

역방향 전위기록을 이용한 해마조직편 허혈손상의 평가

고려대학교 구로병원 신경외과학교실

김재학 · 권택현 · 정흥섭 · 박윤관

Evaluating the Extent of Ischemic Insult on Hippocampal Slices by Using Antidromic Recordings

Jay-Hark Kim, MD, Taek-Hyun Kwon, MD, Heung-Seob Chung, MD and Youn-Kwan Park, MD

Department of Neurosurgery, Korea University Guro Hospital, Seoul, Korea

Objective: Energy failure and concurrent electrical silence are common features of oxygen-glucose deprivation (OGD) in the brain. Hippocampal slice has been used extensively to study electrophysiological alterations. Orthodromic extra-cellular field potential recording has been most widely chosen for those studies however there were few with antidromic recording. The goal of this study is to clarify which types of recordings is better for the evaluation of extent of ischemic insults. **Methods:** Rat hippocampal slices were made for the orthodromically and antidromically evoked field potential recording. Before, during and after 6 to 11 minutes of experimental OGD, the authors measured population spike amplitude and slope of field excitatory postsynaptic potential (fEPSP). **Results:** A dramatic reduction of amplitude and total disappearance of orthodromic population spike (oPS) noted 1.1 \pm 0.2 min after OGD onset. On the contrary antidromic population spike (aPS) was not affected at the beginning. It slowly and gradually diminished and finally disappeared 6.6 \pm 0.2 min after OGD onset. A transient recovery of oPS, so called hypoxic injury potentials (HIP) briefly occurred just before the total disappearance of aPS and the both signals disappeared simultaneously. Incomplete recovery due to irreversible damage began 7 min after OGD onset. There was no recovery 10 min after OGD, 7 min after oPS loss and 2 min after aPS loss. The OGD experiments with various neuroprotective agents (MK 801, AP-5, lidocaine, CNQX, adenosine) lasted for longer than 2 min after aPS disappearance sensitively showed their efficacy. **Conclusion:** These results show that observation for aPS after OGD provides more accurate timing of irreversible damage than those for oPS data or for the duration of OGD. (J Kor Neurotraumatol Soc 2011;7:1-7)

KEY WORDS: Antidromic recording · Orthodromic recording · Oxygen glucose deprivation · Hippocampal slice preparation.

서론

허혈 및 저산소 손상은 가장 흔한 형태의 중추신경계 손상으로 고령화 사회로 이행되면서 더욱 큰 경제 사회적 인 주목을 받고 있다. 신경세포의 높은 산소 및 에너지 요

구량과 매우 한정된 에너지원으로 유사시 급속히 침해되는 세포 내 이온 항상성과 함께, 흥분성 신경독성, 세포 내 칼슘유입, 세포막의 지질과산화 등의 다양한 경로로 괴사 및 자멸사의 과정에 돌입된다.²²⁾ 이에 따라 신경손상의 정도를 정량하는 방법도 대상물의 상태, 확인하고자 하는 병태 생리 및 시기에 따라 매우 다양하게 사용되고 있다. 조직편을 이용한 연구에서는 동결편 및 고정편을 통한 염색, 광학스캔 및 이미지 분석 등의 형태학적인 방법,^{6,15,19-21)} 효소 및 약물을 이용하는 생화학적인 방법¹⁸⁾과 함께 신경 생리학적인 방법¹⁾ 등이 사용되고 있으며 후자는 실시간으로 세포손상을 확인할 수 있어 많이 이용되는 방법이다.

Received: March 28, 2011 / **Revised:** March 29, 2011

Accepted: April 13, 2011

Address for correspondence: Youn-Kwan Park, MD
Department of Neurosurgery, Korea University Guro Hospital,
97 Gurodong-gil, Guro-gu, Seoul 152-703, Korea
Tel: +82-2-2626-1178, Fax: +82-2-863-1684
E-mail: ykapa76@yahoo.co.kr

전기생리학적인 유발전위의 측정은 급성기의 손상에서 널리 사용되고 있는 신경생리학적 방법으로 정방향 군집전위(orthodromic population spike: oPS)와 흥분성 시냅스후 전위(excitatory postsynaptic potential: EPSP)를 측정하는 방법이 보편적이고 우수하다고 하나²³⁾ 허혈 및 저산소 손상의 정도를 정량하기에는 몇 가지 문제점을 가지고 있다. 첫째로는, 모든 정방향의 전위는 시냅스 전도를 통하여 일어나므로 이의 변조를 유발하는 일련의 과정에 의해 영향을 받는다. 둘째로는 시냅스후 돌기세포(dendrites)에서 여러 수용체 및 이온 통로의 작용에 의해 신호의 취합(signal integration) 과정을 통한 조정을 받는다. 대표적인 예로는 에너지 결핍에 따른 adenosine 증가에 따른 초기 시냅스억제 현상(hypoxic synaptic depression)과 저산소후 반발성 과흥분상태(posthypoxic rebound hyperexcitability) 등이 이 두 가지 조정현상에 의해 발생되고 있다.¹²⁾ 셋째로는 시냅스억제 상태에서 일시적으로 전위가 회복되는 현상(hypoxic injury potential: HIP)¹¹⁾이 최종 탈분극(terminal depolarization)과 세포사 직전에 나타나기도 하며 정확한 원인은 아직까지 알려져 있지 않다. 이런 현상들은 정방향 전위가 매우 우수함에도, 실제적인 신경손상을 평가하는 데 문제점으로 남아있게 하였다.

