



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Farmacologia ed Anestesiologia

DOTTORATO DI RICERCA IN: Scienze farmacologiche

INDIRIZZO: Farmacologia, Tossicologia e Terapia

CICLO XXIV

**LA TOSSICITA' DEGLI ANESTETICI GENERALI SUL CERVELLO  
DI TOPO IN VIA DI SVILUPPO**

**Tecniche per lo studio del danno neuronale dopo esposizione ad  
anestetici generali**

**Direttore della Scuola:** Ch.mo Prof. Pietro Giusti

**Coordinatore:** Ch.mo Prof. Pietro Palatini

**Supervisore:** Ch.mo Prof. Carlo Ori

**Dottorando:** Nadia Lunardi

# PARTE I

## BREVE PREMESSA SUI PRINCIPALI MECCANISMI DI FUNZIONAMENTO DEGLI ANESTETICI GENERALI

Nonostante l'utilizzo quotidiano degli anestetici generali nella pratica clinica e più di 100 anni di ricerca, i meccanismi molecolari di azione degli anestetici generali rimangono uno dei misteri irrisolti della farmacologia moderna.

L'anestesia generale può essere definita come una depressione reversibile del sistema nervoso centrale, indotta da farmaci, che risulta nella perdita di coscienza e di risposta a vari stimoli esterni. A complicare lo studio dei meccanismi di azione degli anestetici generali vi sono le diverse componenti dell'anestesia, che comprendono l'incoscienza, l'amnesia, l'analgesia, l'immobilità (o paralisi muscolare) e l'attenuazione/scomparsa delle risposte autonome allo stimolo doloroso.

### In quali parti del sistema nervoso agiscono gli anestetici generali

Diverse aree del sistema nervoso, sia centrale che periferico, sono state chiamate in causa quali possibili target di azione degli anestetici generali. Ad oggi si ritiene semplicistico cercare di identificare un unico sito anatomico quale responsabile dell'anestesia. Piuttosto, si preferisce considerare le sopra citate diverse componenti dell'anestesia quali il risultato degli effetti di uno stesso farmaco anestetico su aree diverse del sistema nervoso centrale (SNC) e periferico (SNP). Per esempio, diverse linee di evidenza suggeriscono che il *midollo spinale* sia il sito a livello del quale gli anestetici

generali inibiscono le risposte motorie allo stimolo doloroso, tramite un effetto diretto sulla eccitabilità dei motoneuroni.

Anche la *sostanza reticolare ascendente* è da sempre considerata un sito importante di azione degli anestetici generali; infatti, vari esperimenti in vivo hanno dimostrato che la stimolazione elettrica della sostanza reticolare è in grado di provocare il risveglio di animali tenuti in anestesia generale. In particolare, a livello della sostanza reticolare il sistema locus coeruleus-neuroni ipotalamici del nucleo preottico ventrolaterale-nucleo tuberomamillare si è dimostrato un sito importante di azione degli anestetici GABAergici, quali il propofol ed i barbiturici.

Infine, la *corteccia cerebrale* è fondamentale per l'azione degli anestetici generali, in particolare per le componenti di perdita della memoria e della coscienza. Un sito di azione particolarmente importante che si correla alla corteccia è il talamo, la cui principale funzione è quella di trasmettere stimoli sensoriali ed informazioni motorie alla corteccia cerebrale tramite le cosiddette vie talamo-corticali. È noto da tempo che vari gas anestetici sono in grado di deprimere l'eccitabilità dei neuroni del talamo, quindi di ridurre il flusso di informazioni sensoriali e motorie alla corteccia cerebrale e potenzialmente di contribuire alla perdita di coscienza che caratterizza l'anestesia generale.

### **Come gli anestetici generali interagiscono con il sistema nervoso**

I dati disponibili ad oggi suggeriscono che gli anestetici generali sono in grado di deprimere alcune popolazioni di neuroni che funzionano da pacemaker del sistema nervoso centrale; ne è un esempio la depressione respiratoria che risulta dall'azione di certi anestetici generali sui centri del respiro del tronco cerebrale. In generale, si ritiene che il "firing" spontaneo di questi neuroni sia solo lievemente modificato dagli anestetici generali, ma che questa pur piccola modificazione rivesta importanza clinica.

E' noto inoltre che alcuni anestetici generali sono in grado di alterare piu' in generale l'eccitabilita' dei neuroni. Per esempio, e' noto che gli anestetici generali causano iperpolarizzazione –ossia creano un potenziale di membrana a riposo piu' negativo- dei neuroni motori del midollo spinale e della corteccia, nonche' dei neuroni talamici. Inoltre, alcuni lavori recenti dimostrano che alcuni gas anestetici sono in grado di causare una riduzione del potenziale di azione.

Nonostante i risultati degli studi sopra descritti, ad oggi vi e' un consenso generale secondo cui gli anestetici generali agiscono principalmente sulla trasmissione sinaptica, piu' che sull'eccitabilita' dei neuroni. In effetti, la trasmissione sinaptica, sia di tipo eccitatorio che inibitorio, è profondamente influenzata dall'anestesia generale. In più studi gli anestetici generali si sono dimostrati in grado di ridurre la trasmissione eccitatoria (a livello di corteccia olfattiva, gangli simpatici, ippocampo e midollo spinale), nonché di aumentare o allo stesso tempo ridurre la trasmissione di tipo inibitorio in diverse aree del sistema nervoso centrale. Esiste una grande eterogeneita' nei modi in cui gli anestetici generali influenzano i vari tipi di sinapsi, a seconda della struttura della sinapsi stessa, del suo grado di funzionamento e dei neurotrasmettitori coinvolti. Gli anestetici generali modulano la trasmissione sinaptica sia a livello pre- che post-sinaptico. A livello presinaptico, è stato dimostrato che vari gas anestetici riducono la liberazione di glutammato, il più importante neurotrasmettitore di tipo eccitatorio del SNC. Per quel che riguarda la trasmissione presinaptica di tipo inibitorio, i dati sono invece più controversi. Studi che hanno utilizzato anestetici volatili e barbiturici sui recettori presinaptici di tipo GABA hanno dimostrato alternativamente inibizione, stimolazione, o nessun effetto. A livello postsinaptico, rari studi preliminari hanno dimostrato che una grande varietà di anestetici generali (barbiturici, etomidato, propofol e gas alogenati) aumenta la risposta elettrica di tipo inibitorio quando GABA viene applicato nello spazio intersinaptico per via esogena. Gli effetti postsinaptici di tipo eccitatorio sono invece molto meno riproducibili e

quindi controversi, e variano al variare del tipo di neurotrasmettitore e di anestetico utilizzati.

### **Gli effetti degli anestetici generali sui canali ionici voltaggio- ligando- e messaggero secondario- dipendenti**

E' probabile che anche vari canali ionici siano coinvolti, almeno in parte, nell'azione degli anestetici generali. L'evidenza attuale suggerisce che la maggior parte dei canali ionici voltaggio-dipendenti (principalmente sodio, potassio e calcio-dipendenti) sia solo lievemente sensibile, se non addirittura insensibile, agli effetti degli anestetici generali, anche se esistono lavori che dimostrano come certi sottotipi di canali voltaggio-dipendenti siano di fatto sensibili a particolari classi di anestetici. Per quanto concerne invece i canali ionici attivati da ligandi -quelli meglio caratterizzati- esistono due principali classi di recettori, ossia i canali ionici attivati dal glutammato e quelli attivati dal GABA. I primi sono di tre tipi: recettori AMPA, recettori kainici e recettori NMDA. In particolare, i recettori NMDA conducono Na, K e Ca, e sono coinvolti nella modulazione a lungo termine delle risposte sinaptiche (long term potentiation). E' noto da tempo che la ketamina è un potente inibitore dei canali ionici NMDA-attivati, così come il protossido d'azoto e lo xenon. Invece, i canali ionici attivati dal GABA (il neurotrasmettitore inibitorio più importante a livello del SNC) sono per lo più post-sinaptici e permettono l'ingresso di cloro all'interno della cellula, causando così una iperpolarizzazione del neurone. I barbiturici, le benzodiazepine, il propofol, l'etomidato ed i gas alogenati modulano i recettori di tipo GABA<sub>A</sub>. Tutti questi farmaci non alterano tanto la velocità alla quale gli ioni attraversano il canale, bensì aumentano la frequenza con la quale il canale si apre, oppure il periodo di tempo durante il quale il canale rimane aperto. Vi sono tutt'ora studi in corso per chiarire

l'effetto degli anestetici generali su altre famiglie di canali ionici attivati da ligandi, tra cui i recettori 5-HT<sub>3</sub>, della glicina e nicotinici.

Infine, vi sono soltanto rari studi riguardanti gli effetti degli anestetici generali sui canali ionici attivati da messaggeri secondari, che suggeriscono un loro possibile ruolo nel regolare l'eccitabilità "basale" dei neuroni ed il loro potenziale di membrana a riposo.

### **Teoria dei lipidi e delle proteine**

Piu' di 100 anni fa Meyer ed Overton osservarono che la potenza di un gas anestetico e' fortemente correlata alla sua solubilita' in olio di oliva. Come conseguenza, molti investigatori dell'epoca conclusero che gli anestetici generali dovessero interagire con un target idrofobico, piu' specificatamente coi lipidi. Tali conclusioni portarono alla enunciazione della teoria dei lipidi, secondo la quale gli anestetici generali si dissolvono e raggiungono una concentrazione critica nel doppio strato lipidico delle membrane cellulari, causando la perturbazione delle caratteristiche fisiche di quest'ultime. In particolare, alcuni studiosi propongono che, dissolvendosi nelle membrane, gli anestetici generali ne provochino un aumento nel volume, il quale a sua volta causa una compressione dei canali ionici che attraversano la membrana ed una alterazione del loro funzionamento. In alternativa, alcuni investigatori suggeriscono che un aumento dello spessore della membrana causi un cambiamento del gradiente di potenziale di membrana, e quindi dell'eccitabilita' dei neuroni. Infine, alcuni hanno proposto che il dissolversi degli anestetici nelle membrane cellulari causi una "fluidificazione" delle membrane stesse, ossia un sovvertimento della organizzazione dei fosfolipidi nel doppio strato in grado di causare una alterazione del funzionamento dei canali ionici che attraversano la membrana.

I dati disponibili ad oggi indicano che le proteine- piu' che i lipidi- sono da considerare il sito piu' probabile di interazione degli anestetici generali. Numerosi studi hanno ormai

chiaramente confermato che vari anestetici generali sono in grado di legarsi ai siti idrofobici di proteine solubili in acqua, e che la grandezza e la conformazione di queste “tasche idrofobiche” determina la capacità o meno dei differenti anestetici di interagire con tale proteina. Purtroppo, nonostante la controversia tra teoria dei lipidi e delle proteine sia andata risolvendosi a favore delle ultime, rimangono ancora da chiarire molti quesiti, tra cui l'esistenza di tasche idrofobiche diverse per anestetici diversi, e quali siano le proteine che si legano agli anestetici generali.

### **L'approccio genetico**

Più di recente alcuni studi di genetica hanno cominciato ad identificare alcune sequenze di geni -ed i prodotti dell'espressione di quest'ultimi- potenzialmente coinvolti nelle interazioni proteina-farmaci anestetici. Tutti questi studi, però, sono condotti su invertebrati, per cui risulta difficile estrapolare i loro risultati ai meccanismi di funzionamento dell'anestesia nell'uomo.

*In conclusione*, è evidente che i molteplici effetti degli anestetici generali non possono essere ricondotti all'azione su un unico sito anatomico nel SNC, ma che piuttosto le diverse componenti dell'anestesia siano riconducibili a differenti siti anatomici del sistema nervoso centrale e periferico. Allo stesso modo, il meccanismo di funzionamento degli anestetici generali non può essere spiegato da un unico specifico processo fisiologico. Se da una parte vi è un'accettazione del fatto che gli anestetici generali influenzano la trasmissione sinaptica più che l'eccitabilità dei neuroni, gli effetti degli anestetici si sono dimostrati comunque dipendenti dal tipo di agente anestetico e di sinapsi studiati, e possono manifestarsi sia a livello pre- che post- sinaptico. A livello molecolare, gli anestetici generali -pur dimostrando un certo grado di selettività- interagiscono con un

vasto numero di canali ionici e proteine di segnale. Nonostante sia evidente che gli effetti degli anestetici generali sono mediati da interazioni dirette con target proteici, vi sono numerose potenziali proteine in grado di interagire con gli anestetici generali, ad oggi non ancora caratterizzate.



## INTRODUZIONE ALLO STUDIO

Nel corso degli ultimi decenni il numero, la complessità e la durata degli interventi chirurgici eseguiti su bambini o feti è cresciuto in maniera esponenziale, così come l'incidenza ed i tassi di sopravvivenza dei nati prematuri (Rose et al, 1999; Hall, 2000). Pertanto, accade sempre più spesso che l'anestesista si trovi a dover offrire assistenza anestesiológica in età anche molto precoce: per interventi chirurgici correttivi di anomalie congenite sul feto o nei primi giorni di vita, per sedazioni prolungate di nati prematuri nelle unità di terapia intensiva, etc...

Il sistema nervoso centrale dell'uomo non è però completamente sviluppato al momento del parto, ed anzi va incontro a rapida maturazione subito dopo la nascita. Basti pensare che il cervello umano pesa circa 300 g alla nascita, raddoppia di peso a sei mesi di vita e triplica ad un anno di età (Brown et al, 1997). Questo periodo di rapida crescita coincide con il tempo della sinaptogenesi, durante il quale i neuroni, aiutati dalle cellule della glia, proliferano, si differenziano, migrano verso la loro destinazione finale e formano milioni di connessioni chimiche ed elettriche (Dobbing et al, 1979). Nell'uomo tale fenomeno avviene a partire dal sesto mese di gravidanza fino a circa due anni di vita. Nel corso di questo lungo processo, i neuroni che non sono in grado di formare sinapsi funzionali vengono etichettati come ridondanti e vengono destinati alla morte per apoptosi, che avviene in assenza di un'evidente reazione infiammatoria e preserva i restanti neuroni (funzionali) dell'ambiente circostante (Ishimaru et al, 1999). Fisiologicamente, meno dell'1% dei neuroni del SNC muore per apoptosi durante la sinaptogenesi.

Nell'ultimo decennio studi condotti da gruppi diversi di ricercatori hanno dimostrato che è necessario mantenere un fine equilibrio tra stimolazione ed inibizione nel SNC perché quelle sinapsi che si sono generate durante la sinaptogenesi possano sopravvivere,

maturare e funzionare in maniera appropriata. Vale a dire, un'eccessiva stimolazione o, al contrario, un'eccessiva inibizione, sono tossiche per le sinapsi (e quindi per i neuroni) in via di sviluppo (Ikonomidou et al, 1999; 2000; Xu et al, 2000).

Nonostante ancora oggi il meccanismo di funzionamento di gran parte degli anestetici generali usati nella comune pratica clinica sia lontano dall'essere chiarito, alcuni studi indicano almeno due principali meccanismi coinvolti: da una parte un aumento della trasmissione di tipo inibitorio ad opera dei recettori GABA<sub>A</sub>, dall'altra una diminuzione della trasmissione di tipo eccitatorio ad opera dei recettori NMDA. Di qui la profonda depressione dell'attività chimico-elettrica dei neuroni che caratterizza una anestesia generale. Tra gli anestetici utilizzati oggi nella comune pratica clinica, benzodiazepine, barbiturici, propofol, sevoflurano e desflurano appartengono al primo gruppo (Franks et al, 1994; Hirota et al, 1998; Hapfelmeier et al, 2001). Ketamina, protossido d'azoto e xenon appartengono al secondo (Lodge et al, 1982; Jevtovic-Todorovic et al, 1998; Franks et al, 1998). L'alcol, nel passato utilizzato come anestetico generale, condivide caratteristiche di entrambi i gruppi, ossia agisce come antagonista sui recettori NMDA e come agonista sui recettori GABA<sub>A</sub> (Olney et al, 2000).

In considerazione di questo, alcuni ricercatori hanno ipotizzato che un'eccessiva inibizione del SNC causata da un'anestesia generale sufficientemente prolungata ed effettuata durante il periodo di massima sinaptogenesi del SNC possa violare quel fine equilibrio tra inibizione e stimolazione di cui sopra, ed essere interpretata come segnale generico di apoptosi dalle sinapsi in via di sviluppo, arrivando a causare un aumento del numero di neuroni destinati a morire di "morte fisiologica".

## **La sinaptogenesi nel topo e nell'uomo**

Vari studi in letteratura dimostrano che il picco di vulnerabilità all'apoptosi, causata da antagonismo sui recettori NMDA e/o agonismo sui recettori GABA, avviene durante la sinaptogenesi, che coincide a sua volta col tempo di più rapida crescita del SNC (Ikonomidou et al, 1999; 2000). Tale periodo occorre in tempi diversi in specie diverse. Nel topo, comincia un giorno o due dopo la nascita, e termina due settimane dopo il parto, mentre nell'uomo comincia all'inizio del terzo trimestre di gravidanza e termina circa due anni dopo la nascita (Dobbing et al, 1979). Se si confrontano le curve di crescita del cervello nel topo e nell'uomo, il picco di crescita è tra il quarto ed il decimo giorno post natali nel topo, e tra l'ultimo mese di gestazione ed i primi 6 mesi di vita nell'uomo.

Anche se non possono essere fatte equivalenze precise tra diverse età dello sviluppo del SNC fra topo e uomo, la decisione di utilizzare topi di 7 giorni di vita, nel nostro studio come in altri in letteratura, si basa sulla stima che questo momento dello sviluppo del cervello del topo equivale al periodo tra 0 e 6 mesi nel bimbo nato maturo, ed all'incirca al periodo tra 0 e 12 mesi nel nato prematuro.

L'ipotesi di cui sopra è stata effettivamente testata in una serie di recenti esperimenti. Nel 1999 Ikonomidou e colleghi dimostrano che l'infusione continua di MK801 (un antagonista dei recettori NMDA), mantenuta per 4 ore in topi di 7 giorni di vita (picco della

sinaptogenesi nel topo), è sufficiente a causare diffusa apoptosi neuronale (Ikonomidou et al, 1999). Lo stesso gruppo, un anno dopo, suggerisce che il blocco dei recettori NMDA, unitamente alla stimolazione dei recettori GABA<sub>A</sub>, sono i due principali meccanismi attraverso i quali l'alcol causa apoptosi nel SNC di ratti in via di sviluppo (Ikonomidou et al, 2000). Nel 2003 il gruppo di Jevtovic-Todorovic affronta lo stesso quesito in una serie di esperimenti mirati a riprodurre in laboratorio -il più fedelmente possibile- le condizioni di un'anestesia generale, così come avviene nella comune pratica clinica (Jevtovic-Todorovic et al, 2003). A questo scopo anestetizza topi di 7 giorni di vita con concentrazioni clinicamente rilevanti di midazolam (da 3 a 9 mg/Kg), isoflurano (0.75%) e protossido d'azoto (75%), sufficienti a mantenere un'anestesia chirurgica per 6 ore, mentre gli animali controllo vengono sottoposti ad "anestesia tronca", ossia alla semplice infusione endovenosa continua di oppioidi. Dopo il risveglio, gli animali vengono divisi in tre gruppi: il primo da utilizzare in studi di istopatologia, il secondo in test di memoria/apprendimento, il terzo riservato allo studio della plasticità dell'ippocampo in vitro. I dati del primo gruppo rivelano che l'isoflurano causa da solo un aumento dose dipendente del tasso di apoptosi dei neuroni, mentre midazolam e protossido d'azoto, usati singolarmente, non dimostrano alcun effetto. Però, quando la somministrazione di midazolam è seguita da mantenimento dell'anestesia con isoflurano, il danno risulta sensibilmente aumentato. Tale danno diventa ancora più pronunciato se al doppio cocktail di midazolam ed isoflurano si aggiunge il protossido d'azoto. Il triplo cocktail, infatti, causa un aumento di 15 volte del numero di neuroni morti per apoptosi negli animali sottoposti ad anestesia rispetto agli animali controllo. Ancora, i dati del secondo gruppo dimostrano una estrema riduzione della capacità delle sinapsi ippocampali di sostenere long term potentiation negli animali esposti ad anestesia, quando studiati con elettrofisiologia tra il 29esimo ed il 33esimo giorno di vita (è ben documentata una relazione tra long term potentiation e memoria/capacità di apprendimento). Infine, topi esposti ad anestesia nei primi giorni di vita mostrano deficit

misurabili quando sottoposti da adulti a vari test di memoria/apprendimento (water maze e radial arm maze).

In realtà una certa preoccupazione per i potenziali effetti tossici di alcuni anestetici generali non è del tutto nuova in letteratura. Nei primi anni '70 alcuni studi pilota avevano infatti denunciato un tasso di aborto sensibilmente più alto tra il personale di sala operatoria rispetto a medici ed infermieri di altri reparti, così come un'incidenza maggiore di cefalee, irritabilità ed altri disturbi del SNC (Corbett, 1972;1974; Jenkins, 1973; Tyrrel et al, 1968; Vaisman, 1967). E' così che tra la metà degli anni '70 ed '80, in coincidenza col fiorire della microscopia elettronica, prendono il via una serie di progetti indirizzati a studiare il numero e le caratteristiche morfologiche delle sinapsi e dei neuroni di animali sottoposti ad anestesia generale. A quel tempo, l'anestetico più utilizzato, e quindi anche il più studiato, è l'alotano, oggi non più utilizzato nella pratica clinica.

Nel 1974 Kelvin L.Quimby e colleghi dimostrano che topi sottoposti a dieci ppm di alotano in utero e/o fino a 60 giorni di vita presentano una riduzione intorno al 30% del numero di sinapsi della corteccia sagittale superiore. Sottoposti a vari test, quegli stessi animali accusano gravi e permanenti deficit di apprendimento (Quimby et al, 1974). Sei anni più tardi, E.Uemura e R.E.Bowman testano concentrazioni più elevate di alotano (50-100-200 ppm), e riconfermano una sensibile riduzione della densità sinaptica nella corteccia sagittale superiore dei topi esposti (Uemura et al, 1980). Nel 1985 lo stesso gruppo studia gli effetti dell'alotano sulle densità sinaptiche di corteccia entorinale e subicolo. I risultati confermano una densità sinaptica significativamente più bassa negli animali trattati rispetto ai controlli ed un grado di maturazione delle sinapsi (espresso come numero di coni di crescita sui neuroni) più avanzato negli animali controllo, suggerendo un effetto "cronotropo negativo" dell'alotano sulla sinaptogenesi. Tale effetto si dimostra inoltre duraturo, vale a dire l'iniziale ritardo nella formazione delle sinapsi non verrà mai più

ricolmato in età adulta da un aumento del tasso di formazione delle sinapsi stesse (Uemura et al, 1985). Più o meno contemporaneamente altri gruppi di ricerca denunciano che l'esposizione ad alotano causa danni ai neuroni a livello ultrastrutturale (indebolimento delle membrane nucleari, vacuolizzazione del Golgi, rigonfiamento dei lisosomi), nonché ridotta mielinogenesi (Chang et al, 1976; Wiggins et al, 1979).

In quegli anni lo scopo principale della suddetta letteratura è quello di focalizzare l'attenzione della comunità scientifica sull'alotano come possibile causa di patologia da lavoro, non solo per gli anestesisti, ma anche per tutto il personale di sala operatoria, in stato di gravidanza o meno. Nessun cenno in letteratura ai possibili effetti della stessa anestesia in età pediatrica, ma ciò risulta comprensibile, considerato il ridottissimo numero di procedure chirurgiche eseguite su feto/neonato in quel periodo.

Dagli anni '70 in poi non sono più stati intrapresi studi di microscopia elettronica che abbiano avuto come soggetto i "moderni" anestetici generali usati oggi nella comune pratica clinica, e anche quei gruppi di ricerca che nell'ultimo decennio si sono occupati di neurotossicità degli anestetici generali sul cervello in via di sviluppo hanno preferito alla microscopia elettronica altre tecniche, quali l'istopatologia e/o l'elettrofisiologia.

E' per questo motivo che il gruppo di Jevtovic-Todorovic ha iniziato circa due anni fa un progetto di ricerca volto a studiare gli effetti dell'esposizione ad anestesia generale sul numero e le caratteristiche morfologiche di sinapsi e neuroni, analizzati a livello ultrastrutturale mediante microscopia elettronica. Come in altri studi del medesimo gruppo, anche per questo progetto si è scelto di trattare topi di 7 giorni di vita, vale a dire al picco della sinaptogenesi, ma diversamente dagli studi precedenti, gli animali non sono stati sacrificati ed i loro tessuti non sono stati raccolti subito dopo l'anestesia. Bensì, questa volta si è deciso di lasciare sopravvivere gli animali fino al 21esimo giorno di vita postnatale, in modo da dare il tempo alla reazione acuta di svanire e lasciare il posto agli effetti *a lungo termine* dell'esposizione ad anestesia generale (in letteratura è ben

documentato che la reazione acuta a vari insulti al SNC (ischemia, intervento chirurgico,..) non è più documentabile a partire dalla terza settimana dopo l'insulto stesso) (Sminia et al, 1987; Ling et al, 1993; Milligan et al, 1991).

Inoltre, questa volta si è deciso di concentrare l'attenzione su una particolare zona del SNC, il *subiculum proper*, perché, come dimostra uno studio pubblicato nel 2003 dallo stesso gruppo di ricerca (Jevtovic-Todorovic et al, 2003), quest'ultimo è tra le regioni del cervello più danneggiate dopo esposizione ad anestesia generale (insieme coi nuclei talamici anteriori, vedi tabella pagina seguente).

**Tab.1:** Regioni del cervello in cui il danno causato da anestesia generale è più evidente  
(tratto da: Jevtovic-Todorovic et al, 2008)

| <b>Regione del cervello</b> | <b>Severità del danno (fold increase)</b> |
|-----------------------------|---|
| Nucleo mediale del setto    | 27  |
| Area del Broca              | 29  |
| Nucleus Accumbens           | 33  |
| Nucleo caudato rostrale     | 26  |
| Globo pallido               | 43  |
| <u>Nuclei dell'amigdala</u> |   |
| Basolaterale                | 22  |
| Mediale                     | 25  |
| Corticale                   | 23  |
| <u>Nuclei talamici</u>      |   |
| Paraventricolare            | 34  |
| Anterodorsale               | 28  |
| Anteroventrale              | 57  |
| Anteromediale               | 51  |
| Laterodorsale               | 68  |
| Reuniens                    | 34  |
| Parafascicularis            | 45  |
| Ippocampo                   | 21  |
| <b><u>Subiculum</u></b>     | <b>58</b>                                 |
| Corteccia cingolata         | 32  |
| Retrosplenio                | 53  |
| <u>Neocorteccia</u>         |   |
| Frontale                    | 18  |
| Parietale                   | 34  |
| Temporale                   | 22  |
| Occipitale                  | 35  |
| <u>Ipotalamo</u>            |   |
| Anteriore                   | 22  |
| Ventromediale               | 34  |
| Dorsomediale                | 21  |
| <u>Corpi mamillari</u>      | 33  |



## Il complesso subicolare ed il subiculum proper

Il “complesso subicolare” è una regione subcorticale localizzata tra l’area CA1 dell’ippocampo proprio e la corteccia entorinale ventralmente, e tra CA1 ed il retrosplenio dorsalmente (Amaral et al, 1995). Viene normalmente suddiviso in tre sottoregioni, rispettivamente il subicolo proprio, il presubicolo ed il parasubicolo (Witter et al, 1989).

