



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα

Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Επίδραση της προγεννητικής έκθεσης στην
αιθανόλη και της επιληπτογένεσης στο ραβδωτό
σώμα επίμυων»**

Χρήστος Κορσκετίδης

Βιοχημικός-Βιοτεχνολόγος

Λάρισα

Σεπτέμβριος 2024



UNIVERSITY OF THESSALY

FACULTY OF MEDICINE

Master Programme

Clinical Applications of Molecular Medicine



MASTER THESIS

**«Effect of prenatal ethanol exposure and
epileptogenesis in rat striatum»**

Christos Korsketidis

Biochemist-Biotechnologist

Larissa

September 2024

Τριμελής επιτροπή

Άννα Βασιλάκη

Επίκουρος Καθηγήτρια Φαρμακολογίας (Υπεύθυνη Καθηγήτρια)

Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, ΠΘ

Ευτυχία Ασπροδίνη

Καθηγήτρια Φαρμακολογίας

Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, ΠΘ

Δημήτριος Μπόγδανος

Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων

Τμήμα Ιατρικής, ΠΘ

Ευχαριστίες

Για την εκπόνηση της πτυχιακής αυτής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κ. Άννα Βασιλάκη για την πολύτιμη βοήθεια, την προθυμία, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την καθοδήγηση της χωρίς τα οποία η εργασία αυτή δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της επιτροπής και συγκεκριμένα την κ. Ευτυχία Ασπροδίνη και τον κ. Δημήτρη Μπόγδανο για τη πολύτιμη βοήθειά τους και τις υποδείξεις που βοήθησαν στην ολοκλήρωση της εργασίας αυτής.

Σημαντική βοήθεια για την πραγματοποίηση της εργασίας αυτής αποτέλεσαν η κ. Αποστολία Χατζηευθυμίου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας και ο κ. Ηλίας Μπέγας, μέλος Ε.Τ.Ε.Π. του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας τους οποίους ευχαριστώ θερμά.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συμφοιτητές μου στο εργαστήριο Φαρμακολογίας για την άψογη συνεργασία και βοήθεια τους που είχαν καταλυτικό ρόλο στην επίτευξη των πειραμάτων αλλά και για όλες τις ευχάριστες αναμνήσεις που αποκόμισα μαζί τους εντός και εκτός εργαστηρίου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για όλη τη βοήθεια και τη στήριξη τους.

Περιεχόμενα

Περίληψη	1
Abstract	2
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
1.1 Προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη.....	3
1.2 Επιληψία.....	7
1.3 Προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη και επιληψία	11
1.4 Πειραματικά μοντέλα.....	12
1.4.1 Πειραματικά μοντέλα αλκοολισμού.....	12
1.4.2 Πειραματικά μοντέλα επιληψίας	15
1.5 Ραβδωτό σώμα	19
1.6 Επίδραση της έκθεσης στην αιθανόλη στην περιοχή του ραβδωτού σώματος..	23
1.7 Επίδραση της επιληπτογένεσης στην περιοχή του ραβδωτού σώματος	27
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	32
3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	33
3.1 Πειραματόζωα.....	33
3.2 Πρωτόκολλο έκθεσης στην αιθανόλη και πρόκλησης επιληπτικών κρίσεων....	33
3.2.1 Έκθεση στην αιθανόλη.....	33
3.2.2 Πρόκληση επιληπτικών κρίσεων.....	34
3.3 Ενδοκαρδιακή Μονιμοποίηση επίμυων	36
3.4 Συλλογή στεφανιαίων τομών εγκεφάλου.....	37
3.5 Χρώση των σωματιδίων Nissl με Cresyl Violet	38
3.5.1 Ανάλυση Εικόνας	39
3.6 Ανοσοϊστοχημεία	40
3.6.1 Ανάλυση εικόνας.....	42
3.7. Χρώση με τη μέθοδο Golgi-Cox.....	43
3.8. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων.....	44
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	45
4.1 Επίδραση της προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη και της επιληπτογένεσης στην πυκνότητα των σωματιδίων Nissl.....	45
4.1.1 Ραχιαίο ραβδωτό σώμα (κερκοφόρος πυρήνας & κέλυφος)	45

4.1.2 Κοιλιακό ραβδωτό σώμα (επικλινής πυρήνας)	46
4.2 Επίδραση της προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη και της επιληπτογένεσης στον αριθμό των κυττάρων.....	49
4.2.1 Ραχιαίο ραβδωτό σώμα (κερκοφόρος πυρήνας & κέλυφος)	49
4.2.2 Κοιλιακό ραβδωτό σώμα (επικλινής πυρήνας)	50
4.3 Επίδραση της προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη και της επιληπτογένεσης στην αρχιτεκτονική των νευρικών κυττάρων.....	53
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	55
5.1 Ραχιαίο ραβδωτό σώμα	55
5.2 Κοιλιακό ραβδωτό σώμα	57
5.3 Περιορισμοί της εργασίας.....	59
5.4 Σύνοψη	60
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	61
6.1 Άρθρα.....	61
6.2 Ιστοσελίδες.....	63

Περίληψη

Η προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη μπορεί να έχει ποικίλες συνέπειες στον άνθρωπο όπως δυσμορφίες στο πρόσωπο, διαταραχές στην ανάπτυξη, διανοητική καθυστέρηση αλλά και ενδεχόμενη εμφάνιση επιληπτικών κρίσεων. Η εργασία αυτή έχει ως στόχο να εξετάσει τις συνέπειες της προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη και της επιληπτογένεσης στο ραβδωτό σώμα επίμυων Sprague Dawley ηλικίας 2 μηνών. Η προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη εφαρμόστηκε σε όλη τη διάρκεια της εγκυμοσύνης καθώς και για 2 εβδομάδες μετά τη γέννηση ενώ η επιληπτογένεση προκλήθηκε με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση της ουσίας πεντυλενοτετραζόλης (PTZ), που είναι ένας ανταγωνιστής των GABA υποδοχέων, την μεταγεννητική μέρα 21. Πειραματικά, πραγματοποιήθηκαν ιστοχημικές χρώσεις (χρώση σωματιδίων Nissl) και ανοσοϊστοχημεία σε στεφανιαίες τομές εγκεφάλων στην περιοχή του ραχιαίου (κερκοφόρος πυρήνας & κέλφος) και κοιλιακού (επικλινής πυρήνας) ραβδωτού σώματος. Επίσης πραγματοποιήθηκε χρώση κατά Golgi-Cox για την παρατήρηση της αρχιτεκτονικής των νευρικών κυττάρων στις παραπάνω περιοχές. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική μείωση της έντασης σήματος των σωματιδίων Nissl εξαιτίας της προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη στην περιοχή του ραχιαίου και κοιλιακού ραβδωτού σώματος ενώ μόνο στο κοιλιακό ραβδωτό σώμα η ένταση σήματος των σωματιδίων Nissl ήταν σημαντικά μειωμένη και στα ζώα που εκτέθηκαν προγεννητικά στην αιθανόλη σε σχέση με τα ζώα που εκτέθηκαν προγεννητικά στην αιθανόλη και τους χορηγήθηκε PTZ. Ο συνολικός αριθμός των κυττάρων στην περιοχή του ραχιαίου και κοιλιακού ραβδωτού σώματος δεν φάνηκε να επηρεάζεται από την προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη και την επιληπτογένεση. Σκοπός της εργασίας ήταν η καλύτερη κατανόηση των επιπτώσεων της προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη και της επιληπτογένεσης στο ραβδωτό σώμα επίμυων με στόχο την εξαγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων για τον άνθρωπο. Περαιτέρω έρευνες κρίνεται αναγκαίο να πραγματοποιηθούν για την βαθύτερη μελέτη των μηχανισμών με τους οποίους η προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη προκαλεί δυσμενείς επιπτώσεις στον εγκέφαλο.

Abstract

Prenatal exposure to ethanol has a variety of consequences in humans such as facial deformities, developmental disorders, mental retardation and possible seizures. This work aims to examine the consequences of prenatal ethanol exposure and epileptogenesis in the striatum of 2-month-old Sprague Dawley rats. Prenatal exposure to ethanol was applied throughout pregnancy as well as for 2 weeks after birth while epileptogenesis was induced by intraperitoneal administration of pentylenetetrazol (PTZ), an antagonist of GABA_A receptors, on postnatal day 21. Experimentally, histochemical stains (Nissl bodies staining) and immunohistochemistry were performed on coronal brain sections in the dorsal (caudate nucleus & putamen) and ventral (nucleus accumbens) striatum. Golgi-Cox staining was also performed to observe the architecture of nerve cells in the above areas. Results showed a significant decrease in signal density of Nissl bodies due to prenatal exposure to ethanol in the region of the dorsal and ventral striatum, while only in the ventral striatum the signal density of Nissl bodies was also significantly reduced in animals prenatally exposed to ethanol in relation to animals prenatally exposed to ethanol and PTZ. The total number of cells in the dorsal and ventral striatum did not appear to be affected by prenatal ethanol exposure and epileptogenesis. The aim of this work was a better understanding of the effects of prenatal ethanol exposure and epileptogenesis in rat striatum in order to provide useful information for humans. Further research is needed to further study the mechanisms by which prenatal ethanol exposure causes adverse effects on the brain.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη

Η κατανάλωση αιθανόλης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης μπορεί να έχει επιβλαβείς συνέπειες στην φυσιολογική ανάπτυξη του νευρικού ιστού του εμβρύου καθώς και άλλες αρνητικές επιπτώσεις οι οποίες στο σύνολό τους περιγράφονται ως διαταραχές του φάσματος έκθεσης στην αιθανόλη κατά την εγκυμοσύνη (fetal alcohol spectrum disorders, FASD) [1]. Κατηγορίες του FASD είναι το εμβρυϊκό αλκοολικό σύνδρομο (fetal alcohol syndrome, FAS) [1], που είναι και η πιο σοβαρή [2], το μερικό εμβρυϊκό αλκοολικό σύνδρομο (partial fetal alcohol syndrome, pFAS), η νευροαναπτυξιακή διαταραχή που σχετίζεται με την αιθανόλη (alcohol-related neurodevelopmental disorder, ARND), οι ανωμαλίες κατά τη γέννηση που σχετίζονται με την αιθανόλη (alcohol-related birth defects, ARBD) και η νευροψυχιατρική διαταραχή που σχετίζεται με την προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη (neurobehavioral disorder associated with prenatal alcohol exposure, ND-PAE) [1].

