



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΚΟΙΝΩΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ - ΨΥΧΙΑΤΡΙΚΗΣ ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΑΣ
Α' ΨΥΧΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Χ. ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ

**ΕΚΘΕΣΗ ΟΛΟΚΛΗΡΩΣΗΣ
ΤΗΣ ΜΕΤΑΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ:**

**«ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΚΑΤΕΧΟΛΑΜΙΝΙΚΩΝ ΝΕΥΡΩΝΩΝ
ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΕΡΙΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΥΠΟΞΙΑ:
ΠΡΩΙΜΟΣ ΕΚΦΥΛΙΣΜΟΣ Ή ΚΑΘΥΣΤΕΡΗΣΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ;»**

**ΤΗΣ Δρ. ΜΑΡΙΑΝΝΑΣ Α. ΠΑΓΙΔΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΥ**

Η εκπόνηση της παρούσας μεταδιδακτορικής έρευνας υλοποιήθηκε με υποτροφία του Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών η οποία χρηματοδοτήθηκε από την Πράξη «Ενίσχυση Μεταδιδακτόρων Ερευνητών/Ερευνητριών» από τους πόρους του ΕΠ «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση» με άξονες προτεραιότητας 6,8,9 και συγχρηματοδοτείται από το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο (ΕΚΤ) και το Ελληνικό Δημόσιο (ΜΙΣ: 5001552).

ΑΘΗΝΑ 2019

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πειραματικά μοντέλα περιγεννητικής υποξίας/ισχαιμίας (ΠΥΙ) υποδεικνύουν ειδικές -μακράς διάρκειας- αλλοιώσεις όχι μόνο στον ιππόκαμπο (περιοχή που πρώτη εμφανίζει νέκρωση σε υποξικές συνθήκες), αλλά και στα κατεχολαμινικά συστήματα του εγκεφάλου που διατηρούνται μέχρι την ενήλικη ζωή (Bjelke et al., 1991; Buller et al., 2008; Burke et al., 1992; Chen et al., 1997). Υποξικές βλάβες κατά τον τοκετό αλληλεπιδρούν με το στρες με αποτέλεσμα να τροποποιούν τη ντοπαμινεργική λειτουργία του εγκεφάλου σε όλη τη μετέπειτα ζωή (Boksa and El-Khodor, 2003). Είναι ευρέως γνωστό ότι δυσλειτουργία των ντοπαμινεργικών συστημάτων παρατηρείται στην παθοφυσιολογία πολλών νευρολογικών [π.χ. νόσος Πάρκινσον (Rizzi and Tan, 2017)] και ψυχικών [π.χ. σχιζοφρένεια (Howes et al., 2015; Weinstein et al., 2017) και ΔΕΠΥ (Gonon, 2009)] νοσημάτων, ενώ τα ντοπαμινεργικά συστήματα εμπλέκονται και στη φαρμακευτική τους αντιμετώπιση (Boksa and El-Khodor, 2003; Gonon, 2009).

Προηγούμενες μελέτες μας σε ανθρώπινο νεκροτομικό υλικό έδειξαν ότι η ΠΥΙ ανάλογα με την ένταση/ διάρκεια ή χρονιότητά της –όπως αυτή εκτιμήθηκε με νευροπαθολογικά κριτήρια- είχε διαφορετική επίδραση στους κυτταρικούς και μοριακούς μηχανισμούς που ρυθμίζουν τη σύνθεση της υδροξυλάσης της τυροσίνης (TH, πρώτο και καθοριστικό ένζυμο της σύνθεσης κατεχολαμινών) στις διάφορες περιοχές του εγκεφάλου (Ganou et al., 2010; Pagida et al., 2016; Pagida et al., 2013a; Pagida et al., 2013b; Pagida et al., 2013c). Στον μεσεγκέφαλο νεογνών με νευροπαθολογικές αλλοιώσεις παρατεταμένης/ χρόνιας ΠΥΙ, παρατηρήθηκε δραματική μείωση ή και απώλεια της έκφρασης της TH στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες του μεσεγκεφάλου, υποδεικνύοντας μια πιθανή πρόωμη δυσλειτουργία της ντοπαμινεργικής νευρομεταβίβασης υπό συνθήκες παρατεταμένης διάρκειας ΠΥΙ. Παράλληλα, στη πλειοψηφία των νεογνών αυτών, βρέθηκε μείωση της TH-ανοσοθετικότητας και στους νοραδρενεργικούς νευρώνες του υπομέλανα τόπου (LC), περιοχή που εμπλέκεται στην αιτιοπαθογένεια της νόσου του Πάρκινσον, της νόσου Alzheimer και της κατάθλιψης (Pagida et al., 2016).

Μια άλλη πολύ σημαντική παρατήρηση ήταν ότι το κυτταρικό μέγεθος τόσο των νευρώνων της SN, όσο και του LC ήταν σημαντικά μικρότερο σε σχέση με αυτό που μετρήθηκε στα νεογνά με μικρής διάρκειας ΠΥΙ (Pagida et al., 2016; Pagida et al., 2013b). Το ερώτημα που προέκυψε ήταν εάν αυτή η σημαντική μείωση του μεγέθους των νευρώνων της SN και του LC, καθώς και της δυνατότητάς τους να συνθέτουν ντοπαμίνη και νοραδρεναλίνη, αντίστοιχα, αντανακλά ένα πρώιμο στάδιο εκφυλισμού ή καθυστέρηση της φυσιολογικής ανάπτυξης των νευρώνων αυτών. Σκοπός της παρούσας μεταδιδακτορικής έρευνας ήταν να διερευνηθεί με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους: Α) η πιθανή ενεργοποίηση του κυτταρικού θανάτου και Β) η εξέταση του σταδίου ωρίμανσης και διαφοροποίησης των νευρώνων της SN και του LC μετά από διαφορετικής έντασης/ διάρκειας ΠΥΙ.

Συγκεκριμένα, στη παρούσα εργασία μελετήσαμε:

- **την ενεργοποιημένη κασπάση-3 (CCP3, cleaved caspase-3)**

Η κασπάση-3 αποτελεί μια από τις κύριες εκτελεστικές πρωτεΐνες της απόπτωσης παίζοντας σημαντικό ρόλο στην έναρξη και ρύθμιση των πρωτεολυτικών γεγονότων που οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο (Thornberry, 1999). Η ανίχνευση της CCP3 αποτελεί ένα σημαντικό και ειδικό εργαλείο για την ανίχνευση νευρώνων που βρίσκονται στα πρώτα στάδια της απόπτωσης, ακόμα και πριν εμφανιστούν τα τυπικά μορφολογικά χαρακτηριστικά της, όπως διάσπαση της χρωματίνης (Machaalani et al., 2007).

- **τον παράγοντα επαγωγής απόπτωσης (AIF, apoptosis-inducing factor)**

Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος μπορεί να συμβεί και χωρίς την εμπλοκή των κασπασών, με κύριο εκτελεστικό μόριο θανάτου τον AIF (Joza et al., 2001; Susin et al., 1999). Ο AIF είναι μια οξειδοαναγωγή που φυσιολογικά εδράζεται στα μιτοχόνδρια και εμπλέκεται στη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Όμως όταν ο AIF μετακινηθεί στον πυρήνα των κυττάρων, τότε ενεργοποιεί μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου (Bano and Prehn, 2018; Boujrad et al., 2007; Cande et al., 2002).

- **τη διάσπαση της χρωματίνης (DNA fragmentation)**

Η διάσπαση της χρωματίνης αποτελεί ένα κύριο μορφολογικό χαρακτηριστικό που σχετίζεται με αποπτωτικούς μηχανισμούς. Μελετήθηκε χρησιμοποιώντας την

τεχνική TUNEL (technique of terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated in corporation of digoxigenin-labeled nucleotide), μια in situ τεχνική σήμανσης των άκρων του DNA (Gavrieli et al., 1992; Hara et al., 1999; Stadelmann and Lassmann, 2000).

