTROFISIOLOGICHE

Le registrazioni extracellulari del presente studio sono state eseguite con microelettrodi di vetro a bassa resistenza (5–6 M Ω) riempiti con NaCl 0.9% (154 mM) nelle corteccie olfattorie vascolarizzate dalla MCA. I potenziali di campo sono stati evocati sia stimolando (puls quadrati di 0.3 – 0.8 mA della durata di 350 μ sec) il tratto laterale olfattorio laterale (*lateral olfactory tract*, LOT) per mezzo di un elettrodo bipolare (filo d'argento teflonato arrotolato a spirale) sia attivando le fibre associative intracorticali del OT con uno stimolante bipolare in tungsteno con le punte distanziate di 100 μ m (FHC, ME, USA; puls quadrati di 0.06-0.1 mA da 1 msec, con un ritardo di tre secondi dall'elettrodo bipolare).

La posizione relativa degli elettrodi (3 nel OT ed 1 in PC), posti a 2 mm di distanza l'uno dall'altro, è stata determinata utilizzando come riferimento il chiasma ottico, la scissura mediale e la convessità del tubercolo, nel tentativo così di registrare sempre dalle medesime posizioni in esperimenti diversi (Fig. 10A).

Prima di terminare l'esperimento, è stata valutata l'ampiezza e la morfologia della risposta evocata della corteccia piriforme controlaterale al lato ischemizzato, nel tentativo di apprezzare la preservazione funzionale del preparato al termine dell'esperimento. Puls di corrente continua (0,2 mA per 10 sec) sono stati dati tramite l'elettrodo stimolante, nell' area speculare a quella a cui si era registrato per identificare senza possibilità di errore il lato non ischemizzato sulle sezioni anatomiche preparate dopo l'esperimento di elettrofisiologia.

I segnali elettrofisiologici sono stati amplificati attraverso un amplificatore differenziale multicanale (Biomedical Engineering, Tornwood, NY, USA) e sono stati acquisiti in forma digitale attraverso una scheda analogica/digitale PCI-6023E (National Instrumenta, USA). Le tracce infine sonostate acquisite e analizzate tramite un software sviluppato presso il nostro laboratorio dal dott. Vadym Gnatkovsky (ELPHO®).

Nell'analisi dei dati elettrofisiologici sono state considerate le risposte evocate in tre periodi differenti dell'esperimento: un minuto prima dell'instaurarsi delle ID, dopo la caduta del potenziale, e dopo il suo recupero massimale durante la riperfusione (rispettivamente: pre-ID, post-ID e *reperfusion* in Fig. 13A). Per ogni punto di registrazione (PC, OT1-3) è stato calcolato il rapporto percentuale dell'ampiezza del FP misurato nelle tre fasi appena citate (Fig. 13B). Come valore di riferimento è stata usata la media dei primi quattro potenziali registrati appena dopo la MCAo.

L'intensità delle depolarizzazioni del tessuto, registrate durante le IDs e le PIDs, è stata misurata calcolando l'integrale dell'area sottesa dalla traccia del potenziale di campo dal momento

dell'onset a 30 min dopo ($\int_{t_0,1} mV(dt)$; $t_0= 0 \text{ min}$; $t_1= 30 \text{ min}$). I valori ricavati per ogni punto di registrazione sono stati poi comparati (ANOVA, Tukey *ad hoc* test) tra i vari protocolli di occlusione. Le velocità di propagazione degli eventi lenti è stata calcolata conoscendo la distanza relativa tra gli elettrodi e il ritardo, delle ID e PID, registrato dagli stessi (Fig. 12B).

RISONANZA MAGNETICA DEL CERVELLO ISOLATO

Prima di essere tagliati e processati per lo studio neuroanatomico, i cervelli sono stati immersi per 5 giorni in una soluzione tamponata di paraformaldeide al 4% (Phosphate Buffer 0.1 M; pH= 7.4). I cervelli sono stati posizionati in una *falcon* (50 mL) e adeguatamente bloccati, in modo da evitare oscillazioni durante l'acquisizione delle immagini in RM. A questo proposito è stato utilizzato uno spettrometro RM Bruker (BIOSPEC 70/30 USR; Ettlingen, Germany) da 7T (30 cm. bore), dotato di un sistema di gradienti schermato e una bobina di superficie per la trasmissione e la ricezione di radiofrequenze. L'uso di preparati fissati in MR permette di fare lunghe acquisizioni, senza artefatti di movimento, e quindi aver una miglior risoluzione delle strutture anatomiche. Le misure del coefficiente di diffusione apparente (*apparent diffusion coefficient*, ADC) in cervelli fissati in paraformaldeide, sono caratterizzate da un valore assoluto più basso (Sun et al., 2005; D'Arcueil et al., 2007) rispetto a quelle rilevate *in vivo*. Le differenze relative di tale coefficiente tra le aree ischemiche e non, tuttavia permangono (Zucca I. et al., 2009). L'immagine di riferimento utile alla corretta localizzazione del campione è stata ottenuta con una sequenza: "3-orthogonal plane gradient echo triplot". Una volta localizzata la zona d'interesse, corrispondente a quella dove si è focalizzata l'indagine elettrofisiologica (Fig. 10A, pannello in Fig. 14), sono state scelte diverse sezioni coronali disposte in successione rostro-caudale. Di queste sono state acquisite prima, le immagini pesate in T2 (RARE factor: 8, TE= 39 ms, TR= 4000, inter echo time= 13 ms, FOV= 3x3 cm², data matrix 256 x 256, slice thickness= 1 mm) necessarie a visualizzare dettagli morfologici e a scegliere i piani anatomici (n= 10) sui quali calcolare il coefficiente di diffusione. Dopo, quelle pesate in diffusione (*diffusion weighted images*, DWI), ottenute con una sequenza spin-echo (TE= 40 ms, TR= 7.5 sec), N.A.= 1, ore di acquisizione= 9, spessore della sezione= 1mm; F.O.V.=2.8x2.8 cm², matrice 128x128, plane resolution= 219x219 μm²; parametri di diffusione: δ=12 ms, Δ=22 ms, numero delle direzioni di diffusione = 6, numero delle immagini A₀= 5, 7 b-valori (800, 1500, 2000, 2500, 3000, 3300, 3500 s/mm²). Infine dalle immagini di riferimento (A₀) e da quelle di diffusione sono state computate, mediante la supervisione della Dott.ssa Ileana Zucca e il Dr. Alfonso Mastropietro, le mappe parametriche del tensore di diffusione (TrD) utilizzando il software Paravision 5.0 (Bruker, Ettlingen, Germany).

IMMUNOISTOCHEMICA E COLORAZIONI ISTOLOGICHE

Al termine degli esperimenti i cervelli sono stati fissati per immersione in paraformaldeide 4% in tampone fosfato (PB). Dopo 1 settimana di fissazione alcuni cervelli sono stati tagliati al vibratomo in sezioni coronali cranio-caudali dello spessore di 50 μm poi immerse in PB, altri sono stati inclusi in paraffina e sezionati a 5 μm .

Microtubule-associated protein - MAP-2

Per evidenziare il danno neuronale è stata ricercata l'espressione di una proteina ancillare dei microtubuli (MAP-2 Microtubule Associate Protein). Le sezioni in *free-floating*, sono state scelte in base alla presenza della lesione di elettrocoagulazione che identifica l'emisfero opposto a quello dal quale si è registrato. In questo modo, con buona approssimazione sono state ottenute delle fettine corrispondenti alle aree da cui era stata registrata la funzionalità cerebrale (OT anteriore e PC anteriore). Dopo esser state incubate in H_2O_2 (1%) diluita in PB per 10 minuti al fine di inattivare le perossidasi endogene, le sezioni venivano messe in una soluzione contenente NHS (Normal Horse Serum) al 10% e Triton X-100 0.2% diluiti in PBS per 5 ore. In seguito le sezioni sono state lasciate una notte a temperatura di 4.0° C con l'anticorpo primario monoclonale di topo anti-MAP2 (Sigma) diluito 1:1000 in 1% NHS.

Al fine di rilevare il legame antigene anticorpo primario, le sezioni sono state incubate per 75 minuti in un anticorpo secondario prodotto in cavallo anti-topo biotilinato (1:200, Vector laboratories, CA, USA) diluiti in NHS 1%, seguito da NeutrAvidina™ -perossidasi (1:2000, ABC kit Vector Laboratories) per 75 min.

Come cromogeno è stata utilizzata la 3,3'diaminobenzidina tetraidrocloruro (DAB; Sigma, St.Louis, MO, USA) 0,075% in tampone Tris-HCl 0.05 M, pH 7.3, con aggiunta di H_2O_2 0.02%), la quale una volta ossidata dall'enzima perossidasi, dimerizza, formando precipitati marroni (vedi pannello in Fig. 15).

In esperimenti precedenti era stata verificata la specificità dell'anticorpo anti-MAP-2, omettendo l'anticorpo primario, e non era stata evidenziata alcuna colorazione anche quando è stato utilizzato un siero normale (BSA, 1:100).

Ematossilina-eosina e tionina

In (n=5; P2= 2; P3= 3) esperimenti, il medesimo campione utilizzato per la reazione di immunostochimica, è stato utilizzato per ottenere sezioni sottili (5 μm) al microtomo. A tale scopo i preparati sono stati lavati in acqua corrente e disidratati in una scala ascendente di alcoli

(70-80-90-95-100% due cambi almeno di tre ore ciascuno), in cloroformio e inclusi in paraffina. Sono state quindi ottenute al microtomo (6) sezioni rostro caudali di 5 µm, per ciascun cervello, raccolte su vetrini e colorate alternativamente o con ematossilina eosina o con la tionina.

ANALISI DELLE IMMAGINI ISTOLOGICHE

La misura del valore del TrD è stata eseguita demarcando delle regioni di interesse (*region of interest*, ROI, area: 12 pixels, diametro= 400 µm; Fig. 17A in basso) sulle mappe parametriche. Il loro valore medio è poi stato rilevato nelle cortecce di interesse e nelle omologhe contro laterali. La seguente equazione è stata usata per determinarne la variazione percentuale:

$$\left[1 - \left(\frac{\text{reference ROI ADC mean}}{\text{ischemic ROI ADC mean}} \right) \right] \times 100$$

Per determinare l'intensità di colorazione nelle sezioni immunoreagite (MAP-2), sono state dapprima scelte quelle corrispondenti al livello stereotassico delle immagini MR e acquisite con il sistema digitale ScanScope (0.5 µm/pixel; Nikon, Firenze, Italia). Le immagini ottenute sono state poi convertite in immagini in scala di grigi (8-byte; scala di riferimento: Kodak Nr. 8). Nelle medesime aree in cui è stata condotta la valutazione del TrD sono state poi posizionate delle ROIs (diametro= 500 µm; Fig. 15 pannello in basso e Fig.17 pannello centrale), e misurata (software: imageJ; <http://rbs.info.nih.gov/ij/>) la loro densità ottica (*optical density*, OD). La seguente equazione è stata usata per determinarne la variazione percentuale:

$$\left[1 - \left(\frac{\text{PCc OD}}{\text{ischemic ROI OD}} \right) \right] \times 100$$

dove PCc è il valore (OD) di riferimento.

Le sezioni istologiche e le immagini MR ottenute allo stesso livello rostro-caudale sono poi state coregistrate usando un algoritmo di trasformazione spaziale per affinità sviluppato in Matlab. Le immagini, istologiche e MR, così derivate sono state sovrapposte allo scopo di tracciare e misurare l'estensione totale e l'area ischemica.

Il rapporto percentuale tra queste due aree (*ischemic lesion fraction*, ILF; Fig. 18A) è stato infine calcolato e confrontato.

Il test ANOVA è stato utilizzato nel comparare i vari dati di MR *imaging* (Fig. 17C e 18C) e di OD (Fig 15), mentre nel comparare, per verificare poi la significatività delle eventuali differenze è

stato usato il test *ad hoc* di Tukey. Nel caso fossero solo due i gruppi da comparare, allora è stato usato il *paired t-test* (Fig. 17B).

RISULTATI

VALUTAZIONE DEI PARAMETRI ELETTROFISIOLOGICI

La scelta dei punti di registrazione (PC, OT1-3; Fig.10A) è stata determinata in base a precedenti lavori (Pastori et al., 2007; Librizzi et al., 1999). Da questi era stato evidenziato che, nel cervello di cavia, le cortecce olfattive sono servite dalla MCA e dalla ACA. La sovrapposizione di questi due territori vascolari, idealmente definisce la PC e l'OT come aree di core e penombra rispettivamente. Le registrazioni elettrofisiologiche, hanno dimostrato modifiche sia nell'ampiezza delle risposte evocate che variazioni del potenziale extracellulare indotte dall'insulto ischemico. Queste ultime, sono rappresentate da oscillazioni di bassa frequenza (*DC shifts*), identificate come depolarizzazioni ischemiche (*ischemic depolarizations*, IDs) o depolarizzazioni peri-infartuali (*periinfarctual depolarizations*, PIDs) che si sono dimostrate diverse per intensità e morfologia nei diversi punti di registrazione.

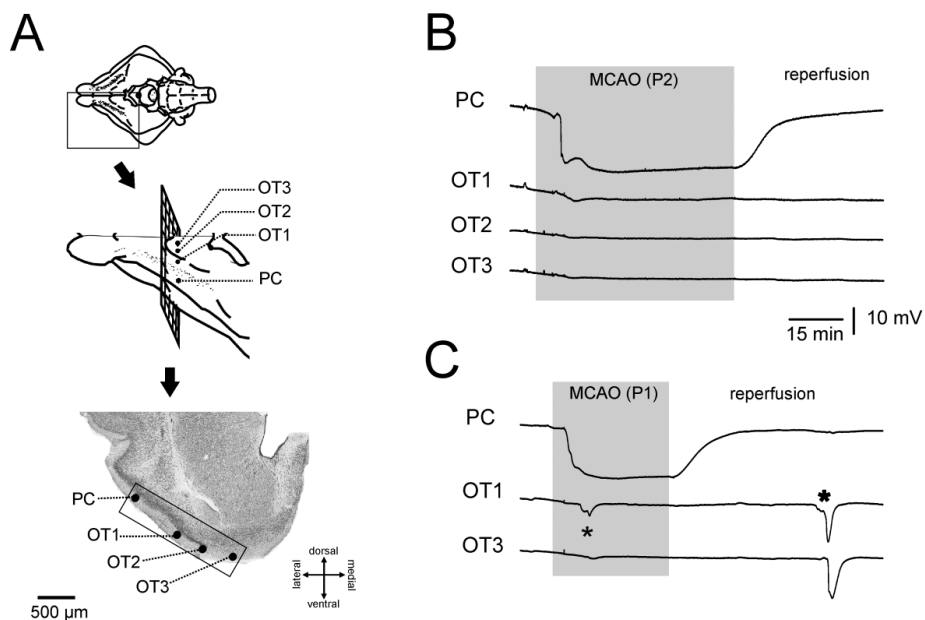


Figura 10. Potenziali lenti registrati(DC) durante la MCAo. In A lo schema della superficie ventrale del cervello e le relative posizioni degli elettrodi registranti: PC e OT (dal più laterale, 1, a quello mediale, 3).Questi sono poi riportati nella sezione istologica sottostante. B e C Potenziali di campo (FP) registrati durante una MCAo di 60 min (area in grigio in B) e di 30 min (area in grigio in C). Le PIDs sono indicate da un asterisco.

Elettrofisiologia di un evento ischemico focale

La PC ha sempre evidenziato delle cadute di potenziali dalla morfologia “a sella rovesciata”(vd PC in Fig. 10B e C; ID in Fig. 11A e 12A) a pochi minuti (5.95 ± 1.13 min; media SEM) dall’occlusione della MCA. L’ampiezza di queste oscillazioni non ha mostrato significative variazioni tra i vari protocolli di occlusione (valor medio: 20.94 ± 1.51 mV; P1 n= 7; P2 n= 3; P3 n= 4; $p \geq 0.05$). La durata, invece delle ID, è dipesa dalla durata dell’occlusione stessa (P1= 69.60 ± 9.13 min; P2= 77.37 ± 5.38 min). Infine, sono state osservate molto più raramente a livello dell’OT1 (n= 3 in P1; n=1 in P2; n= 3 in P3) e mai né in OT2 né in OT3.

Il tubercolo olfattorio è stato caratterizzato da un altro tipo di DC *shift*: le PID (Fig. 11A e 12A). Queste sono state registrate 4.15 ± 1.05 min dopo le ID osservate in PC (Fig. 12A). L’ampiezza e la durata delle PID misurate in OT1 (n= 5) e OT3 è stata di 10.2 ± 2.9 mV e 9.9 ± 4.2 min; 8.6 ± 2.7 mV e 3.8 ± 1.3 min, rispettivamente.

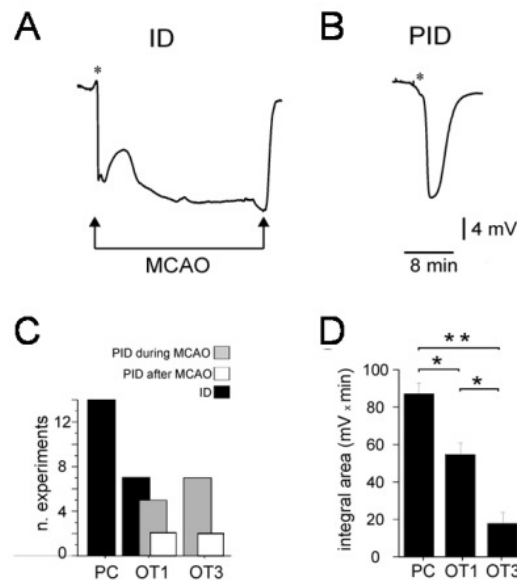


Figura 11. Distribuzione e intensità delle IDs e PIDs nelle cortecce osservate. In **A** e **B** è riportato il caratteristico andamento temporale dei FP che identificano le ID (**A**) e le PIDs (**B**). L’istogramma (**C**) evidenzia la frequenza (n= 14) di questi eventi (ID, colonne nere) in funzione del sito di registrazione, e del momento in cui sono avvenute: in grigio le PIDs registrate durante la MCAo e in bianco durante la riperfusione. In **D** invece sono riportati i valori medi (\pm SEM; n= 16) delle aree sottese dalle IDs e PIDs osservate in PC, OT1-3 (vd. Materiali e metodi)

Le IDs e PIDs sono apparse come eventi mutuamente esclusivi, possono però ripetersi, nel caso delle PID, durante lo stesso esperimento, per esempio durante la riperfusione (n esperimenti=2;

asterisco in Fig. 10C; Fig. 11C). Inoltre le depolarizzazioni transienti, sono fenomeni capaci di propagare lungo l'asse latero-mediale, o più probabilmente in modo radiale (Hartings et al, 2003; Strong et al., 2002; Hossmann,, 2006; Dijkhuizen et al., 1999). Come sopra riportato, generalmente succedono alle ID, eccetto un caso osservato in OT1 (Fig. 12B), e si propagano da OT1 a OT3 con un ritardo di 3.15 ± 0.76 min (Fig. 12A e B).

La quantificazione delle IDs e PIDs nei diversi punti di registrazione è riportata in Fig. 11C e D. Le IDs sono state misurate in (14) esperimenti in PC e in (7) anche a livello dell'OT1. Le PIDs registrate in OT1 e OT3 sono state suddivise tra quelle avvenute durante la MCAo (colonne grigie in Fig. 11D) e dopo (colonne bianche in Fig. 11D) la MCAo. Nel tentativo di evidenziare la diversa entità, in termini di depolarizzazione del tessuto, tra le IDs e PIDs, è stato calcolato l'integrale dell'area sottesa dalla traccia del potenziale di campo (vd. metodi).

La somma di tali valori calcolati per ogni punto di registrazione, ha evidenziato significative differenze ($p \leq 0.05$, Tukey test) tra PC e OT1, e tra OT1 e OT3 (Fig. 11D).

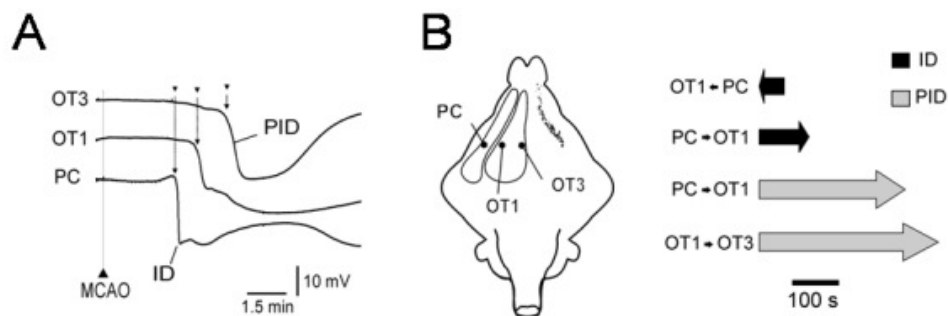


Figura 12. Propagazione degli eventi lenti. La disposizione temporale delle oscillazioni lente (ID e PIDs) è indicata in A dalle linee tratteggiate. Queste indicano l'inizio di una ID in PC, a cui seguono in ordine delle PIDs, in OT1 e OT3 rispettivamente. La distanza relativa degli elettrodi (2mm.) ha permesso poi di misurare il tempo (lunghezza delle frecce) e direzione di propagazione delle IDs (frecce grigie in B) e PIDs (frecce nere in B)

Nel caratterizzare ulteriormente questi potenziali lenti, è stata misurata la velocità media e la direzione di propagazione preferenziale. Questi parametri sono stati valutati per ogni paio di punti di registrazione ($n= 14$; Fig. 12B) e rappresentati in termini di vettori. Questi sono caratterizzati da un verso, e da una lunghezza indicativa della velocità. È stato così possibile esplicitare meglio il caratteristico movimento di diffusione delle ID (frecce nere in Fig.12B) e delle PID (frecce grigie) dall'area di core verso le aree di penombra. La velocità di propagazione è stata calcolata conoscendo la distanza relativa tra gli elettrodi e il tempo d'inizio degli eventi in ciascun punto. E ha permesso di stabilire che le IDs, generate nella PC, si muovono più velocemente (2.5 mm/ min; $n= 5$) delle PIDs (0.6 mm/min; $n= 13$) sulla superficie corticale.

I parametri sono stati acquisiti prima, durante e dopo la MCAo (area ombreggiata in Fig. 13A). Nella figura 13A sono illustrate le risposte evocate in uno degli esperimenti di occlusione

transitoria. Le risposte evocate dalla stimolazione del LOT (S1) sono illustrate dalle tracce superiori e quelle indotte dalla stimolazione locale diretta dell'OT (S2) da quelle inferiori.

Ciascun potenziale di campo è dato dalla sovrapposizione digitale di 3 risposte evocate successive così da ottenere un valore medio dell'ampiezza.

Nello schema del cervello nella Figura 13A sono indicate le relative posizioni degli elettrodi registranti e dei due stimolanti (S1 e S2).

I parametri che sono poi stati valutati e analizzati sono stati l'ampiezza e la morfologia dei FP evocati sia dalla stimolazione del LOT (S1) che delle fibre associative del tubercolo stesso (S2). I valori di questi L'inulto ischemico ha annullato le risposte in quelle regioni in cui sono avvenute le IDs, mentre nel OT è stata osservata solo una temporanea riduzione nell'ampiezza dei potenziali evocati sia da S1 che S2 (Fig. 13A). La componente disinaptica (secondo picco nei FP; Biella & de Curtis, 1995) ha mostrato una più marcata riduzione nell'ampiezza rispetto alla componente disinaptica (primo picco). Il recupero dei FP, parziale o totale, è avvenuto dopo l'inizio della riperfusione e solo nei casi in cui la depolarizzazione ischemica si fosse risolta.

Durante le IDs, a livello della PC, le risposte alla stimolazione del LOT (S1), sono state completamente annullate, mentre nel OT questo è avvenuto in modo variabile (Fig. 13B). In OT1 la riduzione dell'ampiezza, rispetto ai potenziali registrati in fase pre-ischemica, è stata del $62.18 \pm 4.82\%$ (Fig. 13B), in OT2 del $44.03 \pm 7.32\%$ e in OT3 del $58.46 \pm 5.46\%$. Nello stesso periodo di tempo, l'attività evocata da S2, invece, è rimasta pressoché inalterata nel tubercolo olfattorio (OT1= $27.82 \pm 4.82\%$; OT2= $8.56 \pm 6.42\%$; OT3= $39.57 \pm 6.01\%$) ma non nella PC (Fig. 13B).

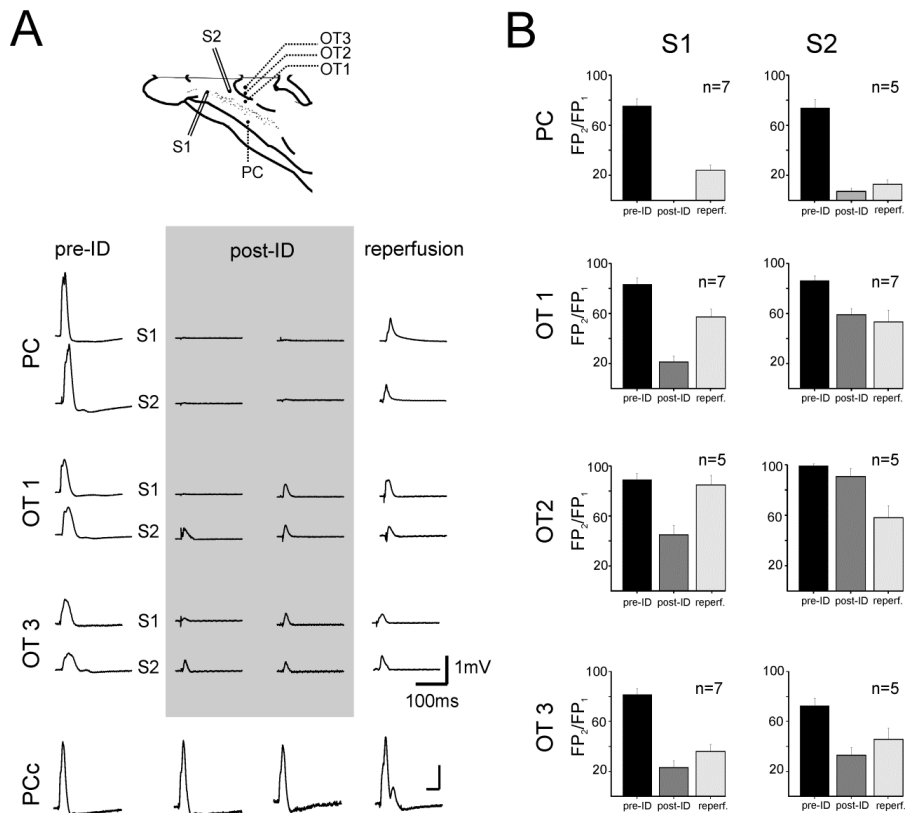


Figura 13. Modulazione dell'attività evocata durante la MCAo. (A) In alto è rappresentata la disposizione degli elettrodi nella PC e nel tubercolo olfattorio (OT1-3). Gli elettrodi stimolanti sono posti invece sopra il LOT (S1), e direttamente nel OT (S2). In basso sono riportate le risposte evocate da S1 e S2 in PC, OT1 e 3, registrate prima della ID, dopo la ID e durante le riperfusione. Nella fila in basso (PCC) sono riportati i potenziali di campo registrati nella PC controlaterale alla MCAo ed evocati dal LOT contro laterale. In (B) è riportato il rapporto percentuale tra la media (n= 3) delle ampiezze dei potenziali (FP₁) registrati durante tre fasi: prima della ID (barre nere) dopo la ID (barre grigie) e durante la riperfusione (barre grigio chiaro); e l'ampiezza media (n= 3) di quelli misurati 1 min dopo la MCAo (FP₂).