Η κατηγοριοποίηση της κάθε διαταραχής που εξετάζεται λόγω προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη σε μία από τις παραπάνω κατηγορίες γίνεται με βάση κάποια εξωτερικά και συμπεριφορικά στοιχεία που παρατηρούνται στα άτομα τα οποία είναι χαρακτηριστικά για κάθε κατηγορία αλλά δεν διαφέρουν πολύ μεταξύ τους [1]. Μερικά από τα χαρακτηριστικά αυτά που αφορούν συγκεκριμένα το FAS είναι δυσμορφίες στο πρόσωπο όπως μικρό άνοιγμα ματιών, λεπτό άνω χείλος, λείο δέρμα στην περιοχή κάτω από τη μύτη και πάνω από το άνω χείλος, διαταραχές στην ανάπτυξη σχετικά με το βάρος και το ύψος, μη φυσιολογική ανάπτυξη του εγκεφάλου με συνέπεια μικρή περιφέρεια κεφαλιού, προβλήματα στη δομή του εγκεφάλου και εμφάνιση επιληπτικών κρίσεων, δυσλειτουργίες γνωστικού χαρακτήρα που αφορούν για παράδειγμα την μνήμη, την μάθηση και την αντίληψη καθώς και προβλήματα στη συμπεριφορά [1].

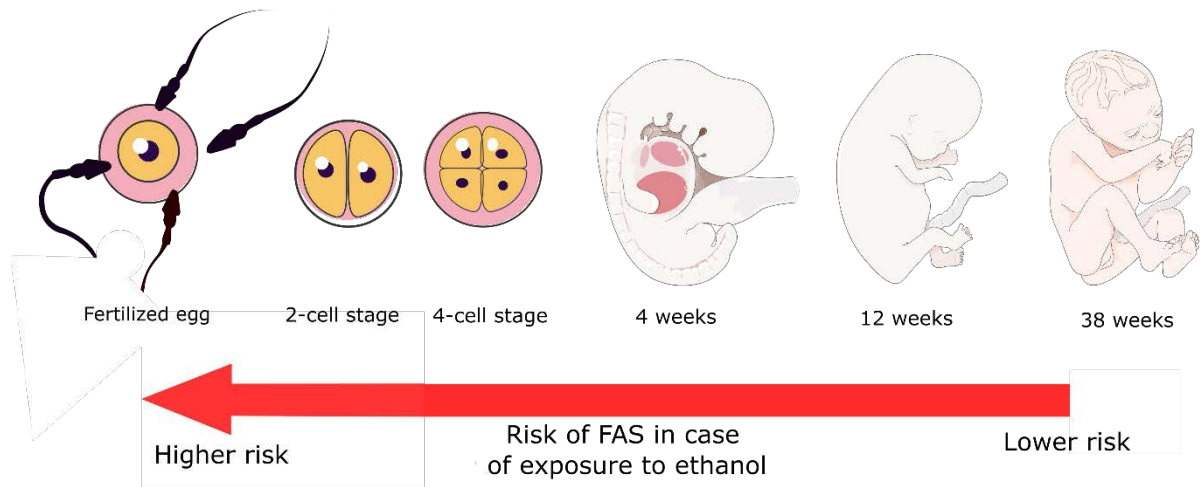
Η διάγνωση των FASD είναι ζωτικής σημασίας να γίνεται όσο το δυνατόν νωρίτερα για την επιλογή κατάλληλων παρεμβάσεων στο παιδί ώστε να αντιμετωπιστούν αποτελεσματικά οι όποιες επιπτώσεις [1]. Παρ' όλα αυτά, σε πολλές περιπτώσεις ατόμων με FASD δεν γίνεται σωστή διάγνωση καθώς τα εξωτερικά χαρακτηριστικά που αναφέρθηκαν παραπάνω δεν εμφανίζονται σε όλα τα άτομα. Επίσης, παιδιά

μεγαλύτερης ηλικίας και ενήλικες είναι δυσκολότερο να διαγνωστούν καθώς τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που μαρτυρούν διαταραχή FASD δεν είναι τόσο εμφανή μετά την εφηβεία [1].

Δύο βασικοί παράγοντες που καθορίζουν τη σοβαρότητα των επιπτώσεων της προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη είναι η ποσότητα της αιθανόλης στην οποία εκτίθεται το έμβρυο καθώς και το αναπτυξιακό στάδιο κατά το οποίο πραγματοποιείται η έκθεση [1,2]. Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα της αιθανόλης στην οποία εκτίθεται το έμβρυο τόσο μεγαλύτερη ζημιά προκαλείται σε αυτό. Σημαντικό ρόλο έχει και ο τρόπος με τον οποίο γίνεται η έκθεση καθώς μεγάλη κατανάλωση αιθανόλης μία φορά έχει περισσότερες αρνητικές συνέπειες από ότι όταν η ίδια κατανάλωση γίνεται σε μεγαλύτερο διάστημα [1]. Σχετικά με το αναπτυξιακό στάδιο (Εικόνα 1) στο οποίο γίνεται η έκθεση, πολλά από τα κρίσιμα αναπτυξιακά στάδια του εγκεφάλου πραγματοποιούνται πολύ νωρίς κατά την κύηση και όταν η έκθεση στην αιθανόλη γίνεται κατά τα στάδια αυτά οι επιπτώσεις στο έμβρυο είναι σοβαρότερες [1] (Εικόνα 1). Μάλιστα, η έκθεση στην αιθανόλη κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης θεωρείται ότι έχει 12 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να προκαλέσει την διαταραχή FAS [2]. Για παράδειγμα, οι δυσμορφίες στο πρόσωπο φαίνεται να προκαλούνται από έκθεση στην αιθανόλη κατά τη διαδικασία της γαστρίδωσης η οποία γίνεται την 3^η και 4^η εβδομάδα της ανθρώπινης κύησης [1] και είναι αποτέλεσμα της αποπτωτικής δράσης της αιθανόλης στα κύτταρα της κρανιακής νευρικής ακρολοφίας [2].

Το ποσοστό γεννήσεων με FASD δεν έχει πλήρως καθοριστεί όμως έχουν γίνει προσπάθειες εκτίμησης του. Σχετικά με το FAS, μία έρευνα το 2002 [3] έδειξε ότι 0,2 με 1,5 άτομα κάθε 1000 γεννήσεις έχουν τη διαταραχή FAS, ενώ αντίστοιχη έρευνα που διεξήχθη το 2010 [4] βρήκε 0,3 παιδιά στις 1000 γεννήσεις να προκύπτουν με FAS [1]. Σε μία έρευνα το 2014 [5] που εξετάστηκε συνολικά το FASD βρέθηκε να εμφανίζεται σε 24-48 άτομα στις 1000 γεννήσεις [1]. Η ίδια έρευνα έδειξε ότι 6 με 9 παιδιά στις 1000 γεννήσεις παρουσιάζουν FAS [5], κάτι που αποτελεί ένδειξη ότι το ποσοστό εμφάνισης της διαταραχής αυτής φαίνεται να αυξάνει. Σημαντικό στοιχείο είναι επίσης ότι το κόστος για κάθε άτομο με FAS ανέρχεται στα 2 εκατομμύρια δολάρια το χρόνο. Στο κόστος αυτό συμπεριλαμβάνονται προγράμματα θεραπείας, υπηρεσίες ψυχικής φροντίδας, σύστημα ποινικής δικαιοσύνης καθώς και υπηρεσίες μακροχρόνιας φροντίδας [1].

Embryo Development



Εικόνα 1: Όσο νωρίτερα κατά την κύηση το έμβρυο εκτεθεί στην αιθανόλη τόσο σοβαρότερες είναι οι επιπτώσεις κύησης και τόσο μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης FAS καθώς, κρίσιμα στάδια ανάπτυξης του εγκεφάλου πραγματοποιούνται στα πρώτα αυτά στάδια της. Για παράδειγμα, οι δυσμορφίες στο πρόσωπο που είναι χαρακτηριστική συνέπεια της προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη φαίνεται να προκαλούνται με έκθεση κατά τη διάρκεια της 3^{ης} και 4^{ης} εβδομάδας της κύησης όπου γίνεται και η διαδικασία της γαστριδίωσης [1]. (Συγγραφέας: Κορσκετίδης Χρήστος).

Όπως αναφέρθηκε, η προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις στη φυσιολογική ανάπτυξη του εγκεφάλου. Αυτές οι επιπτώσεις περιλαμβάνουν την μείωση του συνολικού όγκου του εγκεφάλου εξαιτίας μείωσης της φαιάς ουσίας, καθώς και προβλήματα στη διασύνδεση των νευρώνων μεταξύ τους [1]. Ως αποτέλεσμα επηρεάζονται γνωστικές και συμπεριφορικές λειτουργίες οι οποίες ελέγχονται από περιοχές του εγκεφάλου στις οποίες η αιθανόλη έχει επίδραση. Οι περιοχές του εγκεφάλου οι οποίες είναι γνωστό ότι επηρεάζονται από την προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη είναι το μεσολόβιο, η παραγκεφαλίδα, το ραβδωτό σώμα, ο ιππόκαμπος, τα βασικά γάγγλια, ο θάλαμος και η αμυγδαλή [1]. Αυτές οι περιοχές στο σύνολό τους ελέγχουν διάφορες σημαντικές λειτουργίες οι οποίες φαίνεται να υπολειτουργούν σε άτομα που εκτέθηκαν προγεννητικά στην αιθανόλη. Παραδείγματα τέτοιων λειτουργιών είναι ο συντονισμός των κινήσεων, η γενική ικανότητα απόκτησης γνώσης, η ικανότητα μάθησης και χρήσης της γλώσσας, η ικανότητα επίλυσης προβλημάτων, ο σχεδιασμός, η μνήμη και η οπτική αντίληψη [1].

