

## Μέθοδοι και Στρατηγικές Έρευνας

### Περίγραμμα κεφαλαίου

#### Πειραματική Εκτομή

Αξιολογώντας τις Συμπεριφορικές Επιδράσεις  
Εγκεφαλικής Βλάβης  
Προκαλώντας Εγκεφαλικές Βλάβες  
Στερεοταξική Χειρουργική  
Ιστολογικές Μέθοδοι  
Ανιχνεύοντας Νευρωνικές Συνδέσεις  
Μελετώντας τη Δομή του Ζώντος Ανθρώπινου  
Εγκεφάλου

#### Καταγράφοντας και Διεγείροντας Νευρωνική Δραστηριότητα

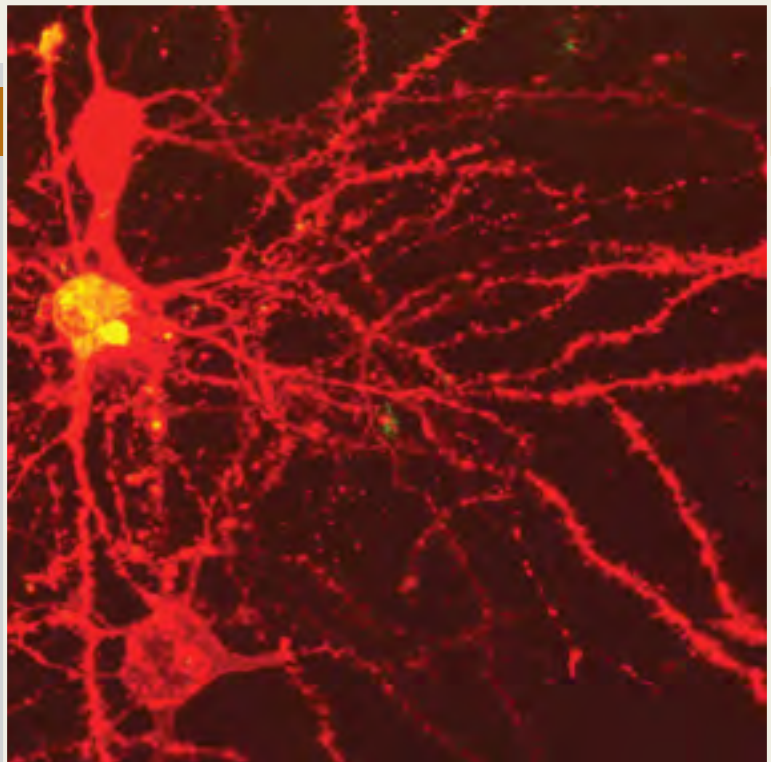
Καταγράφοντας Νευρωνική Δραστηριότητα  
Καταγράφοντας τη Μεταβολική και Συναπτική  
Δραστηριότητα του Εγκεφάλου  
Διεγείροντας Νευρωνική Δραστηριότητα

#### Νευροχημικές Μέθοδοι

Εντοπίζοντας Νευρώνες που Παράγουν  
Συγκεκριμένες Νευροχημικές Ουσίες  
Εντοπίζοντας Συγκεκριμένους Υποδοχείς  
Μετρώντας Χημικές Ουσίες που Εκκρίνονται  
στον Εγκέφαλο

#### Γενετικές Μέθοδοι

Μελέτες Διδύμων  
Μελέτες Υιοθεσίας  
Γονιδιωματικές Μελέτες  
Στοχευμένες Μεταλλάξεις  
Αντινοσηματικά Ολιγονουκλεοτίδια  
Μέθοδοι CRISPR-Cas



Νευρώνες στον φλοιό χρωσμένοι με μια χρώση



## ΜΑΘΗΣΙΑΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

- ΜΣ 5.1:** Εξηγήστε τι μπορούν να μάθουν οι ερευνητές από μελέτες πρόκλησης εγκεφαλικών βλαβών.
- ΜΣ 5.2:** Συγκρίνετε μεθόδους παραγωγής εγκεφαλικών βλαβών.
- ΜΣ 5.3:** Περιγράψτε τη διαδικασία της στερεοταξικής χειρουργικής.
- ΜΣ 5.4:** Συνοψίστε τα στάδια των ιστολογικών μεθόδων.
- ΜΣ 5.5:** Συγκρίνετε τεχνικές για την ανίχνευση απαγωγών και προσαγωγών αξόνων.
- ΜΣ 5.6:** Αντιπαραβάλλετε τις μεθόδους μελέτης της δομής του ζώντος ανθρώπινου εγκεφάλου.
- ΜΣ 5.7:** Συγκρίνετε τις μεθόδους καταγραφής νευρωνικής δραστηριότητας.
- ΜΣ 5.8:** Συγκρίνετε μεθόδους αξιολόγησης μεταβολικής και συναπτικής δραστηριότητας.
- ΜΣ 5.9:** Συγκρίνετε μεθόδους νευρωνικού ερεθισμού.
- ΜΣ 5.10:** Περιγράψτε μεθόδους εντοπισμού νευρώνων που παράγουν μια συγκεκριμένη νευροχημική ουσία.
- ΜΣ 5.11:** Συγκρίνετε μεθόδους εντοπισμού συγκεκριμένων υποδοχέων.
- ΜΣ 5.12:** Συγκρίνετε τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την εξέταση των χημικών ουσιών που εκκρίνονται στον εγκέφαλο.
- ΜΣ 5.13:** Περιγράψτε πώς τα ποσοστά συμφωνίας διδύμων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση της γενετικής συμβολής σε μια συμπεριφορά.
- ΜΣ 5.14:** Αξιολογήστε το ρόλο των μελετών υιοθεσίας στον υπολογισμό των γενετικών συνεισφορών σε μια συμπεριφορά.
- ΜΣ 5.15:** Προσδιορίστε τις γονιδιωματικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη φυσικών και συμπεριφορικών χαρακτηριστικών.
- ΜΣ 5.16:** Συνοψίστε πώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν στοχευμένες μεταλλάξεις στη μελέτη των γενετικών συνεισφορών σε μια συμπεριφορά.
- ΜΣ 5.17:** Περιγράψτε τον τρόπο λειτουργίας των αντινοσηματικών ολιγονουκλεοτιδίων στην αλλαγή της συμπεριφοράς.
- ΜΣ 5.18:** Συνοψίστε τις χρήσεις των μεθόδων CRISPR-Cas στην έρευνα των νευροεπιστημών.

Το καλοκαίρι του 1982, αρκετοί νέοι άρχισαν να εμφανίζονται σε νευρολογικές κλινικές στη βόρεια Καλιφόρνια με δραματικά συμπτώματα (Langston et al., 1983). Οι πιο σοβαρά προσβεβλημένοι ασθενείς ήταν σχεδόν πλήρως παράλυτοι. Δεν μπορούσαν να μιλήσουν καθαρά, έβγαζαν συνεχώς σάλιο και τα μάτια τους ήταν ανοιχτά με σταθερό βλέμμα. Άλλοι, σε λιγότερο σοβαρή κατάσταση, περπατούσαν με αργό, συρτό βάδισμα και κινούνταν με μεγάλη δυσκολία. Τα συμπτώματα έμοιαζαν με εκείνα της νόσου του Parkinson, αλλά αυτή η διαταραχή έχει πολύ σταδιακή έναρξη, συνήθως στη μεγαλύτερη ενήλικη ζωή. Αυτοί οι ασθενείς ήταν όλοι στα είκοσι ή στις αρχές των τριάντα τους ετών.