OSSERVAZIONI ANATOMICHE

Istologia

L'analisi morfologica e immunohistochimica è stata compiuta su sezioni istologiche ottenute dai cervelli isolati fissati dopo la fine dell'esperimento di neurofisiologia. Per valutare le modifiche nell'area ischemica e di penombra sono state utilizzate la colorazione immunohistochimica con anticorpi anti-MAP2 e le colorazioni con ematossilina-eosina e tionina.

La MAP2 è una proteina associata ai microtubuli, è perciò coinvolta nel mantenimento dell'integrità del citoscheletro e nel modulare la plasticità sinaptica (Johnson, 1992). In condizioni normali la MAP2 è per lo più presente nei dendriti apicali, nelle loro diramazioni più fini e delinea il corpo cellulare (Pettigrew L.C., 1996).

La perdita di strutture citoscheletriche, rappresentata dall'apparente mancanza delle proteine associate ai microtubuli (MAPs), viene considerato come valido indicatore di danno neuronale nell'ischemia cerebrale (Inuzuka, 1990; Yanagihara, 1990; Yoshimi, 1991). Il meccanismo che ne causa la degradazione, sembra essere attivato da un aumento intracellulare del Ca^{2+} , e la successiva attivazione di fosfatasi calcio-dipendenti, la calcineurina, e di proteasi come la calpaina (Siman, 1988; Halpain, 1990).

L'analisi morfologica condotta su sezioni reagite con l'anticorpo per la MAP-2 ha dimostrato vistose alterazioni nell'emisfero ischemizzato. Sono stati scelti campioni da (16) esperimenti, di cui (9) provenienti da un protocollo P1, (4) da un protocollo P2 e (3) da un'occlusione permanente (P3). Lo studio è stato realizzato su sezioni ottenute da diversi livelli stereotassici corrispondenti alla regione in cui era stata individuata la lesione da elettrocoagulazione (-14,2 mm e -12,4 mm dalla linea interaurale secondo l'atlante stereotassico della cavia di Luparello, 1967). Nell'emisfero non ischemico si nota un'intensa colorazione del neuropilo dovuta alla marcatura dei numerosi dendriti apicali e dai loro rami collaterali più fini, mentre si può individuare l'area non marcata della posizione dei soma dei piramidali giganti (Fig. 14C). Nella parte ischemizzata invece, si distinguono diversi gradi di alterazione del segnale. L'area che in tutti gli esperimenti risulta priva di alcuna reattività è quella dal caudato/putamen e la parte centrale del nucleo accumbens, due strutture irrorate prevalentemente dalle arterie lenticolostriate.

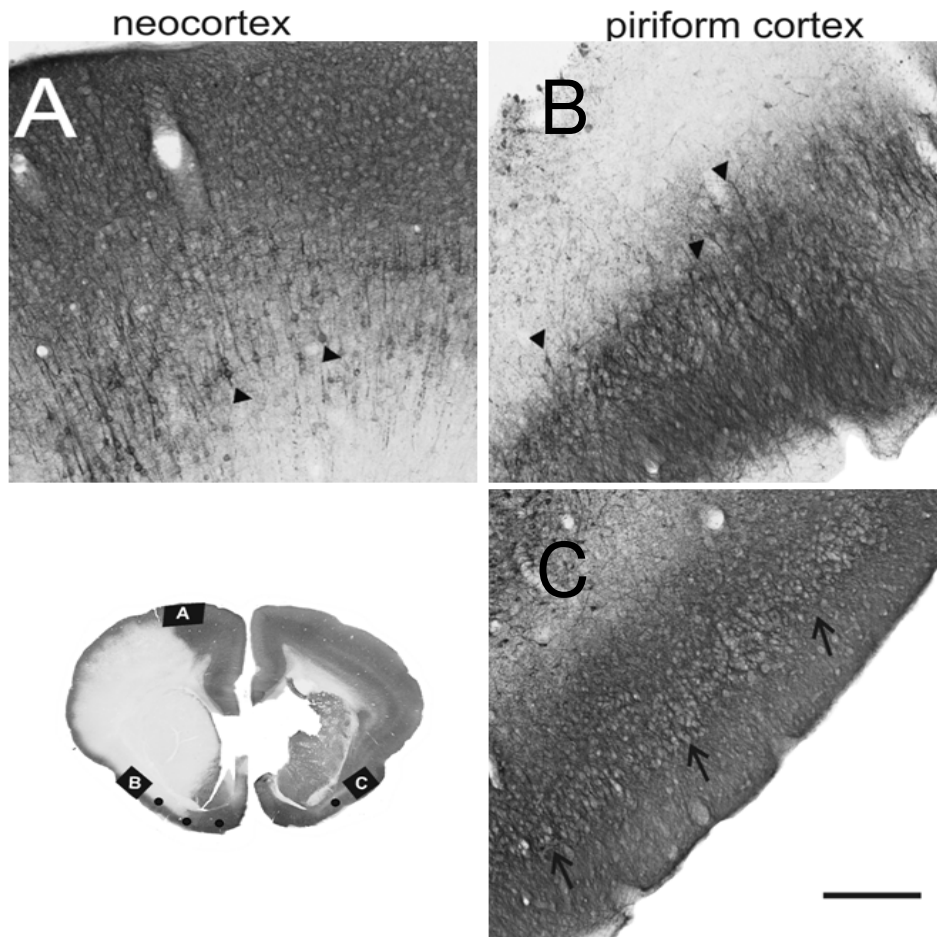


Figura 14. Cambiamenti morfologici successivi a un'ischemia di 30 min. Nel pannello in alto un'immagine a bassa risoluzione di una sezione coronale ottenuta da un cervello in cui è avvenuta l'occlusione della MCA. I rettangoli neri indicano le aree da cui sono tratti gli ingrandimenti: neocorteccia ipsilaterale (A); PC ischemica (B) e PC controlaterale (PCc, C). I punti neri indicano le ROI nelle quali è stata eseguita la quantificazione della OD. Le punte di freccia (A e B) indicano dei neuroni il cui soma è intensamente colorato distintivi del bordo dell'area ischemica (Pastori et al. 2007). Nelle aree preservate (C), invece le frecce identificano dei neuroni il cui soma è privo di segnale MAP-2. Barra di cal.: 500 μ m

Così pure la corteccia somatosensitiva (Fig. 14A), già dal primo strato cellulare è poco marcata, o in alcuni casi solo i dendriti apicali dei neuroni risaltano dal fondo per via di caratteristici frammenti formati presumibilmente da coaguli della proteina microtubulare (Fig 14B). Lo strato molecolare il più delle volte è marcato. La corteccia motoria e quella dei cingoli, così come le porzioni più mediali del tubercolo olfattorio e la parte esterna del nucleo accumbens non mostrano differenza alcuna rispetto all'emisfero di controllo.

Tra le aree prive di segnale (MAP-) e le aree marcate (MAP+), si distinguono due zone di transizione tra la corteccia motoria e quella somatosensitiva e tra quest'ultima e la PC, che comprende anche la parte più laterale dell'OT. Come mostra la Figura 14A (punte di freccia), tra l'area (MAP-) e quella (MAP+) della neocorteccia, vi sono dei neuroni, che ben si distinguono per l'intensa marcatura del soma e della parte prossimale dei dendriti, e non delle porzioni dendritiche più distali. Inoltre molti di questi hanno il dendrite apicale che assume un andamento tortuoso. Il numero di queste cellule si riduce progressivamente verso la zona focale di *core* ischemico. Questo *pattern* di colorazione è visibile anche nella PC ischemica (punte di freccia in Fig. 14B), ma non nel tubercolo mediale. La quantificazione del danno ischemico si è avvalsa della misura della densità ottica (OD), compiuta nelle medesime regioni in cui era avvenuta l'indagine elettrofisiologica e nella PC contro laterale, usata come riferimento (punti neri nel pannello in alto in Fig.14). L'istogramma, posto in figura 15, evidenzia una forte riduzione del segnale MAP-2 rispetto alle porzioni laterali e mediali del tubercolo olfattorio (rispettivamente: $p \leq 0.002$ e $p \leq 0.05$, Tukey test). L'estensione dell'area priva di segnale non è cambiata a seguito dei diversi protocolli di occlusione.

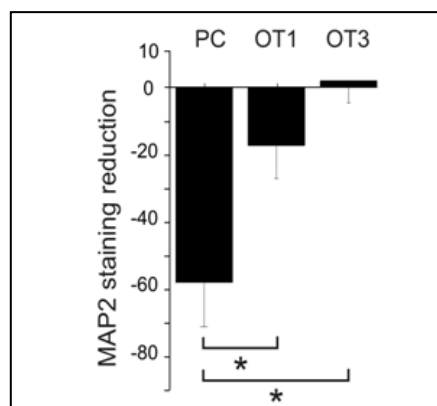


Figura 15. L'istogramma riporta la OD media ($n=10$; \pm SEM) ed esprime la riduzione percentuale della OD misurata nelle ROI (vd. Fig.14) ipsilaterali al danno rispetto(PC, OT1-3) a quella contro laterale(PCc). Gli asterischi denotano una differenza significativa.

L'uso della colorazione istologica con ematossilina ed eosina (Fig. 16A-D; P2, $n= 5$; P3 $n= 3$) ha evidenziato alcuni dei cambiamenti tipici di un tessuto infartuato descritti nell'introduzione (Garcia et al., 1993; Lipton, 1999). In particolar modo, nei cervelli sottoposti a ischemia definitiva, sono stati ritrovati neuroni eosinofili e dall'aspetto triangolare e raggrinzito (freccie in Fig. 16C e D), il neuropilo dall'aspetto spongioso (asterisco in Fig.16D e C) a causa di processi astrocitari rigonfi d'acqua. Nelle aree preservate dall'ischemia invece compaiono neuroni dall'aspetto normale (punte di freccia in Fig. 16A e B).

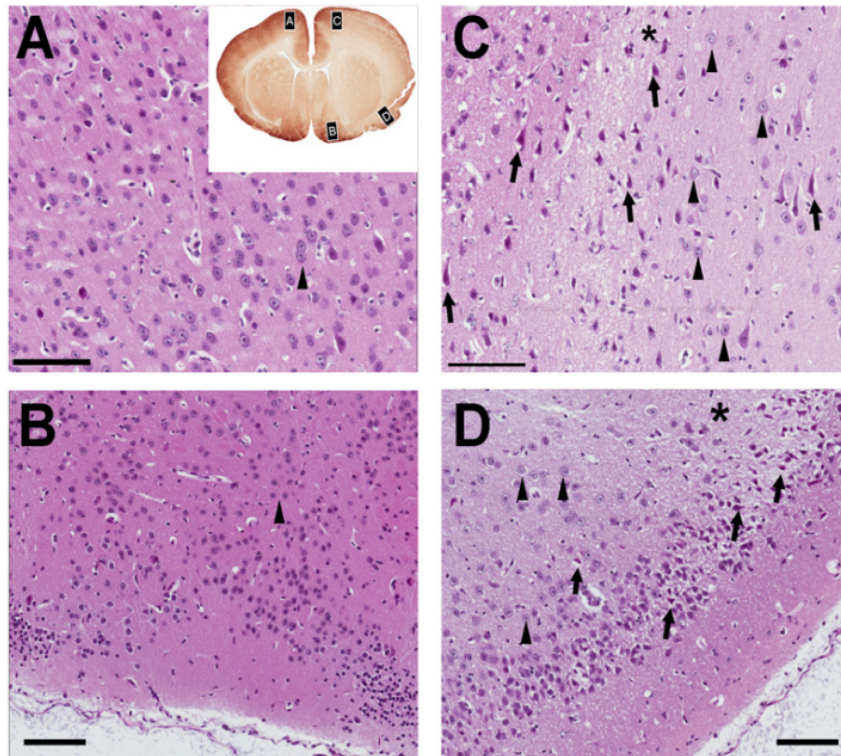


Figura 16. Alterazioni strutturali presenti in sezioni istologiche colorate con H&E. A lato la sezione coronale (MAP-2) attigua a quella da cui sono presi i particolari (A,B, C e D) colorati con H&E. L'area ischemica (C e D), corrispondente a quella priva di segnale MAP-2, mostra un neuropilo edematoso (spongiforme; vd. asterisco) e ricco di cellule eosinofile e raggrinzite (freccie in C e D). Nel OT mediale (B) e nella corteccia parietale (A) invece i neuroni e il parenchima presentano un aspetto normale.

Studio di risonanza magnetica (MR)

Le acquisizioni in risonanza magnetica sono state eseguite su cervelli fissati per immersione in paraformaldeide dopo l'esperimento di elettrofisiologia, prima di sezionare i cervelli per lo studio morfologico.

Di ogni risonanza sono state prese in considerazione le sezioni coronali che meglio rappresentavano le corrispondenti fettine istologiche immunoreagite con l'anticorpo per la MAP2. Le mappe parametriche riportate nelle figure 17 e 18, evidenziano subito le aree soggette a danno ischemico in quanto appaiono ipointense (TrD basso). Queste ben correlano con le regioni prive di immunoreattività contro la MAP-2 (Fig.17A e 18A).

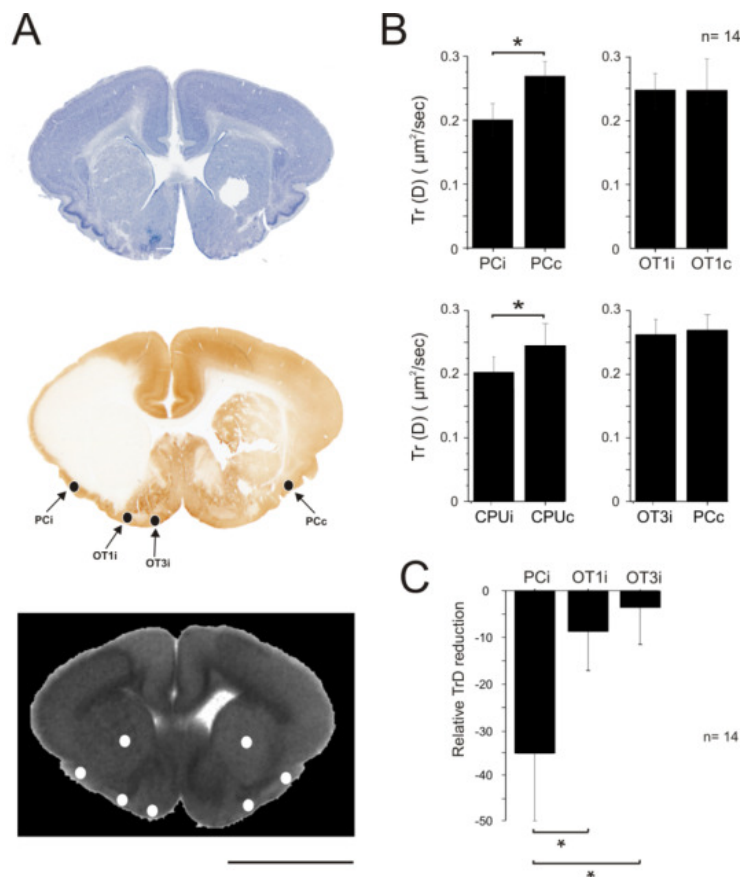


Figura 17. Alterazioni morfologiche visibili alla MR. Nel pannello in A è mostrato il medesimo piano coronale di un cervello sottoposto a un'ischemia durata 180 min (P3). Dall'alto una sezione istologica colorata con la tionina, sotto una fatta reagire contro la MAP-2 e infine l'immagine parametrica di TrD corrispondente. In quest'ultima sono indicate (punti bianchi) le ROI nelle quali è stato misurato il TrD medio. Tali valori (\pm SD; n= 14) sono riportati nell'istogramma in B per le singole regioni ,(CpU= nucleo caudato putamen) sia ipsilaterali che contro laterali al danno ischemico. Gli asterischi indicano una differenza statisticamente significativa. Barra di calibrazione= 5 mm.

La quantificazione del TrD, nelle diverse ROI considerate, ha messo in evidenza la forte riduzione di segnale a livello della PC ipsilaterale e del caudato-putamen (CPu), rispetto alle strutture controlaterali omologhe (Fig. 17B e C; $p \leq 0.05$, paired t-test). Mentre l'intero tubercolo, ipsilaterale all'ischemia, non è diverso da quello controlaterale. All'interno della regione ischemica, infine, sono state computate differenze significative tra la PCe OT1 e OT3 ($p \leq 0.05$, Tukey test, n=14) a non tra OT1 e OT3 (Fig. 17C).

Nel verificare se le regioni ipointense corrispondessero alle aree MAP-2 negative, sono state delineate (Fig.18A), misurate (mm^2) le aree ipointense (TrD, n= 14) e prive di segnale (MAP-2, n=

16) acquisite da vari esperimenti. Dopo averne calcolato i rispettivi rapporti percentuali (Fig. 18B), rispetto all'estensione complessiva della medesima sezione coronale, sono stati correlati (Fig. 18C). Il grafico a barre in Fig. 18B, mostra che non vi è differenza ($p= 0.120$; *paired t-test*) nell'estensione tra l'area ischemica determinata con una tecnica immunocistochimica o con una di MRI. Lo studio di correlazione tra questi due valori, ha poi confermato il dato (Fig. 18C; $R= 0.74$), e inoltre la distribuzione delle due variabili non ha evidenziato alcuna relazione significativa (Tukey test) con la durata del protocollo.

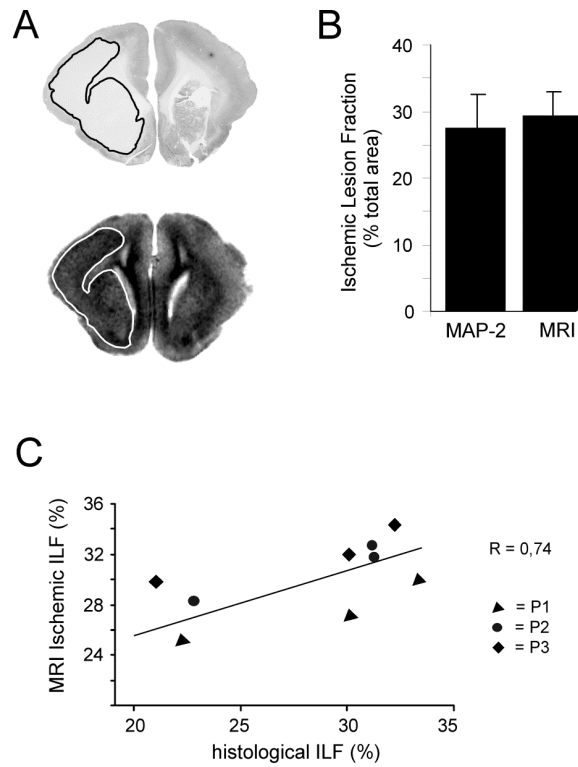


Figura 18. Correlazione tra le aree MAP-2 negative e ipotensione (MRI). In A è delineata l'area di lesione ischemica (ILF) in una sezione immunoreagita contro la MAP-2 e nella corrispondente mappa di TrD. Il valore medio percentuale dell'estensione del danno, osservato e misurato con le due metodiche (MAP-2 $n=16$; TrD $n= 14$), è messo a confronto nell'istogramma in B. (C) Correlazione tra MAP-2 (ILF) e TrD (ILF), calcolate nei medesimi cervelli. Sono riportati i valori (ILF) calcolati in cervelli sottoposti a differenti periodi di ischemia, ad ogni protocollo è associato un simbolo

DISCUSSIONE

Nell'area irrorata dalla MCA, occlusa transitoriamente nel cervello isolato di cavia, sono state registrate modificazioni funzionali e strutturali diverse a seconda dell'area osservata. In base alle misure e le valutazioni riportate nei risultati è stato possibile identificare le modifiche che caratterizzano le diverse regioni ischemiche e peri-ischemiche in questo modello.

I dati elettrofisiologici e le osservazioni morfologiche sono state condotte in una regione specifica del cervello che rappresenta un'area di confine tra il *core* ischemico, servito prevalentemente dalla MCA, e i territori circostanti non ischemici, in quanto perfusi anche dalle arterie cerebrali anteriori (*anterior cerebral arteries*, ACAs). Inoltre la PC e l'OT presentano molte proiezioni cortico-corticali (Biella et al., 1995; Carriero et al., 2010), oltre ad essere attivati in maniera stereotipata dalla stimolazione del LOT. Questo permette di monitorare l'eccitabilità di tali corteccie sia prima che durante l'intero protocollo ischemico. La registrazione continua dei potenziali di campo ha permesso di osservare e identificare IDs e PIDs con un'alta risoluzione temporale e spaziale, difficilmente riproducibili in vivo (Hartings et al., 2003; Dijkhuizen et al., 1999).

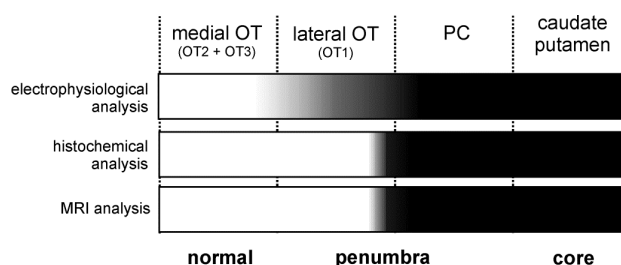


Figura 19. La valutazione e il confronto tra i dati elettrofisiologici, istologici e di MR ha portato a delineare e differenziare le aree ischemiche (aree nere), da quelle di penombra (ombreggiatura in grigio) e normali (aree bianche)

L'analisi delle risposte evocate e dei potenziali lenti ha permesso di definire, dal punto di vista elettrofisiologico, chiaramente due regioni. Una, irrorata dalla MCA, è caratterizzata dalle IDs e dalla scomparsa delle risposte evocate. L'altra, che corrisponde alla regione di confine tra i territori serviti dalla MCA e dall'ACA, ha mostrato il passaggio di PID e solo una riduzione, per altro solo temporanea, dei potenziali evocati. Dai preparati istologici e immunoistochimici è emersa la distinzione tra la zona di *core* ischemico e i tessuti normo-ossigenati. Tra le due è emersa una fine zona di transizione. Le regioni che hanno mostrato evidenti alterazioni nella reazione immunoistochimica, nella colorazione istologica, sono state incluse nelle aree cerebrali in cui sono state registrate le ID (Fig.19). Le zone in cui tali modifiche non si sono esplicitate, sono state correlate alle corteccie in cui si sono registrate le PIDs (Fig. 19). Infine l'estensione delle aree ipointense, visualizzate nelle mappe di TrD, ben correla con quelle evidenziate nei preparati istologici. Queste non includono le aree del tubercolo in cui sono state registrate le PIDs.

Queste relazioni evidenziano che le aree definite ischemiche dal punto di vista morfologico sono quelle che generano le ID. D'altra parte le aree che non hanno evidenziato danni cellulari di tale entità, sono state interessate dalle PIDs (Fig.19).

La definizione di *core* e penombra, non è ancora pienamente condivisa. Nella prima area, sia il metabolismo che la perfusione sono compromessi, nella seconda, il danno ischemico è invece parziale, in quanto reversibile (Symon et al., 1977). Pertanto la penombra può essere definita come quella regione integra dal punto di vista strutturale ma caratterizzata da alcune anomalie elettrofisiologiche, quali la riduzione nell'ampiezza dell'attività spontanea che in quella evocata (Sakatani et al., 1990). La riduzione di ATP in cellula (50-70%, Back et al., 2004) causa tale declino funzionale, ma non è sufficiente a generare IDs. Sempre nella regione di penombra si registrano però altri fenomeni lenti, le PIDs. Queste depolarizzazioni transienti appaiono simili a quelle registrate da vari autori (Mies et al., 1994; Ginsberg e Pulsinelli, 1994), in quanto si manifestano nella forma di veloci cadute del potenziale DC di almeno 5 mV, capaci di muoversi sulla superficie corticale in modo radiale e alla velocità di 3 mm/min (Nallet et al., 1999; Hartings et al., 2003). Durante la loro progressione si ha un blocco della trasmissione sinaptica, paragonabile a quello che avviene in quei fenomeni, formalmente simili, chiamati *spreading depressions* (SD; Leao, 1944). Di fatto, a differenza delle SD, le PIDs sono accompagnate da un aumento bifasico nella $[K^+]_o$ (Nedergaard e Hansen, 1993), e da una riduzione del pH extracellulare, incremento che viene interrotto da un transiente alcalino. Quest'ultimo correla temporalmente con la caduta del potenziale extracellulare (Somjen, 2004; Pastori et al., 2008). Dal punto di vista patofisiologico le PIDs influenzano fortemente l'evoluzione e l'estensione del danno in quanto un loro aumento nella frequenza e durata, comporta un incremento nel fabbisogno metabolico, già compromesso dalla condizione ischemica (Dijkhuizen et al., 1999; Hossmann, 1996).

I dati registrati nei nostri esperimenti hanno dimostrato che le PIDs avvengono in regioni servite dalle ACAs (Librizzi et al., 1999) quali l'OT2 e l'OT3, e mostrano alcune caratteristiche paragonabili a quelle osservate in registrazioni EEG fatte *in vivo*. Altre, quali la velocità di propagazione (0.6 mm/min) risulta essere inferiore rispetto a dati ricavati *in vivo* (Nallet et al., 1999; Nedergaard e Hansen, 1993; Dohmen et al., 2008). Questa differenza potrebbe essere imputata alla temperatura (32°C) in cui viene mantenuto il preparato, ma se così fosse anche la velocità di propagazione delle IDs (2.5mm/min), dovrebbe risultare diversa dalle osservazioni fatte in modelli *in vivo*. E' pur vero che la velocità media delle ID è stata calcolata in esperimenti condotti in fettine corticali o ippocampali. In queste l'evento ischemico è stato mimato seguendo il modello della *oxygen-glucose deprivation* (OGD; vd. introduzione e Somjen, 2004; Martins-Ferreira et al., 2004; Strong e Dardis, 2005), ovvero in condizioni sperimentali diverse. Per esempio, la mantenuta integrità dell'unità neuro vascolare nel nostro modello, potrebbe dar conto della variabilità e delle differenze riscontrate nella propagazione, e nei tempi d'insorgenza, delle PIDs da noi registrate (Dreier et al., 2009; Windmuller et al., 2005).

La localizzazione della proteina MAP-2, è alterata dai primi momenti successivi all'ischemia, come si evince dalle sezioni preparate da cervelli trattati solo per 30 minuti. Alcuni lavori precedenti hanno dimostrato un recupero del segnale MAP-2 nelle aree ischemiche, a 24 e 72 h ore dall'occlusione transiente in vivo (Huh et al., 2003). L'analisi dei potenziali evocati, ha mostrato che nel 71% dei casi, la PC, area definita ischemica, è stata in grado di recuperare la capacità di rispondere a stimoli elettrici. Questo conferma il fatto che la mancanza di immunoreattività non è necessariamente associata ad un danno cellulare permanente, ma a cambiamenti più discreti capaci però di condizionare il riconoscimento tra anticorpo e antigene (MAP-2).

Le colorazioni istologiche, con la tiorina ed H&E, hanno rivelato maggiori dettagli utili a discriminare meglio le differenze, tra le aree ischemiche indotte da diversi periodi di occlusioni. Di fatto, nel gruppo di cervelli sottoposti ad un evento transiente (P1 e P2), il *core* è apparso sbiadito e il neuropilo spongiforme, a causa dell'edema citotossico. L'estensione del periodo ischemico a 3h (P3), ha portato alla formazione di neuroni eosinofili e raggrinziti, caratterizzati dalla presenza di vacuoli intorno al soma (Garcia et al., 1993 e 1995; Lipton, 1999; Dereski et al., 1993).

L'edema citotossico, e quindi il danno cellulare conseguente, è causato dalla perdita dell'omeostasi ionica a cui segue quello idrico. Il flusso delle molecole d'acqua che ne consegue, e la loro nuova distribuzione tra parenchima e comparto intracellulare, è il meccanismo proposto per spiegare le modificazioni viste nelle immagini DWI, e quindi in ultima analisi nel valore di TrD (Neumann-Hafelin et al., 2000). Queste alterazioni della funzionalità di membrana, rappresentano null'altro che il correlato strutturale delle alterazioni elettrofisiologiche fin qui discusse. L'analisi del TrD ha evidenziato, di fatto, profonde alterazioni solo a livello della sola PC, regione nella quale sono state registrate esclusivamente IDs. Nel tubercolo, anche nella porzione laterale, non sono state riscontrate differenze con le regioni omologhe contro laterali.