Anche se in passato la letteratura a riguardo è stata controversa, la maggior parte degli autori oggi è concorde nell’affermare che il subicolo (subiculum proper) consta di tre strati principali: lo *strato molecolare*, che è continuo con lo strato lacunoso-molecolare e radiato di CA1, lo *strato piramidale*, che contiene il corpo dei neuroni principali, e lo *strato polimorfico*. Lo strato piramidale è popolato da grandi neuroni piramidali che estendono i loro dendriti apicali nello strato molecolare ed i dendriti basali nelle porzioni più profonde dello stesso strato piramidale. Tra le cellule piramidali si trovano neuroni più piccoli, i cosiddetti interneuroni del subicolo (O’Mara et al, 2001).

In letteratura sono documentate connessioni di tipo efferente tra i nuclei talamici anteriori ed il complesso subicolare. In particolare, il nucleo talamico anteromediale proietta su subicolo e presubicolo, l’anterodorsale proietta su post e para subicolo, mentre il nucleo anteroventrale proietta su pre e para subicolo (Clancy et al, 2001).

## Materiali e metodi

*Animali.* In tutti gli esperimenti sono stati utilizzati topi di razza Sprague-Dawley, di entrambi i sessi. Al settimo giorno di vita gli animali vengono suddivisi in maniera random in gruppo sperimentale e gruppo controllo. Il gruppo sperimentale viene sottoposto a 6 ore di anestesia generale, mentre il gruppo controllo riceve una iniezione intraperitoneale di DMSO 10% alla dose di 9mg/Kg, viene allontanato dalla madre e mantenuto normotermico in un cestino riscaldato per un equivalente numero di ore. Alla fine delle 6 ore i due gruppi vengono riuniti e mantenuti normotermici nello stesso cestino fino al completo risveglio degli animali sottoposti ad anestesia. Dopo di che, gli animali vengono riposti nella gabbia della madre perché possano essere allattati, riaccompagnati al vivarium, e lasciati sopravvivere fino al 21esimo giorno di vita.

*Anestesia.* L'anestesia generale consiste in una combinazione di midazolam (9 mg/kg intraperitoneali, somministrati prima di entrare nella camera di anestesia), isoflurano (0.75%) e protossido d'azoto (75%). Gli animali vengono posti all'interno di una camera di anestesia chiusa, fornita di una valvola di sfogo atta a mantenere una pressione costante all'interno di 1 atmosfera; il protossido d'azoto e l'ossigeno (25%) vengono somministrati usando un flussometro adeguatamente calibrato, mentre un vaporizzatore specifico viene utilizzato per l'isoflurano. Gli animali vengono mantenuti normotermici per tutta la durata dell'esperimento (30-33 C°). Dopo un periodo di iniziale assestamento della miscela dei gas (circa 15 min), la concentrazione di protossido, isoflurano, ossigeno ed anidride carbonica all'interno della camera viene analizzata in continuo mediante spettrometria a raggi infrarossi.

*Preparazione dei tessuti.* Al 21esimo giorno di vita gli animali vengono profondamente anestetizzati (pentobarbital 65mg/kg intraperitoneali) ed il cervello viene perfuso con paraformaldeide 4% e glutaraldeide 0.5% (tramite incannulazione del ventricolo sinistro del cuore e clampaggio dell'aorta discendente). Il cervello, rimosso dal cranio e lasciato nello stesso fissativo durante la notte, il giorno seguente viene tagliato a fette sottili di 50-75  $\mu\text{m}$  di spessore con un vibratomo, poi le sezioni vengono risciacquate in sodio baroidrato per 30 min e conservate in PBS/0.05% sodio azide a +4 C°.

Successivamente, per poter essere visualizzati al microscopio elettronico, i tessuti devono essere trattati con osmio tetraossido 1% per 1 ora, disidratati in sequenza con alcol 50%, uranil acetato 4%, alcol 70%, 90%, 100% ed acetone, incubati in EPON (resina plastica)/acetone 1:1 ed EPON:EPON 1:1, in entrambi i casi per 2 ore. Infine, i tessuti vengono trasferiti su sandwich di strisce di aclar plastici trasparenti e mantenuti in forno a +60 C° per tre giorni finché si asciugano.

Passati i tre giorni, i sandwich di aclar vengono aperti e la sezione coronale di cervello contenuta tra le due strisce viene esposta. Con l'aiuto di una foratrice, si ricavano per ogni fetta di cervello due dischi di tessuto (0.5 mm di diametro). Successivamente i dischi vengono montati su piccole capsule a forma di proiettile, ricoperti con resina plastica e mantenuti in forno per altri 3 giorni a +60 C° finché si solidificano. Il risultato finale è una capsula di resina plastica a forma di proiettile, sulla punta della quale è esposto il tessuto di interesse; tale tessuto, prima di poter essere sezionato su un vibratomo apposito per sezioni ultrasottili, deve essere cesellato manualmente, così da eliminare la resina/tessuto in eccesso e da esporre una superficie di sezionamento non più grande di 1mm x 1mm. Una volta esposta la zona di interesse, la capsula può finalmente essere montata sul vibratomo a lama di diamante e possono essere ottenute sezioni di tessuto tra i 600 ed i 900 angstroms, tali da poter essere studiate al microscopio elettronico. Ogni sezione così

ottenuta viene montata su una piccola rete di supporto (grid) e può essere conservata in questo modo per un tempo indeterminato.

*Microscopia elettronica ed analisi dei dati.* L'analisi dei tessuti è stata fatta utilizzando un microscopio elettronico a trasmissione Nikon, modello JEOL 3230.

Per ognuno dei tre strati del subicolo sono state scattate ed analizzate 12 fotografie (36 foto totali per animale), e particolare attenzione è stata posta a non sovrapporre una foto con un'altra, vale a dire ad analizzare aree di tessuto sempre diverse una dall'altra. Fin'ora sono stati studiati in tutto 12 animali, 6 maschi e 6 femmine, provenienti da tre madri diverse (in modo da tener conto della variabilità biologica inter mamme), per un totale di 432 foto.

Per l'analisi delle foto è stato utilizzato Image Pro Plus, un software specifico per analisi ultrastrutturali. Le misure ottenute sono: numero e lunghezza delle sinapsi, spessore delle densità post sinaptiche, area del terminale nervoso presinaptico, numero di vescicole sinaptiche nel terminale nervoso presinaptico ed area del campo di tessuto analizzato. Altre informazioni raccolte sono: tipo di sinapsi (asimmetrica: densità post sinaptiche molto più spesse di quelle pre sinaptiche, generalmente di tipo eccitatorio; simmetrica: densità postsinaptiche marcatamente più sottili di quelle presinaptiche, generalmente di tipo inibitorio) (vedi FiguraX), il tipo di contatto sinaptico (axo-axonale, axo-corpo dendritico o axo-spina dendritica), il numero di sinapsi su cellule morenti ed il numero di neuroni contraenti contemporaneamente più di una sinapsi (multiple synaptic boutons).

I criteri utilizzati per definire una sinapsi (Uemura et al, 1974), senza i quali un contatto tra neuroni non può essere contato come tale, sono stati: presenza di una densità post sinaptica, di almeno due vescicole presinaptiche e di due membrane per lo più parallele che dimostrino di affacciarsi a formare lo spazio intersinaptico.

*Analisi statistica.* L'analisi statistica degli studi istologici che ha comparato gruppo controllo e gruppo esperimento ha utilizzato il T-Student test. Per l'analisi dell'incremento ponderale nel gruppo controllo e nel gruppo esperimento è stato utilizzato il Two-way ANOVA test (giorno di vita post-natale e condizione sperimentale, i.e controllo o esperimento) seguito da un Test di Bonferroni. La significatività è stata posta con  $p < 0.05$  (Graph Pad Prizm 5, Graph Pad Software Inc, La Jolla, CA).

### **Densità cruda e densità volumetrica**

Il numero di sinapsi per unità di distanza al quadrato (nel nostro studio  $\mu^2$ ) può essere espresso come *densità cruda (raw density)*, che equivale al numero di sinapsi presenti in un dato campo di osservazione diviso per l'area del campo di osservazione stesso.

Tale parametro è però soltanto bidimensionale, cioè non tiene conto del fatto che i tessuti analizzati, seppur sottili, hanno un proprio spessore, che deve essere compreso tra i 600 ed i 900 angstroms perché possano essere visualizzati ed adeguatamente analizzati al microscopio elettronico. Ciò significa che quelle sinapsi contate in campi di osservazione provenienti da fette di tessuto contigue ed in sequenza potrebbero essere contate più di una volta, specialmente quando si tratti di sinapsi particolarmente lunghe.

Il parametro che permette di correggere tale errore è la *densità volumetrica (volumetric density)*, che equivale alla densità cruda divisa per la lunghezza media delle sinapsi contate nel campo di osservazione.

Nel nostro studio, poiché vengono analizzate 12 foto per ogni strato del subicolo, la densità cruda per singolo strato del subicolo si calcola come la somma delle sinapsi

contate nelle 12 foto divisa per la somma delle aree delle foto stesse. La densità volumetrica si calcola invece come densità cruda divisa per la media delle lunghezze delle sinapsi contate nelle 12 foto. Infine, la media delle tre densità crude e volumetriche (strato piramidale, molecolare e polimorfo) fornisce il dato finale di densità cruda e volumetrica per ogni animale.

## Risultati

Dal momento che un adeguato stato nutrizionale è cruciale per un corretto sviluppo delle sinapsi, abbiamo seguito ogni giorno lo stato generale ed il peso degli animali del nostro studio e non abbiamo trovato alcuna differenza significativa nell'incremento ponderale dei ratti esperimento rispetto ai ratti controllo durante i primi 21 giorni di vita dopo la nascita (Fig.1). Effettivamente, per tutta la durata dello studio è stato impossibile distinguere i 36 animali controllo dai 36 animali esperimento (provenienti da un totale di 13 madri) semplicemente basandosi sul loro aspetto esteriore. Il giorno in cui gli animali vengono sottoposti ad anestesia (PND7) ed il giorno in cui vengono sacrificati (PND21) sono indicati con frecce in Figura 1.

L'esame ultrastrutturale dei tre strati del subicolo (piramidale, polimorfo e molecolare) a 21 giorni di vita (ossia due settimane dopo l'esposizione ad anestesia generale) ha evidenziato notevoli differenze nell'aspetto generale del neuropilo degli animali esperimento rispetto agli animali controllo. Infatti, negli animali controllo il neuropilo appare come un continuo di profili di neuroni e cellule della glia e si caratterizza per l'alta densità cellulare e di contatti sinaptici (Fig.2A, sinapsi indicate con frecce nere). Nel neuropilo degli animali esperimento, invece, documentiamo numerose aree vuote, prive di

profili cellulari o ripiene di detriti cellulari, con numerosi neuroni danneggiati e pochissime sinapsi. (Fig.2A, b e c)

Oltre che alterazioni dell'aspetto generale del neuropilo, l'analisi ultrastrutturale del subicolo evidenzia anche alterazioni indicative di danni ai mitocondri negli animali esperimento rispetto agli animali controllo (Fig.2B). Infatti, nel subicolo degli animali esperimento molti mitocondri appaiono rigonfi, con cristae arrotondate, ma ancora con una membrana mitocondriale esterna ed interna conservate (alterazioni precoci, Fig.2B.e), ed in altri si nota la presenza di profili mitocondriali scuri, grinzi e condensati, oramai senza una chiara separazione tra membrana mitocondriale interna ed esterna (danno tardivo, Fig.2B.f)

Per verificare se l'apparente scarsità di profili cellulari del neuropilo degli animali esperimento si traduce in un ridotto numero di sinapsi negli animali sottoposti ad anestesia abbiamo quantificato il numero totale di sinapsi per  $\mu^3$  in ognuno dei tre strati del subicolo ed espresso questo numero come densità volumetrica (vedi Metodi) (Erisir e Harris, 2003). Abbiamo riscontrato una riduzione statisticamente significativa del 30-40% nelle densità volumetriche medie di ogni strato del subicolo negli animali esperimento rispetto agli animali controllo (n=4 animali controllo e 4 animali esperimento provenienti da due madri diverse) (Fig.3) .

Un aspetto interessante del neuropilo degli animali esperimento è anche la scarsità di bottoni sinaptici multipli (multiple synaptic boutons, MSBs), che si definiscono come contatti sinaptici multipli che si formano quando un unico neurone contrae più contatti sinaptici allo stesso tempo con più neuroni limitrofi (Sorensen e al, 2003; Yankova e al, 2001; Briones e al, 2004; Wooley e al, 1996). Infatti, all'analisi ultrastrutturale è stato molto più comune riscontrare contatti sinaptici multipli (in media 2-3 sinapsi per neurone) negli animali controllo (Fig.4A), che negli animali esperimento, dove anche terminali presinaptici morfologicamente apparentemente normali contraggono solo uno o anche nessun contatto

sinaptico con i neuroni limitrofi (Fig.4B). Ancora, l'analisi ultrastrutturale del tessuto subicolare documenta la presenza –più frequentemente negli animali esperimento rispetto agli animali controllo- di sinapsi che, pur apparendo morfologicamente integre, si contraggono su profili neuronali chiaramente degenerati (Fig.5).

Al fine di chiarire se la differenza nel numero di sinapsi tra animali controllo ed esperimento è dovuta ad una perdita preferenziale di sinapsi eccitatorie o inibitorie, abbiamo quantificato il numero totale di sinapsi eccitatorie ed inibitorie -basandoci sui criteri morfologici menzionati in Metodi- e ne abbiamo confrontato i quozienti relativi negli animali controllo rispetto agli animali esperimento. Nei casi in cui non è possibile fare una chiara distinzione morfologica tra sinapsi eccitatorie o inibitorie la sinapsi in questione viene classificata "indeterminata". Come mostrato in Fig.6, non vi sono differenze nei rapporti relativi tra sinapsi eccitatorie, inibitorie ed indeterminate nei tre strati del subicolo. Vale a dire che nonostante la densità sinaptica totale sia ridotta negli animali esperimento, le percentuali rappresentative delle sinapsi eccitatorie, inibitorie ed indeterminate rimangono le stesse negli animali esperimento dopo esposizione ad anestesia rispetto agli animali controllo (circa 75%, 5% e 20%, rispettivamente.)

Allo stesso modo, per verificare la possibilità che l'anestesia generale possa danneggiare preferenzialmente certi tipi di contatti sinaptici piuttosto che altri, abbiamo esaminato il numero totale di sinapsi asso-spinose, asso-dendritiche ed altri tipi di sinapsi (accomunate nella categoria "altro", in quanto poco rappresentate), ed ancora una volta non abbiamo trovato differenze nei quozienti relativi tra gli animali controllo e gli animali esperimento. Infatti, circa il 70-80%, 15-20% e 5-10% delle sinapsi sono asso-spinose, asso-dendritiche ed "altro" rispettivamente, e questo è vero sia negli animali esperimento dopo esposizione ad anestesia sia negli animali controllo.

Per capire infine se l'anestesia generale è capace di causare modificazioni della morfologia delle sinapsi del subicolo, abbiamo misurato la lunghezza delle sinapsi, lo



spessore delle densità post-sinaptiche, il numero di vescicole presinaptiche e l'area dei terminali presinaptici in tutti e tre gli strati del subicolo. Non vi sono differenze significative in queste caratteristiche delle sinapsi negli animali esperimento rispetto agli animali controllo (dati non pubblicati).

## **Discussione**

Il nostro studio dimostra che l'esposizione ad anestesia generale del cervello in via di sviluppo di topi al picco della sinaptogenesi causa gravi e croniche alterazioni ultrastrutturali dei neuroni del subicolo ippocampale. Oltre alla scarsità di neuroni e cellule della glia nel neuropilo, ed alla degenerazione mitocondriale, documentiamo una riduzione significativa delle densità sinaptiche e di bottoni sinaptici multipli nei neuroni degli strati piramidale, polimorfo e molecolare degli animali esperimento ben due settimane dopo la somministrazione di una anestesia generale.

Il subicolo, posizionato in maniera strategica tra ippocampo e corteccia entorinale, è parte del complesso ippocampale (O'Mara e al, 2001) e strettamente interconnesso dal punto di vista anatomico e funzionale con la regione CA1 dell'ippocampo. In quanto tale, funziona da mediatore di una miriade di connessioni ippocampo-corticali ed ippocampo-subcorticali, specialmente coi nuclei talamici anteriori (McNaughton, 2006). Recentemente il gruppo di Jevtovic-Todorovic ha dimostrato che il subicolo di topi e cavie immaturi è vulnerabile in acuto alla degenerazione neuronale indotta da anestesia (Jevtovic-Todorovic et al, 2003; Rizzi et al, 2008) e che tale danno si traduce in una perdita permanente di neuroni nelle fasi finali della sinaptogenesi (Rizzi e al, 2008; Nikizad e al, 2007). In questo studio dimostriamo che l'esposizione ad un'anestesia generale causa ben più di una disfunzione

neurone acuta, perchè provoca il malfunzionamento di molti neuroni e gravi alterazioni ultrastrutturali che persistono anche molti giorni dopo l'esposizione all'anestesia.

Lesioni specifiche del complesso subicolare sono in grado di danneggiare la corretta acquisizione delle normali funzioni cognitive nel topo, ed hanno effetti particolarmente devastanti sulla memoria e l'apprendimento spaziali a lungo termine (Morris e al, 1990; Galani e al, 1998). Il gruppo di Jevtovic-Todorovic ha dimostrato che il subicolo del topo è sensibile ai danni causati dall'anestesia generale non solo immediatamente dopo la sua somministrazione, ma anche più tardi, come palesato dai significativi deficit di memoria ed apprendimento spaziale di questi animali nella vita adulta (Jevtovic-Todorovic e al, 2003). In questo studio dimostriamo che lo stesso cocktail di anestetici (isoflurano, protossido d'azoto e midazolam) causa una degenerazione prolungata dei neuroni del subicolo ed una importante riduzione del suo numero di sinapsi. Dal momento che le connessioni sinaptiche tra subicolo ed altri componenti del circuito di Papez sono essenziali ai fini di un corretto sviluppo cognitivo (McNaughton, 2006; Chua e al, 2006) è possibile che le alterazioni sinaptiche indotte dall'anestesia documentate in questo studio possano, almeno in parte, spiegare l'alterato sviluppo cognitivo di topi esposti ad anestesia generale in età precoce (Jevtovic-Todorovic e al, 2003).

Gli aspetti più caratteristici del subicolo degli animali esperimento nel nostro studio sono la scarsa cellularità e la presenza di ampi spazi privi di profili di neuroni e cellule della glia, anche a distanza di 14 giorni dall'anestesia. In un cervello giovane si potrebbe aspettarsi una rimozione veloce dei detriti cellulari subito dopo l'insulto ed una ricostruzione rapida del neuropilo che lo riporti ad un aspetto normale. Effettivamente, Oo e al (1995) hanno osservato che un insulto ipossico-ischemico in grado di causare una morte massiva di neuroni in topi di 7 giorni di vita è seguito da una rapida rimozione dei detriti cellulari, col risultato di un neuropilo normale nel giro di 4 giorni. Allo stesso modo, lesioni cerebrali localizzate, come quelle causate da un trauma focalizzato sulla testa, esitano nella rapida

rimozione delle cellule danneggiate ed in un neuropilo normale a circa 5 giorni dal trauma (Bittigau e al, 1999.) Al contrario, nel nostro studio continuiamo a trovare un neuropilo ancora gravemente danneggiato ben 14 giorni dopo esposizione ad anestesia generale. Nonostante il danno causato da anestesia generale sia stato descritto come apoptotico e quindi richieda tempo per dipanarsi (Yon e al, 2005; 2006) noi proponiamo una spiegazione alternativa per il danno protratto sui neuroni che osserviamo nel nostro studio. Ipotizziamo infatti che una riduzione significativa del numero di sinapsi alteri la capacità dei neuroni di connettersi uno con l'altro e di formare circuiti normofunzionanti. Questo potrebbe causare un ciclo di continuo reclutamento di neuroni ridondanti, incapaci di funzionare correttamente e quindi convogliati verso una "morte programmata". Chiaramente, ulteriori studi che chiariscano gli effetti dell'anestesia generale su altri aspetti della sinaptogenesi sono necessari, tra cui la migrazione dei neuroni, la loro differenziazione e maturazione, in modo da poter scoprire altri meccanismi in grado di spiegare questo prolungato danneggiamento neuronale dopo una singola esposizione ad anestesia.

Un aspetto interessante del neuropilo degli animali esperimento nel nostro studio è la scarsità di bottoni sinaptici multipli (MSBs) in tutti gli strati del subicolo rispetto agli animali controllo. Gli MSBs sono definiti come sinapsi che si formano contemporaneamente tra un assone e più di un profilo neuronale, al contrario dei bottoni sinaptici singoli (SSBs), in cui un assone contrae una sola sinapsi con un solo profilo neuronale (Briones e al, 2004; Sorensen e al, 2003; Yankova e al, 2001; Wooley e al, 1996). L'abbondanza di MSBs si associa ad un'aumentata efficienza e/o sincronizzazione della trasmissione sinaptica (Toni e al, 2007; Yankova e al, 2001; Briones e al, 2004) con un grosso vantaggio in termini di stabilità strutturale e di efficienza funzionale rispetto ai contatti sinaptici singoli. E' quindi ragionevole pensare che il ridotto numero di MSBs documentato nel nostro studio dopo esposizione ad anestesia generale possa almeno in parte spiegare alcuni dei meccanismi

causativi dei difetti cognitivi di animali esposti ad anestesia generale (Jevtovic-Todorovic e al, 2003).

L'importanza di una nutrizione adeguata ai fini di una corretta sinaptogenesi è nota da molto tempo. Già più di 20 anni fa, infatti, era stato suggerita un'associazione stretta tra denutrizione nei primi giorni di vita, ridotta densità sinaptica dell'ippocampo ed alterazioni dello sviluppo cognitivo (Ahmed e al, 1987). Tale intuizione è stata più volte confermata in studi successivi (Granados-Rojas e al, 2004; Lister e al, 2005). Di particolare interesse per il nostro studio sono le osservazioni riguardanti gli effetti di una denutrizione prolungata (30 giorni) sulle curve di crescita di neuroni e sinapsi, che suggeriscono una riduzione nella complessità del network sinaptico in presenza di denutrizione (Peeling e Smart, 1994). Per essere certi che il digiuno inflitto ai nostri giovani animali immediatamente prima, durante e subito dopo anestesia (circa 6-7 ore di digiuno) sia adeguatamente condiviso tra gli animali controllo e gli animali esperimento e non abbia un effetto significativo sulla loro curva di crescita ci siamo assicurati che gli animali controllo venissero esposti agli stessi tempi di digiuno degli animali esperimento. Inoltre, la registrazione giornaliera del peso degli animali controllo ed esperimento ha confermato che lo stato nutrizionale dei nostri animali non è alterato da quel breve periodo di digiuno e che gli animali esperimento crescono in peso allo stesso modo degli animali controllo nei primi 21 giorni di vita. Possiamo quindi affermare con sicurezza che le alterazioni delle sinapsi che qui riportiamo non possono essere ascritte alla denutrizione, ma piuttosto al danno causato dall'anestesia generale.

Perdite selettive di neuroni e sinapsi sono state riportate in condizioni patologiche quali, ad esempio, malattie croniche degenerative (Day e al, 2006; Lacor e al, 2004), così come in casi di lesioni ischemiche-riperfusioni (Garcia e al, 1996). Per esempio, in primati in cui sia stato riprodotto un danno da ischemia-riperfusioni è riportata una perdita selettiva di

neuroni nelle zone della corteccia risparmiate dall'ischemia, il che suggerisce che certi tipi di danno possono colpire selettivamente specifiche popolazioni di neuroni e sinapsi (Giffard e al, 2008). Sulla base delle nostre osservazioni la riduzione del numero di sinapsi causata dall'anestesia non appare essere selettiva nei confronti di nessuno degli strati del subicolo. Inoltre, a fronte di una riduzione significativa del numero totale di sinapsi, tale riduzione colpisce allo stesso modo i differenti tipi di contatti sinaptici (asso-spinoso, asso-dendritico e "altri"), così come le sinapsi di tipo eccitatorio o inibitorio. Il gruppo di Jevtovic-Todorovic ha dimostrato che l'esposizione ad anestesia generale causa una perdita numerica di neuroni nel subicolo di ratti e cavie (Rizzi e al, 2008; Nikizad e al, 2007) intorno al al 30-40% (Nikizad e al, 2007). Tale dato risulta in accordo con le percentuali medie di perdita di neuroni del nostro studio e suggerisce che la perdita non specifica di sinapsi che noi osserviamo è legata semplicemente alla morte di un numero simile di neuroni, che muoiono appunto trascinando con sé tutte le sinapsi presenti sulla loro superficie.

L'effetto dei gas anestetici sullo sviluppo delle sinapsi è stato studiato a partire dagli anni '70 (Quimby e al, 1974; Crain e al, 1973; Chang e al, 1974; 1976; Uemura e al, 1985) e si è inizialmente concentrato sull'alotano, un anestetico volatile simile all'isoflurano. In quegli studi le percentuali di gas anestetico analizzate sono basse e l'esposizione è cronica, nel tentativo di simulare le basse concentrazioni ambientali di anestetici volatili a cui sono esposti in utero i feti del personale di sala operatoria. Nonostante la ovvia differenza nella durata dell'esposizione (6 ore nel nostro studio contro tutto il periodo di vita intrauterina ed i primi 28 giorni dopo la nascita, per 8 ore al giorno, 5 giorni alla settimana) vi sono molte somiglianze per quel che riguarda il danno neuronale documentato. Infatti, molti di quegli autori riportano riduzioni significative del numero di sinapsi della corteccia e del subicolo, un ritardo nello sviluppo e nella maturazione di tali sinapsi, nonché una scarsa cellularità

del neuropilo (Quimby e al, 1974; Chang e al, 1976; Crain e al, 1973; Uemura e al, 1985). Nonostante il nostro studio non abbia seguito le modificazioni ultrastrutturali oltre il periodo di massima sinaptogenesi (le prime tre settimane di vita postnatale), altri autori hanno documentato gravi danni ai neuroni ed alterazioni degli organelli intracitoplasmatici della corteccia cerebrale a più di tre mesi di distanza da un'esposizione cronica a gas anestetici (Chang e al, 1976). E' interessante notare come in questi studi un'esposizione cronica ad alotano risulta in una riduzione significativa dello spessore delle densità postsinaptiche (Quimby e al, 1974) al contrario del nostro studio, in cui un cocktail di isoflurano, protossido d'azoto e midazolam non ha causato effetto alcuno sulle densità post sinaptiche.

Nonostante l'aspetto apparentemente normale del subicolo alla visualizzazione mediante microscopio ottico (Nikizad e al, 2007), alterazioni più fini dei neuroni dopo esposizione ad anestesia generale diventano facilmente riconoscibili quando studiate mediante microscopia elettronica, così da suggerire che un prolungato, insensibile ma continuo danno a livello neuronale si può protrarre per molti giorni dopo esposizione ad anestesia generale. Il nostro è il primo studio del genere che dimostra danni a lungo termine sulle sinapsi di topi giovani dopo una singola esposizione ad anestesia. Mediante l'utilizzo di elettrofisiologia su fette di ippocampo (CA1) il gruppo di Jevtovic-Todorovic ha dimostrato che un cocktail di anestetici uguale a quello del nostro studio (isoflurano, protossido d'azoto e midazolam) causa una prolungata depressione della long-term potentiation (LTP), senza però ridurre l'efficienza funzionale delle sinapsi eccitatorie (Jevtovic-Todorovic e al, 2003). Tale dato risulta particolarmente interessante se si considera che nel nostro studio abbiamo invece documentato una perdita non selettiva di sinapsi. La ragione di questa plasticità funzionale delle sinapsi non è ancora nota. A questo proposito è utile sottolineare che mitocondri normofunzionanti con una conseguente adeguata

produzione di ATP sono essenziali per il mantenimento di una normale fisiologia delle sinapsi (Li e al, 2004; Inquimbert e al, 2008; Jonas e al, 2004). Studi di elettrofisiologia dimostrano che l'applicazione in acuto di isoflurano o midazolam su neuroni potenzia il loro drive inibitorio tramite un'aumento dell'azione delle sinapsi di tipo inibitorio mediata da recettori GABA<sub>A</sub> (Franks, 2008), mentre il protossido d'azoto silenzia le sinapsi eccitatorie (tramite i recettori NMDA) (Mennerick e al, 1998) E' quindi possibile che i danni sui mitocondri inficino la loro capacità di produrre adeguate quantità di ATP e che questo vada a sua volta a danno preferenzialmente della funzione sinaptica inibitoria, a causa di uno sbilanciamento nel rapporto domanda-offerta. Saranno necessari ulteriori studi in futuro per chiarire i meccanismi precisi alla base delle alterazioni selettive di funzionalità dei neuroni sotto stimolazione GABAergica (Mody, 2005).