역방향 군집전위(antidromic population spike: aPS)는 축삭에서 신경체(soma)로 역방향으로 진행되는 자극으로 유발되며, 시냅스와 돌기세포의 조정을 거치지 않아 탈분극이 효과적으로 전달되고 활성전위의 분할가능성이 높게 유지된다고 알려져 있다.¹⁷⁾ 그러나 aPS의 측정에 의한 저산소 및 허혈손상의 정량은 이론적 우수성에 비하여 보고례가 적어^{2,4,7)} 이를 깊이 이해하고자 본 실험을 고안하였으며, 약물실험을 통하여 비교하였다.

대상 및 방법

해마 조직편의 제작

모든 실험은 백서(4~6주, 100~150 그램 중량, Sprague-Dawley rat)를 이용하였다. 실험동물은 에테르를 이용하여 전신마취한 후 단두하였고 신속히 뇌를 적출한 후 4℃ 표준 인공뇌척수액에 해마를 분리하였다. 해마를 septotemporal axis에 직각이 되도록 MacIwaine chopper를 이용하여 450 μ M의 두께로 절편을 만들었다. 사용전의 절편은 30 \pm 1℃의 표준 인공뇌척수액에서 배양하였다. 표준 인공 뇌척수액의 구성은 다음과 같았으며 (NaCl 130 mM, KCl 3.5 mM, NaH₂PO₄ 1.24 mM, MgSO₄

1.2 mM, CaCl₂ 2.4 mM, NaHCO₃ 24 mM, D-glucose 10 mM) 여기에 95% 산소/5% 이산화탄소를 환기하여 pH 7.4 \pm 0.05를 유지하였다.

세포외 전기생리학적 측정

해마 조직편을 약 90분간 배양 후 용적이 1 mL 이하인 기록조(submerging chamber)로 옮겼다. 기록조 안에서는 산소가 환기되고 30 \pm 1℃가 유지되는 표준 인공뇌척수액이 분당 3 mL의 속도로 관류되게 유지시켰다. 세포외 기록용 미세유리관은 150 mM NaCl로 채운 후 1~10 M Ω 의 저항을 유지하였다. 세포외 유발 군집전위는 Schaffer collaterals/commissural pathway을 전기적으로 자극하여 CA1영역의 stratum pyramidale과 stratum radiatum 각각에 같은 저항을 가진 미세유리관을 위치하여 기록하였다 (Figure 1). 이때 얻어진 유발전위는 증폭 및 여과 (P511, Grass) 후에 Digidata 1,200을 이용하여 개인 컴퓨터와 연결하여 저장하였다. 양극성 플라티늄-이리듐 전기침 (25 μ m 직경)을 이용하여 50 μ sec 동안 0.05 Hz의 빈도로 가하였으며 정방향의 군집전위는 stratum radiatum에 위치시킨 전극을 최대 유발전위의 절반이 나오도록 강도를 조정하여 전 실험 기간 동안 일정하게 유지하였다. 정방향의 fEPSP가 상대적으로 큰 군집전위에 의해 일정 정도 영향을 받을 수 있으므로 자극용 전극을 한 개 반대편의 stratum radiatum에 위치시켜 군집전위를 발생시키지 않을 정도 (subpopulation level)로 자극을 주었다. 이때 자극용 전극과 기록용 미세유리관의 거리는 약 500 μ m 정도 유지하였다. 역방향의 군집전위는 자극용 전극을 CA1방향의 stratum alveus에 위치시켜서 신경의 축삭을 자극한 후 측정하였고 최대 유발전위의 절반이 나오도록 강도를 조정하였다. 안정된 상태에서 군집전위

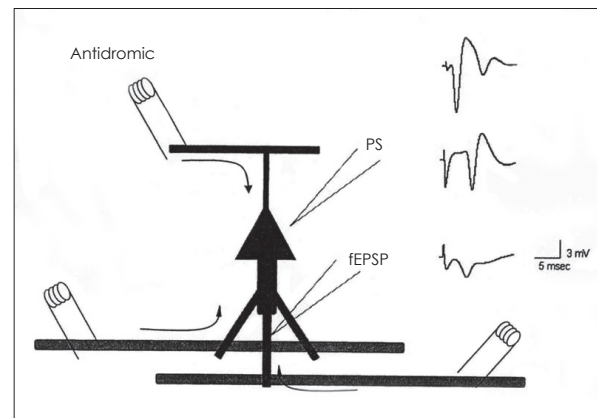


FIGURE 1. Schematic drawing showing the experimental setup for the electrophysiological recordings from CA1 hippocampus.

