

YÜKSEK YERÇEKİMİ KOŞULLARININ YENİDOĞAN RAT BEYİN GELİŞİMİNE ETKİSİNİN STEREOLOJİK, MORFOLOJİK VE HİSTOKİMYASAL AÇIDAN İNCELENMESİ

STEREOLOGICAL, MORPHOLOGICAL AND HISTOCHEMICAL STUDY ON THE EFFECT OF HYPERGRAVITY ON NEWBORN RAT BRAIN

Tuncay VAROL¹

M. İbrahim TUĞLU²

Seda VATANSEVER²

Enis CEZAYIRLI¹

Ertuğrul TATLISUMAK¹

Ceyda HAYRETDAG¹

¹Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı , Manisa, TÜRKİYE

²Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Manisa, TÜRKİYE

Anahtar Sözcükler: hipergravite, rotasyon, miyelinizasyon, beyin gelişimi

Key Words : hypergravity, centrifugation, myelination, brain development

*Bu çalışma Celal Bayar Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı'nın desteği ile yapılmıştır.

ÖZET

Yeryüzünde yaşayan tüm canlılar genetik faktörlerin olduğu kadar, çevresel faktörlerin de etkisi altındadır. Bu çevresel faktörlerin belki de en önemli ve sürekli olanı yerçekimi (gravite)' dir. Gravitenin artması (hipergravite) ise uçak yolculukları sırasında meydana gelen parabolik uçuş esnasında ya da uzaya yolculuk sırasında gerçekleşmektedir. Deneysel olarak özellikle hipergravitenin ve rotasyonun yenidoğan Wistar albino ratlarda merkezi sinir sisteminin gelişimine ve miyelinizasyon sürecine yaptıkları etki araştırıldı. Deney düzeneği olarak hızı ayarlanabilir rotasyon aleti kullanıldı. Rotasyon aletinin kol uzunluğu 144 cm ve dönme hızı G grubu için 25 devir/dk, 2G grubu için 36 devir/dk olarak uygulandı. 90 adet wistar albino yenidoğan rat kullanıldı. Yenidoğan ratlar kontrol, G ve 2G olmak üzere 3 gruba ayrıldı. G ve 2G grupları günde 6 saat rotasyona maruz bırakıldı ve 3., 7., 15., 21. ve 28. günlerde eter anestezisi altında %10 formalin ile perfüzyon fiksasyonu uygulandıktan sonra dekapite edilip, beyinleri çıkarıldı. Hazırlanan parafin bloklardan 8µ luk kesitler alındı. Solochrome cyanine ve PAS ile boyanan kesitler ışık mikroskopu altında değerlendirildi. Ayrıca seri kesitlerden alınan görüntülerde Cavalieri metodu ile stereolojik ölçüm yapıldı. Elde edilen verilere göre rotasyon ve 2G seviyesinde hipergravitenin, ilk 4 haftalık periyotta ışık mikroskopik seviyede, miyelinizasyon sürecine ve beyin gelişimine belirgin bir etki yapmadığı sonucuna varıldı.

SUMMARY

All terrestrial creatures are affected by environmental factors as well as genetic factors. Gravity is probably the most important and continuous environmental factor we all are exposed to. Hypergravity is encountered during parabolic flights, or during the launch of space shuttle, and sometimes during extreme acceleration in a vehicle. The effects of hypergravity and centrifugation on the development and myelination processes of central nervous system of newborn wistar albino rats have especially been investigated. A variable speed centrifugator with a radius of 144 cm was used in the experiment. Ninety newborn Wistar albino rats were assigned equally to control, G and 2G groups. G and 2G groups were subjected to centrifugation at a speed of 25 rpm and 36 rpm respectively for 6 hours a day. Following ether anesthesia, equal number of rats from each group were perfused with 10% formalin at postnatal 3rd, 7th, 15th, 21st and 28th days and decapitated. Brains were removed and embedded in parafin. Eight micrometer thick sections were stained with Solochrome cyanine and PAS and examined under light microscope. Digital images were obtained from serial sections for Cavalieri based stereologic estimations. The results suggested that centrifugation (G) and hypergravity (2G) caused significant effect neither on myelination process nor brain development light microscopically in the first 4 weeks of postnatal period.

Yazışma adresi : Tuncay VAROL, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi

Anatomi Ana Bilim Dalı, Manisa, TÜRKİYE

Makalenin geliş tarihi : 11.05.2004 ; kabul tarihi : 02.02.2005

GİRİŞ

Yerçekiminin biyolojik yapılar üzerine etkileri pek çok çalışmanın konusu olmuştur (1, 8, 9, 10, 11, 15, 20, 21, 25, 26, 30, 31, 33). Bu çalışmalar gerek mikrogravite ortamında, gerekse hipergravitenin değişik derecelerinde, canlıların adaptasyon, üreme ve gelişme özellikleri ile söz konusu canlılarda özellikle gelişim döneminde meydana gelen yapısal ve kalıcı değişikliklerle ilişkili olduğu saptanmıştır (27, 28). Özellikle astronotlarda ve uzay araçlarında kullanılan deney hayvanlarında görülen düşük yerçekimine bağlı hipotalamik ve serebellar değişiklikler, normal koşullarda yapılan yüksek yerçekimi deneylerini anlamlı kılmakta ve mekanizmaların araştırılmasına olanak sağlamaktadır. Gelişen teknolojiye bağlı olarak uzayda yaşam olasılığı bu tür deneylerle insanlığın ve bilimin hazırlanmasına yardımcı olmaktadır. Bunun yanı sıra hipergravitenin osteoporoz gibi hastalıklarda ve yara iyileşmesinde tedavi aracı olarak kullanılma olasılığı da, bu deneylerin ve mekanizmaların anlaşılmasındaki önemi arttırmaktadır (18, 19, 37).