Η αιθανόλη μπορεί πολύ εύκολα και άμεσα να διαπεράσει τον πλακούντα και να συσσωρευτεί στο αμνιακό υγρό [2]. Ο ρυθμός αποβολής της αιθανόλης από την

περιοχή που βρίσκεται το έμβρυο είναι πιο αργός σε σχέση με αυτόν της μητέρας (συγκεκριμένα 3-4% του ρυθμού αποβολής της μητέρας) με αποτέλεσμα την παρατεταμένη χρονικά έκθεση του εμβρύου. Σε αυτό συμβάλει και η διαφορά στην ποσότητα και αποτελεσματικότητα των ενζύμων της μητέρας σε σχέση με αυτά του εμβρύου [2]. Πιο συγκεκριμένα, κατά τον μεταβολισμό της αιθανόλης στον ενήλικα, την μετατροπή της αιθανόλης σε ακεταλδεΐδη αναλαμβάνει κυρίως η κυτταροπλασματική αλκοολική αφυδρογονάση και σε μικρότερο βαθμό το CYP2E1 του ήπατος. Αυτό φαίνεται και από τους δείκτες K_m των ενζύμων αυτών για την αιθανόλη αφού η K_m της αλκοολικής αφυδρογονάσης είναι 4,5mg/dL ενώ του CYP2E1 είναι 74mg/dL. Ο μεταβολισμός της αιθανόλης από το CYP2E1 έχει μεγάλη σημασία όταν η συγκέντρωση της αιθανόλης είναι μεγάλη (>4,5mg/dL στο αίμα) και επέρχεται ο κορεσμός της αλκοολικής αφυδρογονάσης [2]. Στον μεταβολισμό της αιθανόλης στο έμβρυο τα πράγματα είναι διαφορετικά αφού εκεί το CYP2E1 του πλακούντα είναι το κύριο μεταβολικό ένζυμο. Η αιθανόλη έχει μεγαλύτερη συγγένεια για το CYP2E1 του πλακούντα σε σχέση με την αλκοολική αφυδρογονάση ενώ το ήπαρ του εμβρύου παράγει CYP2E1 νωρίτερα στην ανάπτυξη συγκριτικά με την αλκοολική αφυδρογονάση. Ο τρόπος μεταβολισμού της αιθανόλης στο έμβρυο όπως επίσης ότι οι συγκεντρώσεις των εμβρυικών ενζύμων, όπως και του CYP2E1, παραμένουν χαμηλές κατά την κύηση έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη επίδραση της αιθανόλης στο έμβρυο λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης της στο αμνιακό υγρό και της μειωμένης δυνατότητας αποβολής [2]. Ποσότητες του CYP2E1 έχουν βρεθεί και στον εγκεφαλικό ιστό του εμβρύου. Εκεί κατά τον μεταβολισμό της αιθανόλης παράγονται ως παραπροϊόντα ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) οι οποίες προκαλούν υπεροξειδωση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών, κάτι που τελικά οδηγεί σε μη ελεγχόμενη απόπτωση και καταστροφή του εγκεφαλικού ιστού εξαιτίας της μείωσης της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κυττάρου και της κυτταρικής και μιτοχονδριακής βλάβης που προκαλείται από τις ROS. Η αιθανόλη, επίσης, μπορεί απευθείας να ενεργοποιήσει τα συστατικά του ενδογενούς μονοπατιού της απόπτωσης στο κύτταρο [2].

Ο καλύτερος τρόπος αντιμετώπισης των FASD είναι να σταματήσει η κατανάλωση αιθανόλης από μητέρες κατά την εγκυμοσύνη [2]. Όμως, λόγω του αυξημένου ποσοστού των γυναικών που καταναλώνουν αιθανόλη κατά την κύηση, έχουν προταθεί θεραπευτικές προσεγγίσεις που βασίζονται σε συμπληρώματα διατροφής. Τα

συμπληρώματα αυτά περιέχουν ουσίες με αντιοξειδωτική δράση ώστε να αντισταθμιστεί η οξειδωτική δράση που προκαλεί η αιθανόλη στο έμβρυο και παραδείγματα τέτοιων ουσιών είναι η βιταμίνη C και E, η ασταξανθίνη και η κουρκουμίνη οι οποίες όμως δεν έχουν πάρει έγκριση λόγω των πιθανών παρενεργειών που μπορεί να έχουν στο έμβρυο, όπως μειωμένο βάρος [2].

1.2 Επιληψία

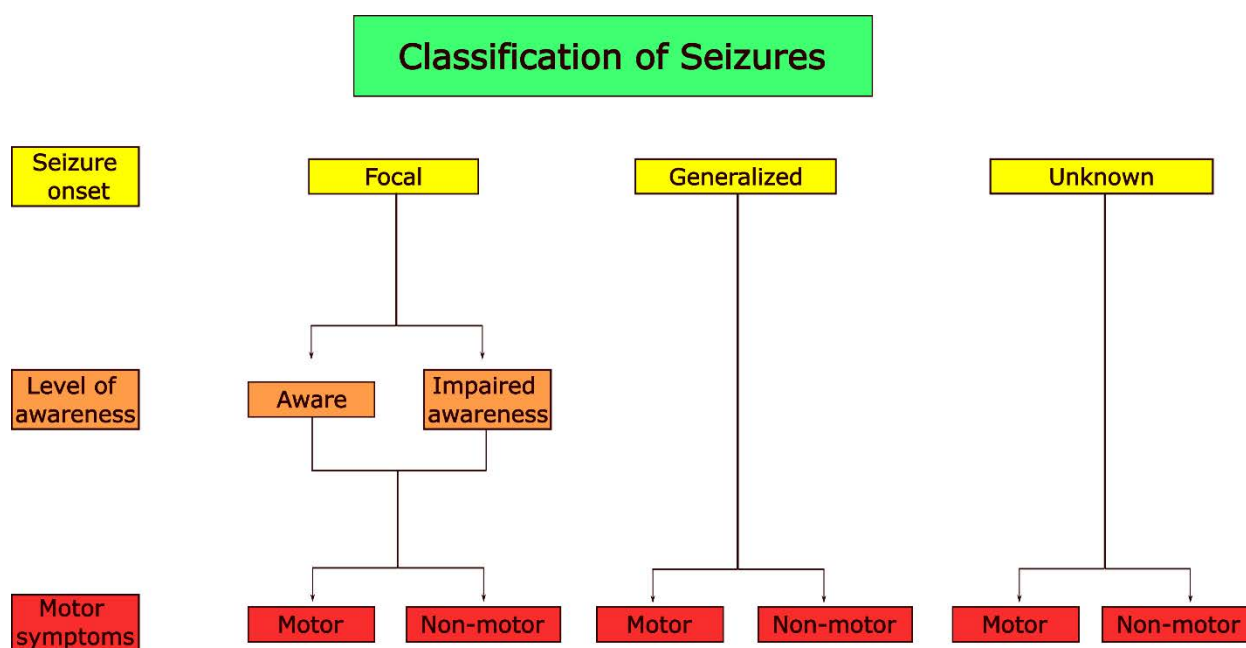
Η επιληπτική κρίση είναι αποτέλεσμα μη φυσιολογικής ηλεκτρικής δραστηριότητας του εγκεφάλου και μπορεί να προκαλέσει σπασμούς [6]. Η επιληψία ορίζεται ως δύο επιληπτικές κρίσεις που συμβαίνουν με διαφορά μεγαλύτερη των 24 ωρών, ή μία κρίση αλλά με υψηλό ποσοστό επανάληψης ($\geq 60\%$) ή όταν υπάρχει κάποιο επιληπτικό σύνδρομο [7]. Είναι μία κατάσταση που εμφανίζεται σε 70 εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως με μεγαλύτερο αριθμό εμφάνισης σε βρέφη κάτω του 1^{ος} έτους και σε άτομα μεγαλύτερα από 50 ετών [6]. Η συχνότητα εμφάνισης επιληψίας είναι 4-12 ανά 1000 άτομα, αλλά σε χώρες χαμηλού εισοδήματος το ποσοστό αυτό είναι αυξημένο μάλλον εξαιτίας των χειρότερων συνθηκών διαβίωσης όπως κακή υγιεινή, χειρότερο σύστημα παροχής υγείας και αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης λοιμώξεων [6,8]. Παράγοντες που μπορούν να προκαλέσουν επιληψία είναι αναπτυξιακές δυσπλασίες στον εγκέφαλο, τραυματισμός στο κεφάλι, μολύνσεις, όγκοι, εγκεφαλική αγγειακή νόσος σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας καθώς και το γενετικό υπόβαθρο των ασθενών [6]. Η επιληψία συνυπάρχει συνήθως με ασθένειες ψυχιατρικής φύσεως όπως η κατάθλιψη, η αγχώδης διαταραχή και ο αυτισμός ή ασθένειες όπως ο διαβήτης τύπου 1 και οι καρδιαγγειακές παθήσεις [6].

Σύμφωνα με τη νέα κατηγοριοποίηση των τύπων επιληψίας και επιληπτικών κρίσεων, γίνεται διάκριση με βάση τον τρόπο έναρξης της κρίσης σε εστιακές κρίσεις όταν η κρίση ξεκινά από ένα συγκεκριμένο σημείο του εγκεφάλου στη μία πλευρά αυτού, σε γενικευμένες κρίσεις οι οποίες επηρεάζουν και τις δύο πλευρές του εγκεφάλου και σε άγνωστης αιτιολογίας όταν δεν είναι γνωστός ο τρόπος έναρξης της κρίσης (Εικόνα 2) [6,34]. Οι γενικευμένες κρίσεις στις περισσότερες περιπτώσεις φαίνεται να έχουν γενετική βάση ενώ οι εστιακές κρίσεις φαίνεται να προκαλούνται λόγω δομικών εγκεφαλικών ανωμαλιών [6]. Αξίζει να σημειωθεί ότι μία εστιακή κρίση μπορεί να είναι απλή και να αφορά μία μικρή περιοχή του εγκεφάλου με μικρή επιρροή στο άτομο