가 3 mV 이상인 경우에만 실험에 이용하였으며, 조직편은 30분간의 안정전위(baseline recording)를 측정하였다.

허혈 상태의 유발

30분간의 안정전위 측정 후에 표준 인공뇌척수액의 glucose를 동일한 농도의 sucrose로 대체하고 95% 질소/5% 이산화탄소를 환기하여 관류함으로써 허혈(oxygen glucose deprivation: OGD) 상태를 유발하였으며 6~12분 이후 다시 표준 인공뇌척수액을 30분간 관류하여 회복시켰다.

Pharmacological manipulations

실험에 사용된 adenosine, dizocilpine maleate (MK-801), 2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP-5), lidocaine, 6-cyano-7-nitroquinoxalin-2, 3-dione (CNQX)는 Sigma Chemical Co.에서 구입하였다. 각각의 약제들을 표준 인공뇌척수액에 희석 전에 증류수, ethanol 혹은 DMSO에 녹인 후에 사용하였고 사용된 ethanol 혹은 DMSO의 최종 농도는 0.05% 미만으로 조절하였다.

Data analyses and statistics

얻어진 모든 데이터는 평균±표준오차로 표시하였으며, 각 실험군 간의 비교는 t-test를 이용하였고 *p*-value가 0.05 이하인 경우에만 통계적으로 유의한 차이로 판정하였다.

결 과

허혈(OGD)시간에 따른 군집전위의 회복률 측정

6분에서 12분까지 다양한 시간의 OGD후 oPS 및 aPS의 회복을 측정하였으며 그 결과는 서로 유사하였다. Figure 2에서 보는 바와 같이 6분간의 OGD에는 모든 조직편이 회복되었고 11분 이상에서는 모두 소실되어 회복되지 못하였다. 7~10분 사이는 경계선상의 구간으로 PS의 회복은 평균적으로 OGD의 시간이 경과함에 따라 감소하는 경향을 보였으나 그 편차는 심하였다. oPS는 OGD후 평균 1.1+/-0.2 분에 급격히 소실되었으며 aPS는 6.6+/-0.2 분에 소실되었다.

8분간의 OGD후 발생하는 HIP의 발생시간, 최고치 및 지속시간과 회복률과의 관계를 관찰하여 본 결과 회복률과 지속시간과의 연관성이 관찰되었고 1분 이하의 짧은 지속시간을 보이는 조직편의 회복률이 1분 이상의 지속된 것에 비하여 뚜렷하게 낮았다 (88% vs. 3.8%)(Figure 3A).

위의 실험 결과를 oPS와 aPS가 소실된 시점 이후 OGD

가 지속된 시간에 따른 PS의 회복의 관점에서 관찰해 보았다. 그 결과 oPS가 소실되고 OGD 지속시간이 5분 이상 진행되면서 손상이 가중되어 7분 이후에는 완전 소실되는 양상을 보였고 aPS 소실된 이후 OGD 지속시간이 1분 이내일 때까지는 완전 회복의 구간으로 나타났고 2분 이후의 구간은 완전 소멸의 구간으로 나타났으며 1~2분 사이의 짧은 구간에서 신경손상의 정도가 결정되는 양상을 보여 (n=53) aPS의 소실의 시점이 비가역적 손상에 임박함을 보여주었다 (Figure 3B, C).

약물처치의 결과

신경보호 기능을 갖는 약물들로 알려진 비경쟁적 NMDA 수용체 차단제인 MK-801, AP-5, Na⁺⁺ 이온통로 차단제인 lidocaine, AMPA 수용체 차단제인 CNQX 및 Adenosine을 투여하고 9분간의 OGD에서의 신경보호효과를 전술한 방법으로 확인하였다. oPS 및 aPS의 측정에서 대조군과 비교하여 30 uM adenosine과 25 uM AP-5는 모두 효과가 없었으며, 20 uM의 MK 801, 40 uM의 lidocaine은 모두 효과를 보였으나 20 uM의 lidocaine