Olası etkinin araştırılmasında hücre davranışının güzel örnekleri olan miyelin oluşumu ve bazal membran formasyonunun seçilmesinin nedeni çoğalma, göç etme ve farklılaşma kriterlerinin birlikte yer aldığı süreçler olmasıdır. Bu amaçla solochrom cyanine metodu ile miyelin boyanmasına ve PAS ile de bazal membranların gösterilmesine çalışılarak, deneysel olarak hipergraviteye maruz bırakılmış yenidoğan sıçanlarda beyin dokusuna etkisi incelenmiştir.

Merkezi sinir sisteminin fonksiyonu bakımından miyelinizasyon süreci büyük önem arz etmektedir. Miyelin protein, lipid ve sudan meydana gelir. Miyelin merkezi sinir sisteminde oligodendrositler tarafından üretilen hücre içi bir yapıdır (39). Periferik sinir sisteminde Schwann hücreleri tarafından yapılan miyelin ile merkezi sinir sistemindeki miyelin arasındaki en belirgin fark, miyelinogenezis sırasında farklı proteinlerden veya farklı protein oranlarından oluşmasıdır. Örneğin proteolipid protein (PLP)/DM20, miyelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG), oligodendrocyt miyelin glycoprotein (OMGP) sadece merkezi sinir sistemindeki miyelin yapısında bulunurken, P0 ve PMP22 proteinleri sadece periferik sinir sistemindeki miyelin yapısında bulunur. P1, P2, miyelin associated glycoprotein (MAG) ve 2'3' siklik AMP phosphodiesterase (CNPase) gibi proteinler her iki sinir sistemi bölümünde farklı oranlarda bulunur. Proteinlerden P0, P1, P2, PLP/DM20, MAG, MOG ve PMP22, Guillain-Barré sendromu ve multiple sclerosis gibi hastalıklarda antijenik özellikleri nedeniyle önem kazanmaktadır. Aynı zamanda bu tip hastalıkların sinir sisteminin farklı bölümlerini etkilemesi, sinir sistemi bölümlerindeki miyelin yapısının farklı olmasına bağlıdır (39).

Lipidler bakımından da benzer durum söz konusudur. Miyelinin yapısında yaklaşık %70-80 oranında lipid bulunur. Bu lipidlerin önemli bir bölümünü kolesterol,

fosfolipidler ve glikosfingolipidler oluşturur. Daha az oranda galaktosilgliseridler, fosfoinozidler ve gangliozidler bulunur. Periferik ve merkezi sinir sistemindeki miyelinin kompozisyonu farklıdır. Yine insanda gangliozidlerden sialosyl paragloboside (LM1) periferik sinir sistemindeki miyeline özgüken, sialosylgalactocerebroside (GM4) merkezi sinir sistemindeki miyelinde bulunan esas gangliozittir. Lipid içinde yer alan asidik glikoglikolipidler antijenik olarak önemlidir. Lipid metabolizmasını ilgilendiren bozukluklarda (metakromatik lökodistrofi, Krabbe hastalığı, Niemann-Pick hastalığı gibi), farklı seviyelerde demiyelinizasyon görülebilmektedir (39).

Miyelin oluşumunun hasara uğramasında ortaya PAS pozitif makrofajların ortaya çıktığı gösterilmiş ve demiyelinizasyon sürecine eşlik ettikleri saptanmıştır (35). Yine gelişim sürecinde sulfataz eksikliğine bağlı olarak kortikal nöronlarda PAS pozitifliğin olduğu (13), ayrıca merkezi sinir sisteminde bazı aksonların ve miyelin yüzeylerinin PAS pozitif oldukları ve bunun gelişim sürecine de bağlı oldukları gösterilmiştir (12). PAS pozitifliğinin nöronal nekroz, reaktif gliosis ve kan beyin bariyerinde yıkımla olan ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmada, hem damar duvarı ile ilgili, hem de glial ve nöronal hücrelerde granüler tarzda birikim şeklinde ortaya çıktığı gözlenmiştir (2).

Yine laminin ve dolayısı ile bazal membran ve onu boyayan PAS reaksiyonunun nöronal hasarın ve dejenerasyonun duyarlı bir tanımlayıcısı olduğu iddia edilmiştir (17).

Bazal membranı oluşturan matriks molekülleri sadece bu membranın oluşması ve devamlılığını sağlamakla kalmaz aynı zamanda oluşturduğu sinyal mekanizması ile dej hücre davranışını direk olarak etkiler. Bunun yanı sıra bu moleküllerin miyelin oluşumunda aktif rol aldıkları ve bu süreci direkt olarak etkiledikleri de gösterilmiştir (24).