ή πιο σύνθετη και να προκαλέσει σύγχυση και ανικανότητα απόκρισης σε ερωτήσεις για μερικά λεπτά [35]. Επίσης, μία εστιακή κρίση μπορεί να ξεκινήσει από ένα σημείο στον εγκέφαλο αλλά στην συνέχεια να εξαπλωθεί και στις δύο πλευρές του εγκεφάλου και τελικά να δημιουργηθεί μία γενικευμένη κρίση [35]. Ακόμα, μία άγνωστης αιτιολογίας κρίση μπορεί αργότερα να ταξινομηθεί ως εστιακή ή γενικευμένη αν υπάρξουν περισσότερες πληροφορίες για αυτή [34]. Σε μία δεύτερη σειρά ταξινόμησης, οι κρίσεις διακρίνονται ανάλογα με το επίπεδο επίγνωσης του ατόμου κατά την επιληπτική κρίση [6,34]. Οι εστιακές κρίσεις διακρίνονται σε εστιακές κρίσεις επίγνωσης (απλές εστιακές κρίσεις) ή εστιακές κρίσεις μειωμένης επίγνωσης (σύνθετες εστιακές κρίσεις) καθώς το άτομο μπορεί να έχει πλήρη ή μειωμένη επίγνωση της πραγματικότητας κατά τη διάρκεια της κρίσης. Στις γενικευμένες κρίσεις τα άτομα έχουν μειωμένη επίγνωση της πραγματικότητας [34]. Τέλος, οι κρίσεις διακρίνονται ανάλογα με το αν υπάρχουν κινητικά συμπτώματα κατά τη διάρκεια των κρίσεων [6,34]. Όλες οι κρίσεις (εστιακές, γενικευμένες, άγνωστης αιτιολογίας) μπορούν να διακριθούν σε κινητικές ή μη κινητικές. Οι κινητικές κρίσεις χαρακτηρίζονται από ρυθμικές σπασμωδικές κινήσεις (κλονικές κρίσεις), οι μύες μπορεί να χαλαρώσουν και να γίνουν αδύναμοι (ατονικές κρίσεις) ή δύσκαμπτοι (τονικές κρίσεις) ή να χαρακτηρίζονται από μικρές μυϊκές συσπάσεις (μυοκλονικές κρίσεις) [34,35]. Κατά τις εστιακές κρίσεις, τα κινητικά συμπτώματα μπορεί να χαρακτηρίζονται επίσης και από αυτοματισμούς ή επαναλαμβανόμενες κινήσεις όπως το τρίψιμο χεριών ή το δάγκωμα χειλιών [34]. Οι μη κινητικές γενικευμένες κρίσεις χαρακτηρίζονται από έλλειψη κίνησης, συνήθως τα άτομα κοιτάνε επίμονα ένα συγκεκριμένο σημείο ενώ μπορεί να χαρακτηρίζονται και από πολύ μικρές συσπάσεις μυών που αφορούν συγκεκριμένα σημεία του σώματος, πολύ συχνά τα βλέφαρα [34,35]. Οι μη κινητικές εστιακές κρίσεις χαρακτηρίζονται από αλλαγές στις αισθήσεις, τα συναισθήματα, τις σκέψεις, ενώ μπορεί να εμφανιστούν κύματα ζέστης ή κρύου και αύξηση στον καρδιακό ρυθμό [34].

Η επιληπτογένεση οφείλεται σε ανισορροπία που εμφανίζεται στην διεγερτική και ανασταλτική ηλεκτρική δραστηριότητα του εγκεφάλου [6]. Αυτή μπορεί να οφείλεται σε μη φυσιολογικά αυξημένη διεγερτική δραστηριότητα ή μη φυσιολογικά μειωμένη ανασταλτική δραστηριότητα αλλά έχει βρεθεί ότι και μη φυσιολογικά αυξημένη ανασταλτική δραστηριότητα μπορεί να προκαλέσει επιληψία (επιληψία χωρίς σπασμούς) [9]. Η επιληψία μπορεί να είναι θανατηφόρα με τον ξαφνικό θάνατο που οφείλεται στην επιληψία να αποτελεί τον πιο συχνό λόγο πρόκλησης θανάτου από

επιληψία [6]. Η συχνότητα αυτού του τύπου θανάτου είναι 1-2 ανά 1000 άτομα τον χρόνο και συμβαίνει κυρίως στα άτομα ηλικίας 20-40 ετών. Τα αίτια φαίνεται να είναι άγνωστα αλλά έχει παρατηρηθεί ότι είναι μία κατάσταση που σχετίζεται με τον ύπνο και οι συχνές κρίσεις αποτελούν τον μεγαλύτερο παράγοντα κινδύνου, ειδικά όταν συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της νύκτας [6].



Εικόνα 2: Ταξινόμηση των επιληπτικών κρίσεων ανάλογα με τον τρόπο έναρξης της κρίσης, το επίπεδο επίγνωσης κατά την κρίση και τα κινητικά συμπτώματα. Σε όλες τις γενικευμένες κρίσεις τα άτομα θεωρείται ότι έχουν μειωμένη επίγνωση. Μία εστιακή κρίση μπορεί να εξαπλωθεί και να προκύψει μία γενικευμένη κρίση (focal to bilateral seizure). Επίσης, μία άγνωστης αιτιολογίας κρίση μπορεί να θεωρηθεί αταξινομήτη (unclassified) αν δεν υπάρχουν επαρκείς πληροφορίες για αυτήν. (Συγγραφέας: Κορσκετίδης Χρήστος).

Όπως αναφέρθηκε, η επιληψία μπορεί να έχει γενετική βάση. Έχουν βρεθεί περισσότερα από 30 γονιδιακές μεταλλάξεις οι οποίες σχετίζονται με την εμφάνιση επιληψίας [6]. Τα γονίδια που σχετίζονται με την προδιάθεση εμφάνισης επιληψίας κωδικοποιούν κυρίως διαύλους ιόντων αλλά έχει βρεθεί ότι μπορεί να κωδικοποιούν και υποδοχείς, μεταγραφικούς παράγοντες και ένζυμα [6]. Για την εμφάνιση επιληψίας πρέπει να υπάρχει συνεισφορά πολλαπλών μεταλλάξεων σε διαφορετικά γονίδια και όχι απλά μία μετάλλαξη σε ένα γονίδιο, κάτι που κάνει την μελέτη της γενετικής βάσης της επιληψίας περίπλοκη [6]. Η γονιδιακή προδιάθεση αφορά κυρίως γενικευμένες αλλά μπορεί να αφορά και εστιακές κρίσεις [6].

Η διάγνωση της επιληψίας είναι δύσκολη και βασίζεται σε ένα λεπτομερές ιστορικό συμπτωμάτων του ασθενούς καθώς και στην οπτική παρατήρηση των κρίσεων [6]. Ένα μη φυσιολογικό ηλεκτροεγκεφαλογράφημα μπορεί να βοηθήσει στην διαπίστωση επιληπτογένεσης στον εγκέφαλο και να αποτελέσει ένδειξη επιληψίας ενώ είναι πολύ χρήσιμο στη διάκριση μεταξύ γενικευμένης ή εστιακής επιληψίας [6]. Στη διαπίστωση επιληπτογενών δομικών βλαβών στον εγκέφαλο το MRI έχει σημαντική συνεισφορά [6].

Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις της επιληψίας βασίζονται κυρίως σε φαρμακευτική αγωγή και χειρουργική επέμβαση [6]. Σκοπός της φαρμακευτικής αγωγής είναι να σταματήσουν οι κρίσεις όσο το δυνατόν νωρίτερα γίνεται και να μειωθεί ο κίνδυνος ξαφνικού θανάτου που μπορεί να προέλθει από πολύ συχνές κρίσεις. Παρά την ποικιλία φαρμάκων κατά της επιληψίας, η φαρμακολογική προσέγγιση έχει αποτέλεσμα μόνο στο 66% των ατόμων με επιληψία και μάλιστα σε κάποια από τα άτομα αυτά οι επιληπτικές κρίσεις δεν θεραπεύονται πλήρως [6]. Σημαντικοί παράμετροι για την εφαρμογή κατάλληλης φαρμακευτικής αγωγής είναι ο τύπος της επιληψίας (γενικευμένη ή εστιακή), ο τύπος των κρίσεων (κινητικές ή μη κινητικές), η ηλικία, το φύλο, η ικανότητα αναπαραγωγής, η ύπαρξη κι άλλων ασθενειών (συννοσηρότητα) και οι αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα που λαμβάνουν οι ασθενείς [6]. Άλλοι παράγοντες που πρέπει να εξετάζονται είναι το στάδιο στο οποίο βρίσκεται ο ασθενής, δηλαδή η συχνότητα των κρίσεων που εμφανίζει, αν έχει φυσιολογικό ή όχι ηλεκτροεγκεφαλογράφημα ή αν έχει κάποια δομική εγκεφαλική ανωμαλία. Είναι λοιπόν απαραίτητο η φαρμακευτική αγωγή που θα χορηγηθεί σε κάθε ασθενή να είναι εξατομικευμένη για όσο το δυνατόν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα και λιγότερες παρενέργειες [6]. Η χειρουργική επέμβαση θεωρείται η καλύτερη θεραπευτική μέθοδος για την αντιμετώπιση της επιληψίας [6]. Εφαρμόζεται σε άτομα στα οποία η φαρμακευτική αγωγή δεν έχει κάποια σημαντική ή καθόλου επίδραση και κατά τη διαδικασία αυτή αφαιρείται ή αποσυνδέεται από το υπόλοιπο νευρωνικό δίκτυο του εγκεφάλου η περιοχή η οποία είναι υπεύθυνη για τις επιληπτικές κρίσεις [6]. Το ποσοστό επιτυχίας της χειρουργικής επέμβασης στην αντιμετώπιση της επιληψίας κυμαίνεται από 50-80% και φαίνεται ότι η μέθοδος αυτή βελτιώνει κατά πολύ την ποιότητα ζωής προσδίδοντας μεγαλύτερη ανεξαρτησία στα άτομα ενώ μειώνεται ο κίνδυνος ξαφνικού θανάτου. Παρά τα θετικά, η χειρουργική επέμβαση δεν χρησιμοποιείται ευρέως κυρίως λόγω του φόβου των ασθενών αλλά και των κινδύνων

που ελλοχεύουν όπως καταστροφή εγκεφαλικού ιστού χωρίς πρόθεση και ο κίνδυνος επιμόλυνσης [6].

1.3 Προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη και επιληψία

Η προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη που προκαλεί κάποια μορφή FASD έχει συσχετισθεί με αυξημένο ρίσκο για εμφάνιση επιληπτικών κρίσεων και επιληψίας [10]. Μία μελέτη (Stephanie H. Bell et al., 2010) αξιοποιώντας δεδομένα ασθενών από 2 κλινικές που φιλοξενούσαν άτομα με FASD εξέτασε 425 άτομα ηλικίας 2-49 ετών τα οποία αποδεδειγμένα είχαν κάποια διαταραχή FASD [10]. Τα άτομα αυτά ήταν σε κατά περίπτωση ίσο αριθμό ≤ 14 ετών (219 άτομα) και ≥ 15 ετών (206 άτομα) ενώ η αναλογία αρσενικών/θηλυκών ατόμων ήταν 60:40. Το 20% των ατόμων αυτών διαγνώστηκε με FAS ή pFAS ενώ το υπόλοιπο 80% διαγνώστηκε με ARND [10]. Από τα άτομα που εξετάστηκαν βρέθηκε ότι 25 (5,9%) από αυτά είχαν επιληψία ενώ άλλα 50 (11,8%) εμφάνισαν έστω μία φορά επιληπτική κρίση. Συνολικά δηλαδή, 75 (17,7%) ασθενείς με FASD από τους 425 που εξετάστηκαν βρέθηκε ότι είχαν ιστορικό εμφάνισης επιληπτικών κρίσεων [10]. Η ίδια μελέτη έδειξε ότι οι ασθενείς με FASD είχαν μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης επιληψίας ή επιληπτικών κρίσεων όταν η προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη πραγματοποιήθηκε στο 1^ο τρίμηνο της κύησης ή σε όλη τη διάρκεια της εγκυμοσύνης καθώς και ότι ο πιο συχνός τύπος επιληψίας που εμφανιζόταν ήταν σύνθετες εστιακές κρίσεις ή κρίσεις χωρίς σπασμούς [10]. Επίσης, εξετάστηκαν αν και άλλοι παράμετροι αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης επιληψίας ή επιληπτικών κρίσεων και βρέθηκε ότι ο μη φυσιολογικός τοκετός και η προγεννητική έκθεση σε φάρμακα μπορεί να αυξήσει αυτή τη πιθανότητα με στατιστικώς σημαντικό τρόπο ή τρόπο που πλησιάζει τη σημαντικότητα αντίστοιχα [10]. Συμπερασματικά, οι ασθενείς με FASD είχαν αυξημένο ρίσκο εμφάνισης επιληψίας ή επιληπτικών κρίσεων, καθώς το ποσοστό εμφάνισης ήταν στο 17,7% των ασθενών ενώ το αντίστοιχο ποσοστό εμφάνισης επιληψίας στον γενικό πληθυσμό είναι 0,6% [10].