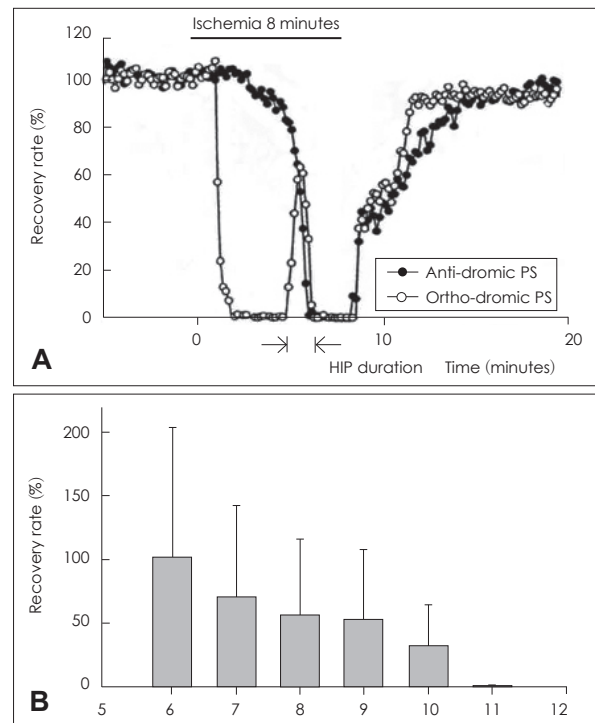


FIGURE 2. A: Graph showing a representative tracing of ortho-dromic (open circle, oPS) and anti-dromic (filled circle, aPS) population spikes before, during and after 8 minutes of oxygen-glucose deprivation. The depression of oPS noted first and a transient recovery was followed immediately before the complete disappearance of aPS. B: Bar graph showing the relationship between the total duration of ischemia and the sequential recovery of oPS.

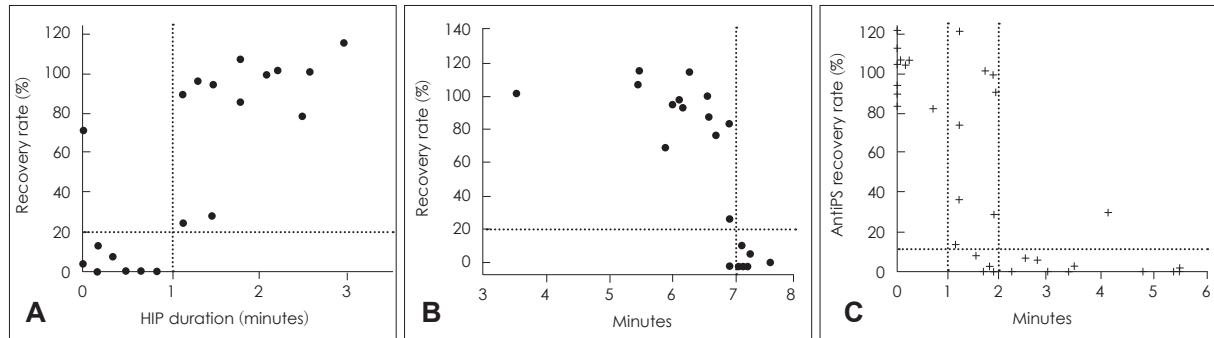


FIGURE 3. A: Scatter graph showing the relationship between the duration of hypoxic injury potential and the recovery of aPS. The experimental conditions that limit HIP duration to less than 1 minutes elicited poor recovery. B: Scatter graph showing the relationship between the duration of ischemia after the initial depression of oPS and the recovery of aPS. C: Scatter graph showing the relationship between the duration of ischemia lasting later the depression of aPS and the recovery of aPS.

TABLE 1. Result of two different recordings obtained from the same 9 min of ischemia experiments. All the agents shown to be effective in oPS recordings (20 μ M MK-801, 40 μ M Lidocaine) are also effective in aPS recording. In addition, those without effect in oPS recording (20 μ M Lidocaine and 10 μ M CNQX) are much clearer in aPS recording

	Antidromic PS (Means SEMs)	<i>p</i> value	Orthodromic PS (Means SEMs)	<i>p</i> value
Control (n=20)	54.05 \pm 10.03		40.89 \pm 10.35	
AP-5 25 μ M (n=3)	40.96 \pm 12.37	0.71	40.92 \pm 13.79	0.99
Adenosine 30 μ M (n=12)	49.81 \pm 10.84	0.78	44.52 \pm 12.71	0.82
MK 20 μ M (n=6)	97.66 \pm 4.53	0.028*	103.76 \pm 4.14	0.003*
Lidocaine 20 μ M (n=10)	89.14 \pm 3.52	0.022*	71.77 \pm 12.43	0.08
Lidocaine 40 μ M (n=12)	84.90 \pm 9.6	0.048*	77.11 \pm 8.85	0.022*
CNQX 10 μ M (n=10)	86.00 \pm 3.58	0.036*	59.19 \pm 10.11	0.27