Ο κοινός παράγοντας που συνέδεε αυτούς τους ασθενείς ήταν η ενδοφλέβια χρήση ναρκωτικών. Όλοι οι ασθενείς είχαν κάνει χρήση συνθετικών οπιοειδών. Το παράνομο ναρκωτικό ήταν μολυσμένο με ΜΡΤΡ, μια τοξική χημική ουσία που κατέστρεψε τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες και προκάλεσε τα νευρολογικά συμπτώματα των ασθενών. Επειδή τα συμπτώματα έμοιαζαν με εκείνα της νόσου του Πάρκινσον, στους ασθενείς χορηγήθηκε L-DOPA, το πρόδρομο φάρμακο της ντοπαμίνης που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία αυτής της νόσου και όλοι παρουσίασαν σημαντική βελτίωση των συμπτωμάτων τους. Δυστυχώς, η βελτίωση ήταν προσωρινή καθώς το φάρμακο έχασε την αποτελεσματικότητά του.

Δύο άτομα που έπασχαν από ΜΡΤΡ ταξίδεψαν στη Σουηδία για να λάβουν μεταμοσχεύσεις εμβρυϊκού ιστού που περιείχε νευρώνες που παράγουν ντοπαμίνη. Ο ιστός αυτός μεταμοσχεύθηκε στον κερκοφόρο πυρήνα και στο κέλυφος, με την ελπίδα ότι οι νέοι νευρώνες από τον μεταμοσχευμένο ιστό θα επιβίωναν και θα άρχιζαν να παράγουν ντοπαμίνη, μειώνοντας τα συμπτώματα που αντιμετώπιζαν οι ασθενείς, τα οποία έμοιαζαν με τη νόσο του Parkinson.

Πριν από τη μεταμόσχευση, σε έναν από τους ασθενείς χορηγήθηκε ένεση ραδιενεργής L-DOPA. Στη συνέχεια, μία ώρα αργότερα, του έγινε σάρωση PET. Το κεφάλι του τοποθετήθηκε στον τομογράφο και για τα επόμενα λεπτά το μηχάνημα συνέλεγε δεδομένα από υποατομικά σωματίδια που εκπέμπονταν καθώς διασπαζόταν η ραδιενεργός L-DOPA στον εγκέφαλό του. Τα δεδομένα αυτά αποκάλυψαν την έκταση και τη θέση της βλάβης στο ντοπαμινεργικό του σύστημα.

Λίγες εβδομάδες αργότερα, ο ασθενής μπήκε στο νοσοκομείο για τη χειρουργική του επέμβαση. Οι τεχνικοί αφαίρεσαν ντοπαμινεργικούς νευρώνες από τη μέλαινα ουσία αρκετών εμβρυϊκών εγκεφάλων και τους προετοίμασαν για εμφύτευση στον εγκέφαλο του ασθενούς. Ο ασθενής αναιθητοποιήθηκε και ο χειρουργός έκανε τομές στο τριχωτό της κεφαλής του για να εκθέσει τμήματα του κρανίου του. Ο χειρουργός προσαρμόσε το πλαίσιο μιας στερεοταξικής συσκευής στο κρανίο του ασθενούς, έκανε κάποιες μετρήσεις με βάση έναν χάρτη του εγκεφάλου του ασθενούς και στη συνέχεια άνοιξε αρκετές οπές. Χρησιμοποίησε τη στερεοταξική συσκευή για να καθοδηγήσει τις εγχύσεις των εμβρυϊκών νευρώνων στον κερκοφόρο πυρήνα και το κέλυφος του ασθενούς. Μόλις ολοκληρώθηκαν οι ενέσεις, ο χειρουργός αφαίρεσε το στερεοταξικό πλαίσιο και έραψε τις τομές που είχε κάνει στο τριχωτό της κεφαλής.

Η επέμβαση ήταν αρκετά επιτυχής και ο ασθενής ανέκτησε μεγάλο μέρος του κινητικού του ελέγχου. Λίγο περισσότερο από ένα χρόνο αργότερα, του χορηγήθηκε άλλη μια ένεση ραδιενεργής L-DOPA και υποβλήθηκε και πάλι σε σάρωση PET. Τα αποτελέσματα της δεύτερης σάρωσης έδειξαν αυτό που έδειχνε και η ανάρρωσή του: τα μεταμοσχευμένα κύτταρα είχαν επιβιώσει και παρήγαγαν ντοπαμίνη. Μπορείτε να δείτε τα αποτελέσματα των σαρώσεων PET στην Εικόνα 5.32 σε αυτό το κεφάλαιο.

Παρά τις καταστροφικές συνέπειες της τυχαίας χορήγησης του MPTP σε αυτή την ομάδα ασθενών, θεωρείται πλέον σημαντικό εργαλείο στην έρευνα για τη νόσο του Parkinson. Οι νευροτοξικές του επιδράσεις το καθιστούν χρήσιμο για τη δημιουργία επιλεκτικών χημικών καταστροφών του ντοπαμινεργικού συστήματος και την παραγωγή ενός μοντέλου των συμπτωμάτων της νόσου του Parkinson. Οι ερευνητές βασίζονται τώρα στο μοντέλο MPTP σε πειραματόζωα για να δοκιμάζουν την αποτελεσματικότητα νέων θεραπειών για τη νόσο.

Η περίπτωση αυτή αναδεικνύει αρκετές σημαντικές μεθοδολογικές έννοιες που διερευνώνται σε αυτό το κεφάλαιο. Η χημική βλάβη, η απεικόνιση με σάρωση PET και η στερεοταξική χειρουργική αποτελούν μεθοδολογικά εργαλεία που χρησιμοποιούν οι ερευνητές καθώς προσπαθούν να κατανοήσουν καλύτερα τη δομή και τη λειτουργία του νευρικού συστήματος και να αναπτύξουν αποτελεσματικές θεραπείες για την αντιμετώπιση της νόσου.