- **τη πρωτεΐνη LC3 (microtubule-associated light chain 3 protein)**

Ενώ ο κυτταρικός θάνατος μέσω της νέκρωσης και της απόπτωσης είναι ευρέως γνωστός και καλά μελετημένος στα μοντέλα ΠΥΙ, η σημαντικότητα του κυτταρικού θανάτου μέσω της αυτοφαγίας αποτελεί ένα πρόσφατο πεδίο ενδιαφέροντος (Descloux et al., 2015). Η πρωτεΐνη LC3, που χρησιμοποιείται ευρέως ως ένας ανοσοϊστοχημικός δείκτης αυτοφαγίας, εμπλέκεται στη φάση σχηματισμού ενός αυτοφαγοσώματος. Αρχικά παράγεται η κυτταροπλασματική της μορφή LC3-I, η οποία μετατρέπεται στην LC3-II που αποτελεί μέρος της μεμβράνης των αυτοφαγοσωμάτων (Uchiyama et al., 2008b).

- **τη μεμβρανική πρωτεΐνη των λυσοσωμάτων (LAMP-1, lysosomal membrane protein 1).**

Το ένζυμο LAMP-1 εντοπίζεται στα λυσοσώματα και στα αυτολυσοσώματα κατά το τελικό στάδιο της αυτοφαγίας. Ο δείκτης αυτός είναι χρήσιμος για να μπορέσουμε να εκτιμήσουμε –συνδυαστικά με την LC3- τη ροή αυτοφαγίας (autophagic flux), δηλαδή εάν προχωράει κανονικά η διαδικασία αυτή με το σχηματισμό αυτολυσοσωμάτων ή υπάρχει πρόβλημα, π.χ. συσσώρευση αυτοφαγοσωμάτων (Descloux et al., 2015; Ginet et al., 2014).

- **τη β-tubulin isotype III (TuJ1).**

Είναι μια κυτταροσκελετική πρωτεΐνη που χρησιμοποιείται ευρέως ως δείκτης νευρωνικής ωριμότητας (Yu et al., 2009).

- **τη πυρηνική πρωτεΐνη ειδική για νευρώνες (NeuN)**

Αποτελεί δείκτη νευρωνικής ωριμότητας (Sarnat et al., 1998).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Νεκροτομικό υλικό εγκεφάλων από 28 ανθρώπινα βρέφη (14 αρσενικά και 14 θηλυκά) με συνολική διορθωμένη ηλικία (εβδομάδων κύησης + μεταγεννητικής) από 25.5 έως 46.5 εβδομάδων, συλλέχθηκε από το τμήμα Α΄ Παθολογικής

Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών σε συνεργασία με την Ελληνική Τράπεζα Εγκεφαλικού Ιστού (Greek Brain Bank, μέλος της Brain-Net Europe). Μέρος του υλικού έχει ήδη χρησιμοποιηθεί στις προηγούμενες μελέτες μας (Pagida et al., 2016; Pagida et al., 2013b; Pagida et al., 2013c). Το νεκροτομικό υλικό λήφθηκε κατόπιν γραπτής συγκατάθεσης των γονέων τους για χρήση του εγκεφαλικού ιστού για διαγνωστικούς και ερευνητικούς σκοπούς.

Η νεκροψία και η νευροπαθολογική εκτίμηση της ΠΥΙ βλάβης πραγματοποιήθηκε από την καθ. Α. Κωνσταντινίδου (Α΄ εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή Αθηνών) που έχει εξειδικευτεί στην εμβρυϊκή και περιγεννητική παθολογοανατομία. Η εκτίμηση της έντασης και διάρκειας της ΠΥΙ βλάβης βασίστηκε σε εδραιωμένα νευροπαθολογικά κριτήρια (Fallet-Bianco, 2005; Rorke-Adams et al., 2007; Squier, 2004), λαμβάνοντας υπόψη τη κατανομή της νευρωνικής νέκρωσης σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου. Τρεις βαθμοί υποξίας αναγνωρίστηκαν: βαθμός 1: έντονη/ μικρής έντασης ΠΥΙ βλάβη, βαθμός 2: ήπια/ παρατεταμένης διάρκειας ΠΥΙ βλάβη και βαθμός 3: πολύ σοβαρή/ μακράς διάρκειας/παλαιάς ΠΥΙ βλάβη.

Λαμβάνοντας υπόψη την ύπαρξη περιορισμών στη χρήση ανθρώπινου υλικού και θεωρώντας ότι όλα τα νεογνά που ικανοποιούσαν τα κριτήρια ένταξης στο υλικό μας είχαν υποστεί σε κάποιο βαθμό υποξία, περιστατικά που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως «μάρτυρες» είναι πολύ δύσκολο να συμπεριληφθούν στη μελέτη αυτή. Στο δείγμα μας, μόνο δύο νεογνά, τα GBB 170/16 και GBB 274/17, που πέθαναν ενδομητρίως και είχαν ενδείξεις οξείας ασφυξίας, αλλά χωρίς στοιχεία νευροπαθολογικής ΠΥΙ βλάβης σε συγκεκριμένες εγκεφαλικές περιοχές, χρησιμοποιήθηκαν ως «μάρτυρες» για τους σκοπούς της μελέτης αυτής.

Οι ιστοί από την περιοχή του μεσεγκεφάλου και της γέφυρας μονιμοποιήθηκαν σε ουδέτερη φορμόλη, εγκλείστηκαν σε μπλοκ παραφίνης και κόπηκαν σε συνεχόμενες τομές των 7μm σε όλη την προσθιο-οπίσθια έκταση του μεσεγκεφάλου και της γέφυρας. Για τη μελέτη της κυτταροαρχιτεκτονικής και την αναγνώριση των μεσεγκεφαλικών και γεφυρικών πυρήνων, μια τομή ανά 100 σε όλη την προσθιο-οπίσθια έκτασή τους, αντίστοιχα, χρώσθηκαν με την ιστολογική χρώση cresyl violet/

luxol fast blue (CV/LFB) με την οποία βάφονται γαλάζιες οι ίνες και μωβ τα κύτταρα [για το πρωτόκολλο δείτε (Pagida et al., 2013b)].

Ανοσοϊστοχημικά δύο κεντρικά επίπεδα της SN και του LC χρησιμοποιήθηκαν. Συνοπτικά, εννιά διπλανές μεταξύ τους τομές χρώσθηκαν αντίστοιχα ως εξής: α) Αιματοξυλίνη/Ηωσίνη (H/E) για τη συνήθη ιστολογική εκτίμηση (Pagida et al., 2016), β) και γ) CCP3 με δύο διαφορετικά πολυκλωνικά αντίσωματα (Asp175, #9661, Cell Signaling Technology και #559565, clone C92-605, BD Biosciences, αντίστοιχα), δ) TUNEL (S7100, ApopTag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, Merck, Germany), ε) AIF (AB16501, Merck, Germany), στ) LC3 (PM036, MBL), ζ) LAMP-1 (sc-20011, Santa Cruz), η) Tuj-1 (MMS-435P, Covance BioLegend) και θ) panNeuronal marker (MAB2300, Millipore).

Τα αποτελέσματά μας εκτιμήθηκαν ημιποσοτικά και μορφομετρική ανάλυση έγινε μόνο στις τομές που χρώσθηκαν με AIF. Σε αυτές μετρήθηκε η κυτταροπλασματική ένταση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης (optical density, OD) του AIF και του μεγέθους των κυττάρων και των πυρήνων τους. Επίσης, το ποσοστό των νευρώνων με πυρηνική AIF-χρώση εκτιμήθηκε μετρώντας όλους τους νευρώνες με πυρηνική AIF-χρώση σε σχέση με το συνολικό αριθμό AIF-θετικών νευρώνων (είτε με βαμμένο ή με άβαφο πυρήνα) σε 10 τυχαία επιλεγμένα πεδία μεγέθους X200 στη περιοχή της SN και του LC. Για τη στατιστική ανάλυση, χρησιμοποιήθηκε το μη-παραμετρικό τεστ Spearman με τη βοήθεια του προγράμματος SPSS (v. 18.0.0, Chicago, IL, USA). Το $p < 0.05$ θεωρήθηκε ως στατιστικά σημαντικό.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

A) ΜΕΛΕΤΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΘΑΝΑΤΟΥ ΣΤΟΥΣ ΝΕΥΡΩΝΕΣ ΤΗΣ SN ΚΑΙ ΤΟΥ LC

1. Ενεργοποιημένη Κασπάση-3 [Cleaved Caspase-3 (CCP3)]

Στο μεσεγκέφαλο του ανθρώπινου νεογνού, δεν βρέθηκε CCP3-ανοσοϊστοχημική χρώση στους νευρώνες της SN και του LC, ανεξάρτητα από τη σοβαρότητα/διάρκεια της νευροπαθολογικής ΠΥΙ βλάβης. Μερικά CCP3-ανοσοθετικά γλοιακά κύτταρα παρατηρήθηκαν σποραδικά στη SN κάποιων περιστατικών.