Concludiamo affermando che gli effetti dell'anestesia generale sul subicolo di ratti in via di sviluppo sono caratterizzati da gravi alterazioni ultrastrutturali nel numero e nella morfologia delle sue sinapsi. Tali alterazioni possono, almeno in parte, spiegare i deficit di memoria e di apprendimento a cui vanno incontro questi stessi animali durante la loro vita adulta a seguito di una singola esposizione ad anestesia generale al picco della sinaptogenesi.

## Bibliografia

Ahmed MG, Bedi KS, Warren MA, Kamel MM (1987) Effects of a lengthy period of undernutrition from birth and subsequent nutritional rehabilitation on the synapse: granule cell neuron ratio in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 263:146-58.

Bittigau P, Sifringer M, Pohl D, Stadthaus D, Ishimaru M, Shimizu H, Ikeda M, Lang D, Speer A, Olney JW, Ikonomidou C (1999) Apoptotic neurodegeneration following trauma is markedly enhanced in the immature brain. *Ann Neurol* 45: 724-35.

Briones TL, Suh E, Jozsa L, Hattar H, Chai J, Wadowska M (2004) Behaviorally-induced ultrastructural plasticity in the hippocampal region after cerebral ischemia. *Brain Res* 997:137- 46.

Chang LW, Dudley AW Jr, Lee YK, Katz J (1974) Ultrastructural changes in the nervous system after chronic exposure to halothane. *Exp Neurol* 45: 209-19.

Chang LW, Dudley AW Jr, Katz J (1976) Pathological changes in the nervous system following in utero exposure to halothane. *Environ Res* 11: 40-51.

Chua EF, Schacter DL, Rand-Giovannetti E, Sperling RA (2006) Understanding metamemory: neural correlates of the cognitive process and subjective level of confidence in recognition memory. *Neuroimage* 29:1150-60.



Crain B, Cotman C, Taylor D, Lynch G (1973) A quantitative electron microscopic study of synaptogenesis in the dentate gyrus of the rat. *Brain Res* 63:195-204

Day M, Wang Z, Ding J, An X, Ingham CA, Shering AF, Wokosin D, Ilijic E, Sun Z, Sampson AR, Mugnaini E, Deutch AY, Sesack SR, Arbuthnott GW, Surmeier DJ (2006) Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models. *Nat Neurosci* 9: 251-9.

Devi L, Diwakar L, Raju TR, Kutty BM (2003) Selective neurodegeneration of hippocampus and entorhinal cortex correlates with spatial learning impairments in rats with bilateral ibotenate lesions of ventral subiculum. *Brain Res* 960:9-15.

Dudanova I, Tabuchi K, Rohlmann A, Sudhof TC, Missler M (2007) Deletion of alpha-neurexins does not cause a major impairment of axonal pathfinding or synapse formation. *J Comp Neurol* 502:261-74.

Erisir A, Harris JL (2003) Decline of the critical period of visual plasticity is concurrent with the reduction of NR2B subunit of the synaptic NMDA receptor in layer 4. *J Neurosci* 23: 5208-18.

Franks NP (2008) General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. *Nat Rev Neurosci* 9: 370-86.

Galani R, Weiss I, Cassel JC, Kelche C (1998) Spatial memory, habituation, and reactions to spatial and nonspatial changes in rats with selective lesions of the hippocampus, the entorhinal cortex or the subiculum. *Behav Brain Res* 96:1-12.

Garcia JH, Lassen NA, Weiller C, Sperling B, Nakagawara J (1996) Ischemic stroke and incomplete infarction. *Stroke* 27: 761–765.

Giffard C, Landeau B, Kerrouche N, Young AR, Barré L, Baron JC (2008) Decreased chronic-stage cortical <sup>11</sup>C-flumazenil binding after focal ischemia-reperfusion in baboons: a marker of selective neuronal loss? *Stroke* 39: 991-9.

Granados-Rojas L, Aguilar A, Díaz-Cintra S (2004) The mossy fiber system of the hippocampal formation is decreased by chronic and postnatal but not by prenatal protein malnutrition in rats. *Nutr Neurosci* 7:301-8.

Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittigau P, Vöckler J, Dikranian K, Tenkova TI, Stefovská V, Turski L, Olney JW (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science* 283: 70-74.

Ikonomidou C, Bittigau P, Ishimaru MJ, Wozniak DF, Koch C, Genz K, Price MT, Stefovská V, Hörster F, Tenkova T, Dikranian K, Olney JW (2000) Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science* 287: 1056-1060.

Inquimbert P, Rodeau JL, Schlichter R (2008) Regional differences in the decay kinetics of GABA(A) receptor-mediated miniature IPSCs in the dorsal horn of the rat spinal cord are determined by mitochondrial transport of cholesterol. *J Neurosci* 28:3427-37.

Jevtovic-Todorovic V, Todorovic SM, Mennerick S, Powell S, Dikranian K, Benshoff N, Zorumski CF, Olney JW (1998) Nitrous oxide (laughing gas) is an NMDA antagonist, neuroprotectant and neurotoxin. *Nat Med* 4: 460-463.

Jevtovic-Todorovic V, Benshoff N, Olney JW (2000) Ketamine potentiates cerebrocortical damage induced by the common anaesthetic agent nitrous oxide in adult rats. *Br J Pharmacol* 130: 1692-1698.

Jevtovic-Todorovic V, Hartman RE, Izumi Y, Benshoff ND, Dikranian K, Zorumski CF, Olney JW, Wozniak DF (2003) Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *J Neurosci* 23: 876-882.

Jonas E (2004) Regulation of synaptic transmission by mitochondrial ion channels. *J Bioenerg Biomembr* 36:357-61.

Kovalenko T, Osadchenko I, Nikonenko A, Lushnikova I, Voronin K, Nikonenko I, Muller D, Skibo G (2006) Ischemia-induced modifications in hippocampal CA1 stratum radiatum excitatory synapses. *Hippocampus* 16:814-25.

Kurt MA, Kafa MI, Dierssen M, Davies DC (2004) Deficits of neuronal density in CA1 and synaptic density in the dentate gyrus, CA3 and CA1, in a mouse model of Down syndrome. *Brain Res* 1022:101-9.

Lacor PN, Buniel MC, Chang L, Fernandez SJ, Gong Y, Viola KL, Lambert MP, Velasco PT, Bigio EH, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (2004) Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *J Neurosci* 24:10191-200.

Laxmi TR, Bindu PN, Raju TR, Meti BL (1999) Spatial memory impairment in ventral subicular lesioned rats. *Brain Res* 816:245-8.

Li Z, Okamoto K, Hayashi Y, Sheng M. (2004) The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell* 119: 873-87.

Lister JP, Blatt GJ, DeBassio WA, Kemper TL, Tonkiss J, Galler JR, Rosene DL (2005) Effect of prenatal protein malnutrition on numbers of neurons in the principal cell layers of the adult rat hippocampal formation. *Hippocampus* 15: 393-403.

Lodge D, Anis NA (1982) Effects of phencyclidine on excitatory amino acid activation of spinal interneurons in the cat. *Eur J Pharmacol* 77: 203-4.

Loepke AW, Istaphanous GK, McAuliffe JJ3rd, Miles L, Hughes EA, McCann JC, Harlow KE, Kurth CD, Williams MT, Vorhees CV, Danzer SC (2009) The effects of neonatal isoflurane exposure in mice on brain cell viability, adult behavior, learning, and memory. *Anesth Analg* 108:90-104.

Lu LX, Yon JH, Carter LB, Jevtovic-Todorovic V (2006) General anesthesia activates BDNF-dependent neuroapoptosis in the developing rat brain. *Apoptosis* 11: 1603-15.

McNaughton N (2006) The role of the subiculum within the behavioural inhibition system. *Behav Brain Res* 174: 232-50.

Mennerick S, Jevtovic-Todorovic V, Todorovic SM, Shen W, Olney JW, Zorumski CF (1998) Effect of nitrous oxide on excitatory and inhibitory synaptic transmission in hippocampal cultures. *J Neurosci* 18:9716-26.

Mody I (2005) Aspects of the homeostatic plasticity of GABAA receptor-mediated inhibition. *J Physiol.* 562: 37-46.

Morris RG, Schenk F, Tweedie F, Jarrard LE (1990) Ibotenate Lesions of Hippocampus and/or Subiculum: Dissociating Components of Allocentric Spatial Learning. *Eur J Neurosci* 2: 1016-1028.

Munno DW, Syed NI (2003) Synaptogenesis in the CNS: an odyssey from wiring together to firing together. *J Physiol* 552:1-11.

Naber PA, Witter MP, Da Silva FHL (2000) Networks of the hippocampal memory system of the rat. The pivotal role of the subiculum. *Ann NY Acad Sci* 911:392-403.

Nikizad H, Yon J-H, Carter LB, Jevtovic-Todorovic V (2007) Early exposure to general anesthesia causes significant neuronal deletion in the developing rat brain. *Annals of New York Academy of Sciences* 1122: 69-82.

O'Mara SM, Commins S, Anderson M, Gigg J (2001) The subiculum: a review of form, physiology and function. *Prog Neurobiol* 64:129-55.

Oo TF, Henchcliffe C, Burke RE (1995) Apoptosis in substantia nigra following developmental hypoxic-ischemic injury. *Neuroscience* 69: 893-901

Oswald CJ, Good M (2000) The effects of combined lesions of the subicular complex and the entorhinal cortex on two forms of spatial navigation in the water maze. *Behav Neurosci* 114:211-7.

Paxinos G, Watson C (1986) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, Australia.

Peeling AN, Smart JL (1994) Successful prediction of immediate effects of undernutrition throughout the brain growth spurt on capillarity and synapse-to-neuron ratio of cerebral cortex in rats. *Metab Brain Dis* 9: 81-95.

Quimby KL, Aschkenase LJ, Bowman RE, Katz J, Chang LW (1974) Enduring learning deficits and cerebral synaptic malformation from exposure to 10 parts of halothane per million. *Science* 185: 625-7.

Rizzi S, Carter LB, Ori C, Jevtovic-Todorovic V (2008) Clinical anesthesia causes permanent damage to the fetal guinea pig brain. *Brain Pathology* 18:198-210.

Slikker W Jr, Zou X, Hotchkiss CE, Divine RL, Sadovova N, Twaddle NC, Doerge DR, Scallet AC, Patterson TA, Hanig JP, Paule MG, Wang C (2007) Ketamine-induced neuronal cell death in the perinatal rhesus monkey. *Toxicol Sci* 98:145-58.

Sorensen SA, Jones TA, Olavarria JF (2003) Neonatal enucleation reduces the proportion of callosal boutons forming multiple synaptic contacts in rat striate cortex. *Neurosci Lett* 351:17-20.

Toni N, Teng EM, Bushong EA, Aimone JB, Zhao C, Consiglio A, Van Praag H, Martone ME, Ellismann MH, Gage FH (2007) Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nat Neurosci* 6:727-734.

Uemura E, Levin ED, Bowman RE (1985) Effects of halothane on synaptogenesis and learning behavior in rats. *Exp Neurol* 89: 520-9.

Uranova NA, Orlovskaya DD, Apel K, Klintsova AJ, Haselhorst U, Schenk H (1991) Morphometric study of synaptic patterns in the rat caudate nucleus and hippocampus under haloperidol treatment. *Synapse* 7:253-9.

Waites CL, Craig AM, Garner CC (2005) Mechanisms of vertebrate synaptogenesis. *Annu Rev Neurosci* 28:251-74.

Wooley CS, Wenzel HJ, Schwartzkroin PA (1996) Estradiol increase the frequency of multiple synapse boutons in the hippocampal CA1 region of the adult female rat. *J Comp Neurol* 373:108-117.

Yankova M, Hart SA, Wooley CS (2001) Estrogen increases synaptic connectivity between single presynaptic inputs and multiple postsynaptic CA1 pyramidal cells: a serial electron-microscopic study. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:3525-3530.

Yon J-H, Daniel-Johnson J, Carter LB, Jevtovic-Todorovic V (2005) Anesthesia induces neuronal cell death in the developing rat brain via the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. *Neuroscience* 35: 815-827.

Yon J-H, Carter LB, Reiter RJ, Jevtovic-Todorovic V (2006) Melatonin reduces the severity of anesthesia-induced apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain. *Neurobiol Dis* 21: 522-530.

Young C, Jevtovic-Todorovic V, Qin YQ, Tenkova T, Wang H, Labruyere J, Olney JW (2005) Potential of ketamine and midazolam, individually or in combination, to induce apoptotic neurodegeneration in the infant mouse brain. *Brit J Pharmacol* 146:189-97.



## APPENDICE

**Figura 1:** L'esposizione ad una anestesia generale non causa differenze significative nella crescita degli animali controllo rispetto agli animali esperimento nei primi 21 giorni di vita. Il peso giornaliero degli animali prima e dopo anestesia (indicata come "treatment") non mostra alcuna differenza tra animali controllo ed esperimento per 14 giorni dopo l'anestesia (PND21, post natal day 21, indicato come "sacrifice") (n=36 topi controllo e 36 topi esperimento).

**Figura 2:** L'esposizione ad una anestesia generale causa una profonda alterazione del neuropilo del subicolo ippocampale (A) e dei suoi mitocondri (B). **a.** Lo strato piramidale del subicolo di un animale controllo mostra numerosi neuroni e cellule della glia, e molteplici sinapsi (freccette). **b,c.** Gli strati piramidali di due differenti animali esperimento mostrano scarse sinapsi (freccette) ed una bassa densità di neuroni e cellule della glia. **d.** I mitocondri di un animale controllo appaiono morfologicamente integri e presentano una doppia membrana di rivestimento e, all'interno di questa, le cristie mitocondriali allineate in maniera ordinata e parallela. **e,f.** I mitocondri degli animali esperimento in diversi stadi di degenerazione. Alcuni mitocondri appaiono rigonfi e con cristie edematose, ma con una doppia membrana di rivestimento ancora intatta (e). Altri appaiono scuri, raggrinziti e condensati, senza una chiara distinzione tra la membrana interna ed esterna di rivestimento (f) (ingrandimento 12000x).

**Figura 3:** L'esposizione ad una anestesia generale causa una riduzione significativa della densità sinaptica di tutti e tre gli strati del subicolo ippocampale in topi di 21 giorni di vita. Nel subicolo di animali esposti ad anestesia generale il numero totale di sinapsi per  $\mu\text{m}^3$  nello strato piramidale, molecolare e polimorfo è ridotto in maniera significativa rispetto a

quello degli animali controllo (in media del 30-40%) (strato piramidale  $P < 0.001$ ; strato polimorfo e molecolare  $P < 0.01$ ;  $n = 4$  animali controllo e 4 animali esperimento).

**Figura 4:** Gli animali esposti ad anestesia presentano scarsi bottoni sinaptici multipli. **A.** Numerosi bottoni sinaptici multipli su un neurone controllo (freccette). In **B**, al contrario, vi e' una pressoché completa assenza di sinapsi (ingrandimento 12000x).

**Figura 5:** Presenza di sinapsi morfologicamente intatte su profili di neuroni apoptotici negli animali esposti ad anestesia (ingrandimento 120000x).

**Figura 6:** L'esposizione ad una anestesia non causa la perdita preferenziale di certi tipi di sinapsi rispetto ad altri (**A**) o di sinapsi di tipo eccitatorio piuttosto che inibitorio (**B**). Il rapporto tra sinapsi di tipo eccitatorio, inibitorio e di tipo indeterminato rimane lo stesso negli animali esperimento rispetto a quelli controllo: circa 75%, 5% e 20% rispettivamente. Allo stesso modo, non vi e' differenza nel rapporto tra sinapsi asso-spinose, asso-dendritiche o di altro tipo negli animali esperimento rispetto agli animali controllo (70-80%, 15-20% e 5-10%, rispettivamente) ( $n = 4$  animali controllo e 4 animali esperimento).

Figura 1

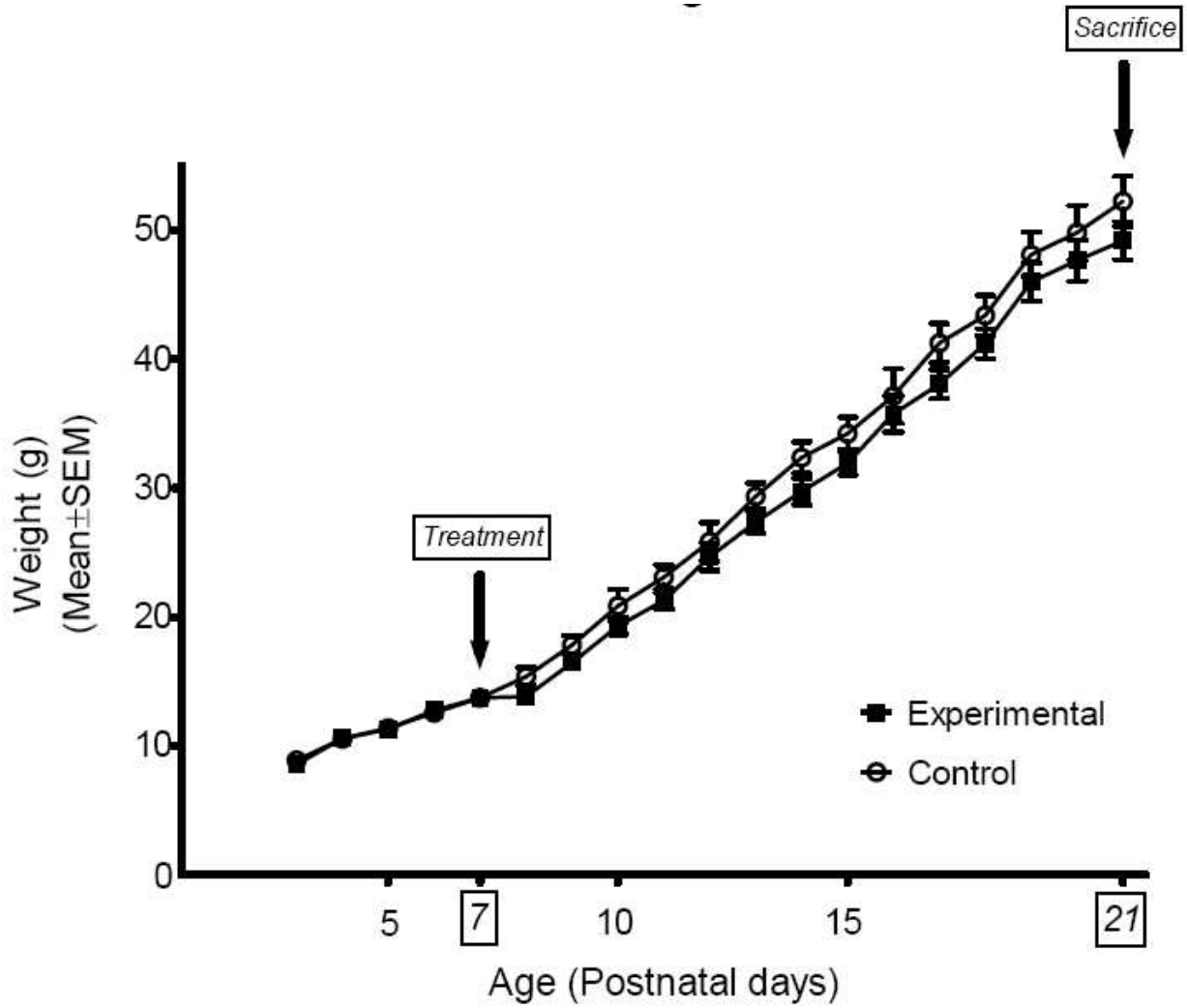


Figura 2.A

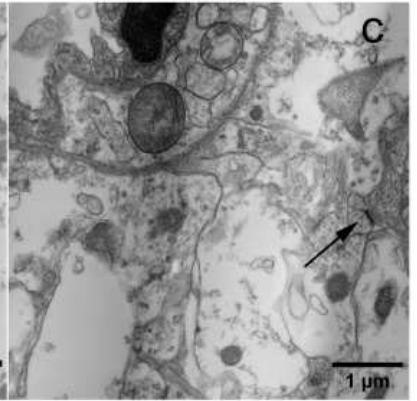
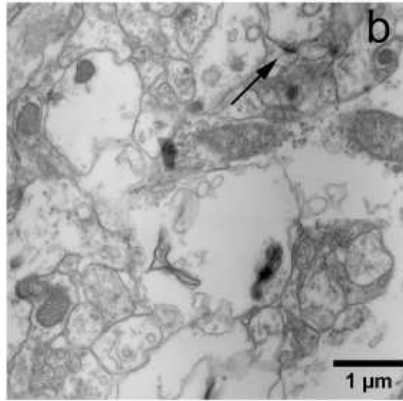
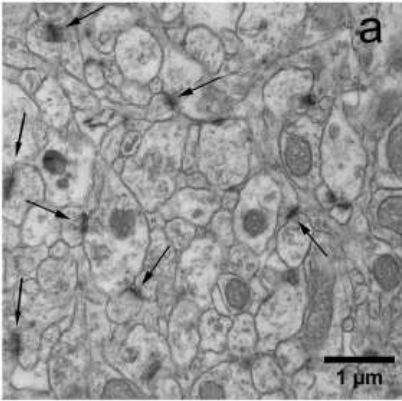


Figura 2.B

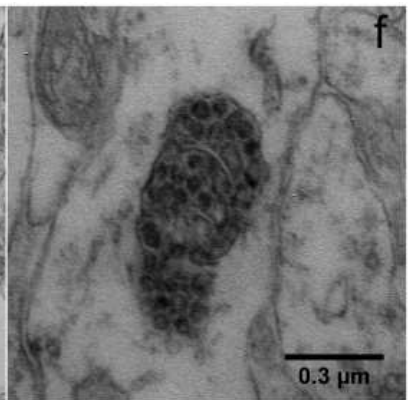
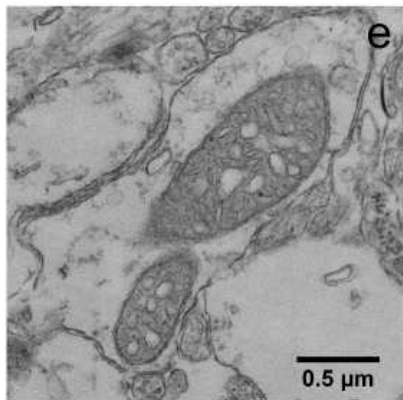
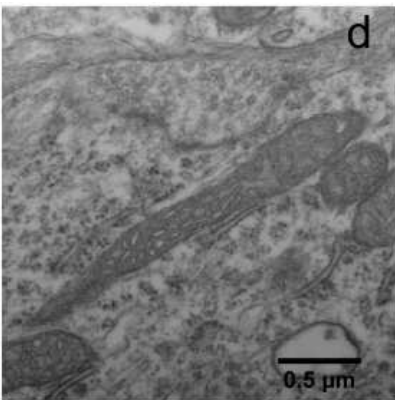