Στους επίμυες η προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη φαίνεται ότι μπορεί να προκαλέσει διαφορετικά αποτελέσματα από αυτά που προκαλεί στον άνθρωπο [11]. Σε μία μελέτη (Ernest L. Abel et al., 1992) θηλυκοί επίμυες Sprague-Dawley κατανάλωσαν υγρή διατροφή που περιείχε αιθανόλη κατά την εγκυμοσύνη από την προγεννητική μέρα 8 έως την γέννηση [11]. Συγκεκριμένα υπήρχαν 4 ομάδες θηλυκών

εγκύων επίμυων όπου η υγρή διατροφή περιείχε 0%, 17,5% και 35% αιθανόλη ενώ υπήρχε και μία ομάδα που κατανάλωσε απλή στερεή τροφή (chow ad lib.). Τη μεταγεννητική μέρα 21 έγινε ο απογαλακτισμός και επιλέχθηκαν οι θηλυκοί μόνο απόγονοι οι οποίοι τράφηκαν με απλή στερεή τροφή μέχρι την ηλικία των 35 ημερών [11]. Στις 35 ημέρες έγινε χορήγηση πεντυλενοτερταζόλης (PTZ) μέσω ενδοπεριτοναϊκής ένεσης συγκέντρωσης 30, 40 ή 45 mg/kg στους θηλυκούς απογόνους και οι επίμυες παρατηρήθηκαν για 10 λεπτά μετά την ένεση ως προς την εμφάνιση τονικών ή κλονικών κρίσεων στα πρόσθια και οπίσθια άκρα [11]. Από τις παρατηρήσεις φάνηκε αρχικά ότι όσο μεγαλύτερη ήταν η δόση PTZ που χορηγήθηκε, τόσο μικρότερη ήταν η καθυστέρηση για εμφάνιση κρίσεων. Επίσης, οι επίμυες που εκτέθηκαν προγεννητικά στην αιθανόλη είχαν μεγαλύτερη καθυστέρηση για εμφάνιση κρίσεων από τους επίμυες των ομάδων ελέγχου, ένα φαινόμενο που ήταν ιδιαίτερα εμφανές στη δόση PTZ 40 mg/kg όπου στατιστική ανάλυση έδειξε ότι οι ομάδες 35% και 17,5% διέφεραν σημαντικά ως προς την καθυστέρηση εμφάνισης κρίσεων από την ομάδα 0% [11]. Ακόμα, οι ομάδες 0% και κατανάλωσης στερεής τροφής δεν διέφεραν σημαντικά στην πρόκληση κρίσεων σε καμία δόση PTZ ενώ στατιστική σημαντικότητα στην καθυστέρηση εμφάνισης κρίσεων ανάμεσα στις ομάδες 0%, 17,5% και 35% υπήρχε μόνο στην δόση PTZ 40 mg/kg [11]. Συμπερασματικά, από την μελέτη φάνηκε ότι η προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη μπορεί να μειώσει την ευαισθησία των επίμυων στην πρόκληση επιληπτικών κρίσεων από την ουσία PTZ αλλά είναι ένα φαινόμενο που εξαρτάται από τη δόση PTZ και στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε στην ενδιάμεση δόση που εφαρμόστηκε στα 40 mg/kg [11].

1.4 Πειραματικά μοντέλα

1.4.1 Πειραματικά μοντέλα αλκοολισμού

Τα πειραματικά μοντέλα αλκοολισμού είναι πολύ χρήσιμα εργαλεία για τους ερευνητές καθώς μπορούν να μελετήσουν τις βλαβερές επιπτώσεις της αιθανόλης με μεθόδους που δεν μπορούν να εφαρμοστούν στους ανθρώπους [12]. Οι στόχοι της έρευνας με τη βοήθεια πειραματικών μοντέλων αλκοολισμού μπορεί να διαφέρουν καθώς μπορεί να έχουν ως βάση τη μελέτη της εξάρτησης και του εθισμού που προκαλεί η αιθανόλη, της καταστροφής που προκαλείται από την αιθανόλη σε κάποιο συγκεκριμένο όργανο (π.χ. εγκέφαλος) ή τις επιπτώσεις στη συμπεριφορά [12]. Αναλόγως του στόχου των

ερευνητών καθώς και της προσαρμογής διάφορων επιθυμητών παραμέτρων (π.χ. επίτευξη επιθυμητών επιπέδων αιθανόλης στο αίμα), επιλέγεται το πρωτόκολλο έκθεσης στην αιθανόλη το οποίο περιλαμβάνει τον τρόπο έκθεσης στην αιθανόλη (οδός χορήγησης), τη δόση και τη χρονική διάρκεια έκθεσης. Η έκθεση στην αιθανόλη που θα πραγματοποιηθεί είναι σημαντικό να είναι ικανή να προκαλέσει τις δυσμενείς επιπτώσεις της ώστε να γίνεται προσομοίωση με μία αντίστοιχη κατάσταση στον άνθρωπο [12]. Έχουν αναφερθεί ποικίλοι τρόποι έκθεσης των πειραματόζων στην αιθανόλη:

- **Μοντέλο φιάλης ελεύθερης επιλογής** (Free-choice bottle model) [12,13]. Το μοντέλο αυτό αποτελεί μία μη επεμβατική μέθοδο *per os* (από του στόματος) αυτοχορήγησης της αιθανόλης. Τα πειραματόζωα καταναλώνουν αιθανόλη οικειοθελώς καθώς μπορούν να επιλέξουν ανάμεσα σε μία φιάλη που περιέχει νερό και σε μία άλλη που περιέχει διάλυμα αιθανόλης [13]. Μετρήσεις του ποσού της αιθανόλης που καταναλώθηκε γίνεται με μέτρηση του βάρους της φιάλης που περιέχει αιθανόλη κάθε 24 ώρες ενώ και μετρήσεις της συχνότητας προσέγγισης των φιαλών με την αιθανόλη είναι σημαντικές. Με τη μέθοδο αυτή συνήθως τα πειραματόζωα δεν πίνουν αρκετά ώστε να θεωρηθεί η κατανάλωση αιθανόλης υπερβολική, δηλαδή οι συγκεντρώσεις αιθανόλης στο αίμα να ξεπεράσουν τα 80mg/dL για επίμυες και τα 100mg/dL για ποντίκια. Συγκεντρώσεις αιθανόλης 8-12% θεωρούνται κατάλληλες για τέτοιου είδους μελέτες [13]. Αύξηση στην κατανάλωση αιθανόλης μπορεί να επιτευχθεί με την προσθήκη στο διάλυμα αιθανόλης ενός παράγοντα για βελτίωση της γεύσης ο οποίος μπορεί να είναι σουκρόζη ή ζαχαρίνη. Η μέθοδος έκθεσης στην αιθανόλη με αυτό τον τρόπο είναι χρήσιμη για τον υπολογισμό της αυθόρμητης πρόσληψης αιθανόλης και της μελέτης της οξείας ή μακροχρόνιας επίδρασης της αιθανόλης και χρησιμοποιείται συνήθως σε μελέτες εθισμού [13].
- **Υγρή διατροφή** (Liquid diet) [12,13]. Με αυτό τον τρόπο χορήγησης η αιθανόλη προστίθεται σε υψηλές συγκεντρώσεις σε υγρή τροφή ως μοναδική πηγή διατροφής, εξαναγκάζοντας έτσι τα πειραματόζωα να καταναλώνουν αιθανόλη [13]. Επειδή ο ρυθμός πρόσληψης τροφής δεν είναι ίδιος κατά τη διάρκεια της περιόδου φωτός/σκότους, η συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα μπορεί να κυμαίνεται ανάμεσα σε μεγάλο εύρος κατά τη διάρκεια ενός 24ώρου [13]. Παρόλα αυτά φαίνεται ότι η έκθεση στην αιθανόλη με αυτό τον τρόπο οδηγεί σε

ικανοποιητικές συγκεντρώσεις στο αίμα ώστε να προκύψουν οι δυσμενείς επιπτώσεις της αιθανόλης και μάλιστα να εμφανιστούν κλινικά συμπτώματα ανάλογα με αυτά που προκαλούνται από κατανάλωση αιθανόλης στον άνθρωπο όπως λιπώδες ήπαρ [13].

- **Ατμοί αιθανόλης (Alcohol vapor)** [13]. Στον τρόπο αυτό έκθεσης τα πειραματόζωα τοποθετούνται σε ειδικό θάλαμο ο οποίος γεμίζει με ατμούς αιθανόλης και η πρόσληψη από τα πειραματόζωα γίνεται μέσω εισπνοής [13]. Η μέθοδος αυτή είναι μη επεμβατική και επιτρέπει τον ορισμό της δόσης και του προτύπου που γίνεται η έκθεση σε αντίθεση με μεθόδους που η πρόσληψη αιθανόλης γίνεται όποτε τα πειραματόζωα το επιθυμήσουν [13]. Με τον τρόπο αυτό έκθεσης προκύπτουν ικανοποιητικά επίπεδα αιθανόλης στο αίμα και μπορούν να εμφανιστούν συμπτώματα εξάρτησης και εθισμού στην αιθανόλη [13].
- **Αυτοχορήγηση από πρόθεση (Operant self-administration)** [13]. Αυτός ο τρόπος χορήγησης εξετάζει το αν τα πειραματόζωα θα προκαλέσουν την πρόσληψη μίας ουσίας εκτελώντας μία ενέργεια. Τα πειραματόζωα τοποθετούνται σε ειδικά διαμορφωμένους θαλάμους που διαθέτουν μοχλούς τους οποίους μπορούν να πιέσουν και να προκαλέσουν την πρόσληψη της ουσίας (αυτοχορήγηση) [13]. Η χορήγηση της ουσίας γίνεται συνήθως με καθετήρα ο οποίος χορηγεί την ουσία ενδοφλεβίως στο πειραματόζωο αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι οδοί όπως από του στόματος στην περίπτωση της αιθανόλης [13]. Με αυτό τον τρόπο έκθεσης μελετάται ο εθισμός και οι ιδιότητες που έχουν ορισμένες ουσίες να προκαλούν την ενίσχυση της επιθυμίας στα πειραματόζωα για την αναζήτηση εξαρτησιογόνων ουσιών [13].