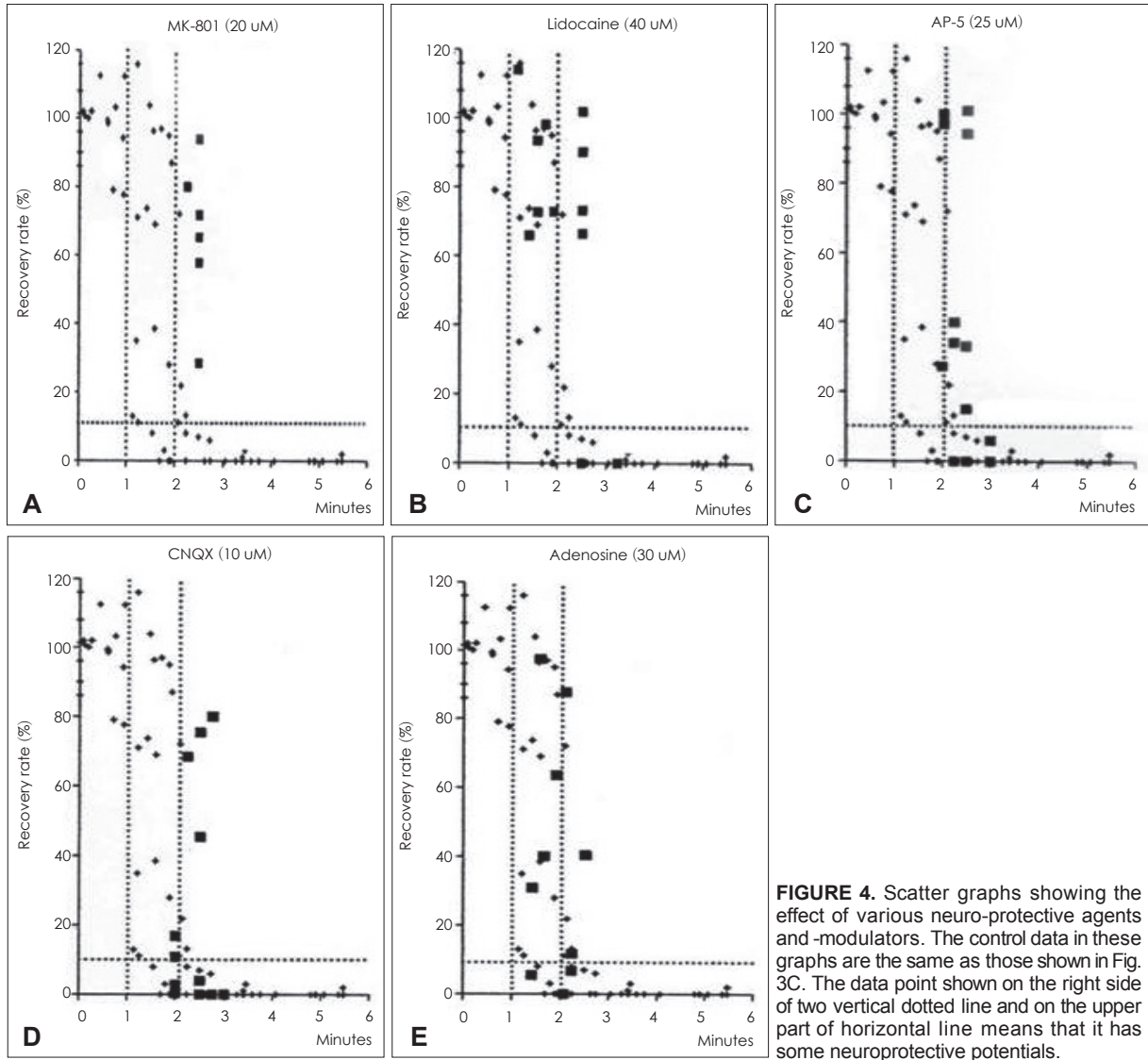
과 10 μ M의 CNQX는 aPS의 측정에서만 유의하게 높아 aPS의 측정이 민감도에서 우수하였다 (Table 1).

aPS가 소실된 이후 OGD 지속 시간을 1~3분으로 임의로 조정하고 이에 따른 PS의 회복률을 투여 약물에 따라 관찰하여 약물처리 하지 않은 대조군과 비교하여 관찰하였다 (Figure 4). 그림에서와 같이 대조군은 aPS 소실 2분 이후까지 진행된 OGD에서는 신호 회복이 없었으나 20 μ M의 MK 801, 40 μ M의 lidocaine은 aPS의 뚜렷한 회복을 보였으며 25 μ M AP-5과 10 μ M의 CNQX는 2분 이후의 OGD에서 회복이 양분되어 부분적으로 효과가 있는 것으로 판단되었고 30 μ M adenosine은 효과가 거의 없는 것으로 나타났다.