Figura 3

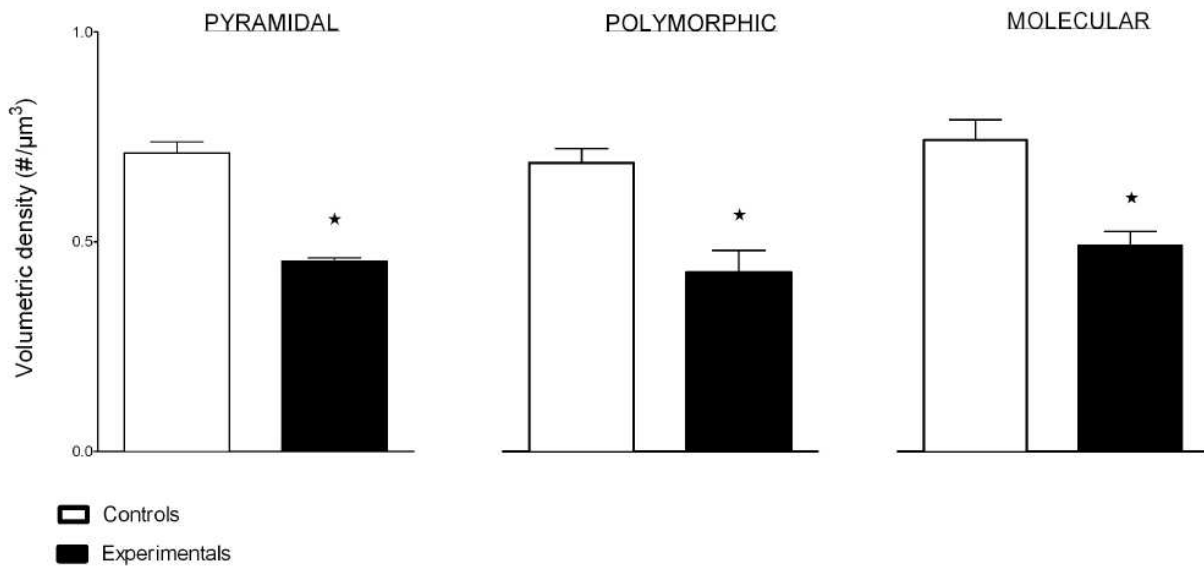


Figura 4

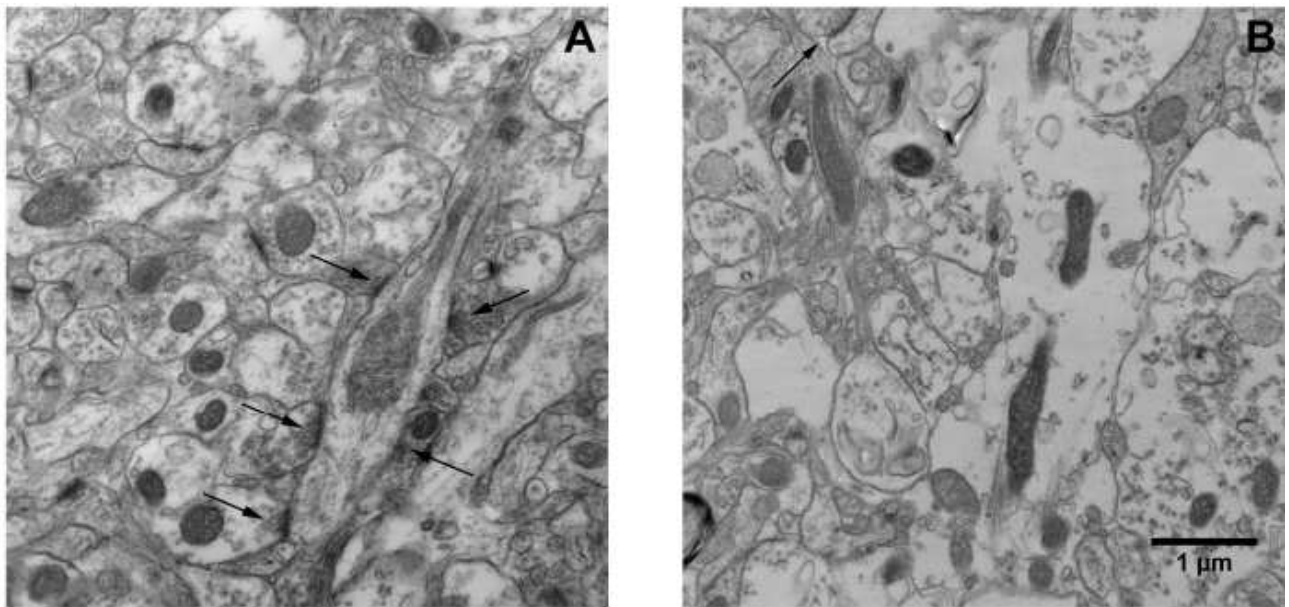


Figura 5

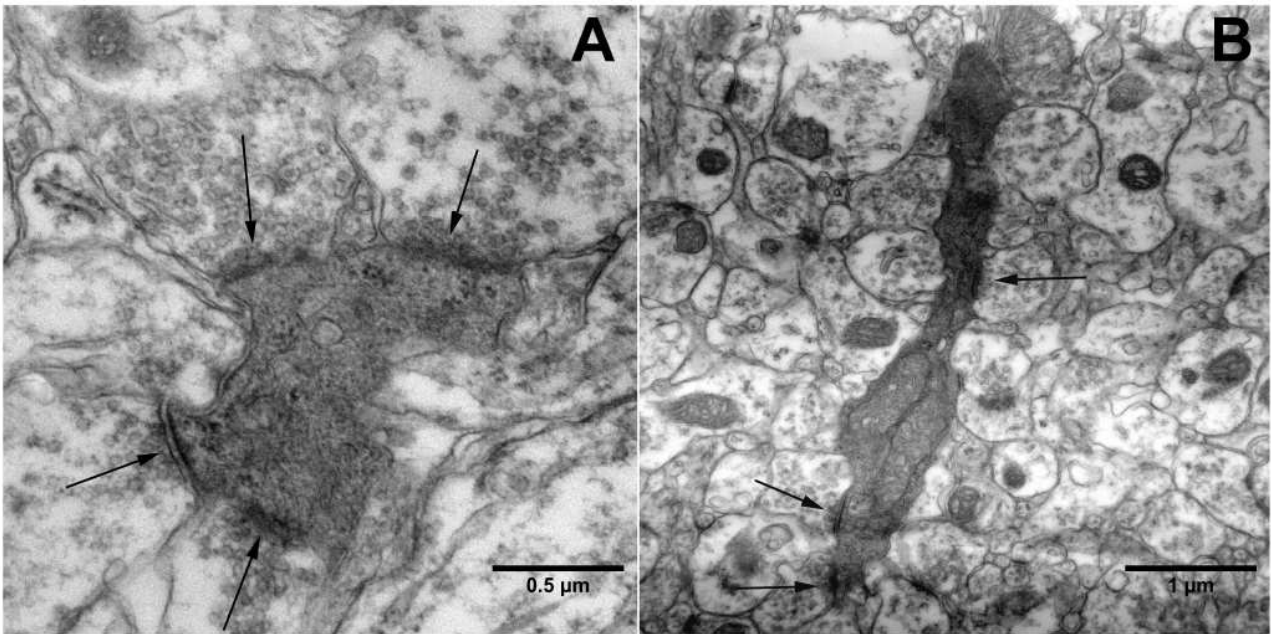


Figura 6.A

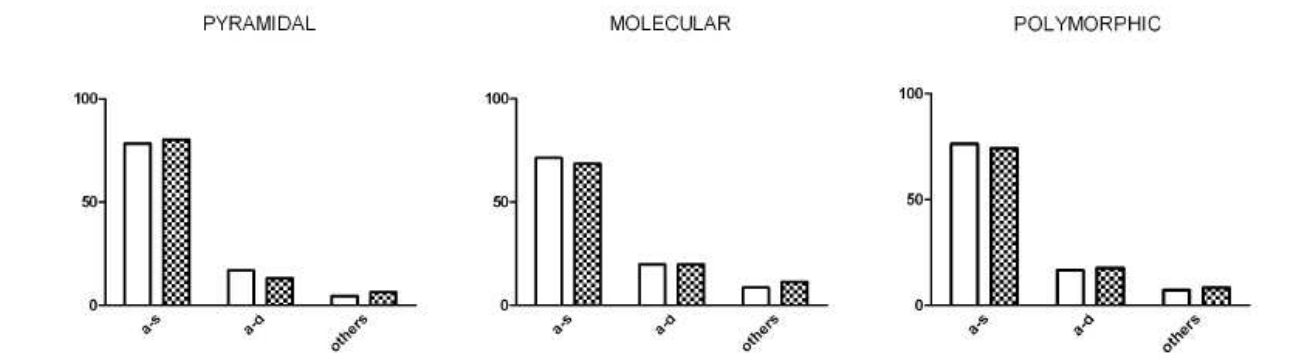
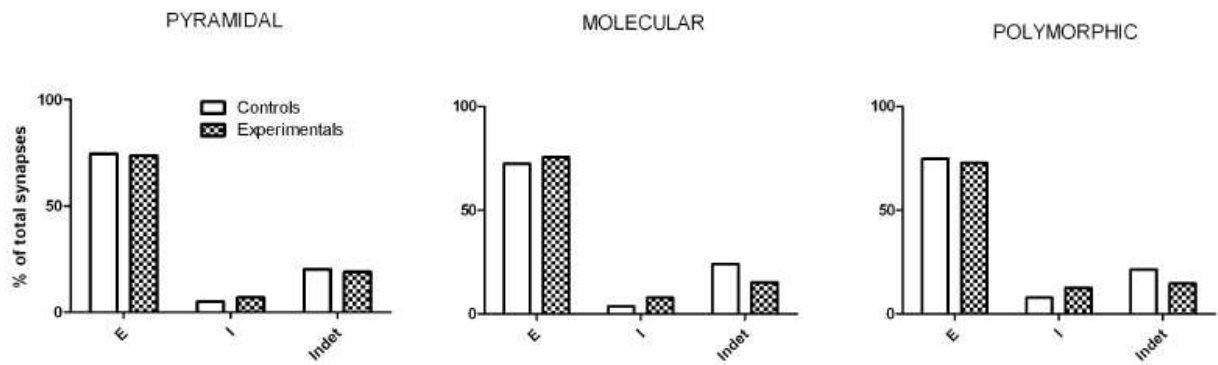


Figura 6.B



# PARTE II

## IL RUOLO DEGLI ASTROCITI NEL SISTEMA NERVOSO

Le cellule della glia costituiscono più della metà del totale delle cellule del cervello umano, e sono quindi molto più rappresentate dei neuroni. Nonostante il loro fenotipo vari molto al variare della zona anatomica del cervello che si prende in considerazione, esse sono state tradizionalmente suddivise in tre sottogruppi: gli astrociti, gli oligodendrociti e la microglia.

A loro volta gli astrociti sono stati storicamente distinti in protoplasmici e fibrosi, differenti per morfologia, fenotipo antigenico e posizione anatomica. Infatti, mentre gli astrociti protoplasmici sono situati a livello della sostanza grigia e coi loro processi circondano le sinapsi ed i vasi sanguigni, gli astrociti fibrosi sono localizzati principalmente nella sostanza bianca, e prendono contatto coi nodi di Ranvier oltre che coi vasi sanguigni.

Fino a qualche decennio fa si riteneva che il ruolo principale degli astrociti fosse di supporto delle cellule “più nobili” del sistema nervoso centrale, ossia i neuroni. Più in particolare, si riteneva che il loro ruolo a livello delle sinapsi fosse semplicemente quello di controllare i livelli di vari ioni, in particolare degli ioni  $K^+$ , nello spazio extracellulare. Nel 1997 Pfrieger e Barres hanno però dimostrato che neuroni purificati dai gangli della retina e coltivati in vitro sono in grado di sviluppare dendriti ed assoni in modo normale, nonché di essere elettricamente “eccitabili”, ma esibiscono una scarsissima attività sinaptica. Quando invece questi stessi neuroni vengono fatti crescere in coltura con astrociti, o in un mezzo di coltura condizionato da astrociti, la loro attività sinaptica è accresciuta di circa 100 volte. Qualche anno più tardi Ullian e collaboratori confermano che le poche sinapsi



formate dai neuroni della retina in assenza di un monostato di astrociti sono funzionalmente immature e che l'aggiunta di astrociti non solo aumenta di circa 10 volte il numero di sinapsi formate, ma agisce anche potenziandone le funzioni pre e post sinaptiche. Nel 2005 Christopherson e colleghi chiariscono che gli astrociti promuovono la formazione delle sinapsi attraverso la produzione di una proteina della matrice -la trombospondina. Le trombospondine sono una grande famiglia di 5 tipi diversi di proteine, ed almeno 4 di questi sono prodotti dagli astrociti. Oggi sappiamo che la presenza delle trombospondine è sufficiente ad indurre la formazione di sinapsi morfologicamente normali e con un normale clustering proteico pre- e post-sinaptico. Tuttavia, tali sinapsi appaiono silenti a livello post sinaptico, perché mancano di sensibilità al glutammato. Infatti, Christopherson e collaboratori hanno dimostrato che gli astrociti sono in grado di secernere un'altra proteina -la cui struttura non è ancora stata identificata- capace di indurre la sensibilità post sinaptica al glutammato. Mauch e collaboratori hanno dimostrato che a livello presinaptico, invece, la presenza di molecole di colesterolo secrete dagli astrociti è in grado di aumentare la funzione presinaptica di circa 100 volte.

Oggi sappiamo che gli astrociti influenzano in maniera attiva il funzionamento di molti circuiti neuronali del cervello adulto. Nel 2008 Agulhon e collaboratori hanno dimostrato che i neuroni rilasciano una varietà di sostanze nella matrice extracellulare, tra cui ATP e glutammato, in grado di attivare i recettori legati alle proteine G degli astrociti. Tale legame causa un aumento di inositol-trifosfato (IP3) nel citoplasma degli astrociti, a sua volta responsabile del rilascio di  $Ca^{++}$  dal reticolo endoplasmico. I livelli intracellulari di calcio non solo regolano il rilascio da parte degli astrociti di sostanze vasocostrittrici e/o vasodilatatrici sui vasi sanguigni del cervello (Zonta e collaboratori), ma correlano anche con il grado di attivazione dei neuroni (Wang e collaboratori). Tale sincizio tra neuroni, astrociti e vasi sanguigni è ritenuto di importanza talmente vitale che alcuni studiosi hanno

coniato per esso il termine di “unità neuro-vascolare”. Inoltre, gli astrociti sono in grado di secernere un gran numero di sostanze che influenzano la trasmissione sinaptica. Per esempio, rilasciano ATP dai lisosomi in risposta ad elevati livelli di calcio intracellulare (l'ATP è una delle molecole la cui mancanza è fattore limitante per una corretta trasmissione sinaptica) (Jaiswal e collaboratori). Gli astrociti secernono anche D-serina, un importante neurotrasmettitore che funge da co-agonista del glutammato a livello dei recettori NMDA (Mustafa e collaboratori). Infine, gli astrociti sono i principali fornitori dello scheletro di carbonio necessario per la sintesi de novo di glutammato e GABA all'interno dei neuroni (Hertz e collaboratori), per cui la velocità con cui gli astrociti riforniscono i neuroni di tale materiale è un importante fattore limitante della trasmissione sinaptica.

Nell'ultimo decennio vari laboratori hanno messo a punto diverse tecniche di isolamento degli RNA messaggeri prodotti dagli astrociti in coltura, nella speranza di poter codificare i diversi tipi di proteine prodotte da queste cellule e le loro funzioni. Tra le sequenze genetiche studiate fin'ora, Bishop e collaboratori hanno scoperto che la sequenza Draper/Megf10 –che codifica proteine coinvolte nella fagocitosi- è particolarmente ben rappresentata negli astrociti in coltura. Tale sequenza è stata reperita anche negli astrociti di *Drosophila*, dove soprasiede alla selezione degli assoni, e nelle cellule di Schwann (una classe particolare di astrociti), dove media la fagocitosi della mielina danneggiata e partecipa all'eliminazione delle sinapsi non o poco funzionanti. Questi dati – ancora preliminari- suggeriscono un possibile ruolo degli astrociti nell'eliminazione attiva delle sinapsi tramite fagocitosi.

E' noto da tempo che gli astrociti in coltura rilasciano fattori neurotrofici che fortemente sostengono la sopravvivenza dei neuroni. Tuttavia, non sappiamo quali siano questi fattori neurotrofici, e come promuovano il benessere dei neuroni. Gli studi sugli mRNA prodotti dagli astrociti in vitro hanno confermato che gli astrociti secernono un gran numero di

fattori neurotrofici nella matrice extracellulare. Purtroppo però le funzioni degli mRNA più frequentemente trascritti rimangono ancora sconosciute. Tra le sequenze geniche più espresse vi sono ApoE, ApoJ, MFGE8 e cistatina C. Molti studiosi ipotizzano che le prime tre codifichino proteine contenute nelle particelle lipoproteiche secrete dagli astrociti, le quali rivestono le sinapsi o i vari detriti cellulari e –funzionando da opsonine- ne facilitano l'eliminazione tramite fagocitosi.

Uno dei ruoli tradizionalmente attribuiti agli astrociti è la formazione della barriera emato-encefalica. In realtà, negli ultimi decenni è divenuto evidente che le cellule dell'endotelio vascolare rivestono un ruolo preminente in questo processo, e non gli astrociti. Infatti, in un modello animale di topo la barriera emato-encefalica è risultata già completamente formata al giorno 11 o 12 di vita intrauterina, molto prima della generazione degli astrociti (Saunders e collaboratori). E' soltanto nel periodo postnatale che gli astrociti vengono coinvolti nel mantenimento -più che nella formazione- della barriera ematoencefalica (Cahoy e collaboratori), e continuano a rivestire un ruolo nel rafforzamento della barriera emato-encefalica in caso di danno al cervello.

Concludendo, poichè gli astrociti rappresentano più della metà delle cellule del cervello umano è difficile pensare che esista una patologia del sistema nervoso centrale che non coinvolga gli astrociti. Purtroppo, ad oggi la ricerca sulla neurotossicità e sulle patologie del sistema nervoso centrale e periferico si è pressoché esclusivamente concentrata sui neuroni. Per esempio, l'edema degli astrociti è una componente drammatica e dannosissima di ogni insulto acuto a carico del SNC, compresi l'ictus ed il trauma cranico, e nonostante questo fino ad oggi ci siamo preoccupati esclusivamente dell'edema dei neuroni, e non sappiamo né perché gli astrociti diventano edematosi né come ridurre tale edema. Ancora, molte comuni malattie neurologiche, tra cui l'epilessia e la sclerosi multipla, sono state correlate a mutazioni di geni espressi dagli astrociti. Ancora,

numerose patologie a carico del SNC causano una gliosi reattiva, che a volte può essere benefica – quando serve ad incapsulare un’infezione o a riparare la barriera emato-encefalica - ma altre volte risulta dannosa- quando inibisce la generazione di nuovi neuroni o promuove in maniera incontrollata la formazione di sinapsi che diventano in seguito responsabili di epilessia o di dolore neuropatico. Infine, è stato dimostrato di recente che astrociti danneggiati in vitro sono in grado di rilasciare nella matrice extracellulare un segnale neurotossico estremamente potente capace di uccidere rapidamente i neuroni (Di Giorgio e collaboratori).

Sulla scorta dei dati presentati, è intuitivo che se le cellule della glia sono danneggiate, i neuroni non possono essere protetti né curati da trattamenti o farmaci che hanno come target unico i neuroni stessi. Una strategia molto più efficace appare invece quella di prevenire il danno sugli astrociti o di riparare il danno prima che si propaghi ai neuroni. Nei prossimi anni sarà imperativo chiarire come il danno sulle cellule della glia viene prodotto e come questo si traduce in un danno secondario sui neuroni, per poter prevenire e trattare molte delle comuni malattie neurologiche la cui fisiopatologia rimane ad oggi in buona parte sconosciuta.

## INTRODUZIONE ALLO STUDIO

Fino ad una decina di anni fa si riteneva che il ruolo principale delle cellule della glia fosse semplicemente quello di supportare le cellule piu' nobili del sistema nervoso, i neuroni. Le principali funzioni attribuite alle cellule della glia erano quelle di trasporto dell'ossigeno e dei nutrienti, di mantenimento del PH nell'ambiente extracellulare, di trasporto della mielina per il riparo di eventuali danni assonali e la costituzione della barriera emato-encefalica. Tuttavia, nell'ultimo decennio una quantita' considerevole di studi – sia in vivo che in vitro- ha rivalutato il ruolo delle cellule della glia ed ha dimostrato come tali cellule presiedano a molti degli aspetti piu' cruciali dello sviluppo del cervello animale (Barres, 2008; Ullian e al, 2004). Oggi sappiamo che le cellule della glia sono a capo della corretta migrazione dei neuroni durante la neuronogenesi e della selezione e maturazione delle sinapsi nel corso della sinaptogenesi. In particolare, tra le cellule della glia gli astrociti promuovono la formazione di nuove sinapsi e stabilizzano le sinapsi esistenti. Gli astrociti esprimono sulla loro superficie recettori per l'acido gamma-amino-butirrico A (GABA A) e sono quindi in grado di ricevere informazioni dai neuroni e di modulare il proprio funzionamento sulla base delle informazioni ricevute (Runquist e al, 2003; Fraser e al, 1994). Studi in vitro hanno dimostrato che quando i neuroni vengono coltivati in assenza di astrociti formano un numero ridotto di sinapsi che si caratterizzano per una bassa attivita' sinaptica intrinseca (Ullian e al, 2004; Pfrieder e al, 1997).

Fino ad oggi la maggior parte della ricerca nel campo della neurotossicita' indotta dagli anestetici generali e' stata condotta sui neuroni. Dal momento che le cellule della glia rivestono un ruolo cruciale in molti aspetti dello sviluppo del cervello e sono attive nel corso della neuronogenesi e della sinaptogenesi almeno quanto i vicini neuroni, ci siamo posti la domanda se gli anestetici generali possano causare tossicita' anche sulle cellule

della glia. Abbiamo quindi ipotizzato che i danni sui neuroni dopo esposizione ad una anestesia generale possano essere non solo dovuti ad una tossicità diretta sui neuroni – come già ben documentato in molti studi- ma anche almeno in parte attribuiti ad un danno secondario sui neuroni causato da un iniziale danno a carico delle cellule della glia.

Le cellule della glia necessitano di una normale morfologia per poter espletare le loro molteplici funzioni. Un'adeguata organizzazione del citoscheletro e la corretta espressione di una delle sue principali proteine -l'actina- sono presupposti essenziali nel determinare la normale trasformazione morfologica e quindi il corretto funzionamento delle cellule della glia. Proprio perché di vitale importanza, la modulazione del citoscheletro delle cellule della glia è finemente regolata da un gran numero di cascate di segnali e di messaggeri secondari (Hall, 1998). Tra queste, una delle proteine più importanti è RhoA, una GTPasi che alterna una forma inattivata, legata a GDP, ad una forma attivata, legata a GTP (Bishop e al, 2000). Nella forma attivata RhoA è in grado di fosforilare la catena leggera della miosina (MLC, myosin light chain), che a sua volta promuove l'organizzazione dell'actina in *actin stress fibers* (ASF) e la formazione di adesioni focali alla matrice extracellulare. Le actin stress fibers sono aggregati di *actina funzionale* (*F actin*) che si uniscono a formare spessi filamenti che corrono all'interno del citoplasma cellulare e costituiscono l'impalcatura strutturale della cellula. La formazione di ASF è alla base di numerose attività di vitale importanza: il trasporto di nutrienti nei diversi compartimenti cellulari, la formazione degli organelli intracitoplasmatici, l'elongamento di processi a partenza dal corpo cellulare attraverso cui la cellula stabilisce connessioni con le cellule vicine e la motilità cellulare stessa. Varie proteine di adesione -tra cui la *paxillina*- si legano alle ASF a livello della membrana cellulare a formare zone di adesione focale, attraverso cui la cellula si ancora alla matrice cellulare e che sfrutta come punti di forza per la propria propulsione. A questo proposito è interessante notare che alcuni studi hanno dimostrato come la perturbazione della cascata dei segnali presieduta da RhoA ad opera dell'etanolo

-che agisce su molti dei recettori cellulari su cui agiscono i più comuni anestetici generali- causa danni severi al citoscheletro delle cellule della glia, con conseguente alterazione della loro morfologia e del loro corretto funzionamento (Guasch e al, 2003; Minambres e al, 2006).

Per poter studiare gli effetti dell'esposizione di cellule della glia ad una anestesia generale abbiamo scelto un modello in vitro di colture primarie di cellule della glia immature. Questo modello ci ha permesso innanzitutto di separare la tossicità sulle cellule della glia da quella sui neuroni, cosa che non sarebbe stata possibile utilizzando un sistema in vivo. Inoltre, ha reso possibile studiare le cellule della glia nella fase di trasformazione da *cellule radiali*- al day in vitro (DIV) 4, estremamente immature- ad astrociti maturi (DIV15). Tale fase di trasformazione coincide infatti con il periodo della neuronogenesi e della sinaptogenesi, quindi con il tempo durante il quale le cellule della glia sono particolarmente "attive". Ipotizziamo infatti che l'elevato metabolismo e la frenetica attività che contraddistinguono le cellule della glia durante lo sviluppo del cervello le rendano particolarmente vulnerabili agli effetti tossici degli anestetici generali.

## **Materiali e Metodi**

*Colture primarie di cellule della glia.* Le nostre colture primarie sono state preparate a partire dal cervello di topi di razza Sprague-Dawley di 1 o 2 giorni di vita (Goslin e al, 1998). Il tessuto del cervello è stato rimosso sterilmente dal cranio, liberato dalle meningi, cervelletto, bulbi olfattori e tronco cerebrale e tritato minutamente. A partire da questo tessuto è stata creata una sospensione cellulare tramite l'aggiunta di soluzione salina bilanciata di Hank, e questa sospensione è stata poi trattata con DNAsi 1% e tripsina 2.5%. La sospensione così digerita è stata centrifugata a 800 giri per minuto per un totale

di 5 minuti ed il sedimento e' stato risospeso nel mezzo di coltura (minimum essential medium con sali di Earle) con l'aggiunta di siero di cavallo 10%, glucosio 6% ed antibiotici (penicillina e streptomina). Il giorno di impiattamento e' stato considerato il giorno di coltura 0 (day in vitro 0, DIV0). Le colture sono state mantenute in una atmosfera controllata (5% di anidride carbonica, 95% di umidita' a 37°C) all'interno di un incubatore, senza mai essere congelate/scongelate ne' trattate con tripsina. Il mezzo di coltura e' stato cambiato il giorno successivo all'impiattamento, ed in seguito ogni tre giorni. La densita' di impiattamento e' stata di circa 50.000 cellule per piatto di coltura. Abbiamo utilizzato piatti con fondo di vetro di 35 mm trattati con polilisina 2-3 giorni prima dell'impiattamento. La purezza delle colture cellulari e' stata determinata tramite l'uso di anticorpi monoclonali di topo contro la proteina acidica fibrillare della glia (GFAP) e la proteina di tipo 2 associata al microtubulo, per testare rispettivamente la percentuale di astrociti e di neuroni presenti in coltura. La contaminazione con neuroni si e' attestata intorno all'1%, quella con microglia intorno al 4%, con il restante 95% di cellule rappresentato da astrociti.

L'iniziale densita' di impiattamento delle cellule in coltura e' un determinante fondamentale della loro capacita' di creare connessioni e di proliferare. Infatti, gli astrociti in coltura hanno necessita' di "toccarsi" l'un l'altro attraverso i processi che emanano dai loro corpi cellulari per poter attivare le cascate dei segnali endogene che portano alla creazione di altri processi, alla maturazione morfologica della cellula ed alla sua proliferazione. Per evitare i fattori confondenti legati a variazioni del numero di cellule dopo l'impiattamento abbiamo eseguito uno screening di tutte le colture al DIV4 e candidato per il trattamento solo quelle con bassa densita' cellulare e distribuzione uniforme (40-80 cellule/mm<sup>2</sup>). A questo scopo abbiamo inizialmente screenato al microscopio ottico le colture, e poi colorato ed analizzato (vedi materiali e metodi) il 10% di quelle candidate al trattamento, per essere certi che tali colture rispondessero ai suddetti criteri di bassa densita' e distribuzione uniforme. Con queste densita' di impiattamento iniziale abbiamo assistito alla



formazione di uno strato confluyente di astrociti in maniera consistente dopo circa 10-14 giorni di coltura.

*Trattamento con Isoflurano.* Le colture di astrociti sono state esposte ad isofluorano 3% per 24 ore al DIV4 (cellule radiali) e al DIV 15 (astrociti maturi). Per il trattamento è stata utilizzata una speciale camera di anestesia dove le colture sono state mantenute in una atmosfera umidificata con la seguente composizione: anidride carbonica 5%, aria 92% ed isofluorano 3%. Tale concentrazione di isofluorano è clinicamente rilevante nel trattamento di colture di neuroni di topo (Sall e al, 2009); inoltre studi in vivo hanno suggerito che la minima concentrazione alveolare di isofluorano necessaria per raggiungere un piano chirurgico di anestesia in giovani topi oscilla tra 3.6% e 4% (Stratmann e al, 2009). Alla somministrazione di isofluorano 3% sotto forma di gas all'interno della camera di anestesia corrisponde una concentrazione del medesimo in fase liquida nel mezzo di coltura pari a 0.7 mmol/L (Weathersby e al, 1980). Per le considerazioni suddette tale concentrazione è da considerarsi clinicamente rilevante in colture di astrociti. Le colture controllo –sham control- sono state mantenute nella stessa atmosfera controllata per 24 ore, ma in assenza di isofluorano. Tale atmosfera è stata analizzata per tutta la durata degli esperimenti tramite un analizzatore ad infrarossi. Dopo 24 ore le colture sono state rimosse dalla camera di anestesia e riposte nell'incubatore. Alcuni piatti di coltura -true control- sono stati mantenuti nell'incubatore per tutto il tempo e non sono stati sottoposti ad alcun tipo di trattamento.

*Western blot ed immunoprecipitazione.* Le cellule appartenenti al gruppo trattato con isofluorano ed al gruppo controllo (sham control) sono state raccolte dai piatti di coltura tramite l'utilizzo di una apposita spatula, lisate con 100 µl di lysis buffer e 10 µl di inibitori delle proteasi, e poi centrifugate a 14000 giri per minuto per 15 minuti a 4°C. Il

supernatante e' stato quindi raccolto, mescolato con sample buffer e poi fatto bollire per 5 minuti. L'espressione della proteina del citoscheletro vimentina diminuisce progressivamente fino al 21esimo giorno di vita in vivo, mentre in vitro rimane pressoché costante nei primi 15 giorni in coltura (Sancho-Tello e al, 1995; Meyer e al, 1989). In virtù di questo abbiamo utilizzato la vimentina come controllo interno e quantificato i livelli di actina, GFAP, RhoA e paxillina. Abbiamo caricato quantità costanti di proteina (5-10 µg) sul gel per elettroforesi (solfato-poliacrilamide 8% per actina e RhoA, 10% per paxillina, GFAP, vimentina, MLC e MLC-p) e le abbiamo poi trasferite su membrane di nitrocellulosa. I seguenti anticorpi primari monoclonali sono stati utilizzati: anticorpi anti Rho, anti paxillina, anti-vimentina, anti GFAP, anti p-MYL9 (anti myosin light chain 9). Le membrane di nitrocellulosa sono state incubate per 24 ore insieme ai rispettivi anticorpi primari, diluiti in una soluzione salina con buffer e tween 0.1%. I seguenti anticorpi secondari policlonali sono stati utilizzati: anti topo per RhoA, paxillina e vimentina (diluizione 1:5000), anti coniglio per GFAP (diluizione 1:8000), anti capra per MLC-p, diluiti nella stessa soluzione descritta sopra ed incubati per 1 ora. Infine, le membrane di nitrocellulosa con adesi gli anticorpi secondari sono state sviluppate tramite l'utilizzo di un sistema a chemoluminescenza, i gel scannerizzati mediante un densitometro e quantificati tramite il software Image Quant TL 2005.