2. TUNEL χρώση στη SN του ανθρώπινου νεογνού

Τυπική εικόνα αποπτωτικής μορφολογίας στον πυρήνα, όπως συμπεραίνεται όταν η TUNEL-χρώση είναι έντονη και πυκνή, βρέθηκε σε πολύ λίγους νευρώνες με πυκνωτικά χαρακτηριστικά στη SN περιστατικών με ΠΥΙ. Η πλειοψηφία των TUNEL-θετικών νευρώνων παρουσίαζαν μία διάχυτη, χαλαρή κατανομή της πυρηνικής χρωματίνης, που δεν ήταν η αναμενόμενη μορφολογία της κλασικής απόπτωσης (πύκνωση χρωματίνης ή/και σχηματισμός αποπτωτικών σωματίων).

3. Apoptosis Inducing Factor (AIF)

Στη SN του ανθρώπινου νεογνού, η πλειοψηφία των νευρώνων εμφάνιζε μια κοκκιώδη AIF-ανοσοϊστοχημική χρώση τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στις αποφυάδες τους, μια κατανομή που ομοιάζει με εκείνη των μιτοχονδρίων. Η κυτταροπλασματική ένταση της AIF-χρώσης εμφάνιζε ιδιαίτερη διακύμανση μεταξύ των νεογνών του δείγματός μας. Σε ένα μικρό αριθμό νευρώνων παρατηρήθηκε πυρηνική AIF- χρώση.

Η μορφομετρική ανάλυση των νευρώνων της SN έδειξε ότι τα νεογνά με μόλυνση στην περιφέρεια ή/και στον εγκέφαλο είχαν υψηλότερες τιμές AIF OD στο κυτταρόπλασμά τους ($\rho=0.477$, $p=0.029$). Στατιστική σημαντική συσχέτιση βρέθηκε επίσης μεταξύ του μεγέθους του κυττάρου και του πυρήνα με την ηλικία κύησης ($\rho=0.768$, $p<0.001$; $\rho=0.764$, $p<0.001$), τη μεταγεννητική ηλικία ($\rho=0.469$, $p=-0.027$; $\rho=-0.482$, $p=-0.023$) και το βάρος εγκεφάλου ($\rho=0.776$, $p<0.001$, $\rho=0.816$, $p<0.001$, αντίστοιχα).

Στον LC, η ένταση της κυτταροπλασματικής χρώσης για AIF επίσης εμφάνιζε ιδιαίτερη διακύμανση μεταξύ των περιστατικών του δείγματός μας. Η μορφομετρική ανάλυση έδειξε ότι η ένταση της AIF-χρώσης αυξάνεται όταν υπάρχει μόλυνση ($\rho=0.489$, $p=0.018$). Επίσης, μείωση του κυτταρικού και πυρηνικού μεγέθους των LC νευρώνων βρέθηκε αυξανόμενου του βαθμού της ΠΥΙ βλάβης ($\rho=0.548$, $p=-0.007$ και $\rho=0.487$, $p=-0.019$, αντίστοιχα). Επίσης, βρέθηκε μεγάλο ποσοστό νευρώνων με πυρηνική AIF-χρώση, που συσχέτισθηκε θετικά με το βαθμό υποξίας ($\rho=0.486$, $p=0.019$).

B) ΜΕΛΕΤΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΑΥΤΟΦΑΓΙΑΣ ΣΤΗ SN ΚΑΙ ΤΟΝ LC

1. Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3)

Στη SN του ανθρώπινου νεογνού, διακύμανση παρατηρήθηκε ως προς την ένταση της LC3-χρώσης ανάμεσα στα περιστατικά του δείγματός μας, η οποία κυρίως ήταν διάχυτη και ομοιόμορφα κατανεμημένη στο κυτταρόπλασμα και πιο σπάνια στον πυρήνα των κυττάρων.

Αντίθετα, οι νευρώνες του LC συνήθως παρουσίαζαν στικτή LC3-χρώση.

2. Lysosomal membrane protein 1 (LAMP1)

Στη SN του ανθρώπινου νεογνού, δεν παρατηρήθηκε θετική χρώση για LAMP1 στους νευρώνες των περιστατικών που μελετήθηκαν. Σε κάποια περιστατικά, παρατηρήθηκε LAMP1-ανοσοαντίδραση στα γλοιακά κύτταρα της SN. Η χρώση ήταν στικτή με τη παρουσία πολυάριθμων, πολύ μικρών κοκκίων, κατανομή που θύμιζε εκείνη των λυσοσωμάτων.

Στον LC του ανθρώπινου νεογνού, παρατηρήθηκε μια αχνή, κοκκιώδης χρώση στο κυτταρόπλασμα των LC νευρώνων μερικών νεογνών. Επίσης, σε κάποια περιστατικά, παρατηρήθηκε LAMP1-ανοσοαντίδραση στα γλοιακά κύτταρα.

ΣΥΓΚΡΙΣΗ LC3 και LAMP1-ανοσοθετικότητας στον LC

Περιστατικά με διάχυτη χρώση για LC3 στους νευρώνες του LC, εμφάνιζαν παράλληλα και μια αχνή LAMP1-χρώση στο κυτταρόπλασμα. Αντίθετα, περιστατικά με λίγα LC3-θετικά κοκκία στο κυτταρόπλασμα, παρατηρήθηκε απουσία της LAMP1-χρώσης.

Γ) ΜΕΛΕΤΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΗ SN ΚΑΙ ΤΟ LC

1. β -tubulin isotype III (Tuj1)

Στη περιοχή της SN του ανθρώπινου νεογνού, απουσία ή πολύ αχνή ανοσοϊστοχημική αντίδραση για Tuj1 βρέθηκε σε όλα τα περιστατικά του δείγματός μας, ανεξάρτητα από το βαθμό ΠΥΙ βλάβης.

Απουσία χρώσης για Tuj1 βρέθηκε στον LC σε όλα τα περιστατικά του δείγματός μας.

2. PanNeuronal Marker-NeuN

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι οι SN νευρώνες δεν βιάφονται, σε αντίθεση με τους κινητικούς νευρώνες του κοινού κινητικού πυρήνα. Αυτό φαίνεται να είναι μια «ιδιομορφία» των ντοπαμινεργικών νευρώνων, που αναφέρεται και στη SN ενηλίκων (Korzhevskii et al., 2017; Sukhorukova, 2013).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη παρούσα εργασία μελετήθηκαν για πρώτη φορά δείκτες απόπτωσης, αυτοφαγίας και ανάπτυξης τόσο στον μεσεγκέφαλο, όσο και τη γέφυρα του ανθρώπινου νεογνού, με σκοπό να αποκαλυφθούν μηχανισμοί που πιθανώς εμπλέκονται στη μείωση της TH-ανοσοθετικότητας και του μεγέθους των νευρώνων της SN και του LC μετά από ΠΥΙ βλάβη (Pagida et al., 2013b). Ένα κύριο εύρημα ήταν ότι οι αποπτωτικοί μηχανισμοί που ενεργοποιούνται εμπλέκουν κυρίως τον AIF και όχι τη CCP3.