Il valore, infine, del TrD nel core ischemico non ha mostrato un significativo recupero né a seguito della riperfusione (P2 e P3), né tra gli esperimenti in cui vi è stato un recupero parziale dell'attività evocata e quelli in cui ciò non è avvenuto.

L'uso di cervelli fissati in paraformaldeide, permette di aver un rapporto S/N più alto in quanto si possono fare acquisizioni in MR più lunghe e prive di artefatti di movimento (battito cardiaco, respirazione). Il valore del coefficiente di diffusione apparente (ADC), secondo alcuni autori, è comunque ridotto del 40% rispetto alle condizioni *in vivo*. Questo non condiziona le differenze relative tra aree ischemiche e normoperfuse (Sun et al., 2005; D'Arcueil et al., 2007; Zucca et al., 2009). Nel tentativo di verificare se la paraformaldeide avesse un qualche effetto sull'acquisizione del segnale di MR, sono stati fatti esperimenti preliminari, nei quali sono stati valutati diversi parametri di acquisizione. Il confronto tra le immagini parametriche di TrD ottenute da un cervello di controllo tenuto in vitro per 5 ore, e quelle acquisite da un animale vivo, hanno mostrato una riduzione (65.1%) del coefficiente nel primo.

In conclusione i dati neurofisiologici, di MR e anatomici, e lo studio delle relative correlazioni, hanno dimostrato che l'acquisizione d'immagini pesate in diffusione (DWI) sottostimano l'area coinvolta dal danno ischemico e non includono le regioni cerebrali in cui si osservano le PIDs (Fig. 19). Queste oscillazioni del potenziale, probabilmente modificano il segnale del coefficiente di diffusione (Sotak, 2004; Rother et al., 1996).

In accordo con alcune osservazioni cliniche (Kidwell et al., 2003; Fiehler et al., 2002), si è potuto verificare che la riduzione del segnale di TrD, tipica dell'area di *core*, non necessariamente è indicativa di un danno funzionale permanente. Questo elemento rafforza l'idea che le immagini parametriche del TrD non siano sufficienti a determinare l'evoluzione del danno tissutale nelle prime ore dall'evento ischemico (Oppenheim et al., 2000).

CAPITOLO II

PENOMBRA ISCHEMICA E MODIFICHE ACUTE NELL'ECCITABILITA' CELLULARE

Gian Luca Breschi, Alfonso Mastropietro, Ileana Zucca, Laura Librizzi
e Marco de Curtis

Publicato in "*Epilepsia*". 2012, 53 (3): 448-458

INTRODUZIONE

EPILESSIA

L'epilessia è definita come una condizione caratterizzata da crisi epilettiche ricorrenti e non provocate da una causa immediatamente identificabile (Hauser & Kurland 1975; ILAE, 1993). Secondo l'organizzazione mondiale della sanità, circa 43 milioni di persone al mondo ne sono affette, ed è la patologia neurologica più diffusa. Nella maggior parte dei casi (più del 70%), il pieno controllo degli attacchi epilettici è ottenibile con adeguati trattamenti farmacologici (Sander 2003). Le principali cause di morte nei pazienti epilettici sono dovute ad uno stato di male epilettico prolungato (crisi ripetute subentranti senza recupero intercritico), suicidio associato a depressione, traumi in seguito alla perdita del controllo corporeo durante una crisi e la morte improvvisa e inaspettata in epilessia (SUDEP). Quindi, il mancato controllo farmacologico o l'implicazione di disfunzioni neurologiche rappresentano i veri fattori di rischio di morte nei pazienti con epilessia.

Classificazione

La classificazione dei disturbi epilettici, rivista e aggiornata dalla *Commissione sulla Classificazione e la Terminologia della Lega Internazionale Contro l'Epilessia* (ILAE: International League Against Epilepsy) nel 1981, è basata principalmente sulle caratteristiche cliniche ed elettroencefalografiche. Le crisi sono suddivise in tre principali categorie: **parziali**, **generalizzate** e **crisi non classificabili**. Vengono definite *crisi parziali* quelle crisi che originano da una precisa e limitata area cerebrale e che inducono una fenomenologia coerente con le funzioni specifiche delle aree corticali interessate. In alcuni casi il focus epilettico può essere più di uno, coinvolgendo differenti circuiti cerebrali che danno origine a caratteristiche cliniche più complesse. Le *crisi generalizzate*, invece, hanno origine da entrambi gli emisferi coinvolgendo fin dall'esordio ampie aree corticali. Dato che alcuni pazienti presentano più di una tipologia di crisi e poiché spesso queste si presentano contemporaneamente o in sequenza è stato necessario implementare la classificazione proposta dall'ILAE, che nel 1989 ha pubblicato la nuova "Classificazione delle Epilessie e delle Sindromi Epilettiche". L'epilessia, quindi, è definita come una patologia sindromica e come tale caratterizzata da un insieme di segni e sintomi che identificano e definiscono un particolare disordine clinico. Con questa nuova classificazione le epilessie e le sindromi correlate sono suddivise in quattro principali categorie: i) epilessie e sindromi localizzate (focali); ii) epilessie e sindromi generalizzate; iii) epilessie e sindromi con sito di origine non determinabile; iv) sindromi specifiche. I primi due gruppi a loro volta sono stati

suddivisi in sottocategorie in base al grado di conoscenza dell'eziologia della sindrome epilettica stessa. Sono stati, quindi, introdotti i concetti di *idiopatico*, *sintomatico* e *criptogenico*. Con il termine idiopatico s'indica che la sindrome epilettica non è stata associata da altra patologia che ne può essere la causa: non ci sono altre cause se non un'alterazione genetica ereditata o acquisita. Le epilessie idiopatiche sono definite in base all'età di esordio, da caratteristiche cliniche ed elettroencefalografiche.

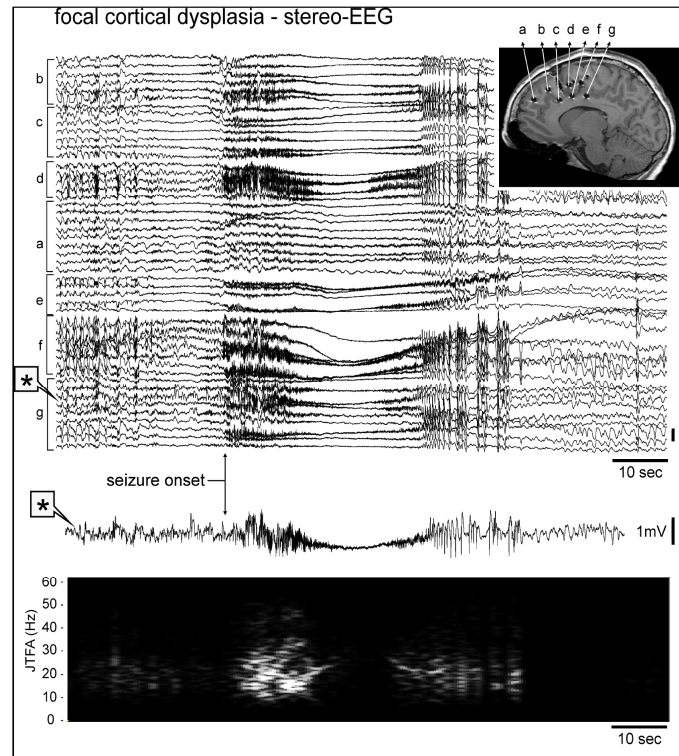


Figura 1. Registrazione stereo-EEG in un paziente affetto da displasia focale. La posizione degli elettrodi intracranici è visibile nell'immagine di risonanza magnetica. In basso lo spettrogramma dell'attività registrata mostra la tipica attività ad alta frequenza all'esordio della crisi (adattato da: de Curtis & Gnatkovsky 2009)

Le *epilessie sintomatiche* sono condizioni neuropatologiche in cui la causa è stata identificata in un'alterazione nota o sospetta del sistema nervoso centrale (SNC). La lesione può essere dovuta ad un'alterazione dei meccanismi di morte programmata, una displasia corticale, un insulto vascolare, un incidente traumatico (*Traumatic Brain Injury*, TBI). Il termine *criptogenico* indica che la causa della patologia è nascosta o occulta. Si presume che le epilessie criptogeniche siano epilessie sintomatiche di cui non si conosce l'eziologia, spesso con un esordio età dipendente ma con un quadro elettroclinico non ben definito. In seguito, un'ulteriore linea guida è stata pubblicata

dall'ILAE nel 2006 dove sono state introdotte novità e specifiche, soprattutto per quanto riguarda le crisi focali e le epilessie con esordio legato all'età (www.ilae-epilepsy.org). Questa classificazione è attualmente in revisione e i nuovi concetti che supportano la nuova proposta di classificazione (Berg 2011; Berg 2012) sono in discussione. Nella presente tesi è stata utilizzata la classificazione più comunemente indicata oggi, riferita al lavoro pubblicato dall'ILAE nel 1989.

Epilessia ed epilettogenesi

Le epilessie sintomatiche generalmente si sviluppano in tre fasi. A un insulto del parenchima cerebrale (es. TBI, ischemia) segue un periodo (periodo di latenza) privo di crisi epilettiche ma durante la quale si attivano vari processi epilettogenici. Tale fase può durare parecchi anni, come nel caso dell'uomo, e i vari meccanismi coinvolti sono ben lontani dall'essere compresi nella loro interezza (Prince et al 2009). Il periodo di latenza si conclude con l'insorgere di un'epilessia conclamata o crisi ricorrenti. I meccanismi epilettogenici sono stati studiati per lo più in modelli animali nei quali lo *status epilepticus* (SE) viene indotto attraverso stimolazione elettrica o chimica (sostanze proepilettogene). Questi sono molteplici e si esplicano, provocando alterazioni morfo-funzionali progressive, quali: morte cellulare, gliosi, neuro genesi, plasticità assonale e dendritica, modificazioni della matrice extracellulare e angiogenesi (Pitkänen A. 2006). Le convulsioni e le crisi epilettiche sono fenomeni clinici che derivano da un'ipereccitabilità neuronale. In termini fisiologici tali manifestazioni possono essere definite come scariche improvvise, eccessive e rapide nella sostanza grigia corticale. Le manifestazioni epilettiche presumono perciò l'esistenza di anomalie costitutive o acquisite dell'eccitabilità neuronale. L'ipereccitabilità neuronale dipende da alterazioni degli scambi ionici transmembranari. In genere si pensa che uno dei più frequenti meccanismi dell'epilessia sia lo sbilanciamento tra azione inibitoria (mediata prevalentemente dal GABA) e azione eccitatoria (mediata da neurotrasmettitori come il glutammato). Questa alterazione del bilancio della trasmissione sinaptica può indurre uno stato di ipereccitabilità neuronale ed in fine scariche epilettiche.

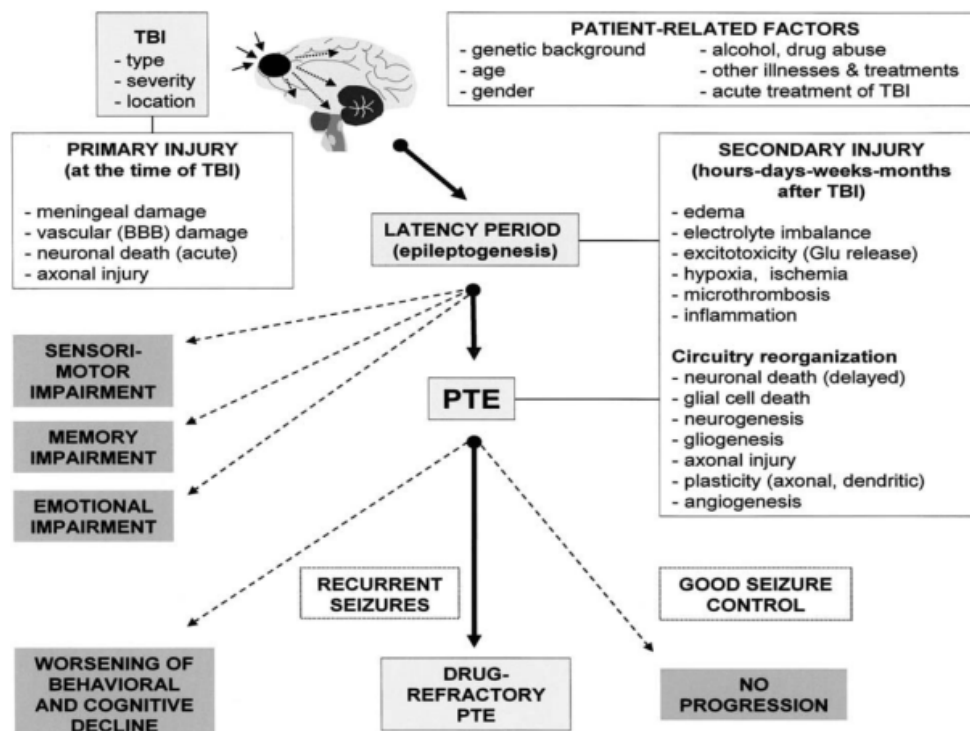


Figura 2. Lo schema riassume le cause che determinano e caratterizzano le epilessie sintomatiche. Sono posti in evidenza i loro principali effetti distinti in acuti e secondari (adattato Pitkanen et al 2007).

Stroke ed Epilessia

Nella popolazione adulta (≥ 60 anni), a seguito di un'ischemia cerebrale circa il 2.3-14% dei pazienti soffre di un attacco epilettico (Burn et al., 1997; Bladin et al., 2000; Camilo & Goldstein 2004; Menon & Shorvon 2009). Come accade per le altre epilessie sintomatiche, anche queste sono distinte tra crisi precoci, quelle che avvengono entro due settimane dal ricovero, e tardive, quelle che avvengono oltre tale periodo (Camilo & Goldstein 2004; Epsztein et al., 2008). Al pari delle altre epilessie post-traumatiche (*traumatic brain injury*, infezioni) i meccanismi patofisiologici che inducono lo scatenarsi delle due tipologie di crisi potrebbero essere differenti, e quindi utili a fini diagnostici. Le prime sono osservate più frequentemente, avvengono nelle prime fasi dell'attacco ischemico, e inoltre tendono a essere focali, brevi e isolate. Potrebbero quindi essere un epifenomeno di un alterato metabolismo indotto da un danno cerebrovascolare locale. Le seconde invece potrebbero essere il risultato di un processo epilettogeno ben più lungo e complesso, che comprende: morte cellulare selettiva, apoptosi, gliosi, *sprouting* di fibre collaterali, e quindi arrangiamento dei circuiti locali spesso accompagnato da modifiche nei recettori sinaptici per esempio quelli GABA-ergici (Stroemer et al., 1995; Alefeld et al., 1998).

Lo sviluppo di un'epilessia acquisita, non è un evento frequente riscontrato negli individui che hanno sofferto un insulto cerebrovascolare (2-39%; Bladin et al., 2000; Lamy et al., 2003; Gupta et al., 1988). Il manifestarsi di una crisi precoce aumenta il rischio di sviluppare crisi tardive di circa otto volte, e di sedici volte la probabilità di sviluppare un'epilessia rispetto ai pazienti che non hanno sofferto di alcuna crisi precoce. (So et al 1996; Lamy et al., 2003).

Vi sono poi dei fattori che aumentano il rischio dello scatenarsi di una crisi epilettica. Se il danno cerebrovascolare si verifica a livello corticale la probabilità è maggiore rispetto a ischemie che avvengono nei nuclei profondi o in strutture infratentoriali (Richardson & Dodge, 1954; Labovitz et al., 2001; Camilo & Goldstein, 2004; Thomas, 1997). Un altro fattore importante è dato dall'estensione del danno, spesso sottostimato, perché se misurato per mezzo della tomografia computerizzata (CT), la penombra non è rilevata. Quest'area, per definizione, è caratterizzata da depolarizzazioni perinfartuali transienti durante i quali si ha un aumento della $[K^+]$ extracellulare e un incremento del rilascio di glutammato. La penombra, quindi, è un territorio che mantiene la capacità di eccitarsi e può quindi essere considerato un potenziale focolaio epilettogeno (Heiss 1992; Luhmann et al., 1995; Buchkremer-Ratzmann et al., 1998).

Se si manifesta uno stato epilettico, che esaspera il fabbisogno energetico dell'area peri-ischemica, si ha un aumento del tasso di mortalità nei pazienti che hanno sofferto di un'ischemia cerebrale. L'uso di farmaci antiepilettici (es. Fenitoina) ha dimostrato avere un effetto non solo sull'incidenza delle crisi, ma anche nell'estensione del danno ischemico e sulla mortalità (Hartings et al., 2003; Williams et al., 2004; Williams et al 2003); Fabricius et al., 2008).

Infine ulteriori studi clinici (Davalos et al., 1988; Bladin et al., 2000) hanno mostrato che nel 19,8% dei pazienti che hanno sofferto un'ischemia emorragica, sono state registrate crisi epilettiche precoci contro il 6,2% di coloro cui era stata diagnosticata un'ischemia occlusiva. Tale effetto peggiorativo, probabilmente è causato da depositi intracerebrali di ferro e dalle proteine seriche rilasciate durante l'emorragia nel tessuto cerebrale.

MODELLI DI EPILESSIA E CRISI EPILETTICA

Lo studio dei meccanismi patofisiologici attraverso l'uso di modelli animali ha permesso di comprendere meglio la genesi di varie patologie. Affinché i modelli siano utili in tal senso, è necessario che rispecchino, in modo affidabile e riproducibile, i vari aspetti aberranti della patologia in questione. Grazie anche allo sviluppo di nuove tecniche molecolari e genetiche questi obiettivi sono divenuti più realistici.

Diversi modelli animali sono utilizzati per indagare i cambiamenti strutturali che prendono atto durante il processo noto come *epilettogenesi*. A tal proposito è necessario distinguere questi

paradigmi, volti a studiare le modificazioni morfo-funzionali, che portano a una condizione patologica permanente, da quelli invece implicati nello studio della genesi di una crisi (*ictogenesi*). Per quanto riguarda i primi, vi sono vari modelli animali che mimano l'epilessia del lobo temporale. Nell'uomo è una delle epilessie parziali farmaco-resistenti più diffuse. La caratteristica essenziale di tali modelli è di presentare crisi epilettiche non indotte nell'immediato da alcuna manipolazione, ma da modificazioni anatomiche e funzionali avvenute dopo un insulto. Questo può essere: i) scatenato a seguito di un'ipossia indotta in epoca perinatale (Kadam et al., 2010); ii) provocato dall'iniezione intraperitoneale (Turski et al., 1984; Fujikawa, 2003; Nadler et al., 1978; Ben-Ari, 1985) o intraippocampale (Longo & Mello, 1998; Raedt et al., 2009; Groticke et al., 2008; Carriero et al., 2012) di acido kainico, agonista dei recettori kainato (recettore ionotropico del glutammato) o di altri convulsivanti.

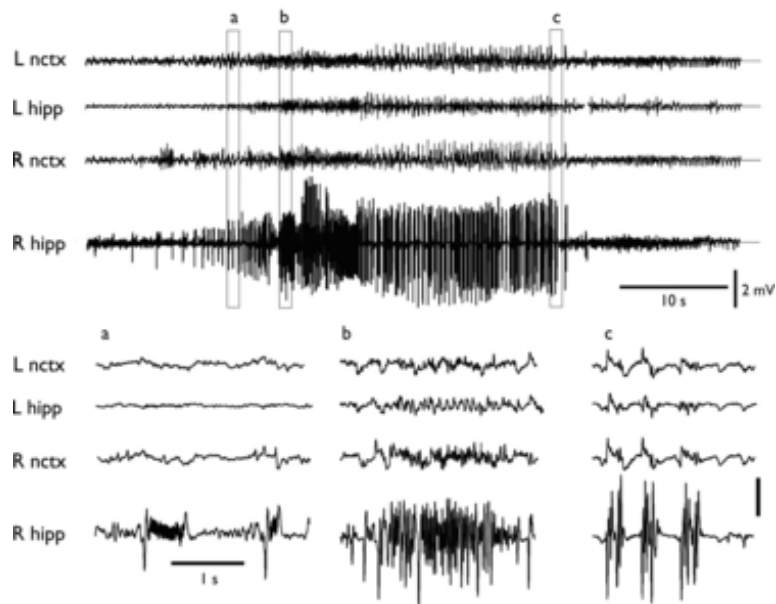


Figura 3. Le registrazioni EEG sono state eseguite su una cavia che ha sviluppato un'epilessia cronica a seguito di un'iniezione di acido kainico intraippocampale. Negli ingrandimenti posti in basso alla figura, sono mostrate le principali fasi (riquadri **a**, **b** e **c**) che contraddistinguono lo svolgersi di una crisi epilettica: l'inizio è dato da un'attività ad alta frequenza e bassa ampiezza (**a**), cui segue un'oscillazione irregolare (**b**) che porta alla conclusione della crisi evidenziata da un'attività a bursts (**c**) (adattato da Carriero et al., 2012).

I differenti approcci prevedono l'induzione di uno stato di male epilettico (SE), caratterizzato da crisi epilettiche sub continue per una durata superiore a due ore. Lo stato epilettico induce morte neuronale, neurogenesi e gliosi (de Lanerolle et al., 1989; Jack et al., 1989; Mello et al., 1993; Kellinghaus et al., 2004; Sloviter & Bumanglag, 2012). Da questa fase inizia il periodo di latenza che può durare vari mesi prima che l'animale cominci a manifestare crisi spontanee, caratterizzate

da tremori iniziali agli arti ed evolvono rapidamente in crisi tonico-cloniche evidenti, che terminano con un periodo di depressione postcritica. Manifestazioni di tali entità, sono difficilmente riscontrabili nel paziente affetto da epilessia del lobo temporale. Di fatto analisi istologiche hanno evidenziato, nell'encefalo degli animali trattati con acido kainico, la presenza di danni in molte strutture cerebrali anche al di fuori dell'ippocampo e delle cortecce paraippocampali (Sloviter 2009). Mentre nell'uomo tale patologia si esprime a livello strutturale con evidenti alterazioni gliotiche a livello dell'ippocampo e a strutture funzionalmente correlate a esso quali il lobo temporale e l'amigdala (Gabriel et al., 2004; Thom et al., 2010).

Episodi ictali possono essere indotti in vivo, attraverso l'uso di pulsali di corrente alternata (AC) ad alta (50-60 Hz) o bassa (3-12 Hz) frequenza dati per pochi secondi. Si possono stimolare con tali protocolli determinate aree cerebrali o a tutto l'encefalo (elettroshock). L'attività elettroencefalografica che si registra è costituita da scariche (*bursts*), indicative di una sincronizzazione parossistica neuronale, chiamate *afterdischarges* (AD). La durata, generalmente di pochi minuti, e la forma di questi AD, dipendono dalla struttura stimolata. Dopo la loro comparsa segue un periodo di depressione (refrattarietà post-ictale) nell'attività EEG (Barton et al., 2001); (Baram et al., 1993). Nell'uomo, questo tipo di elementi elettroencefalografici, sono riscontrabili al termine di una crisi, pertanto tale modello non rappresenta un approccio ottimale per studiare i meccanismi che promuovono l'ictogenesi.

La somministrazione sistemica (sottocutanea, intraperitoneale, intravenosa) di agenti proconvulsivanti è uno dei sistemi più utilizzati per indurre crisi epilettiche. Tra questi, i più diffusi sono rappresentate dai bloccanti dei recettori GABA-ergici: bicucullina, picrotossina, pentilenetetrazolo (Schwartzkroin & Prince, 1980; Hablitz, 1984). Al posto di ridurre l'efficacia inibitoria si può incrementare l'attività dei recettori ionotropici del glutammato, usando degli aminoacidi eccitatori (*Excitatory Amino Acids*, EAA) quali l'acido kainico o l'acido quisqualico (Fisher & Alger, 1984; Thurber et al., 1994). Oppure bloccanti dei canali potassio responsabili della ripolarizzazione delle membrane neuronali: 4-aminopyridine (Brückner et al., 1999; Perrault & Avoli, 1992); e tetraetilammonio (Fueta & Avoli, 1993).

A differenza del modello di shock elettrico, la somministrazione di tali sostanze generalmente induce crisi di tipo tonico o tonico-clonico generalizzate. Inoltre l'uso di EAA comporta anche danni cellulari capaci di provocare uno stato epilettico (SE) grave e duraturo (crisi continua per più di 30 minuti).

Queste metodiche di induzione di crisi, qui brevemente descritte, sono applicate anche in modelli in vitro costituiti da fettine di tessuto cerebrale ottenute dalla neocorteccia o dall'ippocampo. Probabilmente a causa dell'incompleta preservazione delle proiezioni locali, manca il sostrato anatomico capace di generare e sostenere in tutte le sue fasi, una crisi epilettica simile a quelle registrate nel lobo temporale dell'uomo. A tal proposito sono state sviluppate fettine più complesse, le quali preservano la corteccia entorinale, l'ippocampo e le loro interconnessioni (Avoli et al., 2002; Barbarosie & Avoli, 1997; Wozny et al., 2005).

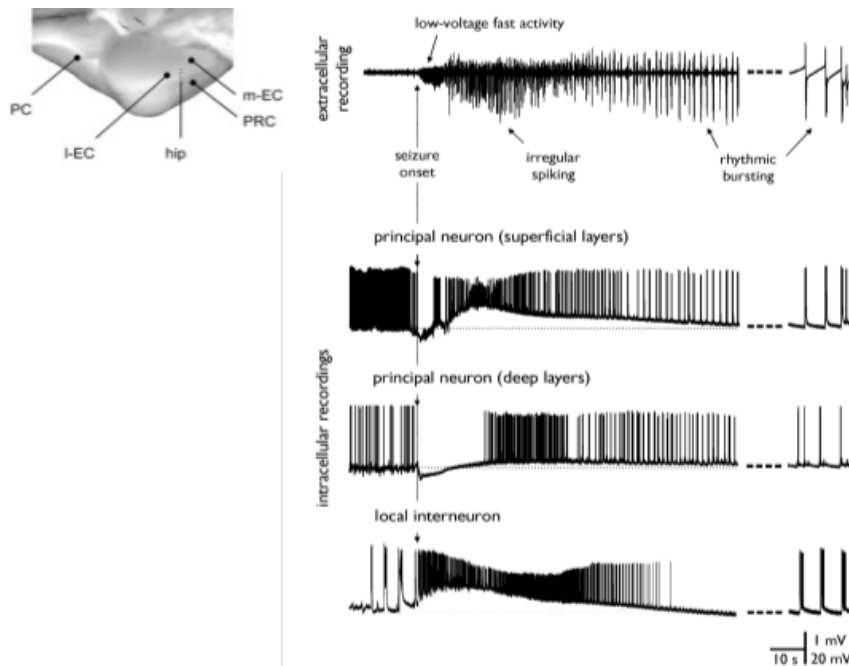


Figura 4. Il modello in vitro del cervello isolato di cavia, è stato ampiamente utilizzato per studiare i fenomeni cellulari e di popolazione che sottendono l'attività inter-ictale ed ictale del lobo temporale. La registrazione extracellulare (in alto) descrive le principali fasi di una crisi epilettica indotta dalla perfusione arteriosa di bicucullina e misurate a livello della corteccia entorinale mediale (**m-EC** nella fotografia posta a sinistra). Le tracce sottostanti sono i correlati cellulari registrati sia da cellule principali poste in diverse laminazioni sia da un interneurone (in basso). Risulta evidente come l'inizio dell'evento ictale, coincida con una riduzione in ampiezza del voltaggio e un aumento nella frequenza dell'attività di popolazione (traccia in alto). Questa è rappresentata dagli interneuroni come dimostra la registrazione intracellulare corrispondente. (adattato da Gnatkovsky, 2008)

Un ulteriore grado di complessità è rappresentato dal cervello isolato di cavia mantenuto in vitro per mezzo della perfusione arteriosa di una soluzione salina complessa. In tale modello, come già sottolineato, viene mantenuta l'integrità dell'unità neurovascolare per diverse ore (de Curtis et al., 1991; Muhlethaler et al., 1993). La soluzione di perfusione può essere arricchita con le stesse sostanze pocanzi descritte, e attraverso diverse tecniche elettrofisiologiche, la comparsa di attività intercritica, preictale e ictale, può essere misurata e seguita nel suo evolversi e nella sua propagazione (de Curtis et al., 1994; Uva 2005; 2008; 2009; Gnatkovsky et al., 2008; Carriero. et al., 2010; de Curtis & Gnatkovsky, 2009).