Hipergraviteye bağlı olarak kaslarda matriks moleküllerinin değişikliğe uğradığı ve kasın hareketini değiştirdiği düşünülmektedir (4, 5, 6). Daha da önemlisi yerçekimi değişikliklerine bağlı olarak hücre içi iskelet proteinlerinin dağılımında da değişiklik olduğu saptanmıştır (5, 6). Yerçekiminin azalmasına bağlı spinal kord motor nöronlarda ve hipotalamik nükleuslarda genel anlamda bir aktivite azalması olduğunu, buna karşılık hipergravitenin ise hiperaktiviteye neden olduğunu belirtmektedir (22). Ayrıca hipergraviteye bağlı merkezi sinir sisteminin etkilendiği ve TRH ile tiroid hormonlarını da bu etkinin içine aldığı gösterilmiştir (9, 29). Hipergravitenin şiddetiyle orantılı iskemi oluşumu ve özellikle hippokampusta nöronların apoptosis mekanizmasını kullanarak öldükleri de değişik çalışmalarla gösterilmiştir. Hipergravite ortamında merkezi sinir sisteminde ve özellikle beyinde iskemi meydana geldiği ve bunun rotasyondan bağımsız olduğu ile ilgili literatür bilgisi vardır (1, 3, 11, 14, 27, 33, 36, 38).

Bu çalışmada hücre davranışı ve bu davranışın bir kriteri olarak miyelinizasyon ile hipergravite arasındaki ilişkinin, kan-beyin bariyeri oluşumunun henüz tamamlanmadığı yenidoğan döneminde araştırılması amaçlandı.

MATERYAL VE METOD

Deney düzeneği olarak hızı ayarlanabilir rotasyon aleti kullanıldı. Cihazın kollarının uzunluğu 144 cm idi ve uçlarında deney hayvanlarının konulduğu kafesler bulunuyordu. Rotasyon (G) grubu için 25 devir/dakika, hipergravite (2G) grubu için 36 devir/dakika dönme hızı uygulandı. Buna göre rotasyon grubu için oluşturulan merkezkaç ivmesi 9.82 m/sn², hipergravite grubu için oluşturulan merkezkaç ivmesi ise 20.86 m/sn² (=2.08 G) olarak hesaplandı.

Çalışmada 90 adet yenidoğan wistar albino rat yavrusu kullanıldı. Yavru ratlar kontrol, rotasyon (G) ve hipergravite (2G) olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Bir grup kontrol olarak ayrılırken, bir grup yerçekimi ivmesine eşit rotasyona (G), diğer grup ise yerçekimi ivmesinin yaklaşık 2 katı olacak şekilde (2G) saat yönünde ve günde 6 saat süreyle rotasyona maruz bırakıldı. Her grupta 6 yavru rat olacak şekilde, postnatal 3., 7., 15., 21. ve 28. günlerde yavrular eter anestezisi altında %10 formalin perfüzyonu ile fikse edilip, dekapite edildi ve beyinleri çıkarıldı. Alınan örneklerden rutin parafin blok takibi sonrası 8µm' lik kesitler alındı. Alınan kesitlerde histokimyasal inceleme yapıldı.

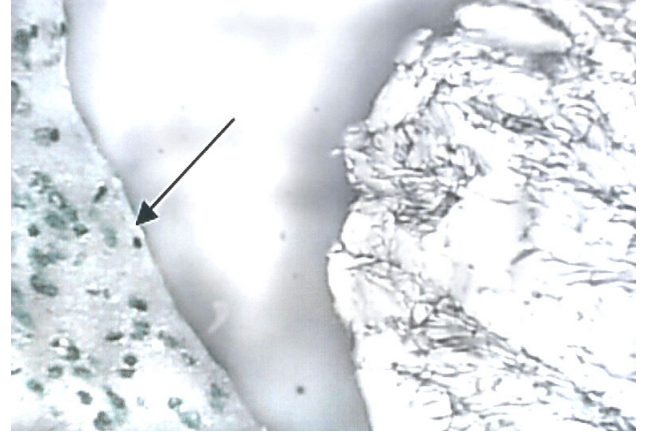
Kesitlere miyelin için solochrome cyanine (Eriochrome Cyanine RC-Sigma) ve bazal membran için PAS boyama teknikleri uygulandı. Sonuçlar ışık mikroskopunda (Olympus BX40F-3 stereo ışık mikroskop) değerlendirildi. Görüntüler kamera vasıtasıyla bilgisayar ekranına aktarılarak Cavalier metodu ile stereolojik ölçüm yapıldı. Ortalama ± standart sapma şeklindeki sonuçlar Graph Pad 3.1 istatistik programı kullanılarak ANOVA testiyle değerlendirildi ve p<0.05 anlamlı kabul edildi.

SONUÇLAR

Örneklerin solochrom cyanine metodu ile boyanması sonucu, kontrol ve deney gruplarında miyelin boyanmasının farklılık göstermediği, ratlarda postnatal dönemde devam eden miyelinizasyon sürecine uygun olarak, 3.ve 7. günlerde beyinde henüz miyelinizasyonun tamamlanmadığı saptandı (Resim 1). Sırasıyla 7. 14. ve 21. günlere ait örneklerde sinir lifleri 7. günde miyelin boyanması göstermemekle birlikte (1a, 1d), 14. günde her iki grupta minimal boyanma görülürken (1b, 1e), 21. günde sinir liflerinin belirgin olarak miyelin boyanması görülmektedir (1c, 1f). Postnatal dönemde artan bir miyelinleşme sürecinin varlığı saptanmıştır.

Bu miyelinleşmenin aktif bir şekilde tamamlanmaya çalışıldığı dönemde hipergravite etkisinin varlığını araştırmak için yapılan deneylerde, 14.günden itibaren miyelin boyanmasının normal olarak gerçekleştiği (Resim 2) ve bunun da kontrol ve deney grupları arasında kalitatif farklılık göstermediği düşünüldü. İncelenen alanlarda miyelin dejenerasyonu ile ilgili herhangi bir bulguya rastlanmadı.