1. Cleaved Caspase-3 (CCP3)

Στη παρούσα μελέτη, παρατηρήσαμε μόνο μερικά γλοιακά κύτταρα θετικά για CCP3, ενώ οι νευρώνες τόσο στη SN, όσο και στον LC ήταν αρνητικοί, κάτι που επιβεβαιώθηκε με τη χρήση δύο CCP3 αντισωμάτων διαφορετικής μάρκας.

Στη SN, ένα μεγάλος αριθμός CCP3-ανοσοθετικών νευρώνων έχει αναφερθεί σε πρόωρα νεογνά προβάτου μετά από περίδεση του ομφάλιου λώρου, προκαλώντας σοβαρής μορφής εμβρυϊκή ασφυξία κατά το τελευταίο διάστημα της κύησης (Castillo-Melendez et al., 2004). Κυτταρικός θάνατος με χαρακτηριστικά απόπτωσης, όπως μελετήθηκε με χρώση silver και με *in situ* 3'-end-labeling του DNA, έχει επίσης περιγραφεί στη SN του αρουραίου μετά από ΠΥΙ βλάβη (Oo et al., 1995). Αντίστοιχες μελέτες δεν υπάρχουν για τη περιοχή του LC, αν και έχει αναφερθεί σημαντική μείωση του αριθμού των TH-νευρώνων στον LC μετά από πειραματικά-επαγόμενη ΠΥΙ (Buller et al., 2008; Chen et al., 1997).

Η έκφραση της κασπάσης-3 φαίνεται να ρυθμίζεται από την ηλικία (Blomgren et al., 2001; Hu et al., 2000; Wang et al., 2001; Zhu et al., 2000; Zhu et al., 2005). Στην SN του αρουραίου, οι νευρώνες υφίστανται αποπτωτικό θάνατο στα πλαίσια της φυσιολογικής ωρίμανσής της σε δύο φάσεις (τη μεταγεννητική ημέρα 2 και 14).

Εφόσον στον αρουραίο, η SN αποκτά την ενήλικη κατανομή των TH-ανοσοθετικών νευρώνων κατά τη μεταγεννητική ημέρα 14 (Oo and Burke, 1997; Terper et al., 1994), οι δύο πρώτες εβδομάδες της ζωής του αρουραίου είναι σημαντικές για να καθοριστεί ο τελικός αριθμός νευρώνων και γλοίας που σχηματίζουν και ελέγχουν το ντοπαμινεργικό κύκλωμα στον εγκέφαλο του αρουραίου (Bandeira et al., 2009; Chocyk et al., 2011). Στον άνθρωπο, όμως, η SN εμφανίζει την ενήλικη κατανομή των ντοπαμινεργικών νευρώνων πριν τη γέννηση του ατόμου, κατά τον 4^ο μήνα της κύησης (Verney, 1999). Σε έμβρυα ηλικίας 20-24 εβδομάδων, παρατηρείται ευρεία TH-ανοσοθετική εννεύρωση του πρόσθιου φλοιού συγκρίσιμη με αυτή που παρατηρείται στον ενήλικα (Verney, 1999). Επίσης, και οι νευρώνες του LC φθάνουν στο πρότυπο της ενήλικης κατανομής το 4^ο μήνα της κύησης (Verney, 1999; Verney et al., 1991). Δεδομένου ότι η διορθωμένη (προγεννητική + μεταγεννητική) ηλικία των περιστατικών στο δείγμα μας κυμαινόταν από 25.5 έως 46.5 εβδομάδες, αναμένουμε ένα σχεδόν «ώριμο» ντοπαμινεργικό σύστημα σε όλα τα περιστατικά, όπως αναφέρεται σε προηγούμενες μελέτες μας (Pagida et al., 2016; Pagida et al., 2013b). Συνεπώς, η απουσία ανιχνεύσιμης CCP3 πιθανώς υποδεικνύει ότι η CCP3 δεν χρειάζεται πλέον σε αυτούς τους κατεχολαμινικούς νευρώνες του ανθρώπινου νεογνού, πιθανώς λόγω της μείωσης της έκφρασής της σε αυτό το αναπτυξιακό στάδιο.

2. TUNEL χρώση

Τα αποτελέσματά μας για τη CCP3 είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που βρήκαμε με τη χρώση TUNEL. Στη μελέτη μας, πολύ λίγοι SN νευρώνες παρατηρήθηκαν με πυρηνική TUNEL χρώση που ήταν ενδεικτική της αποπτωτικής μορφολογίας, δηλαδή πυρηνική πύκνωση και σχηματισμός μαζών (clumping) χρωματίνης, μαζί με πυκνωτικό κυτταρόπλασμα. Πολλοί νευρώνες εμφάνιζαν μια διάχυτη, χαλαρή πυρηνική TUNEL-χρώση, που δεν σχετίζεται με απόπτωση, η ένταση της οποίας φαίνεται ότι εξαρτάται από το βαθμό της ΠΥΙ. Μη-αποπτωτικές TUNEL-χρωσμένες μορφές έχουν περιγραφεί σε φυσιολογικό και υπό νευροεκφύλιση εγκεφαλικό ιστό (Anderson et al., 2000; Anderson et al., 1996; Gleckman et al., 1999; Lucassen et al., 1995; Vis et al., 2005) και θεωρούνται ότι

υποδεικνύουν συσσώρευση DNA βλάβης -λόγω προβλημάτων στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA- σε συνδυασμό με την ενεργοποίηση ή τη διακοπή μέρους του αποπτωτικού προγράμματος (Anderson et al., 2000; Gleckman et al., 1999). Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι η ακεραιότητα του DNA μπορεί να ανακτηθεί μετά την υποξία, κάτι που έχει παρατηρηθεί σε πολλές περιοχές του νεογνικού εγκεφάλου γουρουινών μετά από υποξία (David and Grongnet, 2000), υποδηλώνοντας ότι οι βλάβες μπορούν να διορθωθούν από τους ενδογενείς μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA και συνεπώς, να είναι ένα αντιστρεπτό φαινόμενο (Torres et al., 2015). Εκτεταμένη όμως βλάβη στο DNA, μπορεί να προκαλέσει την ενεργοποίηση ενός κυτταρικού προγράμματος θανάτου που εμπλέκεται ο παράγοντας PARP-1 [poly(ADP-ribose) polymerase], που είναι ανεξάρτητο από τις κασπάσες, αλλά εξαρτάται από τον AIF (Ame et al., 2004; Yu et al., 2002).

3. Apoptosis Inducing Factor (AIF)

Στη SN και το LC, στη πλειοψηφία των νευρώνων βρέθηκε AIF-χρώση αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμά τους, η ένταση της οποίας εμφάνιζε ιδιαίτερη διακύμανση μεταξύ των περιστατικών του δείγματος μας, ακόμα και μεταξύ των δύο νεογνών «μάρτυρες». Εφόσον ο AIF φυσιολογικά εμπλέκεται στη διατήρηση ή/και οργάνωση του μιτοχονδριακού αναπνευστικού συμπλέγματος I [for review, (Bano and Prehn, 2018)], η παρατηρούμενη διακύμανση μπορεί απλά να αντανακλά διαφορές στην μεταβολική/ ενεργειακή κατάσταση της SN ανάμεσα στα περιστατικά, υπό ένα μεικτό γενετικό υπόβαθρο (Benit et al., 2008). Ωστόσο, η AIF-ανοσοθετικότητα βρέθηκε να είναι υψηλότερη σε περιστατικά με παρατεταμένης διάρκειας ΠΥΙ βλάβη, η πλειοψηφία των οποίων είχε επίσης διάγνωση περιφερικής ή εγκεφαλικής μόλυνσης. Πρόσφατες μελέτες προτείνουν ότι η φλεγμονή και η ΠΥΙ μπορούν να προκαλέσουν αθροιστικά μεγαλύτερη εγκεφαλική βλάβη μέσω κοινών κυτταρικών και μοριακών μονοπατιών, εμπλέκοντας τη παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) και έτσι, να οδηγήσουν σε μείωση του κατωφλιού που η ΠΥΙ από μόνη της προκαλεί βλάβη (Coimbra-Costa et al., 2017; Novak et al., 2018; Ugwumadu, 2006; Zhao et al., 2013).