Per l'immunoprecipitazione (MLC e MLC-p) i lisati cellulari sono stati purificati tramite precipitazione con immunoglobuline G aspecifiche di capra e 20 µl di perle di agarosio, e poi incubati per 1 ora con anticorpi anti p-MYL9. 25 µg di proteine totali sono state immunoprecipitate con 10 µl di anticorpi anti-MYL9. Le proteine concentrate così ricavate sono state utilizzate per i western blot di MLC ed MLC-p secondo la procedura sopra descritta.

*Analisi morfologica.* Per lo studio della morfologia degli astrociti in coltura sono state utilizzate colture cellulari trattate con isofluorano e colture controllo a partire dal DIV 4 fino al DIV 15. Dopo aver rimosso il mezzo di coltura ed essere state risciacquate in phosphate buffered saline, le cellule sono state fissate con paraformaldeide 4% a temperatura ambiente per 20 minuti e permeabilizzate con triton-X 0.1% per altri 15 minuti. Sono poi state incubate con 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) –un colorante che lega gli acidi nucleici del nucleo cellulare ed emana una colorazione blu quando stimolato con fluorescenza ad appropriata lunghezza d’onda- per 25 minuti a temperatura ambiente e colorate con un colorante naturale della actina funzionale F, la falloidina (diluizione 1:400). Mediante l’utilizzo di un microscopio a fluorescenza, sono state scattate ed analizzate 5 foto (non sovrapponibili) per piatto di coltura.

*Curve di crescita cellulare.* Le curve di crescita degli astrociti sono state seguite giornalmente a partire dal DIV 4 e dal DIV 15. Dopo aver colorato i nuclei degli astrociti con DAPI, sono state scattate 5 foto non sovrapponibili per piatto di coltura, per un totale di 15-33 piatti per DIV per animale (numero totale di animali pari a 8). Ogni nucleo colorato con DAPI e’ stato contato come una cellula. Il numero di nuclei per foto e’ stato ottenuto mediante l’utilizzo del software ImageJ. Il numero totale di cellule per piatto di coltura, espresso come numero di cellule per  $\text{mm}^2$ , e’ stato calcolato come media dei nuclei delle 5 foto. Per accertarci che le cellule colorate con DAPI fossero vitali, alcuni piatti di coltura sono stati selezionati a random e colorati- oltre che con DAPI- con un apposito kit (live/dead viability/citotoxicity kit) in grado di distinguere le cellule vitali dalle cellule morte o morenti. Tale kit contrassegna col verde le cellule vitali (producenti esterasi in grado di clivare la proteina calceina, che una volta clivata rilascia colorante verde) e di rosso le cellule morenti (contenenti etidio omodimero, normalmente incapace di penetrare la

membrana cellulare, ma che si lega agli acidi nucleici di cellule la cui membrana è compromessa e rilascia una tipica colorazione rossa).

*Analisi statistica.* Il confronto tra gruppi ha utilizzato una analisi di varianza ad una via o analisi di Kruskal-Wallis, seguite quando necessario dal test di Tukey. La significatività statistica è stata posta per  $p < 0.05$ .

## **Risultati**

### **Produzione di GFAP e vimentina durante la maturazione degli astrociti in vitro**

Molti studi hanno mostrato che la produzione di GFAP aumenta progressivamente a mano a mano che le cellule della glia maturano, sia in vivo che in vitro (Sancho-Tello e al, 1995; Meyer e al, 1989; Lascola e al, 1998). Al contrario, la produzione di vimentina in vivo, dopo un iniziale periodo di mantenimento dei livelli in utero, comincia a ridursi intorno al settimo giorno di vita, mentre in vitro rimane costante o mostra un lieve trend di ascesa durante i primi 15 giorni di coltura (Sancho-Tello e al, 1995; Meyer e al, 1989). Perciò, mentre la vimentina non è considerata un indicatore affidabile della maturazione degli astrociti, i livelli di GFAP vengono comunemente utilizzati per stabilire il grado di maturazione degli astrociti in vitro, con bassi livelli di GFAP che caratterizzano le cellule più giovani e immature e alti livelli che sono tipici degli astrociti maturi. Anche i nostri dati confermano minimi livelli di GFAP al DIV4 ed un continuo aumento di questi fino al DIV15 (figura 1A). Se confrontati coi livelli al DIV4 (valore di riferimento pari ad 1), i livelli di GFAP al DIV 7 e DIV15 aumentano rispettivamente di circa 2.8 e 4 volte (figura 1B). I livelli di vimentina, al contrario, rimangono invariati al DIV 4, 7 e 15 (figura 1A). Sulla base della relazione temporale della produzione di vimentina e GFAP nelle nostre colture cellulari, abbiamo

utilizzato cellule della glia immature al DIV 4 come modello di studio di cellule radiali della glia, e colture cellulari al DIV 15 come paradigma di studio degli astrociti piu' maturi.

### **L'esposizione ad isofluorano altera la trasformazione morfologica degli astrociti in coltura e l'organizzazione dell'actina F**

La morfologia delle cellule della glia e' strettamente dipendente dall'organizzazione del citoscheletro di actina. Le cellule radiali immature al DIV4 mostrano un aspetto fusiforme, con corpi cellulari piccoli, organizzazione bipolare dei processi che si elongano dal corpo, e solo rari filamenti di actina che attraversano il citoplasma (figura 2A). Al DIV7 le cellule controllo si sono trasformate in cellule poligonali, con aspetto simile a fibroblasti, corpi cellulari piu' grandi e pochi processi a partenza da quest'ultimi (figura 2B). L'actina funzionale, evidenziata in verde dopo colorazione con falloidina, risulta adesso organizzata a formare ASF, ossia spessi cavi filamentosi che corrono lungo il citoplasma e che costituiscono l'impalcatura interna della cellula. Al DIV 10 gli astrociti sono ormai confluenti, presentano numerosi lunghi processi che si staccano dal corpo cellulare e corrono indistintamente uno sopra all'altro, creando una architettura complessa (figura 2C). In questa fase l'actina F e' organizzata in spesse ASF che corrono parallele ai lunghi processi cellulari e li sostengono. Quando analizzati al DIV7 gli astrociti esposti ad isofluorano appaiono molto simili alle cellule radiali controllo al DIV4. Infatti, mostrano ancora corpi cellulari piccoli e fusiformi, e nessun filamento di actina. Soltanto in alcune rare cellule l'actina comincia ad organizzarsi in periferia, a formare la cosiddetta "*actina corticale*". La trasformazione delle cellule della glia esposte ad isofluorano in cellule poligonali avviene soltanto al DIV10 (figura 2E), anziche' al DIV7, a testimonianza di un ritardo nella trasformazione da cellule radiali immature ad astrociti maturi dopo trattamento con isofluorano. Nelle cellule esposte ad isofluorano al DIV10 la F actina non e' ancora

finemente organizzata e sono ancora visibili numerosi profili cellulari con actina corticale (frecce, figura 2E).

Sulla scorta delle differenze osservate nella organizzazione dell'actina F abbiamo quantificato la percentuale di cellule che presentano ASF nel gruppo esposto ad isofluorano e nel gruppo controllo ai DIV6 e 7 (1 e 2 giorni dopo l'esposizione all'isofluorano, rispettivamente). In linea con le osservazioni sulla ritardata trasformazione morfologica degli astrociti trattati, abbiamo documentato una riduzione di circa il 50% nel numero di cellule della glia contenenti ASF nelle colture esposte ad isofluorano rispetto a quelle controllo al DIV 6 e DIV7 (figura 2F).

### **L'esposizione ad isofluorano altera la proliferazione degli astrociti immaturi**

Durante l'analisi morfologica degli astrociti esposti ad isofluorano abbiamo notato che le colture trattate si caratterizzano per la presenza di un minor numero di cellule nei primi giorni dopo il trattamento. Per testare l'ipotesi che l'esposizione ad isofluorano sia in grado di causare la morte degli astrociti abbiamo trattato le nostre colture con isofluorano 3% per 24 ore al DIV4 ed al DIV15 e ne abbiamo analizzato le densità cellulari per 11 e 3 giorni dopo il trattamento, rispettivamente (figura 3). Quando trattate al DIV4, le cellule radiali sono risultate estremamente sensibili agli effetti tossici dell'isofluorano, come dimostrato da una riduzione significativa del numero di cellule vitali nelle colture esposte rispetto ai controlli ai DIV6 e DIV7 (figura 3A). Ai DIV 8 e DIV 10 (3 e 5 giorni dopo il trattamento), nonostante una differenza che non ha raggiunto la significatività statistica, il numero degli astrociti trattati è risultato comunque ridotto rispetto ai controlli. Come riassunto in figura 3B, la riduzione della densità cellulare nelle colture trattate rispetto ai controlli è variata dal 40% in meno al DIV6 al 20-30% in meno dei DIV7 e DIV10. E' interessante notare che quando esposti al DIV10, gli astrociti più maturi sono risultati resistenti agli effetti tossici dell'isofluorano (figura 3C). Per capire se la ridotta densità cellulare che abbiamo

osservato sia il risultato della morte di un certo numero di astrociti trattati, o semplicemente sia dovuta ad un momentaneo rallentamento nella loro capacità di proliferazione, abbiamo analizzato le colture esposte ad isofluorano dopo trattamento con un colorante apposito per cellule morte/morenti. Il numero di cellule morte o morenti nelle colture trattate è risultato essere meno del 4% delle cellule totali, una percentuale che è risultata sovrapponibile a quella delle colture controllo.

Sulla base di questi risultati abbiamo scelto il DIV7 per i successivi studi sui meccanismi molecolari della tossicità dell'isofluorano.

### **L'esposizione ad isofluorano non altera i livelli di GFAP, vimentina ed actina totale di astrociti in coltura**

Visti gli effetti dell'esposizione ad isofluorano sulla morfologia e l'organizzazione dell'actina degli astrociti in coltura, abbiamo ipotizzato che l'isofluorano modifichi l'espressione delle proteine che formano il citoscheletro nelle cellule della glia. Tramite l'utilizzo di western blots abbiamo quindi quantificato i livelli di GFAP, vimentina ed actina –ossia delle principali proteine del citoscheletro degli astrociti- al DIV7. Come illustrato in figura 4, non abbiamo trovato alcuna differenza nei livelli di GFAP, vimentina ed actina nelle cellule trattate con isofluorano e nelle cellule controllo.

### **L'esposizione ad isofluorano riduce i livelli della GTPasi RhoA e del suo effettore MLC-P in astrociti in coltura**

L'organizzazione del citoscheletro delle cellule della glia e' di vitale importanza nel determinare la morfologia di queste cellule e, di conseguenza, la loro capacità di stabilire connessioni l'una con l'altra, maturare e riprodursi. Proprio perche' di fondamentale importanza, tale organizzazione e' il risultato della fine modulazione da parte di molte cascate dei segnali e di un gran numero di effettori. Tra questi sistemi di regolazione, uno

dei principali e' quello soprasseduto da RhoA. RhoA e' una GTPasi situata nella parte interna della membrana cellulare degli astrociti che nella forma attiva, legata a GTP, e' in grado di attivare un effettore il quale a sua volta fosforila la catena leggera della miosina (MLC-p) (Hall, 1998; Bishop e al, 2000). Una volta fosforilata e quindi attivata, MLC-p promuove l'assemblamento dei filamenti di actina e miosina a formare le ASF, modula la trasformazione morfologica da cellule radiali ad astrociti e facilita la formazione di complessi focali di adesione tra il citoscheletro e diverse famiglie di proteine di adesione (adesine, caderine,...). Tali punti focali di adesione permettono alla cellula di ancorarsi saldamente al substrato ed agiscono come veri e propri punti di forza per la propulsione della cellula (migrazione) e per l'emanazione di pseudopodi e processi cellulari attraverso cui stabilire connessioni chimico-elettriche con le cellule vicine.

Visti gli effetti sull'organizzazione del citoscheletro e la morfologia delle cellule della glia, abbiamo ipotizzato che l'isofluorano possa esplicare i suoi effetti tossici tramite una alterazione della cascata dei segnali presieduta da RhoA. Mediante l'utilizzo di western blot, abbiamo quindi quantificato i livelli di RhoA al DIV7 nelle cellule esposte ad isofluorano e nelle cellule controllo ed abbiamo trovato che i livelli di RhoA sono ridotti di circa 4 volte negli animali esperimento rispetto agli animali controllo (figura 6). Inoltre, abbiamo trovato che l'esposizione ad isofluorano causa una riduzione significativa di MLC e della sua forma attivata, MLC-p (figura 7 A,B). Poiche' MLC ed MLC-p sono ridotte in maniera simile, la frazione MLC-p/MLC+MLC-p rimane la stessa nelle cellule esposte e nelle cellule controllo (figura 7C).

### **L'esposizione ad isofluorano riduce i livelli di paxillina di astrociti in coltura**

Una volta attivata, MLC-p promuove la formazione di punti focali di adesione attraverso la modulazione di varie proteine di adesione, tra cui la paxillina. Abbiamo quindi ipotizzato che il rallentamento nella curva di crescita degli astrociti ed il minor numero di cellule



aderenti al substrato (vedi figura 3) nelle cellule trattate con isofluorano possa essere attribuito almeno in parte ad una alterata formazione dei punti di adesione, sostenuta da una alterata produzione di proteine di adesione focale. Per testare questa ipotesi abbiamo quantificato i livelli di paxillina al DIV 7 mediante western blot e trovato una riduzione di circa due volte dei livelli di paxillina negli astrociti esposti rispetto a quelli controllo (figura 5).

## Discussione

I risultati illustrati suggeriscono che il gas anestetico isofluorano rallenta la normale maturazione morfologica ed altera la crescita degli astrociti in coltura attraverso la perturbazione di tre fattori principali: la formazione di ASF, l'organizzazione del citoscheletro ed i livelli della proteina di adesione focale paxillina. La perturbazione del citoscheletro causata dall'isofluorano e' sostenuta da una downregolazione dei livelli endogeni di RhoA -una proteina membro della grande famiglia di GTPasi Rho che soprasiede alla formazione di ASF ed alla modulazione della morfologia degli astrociti -e di uno dei suoi principali effettori, MLC-p (figura 8).

I nostri risultati dimostrano che l'esposizione ad isofluorano causa una significativa perturbazione nella trasformazione morfologica da cellule radiali della glia ad astrociti maturi. Altri studi hanno confermato che simili perturbazioni nella organizzazione del citoscheletro ostacolano la formazione di un sincizio organizzato nelle fasi della neuronogenesi e della sinaptogenesi, quando una rapida ed efficace comunicazione all'interno della rete degli astrociti e' di vitale importanza per coordinare la migrazione dei neuroni e la creazione e maturazione delle sinapsi (Lascola e al, 1998; Cotrina e al, 1998; Duan e al, 1999; Sergeeva e al, 2000). Una volta che tale sincizio e' stabilizzato, invece,

gli astrociti diventano meno vulnerabili agli insulti tossici esterni. Anche i nostri dati confermano una perturbazione della struttura del citoscheletro che è età e maturazione dipendente. Infatti, mentre le colture cellulari più giovani ed immature (DIV4) risultano essere squisitamente sensibili agli effetti tossici dell'isofluorano, gli astrociti più maturi (DIV15) risultano meno vulnerabili. Le ragioni di questa diversa sensibilità al variare dell'età e del grado di maturazione -che noi ed altri gruppi abbiamo descritto (Xu e al, 2004)- non sono conosciute. È possibile che tale suscettibilità differenziale sia sostenuta da una diversa espressione e differenti proprietà dei recettori di superficie e dei canali ionici localizzati sulla membrana cellulare degli astrociti in epoche diverse dello sviluppo. Alcuni studi hanno suggerito che il corretto funzionamento dei canali del calcio (Cotrina e al, 1998; Duan e al, 1999) e del cloro (Lascola e al, 1998), e dei recettori di superficie per il glutamato (GLAST, GLT-1) (Duan e al, 1999; Sullivan e al, 2007) dipendono da una meticolosa organizzazione del citoscheletro e dalla formazione di processi intercellulari attraverso cui le cellule possono comunicare l'una con l'altra. È possibile che l'esposizione ad isofluorano, dal momento che perturba la corretta organizzazione del citoscheletro, sia in grado di minare il corretto funzionamento dei trasportatori e dei canali ionici sulla superficie delle cellule della glia.

Il citoscheletro di actina, uno dei principali determinanti della morfologia degli astrociti, è sottoposto ad un continuo rimodellamento in modo da poter soddisfare le numerose necessità delle cellule della glia durante lo sviluppo del cervello (John e al, 2004). L'actina G, la proteina base del citoscheletro, polimerizza a formare filamenti di actina F (actina funzionale), i quali a loro volta si organizzano a formare ASF, lunghi e spessi cavi che corrono paralleli all'interno del citoplasma. Le ASF sono collegate tra di loro e con la matrice extracellulare a livello dei punti focali di adesione. La formazione di ASF e di punti di adesione deve essere modulata in maniera estremamente precisa per poter assicurare il corretto sviluppo, la differenziazione e la crescita degli astrociti (Hall e al, 1998). I nostri

dati suggeriscono che l'isofluorano e' in grado di disturbare questa fine modulazione tramite la riduzione del numero di ASF e dei livelli di paxillina.

Durante il periodo di massimo sviluppo del cervello si assiste ad un progressivo cambiamento nella produzione relativa di GFAP e vimentina da parte degli astrociti, che corrisponde al rapido variare delle necessita' del citoscheletro di queste cellule in rapida crescita. La natura dinamica dei filamenti intermedi che costituiscono il citoscheletro dipende dall'assemblamento e disassemblamento di actina e miosina, sulla base della fosforilazione e defosforilazione dei domini di testa della miosina. Alcuni studi sul citoscheletro condotti in vitro hanno dimostrato la mancata formazione di filamenti intermedi in astrociti knock out per i geni di GFAP e vimentina (Pekny e al, 2007). I nostri risultati in vitro mostrano un aumento nella produzione di GFAP di circa quattro volte dal DIV 4 al DIV 15 ed un livello di vimentina che rimane invece inalterato rispetto ai valori iniziali nello stesso arco di tempo.

Uno e due giorni dopo l'esposizione ad isofluorano, rispettivamente al DIV6 e 7, abbiamo osservato un'alterata morfologia delle cellule della glia ed una riduzione significativa nel numero di cellule contenenti ASF. Nonostante l'isofluorano alteri l'organizzazione dell'actina F del citoscheletro, esso non ha alcun effetto sul contenuto di actina di quest'ultimo. In questo senso, l'isofluorano mima gli effetti dell'etanolo sugli astociti in coltura. Guash e altri (Guasch e al, 2003) hanno dimostrato che astrociti esposti cronicamente a piccole quantita' di etanolo presentano una alterata organizzazione dell'actina, sottoforma di filamenti di actina alla periferia della cellula (*actina corticale*) che progressivamente si trasformano in rigidi anelli. Sebbene anche noi abbiamo osservato la presenza di actina corticale nelle cellule in coltura trattate con isofluorano, la percentuale di cellule caratterizzate da anelli alla periferia e' risultata trascurabile. Rimane da valutare se un'esposizione piu' prolungata all'isofluorano possa risultare nella formazione di tali anelli anche nelle nostre cellule in coltura.

L'attivazione di RhoA è un fenomeno complesso che si caratterizza per l'interazione con altre Rho GTPasi (RhoE, Rac-1, Cdc42) ed una lunga serie di effettori (ROCK 1, PACK-1) (Bishop e al, 2000; Moorman e al, 1999) che controllano a loro volta messaggeri della cascata dei segnali più a valle, tra cui MLC ed MLC-p. È possibile che l'isofluorano interferisca con GTPasi diverse da RhoA, e che all'interno della cascata dei segnali presieduta da RhoA agisca su diversi effettori contemporaneamente. I nostri dati mostrano che il trattamento con isofluorano riduce i livelli endogeni sia di MLC che della sua forma attivata, MLC-p. È probabile che la riduzione dei livelli di MLC-p nelle cellule trattate sia la conseguenza diretta dell'iniziale riduzione dei livelli endogeni di MLC. È interessante notare che alcuni studi hanno suggerito come alcune delle alterazioni del citoscheletro modulate tramite la cascata dei segnali regolata da RhoA, quali la formazione di actina corticale e di anelli di actina F alla periferia della cellula, e la ridotta espressione di alcune proteine di adesione, possano rappresentare i segni iniziali della morte cellulare per apoptosi (Rosenblatt e al, 2001; Mills e al, 1999). I nostri risultati non supportano però questa ipotesi. Le suddette osservazioni ci hanno infatti spinto a studiare più attentamente le cellule esposte ad isofluorano alla ricerca di segni di apoptosi, ed ad utilizzare una speciale colorazione per la quantificazione delle cellule morte/morenti dopo esposizione ad isofluorano (vedi Materiali e Metodi). Meno del 4% del totale delle nostre cellule è risultato positivo alla colorazione per cellule morenti a seguito del trattamento con isofluorano e solo un numero negligibile di cellule ha mostrato frammentazione del nucleo dopo colorazione con DAPI (dati non pubblicati).

Nell'ultimo decennio vari studi hanno dimostrato che gli astrociti controllano molti aspetti cruciali dello sviluppo del cervello, dalla migrazione e maturazione dei neuroni fino alla formazione delle sinapsi (Barrea e al, 2008; Ullian e al, 2004). Durante la sinaptogenesi gli astrociti sono strettamente accoppiati a formare un sincizio che modula la funzione dei circuiti sinaptici mediante il rilascio di neurotrasmettitori e la propagazione di correnti di

calcio, oltre che tramite contatti diretti coi neuroni. Essi quindi modulano in maniera attiva la formazione dei circuiti neuronali, contrariamente alla visione semplicistica di qualche decennio fa secondo cui la formazione delle sinapsi era una prerogativa dei neuroni. Per esempio, alcuni studi in vitro hanno documentato che quando i neuroni sono coltivati in assenza di cellule della glia mostrano soltanto rare sinapsi caratterizzate da una bassa attività sinaptica intrinseca (Ullian e al, 2004; Pfrieger e al, 1997). Quando invece crescono al di sopra di uno strato di astrociti, non solo il numero iniziale di sinapsi è fortemente aumentato, ma anche la loro attività sinaptica, fino a 100 volte (Ullian e al, 2004).

Chiaramente rimane da approfondire come la perturbazione della trasformazione morfologica e della proliferazione degli astrociti in vitro si ripercuota in vivo sulla migrazione dei neuroni, sulla loro maturazione e sulla formazione delle sinapsi. In un nostro recente studio (Lunardi e al) abbiamo dimostrato che un cocktail di anestetici contenente isofluorano, amministrato al picco della sinaptogenesi, causa una riduzione significativa della densità delle sinapsi nonché un aumento del numero di sinapsi ridondanti. Nonostante questo lavoro non fosse disegnato per studiare in vivo gli effetti dell'anestesia sulle cellule della glia, ciò nonostante il fatto che l'esposizione ad isofluorano alteri significativamente lo sviluppo delle cellule della glia in vitro fa sospettare che il danno sugli astrociti possa contribuire anche in vivo agli effetti tossici dell'anestesia sui neuroni del cervello in via di sviluppo.

## Bibliografia

Barres BA. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* 2008;60:430-440.

Bishop AL, Hall A. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 2000;348:241-55.

Cotrina ML, Lin JH, Nedergaard M. Cytoskeletal assembly and ATP release regulate astrocytic calcium signaling. *J Neurosci* 1998;18:8794-804.

Duan S, Anderson CM, Stein BA, et al. Glutamate induces rapid upregulation of astrocyte glutamate transport and cell-surface expression of GLAST. *J Neurosci* 1999;19:10193-200.

Fraser DD, Mudrick-Donnon LA, MacVicar BA. Astrocytic GABA receptors. *Glia* 1994;11:83-93.

Goslin K, Asmussen H, Banker G. Rat hippocampal neurons in low-density culture. In: G.Banker and K.Goslin, eds. *Culturing nerve cells*. 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge, MA:MIT Press, 1998:339-70.

Guasch RM, Tomas M, Minambres R, et al. RhoA and lysophosphatidic acid are involved in the actin cytoskeleton reorganization of astrocytes exposed to ethanol. *J Neurosci Res* 2003;72:487-502.

Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998;279:509-14.

Heffron DS, Mandell JW. Opposing roles of ERK and p38 MAP kinases in FGF2-induced astroglial process extension. *Mol Cell Neurosci* 2005;28:779-90.

John GR, Chen L, Riviello MA, et al. Interleukin-1 $\beta$  induces a reactive astroglial phenotype via deactivation of the RhoA GTPase-Rock axis. *J Neurosci* 2004;24:2837-45.

Lascola CD, Nelson DJ, Kraig RP. Cytoskeletal actin gates a Cl channel in neocortical astrocytes. *J Neurosci* 1998;18:1679-92.

Lunardi N, Ori C, Erisir A, et al. General anesthesia causes long-lasting disturbances in the ultrastructural and functional properties of developing synapses in young rats. *Neurotoxicity Res* 2010;17:179-88.

Meyer SA, Ingraham CA, McCarthy KD. Expression of vimentin by cultured astroglia and oligodendroglia. *J Neurosci Res* 1989;24:251-59.

Mills JC, Stone NL, Pittman RN. Extranuclear apoptosis. The role of the cytoplasm in the execution phase. *J Cell Biol* 1999;146:703-8.

Minambres R, Guasch RM, Perez-Aragò A, et al. The RhoA/ROCK-I/MLC pathway is involved in the ethanol-induced apoptosis by anoikis in astrocytes. *J Cell Sci* 2006;119:271-82.

Moorman JP, Luu D, Wickham J, et al. A balance of signaling by Rho family small GTPases RhoA, Rac1 and Cdc42 coordinates cytoskeletal morphology but not cell survival. *Oncogene* 1999;18:47-57.

Pekny M, Wilhelmsson U, Bogestal YR, e al. The role of trocytes and complement system in neural plasticity. *Int Re Neurobiol* 2007;82:95-111.

Pfriegeer FW, Barres BA. Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro. *Science* 1997;277:1684-87.

Rosenblatt J, Raff MC, Cramer LP. An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin- and myosin-dependent mechanism. *Curr Biol* 2001;11:1847-57.

Runquist M, Alonso G. GABAergic signaling mediates the morphological organization of astrocytes in the adult forebrain. *Glia* 2003;41:137-51.

Sall JW, Stratmann G, Leong J, e al. Isoflurane inhibits growth but does not cause cell death in hippocampal neural precursor cells grown in culture. *Anesthesiology* 2009;110:826-33.

Sancho-Tello M, Valles S, Montoliu C, e al. Developmental pattern of GFAP and vimentin gene expression i rat brain and radial glial cultures. *Glia* 1995;15:157-66.

Sergeeva M, Ubl JJ, Reiser G. Disruption of actin cytoskeleton in cultured rat astrocytes suppresses ATP- and bradykinin-induce Ca<sup>++</sup> oscillations by reducing the coupling efficiency between Ca<sup>++</sup> release, capacitative Ca<sup>++</sup> entry, and store refilling. *Neuroscience* 2000;97:765-69.