PAS boyama yöntemi ile bazal membran bütünlüğüne bakıldığında, postnatal ilk günlerden itibaren oluşumunu tamamladığı ve diğer günlerde alınan örneklerde de bütünlüğünde bozulma olmadığı saptandı (Resim 3).



Resim 3. Hipergravite grubu, 28.gün, bazal membran (PAS boyama, x400)

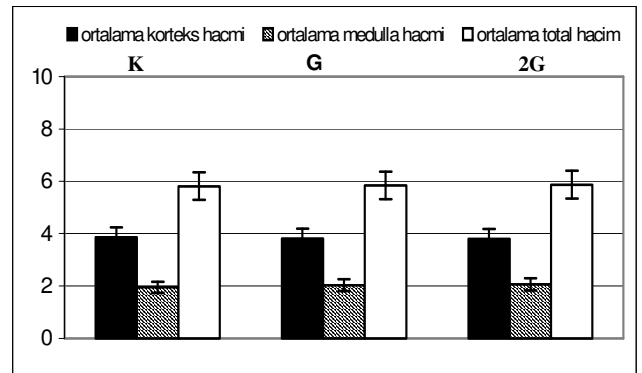
Örnek olarak gösterilen 28. gün boyaması, incelenen diğer zaman noktalarında farklı olmaması nedeni ile bazal membran formasyonunun bundan önce tamamlanmış olduğu ve uygulanan büyüklükteki yer çekiminden etkilenmediği saptandı.

Bilgisayar ekranına aktarılan görüntüler üzerinde Cavalier metoduyla yapılan stereolojik ölçümde, beyaz ve gri cevher oranları araştırıldı (Tablo 1, Şekil 1).

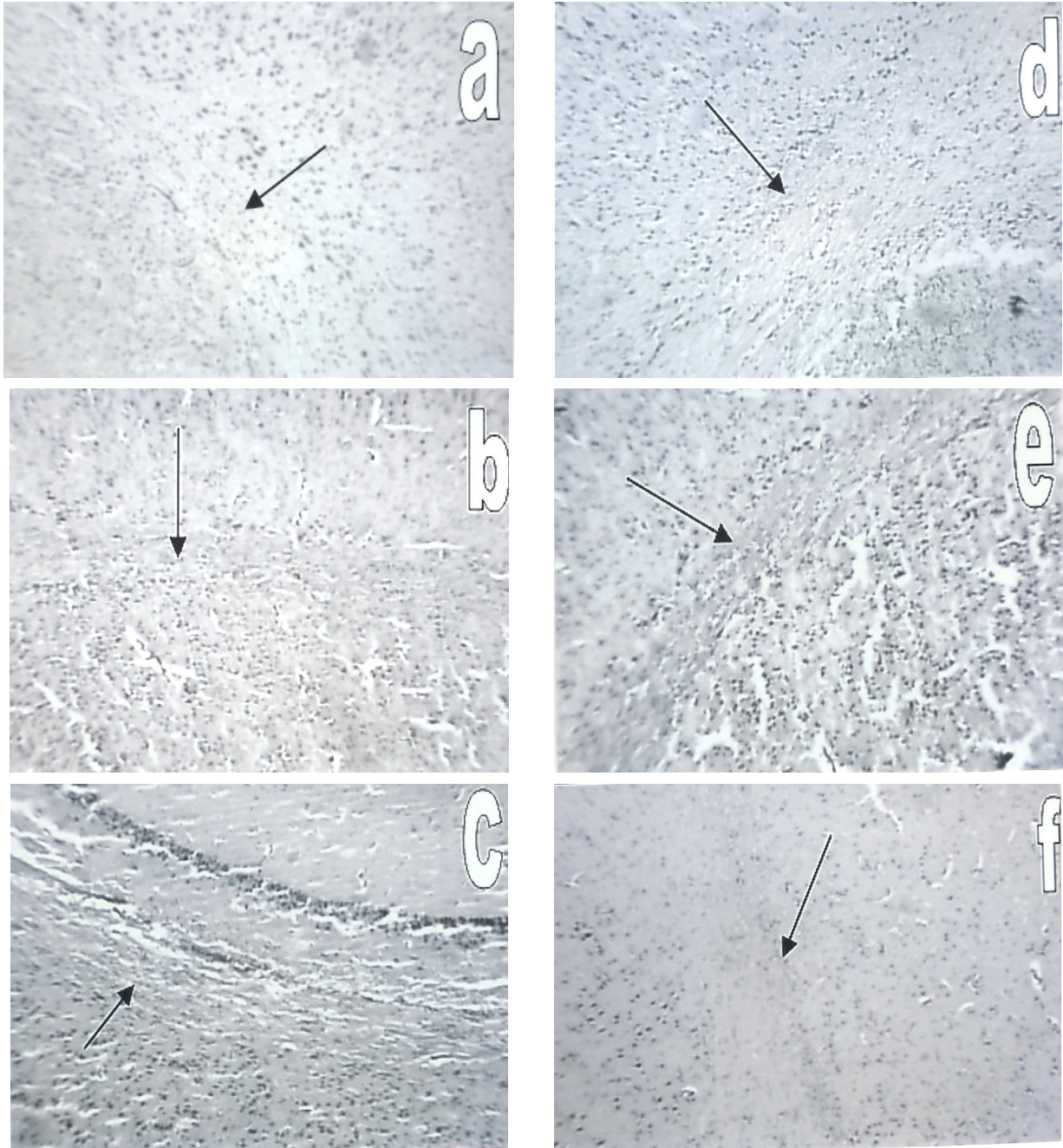
Tablo 1. Kontrol, G ve 2G deney gruplarının 4. haftada beyin korteks, medulla ve total hacim ortalama değerleri.