Περιγεννητική έκθεση στο λιποπολυσακχαρίτη (LPS), που οδηγεί σε φλεγμονή, προκαλεί μείωση της TH-ανοσοθετικότητας στους νευρώνες του LC και της SN του αρουραίου κατά την ενηλικίωση (Tien et al., 2017). Συνεπώς, η παρουσία μόλυνσης εν μέρει μπορεί να εξηγήσει τη μείωση της TH-ανοσοθετικότητας και στο δικό μας υλικό, όπως παρατηρήθηκε σε προηγούμενη μελέτη μας (Pagida et al., 2016; Pagida et al., 2013b).

Υψηλά επίπεδα AIF μπορούν να καταστήσουν τους νευρώνες τόσο της SN, όσο και του LC ευάλωτους στο θάνατο μέσω AIF. Στη SN του ανθρώπινου νεογνού δεν παρατηρήθηκε μεγάλος αριθμός νευρώνων με πυρηνική AIF-χρώση. Αντίθετα, στον LC, βρέθηκε υψηλότερος αριθμός που εξαρτιόταν από το βαθμό υποξίας και το φύλο. Πράγματι, ο LC είναι ιδιαίτερα ευάλωτος στην ΠΥΙ. Ενεργοποιείται μετά από οξεία υποξία (Breen et al., 1997; Nitsos and Walker, 1999) και ακόμα και μετά από ήπιας έντασης ΠΥΙ, προκαλείται μακροχρόνια μείωση στον αριθμό των νοραδρενεργικών νευρώνων στον LC (Buller et al., 2008; Chen et al., 1997).

Απελευθέρωση και μετακίνηση του AIF στον πυρήνα, με απουσία ενεργοποίησης της κασπάσης-3, έχει παρατηρηθεί στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες της SN τρωκτικών μετά από βλάβη με ροτενόνη (Lim et al., 2007), 6-υδροξυ-ντοπαμίνη (6-OHDA) (Kim et al., 2011) ή έγχυση MPTP (Wang et al., 2003), που χρησιμοποιούνται ως πειραματικά μοντέλα της νόσου Πάρκινσον. Στο 6-OHDA πειραματικό μοντέλο, οι ντοπαμινεργικοί SN νευρώνες με πυρηνική εντόπιση του AIF εμφάνιζαν χαμηλά επίπεδα έκφρασης της TH (Kim et al., 2011).

4. Δείκτες Αυτοφαγίας LC3 και LAMP1

Επαγωγή του μηχανισμού της αυτοφαγίας περιγράφεται σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου πειραματοζώων μετά από ΠΥΙ, κυρίως στον ιππόκαμπο και το φλοιό (Carlioni et al., 2008; Ginet et al., 2014; Ginet et al., 2009; Koike et al., 2008; Shi et al., 2012; Uchiyama et al., 2008a; Weis et al., 2014).

Στη παρούσα μελέτη, διερευνήσαμε ανοσοϊστοχημικά την έκφραση της LC3, που αποτελεί τη πιο συχνή μέθοδο εντοπισμού αυτοφαγοσωμάτων στο οπτικό μικροσκόπιο (Kabeya et al., 2000; Rosenfeldt et al., 2012), παράλληλα με έναν

δείκτη λυσοσωμάτων, το LAMP1 στο μεσεγκέφαλο και τη γέφυρα του ανθρώπινου νεογνού, περιοχές που δεν έχουν μελετηθεί στα πειραματικά μοντέλα ΠΥΙ.

Τα ευρήματά μας στον ανθρώπινο νεογνικό εγκέφαλο έδειξαν ότι υπάρχουν διαφορετικά πρότυπα κατανομής της LC3, όσο και μεγάλη διακύμανση της έντασης της LC3-χρώσης μεταξύ των περιστατικών στις περιοχές που μελετήσαμε. Η LC3-χρώση ήταν συνήθως διάχυτη, ομοιόμορφα κατανεμημένη στους νευρώνες της SN, σε αντίθεση με τη στικτή χρώση που βρήκαμε στους νευρώνες του LC. Ανοσοϊστοχημικά μια διάχυτη χρώση στο κυτταρόπλασμα υποδηλώνει τη παρουσία της LC3-I, ενώ στικτή χρώση υποδεικνύει παραγωγή της LC3-II και συνεπώς, το σχηματισμό αυτοφαγοσωμάτων (Rosenfeldt et al., 2012).

Η παρουσία στικτής χρώσης LC3 δεν υποδηλώνει απαραίτητα ότι ο ιστός περιέχει υψηλά επίπεδα ενεργής και επιτυχούς αυτοφαγίας. Ο σχηματισμός των αυτοφαγοσωμάτων αποτελεί ένα ενδιάμεσο βήμα στη διαδικασία της αυτοφαγίας. Μπορεί να συσσωρεύονται λόγω επαγωγής της αυτοφαγίας ή της ύπαρξης της βασικής φυσιολογικής αυτοφαγίας, δηλαδή επειδή έχει ανασταλεί η διαδικασία σε μετέπειτα στάδιο. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι μπορεί να υπάρχει πρόβλημα στο στάδιο της ένωσης με τα λυσοσώματα ή να υπάρχει καταστολή της ενεργότητας των λυσοσωμάτων (Rosenfeldt et al., 2012). Συνεπώς, χρειάζεται η συνδυαστική μελέτη και άλλων δεικτών για την εξαγωγή συμπερασμάτων.

Απουσία έκφρασης LAMP1 παρατηρήθηκε στη περιοχή της SN, ενώ μια αχνή, στικτή χρώση διαπιστώθηκε στον LC κάποιων περιστατικών. Η παρουσία LAMP1-χρώσης υπό τη μορφή κοκκίων υποδηλώνει ότι τα λυσοσώματα παραμένουν άθικτα (Ginet et al., 2009).

Συνεπώς, με βάση τις δύο αυτές χρώσεις, τα πρώτα μας αποτελέσματα υποδεικνύουν την ενεργοποίηση μηχανισμών αυτοφαγίας στους νευρώνες του LC, σε αντίθεση με τους νευρώνες της SN. Στη SN ενήλικων ατόμων χωρίς νευροπαθολογικές αλλοιώσεις, έχει παρατηρηθεί ανοσοθετικότητα για LAMP-1 (διάχυτη στικτή χρώση) τόσο στους SN νευρώνες με μελανίνη, όσο και χωρίς (Chu et al., 2009; Gurney et al., 2018). Μείωση στην έκφραση της LAMP1 βρέθηκε τόσο στη SN παρκινσονικών ασθενών (Chu et al., 2009), όσο και με νόσο Lewy body (Gurney et al., 2018). Στον αρουραίο, υψηλή έκφραση της LAMP1, επίσης, ανιχνεύεται

φυσιολογικά στους SN νευρώνες. Μετά, όμως, από βλάβη των SN νευρώνων λόγω υπερέκφρασης της α -συνουκλείνης σε αυτούς, παρατηρείται μείωση της LAMP1 έκφρασης, παράλληλα με απώλεια του ~60% των TH-IR νευρώνων (Chu et al., 2009). Το ερώτημα λοιπόν που τίθεται είναι εάν η απουσία χρώσης για LAMP1 στους SN νευρώνες του ανθρώπινου νεογνού υποδηλώνει μια πρόιμη βλάβη στα λυσοσώματα που οδηγεί σε συσσώρευση/αύξηση της LC3 σε κάποια περιστατικά λόγω της επίδρασης της ΠΥΙ ή αποτελεί ένα αναπτυξιακό φαινόμενο και υπάρχουν άλλοι δείκτες λυσοσωμάτων που εκφράζονται κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, κάτι που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης με άλλους δείκτες λυσοσωμάτων.