Modelli ischemici di crisi epilettica ed epilessia

La relazione tra ischemia cerebrale ed epilessia acquisita è stata ben sottolineata in vari studi clinici (Bladin et al., 2000; Camilo e Goldstein, 2004; Hauser, 1997) e in pochi modelli animali (Karhunen et al. 2005). Di fatto nonostante il gran numero di modelli animali d'ischemia (Hossmann, 2008; Durukan et al., 2008), quelli che hanno compiuto anche studi elettrofisiologici (Nallet et al., Mies et al., 1998; Dreier et al., 2011), si sono soffermati a misurare i soli eventi lenti quali le depolarizzazioni ischemiche (ID) e quelle peri-infartuali (PID).

Va inoltre sottolineato che molto spesso le attività epilettiformi precoci hanno un carattere puramente strumentale e quindi non hanno manifestazioni comportamentali evidenti. Queste manifestazioni acute spesso non sono neanche mai state prese in considerazione poiché l'impianto degli elettrodi e l'inizio delle registrazioni era posticipato di parecchie settimane rispetto all'evento ischemico (Karhunen et al., 2007, Karhunen et al., 2003; Kelly et al., 2006). Questi fattori, oltre alla consuetudine di studiare l'epilettogenesi in modelli cronici più assodati e riproducibili (Pitkanen et al. 2007; Mazarati, 2006), hanno fatto sì che lo sviluppo di modelli animali di ictogenesi e epilessia post ischemica, sia stato limitato.

TABLE 1. Occurrence characteristics of epilepsy induced by status epilepticus (SE), traumatic brain injury (TBI), or stroke

	SE	TBI	Stroke	
	Amygdala stimulation	Lateral fluid-percussion	Cortical photothrombosis	Endothelin-1
Duration of latency	1 month	Several months	Several months	Several months
% of rats with seizures	90-100%	50%	20%	8%
Mean seizure frequency	8/day	0.3/day	0.3/day	0.3/day
Maximal seizure frequency	up to 30/day	up to 1/day	up to 5/day	up to 3/day
Mean seizure duration	49 s	104 s	117 s	80 s

Figura 5. Nella tabella riprodotta da Pitkanen A. (2007) vengono riportate la frequenza e le caratteristiche delle crisi epilettiche indotte da insulti cerebrali diversi: stato epilettico (SE), trauma cerebrale (TBI) ed ischemia.

Nello studio dell'ictogenesi indotta da ischemia cerebrale, sono stati presi in considerazione per lo più i seguenti modelli ischemici: i) occlusione intraluminale dell'arteria mediale cerebrale (MCA) e delle carotidi comuni (CCA) transiente o permanente (Hartings et al., 2003; Lu et al., 2001; Kelly et al., 2006); ii) vasospasmo della MCA distale indotto dall'applicazione locale di endotelina-1 (Karhunen et al. 2006) o iii) per mezzo di foto trombosi con Rosa bengala (Kelly et al., 2001; Kharlamov et al., 2003; Barth & Mody, 2011). E' necessario rilevare che molti di questi lavori sono stati svolti utilizzando topi adulti (4-20 mesi). Molti autori hanno di fatto riscontrato che il numero di animali epilettici, indotta da un insulto ischemico, aumenta con l'età (Kharlamov et al., 2003; Kelly, 2004 e 2006; Karhunen H., et al., 2006).

Nei protocolli in cui è stato usato come paradigma l'occlusione transitoria dell'arteria mediale e delle carotidi comuni, nelle due ore successive sono state misurate varie alterazioni epilettiformi

(**crisi precoci**; Hartings et al., 2003; Lu et al., 2001). Queste si sono presentate nell'80% degli animali come crisi generalizzate o ipsilaterali all'arteria occlusa, ma prive di un correlato comportamentale. Nelle ore successive, durante quindi la ri-perfusione, sono state poi osservate: scariche epilettiformi lateralizzate (*periodic lateralized epileptiform discharges*, PLED; Hartings et al., 2003); e un aumento dell'attività delta polimorfa (*polymorphic delta activity*, PDA; (Williams et al., 2003). In questo modello le sole aree della corteccia parietale e dello striato appaiono, all'analisi istologica, nettamente infartuate (Kelly et al., 2006). Il monitoraggio EEG discontinuo per 6-12 mesi ha permesso di individuare un periodo di latenza pari a 2-4 settimane nei modelli di occlusione intraluminale. Al termine dei quali solo i ratti di 20 mesi, trattati e controllo, hanno mostrato brevi crisi motorie ed elettroencefalografiche (Kelly K.M. in *Models of Seizures and Epilepsy* Pitkanen A., Schwartzkroin P.A. e Moshè S.L.; Elsevier Academic Press, 2006).

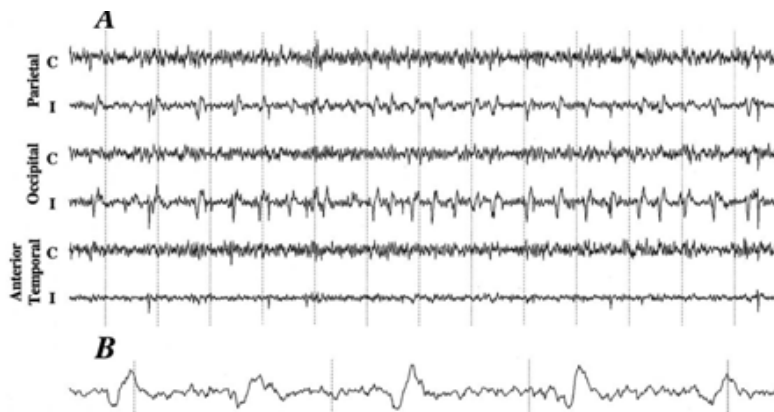


Figura 6. Le registrazioni EEG riportate sono state fatte su un ratto sottoposto a occlusione temporanea della MCA e delle CCA. Le tracce evidenziano la distribuzione, la frequenza e la forma (ingrandimento in B) dell'attività epilettiformi definite PLEDs (vd testo). Queste sono osservate nella sola corteccia perischemica (I= ipsilaterale; C= controlaterale; adattato da Hartings et al., 2003).

L'endotelina-1, il cui effetto è transitorio e dose dipendente, induce un vasospasmo agendo sui recettori ET_A delle cellule muscolari lisce (Macrae et al., 1993; Macrae 1992). L'area infartuata è limitata a quella corticale, e anche in sezioni istologiche prelevate e processate 12 mesi dopo, il trattamento, non hanno evidenziato cambiamenti morfologici a livello dell'ippocampo (morte cellulare e *sprouting*). Come nel modello precedente gli animali (40%) ha sviluppato crisi non convulsive, nelle due ore successive al trattamento (Karhunen et al., 2006). Il periodo di latenza, durato dai 6 mesi ai 12 mesi a seconda della dose di endotelina utilizzata (60 e 120 pmol, rispettivamente), ha portato solo il 3.6% degli animali a produrre crisi epilettiche spontanee.

Una tecnica alternativa all'occlusione dei grossi vasi, MCA e CCA, è rappresentata dall'attivazione di una sostanza fotosensibile (Rosa Bengala), derivato della fluoresceina. Questa, una volta irraggiata, produce dei trombi a livello dei vasi piali e/o delle arteriole terminali. La

lesione corticale che ne consegue è ben definita e riproducibile, ma l'uso del *laser* comporta la formazione di specie radicali, i quali aggrediscono le cellule dell'endotelio causando la formazione di un edema vasogenico (Watson, 1985; Dietrich et al., 1988). Non sono presenti in letteratura fonti che citino una qualche analisi elettrofisiologica nelle immediate fasi successive all'irraggiamento, non si hanno quindi dati relativi alle crisi precoci. Basandosi sull'inizio delle registrazioni EEG, è stato quindi stimato un periodo di latenza di circa 107 giorni (± 32 ; Kharlamov et al., 2003; Karhunen et al., 2007).



Figura 7. Le registrazioni EEG riportate nella figura, sono state eseguite sei mesi dopo l'insulto da fototrombosi. Mostrano una crisi epilettica registrata da elettrodi posti a livello dell'ippocampo ipsilaterale (**ipsi HC**) e della neocorteccia controlaterale (**Contra CX**) al danno ischemico. La durata complessiva dell'evento ictale è di 144 sec., la testa di freccia indica un'ampia spike registrata prima dell'inizio della crisi (vd. I^a freccia a sinistra). Questo è caratterizzato da un'attività spike-and-wave (punta onda) e polyspike. La fine (vd. II^a freccia a destra) segue a una serie di bursts (adattato da Karhunen et al., 2007).

Questa durata sembra essere sovrastimata in quanto Kelly (2001) ha registrato la prima crisi focale dopo 2 mesi dal trattamento. Anche la durata e il tipo di crisi misurata variano confrontando i vari lavori (Kharlamov et al., 2003; Karhunen et al., 2007; Kelly et al., 2001). Questo potrebbe dipendere dall'ampiezza dell'area illuminata dal laser, dall'età e dal tipo di animale (Fisher 344, Sprague Dawley), dalla quantità di rose bengala utilizzato (Karhunen et al., 2005). A differenza dei modelli in precedenza esposti, la frequenza di animali che sviluppano un'epilessia conclamata e cronica è pari al 35-50%, inoltre è stata evidenziata a livello dell'ippocampo la neo-formazione di fibre collaterali provenienti dalle terminazioni delle mossy fibers (*sprouting*, Karhunen et al., 2007). Riguardo alle modifiche anatomiche è necessario sottolineare, che la foto trombosi, proprio perché provocata a livello delle piccole arteriole terminali, induce una modesta area di penombra

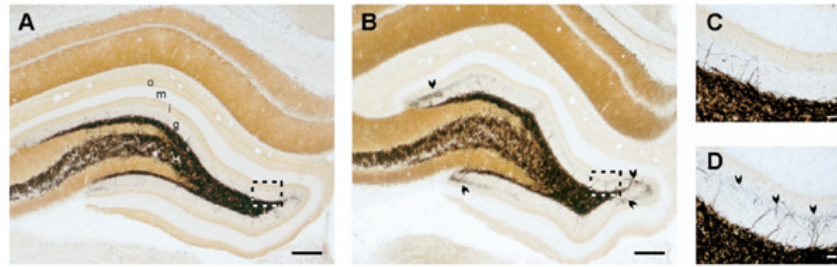


Figura 8. Le sezioni istologiche, processate per la colorazione di Timm, mettono in evidenza le differenze anatomiche tra l'ippocampo di un ratto non epilettico (A) e uno epilettico (B) a seguito dell'occlusione di un arteriola corticale per foto-trombosi. L'insulto ha indotto la neoformazione di fibre collaterali provenienti dal giro dentato (vd punte di freccia nell'ingrandimento D; adattato da Karhunen et al., 2007). Barra di calibrazione 250 μ m.

Le modifiche nell'eccitabilità neuronale sono state valutate anche su fettine corticali ottenute da animali trattati diverse settimane precedenti. In queste condizioni sperimentali l'utilizzo di metodiche più fini, quali registrazioni intracellulari e patch-clamp, ha permesso di analizzare nelle aree peri-ischemiche fenomeni di ipereccitabilità, riduzione dell'efficacia inibitoria, alterazioni nel trasporto di neurotrasmettitori inibitori e nell'espressione dei recettori degli stessi. (Luhmann et al., 1995; Neumann-Haefelin et al., 1995; Allen et al., 2004a; Allen et al., 2004b).

Infine, come descritto nel capitolo concernente l'ischemia cerebrale, a seguito di un'improvvisa e forte riduzione del flusso ematico in un distretto cerebrale, si scatena una pletora di meccanismi patologici reversibili solo se viene compiuta una manovra di riperfusione all'interno delle tre ore dall'evento ischemico. E' ipotizzabile che la perdita dell'omeostasi ionica cellulare e i vari fenomeni di eccitotossicità, conseguenti alle depolarizzazioni ischemiche, siano la causa prima dell'insorgere delle crisi precoci. In Mody I. et al. (2011), le registrazioni elettrofisiologiche sono state eseguite senza alcun filtro (i.e amplificazione in DC). Questo ha permesso di osservare come una breve (7-24 sec.) attività sincrona (30-250 Hz) precedesse le depolarizzazioni peri-infartuali nell'ippocampo. La presenza e la relazione tra attività epilettiforme e PID sono state dimostrate, grazie ad elettrodi epidurali posti sui bordi della lesione, anche in pazienti che avevano sofferto un trauma cranico (Fabricus M. et al., 2008) o di un'emorragia causata da un aneurisma sub aracnoideo (Dreier et al., 2012).

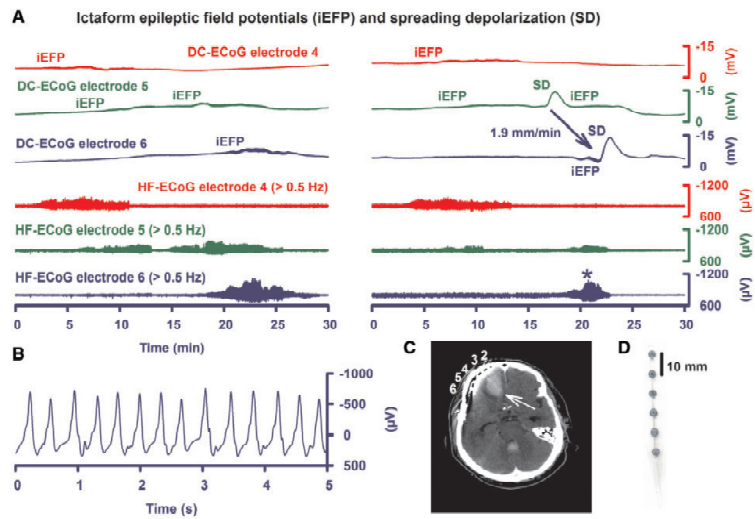


Figura 9. Registrazioni elettrocorticografiche (DC), ottenute per mezzo di elettrodi subdurali (D) posti vicino all'ematoma (freccia in C) provocato da un'emorragia subaracnoidea (area iperintensa nell'immagine di risonanza). Le tracce in alto sono state acquisite in DC, e poi opportunamente filtrate (≥ 0.5 Hz, tracce in basso). Questo ha permesso di osservare in due contatti (5 e 6) due spreading depolarizations (SD), precedute da un'attività epilettiforme (asterisco). Le tracce poste a sinistra fanno riferimento a un altro periodo in cui l'attività critica registrata in tutti e tre gli elettrodi non è preceduta da alcun fenomeno lento. In B un dettaglio dell'attività epilettica (adattato da Dreier et al., 2012)

OBIETTIVI E CARATTERE GENERALE DELLO STUDIO

L'area di penombra ischemica è oggetto di molti studi dal punto di vista terapeutico, in quanto rappresenta la porzione di tessuto cerebrale potenzialmente recuperabile dal punto di vista funzionale. Persistono tuttavia molti quesiti riguardo a quali meccanismi portino a un recupero funzionale attraverso processi di neuro plasticità (Carmichael, 2006; Brown et al., 2010) piuttosto che a una condizione patologica quale l'epilessia. Lo scopo principale di questo lavoro è stato quindi determinare le conseguenze dei soli fenomeni lenti (ID e PID) sulle modifiche dell'eccitabilità del tessuto peri-ischemico, che in ultima analisi potrebbero preludere alla generazione di crisi epilettiche e quindi dare l'inizio ai processi epilettogenici.

Al fine di valutare gli effetti dell'ischemia sull'eccitabilità corticale è stato usato il metodo di occlusione descritto in Pastori et al., 2007 e Breschi et al., 2010. L'uso del cervello isolato di cavia come modello d'ischemia da una parte esclude il possibile contributo dato dagli elementi cellulari e plasmatici del sangue, dall'altra permette una più facile analisi della funzionalità neuronale nell'area ischemica. Possono essere utilizzati più protocolli di stimolazione e osservati più punti di registrazione.

L'area d'interesse è rappresentata dalle corteccie olfattive (corteccia piriforme e tubercolo olfattorio, PC e OT rispettivamente) già attentamente descritte in precedenti lavori (Biella & de Curtis, 1995; Gnatkovsky et al., 2004; Uva et al., 2006; Carriero et al., 2009). Il principale sistema di fibre afferenti è rappresentato dal tratto olfattorio laterale (*lateral olfactory tract*, LOT), il quale origina a livello dei bulbi olfattivi (Haberly & Price, 1978) e proietta sulle principali corteccie olfattive e limbiche. Come la PC, il metabolismo e la funzionalità del LOT è garantito dall'apporto della MCA (Breschi et al., 2010), dato che l'obiettivo del lavoro è stato quello di valutare i cambiamenti dell'eccitabilità nelle fasi acute successive a un'ischemia, si è scelto di non occludere l'arteria mediale, bensì le due arterie cerebrali anteriori (*anterior cerebral arteries*, ACAs). Queste originano dal circolo di Willis, a livello del chiasma ottico, e perfonde le porzioni anteriori e mediali del telencefalo, OT incluso.

MATERIALI E METODI

Gli esperimenti sono stati eseguiti su cervelli di cavie Hartley femmina (150-200 gr.), questi sono stati preparati e mantenuti in vitro secondo la tecnica descritta in Llinas et al., 1981; de Curtis, et al., 1991 e 1998; Muhlethaler et al., 1993. L'animale viene anestetizzato con un'iniezione intraperitoneale di tiopentale sodico (80 mg/kg). Dopo aver raggiunto uno stato profondo di anestesia, si procede alla perfusione intracardiaca per circa 3 minuti di una soluzione salina a 7-8 °C costituita da NaCl 126mM, NaHCO₃ 24.8mM, KH₂PO₄ 1.2mM, MgSO₄ 1.3mM, KCl 3mM, glucosio 15mM, HEPES 2.1mM, CaCl₂ 2.4mM e destrano (PM 70.000) al 3%. La soluzione è ossigenata con una miscela gassosa 95% O₂ e 5% CO₂. Il pH finale, corretto con HCl glaciale, è di 7.1.. Sempre in condizioni di ipotermia si esegue una vasta e delicata craniotomia mediante ossivora, esponendo la porzione dorsale dei bulbi olfattori, la corteccia, il cervelletto, il tronco encefalico e la prima porzione del midollo spinale (fino a C1- C2). Lo strato meningeo viene in seguito rimosso dalla volta dorsale e si scolla delicatamente il cervello dalla base cranica. Si resecano quindi le carotidi e il chiasma ottico, il peduncolo ipofisario insieme alle arterie ipofisarie, i nervi cranici, le arterie vertebrali e i primi nervi spinali.

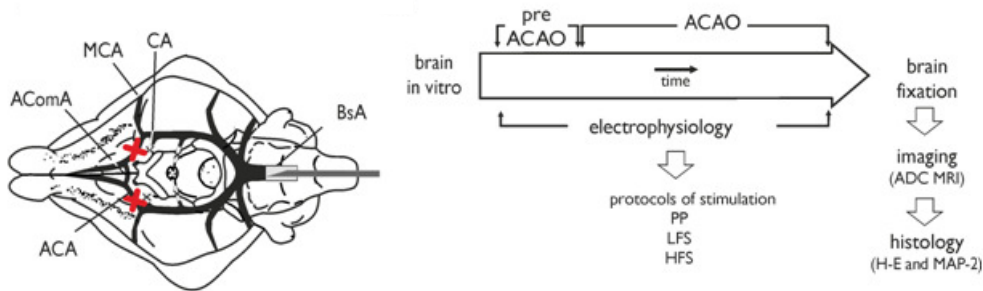


Figura 10. Diagramma del protocollo sperimentale. A sinistra schema della superficie ventrale del cervello di cavia, con indicate alcune arterie che compongono il circolo di Willis (BsA= Arteria basilare; CA= A. carotide; MCA= A. mediale cerebrale; ACA= A. cerebrale anteriore; AComA= A comunicante anteriore). Le due croci rosse apposte su entrambe le ACAs indicano la posizione dei nodini usati per occludere i vasi. A destra viene riportata la sequenza temporale dei protocolli elettrofisiologici eseguiti durante tutta fase in vitro (PP= paired pulse; LFS= low frequency stimulation; HFS= high frequency stimulation), seguiti dalla preparazione del tessuto per le indagini anatomiche in MR e istologiche.

Il cervello così isolato viene posto in una vaschetta termostata, e attraverso una canula in polietilene inserita nell'arteria basilare (Fig.10), vengono chiusi i vasi prima tagliati e ripristinata la perfusione del cervello. Questa viene mantenuta da una pompa peristaltica che immette (7.0 mL/min; Gilson, France) la soluzione salina descritta prima (15°C, pH= 7.3; CO₂-O₂= 5%-95%)La temperatura viene gradualmente (0.5°C/10 min.) aumentata fino a raggiungere 32°C. Il numero di

animali utilizzato e la loro sofferenza è stata ridotta al minimo secondo le vigenti norme internazionali in materia dell'uso di animali da laboratorio. Il protocollo sperimentale è stato vagliato e approvato dal comitato etico dell'Ist. Neurologico C.Besta

PROTOCOLLI DI ISCHEMIA

L'occlusione permanente (2 h) è stata fatta a livello delle due ACAs, in maniera da preservare la funzionalità del LOT. Nella cavia le ACAs originano dal circolo di Willis a livello del chiasma ottico e irrorano l'OT, la corteccia dei cingoli ma non la PC né il LOT. E' stato scelto di occludere entrambe (croci rosse in Fig. 10) le arterie per evitare che l'arteria comunicante anteriore (ACoMA, in Fig. 10) potesse compensare l'occlusione di una delle due ACAs. Il modello d'ischemia, descritto in Pastori. et al., 2007 e Breschi. et al., 2010, ha previsto il posizionamento dei nodini attorno alla porzione prossimale delle arterie appena il cervello raggiunge i 32°C. Dopo aver registrato l'attività neurofisiologica basale per 1 ora, i due nodini sono stati chiusi per mezzo di pinzette chirurgiche. Come controlli sono stati utilizzati 3 cervelli messi *in vitro* e mantenuti per 3 ore ma ai quali non è stata indotta l'ischemia.

PROTOCOLLI DI STIMOLAZIONE

Per valutare l'eccitabilità corticale prima, durante e dopo a un evento ischemico permanente è stato eseguito un protocollo di *paired pulse* (PP). Utilizzando diversi intervalli di tempo tra gli stimoli (20, 40 e 100 msec) sono state misurate le ampiezze della risposta condizionante (I° pulso) e quella condizionata (II° pulso) in modo da valutare l'efficacia sinaptica del circuito corticale osservato nelle varie fasi dell'esperimento (Biella et al., 1995). Tale protocollo di stimolazione è stato usato ogni 15 sec. per i primi 30 minuti precedenti l'ischemia, e ogni 60 sec. per il periodo successivo (Fig. 10). Inoltre, è stato valutato se il territorio peri-ischemico mostrasse una diversa soglia nel generare *after discharges* (ADs) a seguito di una stimolazione tetanica, rispetto ad un tessuto normale. Per tale motivo ogni 30 minuti sono stati dati diversi treni di 10 pulsioni, a bassa (1, 4 Hz; LFS) e ad alta (10, 50 Hz; HFS) frequenza. Ciascun treno è stato ripetuto 6 volte, e nel caso venissero generate scariche epilettiformi, questo veniva interrotto. Gli intervalli tra ciascun gruppo di pulsioni era di: 1 sec, 250 msec, 100 msec e 20 msec, rispettivamente. In una serie di esperimenti preliminari era stato notato che pulsioni dati a 10 Hz a un intervallo di 3 sec. aveva effetti significativi nel generare AD. Per tale motivo dopo 90 e 120 minuti dall'ischemia, e 150 e 180 min dal raggiungimento dei 32°C nei cervelli di controllo, è stato dato anche questo specifico protocollo di stimolazione.

REGISTRAZIONI ELETTROFISIOLOGICHE

Le registrazioni extracellulari sono state eseguite per mezzo con microcapillari di vetro riempiti con NaCl 0.9% (154 mM) a bassa resistenza (5-8 μ m diametro delle punte; 5-10 M Ω). Questi microelettrodi sono stati posti a livello della corteccia piriforme (PC) e in tre diverse posizioni del tubercolo olfattorio (OT): laterale, interno e mediale (lat-OT, int-OT e med-OT rispettivamente, Fig.14A e 16A). La distanza relativa tra le punte era di 1 mm lungo l'asse latero-mediale, ed è stata mantenuta in tutti gli esperimenti usando come punti di riferimento specifiche strutture anatomiche: il chiasma ottico, i bulbi olfattori e il tratto laterale olfattorio (LOT).

I potenziali di campo (*field potentials*, FP) sono stati evocati stimolando il LOT per mezzo di un elettrodo stimolante bipolare posto a contatto del LOT stesso. Le risposte sono state evocate nella fase pre-ischemica, ischemica e post-ischemica (Fig. 10). Queste, insieme ai FP, sono stati acquisiti in DC e amplificate attraverso un amplificatore differenziale multicanale (Biomedical Engineering, Thornwood, NY, USA). I segnali analogici sono quindi stati digitalizzati attraverso una scheda A/D (AT-MIO-64E3 National Instrument, Milan, Italy) e analizzati con un software scritto in LabView dal Dr Gnatkovsky V.

Analisi dati elettrofisiologici

Le modifiche dei FP registrati nel corso dell'esperimento sono state valutate comparando l'ampiezza della risposta disinnaptica (Biella et al., 1995; Suzuki et al., 2012) registrata in condizioni di controllo, 1 e 2 ore dopo l'occlusione delle ACAs (vd. Risultati e Fig.16). Per compiere tale analisi la risposta monosinaptica di ciascun FP evocato è stata normalizzata, e dopo averne allineate 3 all'artefatto di stimolo (Fig. 16A), ne è stato quantificato il loro valore medio (\pm SEM; Fig. 16b).

Nel descrivere i parametri delle depolarizzazioni peri-infartuali (PID, asterisco in Fig.14B) e le oscillazioni lente (stella in Fig. 14B) del potenziale extracellulare (*very slow shifts*, VSS) è stato considerato come punto di inizio la caduta del potenziale di campo (vd asterisco in Fig. 14B). La loro durata è stata stimata considerando come punto di fine, il recupero del 90% del potenziale (mV) registrato prima dell'evento lento. Il valore dell'ampiezza di tali eventi è stato determinato misurando il valore minimo (mV) raggiunto.