Η έρευνα στις νευροεπιστήμες της συμπεριφοράς περιλαμβάνει προσπάθειες επιστημόνων από πολλούς κλάδους όπως η φυσιολογία, η νευροανατομία, η βιοχημεία, η ψυχολογία, η ενδοκρινολογία και η ιστολογία. Η έρευνα στις συμπεριφορικές επιστήμες απαιτεί δεξιότητες και γνώσεις πολλών πειραματικών τεχνικών. Επειδή διαφορετικές διαδικασίες μπορεί να παράσχουν αντιφατικά αποτελέσματα, οι ερευνητές πρέπει να είναι εξοικειωμένοι με τα πλεονεκτήματα και τους περιορισμούς των μεθόδων που χρησιμοποιούνται. Οι ερευνητές μπορεί να πάρουν μια αινιγματική απάντηση, μόνο και μόνο για να συνειδητοποιήσουν αργότερα ότι δεν έθεσαν το ερώτημα που νόμιζαν ότι έθεταν. Όπως θα δούμε, τα καλύτερα συμπεράσματα για τη συμπεριφορική νευροεπιστήμη δεν προκύπτουν από ένα μόνο πείραμα, αλλά από ένα ερευνητικό πρόγραμμα που να μας επιτρέπει να συγκρίνουμε τα αποτελέσματα μελετών που χρησιμοποιούν διαφορετικές μεθόδους.

Μια τεράστια – και δυνητικά συγχυτική – φάρετρα ερευνητικών μεθόδων είναι διαθέσιμη στους ερευνητές της συμπεριφορικής νευροεπιστήμης. Ένας αναγνώστης θα μπορούσε να χαθεί, ή να χάσει το ενδιαφέρον του, αν του παρουσιαζόταν ένας μακρύς κατάλογος μεθόδων. Αντ' αυτού, θα παρουσιάσουμε μερικές από τις σημαντικότερες και ευρύτερα χρησιμοποιούμενες μεθοδολογικές διαδικασίες, ταξινομημένες κατά ομοιότητες. Στόχος μας είναι να διευκολύνουμε την κατανόηση

των πλεονεκτημάτων, των μειονεκτημάτων και των τύπων πληροφοριών που παράγονται από διαφορετικές μορφές μεθόδων. Αυτό θα βοηθήσει επίσης να εξηγήσουμε τις στρατηγικές που χρησιμοποιούν οι ερευνητές καθώς συνεχίζουν την έρευνα πάνω στα αποτελέσματα ενός πειράματος, σχεδιάζοντας και διεξάγοντας ένα άλλο. Η πρώτη ενότητα αρχίζει με τις διάφορες μεθόδους πειραματικής εκτομής ή καταστροφής εγκεφαλικού ιστού. Η δεύτερη εξετάζει τον τρόπο με τον οποίο οι ερευνητές διεγείρουν και καταγράφουν τη νευρωνική δραστηριότητα. Στη συνέχεια, η τρίτη και η τέταρτη ενότητα εξετάζουν νευροχημικές και γενετικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται στην έρευνα της συμπεριφορικής νευροεπιστήμης.

## Πειραματική εκτομή

Μια σημαντική ερευνητική μέθοδος που χρησιμοποιείται για τη διερεύνηση των εγκεφαλικών λειτουργιών περιλαμβάνει την εκτομή ή την απενεργοποίηση τμήματος του εγκεφάλου και την αξιολόγηση της επακόλουθης συμπεριφοράς ενός ζώου. Η μέθοδος αυτή ονομάζεται **πειραματική εκτομή** ή **καταστροφή**. Η πειραματική εκτομή μπορεί να περιλαμβάνει την εκτομή εγκεφαλικού ιστού ή την καταστροφή του ιστού, ώστε να παρεμποδιστεί η λειτουργία του.

Η πειραματική εκτομή είναι μία από τις παλαιότερες μεθόδους που χρησιμοποιούνται στις νευροεπιστήμες.

## Αξιολογώντας τις Συμπεριφορικές Επιδράσεις της Εγκεφαλικής Βλάβης

### ΜΣ 5.1: Εξηγήστε τι μπορούν να μάθουν οι ερευνητές από μελέτες πρόκλησης βλαβών

Μια **βλάβη** είναι μια πληγή ή ένας τραυματισμός και ένας ερευνητής που καταστρέφει μέρος του εγκεφάλου αναφέρεται συνήθως στη βλάβη αυτή

ως *εγκεφαλική βλάβη*. Τα πειράματα στα οποία καταστρέφεται μέρος του εγκεφάλου και στη συνέχεια παρατηρείται η συμπεριφορά του οργανισμού ονομάζονται **μελέτες βλάβης**. Η σκόπιμη εγκεφαλική βλάβη πραγματοποιείται σε ζώα. Επιπλέον, τα αποτελέσματα της συμπεριφοράς των φυσικών βλαβών, όπως αυτές που προκύπτουν από τυχαίους τραυματισμούς ή εγκεφαλικά επεισόδια, μπορούν να μελετηθούν σε ανθρώπους συμμετέχοντες στην έρευνα.

Τι ακριβώς μπορούμε να μάθουμε από τις μελέτες βλαβών; Ο στόχος είναι να ανακαλύψουμε ποιες λειτουργίες επιτελούνται από διάφορες περιοχές του εγκεφάλου και στη συνέχεια να κατανοήσουμε πώς συνδυάζονται αυτές οι λειτουργίες για την επίτευξη συγκεκριμένων συμπεριφορών. Η διάκριση μεταξύ *εγκεφαλικής λειτουργίας* και *συμπεριφοράς* είναι σημαντική. Τα κυκλώματα εντός του εγκεφάλου εκτελούν λειτουργίες, όχι συμπεριφορές. Καμία περιοχή ή νευρωνικό κύκλωμα του εγκεφάλου δεν είναι αποκλειστικά υπεύθυνα για μια συμπεριφορά. Κάθε περιοχή του εγκεφάλου εκτελεί μια λειτουργία (ή ένα σύνολο λειτουργιών) που συμβάλλει στην εκτέλεση της συμπεριφοράς.

Για παράδειγμα, η πράξη της ανάγνωσης περιλαμβάνει λειτουργίες που απαιτούνται για τον έλεγχο των οφθαλμικών κινήσεων, την εστίαση του φακού του ματιού, την αντίληψη και αναγνώριση λέξεων και γραμμάτων, την κατανόηση του νοήματος των λέξεων και λοιπά. Ορισμένες από αυτές τις λειτουργίες συμμετέχουν και σε άλλες συμπεριφορές. Για παράδειγμα, ο έλεγχος της κίνησης των ματιών και η εστίαση απαιτούνται για κάθε εργασία που περιλαμβάνει την όραση και οι εγκεφαλικοί μηχανισμοί που χρησιμοποιούνται στην κατανόηση της σημασίας των λέξεων επίσης συμμετέχουν στην κατανόηση της ομιλίας. Το καθήκον του ερευνητή είναι να κατανοήσει τις λειτουργίες που απαιτούνται για την εκτέλεση μιας συγκεκριμένης συμπεριφοράς και να προσδιορίσει ποια κυκλώματα νευρώνων στον εγκέφαλο είναι υπεύθυνα για καθεμία από αυτές τις λειτουργίες. Ένα άλλο παράδειγμα που αναδεικνύει το ρόλο των νευρωνικών κυκλωμάτων στη συμπεριφορά μπορεί να παρατηρηθεί στη συμπεριφορά λήψης ουσιών. Όπως θα διαβάσετε στο Κεφάλαιο 19, τα κύτταρα που εκκρίνουν ντοπαμίνη και βρίσκονται στην κοιλιακή καλυπτρική περιοχή στέλνουν τα τερματικά τους κομβία στον επικλινή πυρήνα.