5. Tuj1

Η β -tubulin III (Tuj1), ένα ενδιάμεσο ινίδιο του κυτταροσκελετού, παράγεται αποκλειστικά στους μετα-μιτωτικούς νευρώνες και θεωρείται δείκτης ανώριμων νευρώνων. Στη παρούσα μελέτη, δεν βρέθηκε Tuj1-χρώση στους νευρώνες της SN και του LC του ανθρώπινου νεογνού που πιθανώς υποδεικνύει ότι οι νευρώνες αυτοί είναι ώριμοι. Αντίθετα, έντονη χρώση παρατηρήθηκε στα Purkinje κύτταρα ενήλικης παρεγκεφαλίδας, που χρησιμοποιήθηκε ως ιστολογικός «μάρτυρας» της χρώσης.

ΣΥΝΟΨΗ/ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα τελευταία χρόνια, τα πειραματικά μοντέλα χρησιμοποιούνται ευρέως για τη μελέτη και την κατανόηση των μηχανισμών που ενεργοποιούνται μετά την Υ/Ι βλάβη. Αν και οι μελέτες αυτές είναι πολύ σημαντικές γιατί δίνουν τη δυνατότητα να ανακαλυφθούν νέες φαρμακευτικές θεραπείες, δεν αντανακλούν απόλυτα την παθοφυσιολογία του ανθρώπινου εγκεφάλου μετά από ΠΥΙ.

Στη παρούσα μελέτη, δείξαμε ότι στον μεσεγκέφαλο και τη γέφυρα του ανθρώπινου νεογνού, ο AIF παίζει κεντρικό ρόλο στους αποπτωτικούς μηχανισμούς που ενεργοποιούνται μετά από ΠΥΙ, και όχι η κασπάση-3. Η παρουσία φλεγμονής/μόλυνσης, σε συνδυασμό με την ΠΥΙ, φαίνεται ότι προκαλούν αύξηση της έκφρασης του AIF στο κυτταρόπλασμα των νευρώνων της SN και του LC, που

πιθανώς αυξάνει την ευαλωτότητά τους στο θάνατο μέσω AIF. Στον ποντικό, η πυρηνική εντόπιση του AIF έχει συσχετισθεί με μειωμένη έκφραση της TH στους νευρώνες της SN μετά από βλάβη, ενώ δεν έχει μελετηθεί στον LC.

Επίσης, τα πρώτα ευρήματα υποδηλώνουν προβλήματα στην ενεργότητα των λυσοσωμάτων στους νευρώνες της SN που μπορεί να οδηγούν σε αποτυχία των μηχανισμών αυτοφαγίας, σε αντίθεση με το LC που φαίνεται ότι η αυτοφαγία λειτουργεί κανονικά. Η ενεργοποίηση/δυσλειτουργία των μηχανισμών αυτοφαγίας έχει συσχετισθεί με μειωμένη έκφραση της TH (Chu et al., 2009; Gurney et al., 2018) στους νευρώνες της SN και πιθανώς μπορούν να εξηγήσουν την μειωμένη TH-ανοσοθετικότητα που παρατηρήθηκε στη SN του ανθρώπινου νεογνού σε προηγούμενη μελέτη μας (Pagida et al., 2013b).

Η απουσία Tuj1- ανοσοαντίδρασης υποδηλώνει πιθανώς ότι δεν υπάρχει καθυστέρηση ανάπτυξης και συνεπώς, η μείωση του μεγέθους των SN νευρώνων στην παρατεταμένη υποξία πιθανώς σχετίζεται με την έλλειψη ενέργειας στη SN και τον LC. Είναι γνωστό ότι η χρόνια υποξία προκαλεί μια προσαρμοστική μείωση του μεταβολισμού (Hochachka et al., 1994). Μείωση στο κυτταρικό μέγεθος των TH-ανοσοθετικών νευρώνων έχει περιγραφεί στο LC ανθρώπων μεγάλης ηλικίας (Chan-Palay and Asan, 1989), που είναι γνωστό ότι σταδιακά εμφανίζουν μειωμένη αιματική ροή στον εγκέφαλο (Alosco et al., 2013; Sabayan et al., 2013).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alosco M. L., Gunstad J., Jerskey B. A., Xu X., Clark U. S., Hassenstab J., Cote D. M., Walsh E. G., Labbe D. R., Hoge R., Cohen R. A. and Sweet L. H. The adverse effects of reduced cerebral perfusion on cognition and brain structure in older adults with cardiovascular disease. *Brain Behav* 2013, 3(6): 626-36.
- Ame J. C., Spenlehauer C. and de Murcia G. The PARP superfamily. *Bioessays* 2004, 26(8): 882-93.
- Anderson A. J., Stoltzner S., Lai F., Su J. and Nixon R. A. Morphological and biochemical assessment of DNA damage and apoptosis in Down syndrome and Alzheimer disease, and effect of postmortem tissue archival on TUNEL. *Neurobiol Aging* 2000, 21(4): 511-24.
- Anderson A. J., Su J. H. and Cotman C. W. DNA damage and apoptosis in Alzheimer's disease: colocalization with c-Jun immunoreactivity, relationship to brain area, and effect of postmortem delay. *J Neurosci* 1996, 16(5): 1710-9.
- Bandeira F., Lent R. and Herculano-Houzel S. Changing numbers of neuronal and non-neuronal cells underlie postnatal brain growth in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106(33): 14108-13.

- Bano D. and Prehn J. H. M. Apoptosis-Inducing Factor (AIF) in Physiology and Disease: The Tale of a Repented Natural Born Killer. *EBioMedicine* 2018, 30: 29-37.
- Benit P., Goncalves S., Dassa E. P., Briere J. J. and Rustin P. The variability of the harlequin mouse phenotype resembles that of human mitochondrial-complex I-deficiency syndromes. *PLoS One* 2008, 3(9): e3208.
- Bjelke B., Andersson K., Ogren S. O. and Bolme P. Asphyctic lesion: proliferation of tyrosine hydroxylase-immunoreactive nerve cell bodies in the rat substantia nigra and functional changes in dopamine neurotransmission. *Brain Res* 1991, 543(1): 1-9.
- Blomgren K., Zhu C., Wang X., Karlsson J. O., Leverin A. L., Bahr B. A., Mallard C. and Hagberg H. Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of "pathological apoptosis"? *J Biol Chem* 2001, 276(13): 10191-8.
- Boksa P. and El-Khodor B. F. Birth insult interacts with stress at adulthood to alter dopaminergic function in animal models: possible implications for schizophrenia and other disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 2003, 27(1-2): 91-101.
- Boujrad H., Gubkina O., Robert N., Krantic S. and Susin S. A. AIF-mediated programmed necrosis: a highly regulated way to die. *Cell Cycle* 2007, 6(21): 2612-9.
- Breen S., Rees S. and Walker D. Identification of brainstem neurons responding to hypoxia in fetal and newborn sheep. *Brain Res* 1997, 748(1-2): 107-21.
- Buller K. M., Wixey J. A., Pathipati P., Carty M., Colditz P. B., Williams C. E. and Scheepens A. Selective losses of brainstem catecholamine neurons after hypoxia-ischemia in the immature rat pup. *Pediatr Res* 2008, 63(4): 364-9.
- Burke R. E., Macaya A., DeVivo D., Kenyon N. and Janec E. M. Neonatal hypoxic-ischemic or excitotoxic striatal injury results in a decreased adult number of substantia nigra neurons. *Neuroscience* 1992, 50(3): 559-69.
- Cande C., Cecconi F., Dessen P. and Kroemer G. Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *J Cell Sci* 2002, 115(Pt 24): 4727-34.
- Carloni S., Buonocore G. and Balduini W. Protective role of autophagy in neonatal hypoxia-ischemia induced brain injury. *Neurobiol Dis* 2008, 32(3): 329-39.
- Castillo-Melendez M., Chow J. A. and Walker D. W. Lipid peroxidation, caspase-3 immunoreactivity, and pyknosis in late-gestation fetal sheep brain after umbilical cord occlusion. *Pediatr Res* 2004, 55(5): 864-71.
- Chan-Palay V. and Asan E. Quantitation of catecholamine neurons in the locus coeruleus in human brains of normal young and older adults and in depression. *J Comp Neurol* 1989, 287(3): 357-72.
- Chen Y., Herrera-Marschitz M., Bjelke B., Blum M., Gross J. and Andersson K. Perinatal asphyxia-induced changes in rat brain tyrosine hydroxylase-immunoreactive cell body number: effects of nicotine treatment. *Neurosci Lett* 1997, 221(2-3): 77-80.
- Chocyk A., Dudys D., Przyborowska A., Majcher I., Mackowiak M. and Wedzony K. Maternal separation affects the number, proliferation and apoptosis of glia cells in the substantia nigra and ventral tegmental area of juvenile rats. *Neuroscience* 2011, 173: 1-18.
- Chu Y., Dodiya H., Aebischer P., Olanow C. W. and Kordower J. H. Alterations in lysosomal and proteasomal markers in Parkinson's disease: relationship to alpha-synuclein inclusions. *Neurobiol Dis* 2009, 35(3): 385-98.
- Coimbra-Costa D., Alva N., Duran M., Carbonell T. and Rama R. Oxidative stress and apoptosis after acute respiratory hypoxia and reoxygenation in rat brain. *Redox Biol* 2017, 12: 216-25.
- David J. C. and Grongnet J. F. Effect of hypoxia on DNA fragmentation in different brain regions of the newborn piglet. *Mol Reprod Dev* 2000, 57(2): 153-8.