RISONANZA MAGNETICA

Prima di essere tagliati e processati per lo studio neuroanatomico, i cervelli sono stati fissati per immersione (n= 12), o perfusione (n=3), in una soluzione tamponata di paraformaldeide al 4%

(Phosphate Buffer 0.1 M; pH= 7.4). I cervelli sono stati posizionati in una *falcon* (50 mL) e adeguatamente bloccati, in modo da evitare oscillazioni durante l'acquisizione delle immagini in MR. A questo proposito è stato utilizzato uno spettrometro RM Bruker (BIOSPEC 70/30 USR; Ettlingen, Germany) da 7T (30 cm. bore), dotato di un sistema di gradienti schermato e una bobina di superficie per la trasmissione e la ricezione di radiofrequenze. L'uso di preparati fissati in MRI permette di fare lunghe acquisizioni, senza artefatti di movimento, e quindi aver una miglior risoluzione delle strutture anatomiche. Le misure del coefficiente di diffusione apparente (*apparent diffusion coefficient*, ADC) in cervelli fissati in paraformaldeide, sono caratterizzate da un valore assoluto più basso (D'Arcueil et al., 2007) rispetto a quelle rilevate *in vivo*. Ma le differenze relative di tale coefficiente, tra le aree ischemiche e non, permangono (Zucca et al., 2009; Breschi et al., 2010). L'immagine di riferimento utile alla corretta localizzazione del campione è stata ottenuta con una sequenza: "3-orthogonal plane gradient echo triplot". Una volta localizzata la zona d'interesse, corrispondente a quella dove si è focalizzata l'indagine elettrofisiologica (Fig. 14A), sono state scelte diverse sezioni coronali disposte in successione rostro-caudale. Di queste sono state acquisite prima, le immagini pesate in T2 (RARE factor: 8, TE= 39 ms, TR= 4000, inter echo time= 13 ms, FOV= 3x3 cm², data matrix 256 x 256, slice thickness= 1 mm) necessarie a visualizzare dettagli morfologici e a scegliere i piani anatomici (n= 15) sui quali calcolare il coefficiente di diffusione. Dopo, quelle pesate in diffusione (*diffusion weighted images*, DWI), ottenute con una sequenza spin-echo (TE= 40 ms, TR= 7.5 sec), N.A.= 1, ore di acquisizione= 12, spessore della sezione= 1mm; F.O.V.= 3x3 cm², matrice 128x128, plane resolution= 234x234 μm²; parametri di diffusione: δ= 12 ms, Δ= 22 ms, numero delle direzioni di diffusione= 6, numero delle immagini A₀= 5, 7 b-valori (800, 1500, 2000, 2500, 3000, 3300, 3500 s/mm²). Infine dalle immagini di riferimento (A₀) e da quelle di diffusione sono state computeate, mediante la supervisione della Dott.ssa Ileana Zucca e il Dr. Alfonso Mastropietro, le mappe parametriche del tensore di diffusione (TrD) utilizzando il software Paravision 5.0 (Bruker, Ettlingen, Germany).

Analisi delle immagini di risonanza

Al fine di misurare il valore di TrD, sono state selezionate sulle mappe parametriche alcune regioni di interesse (*region of interest*, ROI) di 400 μm di diametro. Il valor medio di TrD è stato calcolato in aree ischemiche e di controllo (Fig. 13A). Sono poi state confrontate tra loro e condotta un'analisi della varianza (ANOVA), la cui significatività statistica è stata verificata tramite il test di Tukey (Fig. 13B).

IMMUNOISTOCHEMICA E COLORAZIONI ISTOLOGICHE

Al termine delle acquisizioni in MR i cervelli sono stati inclusi in paraffina e preparate al microtomo sezioni da 5 μm . Queste sono state scelte tra il livello stereotassico posto a 14.6 mm (anteriore) e 13.6 mm (posteriore) dal bregma secondo l'atlante stereotassico del cervello di cavia (Fig. 12; Luparello, 1967). Le sezioni sono quindi state fatte reagire contro la proteina MAP-2 (*microtubule associated protein 2*, Breschi et al., 2010; Pastori et al., 2007) e colorate con l'ematossilina-eosina in modo alternato. Le immagini dei preparati istologici sono state acquisite per mezzo di un sistema digitale (ScanScope CS Aperio; Nikon, Florence, Italy) per ulteriori analisi

Microtubule-associated protein - MAP-2

Per evidenziare il danno neuronale è stata ricercata l'espressione di una proteina ancillare dei microtubuli (MAP-2 Microtubule Associate Protein). Le sezioni in free-floating sono state scelte in base alla presenza della lesione in corrispondenza dell'area di elettrocoagulazione che identifica l'emisfero opposto a quello dal quale si è registrato. In questo modo sono state studiate le fettine corrispondenti alle aree di cui era stata registrata la funzionalità cerebrale (Fig. 11A, B e 12A). Dopo esser state incubate in H_2O_2 (1%) diluita in PB per 10 minuti al fine di inattivare le perossidasi endogene, le sezioni sono state messe in una soluzione contenente NHS (Normal Horse Serum) al 10% e Tritonx-100 0.2% diluiti in PBS per 5 ore. In seguito le sezioni sono state lasciate una notte a temperatura di 4.0° C con l'anticorpo primario monoclonale di topo anti-MAP2 (Bio-Optica, Fremont, CA, USA) diluito 1:1000 in 1% NHS.

Al fine di rilevare il legame antigene anticorpo primario, le sezioni sono state incubate per 75 minuti in un anticorpo secondario prodotto in cavallo anti-topo biotilinato (1:200, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) diluiti in NHS 1%. E' stato poi eseguito il protocollo dell'avidina-biotina (1:2000, ABC kit Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) perossidasi per 75 min. Come cromogeno è stata utilizzata la 3,3'diaminobenzidina tetraidrocloruro (DAB; Sigma, St.Louis, MO,USA) 0,075% in tampone Tris-HCl 0.05 M, ph 7.3, con aggiunta di H_2O_2 (0.02%). La DAB una volta ossidata dall'enzima perossidasi, dimerizza, formando precipitati marroni.

In esperimenti precedenti era stata verificata la specificità dell'anticorpo anti-MAP-2, omettendo l'anticorpo primario, e non era stata evidenziata alcuna colorazione anche quando è stato utilizzato un siero normale (BSA, 1:100).

Al fine di valutare l'estensione del danno ischemico, sono state scelte, e acquisite per mezzo di un sistema digitale (ScanScope CS Aperio; Nikon), sezioni corrispondenti alle immagini coronali acquisite con la MR. Le immagini digitali sono state prima convertite in immagini in scala di

grigio (8 bytes), e quindi una volta normalizzati i valori di grigio corrispondenti alle aree preservate, le aree ischemiche sono state delineate per sottrazione (Fig.12B).

Ematossilina-eosina

Il medesimo campione utilizzato per la reazione di immunostochimica, è stato utilizzato per ottenere sezioni sottili (5 µm) al microtomo. A tale scopo i preparati sono stati lavati in acqua corrente e disidratati in una scala ascendente di alcoli (70-80-90-95-100% due cambi almeno di tre ore ciascuno), in cloroformio e inclusi in paraffina. Sono state quindi ottenute al microtomo sezioni rostro caudali delle cortecce olfattive attigue a quelle immunoreagite contro la MAP-2, raccolte su vetrini, e colorate con ematossilina eosina (*Hematoxylin and eosine*, H&E).

RISULTATI

Le registrazioni elettrofisiologiche sono state condotte per tutto l'esperimento: prima, durante e dopo l'occlusione delle ACAs. Al termine, una volta fissati i cervelli, questi sono stati utilizzati per acquisire le immagini di risonanza e infine processati per le colorazioni istologiche e le reazioni di immunostochimica (Fig. 10).

DEFINIZIONE ISTOLOGICA E ANATOMICA (MR) DELLE AREE ISCHEMICHE

L'estensione dell'area ischemica è stata quindi valutata confrontando le informazioni ottenute dall'analisi istologica con quella fornita dall'MRi. L'area infartuata, che comprende la regione ventro-mediale del nucleo accumbens (*shell of nucleus accumbens*, SNA) e la corteccia dei cingoli, è caratterizzata dall'assenza di segnale nelle sezioni immunistologiche (Fig. 11A e 12A). La riproducibilità dell'area danneggiata dall'occlusione delle ACAs è illustrata nella Fig. 11, dove sono state sovrapposte le aree ischemiche delineate da fettine preparate da sette diversi esperimenti.

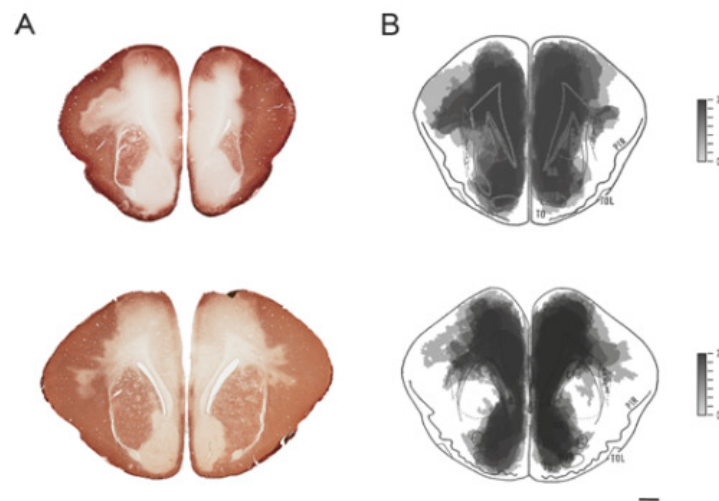


Figura 11. (A) Immagini a bassa risoluzione di due sezioni immunostochimiche (MAP-2), ottenute da piani stereotassici diversi. Barra di calibrazione= 1 mm. (B) Ricostruzione e sovrapposizione delle aree prive di segnale MAP-2, ricavate da diverse sezioni (n° esperimenti = 7) tutte ottenute al medesimo piano coronale dei riferimenti in (A). L'intensità di grigio (vd scala a fianco) indica il numero di sovrapposizioni. L'area più scura rappresenta l'estensione media del core ischemico nei diversi esperimenti.

Le immagini parametriche del tensore (TrD), hanno permesso di valutare il danno cellulare (Breschi et al., 2010).

Nelle corrispondenti sezioni colorate con l'H&E, le stesse strutture presentano un parenchima vacuolizzato e ricco di cellule eosinofile, raggrinzite e dal soma triangolare (H&E in Fig. 12B e H). Le regioni circostanti, la PC e l'OT superficiale quindi, appaiono preservate dal punto di vista strutturale, di fatto il segnale immunocistochimico e la colorazione istologica sono inalterate (Fig. 12D e G).

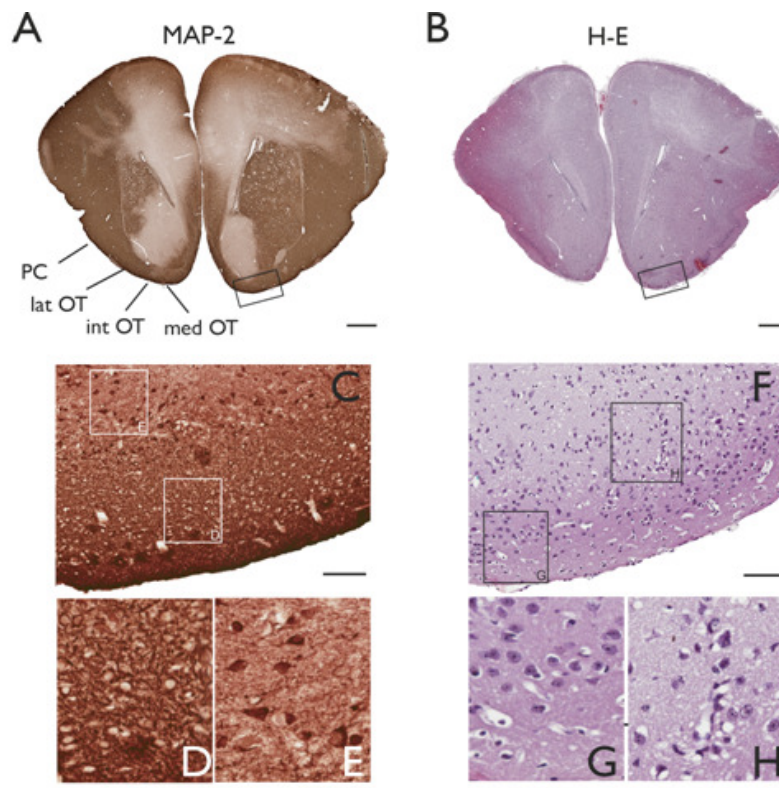


Figura 11. Modifiche strutturali successive all'occlusione delle ACAs. In alto (A) fotomicrografia di una sezione immunoreagita contro la MAP-2, l'area ischemica appare chiara e centrale (PC= corteccia piriforme; OT= tubercolo olfattorio laterale, interno e mediale). A fianco (B) la sezione attigua alla precedente ma colorata con H&E. (C, F) Ingrandimenti del OT mediale. (D, E) Dettagli del OT mediale nei quali sono visibili neuroni normali e un neuropilo fitto (D). In (E) invece le cellule appaiono intensamente marcate al bordo della regione ischemica. Nelle sezioni colorate con H&E gli strati superficiali del med-OT, appaiono normalmente colorati (G), mentre gli strati più profondi, prossimi alla SNA, sono presenti neuroni eosinofili e raggrinziti, immersi in un neuropilo spongiforme (H). Barre di calibrazione 1 mm in A e B; 100 μ m nelle restanti immagini

Gli strati più profondi del tubercolo olfattorio mediale, quelli che limitano l'area ischemica propriamente detta, sono costellati da neuroni, i quali presentano una colorazione iperintensa a livello dei soma e dendriti prossimali (pannello di destra nella Fig. 12E). Questo, come descritto in Breschi (2010) e Pastori (2007), è un segno distintivo della penombra

Le ROI sono state quindi posizionate nel SNA (*core* ischemico) e sulle cortecce dalle quali sono state eseguite le registrazioni elettrofisiologiche (PC e med-OT; Fig 13A). Dopo 2 ore di ischemia, il valore di (TrD) misurato è significativamente ridotto in SNA rispetto a quanto riscontrato nelle cortecce olfattive (Fig. 13B; $p \leq 0.005$, Tukey test; $n = 9$). Tra la PC e med-OT non vi è invece alcuna differenza in termini di coefficiente di diffusione (Fig. 13B). Infine le aree caratterizzate da un segnale MR ipointenso (*core* ischemico), si sovrappongono alle zone prive di immunoreattività (Fig. 11A e 12A).

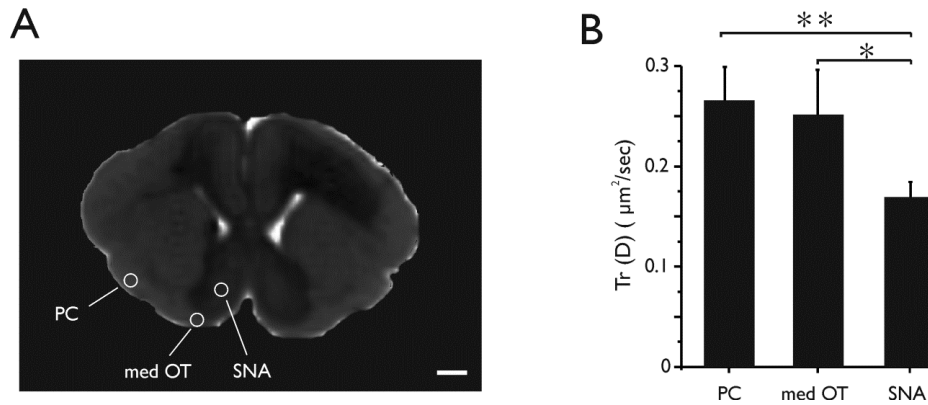


Figura 13. Le aree ipointense visibili nelle immagini di MR (A) corrispondenti alle sezioni istologiche (vd Fig. 11), hanno identificato l'area ischemica. I cerchi bianchi identificano la posizione delle ROI utilizzate a quantificare il valor medio del TrD nei diversi esperimenti. Barra di calibrazione: 1 mm. Nell'istogramma a fianco(B), sono confrontati tali valori ($\pm SD$, $n = 9$) misurati nelle diverse strutture. L'asterisco denota una differenza statisticamente significativa.

CORRELATI ELETTROFISIOLOGICI DELL'AREA DI PENOMBRA

A seguito dell'evento ischemico sono state registrate due diverse tipologie di depolarizzazioni extracellulari: le depolarizzazioni peri-infartuali (PID; vd. asterischi in Fig. 14B), e i *very slow shifts* (VSS; vd. stelle in Fig.14B). I primi sono eventi del tipo tutto o nulla, consistono in rapide e transitorie cadute del potenziale extracellulare, la cui durata è riproducibile (in PC= 5.77 ± 0.77 min; in lat-OT= 4.33 ± 0.53 min.; Figs. 14B e 15C), e si propagano al tessuto circostante a una velocità di 0.75 mm/min (Breschi et al., 2010). I VSS invece sono caratterizzati da una caduta di potenziale molto lenta, che propaga a 0.33 mm/min, ma che non torna al potenziale DC iniziale.

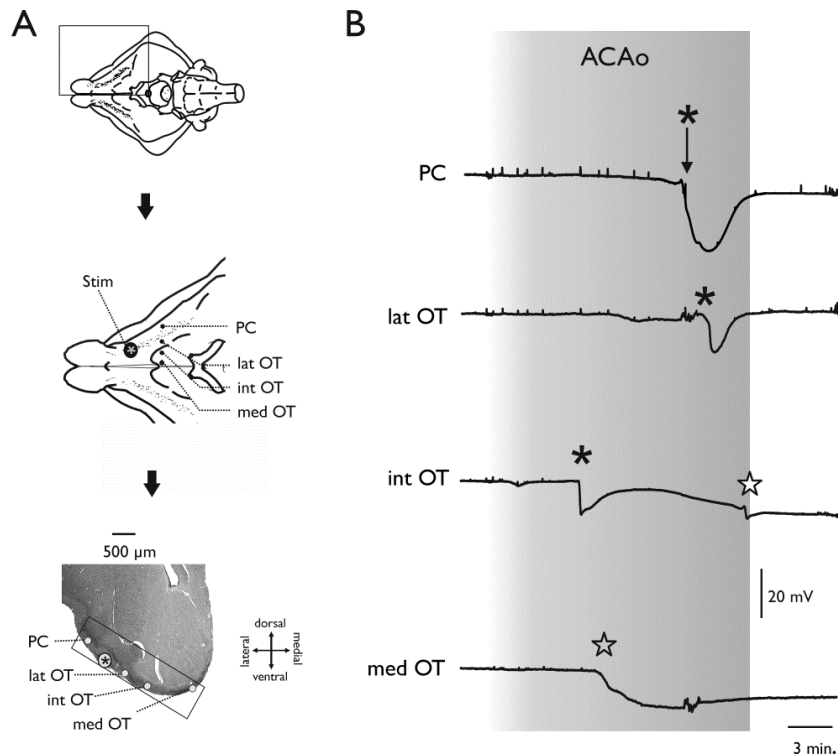


Figura 14. Eventi elettrofisiologici successivi all'occlusione delle ACAs. In (A) la posizione degli elettrodi registranti e stimolanti (Stim.) è evidenziata sulla superficie ventrale del cervello di cavia. Questi sono poi riportati sulla sezione istologica (H&E) sottostante. In (B) sono raffigurate le diverse oscillazioni lente del FP registrate nelle diverse cortecce a seguito dell'evento ischemico (area ombreggiata.). L'inizio delle PID e dei VSS sono indicati da asterischi e stelline rispettivamente.

Entrambi i fenomeni non si sono mai ripetuti all'interno dello stesso esperimento. Inoltre VSSs sono stati osservati più frequentemente nella porzione mediale dell'OT, mentre le PIDs nella PC e nel lat-OT (Fig. 14B e 15A). Solo in un caso, a livello dell'int-OT, è stata registrata una PID (inizio= 4.9 min; ampiezza= 17.7mV; durata= 3.5 min.; vd. Asterisco in Fig.14). Dopo

l'occlusione dei vasi, le PID sono comparse più tardivamente rispetto ai VSS (PC= 11.13 \pm 3.13 min; lat-OT= 12.81 \pm 5.11 min; vs. int-OT= 6.48 \pm 0.3 min, med-OT= 3.36 \pm 0.7 min; Fig. 15A). Anche l'ampiezza massima dell'oscillazione è un elemento distintivo tra i due eventi. Nelle PID è stato calcolato un valore mediamente maggiore (PC= 17.66 \pm 3.74 mV; lat-OT= 14.89 \pm 4.37 mV) rispetto a quello osservato nei VSS (int-OT= 10.33 \pm 3.47 mV, med-OT= 6.76 \pm 2.4 mV; Fig. 15B). La scomparsa dei potenziali evocati solo durante le PID, ma non i VSS, potrebbe indicare una differenza nei meccanismi che sottostanno a questi eventi. L'incapacità delle cellule di rispondere ad uno stimolo elettrico è anche distintivo delle *spreading depressions* (SDs, Herreras e Somjen, 1993; Canals et al., 2005). Nell'80% degli esperimenti, vi è stata solo una transiente riduzione (ca. 50%) nell'ampiezza dei FP, durante i VSS (dati non mostrati).

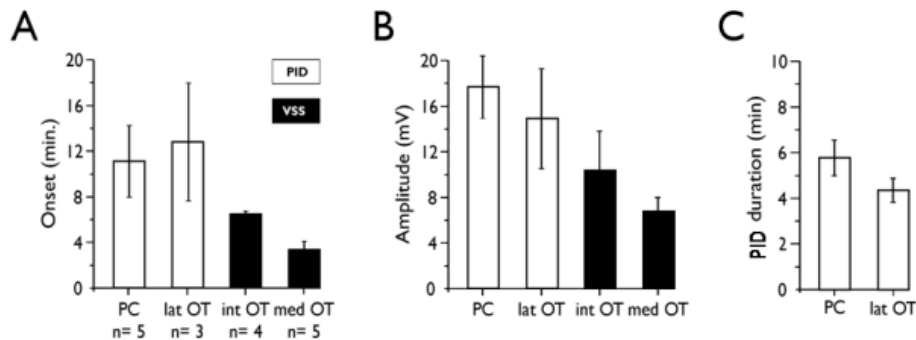


Figura 15. In **A**, **B** e **C** sono quantificate le varie caratteristiche che differenziano i due fenomeni lenti osservati, PIDs e VSS. L'inizio (onset), la durata e l'ampiezza delle oscillazioni sono calcolate prendendo come riferimento la caduta netta del potenziale di campo. I loro valori medi (\pm SEM) sono quindi distinti in base al sito di registrazione.

MODULAZIONE DELL'ECCITABILITÀ NEURONALE NELL'AREA DI PENOMBRA

Le registrazioni, eseguite in continuo, hanno permesso di monitorare e studiare anche i cambi nell'eccitabilità nelle cortecce olfattive (PC e OT) nelle fasi acute post ischemiche. È stato quindi usato come paradigma sperimentale il *paired pulse* (PP) per determinare eventuali cambiamenti nei circuiti inibitori determinati dall'occlusione delle ACAs. Nelle cortecce olfattive, le risposte evocate stimolando il LOT, sono caratterizzate da un potenziale monosinaptico (latenze dall'artefatto del secondo stimolo: PC= 7 \pm 0.8 msec; lat-OT= 7.0 \pm 1.8 msec; med-OT= 9.4 \pm 2.6 msec) seguito da una componente disinaptica (latenze dall'artefatto del secondo stimolo: PC= 15.4 \pm 1.3 msec; lat-OT= 14.8 \pm 1.7 msec; med-OT= 18 \pm 2.3 msec). L'ampiezza di quest'ultima dipende sia dall'intensità dell'input monosinaptico sia dall'efficacia di proiezioni inibitorie ricorrenti (Tseng & Haberly, 1988; Biella & de Curtis, 1995; Carriero et al., 2009). Intervalli di tempo tra i

due stimoli, inferiori a 70 msec, evidenziano l'input inibitorio nella risposta condizionata nella PC (Biella e de Curtis, 1995). Per poter misurare il solo effetto dell'attività inibitoria sulla risposta disinaptica, i valori (mV) del potenziale condizionato, sono stati normalizzati (vd. FP riportati in Fig.16A). Il rapporto percentuale tra il valore medio (n= 3) delle risposte associative, misurato in diverse fasi del periodo post-ischemico (60 min e 120 min) e il valor medio (n= 3) di riferimento, calcolato nel periodo pre ischemico, ha permesso quantificare le variazioni nell'efficacia dell'input inibitorio nei diversi siti di registrazione (Fig.16A e B).

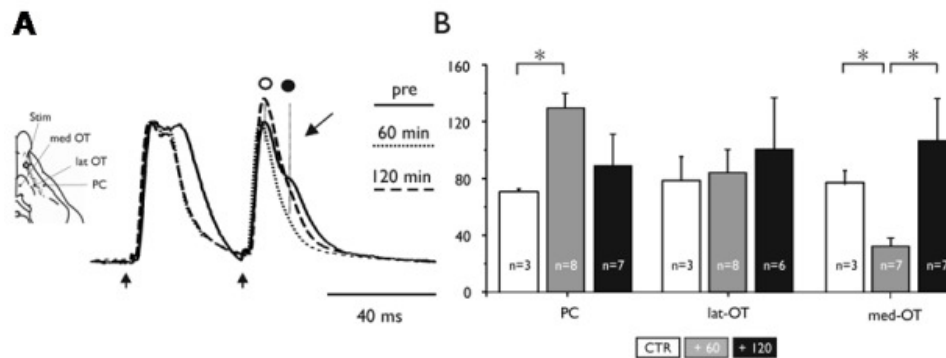


Figura 16. Modolazione dei potenziali sinaptici evocati nei tessuti peri ischemici. La posizione degli elettrodi registranti sulla superficie ventrale del cervello è indicata nello schema posto a sinistra in A. A fianco le tracce normalizzate rappresentano il valor medio (n= 3) delle risposte evocate in PC da uno stimolo appaiato (paired pulse). Queste sono state registrate in tre momenti diversi (prima, 60 min. e 120 min dopo l'occlusione delle ACAs). Il pallino nero e quello bianco rappresentano le componenti mono e di-sinaptica della risposta condizionata. In B l'istogramma riporta i valori medi (\pm SEM) percentuali del potenziale associativo misurato in PC, lat-OT e med-OT nei diversi periodi post-ischemici. Nei cervelli di controllo, il medesimo rapporto (barre bianche) è stato calcolato dopo 120 min dal raggiungimento dei 32°C (vd. risultati)

La stessa metodica è stata applicata ai potenziali registrati nei cervelli di controllo (n= 3), usando come valori di riferimento la media dei potenziali registrati a un'ora dal raggiungimento dei 32 °C (vd Materiali e metodi), e di confronto la media dei valori misurati 60 min. dopo.

L'analisi statistica ha mostrato un aumento transiente delle risposte disinaptiche registrate a 60 min.(colonne grigie nell'istogramma di Fig. 16B) dall'occlusione nella PC (n= 8) rispetto ai controlli (n= 3; Fig. 16B). Questa riduzione nell'input inibitorio non è però stato osservato in lat-OT (n= 8). Il tubercolo mediale, nello stesso periodo, ha mostrato una riduzione significativa del rapporto, ovvero un aumento dell'efficacia inibitoria (unpaired *t-test*, $p \leq 0.05$; Fig. 16B). Dopo 120 minuti (colonne nere in Fig. 16B) i valori del rapporto tra risposta condizionata pre- e post-ischemica, sono tornati ad essere equiparabili (unpaired *t-test* ≥ 0.05).

In seguito all'ischemia cerebrale non è mai stata registrata alcuna attività interictale né ictale nelle corteccie olfattive. Sono stati quindi usati due protocolli di stimolazione a bassa (LFS) e alta (HFS)

frequenza per verificare se il tessuto peri-ischemico risultasse più propenso a sviluppare un'attività epilettiforme rispetto a condizioni sperimentali di controllo. I treni di pulsanti dati a 1, 4, 10 e 50 Hz, non sono stati in grado di indurre AD, neanche dopo 2 ore dall'occlusione.