Αυτή η οδός εμπλέκεται στις ενισχυτικές επιδράσεις πολλών συμπεριφορών, περιλαμβανομένης της χρήσης ουσιών. Η βλάβη των κυττάρων αυτής της οδού όντως μειώνει τη χρήση ουσιών, αλλά μόνο για ορισμένα ναρκωτικά. Ακόμη και η βλάβη ολόκληρης της μεσομεταιχμιακής οδού μπορεί να μην εξαλείψει εντελώς τη συμπεριφορά (Pierce & Kumaresan, 2006). Η λήψη ουσιών είναι μια σύνθετη συμπεριφορά που περιλαμβάνει πολλαπλά κυκλώματα στον εγκέφαλο. Η ερμηνεία των μελετών βλάβης περιπλέκεται από το γεγονός ότι όλες οι περιοχές του εγκεφάλου είναι διασυνδεδεμένες. Ας υποθέσουμε ότι έχουμε μια καλή κατανόηση των λειτουργιών που απαιτούνται για την εκτέλεση μιας συγκεκριμένης συμπεριφοράς. Διαπιστώνουμε ότι βλάβη σε μια συγκεκριμένη δομή του εγκεφάλου επηρεάζει τη συγκεκριμένη συμπεριφορά. Μπορούμε κατ' ανάγκη να συμπεράνουμε ότι μια λειτουργία απαραίτητη για αυτή τη συμπεριφορά εκτελείται από κυκλώματα νευρώνων που βρίσκονται σε αυτή τη συγκεκριμένη δομή; Δυστυχώς, δεν μπορούμε. Οι λειτουργίες που μας ενδιαφέρουν μπορεί στην πραγματικότητα να εκτελούνται από νευρωνικά κυκλώματα που βρίσκονται αλλού στον εγκέφαλο. Η βλάβη σε μια δομή μπορεί απλώς να παρεμβαίνει στη δραστηριότητα των νευρωνικών κυκλωμάτων σε μια διαφορετική δομή.

## Παράγοντας Εγκεφαλικές Βλάβες

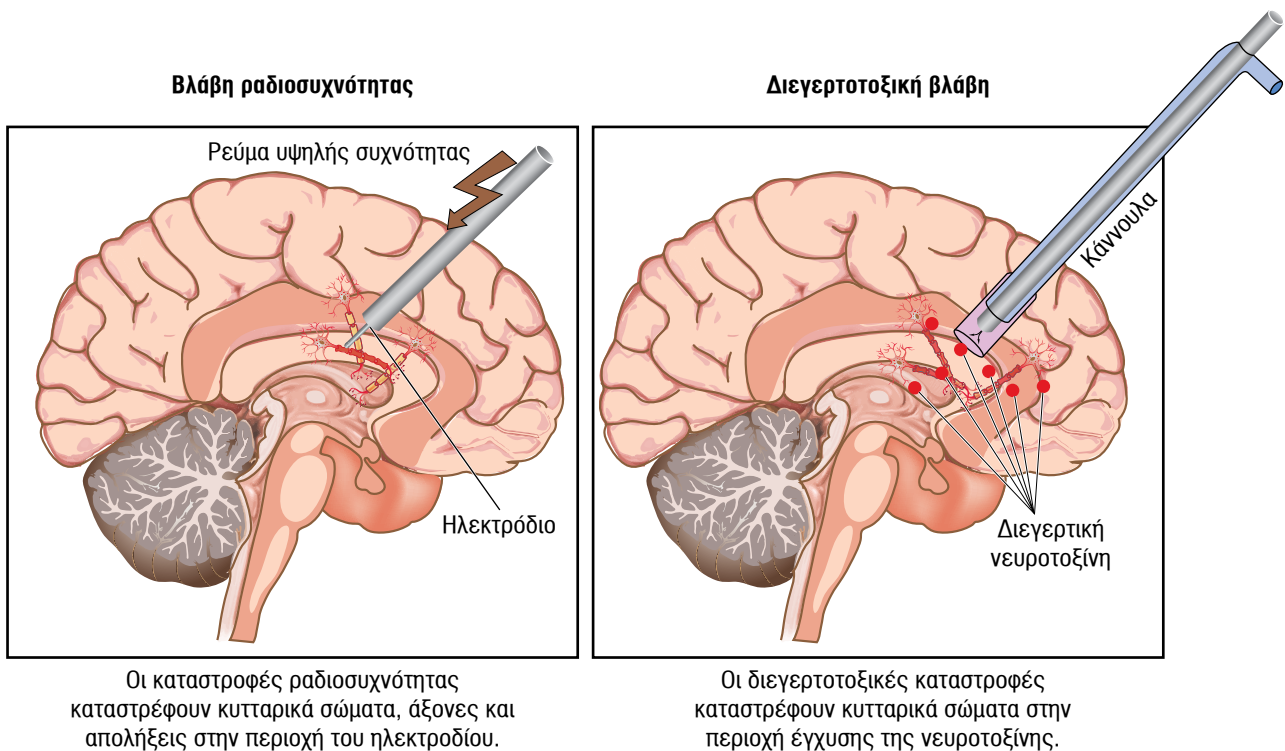
### ΜΣ 5.2: Συγκρίνετε μεθόδους πρόκλησης εγκεφαλικών βλαβών

Πώς παράγονται εγκεφαλικές βλάβες πειραματικά; Συνήθως, ένας ερευνητής θέλει να αδρανοποιήσει περιοχές που είναι κρυμμένες στα βάθη του εγκεφάλου. Οι εγκεφαλικές βλάβες υποφλοιωδών περιοχών (περιοχών που βρίσκονται κάτω από τον φλοιό) παράγονται συνήθως με τη διέλευση ηλεκτρικού ρεύματος μέσω ενός σύρματος από ανοξειδωτο χάλυβα που καλύπτεται με μονωτική επιστρωση παντού εκτός από ένα μικρό τμήμα της άκρης του. Στη συνέχεια, το σύρμα (ηλεκτρόδιο) οδηγείται στον προορισμό του σε μια συγκεκριμένη θέση εντός του εγκεφάλου, με τη χρήση ακριβών συντεταγμένων. Ο ερευνητής κατόπιν ενεργοποιεί μια συσκευή πρόκλησης βλάβης, η οποία παράγει ρεύμα ραδιοσυχνότητας (RF), ένα εναλλασσόμενο ρεύμα πολύ υψηλής συ-

χνότητας. Η διέλευση του ρεύματος RF μέσω του εγκεφαλικού ιστού παράγει θερμότητα που σκοτώνει τα κύτταρα στην γυμνή περιοχή της άκρης του ηλεκτροδίου. Οι βλάβες που παράγονται με αυτή την τεχνική καταστρέφουν τα πάντα γύρω από την άκρη του ηλεκτροδίου, συμπεριλαμβανομένων των νευρωνικών σωμάτων και των διερχόμενων από την περιοχή αξόνων άλλων νευρώνων. Μια πιο επιλεκτική μέθοδος παραγωγής εγκεφαλικών βλαβών χρησιμοποιεί ένα διεγερτικό αμινοξύ, όπως το *καϊνικό*, το οποίο σκοτώνει τους νευρώνες διεγείροντάς τους μέχρι θανάτου. Οι βλάβες που παράγονται με αυτόν τον τρόπο ονομάζονται **διεγερτοτοξικές βλάβες**.