고 찰

허혈로 인한 신경세포 손상의 정도를 측정하는 전기생리학적인 방법에는 세포 외적인 방법으로 시냅스전 볼리, fEPSP, 정방향 군집전위, 역방향 군집전위 측정과 세포내 측정이 있다. 세포내 측정은 OGD에 의해 유발된 탈분극 과정에서의 이온변화를 빠르게 확인할 수 있지만, 신경세포막에 삽입된 미세전극과 세포막 사이의 전기적인 저

항이 시간에 따라 감소하여 부정확하여지고 단일세포의 활동전위 여부로 전체의 기능회복을 판단하기에는 부적절하다는 단점이 있다. 세포 외적인 측정인 군집전위는 막전위 평가에는 어려움이 있지만, 주변 신경세포 및 돌기에서 유출 혹은 유입되는 이온의 합을 반영하므로⁵⁾ 전체적인 평가에 매우 유리하다. Andersen 등²⁾에 의해 해마를 이용한 정방향 전위와 역방향 전위를 통한 신경손상의 정량이 시도되었으며, Cherubini와 Padjen⁵⁾에 의해 신경체(soma)와 수초돌기세포의 fEPSP, 군집전위(oPS)를 동시 측정하는 방법이 고안되었다. 시냅스전 볼리(presynaptic volley)는 시냅스전 유입(afferent) 신경섬유의 compound action potential로 시냅스에 영향을 받지 않으며,³⁾ fEPSP는 유입자극이 시냅스를 가로 질러 피라미드세포 돌기세포를 지날 때 얻어지고, 정방향 군집전위는 자극이 피라미드 세포군에 이를 때 얻어진다. 흥분성 시냅스전도의 효율은 유입된 자극의 크기에 따른 유출된 전위의 크기로 표현되며 시냅스전 볼리와 정방향 전위들을 측정함으로써 정량적으로 가능해 졌다.⁷⁾ 역방향 군집전위는 피라미드세포의 축삭(axon)에서 국소적인 자극을 주었을 때 반대방향으로 측정되며, 정방향 전위와 반대되는 방향을 따라 측정되는 세포막 전위를 표현한다. Shinskaia²³⁾는 정방



향, 역방향 군집전위의 진폭이 신경세포의 반응성을 가늠하는 열쇠라고 기술하였으며, cAMP가 시냅스전달과정에 매우 중요한 역할을 한다고 하였다. Jester 등¹³⁾은 정방향 군집전위나 fEPSP와 비교하여 역방향 군집전위가 효과적인 탈분극과 활성전위형성을 일으키는 것으로 보고했다. Niiyama 등¹⁷⁾은 이온활성(ionotropic) 글루타메이트 수용체 길항제가 존재할 때 시냅스전 볼리와 흥분성 시냅스 후 전위(EPSP)가 소실되기 때문에 약물의 신경보호 효과를 검증할 때 효과적인 것이라고 예상하였다. 세포외 흥분성 시냅스 전도의 측정에서 정방향 군집전위의보다 시냅스전 볼리(presynaptic volley: PV)나 역방향 전위의 측정이 우월하며,⁴⁾ 약물의 효과를 관찰하기 위해서는 oPS보다 PV나 돌기세포에서의 취합을 거치지 않는 EPSP를 측정하는 것이 합리적인 방법이다.^{2,7)} 본 실험에서도 전체적으

로 정방향 군집전위는 fEPSP과 유사한 양상으로 변화하였고, 세포막 기능만을 대표하는 시냅스전 볼리와 역방향 전위는 같은 모양으로 변화하였는데 측정된 전위의 크기에 있어 10배 가까이 차이가 있어 aPS의 측정이 좀 더 상세한 결과를 나타낸다고 생각된다.

그러나 정방향 전위는 역방향 전위와 달리 신경손상이 일어나기 전에 전위가 소실되는 현상, 즉 시냅스조기감소를 보인다. 아데노신이 CA1 피라미드세포의 돌기세포 전위를 감소시켜 군집전위의 소실에 관여한다고 알려져 있으며, 피라미드세포의 시냅스전도를 감소시키고 시냅스후 억제효과를 보일 뿐 아니라 돌기세포 전위의 발현을 억제하는 것으로 보고하고 있다.¹⁶⁾ 아데노신의 이러한 작용으로 시냅스를 지나서 관측되는 정방향 전위의 조기감소 현상이 나타나게 되어 신경손상을 평가하는데 저해요인으로 작용하