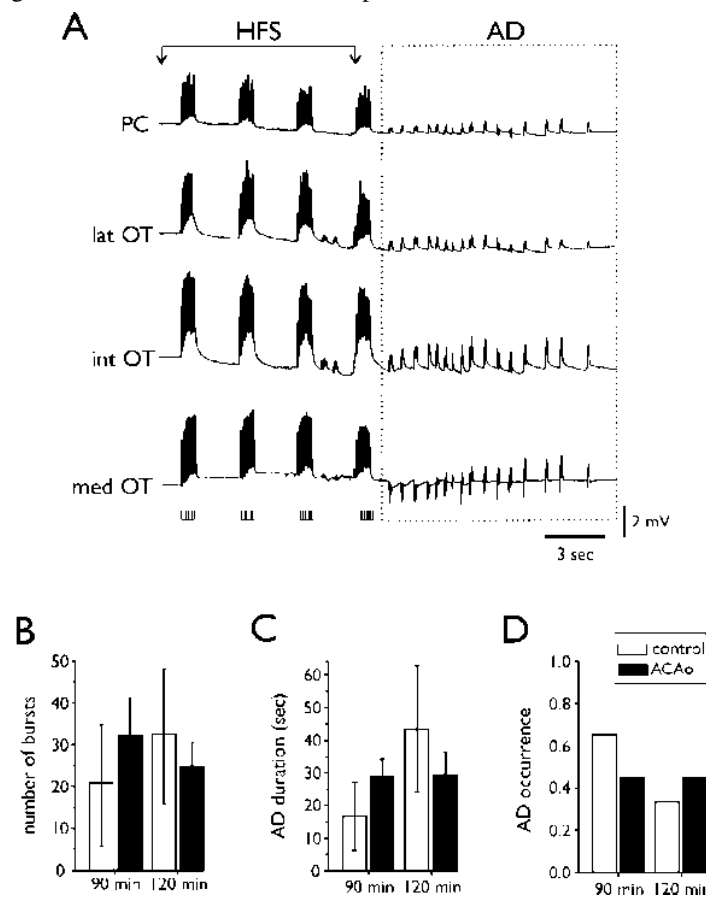


Figura 17. Caratteristiche dell'attività epilettiforme evocata durante l'evento ischemico. (A) L'attività sincrona (AD) evocata da treni di pulsanti a 10 Hz dati ogni 3 sec (HFS), è organizzata a bursts. I grafici a barre (B, C) riportano il numero medio (\pm SEM) e il loro decorso temporale. In D invece è rappresentata la frequenza con cui gli AD sono stati registrati a 90 e 120 min dall'ischemia.

Quando il LOT è stato stimolato con treni di 10 Hz separati da 3 sec., è stata frequentemente registrata un'attività polimorfica organizzata a *bursts* sia a livello della PC che di tutto il tubercolo, sia nei cervelli di controllo (Fig. 17A). Sono state misurate diverse caratteristiche che descrivono questi AD, nei cervelli trattati ($n=9$), prima e dopo l'ischemia, e in quelli di controllo ($n=3$) dopo 90 e 120 min dal raggiungimento dei 32°C. La frequenza e la durata di questi AD non sono risultate significativamente diverse (unpaired *t-test*; $p \geq 0.05$) tra i vari gruppi considerati e punti di registrazione (Fig. 17C e D), così anche il numero di *bursts* (Fig. 17B) che compone ciascun AD.

DISCUSSIONE

In questo lavoro sono stati descritti i cambiamenti nell'eccitabilità conseguenti ad un insulto ischemico indotto nel modello del cervello isolato di cavia. In queste condizioni sperimentali, sono quindi esclusi per definizione, variabili sistemiche o complicazioni di tipo emorragico. Il danno provocato dall'occlusione delle arterie cerebrali anteriori è riproducibile, e coinvolge strutture profonde quali il nucleo accumbens, nella sua porzione ventrale, e la corteccia dei cingoli. In queste aree sono state osservate, per mezzo della MR, modificazioni strutturali confermate poi dalle sezioni istologiche. Queste hanno presentato le tipiche caratteristiche che definiscono il *core* ischemico (Dijkhuizen et al., 1999; Lipton, 1999; Pastori et al., 2007; Breschi et al., 2010). E sono: la presenza di un neuropilo dall'aspetto spongioso, di cellule dall'aspetto raggrinzito e ipercromico, la mancanza di immunoreattività contro la proteina MAP-2. Al limitare di quest'area, verso gli strati profondi dell'OT mediale, così come tra la corteccia dei cingoli e quella somatoestesica, invece sono state osservate cellule intensamente reattive contro la MAP-2 a livello del soma e dei dendriti prossimali, ma prive di vacuoli intorno (Pettigrew et al., 1996; Breschi et al., 2010). Le restanti parti del tubercolo e la corteccia piriforme sono risultate preservate dal punto di vista strutturale. Sulla base quindi dei dati morfologici e di *imaging*, è stato quindi concluso che le aree olfattorie considerate in questo lavoro rappresentano la regione di penombra ischemica.

Le arterie cerebrali anteriori perfondono l'OT, ma nonostante ciò questa regione, nei nostri esperimenti, non ha presentato danni evidenti ischemici. Questo può essere dovuto alla presenza di anastomosi presenti tra i vasi leptomeningei, l'arteria cerebrale media e quelle anteriori (Brozic et al., 2003). Attraverso questi rami collaterali il flusso sanguigno può muoversi in entrambe le direzioni secondo le richieste metaboliche di ciascun territorio vascolare (Shih et al., 2009). In studi fatti sui primati (Schwartz e Pile-Spellman, 2011) sono state evidenziate, tramite MRI, solo piccole aree corticali ischemiche a seguito dell'occlusione dell'ACA. E' stata suggerita, come ipotesi, la possibilità che questa rete anastomotica, rappresentata da vasi piali, abbia potuto vicariare la mancata perfusione da parte del vaso ischemico e quindi ridurre il danno cellulare.

Le PIDs possono essere indotte da diversi stimoli nocivi, sia meccanici che chimici. Le lente oscillazioni del potenziale extracellulare che si generano in seguito, sono sostenute dalla netta depolarizzazione delle membrane cellulari, neuronali e gliali (Somjen, 2004). Se il tessuto cerebrale non è in grado di restaurare i gradienti ionici tipici delle cellule, le PIDs evolvono in depolarizzazioni ischemiche persistenti (Mies et al., 1993; Hossmann, 1996; Dreier, 2011). La regione di penombra e quella di *core*, possono essere differenziate dal punto di vista elettrofisiologico (Breschi et al., 2010; Dreier, 2011). Le PIDs, brevi (4-10 min) e transienti, sono tipiche dell'area di penombra, mentre nel *core* sono registrate cadute di potenziale più durature (≥ 30 min; Nallet et al., 1999; Breschi et al., 2010; Dreier, 2011). Nel corso dei due eventi, inoltre, si ha la completa abolizione di eventi sinaptici, evocati o spontanei (Somjen, 2001; Dreier, 2011). Il lavoro condotto ha dimostrato che le cortecce olfattive (PC e OT), presentano fenomeni lenti

diversi. Nella PC e nel lat-OT, sono apparse esclusivamente PIDs associate alla completa ma temporanea, depressione nella funzionalità sinaptica. La loro presenza e variabilità nei tempi di manifestazione, suggerisce che siano fenomeni propagati dal *core* ischemico (Breschi et al., 2010). E quindi le PIDs, confermano l'ipotesi, che la PC e il tubercolo olfattorio rappresentino la penombra.

Nel tubercolo mediale, la presenza di oscillazioni lente e poco ampie (VSS) correlata alla riduzione ma non alla scomparsa delle risposte evocate, suggerisce l'ipotesi che questi VSS siano eco di un fenomeno generato più in profondità. Nel sottostante *accumbens*, definito parte del *core* ischemico, potrebbero essersi manifestate delle depolarizzazioni ischemiche, le quali generano forti correnti extracellulari. Il potenziale di campo associato potrebbe essere stato condotto passivamente verso il med-OT (*ephaptic coupling*; Jefferys et al., 1982). La riduzione nel med-OT delle risposte evocate, registrate durante i VSS, potrebbe essere un epifenomeno della depolarizzazione incompleta delle cellule piramidali profonde del tubercolo mediale. Di fatto, in studi eseguiti su fettine ippocampali (Canals et al., 2005), nelle quali venivano indotte chimicamente *spreading depolarizations* (SD), è stato possibile osservare che, durante le SD, s'instaura un gradiente di depolarizzazione lungo l'asse longitudinale dell'albero dendritico. E all'apice di quest'ultimo ne è stato registrato il valore più basso.

In una parte degli esperimenti, la stimolazione data da due pulsii appaiati e sufficientemente vicini (40 msec), ha mostrato un aumento dell'efficacia inibitoria nel med-OT. Sempre in questa regione, la stimolazione ad alta frequenza, ha evidenziato una maggior resistenza all'instaurarsi di un'attività epilettiforme. Queste differenze rispetto ai controlli, sono risultate essere non significative e non durature. Nell'area di penombra indotta in questo modello sperimentale, non è pertanto possibile dire che vi sia stato, nelle fasi acute dell'ischemia, una modificazione stabile nell'eccitabilità neuronale. Diversi studi hanno mostrato come a seguito di un insulto ischemico, si siano verificati significativi cambiamenti a carico degli input sinaptici eccitatori e inibitori. Questi sono stati indicati come possibili meccanismi implicati nella morte cellulare selettiva (Luhmann et al., 1995). Dopo aver esposto delle fettine ippocampali a brevi periodi di anossia e deprivazione di glucosio, è stata costatata in CA1, la morte di cellule principali. In tal caso sono stati considerati come responsabili i meccanismi di eccitotossicità attivati da recettori N-metil-D-aspartato (NMDA) e calcio-dipendenti e (Pulsinelli et al., 1982; Krantic et al., 2005).

Nello striato, i neuroni *large aspiny* e molti degli altri interneuroni GABAergici, per esempio i *nitric oxide synthase*, rimangono intatti e funzionali anche dopo 24 ore di ischemia. Invece i neuroni *medium spiny* non sopravvivono all'insulto ischemico, gli autori (Li et al., 2009), hanno quindi concluso che ciò è dovuto sia al fatto che i neuroni MS ricevono un maggior numero di proiezioni glutammatergiche, sia ad un'aumentata attività GABAergica sulle restanti popolazioni neuronali che compongono lo striato.

In alcuni dei pochi lavori che si sono occupati di studiare le caratteristiche elettrofisiologiche dell'ischemia cerebrale in vivo, hanno riscontrato delle anomalie EEG nelle due ore successive

all'evento occlusivo (Lu et al., 2001; Hartings et al., 2003). Nei topi la percentuale che presenta crisi epilettiche acute è dell'80%, quando viene applicato il modello di occlusione intraluminale della MCA, e di 17,5% quando l'endotelina applicata sul vaso. Tuttavia la percentuale che sviluppa un'epilessia cronica è rispettivamente dello 0% e del 3.6% dei casi (Karhunen et al., 2005). Nel nostro modello *in vitro*, di occlusione delle ACAs, non abbiamo mai registrato alcuna attività epilettiforme.

Vi è la possibilità che *in vivo*, i fenomeni di ipereccitabilità siano imputabili ad eventi patologici indipendenti dall'ipossia cerebrale. In studi epidemiologici è stato stimato che il 2.3-14% dei pazienti soffre di una crisi epilettica precoce dopo un'ischemia occlusiva (So et al., 1996; Bladin et al., 2000; Lamy et al., 2003; Szaflaraski et al., 2008), mentre sale 4.2-28% la percentuale dei soggetti vittime di un'emorragia cerebrale (*intracerebral hemorrhage* IHC; Kilpatrick et al., 1992; Passero et al., 2002; Vespa et al., 2003). Dal punto di vista statistico, quindi, l'emorragia rappresenta un indizio prognostico sfavorevole (Bladin et al., 2000; Silverman et al., 2002).

Si può quindi considerare che elementi rilasciati dal sangue e venuti a contatto col parenchima cerebrale, ne alterino il suo equilibrio biochimico e favoriscano l'insorgenza di eventi ictali (Dreier, 2011). Prodotti di degradazione del sangue, quali l'emosiderina, possono provocare un'infiammazione focale capace di scatenare un eccesso epilettico, e quindi spiegare la maggior incidenza di crisi in pazienti emorragici rispetto a quelli ischemici (Baldin et al., 2000). Infine l'effetto epilettogenico dell'emosiderina può essere paragonato a quello osservato nel modello animale di epilessia provocato dalla deposizione di sali di ferro sulla corteccia cerebrale (Willmore, 1990; Kucukkaya et al., 1998).

Durante un'emorragia si ha anche l'extravasazione e infiltrazione di neutrofilo e macrofagi nel tessuto cerebrale, l'attivazione della microglia e degli astrociti e quindi la sintesi e il rilascio di fattori pro infiammatori comprese citochine, specie reattive dell'ossigeno e metalloproteasi che possono indurre un aumento dell'eccitabilità neuronale (Vezzani et al., 2011; Librizzi et al., 2012). Infine vi è anche da considerare che durante un'ischemia, la barriera ematoencefalica (*blood brain barrier*, BBB) subisce un danno, il quale porta ad eventi paragonabili a quelli appena descritti, e quindi scatenare di per sé un fuoco epilettogeno (Janigro et al., 1999; Marchi et al., 2007; Tomkins et al., 2007; van Vilet et al., 2007).

Questi dati supportano l'ipotesi che eventi mediati da elementi del sangue abbiano un ruolo determinante nella genesi delle crisi epilettiche acute a seguito di un'ischemia emorragica cerebrale. Mentre, l'anossia e i fenomeni elettrofisiologici lenti, non sembrano essere implicati nell'aumento dell'eccitabilità neuronale nella fase acuta di un evento ischemico di tipo occlusivo.

ABBREVIAZIONI

ACAs= anterior cerebral arteries

ACAo= anterior cerebral arteries occlusion

ADC = apparent diffusion coefficient

DAB = 3,3-diamino-benzidine-tetrahydrochloride

DPX = dibutyl phtalate xylene

DWI = diffusion weighted immagine

FP = field potential

H&E = Hemaoxylin and Eosin

HFS= high frequency stimulation

ID = ischemic depolarization

LFS= low frequency stimulation

MAP-2 = microtubule associated protein (2)

MCA(o) = medial cerebral artery (occlusion)

MRi= magnetic resonance imaging

P1, P3, P3= protocols of occlusions: ½ h + 2 reperfusion; 1h + 1h reperfusion and 3h (no reperfusion) respectively

PC(c) = piriform cortex (controlateral)

PID = perinfarct depolarization

OD= densità ottica

OT 1, 2, 3, (c) = olfactory tubercle laterale interno mediale, controlaterale

Tr(D)= diffusion tensor trace

BIBLIOGRAFIA

- Aitken, P. G., Balestrino, M., and Somjen, G. G. 1988 NMDA antagonists: lack of protective effect against hypoxic damage in CA1 region of hippocampal slices. *Neuroscience Letters* 89: 187-92.
- Albayrak, S., Zhao, Q., Siesjo, B. K., and Smith, M. L. 1997 Effect of transient focal ischemia on blood-brain barrier permeability in the rat: correlation to cell injury. *Acta Neuropathol* 94: 158-63.
- Alefeld M, Sutor B, Luhmann HJ. 1998. Pattern and pharmacology of propagating epileptiform activity in mouse cerebral cortex. *Experimental neurology* 153: 113-22
- Allen NJ, Karadottir R, Attwell D. 2004a. Reversal or reduction of glutamate and GABA transport in CNS pathology and therapy. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 449: 132-42
- Allen NJ, Rossi DJ, Attwell D. 2004b. Sequential release of GABA by exocytosis and reversed uptake leads to neuronal swelling in simulated ischemia of hippocampal slices. *The Journal of neuroscience* :24: 3837-49
- Alonso de Lecinana, M., Diez-Tejedor, E., Carceller, F., and Roda, J. M. 2001 Cerebral ischemia: from animal studies to clinical practice. Should the methods be reviewed? *Cerebrovasc Dis* 11 Suppl 1: 20-30.
- An, G.; Lin, T. N.; Liu, J. S., Xue, J. J. He, Y. Y. Hsu, C. Y. 1993 Expression of c-fos and c-jun family genes after focal cerebral ischemia *Ann Neurol*; 33 457-64 .
- Andersen, P., Dingledine, R., Gjerstad, L., Langmoen, I. A., and Laursen, A. M. 1980 Two different responses of hippocampal pyramidal cells to application of gamma-amino butyric acid. *Journal of Physiology* 305: 279-96.
- Astrup, J., Siesjo, B. K., and Symon, L. 1981 Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* 12: 723-5,.
- Auer RN Sutherland GR. 2005 Primary intracerebral hemorrhage: pathophysiology. *Can J Neurol Sci*; 32 Suppl s: S3-12
- Avoli M, D'Antuono M, Louvel J, Kohling R, Biagini G, et al. 2002. Network pharmacological mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system in vitro. *Progress in Neurobiology* 68: 167-207
- Aysan Durukan, Turgut Talisumak. 2007 Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour* 87, 179-197.
- Back, T., Hemmen, T., Schuler, O.G., 2004. Lesion evolution in cerebral ischemia. *J. Neurol.* 251, 388-97.
- Backhauss, C., Karkoutly, C., Welsch, M., and Krieglstein, J. 1992 A mouse model of focal cerebral ischemia for screening neuroprotective drug effects. *J Pharmacol Toxicol Methods* 27: 27-32.
- Baram TZ, Hirsch E, Schultz L. 1993. Short-interval amygdala kindling in neonatal rats. *Brain research. Developmental brain research* 73: 79-83

- Barbarosie M, Avoli M. 1997. CA3-driven hippocampal-entorhinal loop controls rather than sustains in vitro limbic seizures. *Journal Of Neuroscience* 17: 9308-14
- Barber, P. A., Demchuk, A. M., Hirt, L., and Buchan, A. M. 2003 Biochemistry of ischemic stroke. *Adv Neurol* 92: 151-64.
- Bardutzky, J. Shen, Q. Henninger, N. Bouley, J. Duong, T. Q. Fisher, M. 2005 Differences in ischemic lesion evolution in different rat strains using diffusion and perfusion imaging *Stroke*; 36, 2000-5.
- Barone, F. C., Knudsen, D. J., Nelson, A. H., Feuerstein, G. Z., and Willette, R. N. 1993 Mouse strain differences in susceptibility to cerebral ischemia are related to cerebral vascular anatomy. *J Cereb Blood Flow Metab* 13: 683-92.
- Barth AM, Mody I. 2011 Changes in hippocampal neuronal activity during and after unilateral selective hippocampal ischemia in vivo. *J Neurosci* 31:851-60.
- Barton ME, Klein BD, Wolf HH, White HS. 2001. Pharmacological characterization of the 6 Hz psychomotor seizure model of partial epilepsy. *Epilepsy research* 47: 217-27
- Basser, P. J. and Jones, D. K. 2002 Diffusion-tensor MRI: theory, experimental design and data analysis a technical review. *NMR Biomed* 15: 456-67.
- Belayev, L.; Zhao, W.; Busto, R.; Ginsberg, M. D. 1997 Transient middle cerebral artery occlusion by intraluminal suture: I. Three-dimensional autoradiographic image-analysis of local cerebral glucose metabolism-blood flow interrelationships during ischemia and early recirculation *J Cereb Blood Flow Metab*; 1266-80
- Ben-Ari Y. 1985. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 14: 375-403
- Benedek, A.; Moricz, K.; Juranyi, Z.; Gigler, G.; Levay, G.; Harsing, L. G.Jr.; Matyus, P.; Szenasi, G.; Albert, M. 2006 Use of TTC staining for the evaluation of tissue injury in the early phases of reperfusion after focal cerebral ischemia in rats *Brain Res*; 1116, 159-65
- Benveniste, H. and Blackband, S. 2002 MR microscopy and high resolution small animal MRI: applications in neuroscience research. *Prog Neurobiol* 67: 393-420.
- Berg AT. 2011. Classification and epilepsy: the future awaits. *Epilepsy currents / American Epilepsy Society* 11: 138-40
- Berg AT. 2012. Introduction: Changing terms and concepts for epilepsy. *Epilepsia* 53 Suppl 2: 1-2
- Berkowicz, D. A., Trombley, P. Q., and Shepherd, G. M. 1994 Evidence for glutamate as the olfactory receptor cell neurotransmitter. *J Neurophysiol* 71: 2557-61.
- Schaller B and Graf. R 2004 Cerebral Ischemia and Reperfusion: The Pathophysiologic Concept as a Basis for Clinical Therapy . *J Cereb Blood Flow Metab* 24, 351-371.
- Biella, G. and de Curtis, M. 1995 Associative synaptic potentials in the piriform cortex of the isolated guinea-pig brain in vitro. *Eur. J. Neurosci.* 7: 54-64.
- Biella, G. and de Curtis, M. Olfactory inputs activate the medial entorhinal cortex via the hippocampus. *J Neurophysiol* 83: 1924-31, 2000.
- Biella, G., Panzica, F., and de Curtis, M. Interactions between associative synaptic potentials in the piriform cortex of the in vitro isolated guinea pig brain. *European Journal Of Neuroscience* 8: 1350-7, 1996.

- Biella, G. R., Gnatkovsky, V., Takashima, I., Kajiwara, R., Iijima, T., and De Curtis, M. Olfactory input to the parahippocampal region of the isolated guinea pig brain reveals weak entorhinal-to-perirhinal interactions. *Eur J Neurosci* 18: 95-101, 2003.
- Bladin CF, Alexandrov AV Bellavance A Bornstein N Chambers B Coté R Lebrun L Pirisi A Norris JW. (2000) Seizures after stroke: a prospective multicenter study. *Arch Neurol*. 57:1617-22.
- Bonfoco, E., Krainc, D., Ankarcona, M., Nicotera, P., and Lipton, S. A. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 7162-6, 1995.
- Bourque, C. W. and Renaud, L. P. Activity patterns and osmosensitivity of rat supraoptic neurones in perfused hypothalamic explants. *J Physiol* 349: 631-42, 1984.
- Breschi GL, Librizzi L, Pastori C, Zucca I, Mastropietro A, Cattalini A, de Curtis M. (2010) Functional and structural correlates of magnetic resonance patterns in a new in vitro model of cerebral ischemia by transient occlusion of the medial cerebral artery. *Neurobiol Dis* 39:181-91.
- Brown, A. W. Structural abnormalities in neurones. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* 11: 155-69, 1977.
- Brown, A. W. and Brierley, J. B. Anoxic-ischaemic cell change in rat brain light microscopic and fine-structural observations. *J Neurol Sci* 16: 59-84, 1972.
- Brozici M, van der Zwan A, Hillen B. (2003) Anatomy and functionality of leptomeningeal anastomoses: a review. *Stroke* 34:2750-62.
- Brückner C, Stenkamp K, Meierkord H, Heinemann U. 1999. Epileptiform discharges induced by combined application of bicuculline and 4-aminopyridine are resistant to standard anticonvulsants in slices of rats. *Neuroscience letters* 268: 163-5
- Buchkremer-Ratzmann I, August M, Hagemann G, Witte OW. 1998. Epileptiform discharges to extracellular stimuli in rat neocortical slices after photothrombotic infarction. *Journal of the neurological sciences* 156: 133-7
- Burn J, Dennis M, Bamford J, Sandercock P, Wade D, Warlow C. (1997) Epileptic seizures after a first stroke: the Oxfordshire Community Stroke Project. *Brit Med J* 315:1582-7.
- Busch, E. Kruger, K. Hossmann, K. A. Improved model of thromboembolic stroke and rt-PA induced reperfusion in the rat *Brain Res* 1997 Dec 5 778 16-24
- Calamante, F., Lythgoe, M. F., Pell, G. S., Thomas, D. L., King, M. D., Busza, A. L., Sotak, C. H., Williams, S. R., Ordidge, R. J., and Gadian, D. G. Early changes in water diffusion, perfusion, T1, and T2 during focal cerebral ischemia in the rat studied at 8.5 T. *Magn Reson Med* 41: 479-85, 1999.
- Camilo O, Goldstein LB. (2004) Seizures and epilepsy after ischemic stroke. *Stroke* 35:1769-75.
- Canals S, Makarova I, Lopez-Aguado L, Largo C, Ibarz JM, Herreras O. (2005) Longitudinal depolarization gradients along the somatodendritic axis of CA1 pyramidal cells: a novel feature of spreading depression. *J Neurophysiol* 94:943-51.
- Carmichael ST. 2006. Cellular and molecular mechanisms of neural repair after stroke: making waves. *Annals of neurology* 59: 735-42

- Carmichael, S. T. Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. *NeuroRx* 2: 396-409, 2005b.
- Carriero G, Uva L, Gnatkovsky V, de Curtis M (2009) Distribution of the olfactory fiber input into the olfactory tubercle of the in vitro isolated guinea pig brain. *J Neurophysiol.* 1613-9.
- Carriero G, Arcieri S, Cattalini A, Corsi L, Gnatkovsky V, de Curtis M. 2012. A guinea pig model of mesial temporal lobe epilepsy following nonconvulsive status epilepticus induced by unilateral intrahippocampal injection of kainic acid. *Epilepsia* 53: 1917-27
- Carmichael, S. T. Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. *NeuroRx* 2: 396-409, 2005a.
- Charriaut-Marlangue, C. and Ben-Ari, Y. A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport* 7: 61-4, 1995.
- Chen, S. T. Hsu, C. Y. Hogan, E. L. Maricq, H. Balentine, J. D. A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction *Stroke* 1986 Jul-Aug 17 738-43
- Choi, D. W. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1: 623-34, 1988.
- Crain, B. J., Westerkam, W. D., Harrison, A. H., and Nadler, J. V. Selective neuronal death after transient forebrain ischemia in the Mongolian gerbil: a silver impregnation study. *Neuroscience* 27: 387-402, 1988.
- Christine A. Davies, Sarah A. Loddick, Nancy J. Rothwell An integrated analysis of the progression of cell responses induced by permanent focal middle cerebral artery occlusion 1998 *Experimental Neurology* 154: 199-212
- Cruz, Rapid efflux of lactate from cerebral cortex during K⁺ induced spreading cortical depression. *Journal of cerebral blood and metabolism* 19: 380-392, 1999.
- Davalos A, Cendra E, Genis D, Lopez-Pousa S. 1988. The frequency, characteristics and prognosis of epileptic seizures at the onset of stroke. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 51: 1464
- D'Arceuil HE, Westmoreland S, de Crespigny AJ. (2007) An approach to high resolution diffusion tensor imaging in fixed primate brain. *Neuroimage* 35:553-65
- de Curtis, M., Arcelli, P., De Biasi, S., Spreafico, R., and Avanzini, G. Ultrastructural features of the isolated guinea-pig brain maintained in vitro by arterial perfusion. *Neuroscience* 59: 775-88, 1994.
- de Crespigny, A. J., Rother, J., Beaulieu, C., Neumann-Haefelin, T., Moseley, M. E. Comparison of diffusion, blood oxygenation, and blood volume changes during global ischemia in rats *Magn Reson Med* 2001 Jan 45 10-6
- de Curtis, M., Biella, G., Buccellati, C., and Folco, G. Simultaneous investigation of the neuronal and vascular compartments in the guinea pig brain isolated in vitro. *Brain Research Protocols* 3: 221-8, 1998.
- de Curtis, M., Dickson, C., Panzica, F., and Pizzi, R. Pharmacology and organization of carbachol-induced gamma activity in the medial entorhinal cortex. *Soc. Neurosci. Abstracts* 29: 903, 1999.
- de Curtis M, Gnatkovsky V. 2009. Reevaluating the mechanisms of focal ictogenesis: The role of low-voltage fast activity. *Epilepsia* 50: 2514-25
- de Curtis, M., Manfredi, A., and Biella, G. Activity-dependent pH shifts and periodic recurrence of spontaneous interictal spikes in a model of focal epileptogenesis. *Journal Of Neuroscience* 18: 7543-51, 1998.