Όταν ένα διεγερτικό αμινοξύ εγχέεται μέσω μιας κάνουλας (ενός λεπτού μεταλλικού σωλήνα) σε μια περιοχή του εγκεφάλου, η χημική ουσία καταστρέφει τα νευρωνικά σώματα στην περιοχή, αλλά σέβεται τους άξονες που ανήκουν σε νευρώνες διαφορετικών περιοχών που τυχαίνει να περνούν από κοντά (βλ. Εικόνα 5.1.) Αυτή η επιλεκτικότητα επιτρέπει στον ερευνητή να προσδιορίσει αν οι συμπεριφορικές επιδράσεις της καταστροφής μιας συγκεκριμένης δομής του

εγκεφάλου προκαλούνται από τον θάνατο των νευρώνων που βρίσκονται εκεί ή από την καταστροφή των αξόνων που διέρχονται από εκεί. Για παράδειγμα, ορισμένοι ερευνητές ανακάλυψαν ότι βλάβες RF μιας συγκεκριμένης περιοχής στο στέλεχος του εγκεφάλου καταργούσαν τον ύπνο REM και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η περιοχή αυτή εμπλέκεται στην παραγωγή αυτού του σταδίου του ύπνου (ο ύπνος REM είναι το στάδιο του ύπνου κατά το οποίο εμφανίζονται τα όνειρα. Θα μάθετε περισσότερα για το θέμα αυτό στο Κεφάλαιο 9). Αλλά μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι όταν χρησιμοποιήθηκε καϊνικό για να καταστραφούν οι νευρώνες που βρίσκονται εκεί, ο ύπνος των ζώων δεν επηρεάστηκε. Επομένως, οι βλάβες RF πρέπει να μετέβαλαν τον ύπνο καταστρέφοντας τους άξονες που διέρχονται από την περιοχή. Υπάρχουν ακόμη πιο συγκεκριμένες μέθοδοι στόχευσης και καταστροφής συγκεκριμένων τύπων νευρώνων. Για παράδειγμα, οι μοριακοί βιολόγοι έχουν επινοήσει τρόπους σύζευξης (σύνδεσης) της *σαπορίνης*, μιας τοξικής πρωτεΐνης, και αντισωμάτων που μπορούν να συνδεθούν με συγκεκριμένες πρωτεΐνες που βρίσκονται μόνο



**ΕΙΚΟΝΑ 5-1** Δύο μέθοδοι παραγωγής εγκεφαλικών βλαβών

σε ορισμένους τύπους νευρώνων στον εγκέφαλο. Τα αντισώματα στοχεύουν αυτές τις πρωτεΐνες και η σαπορίνη σκοτώνει μόνο τα κύτταρα με τα οποία συνδέονται αυτές οι πρωτεΐνες. Σημειώστε ότι όταν παράγονται υποφλοιώδεις βλάβες με τη διέλευση ρεύματος RF μέσω ενός ηλεκτροδίου ή την έγχυση μιας χημικής ουσίας μέσω μιας κάνουλας, προκαλείται πάντα πρόσθετη βλάβη στον εγκέφαλο. Όταν ένα ηλεκτρόδιο ή μια κάνουλα περνάει μέσα από τον εγκέφαλο για να φτάσει σε έναν στόχο, αναπόφευκτα προκαλείται μια μικρής έκτασης βλάβη ακόμη και πριν από την ενεργοποίηση του μηχανισμού παραγωγής βλαβών ή την έναρξη της έγχυσης. Ως αποτέλεσμα, δεν μπορούμε να συγκρίνουμε τη συμπεριφορά των ζώων με εγκεφαλική βλάβη με εκείνη απλώς μη χειρουργημένων ζώων, ως ομάδα ελέγχου. Η ανεπιθύμητη βλάβη στις περιοχές του εγκεφάλου που υπέρκεινται της στοχευμένης βλάβης μπορεί στην πραγματικότητα να ευθύνεται για ορισμένα από τα συμπεριφορικά ελλείμματα που παρατηρούμε. Για τον έλεγχο αυτού του ενδεχόμενου, οι ερευνητές συνήθως περιλαμβάνουν μια πρόσθετη ομάδα ελέγχου ζώων σε μια μελέτη βλάβης, στην οποία προκαλούν μια **εικονική βλάβη**. Στην εικονική επέμβαση οι ερευνητές αναισθητοποιούν το ζώο, εισάγουν το ηλεκτρόδιο ή την κάνουλα στον εγκέφαλο και το κατεβάζουν στο κατάλληλο βάθος, στις συντεταγμένες της πραγματικής επέμβασης. Με άλλα λόγια, κάνουν ό,τι θα έκαναν για την παραγωγή της βλάβης, εκτός από το να ενεργοποιήσουν τη συσκευή παραγωγής βλαβών ή να ξεκινήσουν την έγχυση. Αυτή η ομάδα ζώων χρησιμεύει ως ομάδα ελέγχου εικονικής επέμβασης.

Εάν η συμπεριφορά των ζώων με την εγκεφαλική βλάβη διαφέρει από εκείνη των ζώων της ομάδας ελέγχου εικονικής επέμβασης, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η στοχευμένη βλάβη προκάλεσε τα συμπεριφορικά ελλείμματα (μια εικονική βλάβη εξυπηρετεί τον ίδιο σκοπό με το εικονικό φάρμακο σε μια φαρμακολογική μελέτη).

Τις περισσότερες φορές οι ερευνητές παράγουν μόνιμες εγκεφαλικές βλάβες, αλλά μερικές φορές είναι επωφελές να διαταραχθεί η δραστηριότητα μιας συγκεκριμένης περιοχής του εγκεφάλου μόνο προσωρινά. Ο ευκολότερος τρόπος για να γίνει αυτό είναι η έγχυση ενός τοπικού αναισθητικού ή ενός φαρμάκου που ονομάζεται *μουσκιμόλη* στο κατάλληλο τμήμα του εγκεφάλου. Το αναισθητικό

μπλοκάρει τα δυναμικά ενέργειας στους άξονες που εισέρχονται ή εξέρχονται από τη συγκεκριμένη περιοχή και ουσιαστικά προκαλεί μια προσωρινή βλάβη (που συνήθως ονομάζεται *αναστρέψιμη εγκεφαλική βλάβη*). Η μουσκιμόλη, ένα φάρμακο που διεγείρει τους υποδοχείς GABA, αδρανοποιεί μια περιοχή του εγκεφάλου αναστέλλοντας τους νευρώνες που βρίσκονται εκεί (υπενθυμίζουμε ότι το GABA είναι ένας σημαντικός ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής στον εγκέφαλο). Μια άλλη τεχνική, η οπτογενετική, μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την προσωρινή αναστολή ή, σε ορισμένες περιπτώσεις τη διέγερση, περιοχών του εγκεφάλου. Θα διαβάσετε περισσότερα για αυτήν την τεχνική αργότερα στο κεφάλαιο.