- Descloux C., Ginet V., Clarke P. G., Puyal J. and Truttmann A. C. Neuronal death after perinatal cerebral hypoxia-ischemia: Focus on autophagy-mediated cell death. *Int J Dev Neurosci* 2015, 45: 75-85.
- Fallet-Bianco C. (2005). Diagnosis and dating of hypoxic-ischemic encephalopathy 20th European Congress of Pathology, Paris, France.
- Ganou Vassiliki, Pagida Marianna A., Konstantinidou Anastasia E., Malidelis Yiannis I., Kontostavlaki Dimitra P., Tsekoura Effrossini, Patsouris Efstratios and Panayotacopoulou Maria T. Increased Expression of Tyrosine Hydroxylase in the Supraoptic Nucleus of the Human Neonate Under Hypoxic Conditions: A Potential Neuropathological Marker for Prolonged Perinatal Hypoxia. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 2010, 69(10): 1008-16.
- Gavrieli Y., Sherman Y. and Ben-Sasson S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992, 119(3): 493-501.
- Ginet V., Pittet M. P., Rummel C., Osterheld M. C., Meuli R., Clarke P. G., Puyal J. and Truttmann A. C. Dying neurons in thalamus of asphyxiated term newborns and rats are autophagic. *Ann Neurol* 2014, 76(5): 695-711.
- Ginet V., Puyal J., Clarke P. G. and Truttmann A. C. Enhancement of autophagic flux after neonatal cerebral hypoxia-ischemia and its region-specific relationship to apoptotic mechanisms. *Am J Pathol* 2009, 175(5): 1962-74.
- Gleckman A. M., Jiang Z., Liu Y. and Smith T. W. Neuronal and glial DNA fragmentation in Pick's disease. *Acta Neuropathol* 1999, 98(1): 55-61.
- Gonon F. The dopaminergic hypothesis of attention-deficit/hyperactivity disorder needs re-examining. *Trends Neurosci* 2009, 32(1): 2-8.
- Gurney R., Davidson Y. S., Robinson A. C., Richardson A., Jones M., Snowden J. S. and Mann D. M. A. Lysosomes, autophagosomes and Alzheimer pathology in dementia with Lewy body disease. *Neuropathology* 2018, 38(4): 347-60.
- Hara A., Niwa M., Iwai T., Nakashima M., Bunai Y., Uematsu T., Yoshimi N. and Mori H. Neuronal apoptosis studied by a sequential TUNEL technique: a method for tract-tracing. *Brain Res Brain Res Protoc* 1999, 4(2): 140-6.
- Hochachka P. W., Clark C. M., Brown W. D., Stanley C., Stone C. K., Nickles R. J., Zhu G. G., Allen P. S. and Holden J. E. The brain at high altitude: hypometabolism as a defense against chronic hypoxia? *J Cereb Blood Flow Metab* 1994, 14(4): 671-9.
- Howes O., McCutcheon R. and Stone J. Glutamate and dopamine in schizophrenia: an update for the 21st century. *J Psychopharmacol* 2015, 29(2): 97-115.
- Hu B. R., Liu C. L., Ouyang Y., Blomgren K. and Siesjo B. K. Involvement of caspase-3 in cell death after hypoxia-ischemia declines during brain maturation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000, 20(9): 1294-300.
- Joza N., Susin S. A., Daugas E., Stanford W. L., Cho S. K., Li C. Y., Sasaki T., Elia A. J., Cheng H. Y., Ravagnan L., Ferri K. F., Zamzami N., Wakeham A., Hakem R., Yoshida H., Kong Y. Y., Mak T. W., Zuniga-Pflucker J. C., Kroemer G. and Penninger J. M. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 2001, 410(6828): 549-54.
- Kabeya Y., Mizushima N., Ueno T., Yamamoto A., Kirisako T., Noda T., Kominami E., Ohsumi Y. and Yoshimori T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 2000, 19(21): 5720-8.
- Kim T. W., Moon Y., Kim K., Lee J. E., Koh H. C., Rhyu I. J., Kim H. and Sun W. Dissociation of progressive dopaminergic neuronal death and behavioral impairments by Bax deletion in a mouse model of Parkinson's diseases. *PLoS One* 2011, 6(10): e25346.
- Koike M., Shibata M., Tadakoshi M., Gotoh K., Komatsu M., Waguri S., Kawahara N., Kuida K., Nagata S., Kominami E., Tanaka K. and Uchiyama Y. Inhibition of autophagy prevents

- hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury. *Am J Pathol* 2008, 172(2): 454-69.
- Korzhevskii D. E., Grigor'ev I. P., Sukhorukova E. G. and Gusel'nikova V. V. [Immunohistochemical characteristics of the substantia nigra neurons of the human]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova* 2017, 117(4): 50-55.
- Lim M. L., Mercer L. D., Nagley P. and Beart P. M. Rotenone and MPP+ preferentially redistribute apoptosis-inducing factor in apoptotic dopamine neurons. *Neuroreport* 2007, 18(4): 307-12.
- Lucassen P. J., Chung W. C., Vermeulen J. P., Van Lookeren Campagne M., Van Dierendonck J. H. and Swaab D. F. Microwave-enhanced in situ end-labeling of fragmented DNA: parametric studies in relation to postmortem delay and fixation of rat and human brain. *J Histochem Cytochem* 1995, 43(11): 1163-71.
- Machaalani R., Rodriguez M. and Waters K. A. Active caspase-3 in the sudden infant death syndrome (SIDS) brainstem. *Acta Neuropathol* 2007, 113(5): 577-84.
- Nitsos I. and Walker D. W. The distribution of FOS-immunoreactive neurons in the brainstem, midbrain and diencephalon of fetal sheep in response to acute hypoxia in mid and late gestation. *Brain Res Dev Brain Res* 1999, 114(1): 9-26.
- Novak C. M., Ozen M. and Burd I. Perinatal Brain Injury: Mechanisms, Prevention, and Outcomes. *Clin Perinatol* 2018, 45(2): 357-75.
- Oo T. F. and Burke R. E. The time course of developmental cell death in phenotypically defined dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Brain Res Dev Brain Res* 1997, 98(2): 191-6.
- Oo T. F., Henchcliffe C. and Burke R. E. Apoptosis in substantia nigra following developmental hypoxic-ischemic injury. *Neuroscience* 1995, 69(3): 893-901.
- Pagida M. A., Konstantinidou A. E., Korelidou A., Katsika D., Tsekoura E., Patsouris E. and Panayotacopoulou M. T. The Effect of Perinatal Hypoxic/Ischemic Injury on Tyrosine Hydroxylase Expression in the Locus Coeruleus of the Human Neonate. *Dev Neurosci* 2016, 38(1): 41-53.
- Pagida M. A., Konstantinidou A. E., Malidelis Y. I., Ganou V., Tsekoura E., Patsouris E. and Panayotacopoulou M. T. The human neurosecretory neurones under perinatal hypoxia: a quantitative immunohistochemical study of the supraoptic nucleus in autopsy material. *J Neuroendocrinol* 2013a, 25(12): 1255-63.
- Pagida M. A., Konstantinidou A. E., Tsekoura E., Mangoura D., Patsouris E. and Panayotacopoulou M. T. Vulnerability of the mesencephalic dopaminergic neurons of the human neonate to prolonged perinatal hypoxia: an immunohistochemical study of tyrosine hydroxylase expression in autopsy material. *J Neuropathol Exp Neurol* 2013b, 72(4): 337-50.
- Pagida M. A., Konstantinidou A. E., Tsekoura E., Patsouris E. and Panayotacopoulou M. T. Immunohistochemical demonstration of urocortin 1 in Edinger-Westphal nucleus of the human neonate: colocalization with tyrosine hydroxylase under acute perinatal hypoxia. *Neurosci Lett* 2013c, 554: 47-52.
- Rizzi G. and Tan K. R. Dopamine and Acetylcholine, a Circuit Point of View in Parkinson's Disease. *Front Neural Circuits* 2017, 11: 110.
- Rorke-Adams L., Larroche J.C. and de Vries L. (2007). Fetal and neonatal brain damage. Potter's Pathology of the fetus, infant and child. E. Gilbert-Barness. Philadelphia, Mosby- Elsevier. 2: 2027-53.
- Rosenfeldt M. T., Nixon C., Liu E., Mah L. Y. and Ryan K. M. Analysis of macroautophagy by immunohistochemistry. *Autophagy* 2012, 8(6): 963-9.