게 된다. 저산소 후 과흥분 상태는 주로 정방향 전위에서 일어나는데 저산소 상태에서의 NMDA 수용체 활성화를 통하여 발현되는 것으로 알려져 있으며 회복 후 상당시간 지속되어 이를 백분율로 정량화한 경우 회복이 과장되거나 편차가 커지는 방향으로 작용된다.^{8,9,14,24)} OGD 상태의 정방향 전위측정 도중 본 실험에서와 같이 아주 짧게 전위가 회복되었다가 사라지는 현상은 저산소 손상전위(hypoxic injury potential: HIP)라고 일컬어지며 Fairchild 등은 신경세포의 영구적 손상을 나타내는 지표일 것이라고 추정하였다. 발생은 GABA, adenosine 등이 관여할 것으로 추정되며, Fowler 등¹²⁾은 글루코스농도, pH 등이 HIP 발생에 영향을 미칠 것이라고 보고하였다. Doolette 등¹⁰⁾은 정방향 전위를 측정하면서 발생하는 HIP는 아데노신 수용체가 관여할 것으로 추정하였다. 본 실험조건에서 HIP가 역방향 전위의 소실 전에 나타나 동시에 소실되는 관계로 볼 때, Fairchild의 기술처럼 신경세포의 영구적 손상과 관계가 있으며 세포막의 기능소실과 동반되는 것으로 추정되며 HIP의 지속시간이 회복과 긍정적인 연관이 있음을 보여 주었는데, 동일한 실험조건을 가함에 있어서도 조직편의 OGD전 상태의 차이나 실험자들 간의 차이 등으로 OGD나 조산소 손상의 진행정도가 실험마다 다를 수 있고 이것이 HIP의 지속시간 및 회복률의 차이로 나타나는 것으로 보인다.

통상 전체적인 허혈시간은 신경손상을 결정하는 중요한 요소이면서 대부분의 경우 실험조건으로 일정하게 유지한다. 그러나 본 실험에서와 같이 7~10분 사이의 약 3분이라는 비교적 넓은 시간에 걸쳐 부분 손상대가 걸쳐 있고 OGD 6분 군의 결과를 포함한 전체 부분 손상의 회복률의 편차가 매우 크게 나타나기 때문에 의미 있는 차이를 도출하기 위하여서는 더 많은 실험이 필요한 상황에 이르게 된다. 약물투여의 결과에서도 정방향과 역방향 모두를 측정하였을 때 정방향 측정에서 의미 있는 것으로 나타난 모든 약물군과 유효하지 않았던 일부의 약물군에서 역방향에서 유의한 차이를 보여 역방향이 보다 민감한 지표로 판단되었다.

정방향 전위 소실을 기준으로 하여 이후 허혈 지속시간을 변수로 결과를 관찰하여 보면 5~7분에서 부분 손상대가 형성되었으며, 역방향 전위 소실을 기준으로 하였을 때는 소실 이후 1~2분 사이에서 부분 손상대가 형성되어 비가역적 완전 손상의 임계점에 임박함을 잘 보여 주었다. 따라서 급성기 신경손상의 여부를 결정함에 있어 역방향 전위가 소실되는 시간이 전체적인 허혈 시간이나 정방향 군집전위보다 유용한 지표로 판단되었으며 이는 치료

목적의 인위적인 뇌혈류 차단 상황에서 재관류의 시점을 결정하는 데 중요한 지표가 될 수 있음을 시사한다. 약물투여 실험에서도 8~9분의 OGD에 의한 손상에서 유의한 효과를 보였던 모든 약물군과 효과를 보이지 못하였던 NMDA 수용체 길항제인 AP-5군도 역방향 전위 소실을 기준으로 하여 진행한 실험에서는 소실 2분 이후에 부분 회복을 보여 신경보호기능이 있음을 시사하여 역방향이 실험이 좀 더 민감하기 때문에 적은 수의 실험의 개체로도 의미있는 결과를 도출할 수 있음을 보여 주었다.

결론

저자들은 본 실험을 통하여 정방향의 전기생리학적 분석방법과 함께 막전도를 반영하는 역방향 군집전위를 동시에 측정하는 방법이 초기의 안정적인 기록을 담보하며 신경세포의 비가역적 기능소실 시기를 잘 반영하여 매우 효과적임을 보여주었다.

중심 단어: 역방향 전위기록·정방향 전위기록·허혈손상·해마절편.

■ The authors have no financial conflicts of interest.