## Στερεοταξική Χειρουργική

### ΜΣ 5.3: Περιγράψτε τη διαδικασία της στερεοταξικής χειρουργικής

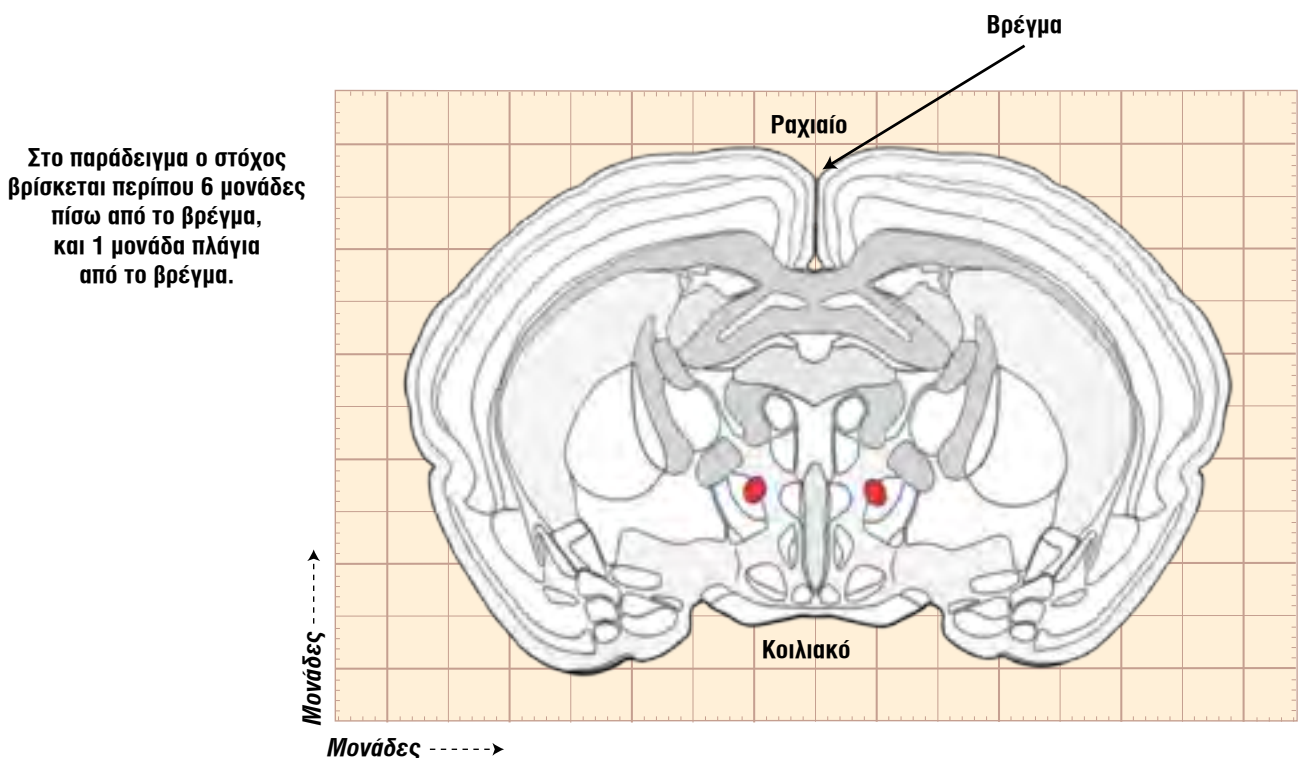
Πώς τοποθετούν οι ερευνητές ένα ηλεκτρόδιο ή μια κάνουλα σε μια ακριβή θέση στα βάθη του εγκεφάλου ενός ζώου; Η απάντηση είναι η **στερεοταξική χειρουργική**. Η *στερεοταξία* αναφέρεται στην ικανότητα εντοπισμού σημείων στο χώρο. Μια στερεοταξική συσκευή περιέχει μια βάση που κρατά το κεφάλι του ζώου σε μια συγκεκριμένη θέση και έναν βραχίονα που μετακινεί ένα ηλεκτρόδιο ή μια κάνουλα μέσω μετρημένων αποστάσεων και στους τρεις άξονες στο χώρο. Ωστόσο, για να εκτελέσει μια στερεοταξική χειρουργική επέμβαση, ο ερευνητής πρέπει πρώτα να συμβουλευτεί ένα *στερεοταξικό άτλαντα*.

**Ο ΣΤΕΡΕΟΤΑΞΙΚΟΣ ΑΤΛΑΣ** Ένας **στερεοταξικός άτλας** είναι ένα βιβλίο, ένας δικτυακός τόπος ή ένα λογισμικό που περιέχει εικόνες οι οποίες αντιστοιχούν σε μετωπιαίες τομές του εγκεφάλου που έχουν ληφθεί σε διάφορες αποστάσεις πρόσθια και οπίσθια του βρέγματος. Το κρανίο αποτελείται από διάφορα οστά που ενώνονται μεταξύ τους κατά την ανάπτυξη και σχηματίζουν *ραφές*. Τα κεφάλια των βρεφών περιέχουν ένα μαλακό σημείο στη συμβολή των μετωπιαίων και των οβελιαίων ραφών, που ονομάζεται *κρανιακή πηγή*. Όταν κλείσει αυτό το κενό, η ένωση ονομάζεται βρέγμα (από την ελληνική λέξη που σημαίνει «μπροστινό μέρος του κεφαλιού»). Οι εγκέφαλοι δύο ζώων ενός συγκεκριμένου είδους δεν είναι

ποτέ εντελώς πανομοιότυποι, αλλά υπάρχει αρκετή ομοιότητα μεταξύ των ατόμων ώστε να μπορεί να προβλεφθεί η θέση συγκεκριμένων εγκεφαλικών δομών σε σχέση με τα εξωτερικά χαρακτηριστικά του κρανίου. Μπορούμε να εντοπίσουμε το βρέγμα και στο κρανίο ενός αρουραίου και αποτελεί χρήσιμο σημείο αναφοράς. Η Εικόνα 5.2 είναι το σχήμα μιας τομής του εγκεφάλου που περιέχει μια εγκεφαλική δομή (με κόκκινο χρώμα) η οποία μας ενδιαφέρει. Αν θέλουμε να τοποθετήσουμε την άκρη ενός σύρματος σε αυτή τη δομή (μια δέσμη αξόνων που ονομάζεται ψαλίδα), θα πρέπει να ανοίξουμε μια τρύπα στο κρανίο ακριβώς πάνω από αυτήν. Κάθε εικόνα του στερεοταξικού άτλαντα αναγράφει μια ένδειξη της απόστασης της τομής προσθίως ή οπισθίως του βρέγματος. Το πλέγμα σε κάθε εικόνα δείχνει τις αποστάσεις των εγκεφαλικών δομών κοιλιακά της κορυφής του κρανίου και πλευρικά της μέσης γραμμής. Για να τοποθετήσει την άκρη ενός σύρματος στην ψαλίδα, ο ερευνητής θα άνοιγε μια οπή πάνω από το στόχο και στη συνέχεια θα κατέβαζε το ηλεκτρόδιο μέσω της οπής μέχρι η άκρη να βρεθεί