Διάλυμα αιθανόλης συγκεκριμένης συγκέντρωσης μπορεί επίσης να χορηγηθεί στα πειραματόζωα μέσω γαστρικού σωλήνα ή με ένεση ή, για παράδειγμα και σε συνδυασμό με τα παραπάνω, χορήγηση υγρής διατροφής μέσω γαστρικού σωλήνα [12]. Σημαντικό να ειπωθεί για τις μελέτες που χρησιμοποιούν πειραματικά μοντέλα αλκοολισμού είναι ότι ο τρόπος έκθεσης στην αιθανόλη με όποιο τρόπο και αν συμβαίνει δεν μπορεί να προσομοιώσει πλήρως τον τρόπο που ένας άνθρωπος εκτίθεται στην αιθανόλη [12]. Σε πολλές μελέτες η έκθεση στην αιθανόλη γίνεται, όπως αναφέρθηκε, με ένεση ή εισπνοή η οποία διαφέρει φυσικά της από του στόματος πρόσληψη στον άνθρωπο. Ακόμα και μελέτες που χρησιμοποιούν την *per os* χορήγηση (π.χ. μοντέλο φιάλης ελεύθερης επιλογής), το πρότυπο έκθεσης των πειραματόζωων

στην αιθανόλη σε σχέση με αυτό του ανθρώπου διαφέρει σημαντικά [12]. Παρόλα αυτά, όλα τα μοντέλα αλκοολισμού μπορούν να χρησιμοποιηθούν αξιόπιστα σε μελέτες εθισμού, καταστροφής κάποιου οργάνου και νευρολογικών επιπτώσεων που προκύπτουν από υπερβολική κατανάλωση αιθανόλης και να εξαχθούν χρήσιμες πληροφορίες [12].

1.4.2 Πειραματικά μοντέλα επιληψίας

Πολλά πειραματικά μοντέλα που εμφανίζουν επιληπτικές κρίσεις και επιληψία έχουν κατασκευαστεί ώστε να μιμούνται ποικίλους και διαφορετικούς τύπους κρίσεων [14]. Οι επίμυες είναι το πιο διαδεδομένο ζωικό μοντέλο επιληψίας αλλά έχουν χρησιμοποιηθεί κι άλλα ζωικά πρότυπα όπως ποντίκια, ψάρια ζέβρα, κουνέλια [14]. Τα ζωικά πρότυπα που χρησιμοποιούνται δεν μπορούν να προσομοιάσουν πλήρως μία μορφή επιληψίας που εμφανίζεται στον άνθρωπο αλλά αποτελούν χρήσιμα εργαλεία για τη μελέτη του μηχανισμού των επιληπτικών κρίσεων και την εύρεση αποτελεσματικών φαρμάκων για την αντιμετώπιση τους [14,15,16]. Οι τρόποι επαγωγής επιληψίας σε πειραματόζωα είναι:

- **Χημικά επαγόμενες κρίσεις.** Οι πιο διαδεδομένες ουσίες για την πρόκληση επιληψίας είναι το καϊνικό οξύ και η πιλοκαρπίνη [15]. Οι ουσίες αυτές μπορούν να προκαλέσουν επιληψία κροταφικού λοβού (temporal lobe epilepsy, TLE) η οποία είναι η πιο συχνή μορφή επιληψίας που εμφανίζεται στους ανθρώπους [15]. Το καϊνικό οξύ είναι ανάλογο του L-γλουταμικού οξέος και η χορήγησή του σε πειραματόζωα μπορεί να προκαλέσει εκπόλωση νευρώνων και επιληπτική κρίση με κυριότερο στόχο την περιοχή του ιπποκάμπου. Η πιλοκαρπίνη είναι αγωνιστής μουςκαρινικών υποδοχέων της ακετυλοχολίνης και χορήγησή της μπορεί να προκαλέσει επιληπτικές κρίσεις σε πειραματόζωα τα συμπτώματα των οποίων έχουν πολλές ομοιότητες με συμπτώματα ανθρώπων με TLE [15]. Άλλες ουσίες που μπορούν να επάγουν επιληπτικές κρίσεις είναι η πεντυλενοτετραζόλη (PTZ), η στρυχνίνη, το N-μέθυλο-D-ασπαρτικό οξύ (NMDA), η φλουροθύλη, η τοξίνη του τετάνου και η πενικιλίνη οι οποίες χρησιμοποιούνται συνήθως για την επαγωγή οξείας επιληπτικής κρίσης [14,15]. Εκτός από τα μοντέλα οξείας επιληπτικής κρίσης υπάρχουν και χρόνια μοντέλα όπως το chemical kindling που μπορεί να γίνει με επαναλαμβανόμενη χορήγηση κάποιας επιληπτογόνου ουσίας [14]. Συγκεκριμένα το PTZ, που χρησιμοποιήθηκε για την επαγωγή επιληπτικών

κρίσεων στην παρούσα μελέτη, είναι μία ουσία που προσδένεται και δρα ως ανταγωνιστής στους GABA υποδοχείς και μέσω χορήγησης με ένεση στην ουραία φλέβα ή με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση μπορεί να ασκήσει την επιληπτογενή δράση της. Οι επίμυες στο μοντέλο PTZ παρουσιάζουν ακούσιες κινήσεις του κεφαλιού και των άκρων και εμφανίζουν γενικευμένες κρίσεις αλλά το PTZ μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την επαγωγή μυοκλονικών μοντέλων, μοντέλων κατάστασης status epilepticus αλλά και μοντέλων επιληψίας χωρίς σπασμούς σε Sprague-Dawley επίμυες [14]. Επίσης το μοντέλο PTZ χρησιμοποιείται ευρέως στην έρευνα με σκοπό την αναζήτηση νέων αντιεπιληπτικών φαρμάκων [14].

➤ **Ηλεκτρικά επαγόμενες κρίσεις.** Επιληπτικές κρίσεις μπορούν να επαχθούν στα πειραματόζωα με εφαρμογή ηλεκτροσόκ [14,15,16]. Σε αυτή την περίπτωση, το ηλεκτροσόκ εφαρμόζεται μία φορά συνήθως στον κροταφικό λοβό με ηλεκτρόδιο για λίγα δευτερόλεπτα και δεν απαιτείται η εμφύτευση του ηλεκτροδίου στον εγκέφαλο του ζώου [14,15,16]. Η συχνότητα εφαρμογής είναι συνήθως 6 HZ στα ποντίκια και 50-60 HZ στους επίμυες και μπορούν να προκύψουν μυοκλονικές κρίσεις ή και γενικευμένες κρίσεις εάν αυξηθεί η ένταση του ηλεκτροσόκ [15]. Το μοντέλο επαγωγής κρίσεων με ηλεκτροσόκ χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό σε μελέτες εύρεσης και επιλογής ουσιών με αντιεπιληπτική δράση [14,15,16]. Ένας άλλος τρόπος ηλεκτρικής επαγωγής κρίσεων είναι το electrical kindling. Το electrical kindling είναι ο πιο καλά μελετημένος τρόπος επαγωγής κρίσεων με ηλεκτρισμό και πραγματοποιείται με επαναλαμβανόμενη εφαρμογή ηλεκτρισμού μέσω ηλεκτροδίου που εμφυτεύεται σε μία συγκεκριμένη περιοχή του εγκεφάλου, όπως για παράδειγμα η αμυγδαλή και ο ιππόκαμπος [14,16], κάτι που τελικά οδηγεί σε αυθόρμητες κρίσεις και την εγκαθίδρυση μίας μόνιμης επιληπτικής κατάστασης [14,15]. Είναι λοιπόν ένα χρόνιο μοντέλο επιληψίας το οποίο συμβάλει σημαντικά στη μελέτη και κατανόηση του μηχανισμού δημιουργίας επιληπτικών κρίσεων και στην ανακάλυψη νέων αντιεπιληπτικών φαρμάκων [15,16].

➤ **Μοντέλα κρίσεων στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο.** Όπως είναι γνωστό ο ανθρώπινος εγκέφαλος κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης έχει αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης επιληπτικών κρίσεων [15]. Αυτό συμβαίνει γιατί στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο η διεγερτική δραστηριότητα, η οποία είναι απαραίτητη για διαδικασίες όπως η συναπτογένεση, είναι μεγαλύτερη από την ανασταλτική [15]. Έτσι, έχουν δημιουργηθεί πειραματικά μοντέλα για την μελέτη της κατάστασης αυτής στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο. Επιληπτικές κρίσεις λόγω υπερθέρμανσης από πυρετό

έχουν παρατηρηθεί σε παιδιά μέχρι 5 ετών σε συχνότητα 2-5%. Ένα μικρό ποσοστό από αυτά τα παιδιά αναπτύσσουν επιληψία [15]. Για τη μελέτη αυτού του τύπου κρίσεων, επίμυες 10-12 μέρες μετά τη γέννηση εκτίθενται με τη βοήθεια θερμού αέρα για 30 λεπτά στους 40-42°C [15]. Αυτοί οι επίμυες μπορούν να εμφανίσουν επιληπτικές κρίσεις, φυσικά πιο ήπιες από αυτές που επάγονται από κάποιο χημικό παράγοντα, ακόμα και αυθόρμητες κρίσεις κατά την ενήλικη ζωή τους [15], και σε κάποιες περιπτώσεις TLE [14]. Βέβαια, ο τρόπος πρόκλησης κρίσεων στα πειραματόζωα σε αυτή την περίπτωση είναι διαφορετικός σε σχέση με τον άνθρωπο όπου οι κρίσεις επάγονται από τον πυρετό, κάτι που υποδηλώνει ότι ο μηχανισμός ανάπτυξης κρίσεων μπορεί να είναι διαφορετικός στις δύο αυτές περιπτώσεις [15]. Η εγκεφαλοπάθεια λόγω υποξείας είναι η πιο συχνή αιτία εμφάνισης κρίσεων σε νεαρή ηλικία [15]. Για την μελέτη αυτής της περίπτωσης επίμυες ηλικίας 10-12 ημερών τοποθετούνται σε θάλαμο αερίων όπου η συγκέντρωση οξυγόνου είναι 4-7% για 15 λεπτά [15]. Αυτοί οι επίμυες μπορεί να εμφανίσουν αυθόρμητες κρίσεις αργότερα στη ζωή τους ενώ έχουν παρατηρηθεί και αλλαγές στη συμπεριφορά (π.χ. επιθετικότητα, απώλεια μνήμης) [14,15].