Sullivan SM, Lee A, Bjorkman T, et al. Cytoskeletal anchoring of GLAST determines susceptibility to brain damage: an identified role for GFAP. *J Biol Chem* 2007;282:29414-22.

Stratmann G, Sall JW, May LD, et al. Isoflurane differentially affects neurogenesis and long-term neurocognitive function in 60-day-old and 7-day-old rats. *Anesthesiology* 2009;110:834-48.

Ullian EM, Christopherson KS, Barres BA. Role of glia in synaptogenesis. *Glia* 2004;47:209-216.

Weathersby PK, Homer LD. Solubility of inert gases in biological fluids and tissues: a review. *Undersea Biomed Res* 1980;7:277-96.

Xu L, Chock VY, Yang EY, et al. Susceptibility to apoptosis varies with time in culture for murine neurons and astrocytes: changes in gene expression and activity. *Neurol Res* 2004;26:632-643.

## APPENDICE

**FIGURA 1:** I livelli di GFAP aumentano a mano a mano che gli astrociti in coltura maturano, mentre i livelli di vimentina rimangono costanti. **(A)** L'analisi Western Blot mostra che i valori di GFAP negli astrociti controllo (true controls) AL DIV7 e DIV15 sono rispettivamente 2.8 e 4 volte i valori al DIV4. I livelli di vimentina al DIV7 e DIV15 sono immutati rispetto al DIV4. I valori mostrati rappresentano la media  $\pm$  SEM (standard error mean) dell'analisi densitometrica di quattro colture cellulari. **(B)** Rapporto dei valori densitometrici di GFAP e vimentina. Alcuni western blot rappresentativi sono mostrati sotto ai grafici.

**FIGURA 2:** L'isofluorano altera la trasformazione morfologica e l'organizzazione del citoscheletro di actina di astrociti in coltura. **(A)** Le cellule radiali al DIV4, subito prima del trattamento, mostrano lunghi e sottili processi che si staccano dalle due estremità dei piccoli corpi cellulari. **(B,C)** Gli astrociti controllo (sham) al DIV7 **(B)** e DIV10 **(C)** mostrano una progressiva maturazione morfologica. Al DIV7 appaiono come cellule di forma poligonale con pochi e spessi processi a partenza dal corpo cellulare. Le actin stress fibers (vedi testo) cominciano ad organizzarsi all'interno delle cellule. Al DIV10 i processi a partenza dai corpi cellulari sono diventati più lunghi e corrono uno sopra l'altro. Le actin stress fibers diventano più spesse e corrono in modo parallelo all'interno del citoplasma della cellula.

**(D,E)** Gli astrociti trattati al DIV7 **(D)** e DIV10 **(E)** mostrano un ritardo nella maturazione morfologica. Al DIV7 gli astrociti mostrano un aspetto bipolare ed assomigliano alle cellule controllo al DIV4 **(A)**. Si noti la ridotta densità cellulare rispetto a **(B)**. Al DIV10 gli astrociti mostrano caratteristiche morfologiche simili a quelle degli astrociti controllo al DIV7**(B)**. Vi

è solo una iniziale organizzazione dell'actina in actin stress fibers. In alcuni astrociti l'actina comincia ad organizzarsi alla periferia cellulare, formando l'actina corticale (freccie). **(A-E)** Colorazione con falloidina, ingrandimento 10X. **(F)** Percentuale di astrociti contenenti actin stress fibers ai DIV6 e DIV7. Il numero di astrociti trattati contenenti actin stress fibers è ridotto di circa 2 volte rispetto ai controlli ( $p < 0.05$ ;  $n = 511-639$  cellule per DIV; analisi condotta su tre colture cellulari).

**FIGURA 3:** L'esposizione ad isofluorano altera la proliferazione degli astrociti maturi, ma non delle cellule radiali. **(A)** L'esposizione ad isofluorano al DIV4 causa una riduzione significativa del numero di cellule in coltura al DIV6 e 7 (cerchi, cellule trattate) rispetto alle cellule controllo (quadrati, sham controls) ( $* p < 0.05$ ). Al DIV8 e DIV10 la crescita delle cellule trattate risulta ancora ridotta rispetto alle cellule controllo, anche se la differenza non è statisticamente significativa. **(B)** Vi è una riduzione della densità degli astrociti trattati rispetto alla baseline dei controlli dal 40% al DIV6 al 20-30% dal DIV7 al DIV10. **(C)** Gli astrociti trattati al DIV15 sono resistenti all'esposizione all'isofluorano ( $n = 19-33$  piatti di coltura per gli esperimenti al DIV4;  $n = 15$  piatti di coltura per gli esperimenti al DIV15). Le densità cellulari prima dell'esposizione ad isofluorano (DIV4) sono rappresentate da triangoli.

**FIGURA 4:** L'esposizione ad isofluorano non modifica i livelli di GFAP, vimentina e actina delle cellule radiali in coltura. Il trattamento con isofluorano al DIV 4 non ha alcun effetto sulle quantità delle principali proteine del citoscheletro prodotte al DIV7 (2 giorni dopo il trattamento). Gli astrociti trattati sono confrontati con gli astrociti controllo (rappresentati come 100%;  $n = 4$  per DIV). Alcuni western blot rappresentativi sono riportati sotto al grafico.

**FIGURA 5:** L'isofluorano causa una riduzione significativa dei livelli di paxillina negli astrociti più immaturi. L'esposizione ad isofluorano al DIV4 causa una riduzione di circa il 50% del contenuto cellulare di paxillina al DIV7 (2 giorni dopo il trattamento; \*  $p < 0.005$ ;  $n = 4$  per DIV). Gli astrociti trattati sono confrontati con gli astrociti controllo (rappresentati come 100%). Alcuni western blot rappresentativi sono riportati sotto al grafico.

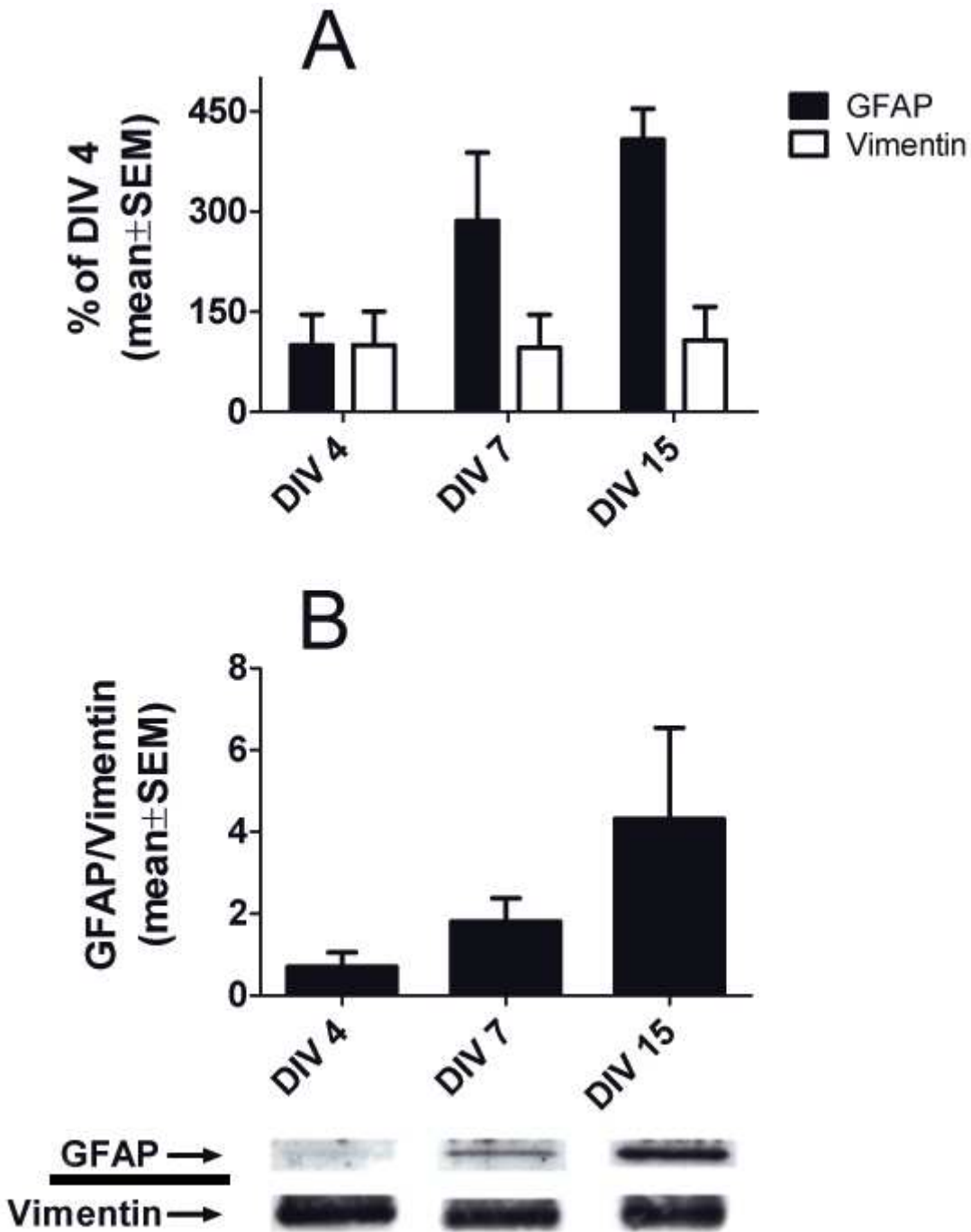
**FIGURA 6:** L'isofluorano causa una riduzione dei livelli endogeni di RhoA negli astrociti più immaturi. L'esposizione ad isofluorano al DIV4 causa una riduzione di circa il 75% del contenuto cellulare di RhoA al DIV7 (2 giorni dopo il trattamento; \*  $p < 0.01$ ;  $n = 4$  per DIV). Gli astrociti trattati sono confrontati con gli astrociti controllo (rappresentati come 100%). Alcuni western blot rappresentativi sono riportati sotto al grafico.

**FIGURA 7:** L'isofluorano riduce i livelli di MLC e della sua forma attivata MLC-p di cellule radiali in coltura. **(A,B)** L'esposizione ad isofluorano al DIV4 causa una riduzione di circa il 50% e 40% del contenuto di MLC **(A)** ed MLC-p **(B)**, rispettivamente, quando analizzato al DIV7 (2 giorni dopo il trattamento; \*  $p < 0.005$ ;  $n = 5$  per DIV). **(C)** Il rapporto MLC/MLC+MLC-p rimane pressoché costante (circa 50%) negli astrociti trattati ed in quelli controllo. Gli astrociti trattati sono confrontati con gli astrociti controllo (rappresentati come 100%). Alcuni western blot rappresentativi sono riportati sotto al grafico.

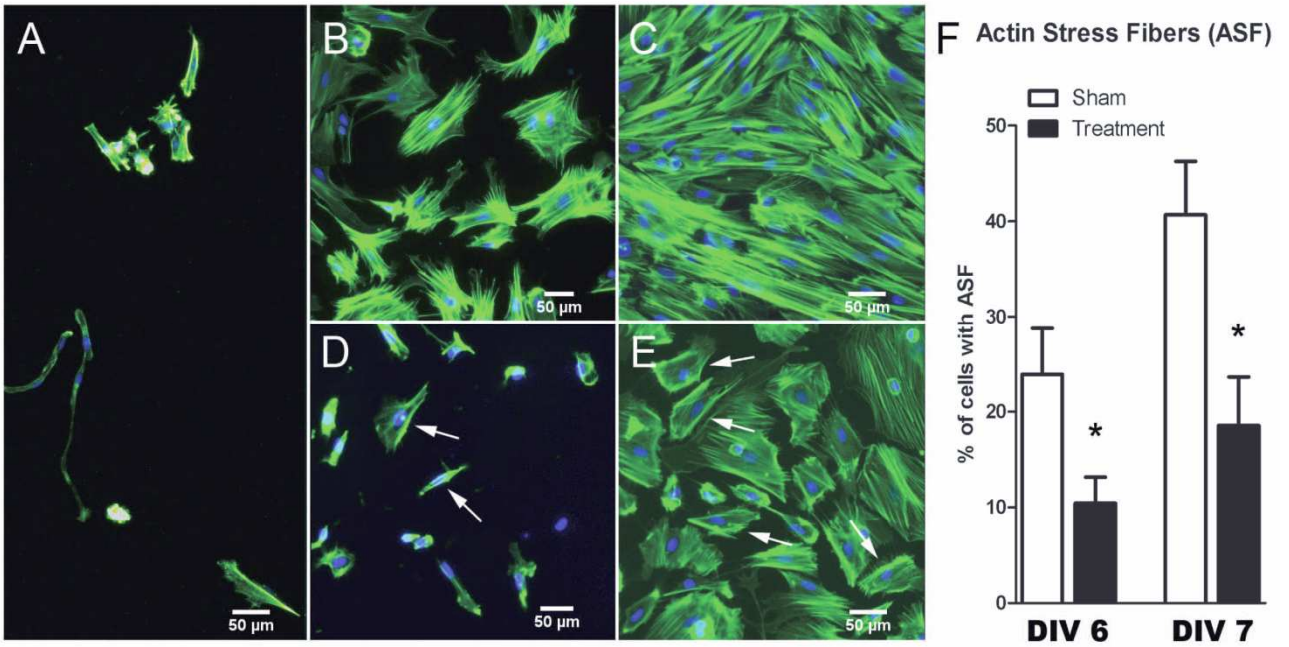
**FIGURA 8:** L'isofluorano modula componenti chiave della cascata dei segnali soprasseduta da RhoA. Gli effetti tossici dell'isofluorano sulla trasformazione morfologica e la proliferazione delle cellule radiali in coltura sono associati alla modulazione della cascata RhoA/MLC. Una significativa riduzione dei livelli endogeni di RhoA, MLC ed MLC-

p coincide con una riduzione dei livelli di paxillina, con alterazioni dell'organizzazione dell'actina nonché della crescita e della trasformazione morfologica degli astrociti trattati.

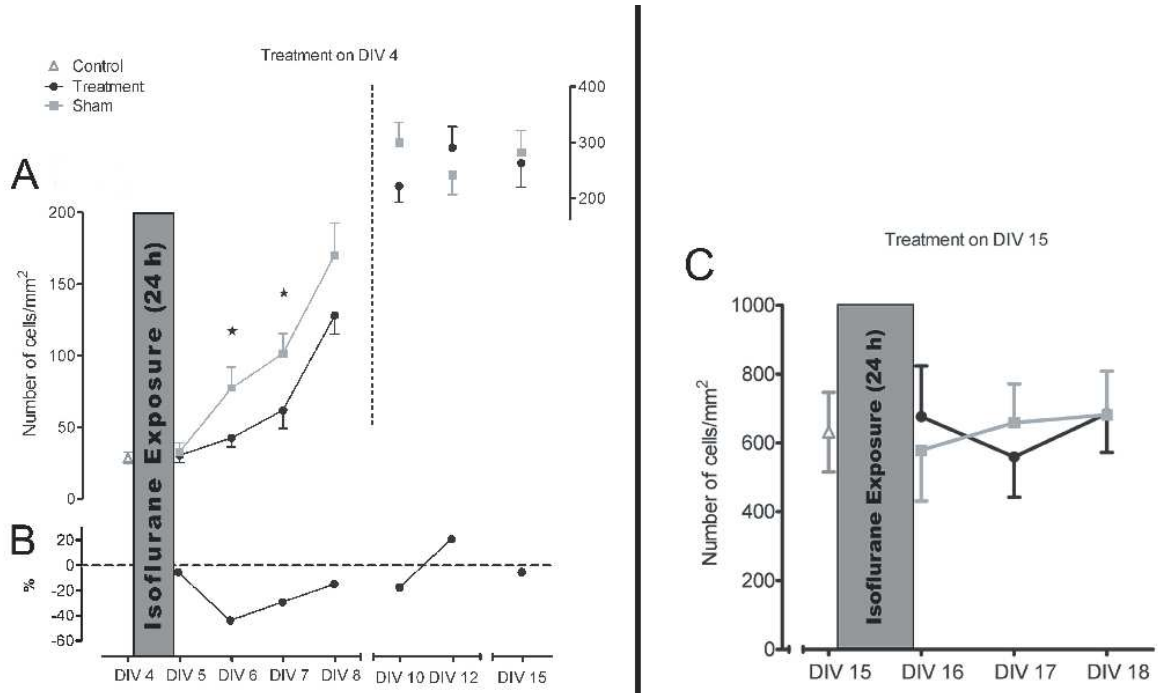
**Figura 1:**



**Figura 2**

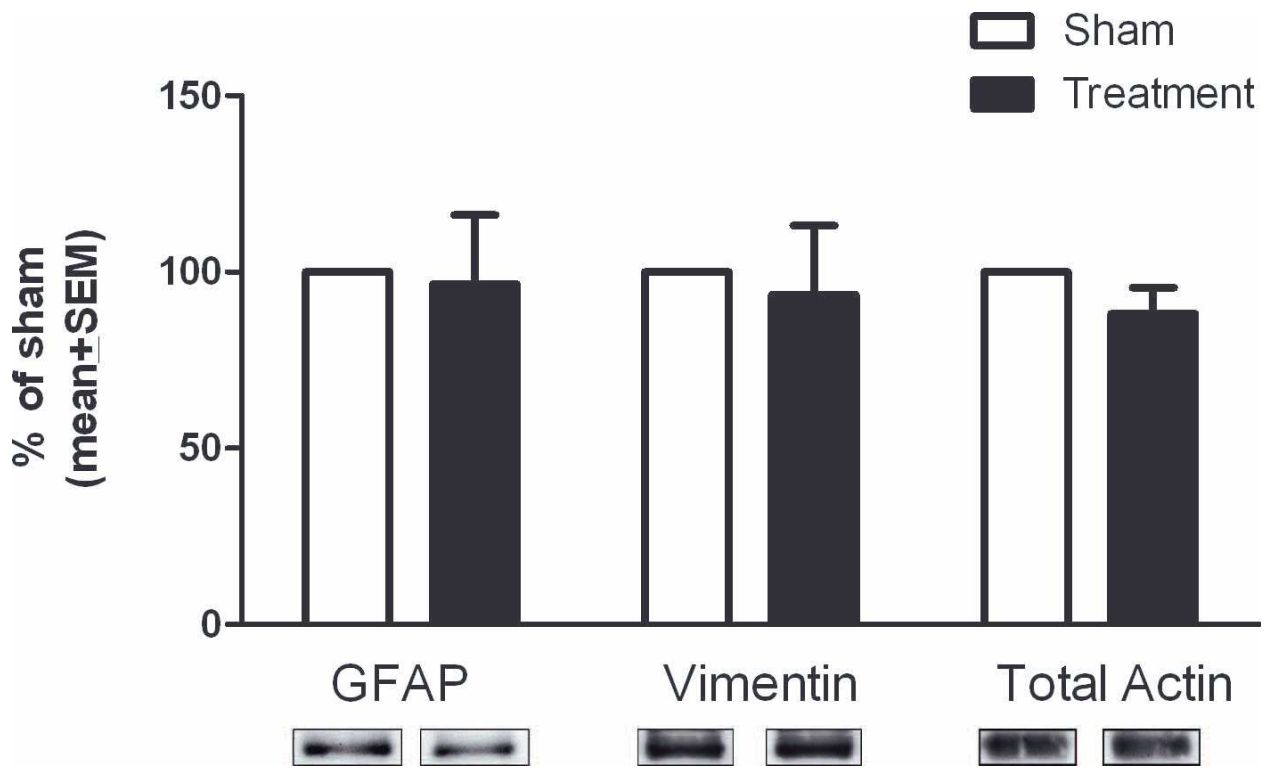


**Figura 3**

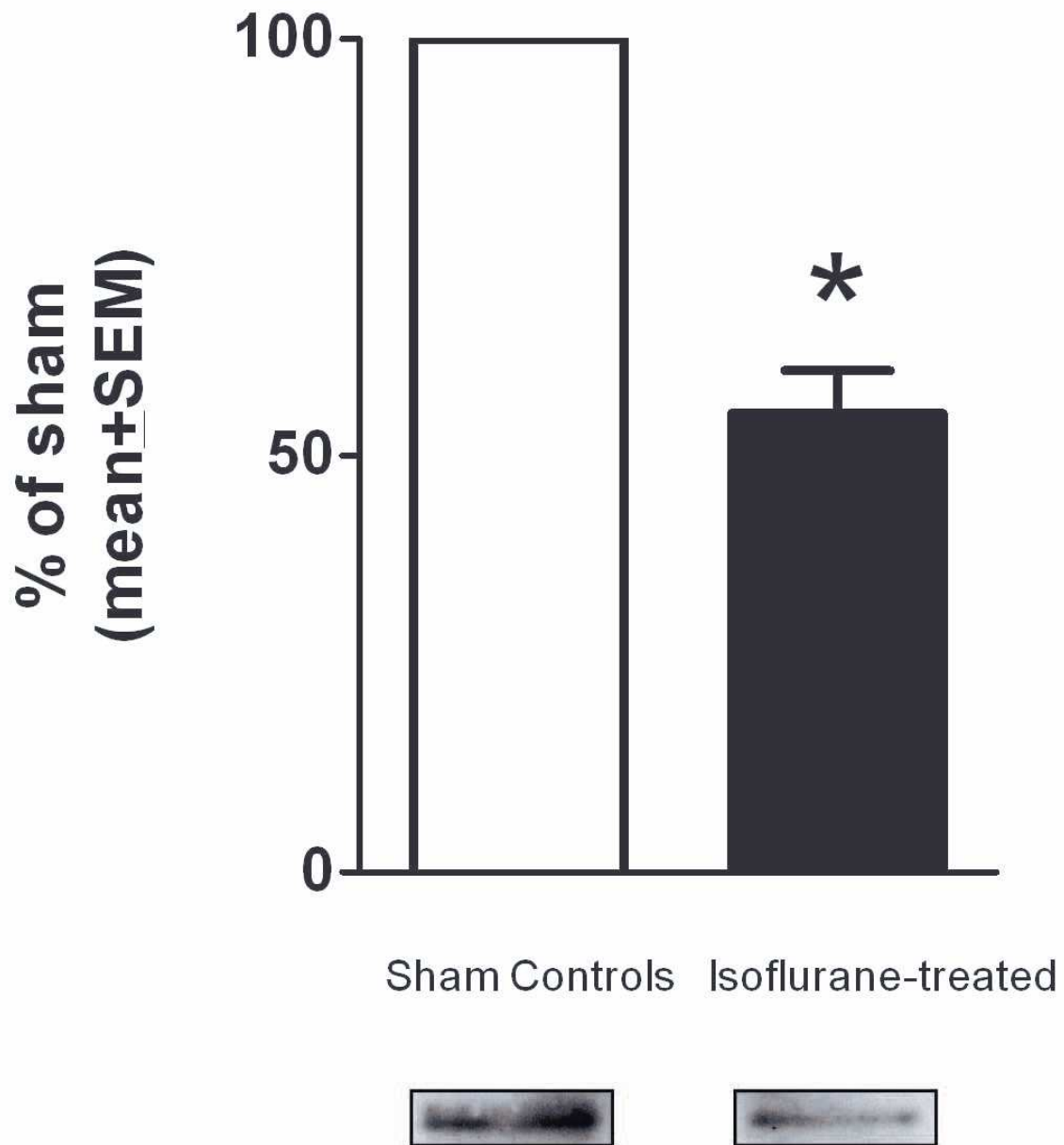




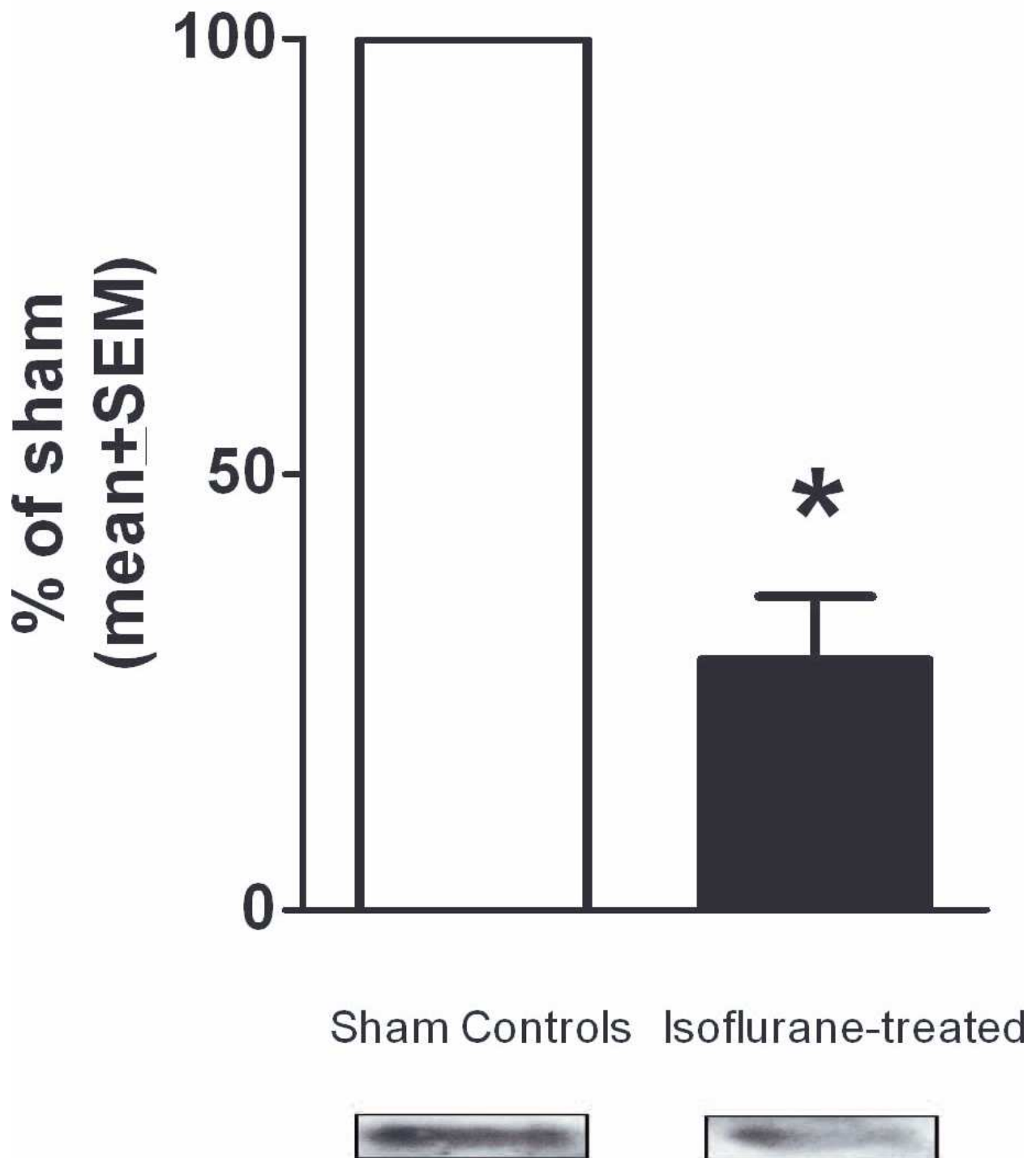
**Figura 4**



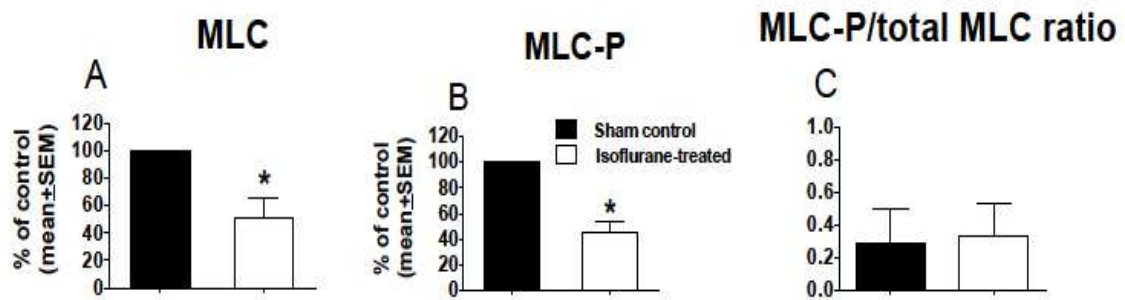
**Figura 5**



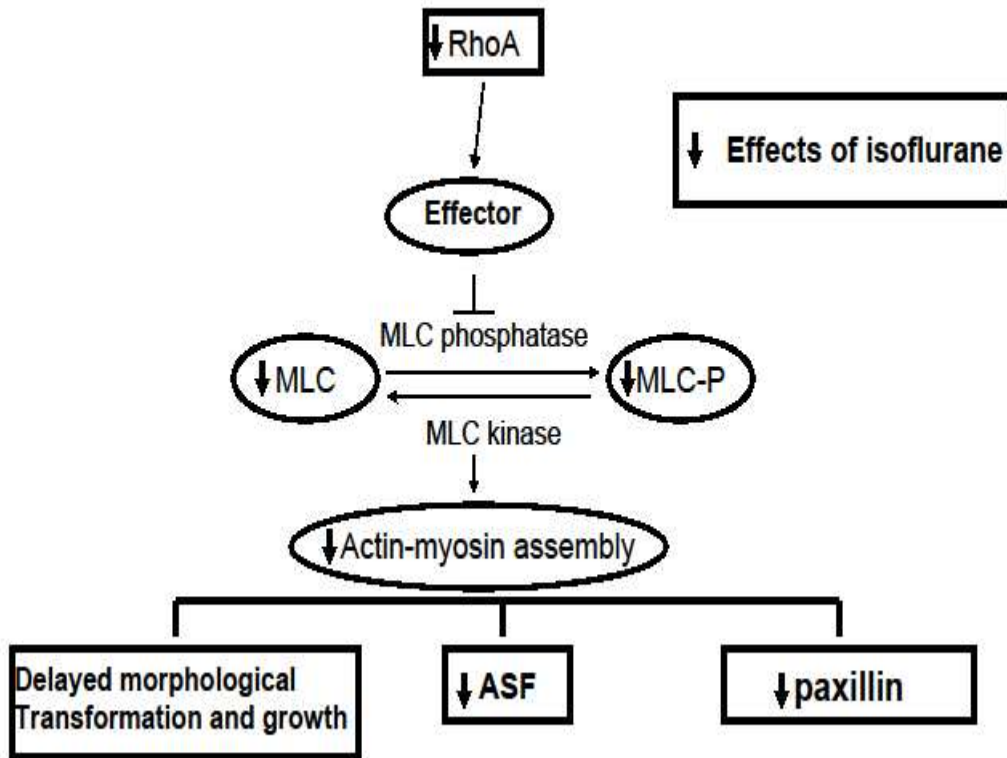
**Figura 6**



**Figura 7**



**Figura 8**



# **General Anesthesia Causes Long-Lasting Disturbances in the Ultrastructural Properties of Developing Synapses in Young Rats**

The exposure of very young children, including premature babies, to general anesthesia is becoming common. The frequency of surgery on these patients has increased, as has the length of their stays in intensive care units. Heroic attempts to save premature and extremely ill infants have resulted in their prolonged deep sedation and repeated anesthesia during an extremely delicate period of human brain development.