στο σωστό βάθος, ανάλογα με το ύψος του κρανίου στο σημείο του βρέγματος. Βρίσκοντας μια δομή του εγκεφάλου (η οποία δεν φαίνεται από το εξωτερικό του κρανίου) σε μία από τις εικόνες του στερεοταξικού άτλαντα, ο ερευνητής μπορεί να προσδιορίσει τη θέση της δομής σε σχέση με το βρέγμα (το οποίο φαίνεται στο εξωτερικό του κρανίου). Λόγω των παραλλαγών σε διάφορα είδη και ηλικίες των ζώων, ο άτλαντας δίνει μόνο μια κατά προσέγγιση θέση. Οι ερευνητές πρέπει πάντα να δοκιμάζουν ένα νέο σύνολο συντεταγμένων, να κόβουν τομές του εγκεφάλου τις οποίες κατόπιν θα χρωματίσουν, να διαπιστώνουν την πραγματική θέση της βλάβης, να διορθώνουν τις συντεταγμένες τους και να προσπαθούν ξανά (ο τεμαχισμός και η χρώση του εγκεφάλου περιγράφονται αργότερα).

**Η ΣΤΕΡΕΟΤΑΞΙΚΗ ΣΥΣΚΕΥΗ** Η στερεοταξική συσκευή είναι μια συσκευή που περιλαμβάνει ένα στήριγμα κεφαλής, το οποίο διατηρεί το κρανίο του ζώου στον κατάλληλο προσανατολισμό, ένα στήριγμα για ένα ηλεκτρόδιο ή μια κάνουλα και



**ΕΙΚΟΝΑ 5-2 Στερεοταξικός άτλανς** Αυτή η εικόνα είναι παράδειγμα σελίδας ενός στερεοταξικού άτλαντα του εγκεφάλου αρουραίου. Δείχνει τον στόχο (την ψαλίδα) με κόκκινο χρώμα. Οι μονάδες έχουν αφαιρεθεί για λόγους σαφήνειας.

Πηγή: (1992): Προσαρμογή από Swanson, L. W. *Χάρτες εγκεφάλου: Δομή του εγκεφάλου αρουραίου*. Νέα Υόρκη: Elsevier

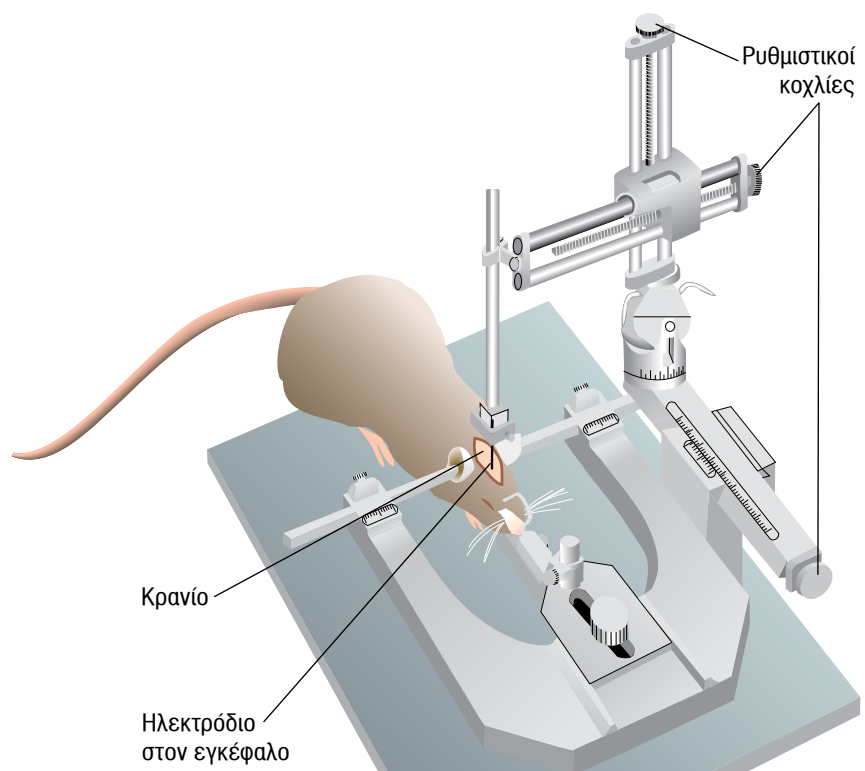
έναν διαβαθμισμένο μηχανισμό που μετακινεί το στήριγμα του ηλεκτροδίου / κάνουλας σε μετρήσιμες αποστάσεις κατά μήκος των τριών αξόνων: πρόσθιο-οπίσθιο, ραχιαίο-κοιλιακό και πλάγιο-μέσο. Στην Εικόνα 5.3 απεικονίζεται μια στερεοταξική συσκευή σχεδιασμένη για μικρά ζώα. Το μέγεθος της στερεοταξικής συσκευής μπορεί να αυξηθεί ή να μειωθεί ώστε να χρησιμοποιηθεί για διαφορετικά είδη.

Μόλις ο ερευνητής πάρει τις συντεταγμένες από το στερεοταξικό άτλαντα, αναισθητοποιεί το ζώο, το τοποθετεί στη συσκευή και ανοίγει το κρανίο. Ο ερευνητής θα εντοπίσει το βρέγμα, θα εισάγει τους κατάλληλους αριθμούς στη στερεοταξική συσκευή, θα ανοίξει μια τρύπα στο κρανίο και θα κατεβάσει τη συσκευή στον εγκέφαλο κατά το σωστό μήκος. Τώρα η άκρη της κάνουλας ή του ηλεκτροδίου βρίσκεται εκεί που θέλει ο ερευνητής να είναι και ο ερευνητής είναι έτοιμος να προκαλέσει τη βλάβη.

Η στερεοταξική χειρουργική μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για άλλους σκοπούς εκτός από την παραγωγή πειραματικών βλαβών. Τα ηλεκτρόδια που τοποθετούνται στον εγκέφαλο μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διέγερση των νευρώνων όπως και για την καταστροφή τους, και μπορούν να χορηγηθούν φάρμακα που διεγείρουν τους

νευρώνες ή μπλοκάρουν συγκεκριμένους υποδοχείς. Ένας ερευνητής μπορεί να τοποθετήσει μόνιμες κάνουλες ή ηλεκτρόδια ακολουθώντας μια διαδικασία που θα περιγραφεί στη συνέχεια. Σε όλες τις περιπτώσεις, μόλις ολοκληρωθεί η χειρουργική επέμβαση, η τομή του τριχωτού της κεφαλής ράβεται και το ζώο βγαίνει από τη στερεοταξική συσκευή και αφήνεται να συνέλθει από το αναισθητικό.