Gurup	Korteks hacmi (mm ³)	Medulla hacmi (mm ³)	Total hacim (mm ³)
Kontrol (n=6)	3,86±0,43	1,95±0,22	5,81±0,77
G (n=6)	3,81±0,33	2,03±0,18	5,84±0,45
2G (n=6)	3,80±0,36	2,07±0,28	5,87±0,64

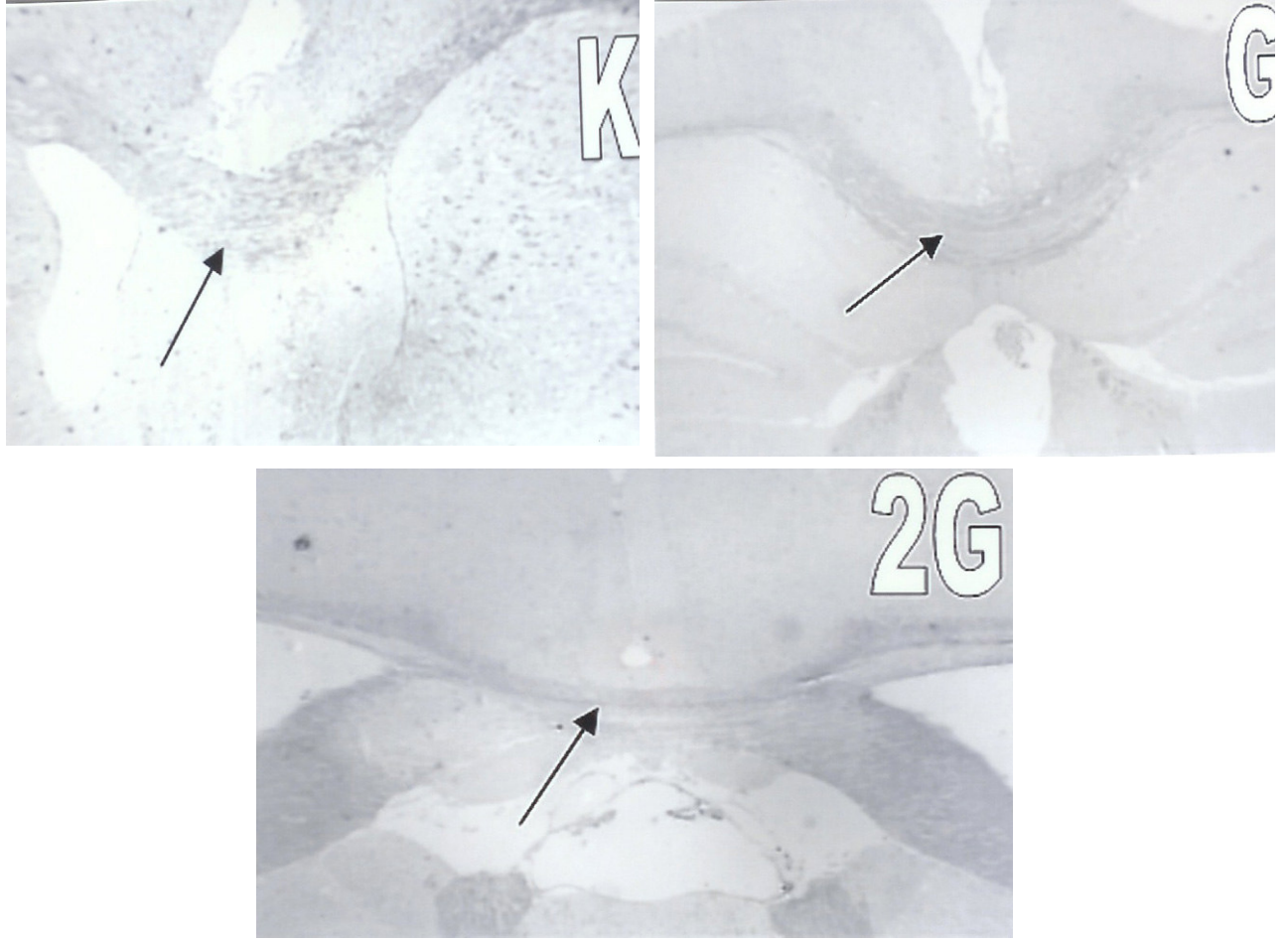
Ancak gruplar arasındaki farklar istatistiksel bakımdan anlamlı (p>0,05) değildi. Böylece hem hücre kaybı ve miyelinizasyon bozukluğuna bağlı, hem de rotasyonun da katıldığı olası iskemi kaynaklı volüm değişikliğinin gerçekleşmediği saptandı.



Şekil 1. Ortalama değerlerin grafik gösterimi.



Resim 1. Kontrol (a, b, c) ve hipergravite (d, e, f) gruplarına ait beyin kesitleri. Sırasıyla 7. 14. ve 21. günlere ait örneklerden alınan kesitler miyelin boyası ile boyanmıştır (solochrome cyanine x100). Okla işaretlenmiş sinir lifleri 7. günde miyelin boyanması göstermemektedir (a, d). 14. günde her iki grupta minimal boyanma görülürken (b, e), 21. günde sinir liflerinin belirgin olarak miyelin boyanması gösterdikleri görülmektedir (c, f).