In the absence of evidence indicating otherwise, these practices have generally been considered safe. However, our work and that of others has now shown that general anesthetics are damaging to developing mammalian brains. It is becoming widely accepted that common general anesthetics known to potentiate inhibitory transmission through GABAA receptors (e.g., intravenous anesthetics such as benzodiazepines, barbiturates, and propofol, as well as inhalational anesthetics such as isoflurane) (Franks, 2008) and/or to decrease excitatory transmission through N-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate receptors (e.g., nitrous oxide and ketamine) (Jevtovic-Todorovic et al. 1998; Lodge and Anis 1982) cause widespread apoptotic neurodegeneration when used at the peak of brain growth. This has been shown in various mammalian species, including rats, mice, guinea pigs, and nonhuman primates (Jevtovic-Todorovic et al. 2003; Ikonomidou et al. 1999, 2000; Rizzi et al. 2008; Slikker et al. 2007; Young et al. 2005). Based on behavioral studies of rats, it appears that exposure to general anesthesia at the peak of synaptogenesis causes learning and memory deficiencies later in life (Jevtovic-Todorovic et al. 2003).

The subiculum, a part of the hippocampus proper and Papez's circuit, is intertwined with the hippocampal CA1 region, anterior thalamic nuclei, and both entorhinal and cingulate cortices. Accordingly, the involvement of subiculum in cognitive processing has long been recognized based on selective lesioning studies which have shown that rats with damaged subiculum demonstrate significant impairment of spatial learning/memory and the integration of geometric information (Naber et al. 2000; Laxmi et al.1999; Oswald and Good 2000; Devi et al. 2003). The conclusion that the subiculum is vulnerable to anesthesia induced developmental neuroapoptosis is based not only on substantial acute neuroapoptotic damage after the administration of anesthesia (Jevtovic-Todorovic et al. 2003; Rizzi et al. 2008), but also on permanent neuronal loss in later stages of synaptogenesis (Rizzi et al. 2008; Nikizad et al. 2007). Since anesthesia-induced neurotoxicity in the developing brain results in long-term cognitive impairment and the subiculum appears to be one of the vulnerable brain regions, we examined whether exposure to highly neurotoxic anesthesia combination containing isoflurane, nitrous oxide, and midazolam, at the peak of brain development, can cause long-lasting ultrastructural changes in the developing synapses of the rat subiculum. Synapse formation is the hallmark of synaptogenesis, a complex phenomenon that encompasses several other important elements (e.g., neuronal migration, differentiation, and maturation, as well as glial proliferation, establishment of neuronal-glia interactions, maturation/stabilization of synapses and activity dependent pruning of inappropriate synaptic contacts), which are intertwined and precisely timed (Waites et al. 2005; Munno and Syed 2003).

## **Materials and Methods**

### *Animals*

We used Sprague-Dawley rat pups at the postnatal day (PND) 7 for all experiments, since this is when they are most vulnerable to anesthesia-induced neuronal damage (Yon et al. 2005). Experimental rats were exposed to 6 h of anesthesia; controls were exposed to 6 h of mock anesthesia (vehicle). After the administration of anesthesia, rat pups were allowed to recover and were reunited with their mothers. To assess their general appearance and body weight gain a large population study was first conducted (n = 36 controls, n = 36 experimentals, total of 13 litters). On PND 21, n = 4 control and 4 experimental pups from two litters were randomly selected for ultrastructural analysis of the subiculum. While the body weight analysis required higher number of animals to address the innate individual variability of daily weight gain, the number of animals used for complex and time-consuming ultrastructural histological studies was sufficiently powered to make proper conclusions (Dudanova et al. 2007; Kovalenko et al. 2006; Kurt et al. 2004; Uranova et al. 1991). All experiments were approved by the Animal Use and Care Committee of the University of Virginia Health System and were done in accordance with the Public Health Service's Policy on Human Care and Use of Laboratory Animals. Efforts were made to minimize the number of animals used.

### Anesthesia

N<sub>2</sub>O and oxygen were delivered using a calibrated flowmeter. Isoflurane was administered using an agent-specific vaporizer that delivers a set percentage of anesthetic into the anesthesia chamber in which rat pups were placed. Midazolam (Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, MO) was dissolved in 0.1% dimethyl sulfoxide (DMSO) just before administration. For control animals, 0.1% DMSO was used alone. To administer a specific concentration of N<sub>2</sub>O/oxygen and isoflurane in a highly controlled environment, an anesthesia chamber was used (Yon et al. 2005, 2006; Lu et al. 2006). Rats were kept normothermic throughout the experiment, as previously described (Jevtovic-Todorovic et



al. 2000). For control experiments, air was substituted for the gas mixture. After initial equilibration of the N<sub>2</sub>O/ oxygen/isoflurane or air atmosphere inside the chamber, the composition of the chamber gas was analyzed by mass spectrometry to establish the concentrations of N<sub>2</sub>O or nitrogen, isoflurane, carbon dioxide, and oxygen. Our standard general anesthesia protocol consisting of a single injection of midazolam (9 mg/kg, i.p.) followed by 6 h of nitrous oxide (75%) and isoflurane (0.75%) administered to PND 7 rat pups was chosen since this protocol has been shown in several studies to cause severe apoptotic damage to the developing neurons (Jevtovic-Todorovic et al. 2003; Yon et al. 2005, 2006; Nikizad et al. 2007; Lu et al. 2006).

### Histopathological Studies

On PND 21, each pup was deeply anesthetized with Nembutal (65 mg/kg, i.p.). After cannulating the left ventricle, we clamped the descending aorta and did an initial flush with Tyrodes solution (30–40 ml). This was followed by 10 min of continuous perfusion with freshly prepared paraformaldehyde (4%) and glutaraldehyde (0.5%) (Jevtovic-Todorovic et al. 2003; Yon et al. 2005, 2006; Lu et al. 2006). We removed the brains and stored them in the same fixative overnight. Both control and experimental pups were perfused by an experienced experimenter on the same day, using the same solution to assure uniform tissue fixation. Any brains considered to have been inadequately perfused were not processed for EM analysis. Fixed brains were coronally sectioned (50–75  $\mu$ m thick) with a DTK-1000 microslicer (Ted Pella, Tools for Science and Industry, Redding CA). The subiculum was localized as described in anatomical maps (Paxinos and Watson 1944), fixed in 1% osmium tetroxide (EM Sciences, Hatfield, PA), stained with 4% uranyl acetate (EM Sciences, Hatfield, PA) and embedded in aclar sheets using epon-araldite resins. The subiculum was then dissected from the aclar sheets and re-embedded in beam capsules. To prepare capsules for microtome cutting (Sorvall MT-2 microtome, Ivan Sorvall,

Norwalk, CT) the tips were manually trimmed so that ultrathin slices (silver interference color, 600–900 Å) could be cut using a diamond knife (Diatome, Hatfield, PA). Ultrathin sections were placed on grids and examined using a 1230 JEOL TEM electron microscope, with a 16 M-pixel digital camera (SIA-12C digital cameras, Scientific Instruments and Applications, Duluth, GA). We took 12 random, nonoverlapping electron micrographs (12,000 magnification) of each subicular layer (pyramidal, polymorphic, and molecular) for each animal and derived the average number of synapses/layer for each individual. The means for each animal were then compiled (n = 4 control and n = 4 experimental pups) to calculate the mean and standard error for each subicular layer in each group (control and experimental). Since our focus was on synapses, our electron micrographs mainly depicted neuropil; large pyramidal neurons, phagocytes, and blood vessels were avoided. The investigator taking electron micrographs was blinded to the experimental conditions.

### Quantitative Histology

To examine morphological properties and calculate synaptic densities, synapses were identified and counted when all of the following criteria were met: the presence of a postsynaptic density; the presence of more than one synaptic vesicle closely apposed to the presynaptic membrane; and the presence of a synaptic cleft delineated by parallel pre- and postsynaptic membranes. The number of synapses per unit volume was expressed as volumetric density (# of synapses/lm<sup>3</sup>), using the following ratios (Erisir and Harris 2003): (1) Volumetric density = Raw density/mean length of synapses (2) Raw density = Crude number of synapses/sum of areas examined. Further classification of synapses involved identification of the asymmetric synapses, generally considered to be excitatory, and symmetric synapses, generally considered to be inhibitory. Asymmetric and symmetric synapses were defined as specified by Crain et al. (1973). Namely, symmetric synapses

were identified as having pre- and postsynaptic densities of equal width, whereas asymmetric synapses were identified as having a postsynaptic density 2–3 times as thick as the presynaptic density. When the criteria were not clearly met, the synapse was assigned to the “undetermined” category. To study different types of synaptic connections, we classified synapses into three categories: (1) Axo-spinous synapses, or synapses on the dendritic spine, were identified as those on profiles that do not contain mitochondria or microtubules, although a spine apparatus occasionally is present; (2) Axo-dendritic synapses, or synapses on dendritic shafts, were identified by the presence of microtubules or mitochondria; (3) Others, or ones that did not conform to the preceding criteria (about 3% of all synapses).

#### *Morphometric Analyses of Synapses*

All measurements were done using Image-Pro.Plus 6.1 computer software (MediaCybernetics, Bethesda, MD). The length of synapses was measured along parallelaligned plasma membranes. If a synapse was perforated, its synaptic length included the length of the perforation. A terminal bouton in contact with two postsynaptic profiles was treated as two different synapses. The thickness of postsynaptic densities (PSDs) was calculated as the mean of two to three (depending on the length of the synapse) measurements perpendicular to the postsynaptic membrane.

The number of presynaptic vesicles was the number of all vesicles that could be counted in the presynaptic terminal area (Erisir and Harris 2003). Counting was done by an experienced histopathologist who was unaware of the treatment condition.

#### *Statistical Analysis*

Comparisons among the groups in histological studies were made using Student’s t-tests. To conduct the analysis of daily weight gain we used two-way ANOVA (PND and

experimental condition) followed by Bonferroni test. Significance was set at  $P < 0.05$  (Graph Pad Prism 5, Graph Pad Software Inc, La Jolla, CA).

## Results

Since proper nutritional status is critically important during the development of synapses, we closely followed rat pups' general appearance and daily weight by conducting a large population study. There was no significant difference in weight gain between control and experimental animals during the first 21 days of their postnatal life (Fig. 1). In fact, based on their general appearance, the 36 control and 36 experimental animals (from 13 litters) could not be distinguished. The time points when the animals were treated (PND 7) and euthanized (PND 21) are indicated in Fig. 1.

On ultrastructural examination of the three layers of the subiculum, we found striking differences in the overall appearance of the neuropil in control and anesthesia-treated animals at PND 21 (14 days after treatment). In control rats, the neuropil was a continuum with abundant, tightly packed neuro-glial profiles. The neuropil was also rich in synaptic contacts (Fig. 2A, a, black arrows). In the experimental neuropil, we found numerous scant and empty looking areas with multiple "blank" spaces containing only cellular debris, broken-looking profiles, and scarce synapses (Fig. 2A, b, c).

In addition to the changes in the appearance of the neuropil, we observed ultrastructural changes indicative of degeneration in mitochondria in the experimental subiculum (Fig. 2B). Some appeared swollen, with balloon-like cristae, but had normal-looking inner and outer membranes (early stage, Fig. 2B, e). There was also an abundance of dark, condensed, and shrunken mitochondrial profiles having no clear outline between the inner and the outer membrane (late stage, Fig. 2B, f).

To assess whether scarcity of neuropil resulted in a decrease in synapse density in anesthesia-treated rat pups, we quantified the overall number of synapses per  $\text{mm}^3$  in each subicular layer and expressed this number as volumetric density (see “Materials and Methods”) (Erisir and Harris 2003). We found an average of 30–40% lower synapse volumetric density in each subicular layer of anesthesia-treated rats than in control rats ( $n = 4$  control and 4 experimental pups from two different litters) (Fig. 3). This lowered synapse density attained statistical significance.

An interesting feature of the experimental neuropil in PND 21 animals was the scarcity of multiple synaptic boutons, defined as synapses formed between an individual axon and more than one neuronal profile (Sorensen et al. 2003; Yankova et al. 2001; Briones et al. 2004; Wooley et al. 1996). It was more common to encounter multiple synaptic boutons (showing 2–3 synapses in average) in control animals (Fig. 4A), whereas even normal-looking presynaptic terminals in experimental rats made only one or no synaptic contacts (Fig. 4B).

In addition, our ultrastructural analysis of the experimental subiculum showed that some synapses that appeared morphologically intact were found in degenerating neuronal profiles (Fig. 5). To examine whether the observed difference in volumetric densities is due to preferential loss of excitatory or inhibitory synapses, we quantified the overall number of inhibitory and excitatory synapses based on the established morphological criteria (see “Materials and Methods”) and compared relative changes between control and experimental animals. When a clear distinction could not be made, the synapses were defined as “undetermined.” As shown in Fig. 6, we found no differences in relative ratios among the excitatory, inhibitory, and undetermined synapses in the subicular layers. Thus, although the overall synapse density was significantly decreased in experimental animals, the ratios among the excitatory, inhibitory, and undetermined synapses spared by anesthesia remained the same as the ratios in controls (approximately 75, 5, and 20%,

respectively). To investigate the possibility that anesthesia could be preferentially more damaging to certain types of synaptic contacts, we examined the relative ratios among axo-spinous, axo-dendritic, and other types of synapses in experimental animals, but found no difference compared to the ratios in controls. On average 70–80%, 15–20%, and 5–10% of synapses were axo-spinous, axodendritic, and others, respectively, in both control and experimental rats.

To determine whether anesthesia causes morphological changes in subicular synapses, we measured synaptic lengths, the thickness of postsynaptic densities, the number of presynaptic vesicles and the areas of presynaptic terminals in pyramidal, molecular, and polymorphic layers. We found no significant differences in these characteristics of synapses in experimental and control rats (data not shown).

## **Discussion**

Our results demonstrate that exposure of immature rats to general anesthesia at the peak of synaptogenesis causes severe and long-lasting ultrastructural abnormalities of young neurons in the developing subiculum. In addition to the scarcity of neuropil and degeneration of mitochondria, we observed significant decreases in synapse volumetric densities and the paucity of multiple synaptic boutons in subicular neurons in the pyramidal, polymorphic, and molecular layers 2 weeks after the administration of anesthesia. The subiculum, strategically positioned between the hippocampus and the entorhinal cortex, is considered a part of the hippocampal formation (O'Mara et al. 2001). It is functionally and anatomically intertwined with the CA1 region of the hippocampus. As such, it mediates a myriad of hippocampal-cortical and hippocampal- subcortical interactions, especially with anterior thalamic nuclei (McNaughton 2006). Previously, we have shown that the immature subiculum in rats and guinea pigs is vulnerable to

anesthesia-induced apoptotic acute neurodegeneration (Jevtovic-Todorovic et al. 2003; Rizzi et al. 2008) and that this neuronal damage results in permanent neuronal deletion in the final stages of synaptogenesis (Rizzi et al. 2008; Nikizad et al. 2007). Here we show that anesthesia-induced neuronal damage goes beyond acute neuronal destruction, leaving many neurons dysfunctional and with ultrastructural abnormalities that persist many days after anesthesia exposure, suggesting that a single exposure to anesthesia has far-reaching effects on synaptic organization in the subiculum. Specific lesions of the subicular complex impair cognitive function in rodents, having particularly devastating effects on long-term spatial learning and memory (Morris et al. 1990; Galani et al. 1998). Earlier, we found that the subiculum is sensitive to anesthesia-induced neurodegeneration, not only soon after its administration, but also later in adult life, as demonstrated by significant spatial learning and memory deficits (Jevtovic-Todorovic et al. 2003). Here we have shown that the same anesthesia combination causes protracted neuronal degeneration in the subiculum, leading to significant synapse scarcity. Since synaptic connections between the subiculum and components of Papez's circuit are considered to be important for proper cognitive development (McNaughton 2006; Chua et al. 2006), it is possible that the anesthesia-induced synaptic disturbances we have demonstrated may, at least in part, explain previously reported cognitive impairments in rodents exposed to general anesthesia early in life (Jevtovic-Todorovic et al. 2003).

It is of interest that those cognitive impairments appear to be positively correlated with the histo-pathological finding in the cases when the damage is protracted, leading to permanent synaptic disturbances and neuronal loss, and not when anesthesia-induced neuronal damage is transient. For example, a recent study by Loepke et al. (2009) has shown that despite the fact that isoflurane anesthesia causes significant short-term apoptotic neurodegeneration in the immature mouse brain, it does not lead to neuronal loss and/or neurocognitive impairments later in life. The most striking ultrastructural

features of anesthetiatreated subicular tissue were the scarcity of neuro-glial profiles and the empty-looking neuropil, even 14 days after exposure to anesthesia. It would be reasonable to expect that in active young brains quick pruning and removal of cellular debris would occur soon after an insult, with reconstruction giving rise to a normal-looking neuropil. Indeed, Oo et al. (1995) have shown that in PND 7 rat pups, hypoxic-ischemic insult, which causes massive neuronal death, is followed by rapid removal of dead cells, resulting in a normal-looking neuropil within about 4 days. Similarly, localized brain lesions caused by head trauma in PND 7 rats result in removal of dead cells and normal-looking tissue at 5 days after trauma (Bittigau et al. 1999). In contrast, we found ill-looking neuropil with many neuro-glial profiles undergoing degeneration 14 days after insult. Although anesthesia-induced neuronal death has been reported to be apoptotic and, accordingly, may take time to evolve (Yon et al. 2005, 2006), it appears that there must be some additional explanation for what appears to be ongoing neuropil demise. We hypothesize that the significant decrease in synapse densities could affect the ability of the neurons to interconnect and form meaningful and functional circuitries. This could cause a cycle of ongoing recruitment of redundant neurons that are unable to function properly and therefore are destined to die. Further studies of anesthesia-induced effects on other aspects of synaptogenesis, including neuronal migration, differentiation, and maturation, are needed to address other possible explanations for protracted neuropil demise after a single anesthesia exposure.

An interesting feature of the experimental neuropil was the paucity of multiple synaptic boutons (MSBs) in all layers of the experimental subiculum when compared to controls.

MSBs are defined as synapses formed between an individual axon and more than one neuronal profile, as opposed to single synapse boutons (SSBs), which are synaptically connected to only one postsynaptic neuronal profile (Briones et al. 2004; Sorensen et al. 2003; Yankova et al. 2001; Wooley et al. 1996). The abundance of MSBs either from the



“same cell” or “different cell” contacts is believed to predict increased efficiency of synaptic transmission and/or improved synchronization of synaptically driven activity (Toni et al. 2007; Yankova et al. 2001; Briones et al. 2004), with an overall increase in structural stability and synaptic efficacy when compared to single synaptic connections. Although our study was not designed to trace multiple synapses to their neuronal profiles of origin it is reasonable to propose that anesthesia-induced scarcity of MSBs, whether of the “same” or “different” cell contacts, could potentially contribute to previously reported neurocognitive impairment (Jevtovic-Todorovic et al. 2003).

The importance of proper nutrition during synaptogenesis has been well-established. It was suggested, more than 20 years ago, that there is an association between poor nutrition during early life, alteration in cognitive development and decreased synapse densities in hippocampal formation (Ahmed et al. 1987). That suggestion has since been confirmed (Granados-Rojas et al. 2004; Lister et al. 2005). Of special interest to our study are the findings regarding the effects of prolonged (30-day) undernutrition on the developmental growth curve for ratios of synapses to neurons, which suggest a decline in Smart 1994). To assure that short nutritional deprivation during and immediately after anesthesia (between 6 and 7 h) had no effect on the growth curve, we made sure that control animals were exposed to the same short-term undernutrition as were experimental animals. Daily weight gain, closely followed until the time of sacrifice, confirmed that rats’ nutritional development was unaffected. Thus, we conclude that the observed synaptic abnormalities are unlikely to have been caused by the short period of undernutrition but, instead, most likely are caused by longlasting anesthesia-induced impairment of synaptogenesis.

Selective synapse loss and neuronal loss have been reported in pathological conditions such as chronic degenerative diseases (Day et al. 2006; Lacor et al. 2004) and ischemic and reperfusion injuries (Garcia et al. 1996). For example, in primates with ischemia-

reperfusion injury a selective loss of inhibitory synapses has been reported to occur in cortical brain regions that were not infarcted, suggesting that certain brain injury paradigms can target a selective group of synapses and/or neurons (Giffard et al. 2008). Based on our observations, anesthesia-induced depletion of synapses does not appear to be selective for any layer of subicular neurons. Also, although the synapse loss is significant, it equally targets different types of synaptic contacts (axo-spinous, axo-dendritic, and others). We have previously reported that general anesthesia causes neuronal deletion in the subiculum of both rats and guinea pigs (Rizzi et al. 2008; Nikizad et al. 2007), causing approximately 30–40% neuronal loss as compared to age-matched controls (Nikizad et al. 2007). This suggests that nonselective synaptic loss after anesthesia exposure is likely due to an overall neuronal loss.

The effect of volatile inhalational anesthetics on synaptic development was studied many years ago (Quimby et al. 1974; Crain et al. 1973; Chang et al. 1974, 1976; Uemura et al. 1985). The focus then was on halothane, a volatile anesthetic similar to isoflurane. Also, the experimental exposure was low-level but chronic, in an attempt to simulate the exposure to low atmospheric concentrations of volatile anesthetics experienced in utero by the offspring of pregnant operating room personnel. Despite the obvious difference in the length of exposure (6 h in our study versus all of in utero life and 28 days postnatally for 8 h/day 5 days a week), the similarities in the ultrastructural neuronal damage are striking. Various authors have reported significant reductions in cortical and subicular volumetric synaptic densities, with lags in synaptic development and maturation, as well as sparse-looking neuropil (Quimby et al. 1974; Chang et al. 1976; Crain et al. 1973; Uemura et al. 1985). Although our study did not follow the ultrastructural changes beyond the main synaptogenesis period (the first 3 weeks of postnatal life), other authors have reported halothane-induced neuronal degeneration and organelle abnormalities in the cerebral cortex more than 3 months after chronic exposure (Chang et al. 1976). Interestingly,

chronic exposure to halothane resulted in a significant impairment of the development of postsynaptic membrane densities (Quimby et al. 1974). We did not find that similar changes were induced by short exposure to isoflurane in combination with midazolam and nitrous oxide. Despite the apparently normal appearance of subicular tissue at the light microscopic level (Nikizad et al. 2007), long-term impairment of normal neuronal development becomes obvious when studied at the ultrastructural level, suggesting that subtle, insidious, and ongoing neuropil demise occurs many days after anesthesia exposure. To our knowledge, this is the first report of lasting synaptic plasticity in the young rodent brain after single exposure to anesthesia early in life. Using extracellular recordings from CA1 hippocampal neurons in slices, we have previously demonstrated that the same anesthetic combination as that used in the present study (isoflurane, midazolam, and nitrous oxide) caused lasting depression of long-term potentiation (LTP), but not depression of excitatory synaptic strength (Jevtovic-Todorovic et al. 2003). This is interesting, considering that our morphometric studies of the subiculum show nonselective synapse loss. The obvious reason for potentially selective functional synaptic plasticity is not known. However, it is of interest that functioning mitochondria and their ATP production are essential for maintaining normal synaptic physiology (Li et al. 2004; Inquimbert et al. 2008; Jonas 2004). Acute application of isoflurane or midazolam potentiates the inhibitory drive by heightening inhibitory synaptic activity mediated by GABAA receptors (Franks 2008). In contrast, nitrous oxide silences excitatory (NMDA-mediated) synaptic transmission (Mennerick et al. 1998). Thus, it is possible that anesthesia-induced degenerative changes in mitochondria and a consequent decrease in ATP production preferentially impairs highly activated inhibitory synaptic function due to an inadequate metabolic ratio of supply to demand. However, the precise mechanism for the selective homeostatic changes of neuronal function under extensive GABAergic stimulation associated with various physiological and pathological conditions remains to be

examined (Mody 2005).