- **Μετατραυματική επιληψία.** Ο τραυματισμός του εγκεφάλου (Traumatic brain injury, TBI) μπορεί να οδηγήσει σε κρίσεις και τελικά σε μετατραυματική επιληψία (posttraumatic epilepsy, PTE) [15]. Δεδομένου ότι ο TBI μπορεί να προκληθεί με ποικίλους τρόπους και να επιφέρει κάθε φορά διαφορετικά αποτελέσματα, έχουν δημιουργηθεί πολλά μοντέλα που προσομοιάζουν την κατάσταση αυτή [15]. Το πιο διαδεδομένο και χρησιμοποιούμενο μοντέλο είναι αυτό της πρόκλησης τραυματισμού μέσω πίεσης υγρού (fluid percussion injury model, FPI). Σε αυτό το μοντέλο, η σκληρή μήνιγγα δέχεται πίεση από υγρό μέσω κρανιοτομής με τη βοήθεια ενός κλειστού υδραυλικού συστήματος, κάτι που οδηγεί σε τραυματισμό και πρόκληση επιληπτικών κρίσεων [14]. Αυτό το μοντέλο μπορεί να προκαλέσει γενικευμένες κρίσεις στα πειραματόζωα και προσομοιάζει τον TBI στον άνθρωπο καθώς προκαλεί ενδοκρανιακή αιμορραγία, οίδημα και δυσλειτουργίες σε γνωσιακές λειτουργίες, στην κίνηση και τη μνήμη [14].
- **Γενετικά μοντέλα επιληψίας.** Μέχρι τώρα έγινε αναφορά σε μοντέλα επιληψίας που εφαρμόζονται σε φυσιολογικά ζώα. Στην περίπτωση των γενετικών μοντέλων επιληψίας τα πειραματόζωα είναι γενετικά τροποποιημένα με τρόπο ώστε να είναι επιρρεπή στην εμφάνιση επιληπτικών κρίσεων. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν επίμυες που είναι γενετικά τροποποιημένοι με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι

ευαίσθητοι στην εμφάνιση επιληπτικών κρίσεων από κάποιο υψηλής έντασης ακουστικό ερέθισμα [14,15]. Πολλά ευαίσθητα σε ήχο στέλεχη έχουν δημιουργηθεί, όπως για παράδειγμα το Wistar Albino Glaxo/Rijwijk rat (WAG/Rij), με κάθε στέλεχος να χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένα συμπεριφορικά χαρακτηριστικά [15]. Το πρότυπο των ακουστικών ερεθισμάτων μπορεί να διαρκέσει για μεγάλο χρονικό διάστημα και να προκύψουν χρόνια μοντέλα που περιγράφονται ως audiogenic kindling [15]. Πειραματόζωα αυτού του μοντέλου μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη διαφόρων τύπων επιληψίας όπως η TLE αλλά και για τη μελέτη συνοσηροτήτων που συνοδεύουν την επιληψία όπως οι διαταραχές στη διάθεση, κατάθλιψη και άγχος [15]. Γενετικά μοντέλα επιληψίας κατασκευάζονται και για την επιληψία στην οποία απουσιάζουν οι επιληπτικές κρίσεις [14,15]. Στον άνθρωπο οι κρίσεις αυτές χαρακτηρίζονται από σύντομα μη σπασμωδικά επεισόδια κατά τα οποία παρατηρείται απώλεια των αισθήσεων και μειωμένη επίγνωση [15]. Πειραματόζωα αυτού του τύπου επιληψίας έχουν μεταλλάξεις οι οποίες ενισχύουν την έκφραση και την λειτουργία τασσεοεξαρτώμενων διαύλων Ca^{2+} ενώ τα πιο γνωστά μοντέλα επίμυων αυτής της κατηγορίας είναι τα Genetic Absence Epilepsy in Rats from Strasbourg (GAERS) και τα WAG/Rij [14,15].

- **Οπτογενετική.** Γενικευμένες επιληπτικές κρίσεις σε πειραματόζωα μπορούν να επαχθούν και με οπτογενετικές μεθόδους [14]. Με τη βοήθεια εργαστηριακά τροποποιημένων ιών μπορεί να προκληθεί η έκφραση διαύλων ευαίσθητων στο φως στην κυτταρική μεμβράνη νευρικών κυττάρων. Οι δίαυλοι αυτοί ονομάζονται δίαυλοι ροδοψίνης (Channelrhodopsins, ChRs) και είναι δίαυλοι κατιόντων που ανοίγουν με φωτεινά ερεθίσματα [14]. Με το άνοιγμά τους μπορεί να προκληθεί εκπόλωση των γενετικά τροποποιημένων κυττάρων που εκφράζουν τους ChRs και το αποτέλεσμα να είναι επιληπτική κρίση [14]. Ένα από τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι η έκφραση αυτών των διαύλων μπορεί να γίνει από συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω γενετικών τεχνικών που επιτρέπουν την επιλεκτική έκφραση των διαύλων ροδοψίνης σε κύτταρα που φέρουν συγκεκριμένους υποδοχείς ή δείκτες. Αυτή η επιλεκτικότητα καθιστά τη μέθοδο εξαιρετικά ακριβή, επιτρέποντας στους ερευνητές να μελετήσουν τις λειτουργίες συγκεκριμένων κυτταρικών πληθυσμών μέσα σε έναν πολύπλοκο ιστό, όπως είναι ο εγκέφαλος, χωρίς να επηρεάζουν άλλους κυτταρικούς τύπους [14].

Με τα παραπάνω μοντέλα επιληπτογένεσης μπορούν να προκύψουν πολλοί τύποι επιληψίας όπως η TLE, γενικευμένες ή εστιακές κρίσεις, μοντέλα αυθόρμητων ή μη κρίσεων, σπασμωδικές ή μη σπασμωδικές κρίσεις, μοντέλα status epilepticus, μοντέλα αφαιρέσεων [14,16]. Η επιλογή του μοντέλου γίνεται ανάλογα του στόχου του πειράματος [15,16]. Σε κάθε περίπτωση, όταν επιλέγεται κάποιο μοντέλο πρέπει να εξετάζονται τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα του μοντέλου αυτού καθώς, για παράδειγμα, οι επαγόμενες κρίσεις από κάποιο χημικό επιτρέπουν την γρήγορη ανίχνευση και μελέτη μηχανισμών επιληψίας και αντιεπιληπτικών ιδιοτήτων ουσιών αλλά προκαλούν υψηλά ποσοστά θνησιμότητας ενώ, αντίθετα, οι ηλεκτρικά επαγόμενες κρίσεις είναι λιγότερο βλαβερές για τα πειραματόζωα και μπορεί να γίνει καλύτερος έλεγχος των κρίσεων αλλά η διαδικασία επαγωγής είναι χρονοβόρα και έχει υψηλό κόστος [15].

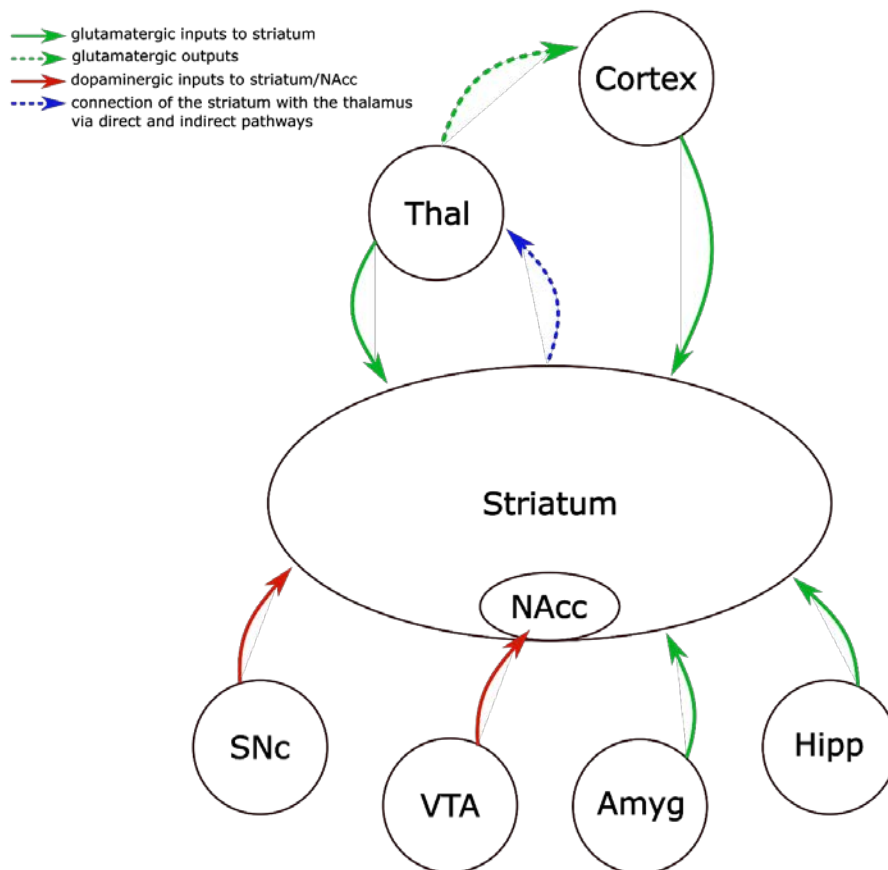
1.5 Ραβδωτό σώμα

Το ραβδωτό σώμα αποτελεί μέρος των βασικών γαγγλίων στον εγκέφαλο και οι βασικότερες λειτουργίες που επιτελεί είναι ο έλεγχος και σχεδιασμός των κινήσεων, η μάθηση κινήσεων και δεξιοτήτων, η ανταμοιβή, η λήψη αποφάσεων και η διαδικαστική μνήμη, δηλαδή η μνήμη που βοηθά στην εκτέλεση εργασιών χωρίς συνειδητή επίγνωση αυτών [17,18]. Το ραβδωτό σώμα μπορεί να διακριθεί σε υποπεριοχές με ξεχωριστό λειτουργικό ρόλο οι οποίες στα τρωκτικά είναι το πλαγιοραχιαίο ραβδωτό σώμα (dorsolateral striatum, DLS) και το μεσοραχιαίο ραβδωτό σώμα (dorsomedial striatum, DMS) που αποτελούν το ραχιαίο ραβδωτό σώμα (dorsal striatum, DS) και ο επικλινής πυρήνας (nucleus accumbens, NAc) που αποτελεί το κοιλιακό ραβδωτό σώμα (ventral striatum, VS) [18]. Η αντίστοιχη περιοχή του DLS και του DMS στα θηλαστικά είναι το κέλυφος του φακοειδούς πυρήνα (putamen nucleus) και ο κερκοφόρος πυρήνας (caudate nucleus), αντίστοιχα. Το DLS παίζει σημαντικό ρόλο στην εκτέλεση κινήσεων δεξιότητας και σε ενέργειες που έχουν γίνει συνήθεια ενώ το DMS σχετίζεται με συμπεριφορές για την επίτευξη ενός στόχου [18]. Η περιοχή DMS επιτελεί τη λειτουργία της μάθησης νέων κινήσεων και πράξεων με σκοπό ένα επιτυχημένο αποτέλεσμα που προσφέρει ανταμοιβή. Με το πέρασμα του χρόνου αυτές οι πράξεις γίνονται συνήθεια και δεν εξαρτώνται πλέον από τη λήψη κάποιας ανταμοιβής, δημιουργώντας έτσι έναν τύπο μνήμης. Η αποθήκευση αυτού του τύπου μνήμης γίνεται στην περιοχή DLS και πραγματοποιείται με μεταβολές στη συναπτική πλαστικότητα