- de Curtis, M., Pare, D., and Llinas, R. R. The electrophysiology of the olfactory-hippocampal circuit in the isolated and perfused adult mammalian brain in vitro. *Hippocampus* 1: 341-54, 1991.
- de Lanerolle NC, Kim JH, Robbins RJ, Spencer DD. 1989. Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy. *Brain research* 495: 387-95
- Dereski, M.O., Chopp, M., Knight, R.A., Rodolosi, L.C., Garcia, J.H., 1993. The heterogeneous temporal evolution of focal ischemic neuronal damage in the rat. *Acta Neuropath.* 85, 327-333.
- del Zoppo, G. J., Schmid-Schonbein, G. W., Mori, E., Copeland, B. R., and Chang, C. M. Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke* 22: 1276-83, 1991.
- Dickson, C. T., Biella, G., and de Curtis, M. Slow periodic events and their transition to gamma oscillations in the entorhinal cortex of the isolated Guinea pig brain. *J Neurophysiol* 90: 39-46, 2003.
- Dietrich, W. D., Busto, R., Watson, B. D., Scheinberg, P., and Ginsberg, M. D. Photochemically induced cerebral infarction. II. Edema and blood-brain barrier disruption. *Acta Neuropathol* 72: 326-34, 1987.
- Dijkhuizen, R. M., Beekwilder, J. P., van der Worp, H. B., Berkelbach van der Sprenkel, J. W., Tulleken, K. A., and Nicolay, K. Correlation between tissue depolarizations and damage in focal ischemic rat brain. *Brain Res* 840: 194-205, 1999.
- Dijkhuizen RM, Berkelbach van der Sprenkel JW, Tulleken KA, Nicolay K. Regional assessment of tissue oxygenation and the temporal evolution of hemodynamic parameters and water diffusion during acute focal ischemia in rat brain. *Brain Res* 1997; 750:161-170
- Dingledine, R., Dodd, J., and Kelly, J. S. The in vitro brain slice as a useful neurophysiological preparation for intracellular recording. *J Neurosci Methods* 2: 323-62, 1980.
- Dirnagl, U., Iadecola, C., and Moskowitz, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22: 391-7, 1999.
- Dreier JP. (2011) The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nat Med* 17:439-47.
- Dreier JP, Major S, Pannek HW, Woitzik J, Scheel M, Wiesenthal D, Martus P, Winkler MK, Hartings JA, Fabricius M, Speckmann EJ, Gorji A; Spreading convulsions, spreading depolarization and epileptogenesis in human cerebral cortex. *Brain*. 2012; 135:259-75
- Dohmen, C., Sakowitz, O.W., Fabricius, M., Bosche, B., Reithmeier, T., Ernestus, R.I., Brinker, G., Dreier, J.P., Woitzik, J., Strong, A.J., Graf, R., C.O.S.B.I.D., 2008. Spreading depolarization occur in human ischemic stroke
- Dreier, J.P., Major, S., Manning, A., Woitzik, J., Drenckhahn, C., Steinbrink, J., Tolias, C., Oliveira-Ferreira, A.I., Fabricius, M., Hartings, J.A., Vajkoczy, P., Lauritzen, M., Dirnagl, U., Bohner, G., Strong, A.J., 2009. Cortical spreading ischaemia is a novel process involved in ischaemic damage in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Brain* 132, 1866-81.
- Du, C., Hu, R., Csernansky, C. A., Hsu, C. Y., and Choi, D. W. Very delayed infarction after mild focal cerebral ischemia: a role for apoptosis? *J Cereb Blood Flow Metab* 16: 195-201, 1996.

- Durukan, A. and Tatlisumak, T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav* 87: 179-97, 2007.
- Edvinsson, L., Emson, P., McCulloch, J., Tatemoto, K., and Uddman, R. Neuropeptide Y: immunocytochemical localization to and effect upon feline pial arteries and veins in vitro and in situ. *Acta Physiol Scand* 122: 155-63, 1984.
- Epszstein J, Ben-Ari Y, Represa A, Crepel V. (2008) Late-onset epileptogenesis and seizure genesis: lessons from models of cerebral ischemia. *Neuroscientist* 14:78-90.
- Fabricius M, Fuhr S, Willumsen L, Dreier JP, Bhatia R, et al. 2008. Association of seizures with cortical spreading depression and peri-infarct depolarisations in the acutely injured human brain. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 119: 1973-84
- Fiehler, J., Foth, M., Kucinski, T., Knab, R., von Bezold, M., Weiller, C., Zeumer, H., Rother, J., 2002. Severe ADC decreases do not predict irreversible tissue damage in humans. *Stroke* 33, 79-86.
- Fisher RS, Alger BE. 1984. Electrophysiological mechanisms of kainic acid-induced epileptiform activity in the rat hippocampal slice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 4: 1312-23
- Forster, C., Clark, H. B., Ross, M. E., and Iadecola, C. Inducible nitric oxide synthase expression in human cerebral infarcts. *Acta Neuropathol* 97: 215-20, 1999.
- Forti, M., Biella, G., Caccia, S., and de Curtis, M. Persistent excitability changes in the piriform cortex of the isolated guinea-pig brain after transient exposure to bicuculline. *European Journal Of Neuroscience* 9: 435-51, 1997.
- Fox, G. Gallacher, D. Shevde, S. Loftus, J. Swayne, G Anatomic variation of the middle cerebral artery in the Sprague-Dawley rat *Stroke* 1993 Dec 24 2087-92; discussion 2092-3
- French, C. R., Sah, P., Buckett, K. J., and Gage, P. W. A voltage-dependent persistent sodium current in mammalian hippocampal neurons. *J. Gen. Physiol.* 95: 1139-1157, 1990.
- Fueta Y, Avoli M. 1993. Tetraethylammonium-induced epileptiform activity in young and adult rat hippocampus. *Brain research. Developmental brain research* 72: 51-8
- Fujikawa DG. 2003. Neuronal death in mesial temporal sclerosis: separating morphology from mechanism. *Epilepsia* 44: 1607; author reply 07-8
- Fujimura, M., Morita-Fujimura, Y., Kawase, M., Copin, J. C., Calagui, B., Epstein, C. J., and Chan, P. H. Manganese superoxide dismutase mediates the early release of mitochondrial cytochrome C and subsequent DNA fragmentation after permanent focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci* 19: 3414-22, 1999.
- Fukuchi, K., Kusuoka, H., Watanabe, Y., and Nishimura, T. Correlation of sequential MR images of microsphere-induced cerebral ischemia with histologic changes in rats. *Invest Radiol* 34: 698-703, 1999.
- Furlow, T. W. Jr and Bass, N. H. Stroke in rats produced by carotid injection of sodium arachidonate. *Science* 187: 658-60, 1975.
- Fuxe, K., Bjelke, B., Andbjør, B., Grahn, H., Rimondini, R., and Agnati, L. F. Endothelin-1 induced lesions of the frontoparietal cortex of the rat. A possible model of focal cortical ischemia. *Neuroreport* 8: 2623-9, 1997.

- Gabriel S, Njunting M, Pomper JK, Merschhemke M, Sanabria ER, et al. 2004. Stimulus and potassium-induced epileptiform activity in the human dentate gyrus from patients with and without hippocampal sclerosis. *J neurosci* 24: 10416-30
- Garcia, J. H., Liu, K. F., and Ho, K. L. Neuronal necrosis after middle cerebral artery occlusion in Wistar rats progresses at different time intervals in the caudoputamen and the cortex. *Stroke* 26: 636-42; discussion 643, 1995.
- Garcia, J. H., Yoshida, Y., Chen, H., Li, Y., Zhang, Z. G., Lian, J., Chen, S., and Chopp, M. Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Pathol* 142: 623-35, 1993.
- Garden, D. L. F. and Kemp, N. B. Z. I. Differences in GABAergic transmission between two inputs into the perirhinal cortex. *European Journal of Neuroscience* 16: 437-444, 2002.
- Gass, P.; Spranger, M.; Herdegen, T.; Bravo, R.; Kock, P.; Hacke, W. ; Kiessling, M. Induction of FOS and JUN proteins after focal ischemia in the rat: differential effect of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 *Acta Neuropathol* 1992 84 545-53
- Ginsberg, M. D. and Busto, R. Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke* 20: 1627-42, 1989.
- Ginsberg, M. D. and Pulsinelli, W. A. The ischemic penumbra, injury thresholds, and the therapeutic window for acute stroke. *Ann Neurol* 36: 553-4, 1994.
- Giulian, D. Immune responses and dementia. *Ann N Y Acad Sci* 835: 91-110, 1997.
- Goldberg, M. P. and Choi, D. W. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J Neurosci* 13: 3510-24, 1993.
- Gorelick, P. B. Distribution of atherosclerotic cerebrovascular lesions. Effects of age, race, and sex. *Stroke* 24: I16-9; discussion I20-1, 1993.
- Gorji, A., Scheller, D., Straub, H., Tegtmeier, F., Kohling, R., Hohling, J. M., Tuxhorn, I., Ebner, A., Wolf, P., Werner Panneck, H., Opper, F., and Speckmann, E. J. Spreading depression in human neocortical slices. *Brain Res* 906: 74-83, 2001.
- Gotti et al., The pharmacotherapy of focal cortical ischaemia in the mouse, *Brain Research*, 522:290-307 (1990)
- Groticke I, Hoffmann K, Loscher W. 2008. Behavioral alterations in a mouse model of temporal lobe epilepsy induced by intrahippocampal injection of kainate. *Experimental neurology* 213: 71-83
- Guerrini, U., Sironi, L., Tremoli, E., Cimino, M., Pollo, B., Calvio, A. M., Paoletti, R., and Asdente, M. New insights into brain damage in stroke-prone rats: a nuclear magnetic imaging study. *Stroke* 33: 825-30, 2002.
- Gupta SR, Naheedy MH, Elias D, Rubino FA. 1988. Postinfarction seizures. A clinical study. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 19: 1477-81
- Haberly, L. B. and Price, J. L. Association and commissural fiber systems of the olfactory cortex of the rat. II. Systems originating in the olfactory peduncle. *J Comp Neurol* 181: 781-807, 1978.
- Hablitz JJ. 1984. Picrotoxin-induced epileptiform activity in hippocampus: role of endogenous versus synaptic factors. *J neurop* 51: 1011-27
- Hansen, A. J. Effect of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiol Rev* 65: 101-48, 1985.

- Hartings, J.A., Rolli, M.L., Lu, X.C., Tortella, F.C., 2003. Delayed secondary phase of peri-infarct depolarizations after focal cerebral ischemia: relation to infarct growth neuroprotection. *J. Neurosci.* 23, 11602-10.
- Hauser WA, Kurland LT. 1975. The epidemiology of epilepsy in Rochester, Minnesota, 1935 through 1967. *Epilepsia* 16: 1-66
- Heimer, L. Synaptic distribution of centripetal and centrifugal nerve fibres in the olfactory system of the rat. An experimental anatomical study. *J Anat* 103: 413-32, 1968.
- Heimer, L. and Peters, A. An electron microscope study of a silver stain for degenerating boutons. *Brain Res* 8: 337-46, 1968.
- Heimer, L., Zaborszky, L., Zahm, D. S., and Alheid, G. F. The ventral striatopallidothalamic projection: I. The striatopallidal link originating in the striatal parts of the olfactory tubercle. *J Comp Neurol* 255: 571-91, 1987.
- Heiss, W. D. Experimental evidence of ischemic thresholds and functional recovery. *Stroke* 23: 1668-72, 1992.
- Henninger, N. Sicard, K. M. Schmidt, K. F. Bardutzky, J. Fisher, M. Comparison of ischemic lesion evolution in embolic versus mechanical middle cerebral artery occlusion in Sprague Dawley rats using diffusion and perfusion imaging *Stroke* 2006 May 37 1283-7
- Herreras O, Somjen GG. (1993) Propagation of spreading depression among dendrites and somata of the same cell population. *Brain Res* 610:276-82
- Herreras, O., Largo, C., Ibarz, J. M., Somjen, G. G., and Martin del Rio, R. Role of neuronal synchronizing mechanisms in the propagation of spreading depression in the in vivo hippocampus. *J Neurosci* 14: 7087-98, 1994.
- Herz, R. C. Jonker, M. Verheul, H. B. Hillen, B. Versteeg, D. H. de Wildt, D. J. Middle cerebral artery occlusion in Wistar and Fischer-344 rats: functional and morphological assessment of the model *J Cereb Blood Flow Metab* 1996 Mar 16 296-302
- Hille, B. Ionic channels of excitable membranes. Sunderland, Mass, Sinauer Associates Inc. 1992.
- Honkaniemi, J. Sharp, F. R. Global ischemia induces immediate-early genes encoding zinc finger transcriptionfactors *J Cereb Blood Flow Metab* 1996 Jul 16 557-65
- Hossmann, K. A. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 36: 557-65, 1994.
- Hossmann, K. A. Experimental models for the investigation of brain ischemia. *Cardiovasc Res* 39: 106-20, 1998a.
- Hossmann, K. A. Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cell Mol Neurobiol* 26: 1057-83, 2006.
- Hossmann K.A., Cerebral ischemia: models, methods and outcomes. *Neurophar*2008; 55(3):257-70.
- Huh, J.W., Raghupathi, R., Laurer, H.L., Helfaer, M.A., Saatman K.E., 2003. Transient loss of microtubule-associated protein 2 immunoreactivity after moderate brain injury in mice. *J. Neurotrauma* 20, 975-984.
- Huang, N. C. Wei, J. Quast, M. J. A comparison of the early development of ischemic brain damage in normoglycemic and hyperglycemic rats using magnetic resonance imaging *Exp Brain Res* 1996, 109 33-42

- Iadecola, C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci* 20: 132-9, 1997.
- Iadecola, C., Salkowski, C. A., Zhang, F., Aber, T., Nagayama, M., Vogel, S. N., and Ross, M. E. The transcription factor interferon regulatory factor 1 is expressed after cerebral ischemia and contributes to ischemic brain injury. *J Exp Med* 189: 719-27, 1999.
- Iijima, T., Bauer, R., and Hossmann, K. A. Brain resuscitation by extracorporeal circulation after prolonged cardiac arrest in cats. *Intensive Care Med* 19: 82-8, 1993.
- Iijima, T., Mies, G., and Hossmann, K. A. Repeated negative DC deflections in rat cortex following middle cerebral artery occlusion are abolished by MK-801: effect on volume of ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 12: 727-33, 1992.
- Inamura, K., Olsson, Y., and Siesjo, B. K. Substantia nigra damage induced by ischemia in hyperglycemic rats. A light and electron microscopic study. *Acta Neuropathol* 75: 131-9, 1987.
- Inuzuka, T.; Tamura, A.; Sato, S.; Kirino, T.; Yanagisawa, K.; Toyoshima, I.; Miyatake, T. Changes in the concentrations of cerebral proteins following occlusion of the middle cerebral artery in rats *Stroke* 1990 21 917-22
- Jack CR, Jr., Twomey CK, Zinsmeister AR, Sharbrough FW, Petersen RC, Cascino GD. 1989. Anterior temporal lobes and hippocampal formations: normative volumetric measurements from MR images in young adults. *Radiology* 172: 549-54
- Janigro D. Blood-brain barrier ion homeostasis and epilepsy: possible implications towards the understanding of ketogenic diet mechanisms. *Epil Res* 1999 37:223-232.
- Jefferys JG, Haas HL Synchronized bursting of CA1 hippocampal pyramidal cells in the absence of synaptic transmission. *Nature* 1982, 589:448-50
- Johnson, G. V. Jope, R. S. The role of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) in neuronal growth, plasticity, and degeneration *J Neurosci Res* 1992, 33 505-12
- Jones, R. S. G., Heinemann, U. F. H., and Lambert, J. D. C. The entorhinal cortex and generation of seizure activity: Studies of normal synaptic transmission and epileptogenesis. In Avanzini, G., Engel, J. Jr., Fariello, R., and Heinemann, U. eds. Amsterdam, Elsevier. 1992, 173-180.
- Juergen Bardutzky, Qiang Shen Nils Henninger James Bouley Timothy Q. Duong and Marc Fisher. Differences in Ischemic Lesion Evolution in Different Rat Strains Using Diffusion and Perfusion Imaging *Stroke* 2005, 36, 2000-2005..
- Kadam SD, White AM, Staley KJ, Dudek FE. 2010. Continuous electroencephalographic monitoring with radio-telemetry in a rat model of perinatal hypoxia-ischemia reveals progressive post-stroke epilepsy. *J neurosci* 30: 404-15
- Kaila, K. Ionic basis of GABAA receptor channel function in the nervous system. *Prog Neurobiol* 42: 489-537, 1994.
- Kalimo, H., Garcia, J. H., Kamijyo, Y., Tanaka, J., and Trump, B. F. The ultrastructure of "brain death". II. Electron microscopy of feline cortex after complete ischemia. *Virchows Arch B Cell Pathol* 25: 207-20, 1977.
- Kalimo, H., Olsson, Y., Paljarvi, L., and Soderfeldt, B. Structural changes in brain tissue under hypoxic-ischemic conditions. *J Cereb Blood Flow Metab*, 19822 Suppl 1: S19-22.

- Kanter, E. D. and Haberly, L. B. NMDA-dependent induction of long-term potentiation in afferent and association fiber systems of piriform cortex in vitro. *Brain Res*, 1990 525: 175-9.
- Karhunen H, Bezvenyuk Z, Nissinen J, Sivenius J, Jolkkonen J, Pitkanen A.. Epileptogenesis after cortical photothrombotic brain lesion in rats. *Neuroscience* 2007, 148: 314-24
- Karhunen H, Jolkkonen J, Sivenius J, Pitkanen A. 2005. Epileptogenesis after experimental focal cerebral ischemia. *Neurochemical research* 30: 1529-42
- Karhunen H, Nissinen J, Sivenius J, Jolkkonen J, Pitkanen A. 2006. A long-term video-EEG and behavioral follow-up after endothelin-1 induced middle cerebral artery occlusion in rats. *Epilepsy research* 72: 25-38
- Karhunen H, Pitkanen A, Virtanen T, Gureviciene I, Pussinen R, et al. 2003. Long-term functional consequences of transient occlusion of the middle cerebral artery in rats: a 1-year follow-up of the development of epileptogenesis and memory impairment in relation to sensorimotor deficits. *Epilepsy research* 54: 1-10
- Karpiak SE, Tagliavia A, Wakade CG. Animal models for the study of drugs in ischemic stroke. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (29), 403-14. 1989
- Katsura, K., Kristian, T., Smith, M. L., and Siesjo, B. K. Acidosis induced by hypercapnia exaggerates ischemic brain damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 14: 243-50, 1994.
- Katz, L., Ebmeyer, U., Safar, P., Radovsky, A., and Neumar, R. Outcome model of asphyxial cardiac arrest in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 15: 1032-9, 1995.
- Kidwell, C.S., Alger, J.R., Saver, J.L., 2003. Beyond mismatch: Evolving paradigms in imaging the ischemic penumbra with multimodal magnetic resonance imaging. *Stroke* 34, 2729-2735.
- Kellinghaus C, Kunieda T, Ying Z, Pan A, Luders HO, Najm IM. 2004. Severity of histopathologic abnormalities and in vivo epileptogenicity in the in utero radiation model of rats is dose dependent. *Epilepsia* 45: 583-91
- Kelly KM. 2004. Modeling traumatic brain injury and posttraumatic epilepsy. *Epilepsy currents / American Epilepsy Society* 4: 160-1
- Kelly KM, Jukkola PI, Kharlamov EA, Downey KL, McBride JW, et al. 2006. Long-term video-EEG recordings following transient unilateral middle cerebral and common carotid artery occlusion in Long-Evans rats. *Experimental neurology* 201: 495-506
- Kelly KM, Kharlamov A, Hentosz TM, Kharlamova EA, Williamson JM, et al. 2001. Photothrombotic brain infarction results in seizure activity in aging Fischer 344 and Sprague Dawley rats. *Epilepsy research* 47: 189-203
- Kharlamov EA, Jukkola PI, Schmitt KL, Kelly KM. 2003. Electrobehavioral characteristics of epileptic rats following photothrombotic brain infarction. *Epilepsy research* 56: 185-203
- Kiessling, M., Gass, P., 1994. Stimulus-transcription coupling in focal cerebral ischemia. *Brain Pathol.* 4, 77-83.
- Kilpatrick CJ, Davis SM, Hopper JL, Rossiter SC. (1992) Early seizures after acute stroke. Risk of late seizures. *Arch Neurol* 49:509-11.
- Kirino, T., Tamura, A., and Sano, K. Delayed neuronal death in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Acta Neuropathol* 64: 139-47, 1984.
- Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema: 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn Stroke J* 8, 1-8. 86.

- Kraig, R. P., Ferreira-Filho, C. R., and Nicholson, C. Alkaline and acid transients in cerebellar microenvironment. *J Neurophysiol* 49: 831-50, 1983.
- Krantic S, Mechawar N, Reix S, Quirion R. Molecular basis of programmed cell death involved in neurodegeneration. *Trends Neurosci* 2005 28:670-6.
- Krettek, J. E. and Price, J. L. Projections from the amygdaloid complex and adjacent olfactory structures to the entorhinal cortex and the subiculum in the rat and cat. *J Comp Neurol* 172: 723-752, 1977.
- Kucukkaya B, Aker R, Yuksel M, Onat F, Yalcin AS. Low dose MK-801 protects against iron-induced oxidative changes in a rat model of focal epilepsy. *Brain Res* 1998 788:133-6.
- Labovitz DL, Hauser WA, Sacco RL 2001, Prevalence and predictors of early seizure and status epilepticus after first stroke, *Neurology*57:200–206.
- Lamy C, Domigo V, Semah F, Arquizan C, Trystram D, Coste J, Mas JL. Early and late seizures after cryptogenic ischemic stroke in young adults. *Neurology* 2003 60:400-4.
- Lauer, K. K., Shen, H., Stein, E. A., Ho, K. C., Kampine, J. P., and Hudetz, A. G. Focal cerebral ischemia in rats produced by intracarotid embolization with viscous silicone. *Neurol Res* , 2002, 24: 181-90.
- Lauritzen, M. and Hansen, A. J. The effect of glutamate receptor blockade on anoxic depolarization and cortical spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1992 12: 223-9.
- Leao, A.P. Spreading depression of activity in cerebral cortex. *J Neurophysiol* 1944b; 7: 359–90
- Leao, A.P. The slow voltage variation of cortical spreading depression of activity. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 3: 315-21, 1951.
- Leao A.P. 1986. Spreading depression. *Funct Neurol* 1: 363-6
- Levine, S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol* 36: 1-17, 1960.
- Levine, S. and Payan, H. Effects of ischemia and other procedures on the brain and retina of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Exp Neurol* 16: 255-62, 1966.
- Li, F., Han, S., Tatlisumak, T., Carano, R. A., Irie, K., Sotak, C. H., and Fisher, M. A new method to improve in-bore middle cerebral artery occlusion in rats: demonstration with diffusion- and perfusion-weighted imaging. *Stroke* 29: 1715-9; 1998.
- Li, F., Omae, T., and Fisher, M. Spontaneous hyperthermia and its mechanism in the intraluminal suture middle cerebral artery occlusion model of rats. *Stroke* 30: 2464-70, 1999.
- Li F., Fisher M. Animal modeling for developing stroke therapy. 83-96. 2001. Woburn, Butterworth-Heinemann.
- Li, Y., Jiang, N., Powers, C., and Chopp, M. Neuronal damage and plasticity identified by microtubule-associated protein 2, growth-associated protein 43, and cyclin D1 immunoreactivity after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 29: 1972-80; 1998.
- Librizzi, L., Biella, G., Cimino, C., and De Curtis, M. Arterial supply of limbic structures in the guinea pig. *J Comp Neurol* 411: 674-82, 1999.
- Librizzi, L., Folco, G., and de Curtis, M. NO-synthase inhibitors block acetylcholine-mediated dilation of cerebral arteries in the in vitro isolated guinea pig brain. *Neuroscience* 101: 283-287, 2000.
- Librizzi, L., Janigro, D., De Biasi, S., and de Curtis, M. Blood brain barrier preservation in the *in vitro* isolated guinea -pig brain preparation . *J Neurosci Res* 66: 289-297, 2001a.

- Librizzi, L., Janigro, D., De Biasi, S., and de Curtis, M. Blood-brain barrier preservation in the in vitro isolated guinea pig brain preparation. *J Neurosci Res* 66: 289-97, 2001b.
- Librizzi, L., Pastori, C., de Grazia, U., Croci, D., and de Curtis, M. Rapid in vitro elimination of anesthetic doses of thiopental in the isolated guinea pig brain. *Neurosci Lett* 380: 66-9, 2005.
- Lindsberg, P. J., Carpen, O., Paetau, A., Karjalainen-Lindsberg, M. L., and Kaste, M. Endothelial ICAM-1 expression associated with inflammatory cell response in human ischemic stroke. *Circulation* 94: 939-45, 1996.
- Lindsberg, P. J., Hallenbeck, J. M., and Feuerstein, G. Platelet-activating factor in stroke and brain injury. *Ann Neurol* 30: 117-29, 1991.
- Lipton, P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 79: 1431-568, 1999.
- Liu, K.F., Silva, M.D., Meng, X., Gerriets, T., Helmer, K.G., Fenstermacher, J.D., Sotak, C.H., Fisher, M., 2002. Acute postischemic renormalization of the apparent diffusion coefficient of water is not associated with reversal of astrocytic swelling neuronal shrinkage in rats. *Am. J. Neuroradiol.* 23, 180–188.
- Llinas, R. and Muhlethaler, M. An electrophysiological study of the in vitro, perfused brain stem-cerebellum of adult guinea-pig. *J Physiol* 404: 215-40, 1988a.
- Llinas, R. and Muhlethaler, M. Electrophysiology of guinea-pig cerebellar nuclear cells in the in vitro brain stem-cerebellar preparation. *J Physiol* 404: 241-58, 1988b.
- Llinás, R. and Yarom, Y. Electrophysiology of mammalian inferior olivary neurons "in vitro". Different types of voltage dependent ionic conductances. *J. Physiol.* 315: 549-567, 1981.
- Llinas, R., Yarom, Y., and Sugimori, M. Isolated mammalian brain in vitro: new technique for analysis of electrical activity of neuronal circuit function. *Federation Proceedings* 40: 2240-5, 1981.
- Longa, E. Z., Weinstein, P. R., Carlson, S., and Cummins, R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20: 84-91, 1989.
- Longo BM, Mello LE. 1998. Supragranular mossy fiber sprouting is not necessary for spontaneous seizures in the intrahippocampal kainate model of epilepsy in the rat. *Epilepsy research* 32: 172-82
- Lossius MI, Ronning OM, Mowinckel P, L. Gjerstad (2002, a), Incidence and predictors for post-stroke epilepsy: a prospective controlled trial. The Akershus stroke study, *Eur J Neuro* 9:365–368.
- Lossius MI, Ronning OM, Slapo GD, Mowinckel P, Gjerstad L (2005, b) Poststroke epilepsy: occurrence and predictors—a long-term prospective controlled study (Akershus Stroke Study), *Epilepsia* 46:1246–1251.
- Love, S. Apoptosis and brain ischaemia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27: 267-82, 2003.
- Lu XC, Williams AJ, Tortella FC. (2001) Quantitative electroencephalography spectral analysis and topographic mapping in a rat model of middle cerebral artery occlusion. *Neuropathol Appl Neurobiol* 27:481-95.
- Luhmann HJ, Mudrick-Donnon LA, Mittmann T, Heinemann U. (1995) Ischaemia-induced long-term hyperexcitability in rat neocortex. *Eur J Neurosci* 7:180-91.
- Luparello, T. J. Stereotaxic atlas of the forebrain of the guinea pig. Basel, S. Krager. 1967.