Resim 2. 28.günde kontrol (K), rotasyon (G) ve hipergravite (2G) gruplarına ait beyin kesitleri (solochrome cyanine x100). Miyelinli lifler okla gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Çalışmamızda yenidoğan ratların merkezi sinir sistemi gelişimi üzerine yerçekimi ivmesine eşit rotasyon (G) ve hipergravitenin (2G) etkisi araştırıldı. Buna göre anneleri ile birlikte kafes içinde günde 6 saat süreyle ve 4 hafta boyunca rotasyon ve hipergraviteye maruz bırakılan yenidoğan ratlarda miyelinizasyon sürecinde ve bazal membran proteinlerinin bütünlüğünde farklılık saptanmadı. Ayrıca beyin gelişiminde hacimsel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi (Tablo 1, Şekil 1). Ancak klinik olarak oldukça etkilendikleri saptanan ve önemli miktarda deneğin deney sırasında ölmesi ve çalışma dışı bırakılması, hipergravitenin bir şekilde metabolizmayı etkilediği ancak beyin hücrelerinin davranış bozukluğuna yol açmadığı yapılan yöntemlerin izin verdiği ölçüde gösterildi.

Yapılan çeşitli çalışmalarda yerçekiminin, vertebralılarda ve daha alt sınıf canlılarda normal embriyogenezis ve organogenezis bakımından gerekli olduğunu ortaya koymuştur. Buna göre yerçekimi değişiklikleri kalıcı yapısal değişikliklere neden olabilmesine rağmen, belli ölçüde adaptasyon mümkün olmaktadır (10, 27).

Sıçanlarda beyin gelişimi yaklaşık doğum sonrası 16. gün civarında tamamlanır (34). Miyelinizasyon süreci ise prenatal dönemde başlayıp, postnatal dönemin ilk 4 haftasında tamamlanan bir süreçtir. Bu süreçte genetik ve çevresel faktörler kadar, nöronal aktivitenin de büyük önemi vardır ve hipergravite aynı zamanda nöronal aktivitede artışa neden olmaktadır (21, 27, 28). Çalışmamızda miyelinizasyon sürecinde kontrol, yer çekimine eşit rotasyon (G) ve 2G gruplarında ışık mikroskopik olarak, miyelin boyanmasında farklılık göremedik. Literatürde de bununla ilgili yapılmış çalışma ve kesin bir bulgu saptayamadık. Miyelinizasyon bozukluğunun ışık mikroskopik düzeyde görülmemesi, hipergravitenin etkisinin olmadığını söylemek için yeterli olmamaktadır. Bu amaçla miyelin proteinlerinin immunohistokimyasal olarak incelenmesi ve ultrastrüktürel çalışma ile desteklenmesi durumunda kesin bir yorum yapmak mümkün olabilecektir. Klinik olarak etkilenen deneklerde metabolizma koşullarının değerlendirilmesi için kan gazı analizlerinin yapılması, serum parametrelerinin araştırılarak özellikle beyni dışarıdan etkileyen faktörlerin durumu ortaya konmalıdır.

Denek hayvanların fiziksel aktivitelerinde farklılık olmaması, kısa sürede toparlanmaları bu tür çevresel faktörlerin beyin üzerinde geçici etki oluşturması ve miyelin oluşumunu etkileyecek seviyeye ulaşamamasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Yapılan çalışmalar hipergraviteye bağlı oluşan iskeminin, gravite şiddetine ve zamana bağlı olduğunu göstermiştir. Bu tür bir etki genellikle 2G üzerindeki şiddette meydana gelmektedir (23).

Kültür çalışmalarında hücre adezyon moleküllerinin yerçekimine bağlı olarak değişiklik göstermedikleri düşünülmektedir (16). Buna karşın yerçekimine bağlı olarak annexin gibi protein dağılımında değişiklikler meydana geldiği ileri sürülmüştür (7). Mikrograviteye bağlı etkinin submandibüler bezlerde yaptığı etkinin araştırıldığı bir çalışmada da bazal membranın kaybolduğu saptanmış ve bunun birçok organelin bozukluğuna eşlik ettiği düşünülmüştür (32). PAS boyamasından elde edilen sonuçlar ile hem bazal membran oluşumunu sağlayan proteinlerde bir değişiklik saptanmamış ve bazal membran formasyonu bozulmamış, hem de bir dejenerasyon göstergesi olarak herhangi bir nöronal patoloji görülmemiştir. Bu tür etkinin oluşması için literatürde yer alan çalışmalarla bu çalışmanın farkı yerçekimi etkisinin süresi ve özellikle şiddeti ile ilgili olduğu düşünülmüştür.

Miyelin ve bazal membran oluşumunun etkilenmemesi yanı sıra, beyin total hacmi, beyaz ve gri cevher hacimleri ve birbirine oranları farklılık göstermemiştir. Ancak bu konuda daha yüksek hipergravite şartlarında yapılmış

çalışmalarda hippokampus, talamus, serebellum ve frontal lob gibi beyin bölümlerinin etkilendiğini bildiren yayınlar mevcuttur (3, 23, 29). Bu yayınlarda oluşan değişikliklerin iskemik değişikliklerden farklı olmadığı da bildirilmektedir. Bizim elde ettiğimiz sonuçlar, 2G gibi göreceli olarak daha düşük hipergravite koşullarında oluşan değişikliklerin ışık mikroskopik düzeyde çok sınırlı düzeyde kaldığını, oluşan klinik bozukluğun metabolik şartlardan kaynaklandığı düşüncesini desteklemektedir.