Στερεοταξικές συσκευές κατασκευάζονται επίσης για ανθρώπους. Μερικές φορές ένας νευροχειρουργός μπορεί να προκαλέσει υποφλοιώδεις βλάβες, για παράδειγμα για να μειώσει τα συμπτώματα της νόσου του Parkinson, μια θεραπεία που θα συναντήσετε στο Κεφάλαιο 16. Συνήθως, ο χειρουργός χρησιμοποιεί πολλαπλά ορόσημα και επαληθεύει τη θέση του ηλεκτροδίου (ή άλλης συσκευής) που εισάγεται στον εγκέφαλο, κάνοντας εγκεφαλικές σαρώσεις ή καταγράφοντας τη δραστηριότητα των νευρώνων στην περιοχή-στόχο, προτού παράγει την εγκεφαλική βλάβη. Η εν τω βάθει εγκεφαλική διέγερση είναι μια άλλη διαδικασία που απαιτεί τη χρήση στερεοταξικής συσκευής. Η βαθιά εγκεφαλική διέγερση χρησιμοποιείται για τη θεραπεία καταστάσεων που περιλαμβάνουν χρόνιο πόνο, κινητικές διαταραχές (περιλαμβανομένης της νόσου του Parkinson),



**ΕΙΚΟΝΑ 5-3 Στερεοταξική συσκευή** Αυτή η συσκευή χρησιμοποιείται για την εκτέλεση χειρουργικών επεμβάσεων στον εγκέφαλο αρουραίων ή ποντικών.

επιληψία, κατάθλιψη και ψυχαναγκαστική διαταραχή. Η βαθιά εγκεφαλική διέγερση χρησιμοποιεί μια στερεοταξική συσκευή για την εμφύτευση ενός μόνιμου ηλεκτροδίου στον εγκέφαλο των ασθενών (βλ. Εικόνα 5.4). Αντί να προκληθεί βλάβη, το ηλεκτρικό ρεύμα που διέρχεται από το ηλεκτρόδιο χρησιμοποιείται για τη διέγερση περιοχών του εγκεφάλου και τη μείωση των συμπτωμάτων (Holtzheimer & Mayberg, 2011a, Sarem-Aslani & Mullett, 2011). Οι εφαρμογές αυτής της μεθόδου συνεχίζουν να διευρύνονται (για σύντομη παρουσίαση βλ. Deeb et al., 2016, Hariz, 2014).

### Ιστολογικές Μέθοδοι

#### **ΜΣ 5.4: Συνοψίστε τα στάδια των ιστολογικών μεθόδων**

Μετά την παραγωγή μιας εγκεφαλικής βλάβης και την παρατήρηση των επιπτώσεών της στη συμπεριφορά ενός ζώου, οι ερευνητές πρέπει να κόψουν λεπτές φέτες και να χρώσουν τον εγκέφαλο, ώστε να μπορούν να τον παρατηρήσουν στο μικροσκόπιο και να διαπιστώσουν τη θέση της βλάβης. Η εγκεφαλική βλάβη μπορεί να αστοχήσει, οπότε οι ερευνητές πρέπει να επαληθεύσουν την ακριβή θέση της αφού ελέγξουν το ζώο συμπεριφορικά. Για να γίνει αυτό, οι ιστολόγοι (ειδικοί σε αυτές τις τεχνικές) πρέπει να σταθεροποιήσουν, να τεμαχίσουν, να χρώσουν και να εξετάσουν τον εγκέφαλο. Συνολικά, αυτές οι διαδικασίες αναφέρονται ως ιστολογικές μέθοδοι (το πρόθεμα ιστο- αναφέρεται στον σωματικό ιστό).

**ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΛΗΨΗ ΤΟΜΩΝ** Για να μελετηθεί ο εγκεφαλικός ιστός, πρέπει να προστατευθεί από τα αυτολυτικά ένζυμα (αυτολυτικό σημαίνει «αυτοδιαλυόμενος»), τα οποία διαφορετικά θα διασπάρουν τον ιστό, καθιστώντας τη μελέτη του αδύνατη. Ο ιστός πρέπει επίσης να συντηρηθεί για να αποτραπεί η αποσύνθεσή του από βακτήρια ή μύκητες. Για να επιτευχθούν και οι δύο αυτοί στόχοι, ο νευρικός ιστός τοποθετείται σε ένα **σταθεροποιητικό**. Ο σταθεροποιητής που χρησιμοποιείται συνήθως είναι η **φορμόλη** ή η **παραφορμαλδεΰδη**, που είναι υδατικά διαλύματα φορμαλδεΰδης, ενός αερίου. Οι σταθεροποιητές διασυνδέουν τις πρωτεΐνες για να ενισχύσουν τον πολύ μαλακό και εύθραυστο εγκεφαλικό ιστό και να σκοτώσουν τυχόν μικροοργανισμούς που θα μπορούσαν να τον καταστρέψουν.

Πριν από τη σταθεροποίηση του εγκεφάλου (δηλαδή πριν από την τοποθέτησή του σε σταθεροποιητικό διάλυμα), ο εγκέφαλος συνήθως διηθείται. Η **διήθηση** των ιστών συνεπάγεται την αφαίρεση του αίματος και την αντικατάστασή του με άλλο υγρό. Ο εγκέφαλος του ζώου αφαιμάσσεται, επειδή επιτυγχάνονται καλύτερα ιστολογικά αποτελέσματα όταν δεν υπάρχει αίμα στον ιστό. Το ζώο του οποίου ο εγκέφαλος πρόκειται να μελετηθεί θανατώνεται με ανθρωπιστικό τρόπο, με υπερβολική δόση γενικού αναισθητικού. Το αίμα αφαιρείται από τα αγγεία και αντικαθίσταται με αραιό διάλυμα άλατος. Τέλος, ένα αραιό σταθεροποιητικό διάλυμα διοχετεύεται μέσω του ιστού και ο εγκέφαλος αφαιρείται από το κρανίο και τοποθετείται σε δοχείο γεμάτο με το σταθεροποιητή.

Αφού ο εγκέφαλος σταθεροποιηθεί ή μονιμοποιηθεί, πρέπει να τεμαχιστεί σε λεπτές τομές και να χρωστεί για διάφορες κυτταρικές δομές, προκειμένου να γίνουν εμφανείς οι ανατομικές λεπτομέρειες. Ο τεμαχισμός γίνεται με μικροτόμο ή με κρουστάτη. Ένας **μικροτόμος** περιέχει τρία μέρη: μια λεπίδα, μια πλάκα πάνω στην οποία τοποθετείται ο ιστός και έναν μηχανισμό που προωθεί τη λεπίδα (ή την πλάκα) στη σωστή απόσταση μετά από κάθε τομή, ώστε να μπορεί να κοπεί η επόμενη τομή. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η πλάκα περιλαμβάνει ένα εξάρτημα που καταψύχει τον εγκέφαλο για να τον κάνει αρκετά σκληρό ώστε να μπορεί να κοπεί σε λεπτές τομές. Η Εικό-



**ΕΙΚΟΝΑ 5-4** Στερεοταξική συσκευή σε ασθενή