- Macrae IM, Robinson MJ, Graham DI, Reid JL, McCulloch J. 1993. Endothelin-1-induced reductions in cerebral blood flow: dose dependency, time course, and neuropathological consequences. *J cereb blood flow metab* 13: 276-84
- Marchi N, Angelov L, Masaryk T, Fazio V, Granata T, Hernandez N, Hallene K, Diglaw T, Franic L, Najm I, Janigro D. (2007) Seizure-promoting effect of blood-brain barrier disruption. *Epilepsia* 48:732-42.
- Martin, L. J., Al-Abdulla, N. A., Brambrink, A. M., Kirsch, J. R., Sieber, F. E., and Portera-Cailliau, C. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull* 46: 281-309, 1998.
- Martins-Ferreira, H., Nedergaard, M., Nicholson, C., 2000. Perspectives on spreading depression. *Brain Res. Rev.* 32, 215-34.
- Martina, M., Royer, S., and Paré, D. Cell-Type-Specific GABA Responses and Chloride Homeostasis in the Cortex and Amygdala. *J Neurophysiol* 86: 2887-2895, 2001.
- Matz PG, Lewen A, Chan PH. (2001) Neuronal, but not microglial, accumulation of extravasated serum proteins after intracerebral hemolysate exposure is accompanied by cytochrome c release and DNA fragmentation. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:921-8.
- Mazzetti, S., Librizzi, L., Frigerio, S., de Curtis, M., and Vitellaro-Zuccarello, L. Molecular anatomy of the cerebral microvessels in the isolated guinea-pig brain. *Brain Res* 999: 81-90, 2004.
- McGee-Russell, S. M., Brown, A. W., and Brierley, J. B. A combined light and electron microscope study of early anoxic-ischaemic cell change in rat brain. *Brain Res* 20: 193-200, 1970.
- McIlvoy, L. H. The effect of hypothermia and hyperthermia on acute brain injury. *AACN Clin Issues* 16: 488-500, 2005.
- McIlwan, H. Metabolic response in vitro to electrical stimulation of sections of mammalian brain. *Biochem J* 48: lvi, 1951.
- Mello LE, Cavalheiro EA, Tan AM, Kupfer WR, Pretorius JK, et al. 1993. Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia* 34: 985-95
- Menna, G., Tong, C. K., and Chesler, M. Extracellular pH changes and accompanying cation shifts during ouabain-induced spreading depression. *J Neurophysiol* 83: 1338-45, 2000.
- Menon B, Shorvon SD. 2009. Ischaemic stroke in adults and epilepsy. *Epilepsy research* 87: 1-11
- Menzies, S. A., Betz, A. L., and Hoff, J. T. Contributions of ions and albumin to the formation and resolution of ischemic brain edema. *J Neurosurg* 78: 257-66, 1993.
- Mergenthaler, P., Dirnagl, U., and Meisel, A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Brain Dis* 19: 151-67, 2004.
- Meyer, G. and Wahle, P. The olfactory tubercle of the cat. I. Morphological components. *Exp Brain Res* 62: 515-27, 1986.
- Mhairs Macrae, I. New models of focal cerebral ischaemia. *Br J Clin Pharmacol* 34: 302-8, 1992.
- Michael S. Dittmar, Bijan Vatankeh Nando P. Fehm Gerhard Schuierer Ulrich Bogdahn Markus Horn and Felix Schlachetzki. Fischer-344 rats are unsuitable for the MCAO filament model due to their cerebrovascular anatomy *J Neurosci Meth* , 50-54. 2006.

- Mies, G., Iijima, T., and Hossmann, K. A. Correlation between peri-infarct DC shifts and ischaemic neuronal damage in rat. *Neuroreport* 4: 709-11, 1993.
- Minematsu K, L Li, CH Sotak, MA Davis, and M Fisher Reversible focal ischemic injury demonstrated by diffusion-weighted magnetic resonance imaging in rats *Stroke*, 1992; **23**: 1304-1310.
- Moosy, J. Pathology of cerebral atherosclerosis. Influence of age, race, and gender. *Stroke* 24: I22-3; I31-2, 1993.
- Moseley, M. E. Cohen, Y. Mintorovitch, J. Chileuitt, L. Shimizu, H. Kucharczyk, J. Wendland, M. F. Weinstein, P. R. Early detection of regional cerebral ischemia in cats: comparison of diffusion- and T2-weighted MRI and spectroscopy *Magn Reson Med* 1990: 330-46
- Muhlethaler, M., de Curtis, M., Walton, K., and Llinas, R. The isolated and perfused brain of the guinea-pig in vitro. *Eur J Neurosci* 5: 915-26, 1993.
- Nadler JV, Perry BW, Cotman CW. 1978. Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells. *Nature* 271: 676-7
- Nallet, H., MacKenzie, E. T., and Roussel, S. The nature of penumbral depolarizations following focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res* 842: 148-58, 1999.
- Nedergaard, M. Spreading depression as a contributor to ischemic brain damage. *Adv Neurol* 71: 75-83; discussion 83-4, 1996.
- Nedergaard, M Transient focal ischemia in hyperglycemic rats is associated with increased cerebral infarction *Brain Res* 1987 Apr 408 79-85
- Nedergaard, M. and Hansen, A. J. Characterization of cortical depolarizations evoked in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 13: 568-74, 1993.
- Nedergaard M. 1996. Spreading depression as a contributor to ischemic brain damage. *Adv neurol* 71: 75-83; discussion 83-4
- Neumann-Haefelin T, Hagemann G, Witte OW. 1995. Cellular correlates of neuronal hyperexcitability in the vicinity of photochemically induced cortical infarcts in rats in vitro. *Neuroscience letters* 193: 101-4
- Neumann-Haefelin, T., Kastrup, A., de Crespigny, A., Yenari, M.A., Ringer, T., Sun, G.H., Moseley, M.E., 2000. Serial MRI after transient focal cerebral ischemia in rats: dynamics of tissue injury, blood-brain barrier damage, edema formation. *Stroke* 31, 1965-72.
- Neumann-Haefelin, T., Wittsack, H.J., Wenserski, F., Siebler, M., Seitz, R., Moder, U., Freund, H.J., 1999. Diffusion perfusion weighted MRI The DWI/PWI mismatch region in acute stroke. *Stroke* 30, 1591-1597.
- Nicholson, C. Comparative neurophysiology of spreading depression in the cerebellum. *An Acad Bras Cienc* 56: 481-94, 1984.
- Nogawa, S., Zhang, F., Ross, M. E., and Iadecola, C. Cyclo-oxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. *J Neurosci* 17: 2746-55, 1997.
- Oliff, H. S. Coyle, P. Weber, E Rat strain and vendor differences in collateral anastomoses *J Cereb Blood Flow Metab* 1997: 571-6
- O'Neill, L. A. and Kaltschmidt, C. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci* 20: 252-8, 1997.

- Okada, Y., Copeland, B. R., Mori, E., Tung, M. M., Thomas, W. S., and del Zoppo, G. J. P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 expression after focal brain ischemia and reperfusion. *Stroke* 25: 202-11, 1994.
- Oppenheim, C., Stanescu, R., Dormont, D., Crozier, S., Marro, B., Samson, Y., Rancurel, G., Marsault, C., 2000. False-negative diffusion-weighted MR findings in acute ischemic stroke. *Am. J. Neuroradiol.* 21, 1434-40.
- Overgaard, K., Sereghy, T., Boysen, G., Pedersen, H., Hoyer, S., and Diemer, N. H. A rat model of reproducible cerebral infarction using thrombotic blood clot emboli. *J Cereb Blood Flow Metab* 12: 484-90, 1992.
- Papadopoulos, S. M., Chandler, W. F., Salamat, M. S., Topol, E. J., and Sackellares, J. C. Recombinant human tissue-type plasminogen activator therapy in acute thromboembolic stroke. *J Neurosurg* 67: 394-8, 1987.
- Park, C. K., Nehls, D. G., Teasdale, G. M., and McCulloch, J. Effect of the NMDA antagonist MK-801 on local cerebral blood flow in focal cerebral ischaemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 9: 617-22, 1989.
- Paschen, W., Mies, G., Hossmann, K-A., 1992. Threshold relationship between cerebral blood flow, glucose utilization, energy metabolites during development of stroke in gerbils. *Exp. Neurol.* 117, 325-333.
- Passero S, Rocchi R, Rossi S, Ulivelli M, Vatti G. Seizures after spontaneous supratentorial intracerebral hemorrhage. *Epilepsia* 43:1175-80, 2002.
- Pastori, C., Regondi, M.C., Librizzi, L. & de Curtis, M. Early excitability changes in a novel acute model of transient focal ischemia and reperfusion in the in vitro isolated guinea pig brain. *Exp Neurol*, 204, 95-105, 2007.
- Perrault P, Avoli M. 1992. 4-Aminopyridine-induced activity in hilar neurons in the guinea pig hippocampal slice. *J. Neurosci.* 12: 104-15
- Pettigrew, L. C.; Holtz, M. L.; Craddock, S. D.; Minger, S. L.; Hall, N.; Geddes, J. W. Microtubular proteolysis in focal cerebral ischemia *J Cereb Blood Flow Metab* 1189-2, 1996
- Philpot, B. D, Lim, J. H., Halpain, S., Brunjes, P. C. Experience-dependent modifications in MAP2 phosphorylation in rat olfactory bulb *J Neurosci* Dec 17 9596-604, 1997.
- Pickard, J.D., Gill, R., Sibson, N.R., Hatfield, R.H., Burdett, N.G., Carpenter, T.A., Hall, L.D., 1995. A comparison of the early development of ischaemic damage following permanent middle cerebral artery occlusion in rats as assessed using magnetic resonance imaging histology. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 15, 1-11.
- Pierpaoli, C., Righini, A., Linfante, I., Tao-Cheng, J.H., Alger, J.R., Di Chiro, G., Histopathologic correlates of abnormal water diffusion in cerebral ischemia: diffusion-weighted MR imaging light electron microscopic study. *Radiology* 1993, 189(2):439-48.
- Pitkanen A, Kharatishvili I, Karhunen H, Lukasiuk K, Immonen R, et al. 2007. Epileptogenesis in experimental models. *Epilepsia* 48 Suppl 2: 13-20
- Pitkänen A, KI, Nissinen J., McIntosh T.K. 2006. Posttraumatic Epilepsy Induced By Lateral Fluid-Percussion Brain Injury in Rats. In *Models of Seizures and Epilepsy*, ed. A Pitkanen, Schwartzkroin, P.A., Moshe, S.L., pp. 465-94: Elsevier Academic Press

- Prince DA, Parada I, Scalise K, Graber K, Jin X, Shen F. 2009. Epilepsy following cortical injury: cellular and molecular mechanisms as targets for potential prophylaxis. *Epilepsia* 50 Suppl 2: 30-40
- Pulsinelli, W. A. and Buchan, A. M. The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. *Stroke* 19: 913-4, 1988.
- Purdy, P. D., Devous, M. D. Sr, Batjer, H. H., White, C. L. 3rd, Meyer, Y., and Samson, D. S. Microfibrillar collagen model of canine cerebral infarction. *Stroke* 20: 1361-7, 1989.
- Raedt R, Van Dycke A, Van Melkebeke D, De Smedt T, Claeys P, et al. 2009. Seizures in the intrahippocampal kainic acid epilepsy model: characterization using long-term video-EEG monitoring in the rat. *Acta neurologica Scandinavica* 119: 293-303
- Richardson EP Jr, Dodge PR. (1954) Epilepsy in cerebral vascular disease; a study of the incidence and nature of seizures in 104 consecutive autopsy-proven cases of cerebral infarction and hemorrhage. *Epilepsia* 3:49-74.
- Robinson, M. J. McCulloch, J. Contractile responses to endothelin in feline cortical vessels in situ *J Cereb Blood Flow Metab* 1990, 10, 285-9
- Romanic, A. M., White, R. F., Arleth, A. J., Ohlstein, E. H., and Barone, F. C. Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size. *Stroke* 29: 1020-30, 1998.
- Roos, M. W., Ericsson, A., Berg, M., Sperber, G. O., Sjoquist, M., and Meyerson, B. J. Functional evaluation of cerebral microembolization in the rat. *Brain Res* 961: 15-21, 2003.
- Rosenberg, G. A., Navratil, M., Barone, F., and Feuerstein, G. Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 16: 360-6, 1996.
- Rother, J., de Crespigny, A.J., D'Arceuil, H., Mosley, M.E., 1996. MR detection of cortical spreading depression immediately after focal ischemia in the rat. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 16, 214-20.
- Rothwell, N. J. and Hopkins, S. J. Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action. *Trends Neurosci* 18: 130-6, 1995.
- Rudin, M. Baumann, D. Ekatodramis, D. Stirnimann, R. McAllister, K. H. Sauter, A. MRI analysis of the changes in apparent water diffusion coefficient, T(2) relaxation time, and cerebral blood flow and volume in the temporal evolution of cerebral infarction following permanent middle cerebral artery occlusion in rats *Exp Neurol* 2001, 169, 56-63
- Ruscher, K., Isaev, N., Trendelenburg, G., Weih, M., Iurato, L., Meisel, A., and Dirnagl, U. 1998 Induction of hypoxia inducible factor 1 by oxygen glucose deprivation is attenuated by hypoxic preconditioning in rat cultured neurons. *Neurosci Lett* 254: 117-20,.
- Sander JW. 2003. The natural history of epilepsy in the era of new antiepileptic drugs and surgical treatment. *Epilepsia* 44 Suppl 1: 17-20
- Sahuquillo, J. and Vilalta, A. 2007 Cooling the injured brain: how does moderate hypothermia influence the pathophysiology of traumatic brain injury. *Curr Pharm Des* 13: 2310-22.
- Sakatani, K., Iizuka, H., Young, W., 1990. Somatosensory evoked potentials in rat cerebral cortex before after middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 21, 124-32
- Sakuma M, Hyakawa N, Kato H, Araki T. (2008) Time dependent changes of striatal interneurons after focal cerebral ischemia in rats. *J. Neural Trasm* 115: 413-422.

- Salford, L. G., Plum, F., and Brierley, J. B. Graded hypoxia-oligemia in rat brain. II. Neuropathological alterations and their implications. *Arch Neurol* 29: 234-8, 1973.
- Samdani, A. F., Dawson, T. M., and Dawson, V. L. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke* 28: 1283-8, 1997.
- Schaller B, Graf R. 2004. Cerebral ischemia and reperfusion: the pathophysiologic concept as a basis for clinical therapy. *J Cereb Blood Flow Metab* 24: 351-71
- Scheller, D., Kolb, J., and Tegtmeier, F. Lactate and pH change in close correlation in the extracellular space of the rat brain during cortical spreading depression. *Neurosci Lett* 135: 83-6, 1992.
- Shih AY, Friedman B, Drew PJ, Tsai PS, Lyden PD, Kleinfeld D. (2009) Active dilation of penetrating arterioles restores red blood cell flux to penumbral neocortex after focal stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 29:738-51.
- Schwartz AE, Pile-Spellman J. (2011) New model of reperfused stroke by occlusion of the anterior cerebral artery in baboons. *Acta Neurochir* 153:327-31.
- Schwartzkroin PA, Prince DA. 1980. Changes in excitatory and inhibitory synaptic potentials leading to epileptogenic activity. *Brain research* 183: 61-76
- Silverman IE, Restrepo L, Mathews GC. (2002) Poststroke seizures. *Arch Neurol* 59:195-201.
- Siman, R.; Noszek, J. C. Excitatory amino acids activate calpain I and induce structural protein breakdown in vivo *Neuron* 1988 Jun 1 279-8 Smith, M. L., Auer, R. N., and Siesjo, B. K. The density and distribution of ischemic brain injury in the rat following 2-10 min of forebrain ischemia. *Acta Neuropathol* 64: 319-32, 1984.
- Sloviter RS. 2009. Experimental status epilepticus in animals: What are we modeling? *Epilepsia* 50 Suppl 12: 11-3
- Sloviter RS, Bumanglag AV. 2012. Defining "epileptogenesis" and identifying "antiepileptogenic targets" in animal models of acquired temporal lobe epilepsy is not as simple as it might seem. *Neuropharmacology*
- Smith, S.E. and Chesler, M. Effect of divalent cations on AMPA-evoked extracellular alkaline shifts in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 82: 1902-8, 1999.
- Snider B.J., Fank J. Gottron, Dennis W. Choi: Apoptosis and necrosis in cerebrovascular disease, *Ann N Y Acad Sci.* 1999, 893:243-53
- So EL, Annegers JF, Hauser WA, O'Brien PC, Whisnant JP. (1996) Population-based study of seizure disorders after cerebral infarction. *Neurology* 46:350-5.
- Somjen, G. G., Segal, M. B., and Herreras, O. Osmotic-hypertensive opening of the blood-brain barrier in rats does not necessarily provide access for potassium to cerebral interstitial fluid. *Experimental Physiology* 76: 507-14, 1991.
- Somjen GG, Muller M. 2000. Potassium-induced enhancement of persistent inward current in hippocampal neurons in isolation and in tissue slices. *Brain research* 885: 102-10
- Somjen GG. 2001. Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. *Physiol Rev* 81: 1065-96
- Sotak, C.H., 2004. Nuclear magnetic resonance (NMR) measurement of the apparent diffusion coefficient (ADC) of tissue water its relationship to cell volume changes in pathological states. *Neurochem Int.* 45, 569-82.

- Symon, L., Branston, N. M., Strong, A. J., and Hope, T. D. The concepts of thresholds of ischaemia in relation to brain structure and function. *J Clin Pathol Suppl* (R Coll Pathol) 11: 149-54, 1977.
- Stroemer RP, Kent TA, Hulsebosch CE. 1995. Neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery after neocortical infarction in rats. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 26: 2135-44
- Strong, A.J., Fabricius, M., Boutelle, M.G., Hibbins, S.J., Hopwood, S.E., Jones, R., Parkin, M.C., Lauritzen, M., 2002. Spreading synchronous depressions of cortical activity in acutely injured human brain. *Stroke* 33, 2738-43.
- Strong, A.J., Dardis, R., 2005. Depolarisation phenomena in traumatic ischaemic brain injury. *Adv. Tech. St. Neurosurg.* 30, 3-49.
- Sun, S.W., Neil, J.J., Liang, H.F., He, Y.Y., Schmidt, R.E., Hsu, C.Y., Song, S.K., 2005. Formalin fixation alters water diffusion coefficient magnitude but not anisotropy in infarcted brain. *Magn. Reson. Med.* 53, 1447-51.
- Suzuki N Bekkers JMMicrocircuits mediating feedforward and feedback synaptic inhibition in thepiriformcortex.*J Neurosci.*;2012, 32:919-31
- Szafer, A. Zhong, J. Gore, J. C. Theoretical model for water diffusion in tissues. *Magn Reson Med* 33 697-712; 1995
- Szaflarski JP, Rackley AY, Kleindorfer DO, Khoury J, Woo D, Miller R, Alwell K, Broderick JP, Kissela BM. (2008) Incidence of seizures in the acute phase of stroke: a population-based study. *Epilepsia* 49:974-81.
- Takano, K., Latour, L. L., Formato, J. E., Carano, R. A., Helmer, K. G., Hasegawa, Y., Sotak, C. H., and Fisher, M. The role of spreading depression in focal ischemia evaluated by diffusion mapping. *Ann Neurol* 39: 308-18, 1996.
- Takizawa, S., Hogan, M., and Hakim, A. M. The effects of a competitive NMDA receptor antagonist (CGS-19755) on cerebral blood flow and pH in focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 11: 786-93, 1991.
- Tamura, A., Graham, D. I., McCulloch, J., and Teasdale, G. M. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1: 53-60, 1981.
- Thom M, Mathern GW, Cross JH, Bertram EH. 2010. Mesial temporal lobe epilepsy: How do we improve surgical outcome? *Annals of neurology* 68: 424-34
- Thomas RJ. (1997) Seizures and epilepsy in the elderly. *Arch Intern Med* 157:605-17.
- Thurber SJ, Mikati MA, Stafstrom CE, Jensen FE, Holmes GL. 1994. Quisqualic acid-induced seizures during development: a behavioral and EEG study. *Epilepsia* 35: 868-75
- Tombaugh, G. C. Mild acidosis delays hypoxic spreading depression and improves neuronal recovery in hippocampal slices. *J Neurosci* 14: 5635-43, 1994.
- Tomkins O, Friedman O, Ivens S, Reiffurth C, Major S, Dreier JP, Heinemann U, Friedman A. (2007) Blood-brain barrier disruption results in delayed functional and structural alterations in the rat neocortex. *Neurobiol Dis* 25:367-77.
- Török, K., Stauffer, K., and Evans, W. H. Connexin 32 of gap junctions contains two cytoplasmic calmodulin-binding domains. *Biochemical Journal* 326 (Pt 2): 479-83, 1997.

- Tóth, K., Borthegy, Z., and Freund, T. F. Postsynaptic targets of GABAergic hippocampal neurons in the medial septum-diagonal band of Broca complex. *J. Neurosci.* 13: 3712-3724, 1993.
- Tóth, K., Freund, T., and Miles, R. (1997) Disinhibition of rat hippocampal pyramidal cells by GABAergic afferents from the septum. *J. Physiol.* 500: 463-474,.
- Trabka, W., Pijn, J. P., and Lopes da Silva, F. Spreading of epileptic afterdischarges between entorhinal cortex and hippocampus in acute experiments and the kindling model of epilepsy in the rat, comparing different methods of analysis. *Acta Physiologica Polonica* 40: 194-214, 1989.
- Traystman, R. J., Kirsch, J. R., and Koehler, R. C. (1991) Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol* 71: 1185-95.
- Tseng GF, Haberly LB. (1988) Characterization of synaptically mediated fast and slow inhibitory processes in piriform cortex in an in vitro slice preparation. *J Neurophysiol* 59:1352-76.
- Turski WA, Cavalheiro EA, Bortolotto ZA, Mello LM, Schwarz M, Turski L. 1984. Seizures produced by pilocarpine in mice: a behavioral, electroencephalographic and morphological analysis. *Brain research* 321: 237-53
- Umegaki, M., Sanada, Y., Waerzeggers, Y., Rosner, G., Yoshimine, T., Heiss, W.D., Graf, R., 2005. Peri-infarct depolarizations reveal penumbra-like conditions in striatum. *J. Neurosci.* 25, 1387-94.
- Uva, L. and de Curtis, M. Propagation pattern of entorhinal cortex subfields to the dentate gyrus in the guinea-pig: an electrophysiological study. *Neuroscience* 122: 843-51, 2003.
- Uva, L., Gruschke, S., Biella, G., De Curtis, M., and Witter, M. P. Cytoarchitectonic characterization of the parahippocampal region of the guinea pig. *J Comp Neurol* 474: 289-303, 2004.
- van Gijn J, Rinkel GJ. 2001. Subarachnoid haemorrhage: diagnosis, causes and management. *Brain : a journal of neurology* 124: 249-7
- van Groen, T., van Haren, F. J., Witter, M. P., and Groenewegen, H. J. Organization of the reciprocal connections between the subiculum and the entorhinal cortex in the cat: I. A neuroanatomical tracing study. *J Comp Neurol* 250: 485-497, 1986.
- Vespa PM, Nuwer MR, Nenov V, Ronne-Engstrom E, Hovda DA, Bergsneider M, Kelly DF, Martin NA, Becker DP. (1999) Increased incidence and impact of nonconvulsive and convulsive seizures after traumatic brain injury as detected by continuous electroencephalographic monitoring. *J Neurosurg* 91:750-60.
- Vespa PM, O'Phelan K, Shah M, Mirabelli J, Starkman S, Kidwell C, Saver J, Nuwer MR, Frazee JG, McArthur DA, Martin NA. (2003) Acute seizures after intracerebral hemorrhage: a factor in progressive midline shift and outcome. *Neurology* 60:1441-6.
- Vezzani A, French J, Bartfai T, Baram TZ. (2011) The role of inflammation in epilepsy. *Nat Rev Neurol* 7:31-40.
- Vornow JJ, Tasker RC Coyle JT. Delayed protection by MK-801 and tetrodotoxin in rat organotypic hippocampal culture model of ischemia. *Stroke* 25, 457-464. 94.
- Wester, P., Watson, B. D., Prado, R., and Dietrich, W. D. A photothrombotic 'ring' model of rat stroke-in-evolution displaying putative penumbral inversion. *Stroke* 26: 444-50, 1995a.

- Wester, P., Watson, B. D., Prado, R., and Dietrich, W. D. A photothrombotic 'ring' model of rat stroke-in-evolution displaying putative penumbral inversion. *Stroke* 26: 444-50, 1995b.
- Whittingham, T. S., Lust, W. D., and Passonneau, J. V. An in vitro model of ischemia: metabolic and electrical alterations in the hippocampal slice. *J Neurosci* 4: 793-802, 1984.
- Williams AJ, Lu XC, Hartings JA, Tortella FC.. Neuroprotection assessment by topographic electroencephalographic analysis: effects of a sodium channel blocker to reduce polymorphic delta activity following ischaemic brain injury in rats. *Fundamental & clinical pharmacology* 2003, 17: 581-93
- Williams AJ, Tortella FC, Lu XM, Moreton JE, Hartings JA.. Antiepileptic drug treatment of nonconvulsive seizures induced by experimental focal brain ischemia. *J pharmacol exper ther* 2004, 311: 220-7
- Willmore LJ. (1990) Post-traumatic epilepsy: cellular mechanisms and implications for treatment. *Epilepsia* 31 Suppl 3:S67-73.
- Windmuller, O., Lindauer, U., Foddiss, M., Einhaupl, K.M., Dirnagl, U., Heinemann, U., Dreier, J.P., Ion changes in spreading ischaemia induce rat middle cerebral artery constriction in the absence of NO. *Brain* 2005, 128, 2042-51.
- Wozny C, Gabriel S, Jandova K, Schulze K, Heinemann U, Behr J.. Entorhinal cortex entrains epileptiform activity in CA1 in pilocarpine-treated rats. *Neurobiology of disease* 2005, 19: 451-60
- Yamamoto, C. and McIlwain, H. Electrical activities in thin sections from the mammalian brain maintained in chemically-defined media in vitro. *J Neurochem* 13: 1333-43, 1966
- Yanagihara, T.; Brengman, J. M.; Mushynski, W. E. Differential vulnerability of microtubule components in cerebral ischemia *Acta Neuropathol* 1990, 80, 499-505
- Yang, Y., Yang, T., Li, Q., Wang, C. X., and Shuaib, A. A new reproducible focal cerebral ischemia model by introduction of polyvinylsiloxane into the middle cerebral artery: a comparison study. *J Neurosci Methods*, 2002, 118: 199-206.
- Yi Li, MD; Michael Chopp, PhD; Ning Jiang, MD; Zheng Gang Zhang, MD Cecylia Zaloga, BS, Induction of DNA Fragmentation *Stroke* 1995, 26:1252-1258;
- Yoshimi, K.; Takeda, M.; Nishimura, T.; Kudo, T.; Nakamura, Y.; Tada, K.; Iwata, N. An immunohistochemical study of MAP2 and clathrin in gerbil hippocampus after cerebral ischemia *Brain Res* 1991, 27 560 149-58
- Yoshimoto, S., Ishizaki, Y., Kurihara, H., Sasaki, T., Yoshizumi, M., Yanagisawa, M., Yazaki, Y., Masaki, T., Takakura, K., and Murota, S. Cerebral microvessel endothelium is producing endothelin. *Brain Res*, 1990, 508: 283-5.
- Yue, X., Mehmet, H., Penrice, J., Cooper, C., Cady, E., Wyatt, J. S., Reynolds, E. O., Edwards, A. D., and Squier, M. V. Apoptosis and necrosis in the newborn piglet brain following transient cerebral hypoxia-ischaemia. *Neuropathol Appl Neurobiol* 23: 16-25, 1997.
- Van Gijn J, Rinkel GJ. Subarachnoid hemorrhage: diagnosis, causes and management. *Brain*; 124: 298-78, 2001.
- Zeman W., J. R. M. Innes. Craigie's Neuroanatomy of the rat. 1963. Academic Press. NY, London
- Zhang, R., Chopp, M., Zhang, Z., Jiang, N., and Powers, C. The expression of P- and E-selectins in three models of middle cerebral artery occlusion. *Brain Res* 785: 207-14, 1998.

- Zivin, J. A., DeGirolami, U., Kochhar, A., Lyden, P. D., Mazzarella, V., Hemenway, C. C., and Henry, M. E. A model for quantitative evaluation of embolic stroke therapy. *Brain Res* 435: 305-9, 1987
- Zucca I., Mastropietro A, Breschi GL, Cattalini A, Bruzzone M, Spreafico R, de Curtis M. (2009) High field MRI on isolated ischemic brain model: comparison of MRI parameters at different time in paraformaldehyde and role of diffusion imaging in the evaluation of brain injury *in-vitro*. Abstract Eur. Soc. Mag. Res. Med. Biol. Congress, Antalya, Turkey.