Sonuç olarak literatür bilgisi ışığında, G ve 2G deney gruplarında elde ettiğimiz bulgulara dayanarak, inceleme yöntemlerimizin sınırlamaları içinde, miyelinizasyon sürecinde gerileme olmadığı ve bazal membran bütünlüğünün bozulmadığını söyleyebiliriz. Bu yorumun daha doğru yapılması için protein düzeyinde immunohistokimyasal, yapısal düzeyde elektron mikroskopik ve klinik tablonun tanımlanmasında metabolik şartların durumunu göstermek için serum ve kan gazı parametrelerinin çalışılması gerekmektedir olup, maddi imkanlar ölçüsünde bu deneyler sürdürülmektedir. Bu çalışmada ılımlı sayılabilecek düzeyde gerçekleştirilen hipergravite etkisinin sıçanların miyelin ve bazal membran oluşumunu ışık mikroskopik düzeyde etkilediği gösterilmiştir. Ayrıca, yerçekimsiz alanda yaşama olasılığı ve olası hipergravite etkilerinin hem yaşam kalitesi ile ilişkisi, hem de osteoporoz gibi hastalıklarda tedavi protokollerinin içinde yer alabilme düşüncesi nedeni ile önemi gittikçe artmakta olan hipergravite etki mekanizmalarının anlaşılmasında, ileri çalışmaların yapılması gerektiği ortaya konmuştur.

KAYNAKLAR

1. Bagshaw RJ, Whinnery JE. Mammalian cardiovascular morphology and the maintenance of cerebral function at high Gz. *Aviat Space Environ Med* 1994 ; 65 (7): 666-9
2. Bennett SA, Stevenson B, Staines WA, Roberts DC. Periodic acid-Schiff (PAS)-positive deposits in brain following kainic acid-induced seizures: relationships to fos induction, neuronal necrosis, reactive gliosis, and blood-brain barrier breakdown. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1995; 89 (2): 126-38.
3. Cai Q, Liu HJ, Zhan Z, Zhu MC. A study of apoptosis and related gene bcl-2 and p53 expression in hippocampus of rats exposed to repeated +G. *Space Med Med Eng (Beijing)* 2000 Aug; 13 (4): 263-6
4. Chopard A, Leclerc L, Muller J, Pons F, Leger JJ, Marini JF. Effect of a 14-day space flight on dystrophin associated protein complex in rat soleus muscle. *J Gravit Physiol* 1998 ; 5 (1): 67-8.
5. Chopard A, Pons F, Charpiot P, Marini JF. Quantitative analysis of relative protein contents by Western blotting: comparison of three members of the dystrophin-glycoprotein complex in slow and fast rat skeletal muscle. *Electrophoresis* 2000 ; 21 (3): 517-22.
6. Chopard A, Pons F, Marini JF. Cytoskeletal protein contents before and after hindlimb suspension in a fast and slow rat skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 280 (2): 323-30.
7. Clark GB, Rafati DS, Bolton RJ, Dauwalder M, Roux SJ. Redistribution of annexin in gravistimulated pea plumules. *Plant Physiol Biochem* 2000 ; 38 (12): 937-47.
8. D'Amelio F, Wu LC, Fox RA, Daunton NG, Corcoran ML, Polyakov I. Hypergravity exposure decreases gamma-aminobutyric acid immunoreactivity in axon terminals contacting pyramidal cells in the rat somatosensory cortex: a quantitative immunocytochemical image analysis. *J Neurosci Res* 1998 Jul 15; 53 (2): 135-42
9. Daunton NG, Tang F, Corcoran ML, Fox RA, Man SY. Chronic exposure to hypergravity affects thyrotropin-releasing hormone levels in rat brainstem and cerebellum. *Biol Signals Recept* 1998 ; 7 (6): 337-44
10. Duprat AM, Husson D, Gualandris-Parisot L. Does gravity influence the early stage of the development of the nervous system in an amphibian? *Brain Res Brain Res Rev* 1998 ; 28 (1-2): 19-24
11. Florence G, Lemenn M, Desert S, Bourron F, Serra A, Bonnier R, Blanquie JP, Charbonne R, Seylaz J. Cerebral cortical blood flow in rabbits during parabolic flights (hypergravity and microgravity). *Eur J Appl Physiol* 1998 ; 77 (5): 469-78
12. Garcia-Segura LM. Microscopic visualization of axon carbohydrates. *J Hirnforsch* 1979; 20 (3): 303-11.
13. Guerra WF, Verity MA, Fluharty AL, Nguyen HT, Philippart M. Multiple sulfatase deficiency: clinical, neuropathological, ultrastructural and biochemical studies. *J Neuropathol Exp Neurol* 1990 ; 49 (4): 406-23.