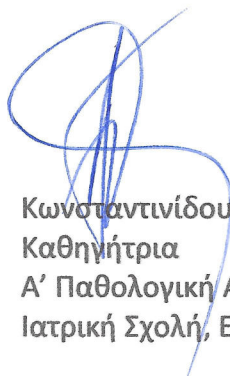
- Sabayan B., van der Grond J., Westendorp R. G., Jukema J. W., Ford I., Buckley B. M., Sattar N., van Osch M. J., van Buchem M. A. and de Craen A. J. Total cerebral blood flow and mortality in old age: a 12-year follow-up study. *Neurology* 2013, 81(22): 1922-9.
- Sarnat H. B., Nochlin D. and Born D. E. Neuronal nuclear antigen (NeuN): a marker of neuronal maturation in early human fetal nervous system. *Brain Dev* 1998, 20(2): 88-94.
- Shi R., Weng J., Zhao L., Li X. M., Gao T. M. and Kong J. Excessive autophagy contributes to neuron death in cerebral ischemia. *CNS Neurosci Ther* 2012, 18(3): 250-60.
- Squier W. (2004). Gray matter lesions. Pathology and Genetics, Developmental Neuropathology. J. Golden and B. Harding. Basel, ISN Neuropathology Press: 171-75.
- Stadelmann C. and Lassmann H. Detection of apoptosis in tissue sections. *Cell Tissue Res* 2000, 301(1): 19-31.
- Sukhorukova E. G. [NeuN nuclear protein in neurons of human brain substantia nigra]. *Morfologiya* 2013, 143(2): 78-80.
- Susin S. A., Lorenzo H. K., Zamzami N., Marzo I., Snow B. E., Brothers G. M., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D. R., Aebersold R., Siderovski D. P., Penninger J. M. and Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999, 397(6718): 441-6.
- Tepper J. M., Damlama M. and Trent F. Postnatal changes in the distribution and morphology of rat substantia nigra dopaminergic neurons. *Neuroscience* 1994, 60(2): 469-77.
- Thornberry N. A. Caspases: a decade of death research. *Cell Death Differ* 1999, 6(11): 1023-7.
- Tien L. T., Lee Y. J., Pang Y., Lu S., Lee J. W., Tseng C. H., Bhatt A. J., Savich R. D. and Fan L. W. Neuroprotective Effects of Intranasal IGF-1 against Neonatal Lipopolysaccharide-Induced Neurobehavioral Deficits and Neuronal Inflammation in the Substantia Nigra and Locus Coeruleus of Juvenile Rats. *Dev Neurosci* 2017, 39(6): 443-59.
- Torres G., Leheste J. R. and Ramos R. L. Immunocytochemical localization of DNA double-strand breaks in human and rat brains. *Neuroscience* 2015, 290: 196-203.
- Uchiyama Y., Koike M. and Shibata M. Autophagic neuron death in neonatal brain ischemia/hypoxia. *Autophagy* 2008a, 4(4): 404-8.
- Uchiyama Y., Shibata M., Koike M., Yoshimura K. and Sasaki M. Autophagy-physiology and pathophysiology. *Histochem Cell Biol* 2008b, 129(4): 407-20.
- Ugwumadu A. Infection and fetal neurologic injury. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2006, 18(2): 106-11.
- Verney C. Distribution of the catecholaminergic neurons in the central nervous system of human embryos and fetuses. *Microsc Res Tech* 1999, 46(1): 24-47.
- Verney C., Zecevic N., Nikolic B., Alvarez C. and Berger B. Early evidence of catecholaminergic cell groups in 5- and 6-week-old human embryos using tyrosine hydroxylase and dopamine-beta-hydroxylase immunocytochemistry. *Neurosci Lett* 1991, 131(1): 121-4.
- Vis J. C., Schipper E., de Boer-van Huizen R. T., Verbeek M. M., de Waal R. M., Wesseling P., ten Donkelaar H. J. and Kremer B. Expression pattern of apoptosis-related markers in Huntington's disease. *Acta Neuropathol* 2005, 109(3): 321-8.
- Wang H., Shimoji M., Yu S. W., Dawson T. M. and Dawson V. L. Apoptosis inducing factor and PARP-mediated injury in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2003, 991: 132-9.
- Wang X., Karlsson J. O., Zhu C., Bahr B. A., Hagberg H. and Blomgren K. Caspase-3 activation after neonatal rat cerebral hypoxia-ischemia. *Biol Neonate* 2001, 79(3-4): 172-9.

- Weinstein J. J., Chohan M. O., Slifstein M., Kegeles L. S., Moore H. and Abi-Dargham A. Pathway-Specific Dopamine Abnormalities in Schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2017, 81(1): 31-42.
- Weis S. N., Toniazzo A. P., Ander B. P., Zhan X., Careaga M., Ashwood P., Wyse A. T., Netto C. A. and Sharp F. R. Autophagy in the brain of neonates following hypoxia-ischemia shows sex- and region-specific effects. *Neuroscience* 2014, 256: 201-9.
- Yu S. W., Wang H., Poitras M. F., Coombs C., Bowers W. J., Federoff H. J., Poirier G. G., Dawson T. M. and Dawson V. L. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 2002, 297(5579): 259-63.
- Yu Z. Q., Zha J. H., Liu H. M., Ding Y. X., Wang Y. Q., Wang H. J. and Gao D. S. Effect of intranigral injection of GDNF and EGF on the survival and possible differentiation fate of progenitors and immature neurons in 6-OHDA-lesioned rats. *Neurochem Res* 2009, 34(12): 2089-101.
- Zhao J., Chen Y., Xu Y. and Pi G. Effect of intrauterine infection on brain development and injury. *Int J Dev Neurosci* 2013, 31(7): 543-9.
- Zhu C., Wang X., Hagberg H. and Blomgren K. Correlation between caspase-3 activation and three different markers of DNA damage in neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *J Neurochem* 2000, 75(2): 819-29.
- Zhu C., Wang X., Xu F., Bahr B. A., Shibata M., Uchiyama Y., Hagberg H. and Blomgren K. The influence of age on apoptotic and other mechanisms of cell death after cerebral hypoxia-ischemia. *Cell Death Differ* 2005, 12(2): 162-76.

Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ



Παναγιωτακοπούλου Μ.
Καθηγήτρια
Α΄ Ψυχιατρική Κλινική,
Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
Επιβλέπων Μέλος ΔΕΠ



Κωνσταντινίδου Α.
Καθηγήτρια
Α΄ Παθολογική Ανατομική
Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ



Σταματάκης Α.
Αναπληρωτής Καθηγητής
Τμήμα Νοσηλευτικής,
ΕΚΠΑ