REFERENCES

- 1) Andersen P, Eccles JC, Loynning Y. Pathway of postsynaptic inhibition in the hippocampus. *J Neurophysiol* 27:608-619, 1964
- 2) Andersen P, Silfvenius H, Sundberg SH, Sveen O. A comparison of distal and proximal dendritic synapses on CA1 pyramids in guinea-pig hippocampal slices in vitro. *J Physiol* 307:273-299, 1980
- 3) Andersen P, Silfvenius H, Sundberg SH, Sveen O, Wigström H. Functional characteristics of unmyelinated fibres in the hippocampal cortex. *Brain Res* 144:11-18, 1978
- 4) Balestrino M, Aitken PG, Somjen GG. The effects of moderate changes of extracellular K⁺ and Ca²⁺ on synaptic and neural function in the CA1 region of the hippocampal slice. *Brain Res* 377:229-239, 1986
- 5) Cherubini E, Rovira C, Ben-Ari Y, Padjen A. Simultaneous recording of somatic and dendritic field potentials and combined microiontophoresis in the rat Ammon's horn in situ: effects of GABA and acetylcholine. *Neurosci Lett* 31:19-24, 1982
- 6) Corbett D, Nurse S. The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia. *Prog Neurobiol* 54:531-548, 1998
- 7) Danscher G, Shipley MT, Andersen P. Persistent function of mossy fibre synapses after metal chelation with DEDTC (Antabuse). *Brain Res* 85:522-526, 1975
- 8) de Mendonça A, Ribeiro JA. Adenosine inhibits the NMDA receptor-mediated excitatory postsynaptic potential in the hippocampus. *Brain Res* 606:351-356, 1993
- 9) de Mendonça A, Sebastião AM, Ribeiro JA. Inhibition of NMDA receptor-mediated currents in isolated rat hippocampal neurones by adenosine A1 receptor activation. *Neuroreport* 6:1097-1100, 1995

- 10) Doolette DJ, Kerr DI. Hyperexcitability in CA1 of the rat hippocampal slice following hypoxia or adenosine. **Brain Res** 677:127-137, 1995
- 11) Fairchild MD, Parsons JE, Wasterlain CG, Rinaldi PC, Wallis RA. A hypoxic injury potential in the hippocampal slice. **Brain Res** 453:357-361, 1988
- 12) Fowler JC. Adenosine antagonists alter the synaptic response to in vitro ischemia in the rat hippocampus. **Brain Res** 509:331-334, 1990
- 13) Jester JM, Campbell LW, Sejnowski TJ. Associative EPSP--spike potentiation induced by pairing orthodromic and antidromic stimulation in rat hippocampal slices. **J Physiol** 484:689-705, 1995
- 14) Klishin A, Lozovaya N, Krishtal O. A1 adenosine receptors differentially regulate the N-methyl-D-aspartate and non-N-methyl-D-aspartate receptor-mediated components of hippocampal excitatory postsynaptic current in a $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -dependent manner. **Neuroscience** 65:947-953, 1995
- 15) McCullers DL, Sullivan PG, Scheff SW, Herman JP. Mifepristone protects CA1 hippocampal neurons following traumatic brain injury in rat. **Neuroscience** 109:219-230, 2002
- 16) Miyashita K, Nakajima T, Ishikawa A, Miyatake T. An adenosine uptake blocker, propentofylline, reduces glutamate release in gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia. **Neurochem Res** 17:147-150, 1992
- 17) Niiyama S, Tanaka E, Yamamoto S, Yasumoto S, Kano T, Higashi H. Bupivacaine, but not tetracaine, protects against the in vitro ischemic insult of rat hippocampal CA1 neurons. **Neurosci Res** 42:231-241, 2002
- 18) Oliveira IJ, Molz S, Souza DO, Tasca CI. Neuroprotective effect of GMP in hippocampal slices submitted to an in vitro model of ischemia. **Cell Mol Neurobiol** 22:335-344, 2002
- 19) Preston E, Webster J. Spectrophotometric measurement of experimental brain injury. **J Neurosci Methods** 94:187-192, 2000
- 20) Rekling JC. Neuroprotective effects of anticonvulsants in rat hippocampal slice cultures exposed to oxygen/glucose deprivation. **Neurosci Lett** 335:167-170, 2003
- 21) Schmidt-Kastner R, Truettner J, Lin B, Zhao W, Saul I, Busto R, Ginsberg MD. Transient changes of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression in hippocampus during moderate ischemia induced by chronic bilateral common carotid artery occlusions in the rat. **Brain Res Mol Brain Res** 15:92(1-2): 157-166, 2001
- 22) Sebastião AM, de Mendonça A, Moreira T, Ribeiro JA. Activation of synaptic NMDA receptors by action potential-dependent release of transmitter during hypoxia impairs recovery of synaptic transmission on reoxygenation. **J Neurosci** 21:8564-8571, 2001
- 23) Shinskaia NE. [Role of cAMP in regulating hippocampal neuronal reactivity in vitro]. **Biull Eksp Biol Med** 94:3-5, 1982
- 24) Swanson TH, Drazba JA, Rivkees SA. Adenosine A1 receptors are located predominantly on axons in the rat hippocampal formation. **J Comp Neurol** 363:517-531, 1995