14. Guillaume A, Osmont D, Gaffie D, Sarron JC, Quandieu P. Effects of perfusion on the mechanical behavior of the brain exposed to hypergravity. *J Biomechanics* 1997 30 (4): 383-89
15. Heaps CL, Fischer MD, Hill RC. Female acceleration tolerance: effects of menstrual state and physical condition. *Aviat Space Environ Med* 1997; 68 (6): 525-30
16. Jessup JM, Brown K, Ishii S, Ford R, Goodwin TJ, Spaulding G. Simulated microgravity does not alter epithelial cell adhesion to matrix and other molecules. *Adv Space Res* 1994; 14 (8): 71-6.
17. Jucker M, Bialobok P, Kleinman HK, Walker LC, Hagg T, Ingram DK. Laminin-like and laminin-binding protein-like immunoreactive astrocytes in rat hippocampus after transient ischemia. Antibody to laminin-binding protein is a sensitive marker of neural injury and degeneration. *Biosci Rep* 1989 ; 9 (1): 1-12.
18. Klein Nulend J, Veldhuijzen JP, Burger EH. Increased calcification of growth plate cartilage as a result of compressive force in vitro. *Arthritis Rheum* 1986 29: 1-9.
19. Klein Nulend J, Veldhuijzen JP, Strien ME, van Jong M, Burger EH. Inhibition of osteoclast bone resorption by mechanical stimulation in vitro. *Arthritis Rheum* 1990 33: 66-72.
20. Kobayashi A, Miyamoto Y. In-flight cerebral oxygen status: continuous monitoring by near-infrared spectroscopy. *Aviat Space Environ Med* 2000 ; 71 (2): 177-83.
21. Krasnov IB, Polyakov IV, Ilyina-Kakueva EI, Drobyshev VI. Morphology and histochemistry of spinal cord and soleus muscle in rats grown under hypergravity. *The Physiol* 1992 35 (Suppl I): 216-7.
22. Krasnov IB. Gravitational neuromorphology. *Adv Space Biol Med.* 1994; 4: 85-110.
23. Li JS, Sun XQ, Wu XY, Rao ZR, Liu HL, Xie XP. Influences of repeated lower +Gz exposure induced brain injury in rats. *Space Med Med Eng (Beijing)* 2002 ; 15 (5): 339-42.
24. Martini R. Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves. *J Neurocytol* 1994 ; 23 (1): 1-28.
25. Masseguin C, Corcoran M, Carcenac C, Daunton NG, Guell A, Verkman AS, Gabrion J. Altered gravity downregulates aquaporin-1 protein expression in choroid plexus. *J Appl Physiol* 2000 ; 88 (3): 843-50.
26. Megory E, Oyama J. Intrauterine fetal response to hypergravity by reduction of plasma prolactin levels in the rat. *Am J Obstet Gynecol* 1985 ; 153 (7): 811-2.
27. Ribotta MG, Sandillon F, Privat A. Influence of hypergravity on the development of monoaminergic systems in the rat spinal cord. *Dev Brain Res* 1998 ; 111 (2): 147-157.
28. Roerig B, Feller MB. Neurotransmitters and gap junctions in developing neural circuits. *Brain Res Rev* 2000 ; 32 (1): 86-114.
29. Sajdel-Sulkowska EM2001, Li GH, Ronca AE, Baer LA, Sulkowski GM, Koibuchi N, Wade CH. Effects of hypergravity exposure on the developing central nervous system: possible involvement of thyroid hormone. *Exp Biol Med (Maywood)* 2001; 226 (8): 790-8.
30. Santucci D, Corazzi G, Fancia N, Antonelli A, Aloe L, Alleva E. Neurobehavioral effect of hypergravity conditions in the adult mouse. *Neuroreport* 2000 20; 11 (5): 3353-6.
31. Shellenberge KE, Grindeland RE, Hymer WC. Rat anterior pituitary hormone cells: responses to variable gravity. *Aviat Space Environ Med* 1988 ; 69 (6 suppl): 37-44.
32. Shubnikova EA, Dobriakova AV. Ultrastructure of the submandibular glands in rats kept in weightlessness. *Kosm Biol Aviakosm Med* 1988 ; 22 (2): 20-6.
33. Son M, Shahed AR, Werchan PM, Lee JC. C-fos and HSP70 gene expression in rat brains in high gravitation-induced cerebral ischemia. *Neurosci Let* 1995 ; 200: 81-84.
34. Stoltenburg-Didinger G, Punder I, Peters B, Marcinkowski M, Herbst H, Winneke G, Wiegand H. Glial fibrillary acidic protein and RNA expression in adult rat hippocampus following low-level lead exposure during development. *Histochem Cell Biol* 1996; 105 (6): 431-42.
35. Taniike M, Suzuki K. Spacio-temporal progression of demyelination in twitcher mouse: with clinico-pathological correlation. *Acta Neuropathol (Berl)* 1994; 88 (3): 228-36.
36. Trip LD, Chelette T, Savul S, Widman RA. Female exposure to high G: effects of simulated combat sorties on cerebral and arterial O2 saturation. *Aviat Space Environ Med* 1998 ; 69 (9): 869-74.
37. van Loon JJWA, van den Bergh LC, Schelling R, Veldhuijzen JP, Huijser RH. Development of a centrifuge for acceleration research in cell and developmental biology. 44th International Astronautical Congress, IAF/IAA-93-G.4-166, 39, Graz, Austria, 16-22 October 1993.
38. Werchan PM, Schadt JC, Fanton JW, Laughlin MH. Total and regional cerebral blood flow during recovery from G-LOC. *Aviat Space Environ Med* 1996 ; 67 (8): 751-58
39. Williams PL, Bannister LH, Berry MM, Collins P, Dyson M, Dussek JE, Ferguson MWJ. *Gray's Anatomy* 38th Edition, Churchill Livingstone, London, 1995.