We conclude that anesthesia-induced impairment of synaptogenesis in the rat subiculum is marked by morphological disturbances of developing synapses. This may, at least in part, contribute to the learning and memory deficits that occur later in life after exposure of the immature brain to general anesthesia.

# Isoflurane Impairs Immature Astroglia Development In Vitro: The Role of Actin Cytoskeleton

## INTRODUCTION

During the last several years, we and others have demonstrated that widely used general anesthetics can damage the developing mammalian brain. A variety of such anesthetics, including benzodiazepines, barbiturates, propofol, ketamine, and volatile anesthetics, used alone or in combination at the peak of synaptogenesis, cause widespread apoptotic neurodegeneration in vulnerable brain regions in rats, mice, guinea pigs, and nonhuman primates (1Y7). Moreover, examination of the ultrastructural properties of newly formed synapses has demonstrated that anesthesia causes long-term impairment of synapse formation, manifested as significant decreases in both synapse volumetric densities and complexity. These changes are accompanied by scarcity and disarray of the neuropil (8).

Astroglia, the most abundant glial cells, control every aspect of brain development by regulating neuronal migration, maturation, and synapse sculpting (e.g. synapse number, function, and stability) (9, 10). Neurons cultured in the absence of the astrocytic feeding layer have decreased synaptic density; there is also little spontaneous synaptic activity of the existing synapses (10, 11). Normally, astrocytes not only promote de novo formation of synapses, but also stabilize existing synapses. It seems that F-amino butyric acid A (GABAA) receptors are expressed in astrocytes in vitro and in vivo and that GABA signaling is, at least in part, responsible for morphological changes in immature and

mature astrocytes (12, 13), suggesting that modulation of GABA could influence astrocyte development and function. Because research to date on anesthesia-induced neurotoxicity has mainly focused on examining the cellular mechanisms of neuron degeneration, we postulated that the anesthesia-induced death of neurons could be associated with anesthesia-induced disturbances in astroglia development. In particular, it is important to examine whether and how general anesthetics, potent modulators of GABAA receptors (14), disturb astroglia development. The actin cytoskeleton is the major determinant of astroglia morphology and function. Hence, understanding of glial development rests on an appreciation of the signaling pathways controlling the organization and dynamics of the actin cytoskeleton (15). Such signaling pathways are regulated by a family of small GTPases, one of the most influential of which is RhoA (16). Like other GTPases, RhoA functions as a molecular switch, cycling between an inactive GDP-bound state and an active GTP-bound state. It regulates the phosphorylation of myosin light chain proteins (MLC-P), which, in turn, promote the organization of the actin cytoskeleton in actin stress fibers (ASFs) and the formation of focal adhesions. Modulation of the RhoA signaling pathway by ethanol (the most commonly used CNS depressant and oldest anesthetic) causes severe disruption of the actin cytoskeleton, ultimately leading to impairment of astrocyte morphological differentiation and function (17, 18). To begin to understand whether and how anesthetics affect astroglia development, we exposed immature primary astroglia cultures to the inhalational anesthetic isoflurane and studied its effect on astroglia maturation and sculpting of actin cytoskeleton. This in vitro model enabled us to examine astroglia during their transformation from radial (i.e. very immature) glia to more mature astrocytes and to study them in isolation without the interference of anesthesia effects on the developing neurons, which is not possible to accomplish using in vivo models.

## Material and Methods

### Astroglia cultures

Primary cultures of astrocytes from 1- to 2-day-old Sprague-Dawley rat pups were prepared as described (19). Brain tissue was freed from meninges and dissected by removing the cerebellum, olfactory bulb, and brainstem; this tissue was minced under sterile conditions. The cell suspension was made with Hank's balanced salt solution and 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid buffers (Gibco BRL, Carlsbad, CA) and treated with 1% DNase (Sigma, St. Louis, MO) and 2.5% trypsin (Gibco BRL). After centrifuging at 800 rpm for 5 minutes, the pellet was resuspended in culture medium (Minimum Essential Medium with Earle's salts) containing 10% horse serum (Gibco BRL), 6% glucose, and penicillin-streptomycin (Gibco BRL). The day of plating was designated as Day-In-Vitro 0 (DIV0). Cultures were grown in an incubator in a constant humidified atmosphere of 5% carbon dioxide and 95% air at 37-C. Medium was changed the day after plating (DIV1) and every third day thereafter. The plated cell density was approximately 50,000 cells/dish (Fluorodish FD35-100; World Precision Instruments Inc., Sarasota, FL). We used 35-mm glass-bottom dishes that had been treated with poly-L-lysine (Sigma) 2 to 3 days before plating. The purity of astrocyte cultures was assessed by immunofluorescence using a mouse antiYglial fibrillary acidic protein (GFAP) monoclonal antibody. Possible contamination by neurons was assessed using an antiYmicrotubule-associated protein 2 antibody and found to be about 1%. Under our conditions, 95% of the cells were astrocytes. This culturing method provides astrocyte-enriched cultures with microglia contamination approximately 4% (20, 21). Because the plating density of immature glia (and thus their ability to touch and connect) is a crucial determinant of growth and morphological development, we prescreened all culture dishes on DIV4 immediately before treatment and selected only dishes with relatively uniformly distributed

cells of low density (40Y80 cells/mm<sup>2</sup>). The accuracy of prescreening was confirmed by randomly selecting approximately 10% of dishes from the same batch. These were then stained and analyzed as outlined below. The plating density resulted in confluent monolayers of astrocytes in 10 to 14 days. At preselection, culture dishes were randomly assigned to control and experimental groups.

### *Isoflurane Treatment*

Primary astrocyte cultures were exposed to isoflurane for 24 hours either at DIV4 (very immature) or DIV15 (more mature). Treatment was done at 37-C in a humidified atmosphere containing 3% isoflurane, 5% carbon dioxide, and 92% air (experimental dishes) using a specially designed gas chamber that allowed a constant flow of isoflurane. This concentration of isoflurane (administered at 3.4%) has been shown to be clinically relevant for the treatment of primary rat neuronal cultures (22). This procedure is based on in vivo studies in which the inspired minimum alveolar concentration of isoflurane required to achieve a surgical plane of anesthesia in immature rat pups was determined to be 3.6% to 4% (23). It is noteworthy that the minimum alveolar concentration requirement for isoflurane in immature rat pups is about 2 times higher than that required by adult animals. Thus, the resulting free concentration of 3% isoflurane in culture medium at 37C (determined to be 0.7 mmol/L [24]) could be considered clinically relevant in this age population. Sham control dishes were kept in the same atmosphere but in the absence of isoflurane. The chamber design enabled the gas composition to which culture dishes were exposed to be analyzed continuously using an infrared analyzer (Datex Ultima, Chalfont, St. Giles, United Kingdom). After 24 hours, the dishes were taken out of the anesthesia chamber and immediately placed in an incubator. True control dishes were kept in the incubator and were not exposed to any treatment.



### Western Blotting and Immunoprecipitation

Astroglia from sham control and isoflurane-treated dishes were collected at various DIV with a cell scraper, lysed in 100 microL of lysis buffer (RIPA Buffer; Thermo Scientific, Rockford, IL) per dish and 10 microL of protease inhibitors (Sigma) per dish, and then centrifuged at 14,000 rpm for 15 minutes at 4C. The supernatant was then collected, mixed with sample buffer (2X Laemmli Sample Buffer; Sigma), and boiled at 90 C to 100 C for 5 minutes. Although in vivo vimentin protein expression steadily declines until Postnatal Day 21, in vitro vimentin protein expression in primary rat glia during the first 15 days after plating does not change significantly (25, 26). Therefore, vimentin was used as an internal loading control for total actin, GFAP, RhoA, and paxillin measurements. Equal amounts of proteins (5-10 microg) were electrophoresed on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis gels (8% for actin and RhoA, 10% for paxillin, GFAP, vimentin, and MLC-P) and then transferred to nitrocellulose membranes. The primary antibodies used were anti- RhoA monoclonal antibody (1:50; Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA), anti-paxillin monoclonal antibody (1:75; Transduction Laboratories, San Jose, CA), anti-vimentin monoclonal antibody (1:100; Sigma), anti-GFAP monoclonal antibody (1:2500; DakoCytomation, Glostrup, Denmark), and anti-p-MYL9 (myosin light chain, Thr18/Ser19) polyclonal antibody (1:100; Santa Cruz Biotechnology). Membranes were exposed to antibodies diluted in Tris buffered salineYTween 0.1% overnight. The secondary antibodies used were HRPconjugated anti-mouse immunoglobulin G for RhoA, paxillin, and vimentin (1:5000); HRP-conjugated anti-rabbit for GFAP (1:8000); and horseradish peroxidase conjugated anti-goat for MLC-P diluted in Tris buffered salineYTween 0.1% for 1 hour. Membranes were developed using the enhanced chemiluminescence system (ECL Plus; Amersham, Arlington Heights, IL). When needed, membranes were washed in Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific) for 7.5 minutes at 37 C. Gels

were scanned with a Bio-Rad GS-800 Densitometer and quantified using Image Quant TL 2005.

For immunoprecipitation studies (total MLC and MLC-P), lysates were precleared by the addition of 1 µg of goat immunoglobulin G (sc-2028; Santa Cruz Biotechnology) with 20 µL A/G Plus-Agarose (Santa Cruz Biotechnology), followed by incubation for 1 hour with antiYp-MYL9 antibodies and protein A/G Plus agarose beads. To detect MLC and MLC-P, 25 µg of total cell proteins were immunoprecipitated using 10 µL of anti-MYL9 antibodies. Western blot was then performed as described.

### Morphological Studies

Sham control and isoflurane-treated primary astrocytic cultures were followed from DIV4 until DIV15. On DIV posttreatment, the cells were washed in PBS, fixed with freshly prepared paraformaldehyde (4% in PBS) at room temperature for 20 minutes, and permeabilized for 15 minutes in Triton-X 0.1% in PBS. Cells were then incubated with 1% 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) stain (D1306; Invitrogen, Carlsbad, CA) for 25 minutes at room temperature, followed by phalloidin stain (1:40; Oregon Green 514 Phalloidin, Invitrogen). After rinsing, the cells were examined by light microscopy (Nikon Eclipse TE200). For analysis, 5 random nonoverlapping photographs were taken per dish.

### Growth Studies

We followed the growth rates of cultured astrocytes starting from either DIV4 or DIV15 (immediately before treatment) and daily thereafter. After staining the dishes with DAPI, 5 random nonoverlapping pictures were taken of a known area per dish (total 15Y33 dishes per time point per litter; 8 litters used). Every DAPI-stained nucleus was counted as 1 cell. The number of nuclei per picture was obtained using ImageJ software (NIH Image, Bethesda, MA). The total number of cells per dish, expressed as number of cells per

square millimeter, was derived as the average of the nuclei counted in each of the 5 pictures. To assess whether the DAPI-stained cells were alive, randomly selected dishes were double stained with a live/dead viability/cytotoxicity kit for mammalian cells (Molecular Probes, Invitrogen). Bright green fluorescent cells were recorded as live cells because membrane-permeant calcein AM, which is cleaved by esterases in live cells, yields green fluorescence. Red fluorescent cells were counted as dead cells because membrane-impermeant ethidium homodimer-1, which labels the nucleic acids of membrane-compromised cells, yields red fluorescence.

### Statistics

Comparisons among the groups were made using 1-way analysis of variance or Kruskal-Wallis analysis, followed when necessary by Tukey test (post hoc analysis) (GraphPad Prism, La Jolla, CA). Significance was set at p 0.05.

## **RESULTS**

### **Temporal Pattern of GFAP and Vimentin Expression During Maturation of Astroglia**

#### **In Vitro**

Several lines of evidence suggest that expression of GFAP gradually increases as astroglia mature both in vitro and in vivo (25-27), whereas changes in protein expression of vimentin differ under in vivo and in vitro conditions. In vivo vimentin protein expression in rodents decreases around Postnatal Day 7, whereas it remains relatively unchanged or slightly elevated for the first 15 days in vitro (25, 26). Therefore, whereas vimentin expression is an unreliable indicator of glial maturity, GFAP levels are often used for assessing glial maturity in vitro with very low levels typically detected in very immature glial

cultures. We found minimal GFAP expression in DIV4 cultures, but a steady increase in expression at DIV7 and DIV15; compared with DIV4, the increases on these days were 2.8- and about 4-fold, respectively (Fig. 1A). Vimentin levels remained unchanged in DIV7 and DIV15 cultures compared with the level at DIV4 (Fig. 1B; n = 4 per data point). Therefore, we used DIV4 as very immature and DIV15 as more mature astroglia cultures for analysis.

### **Isoflurane Disrupts Morphological Transformation of Astroglia and Impairs F-Actin**

#### **Organization**

The regulation of astrocyte morphology is highly dependent on the actin cytoskeleton. Astrocytes in DIV4 untreated cultures displayed a spindle-like appearance, with small cell bodies, bipolar organization of the processes, and scarce actin filaments (Fig. 2A). Under sham control conditions, radial glia underwent morphological differentiation; at DIV7, this was indicated by their transformation into flat polygonal cells with fibroblast-like morphology and relatively large cell bodies, although still without any major processes elongating from them (Fig. 2B). As labeled by phalloidin, F-actin at this stage was arranged mainly in ASF, distinct filament bundles running throughout the cytoplasm. By DIV10, astroglia became fairly confluent, with major processes elongating from the cell bodies and running on top of each other, becoming intermingled and displaying a complex architecture (Fig. 2C). F-actin gradually became more densely organized in rich, thick, parallel-running stress fibers. Astrocytes in cultures exposed to 3% isoflurane for 24 hours, although morphologically indistinguishable from the sham controls before treatment at DIV4, displayed changes indicative of delayed transformation of radial glial cells into normal fibroblast-like morphology at DIV7 (Fig. 2D). Indeed, the isoflurane-treated DIV7 astroglia seemed similar to DIV4 radial glial cells, having no morphological properties typical of flat polygonal cells and lacking organized actin filament bundles. In some cells,

actin started to reorganize into groups of filaments at the cell periphery, forming cortical actin. The transformation of astroglia into flat polygonal cells occurred at DIV10 (Fig. 2E) instead of DIV7, as in the sham controls (Fig. 2B), suggesting that there was a delay in the morphological transformation of immature glia to more mature ones. It is noteworthy that F-actin in isoflurane-treated cultures at DIV10 still did not seem to be as finely organized as in sham controls, with many profiles displaying cortical actin (Fig. 2E). We assessed this phenomenon by quantifying the percentage of cells in experimental and sham control groups displaying ASF at DIV6 and DIV7 (i.e. 1 and 2 days posttreatment, respectively). As expected, we found a significant decrease in the number of astrocytes containing ASF in isoflurane-treated astroglia versus those in sham controls on both days (Fig. 2F; \* $p < 0.05$ ;  $n = 511-639$  cells per data point).

### **Isoflurane Impairs the Growth of Very Immature but Not More Mature Cultured Astroglia**

To assess the effect of anesthesia on astrocyte growth in vitro, we exposed cultured astroglia at DIV4 or DIV15 to 3% isoflurane for 24 hours and followed them up to 11 days or 3 days posttreatment, respectively (Fig. 3). When treated in a very immature state at DIV4, astroglia were highly sensitive to isoflurane, as demonstrated by a significant decrease in numbers of cells versus age-matched sham controls at DIV6 and DIV7 (Fig. 3A; \* $p < 0.05$ ). Although the difference was not statistically significant at DIV8 to DIV10 (3-5 days after treatment), the growth of experimental glia still lagged behind that of sham controls. There was also a decrease in cell density versus age-matched sham controls that ranged from about 40% at DIV6 to about 20% to 30% from DIV7 to DIV10 (Fig. 3B). When treated in a more mature state at DIV15, isoflurane had no significant effect on cell density during the first 3 days after treatment (Fig. 3C) when immature glia were most sensitive ( $n = 19-33$  dishes per data point for DIV4 experiments;  $n = 15$  dishes per data point for DIV15

experiments). When the numbers of dead versus live cells were assessed using a live/dead viability/cytotoxicity kit, the number of dead cells in the experimental dishes was less than 4% of the total cell density, as counted with DAPI staining, a level that was comparable to sham controls at any given posttreatment day (data not shown). Based on these results, the DIV7 (2 days post treatment) time point was used in subsequent analyses.

### **Isoflurane Has No Effect on the Protein Levels of GFAP, Vimentin, and Total Actin in Immature Astroglia**

To assess the effects of isoflurane on cytoskeletal proteins, we exposed cultured astroglia at DIV4 to 3% isoflurane or air for 24 hours and measured the levels of GFAP, vimentin, and actin at DIV7. There were no changes in levels of GFAP, vimentin, or total actin (Fig. 4). Experimental cultures were compared with age-matched sham controls (noted as 100%) (n = 4 per data point).

### **Isoflurane Decreases Protein Levels of Paxillin**

We next examined whether isoflurane also affects paxillin, a focal adhesion protein that is important for attachment and stabilization of astrocytes in vitro, as well as their communication with the extracellular matrix in vivo and in vitro. The posttreatment time point of DIV7 was of particular interest because it coincides with the isoflurane-induced impairment in ASF formation (Fig. 2F). Isoflurane caused a significant decrease in the protein content of paxillin when measured at DIV7 (Fig. 5). Paxillin levels in experimental astrocytes were approximately 2-fold lower than levels in sham controls (\*p < 0.005; n = 4 per data point).

## **Isoflurane Modulates Protein Levels of Small GTPase, Rho A, and Its Downstream**

### **Effector MLC-P**

To determine whether isoflurane-induced effects on the actin cytoskeleton are, at least in part, caused by modulation of the RhoA/MLC-P pathway, we measured the levels of RhoA at DIV7 in cultures treated with isoflurane or air at DIV4. RhoA levels were decreased by about 4-fold in experimental astrocytes versus controls (\*p < 0.01, Fig. 6; n = 4 per data point). Furthermore, when the protein levels of total MLC were determined and compared with the protein levels of the activated (phosphorylated) form of MLC (MLC-P) at DIV7, we found that isoflurane treatment significantly downregulated both the total protein level of MLC (\*p < 0.005, n = 5 per data point; Fig. 7A) and its phosphorylated fraction (MLC-P) (\*p < 0.005; Fig. 7B), while maintaining the MLC-P fraction (determined as the MLC-P/MLC + MLC-P ratio) roughly similar (control group, 49.89% T 7.04%; experimental group, 52.89% T 12.85%; Fig. 7C).

## **DISCUSSION**

We have demonstrated that the volatile anesthetic isoflurane delays proper morphological differentiation and impairs the growth of immature astrocytes in primary culture by causing significant disturbances in 3 important factors of astrocyte morphology and function: ASF formation, cytoskeletal organization, and paxillin content. Cytoskeletal reorganization was accompanied by significant downregulation of endogenous RhoA protein, a member of the Rho family of GTP-binding proteins, which controls ASF formation and, consequently, astroglia morphology, maturation, and growth. Isoflurane-induced RhoA-modulated disruption of actin cytoskeletal organization is, at least in part, mediated via the MLC signaling cascade (Fig. 8). Our findings suggest that isoflurane causes significant impairment in morphological transformation during the early stages of astroglia maturation,

as documented by the scarcity of well-developed ASF, as well as reduced branching and the undue presence of cortical actin in isoflurane-treated cells. Similar disturbances in actin cytoskeletal organization during the early stages of glial maturation have been shown to impair timely formation of a highly organized syncytial glial network that is crucially important in young brain development (27-31). Once the syncytial network has been formed, glia might be less vulnerable to exogenous insults. Our observation that isoflurane-induced impairment in actin morphology is likely age and maturation dependent is consistent with this concept, although it remains to be determined whether isoflurane can influence other important aspects of mature astrocyte function without affecting glial growth, morphology, and/or actin stress fiber formation. Although the causes of the age- and maturity dependent vulnerability that we and others (21) have found are not fully understood, it is possible that differential susceptibility could be because the expression and properties of cell surface transporters and ion channels vary at different stages of astroglia maturity, thus making them more or less sensitive to certain toxic insults. For example, the coupling efficiency of calcium signaling (28, 29). chloride channel gating (27), and cell surface expression of some astrocyte glutamate transporters (e.g. GLAST and GLT-1) (29, 31) rely on proper cytoskeletal formation and the processes formation that promote glial growth, communication, and the formation of a tightly intertwined and woven glial syncytium. Therefore, we propose that isoflurane, by disrupting proper cytoskeletal actin organization, modulates a variety of glial cell surface transporters and ion channels in an age-dependant fashion. Further studies are needed to confirm this hypothesis.

The actin cytoskeleton, one of the major determinants of astrocyte morphology, motility, adhesion, and migration, undergoes extensive and constant sculpting to accommodate many demands of astroglial development (32). By polymerizing, G-actin forms filament bundles (F-actin), which become more densely organized in ASF running throughout the cytoplasm and glial processes as glia mature. Normally, ASFs are linked and anchored to



the extracellular matrix through specific proteins, such as paxillin, that are localized at focal adhesion complexes. The formation of ASFs and focal adhesions must be finely balanced and precisely timed to allow proper development, differentiation, and growth of developing astrocytes (15). Based on our findings, it seems that isoflurane disturbs this fine balance by downregulating paxillin levels and disorganizing ASFs. During brain development, astroglia undergo morphological changes characteristic of extensive formation of cellular processes. That process relies on complex temporal changes in the relative presence and protein expression of vimentin and GFAP. It is becoming increasingly clear that the dynamic nature of intermediate filaments depends on the regulation of filament assembly and disassembly by phosphorylation of their head domains. Studies with reactive astrocytes lacking both GFAP and vimentin have shown that cytoskeletal bundle formation does not occur, indicating that the relationship between vimentin and GFAP is complex and highly intertwined (33). Although vimentin and GFAP lack enzymatic activity, they have an important part in maintaining the mechanical stability and shape of astrocytes; they also assist in the organization of the cytoplasm and organelles. Of particular relevance to this study is the finding that intermediate filaments contribute to astrocyte motility, which is essential to proper neuronal development. It seems that GFAP and vimentin expression during early stages of astrocyte development differ under *in vitro* and *in vivo* conditions (25, 26, 34). Our findings are consistent with the notion that a robust increase in GFAP expression from DIV4 until DIV15 (4-fold) is accompanied by essentially unchanged expressions of vimentin. The reason for the different expression of these 2 crucial intermediates under *in vivo* and *in vitro* conditions remains elusive. Not surprisingly, the actin cytoskeleton imbalance coincides with the greatest effect on glial growth. Thus, at 1 day (DIV6) and 2 days (DIV7) after isoflurane treatment, we found impaired glial growth and a significant decrease in the number of ASF-containing glial cells. Interestingly, although isoflurane seemed to disturb the spatial organization of the actin cytoskeleton, it

had no effect on the total protein content of actin. In that respect, isoflurane mimics the effect of ethanol on developing glia. For example, Guasch et al (17) showed that cultured glia chronically exposed to physiologically relevant concentrations of ethanol have altered actin organization, shown as the formation of groups of bundles around the cell periphery (i.e. cortical actin), which gradually are reorganized into continuous actin rings. We found that although there was a clear presence of cortical actin in isoflurane-treated cells, the formation of cortical rings was not significant after an acute exposure to isoflurane (data not shown). It remains to be examined whether prolonged exposure to isoflurane results in the formation of actin rings similar to those that occur after chronic exposure to ethanol. It is noteworthy that although the number of glial cells displaying ASF was significantly reduced after isoflurane treatment at DIV6 and DIV7, not all astrocytes displayed actin reorganization, which suggests differential susceptibilities to the effects of isoflurane. Indeed, astroglia, especially immature ones, contain different subpopulations of astrocytes that display both functional and pharmacological heterogeneity (35, 36).

Our findings suggest involvement of the RhoA signaling pathway in isoflurane-induced actin alterations. Interestingly, earlier findings indicate that substantial downregulation of endogenous RhoA protein often results in the impairment of RhoA function, especially in cases of chronic modulation (17). It remains to be determined whether acute exposure to isoflurane also affects Rho-GDI complex dissociation and/or impairs its binding to RhoA receptors on the effectors, especially in view of the profound (4-fold) downregulation of RhoA protein content. RhoA activation is a complex phenomenon that requires interaction not only with other Rho GTPases (e.g. RhoE, Rac-1, and Cdc42), but also with a variety of effectors (e.g. ROCK-1 and PAK-1) (16, 37) that control downstream aspects of the pathway (especially MLC/MLC-P balance). Therefore, it remains to be determined whether isoflurane interferes at different and perhaps multiple levels of this signaling cascade. Interestingly, although chronic exposure to ethanol was found not to affect MLC-P (17), a

RhoA downstream protein that is crucial for the linkage of actin-myosin fibers and, consequently, for ASF formation, we found that isoflurane treatment was detrimental not only to protein levels of endogenous MLC, but also to its activated form (MLC-P). Because the MLC-P fraction remained roughly unchanged as compared with the control condition, it is most likely that the effects of isoflurane on MLC-P are caused by downregulation of its substrate (MLC), which in turn results in significant reorganization of the actin cytoskeleton, impairment of ASF formation, and delay in glial morphological transformation indicative of slowed maturation.

Previous reports have shown that Rho-dependent actin reorganization, from stress fibers to cortical actin and actin rings as well as oval-type morphology, occurs in cells that are committed to die by apoptotic mechanisms (38, 39). In that sense, isoflurane-induced actin reorganization, cortical actin formation, and “rounded” morphological transformation combined with a reduction in paxillin could represent a series of initial steps in apoptotic activation. Based on our results, however, this is less likely because less than 4% of immature astrocytes die after isoflurane treatment, and a negligible number of isoflurane-treated astroglia have fragmented apoptotic nuclear morphology (unpublished observation).

It is becoming clear that astrocytes, by regulating neuronal migration, maturation, and synapse formation and sculpting, control every aspect of brain development (9, 10). By the end of synaptogenesis, mature astrocytes are highly coupled in a syncytial network that propagates calcium waves and modulates the function of synaptic circuits by releasing gliotransmitters, as well as by forming direct contact with developing neurons. This indicates that astrocytes actively mold neuronal circuits during development, which is contrary to the simplistic original view that the formation of synapses is an ability intrinsic to neurons. For example, in vitro studies in which neurons were cultured in the absence of the astrocytic feeding layer have shown little spontaneous synaptic activity compared with

the high level of synaptic activity that occurs in neurons grown with the astrocytic feeding layer (10, 11). Further studies have confirmed that the ability of astrocytes to increase synaptic activity is accounted for by a significant increase in synapse number, as well as synapse function, leading, in some in vitro systems, to a nearly 100-fold increase in synaptic activity (10). Although it remains to be established whether and how the isoflurane-induced impairment of glial morphological transformation and growth observed in the present study may affect the function of neurons and the formation of synapses, our recent in vivo evidence suggests that an isoflurane-containing anesthesia cocktail, when administered at the peak of synaptogenesis, causes severe longterm impairment of synapse formation, which is manifested as a decrease in synapse number and an increase in redundant synapsing (8). Although this study did not examine the effects of anesthesia on immature glia, the fact that isoflurane impairs the development of astroglia in vitro raises the question of whether astroglia could be an important, although thus far neglected player, in the detrimental effects of general anesthetics on developing neurons.

In conclusion, our results demonstrate that isoflurane profoundly disrupts actin cytoskeleton organization and that these effects are accompanied by RhoA and MLC modulation. Isoflurane-induced downregulation of endogenous RhoA and MLC-P could be the triggering events in impairment of the morphological transformation of radial glial cells to more mature astrocytes and, therefore, could have detrimental functional consequences for developing glia. In view of the fact that astroglia are central to proper neuronal development, our study points, for the first time, toward the possibility that isoflurane-induced developmental neurotoxicity could be caused not only by a direct toxic effect on neurons, but also by isoflurane-induced actin cytoskeleton mediated glial impairment.