των νευρώνων στο ραβδωτό σώμα [17]. Ο NAc ρυθμίζει λειτουργίες όπως το κίνητρο, η ανταμοιβή και ο εθισμός [17,18]. Στα θηλαστικά η ουρά του ραβδωτού σώματος (tail of striatum, TS) αναγνωρίζεται ως ξεχωριστή λειτουργικά περιοχή της οποίας ο ρόλος είναι η επεξεργασία αισθητήριων πληροφοριών και η προώθηση συμπεριφορών με βάση τις πληροφορίες αυτές [18].

Το ραβδωτό σώμα δέχεται γλουταμινεργική νεύρωση από τον φλοιό, τον θάλαμο, την αμυγδαλή και τον υπόκαμπο ενώ ντοπαμινεργικοί νευρώνες από τον μεσεγκέφαλο νευρώνουν επίσης την περιοχή (Εικόνα 3) [17,18]. Πιο συγκεκριμένα, ντοπαμινεργικοί νευρώνες από την κοιλιακή καλυπτρική περιοχή (ventral tegmental area, VTA) καταλήγουν στον επικλινή πυρήνα ενώ ντοπαμινεργικοί νευρώνες από την συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας (substantia nigra pars compacta, SNc) καταλήγουν στο ραχιαίο ραβδωτό σώμα και στις περιοχές DMS, DLS και TS [18]. Η δράση των ντοπαμινεργικών νευρώνων εξαρτάται από τη θέση τους και από το ποιες υποπεριοχές του ραβδωτού σώματος νευρώνουν [18]. Για παράδειγμα, ντοπαμινεργικοί νευρώνες που βρίσκονται στην SNc και νευρώνουν το DMS αποκρίνονται ισχυρά κατά τη διαδικασία της κίνησης ενώ έχουν αδύναμες αποκρίσεις σε διαδικασίες ανταμοιβής [18]. Με βάση τις πληροφορίες που δέχεται από τις περιοχές που το νευρώνουν, το ραβδωτό σώμα στέλνει πληροφορίες πίσω στον φλοιό μέσω του θαλάμου με την άμεση και έμμεση απαγωγική οδό. Επίσης, ο επικλινής πυρήνας μπορεί να ρυθμίσει την απελευθέρωση ντοπαμίνης στο ραβδωτό σώμα καθώς νευρώνει περιοχές στον μεσεγκέφαλο [18].

Σχετικά με τον τύπο των κυττάρων, το ραβδωτό σώμα συνίσταται κυρίως από τους μέσους ακανθώδεις νευρώνες (medium spiny neurons, MSNs) που είναι GABAεργικοί και σε πολύ μικρότερο ποσοστό από ενδονευρώνες οι οποίοι μπορεί να είναι GABAεργικοί ή χολινεργικοί [17,18]. Χαρακτηριστικό των MSNs είναι οι πολύ πυκνές νευρικές απολήξεις και μπορούν να διακριθούν σε D1 και D2 ανάλογα με τον ντοπαμινικό υποδοχέα που εκφράζουν [17]. Οι GABAεργικοί ενδονευρώνες μπορούν να διακριθούν σε fast-spiking και low-threshold spiking [17]. Χαρακτηριστικό των χολινεργικών ενδονευρώνων είναι τα μεγάλα κυτταρικά σώματα που διαθέτουν [17] και φαίνεται να έχουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του ρυθμού της μάθησης που επιτελείται στο ραβδωτό σώμα χωρίς να προκαλούν την έναρξη σημάτων με σκοπό την μάθηση [18].

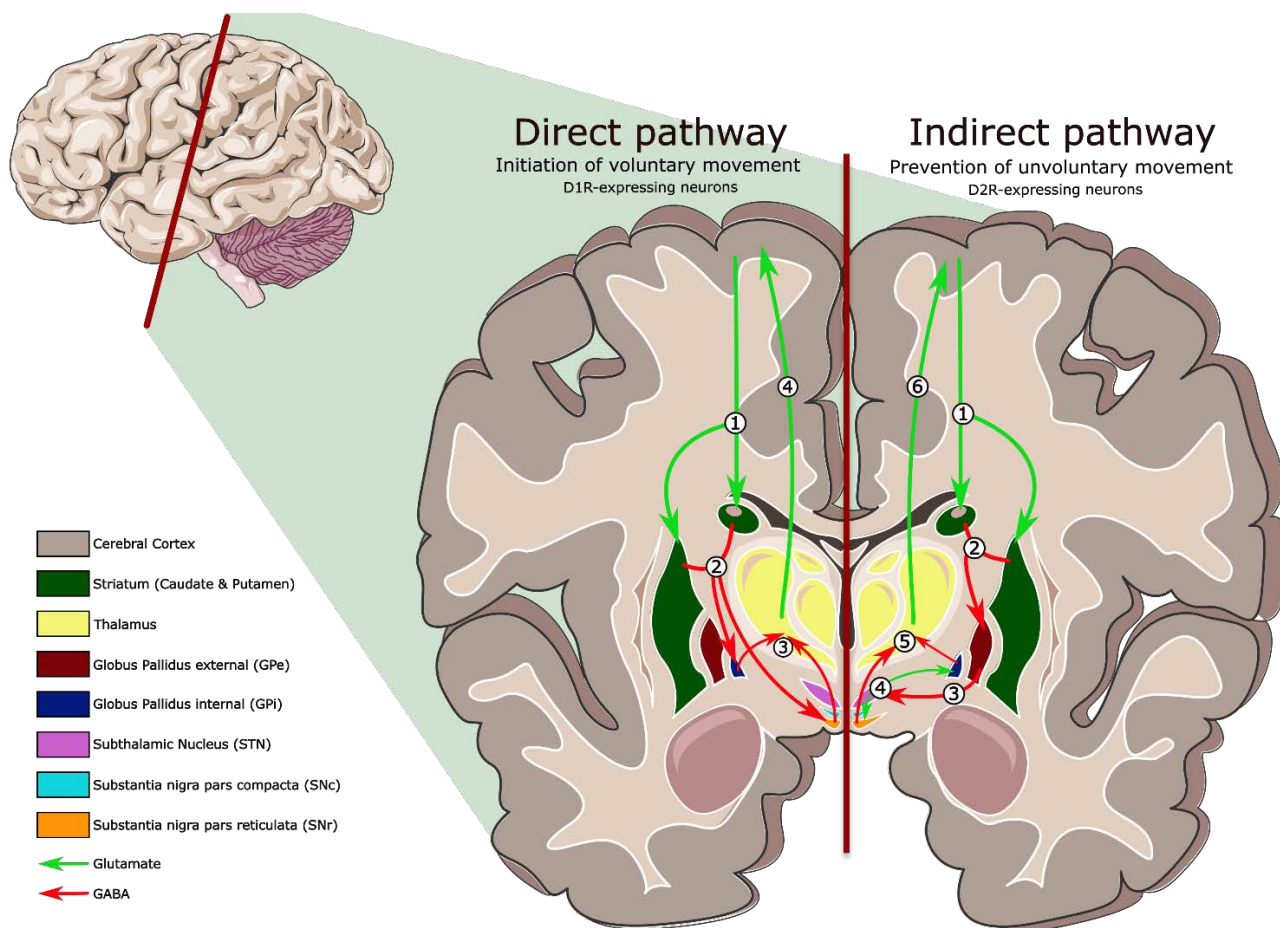


Εικόνα 3: Διασυνδέσεις του ραβδωτού σώματος με άλλες περιοχές στον εγκέφαλο. (Συντομογραφίες: Thal: Θάλαμος, Hipp: Ιππόκαμπος, Amyg: Αμυγδαλή, VTA: Κοιλιακή καλυπτική περιοχή, SNc: Συμπαγής μοίρα της μέλαινας ουσίας, NAcc: Επικλινής πυρήνας). (Συγγραφέας: Κορσκετίδης Χρήστος).

Η άμεση και έμμεση απαγωγική οδός στο ραβδωτό σώμα συμβάλλει στον έλεγχο των εκούσιων κινήσεων (Εικόνα 4) [17,18]. Όταν υπάρξει σήμα για την έναρξη μίας εκούσιας κίνησης, ο φλοιός στέλνει διεγερτικά σήματα στο ραβδωτό σώμα μέσω της γλουταμινεργικής νεύρωσης που διαθέτει [17]. Αυτά τα διεγερτικά σήματα ενεργοποιούν το ραβδωτό σώμα και τους MSN νευρώνες τύπου D1 (εκφράζουν κυρίως υποδοχείς ντοπαμίνης τύπου D1) οι οποίοι ενισχύουν την ανασταλτική νεύρωση που έχουν στην περιοχή της εσωτερικής ωχράς σφαίρας (globus pallidus internal, GPi) και της δικτυωτής μοίρας της μέλαινας ουσίας (substantia nigra pars reticulata, SNr), κάτι που έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της ανασταλτικής δράσης των περιοχών GPi και SNr σε νευρώνες του θαλάμου [17,18]. Έτσι, ο θάλαμος ενισχύει τη διεγερτική του νεύρωση προς τον φλοιό προκαλώντας την έναρξη της κίνησης. Αυτό είναι το άμεσο μονοπάτι ή η άμεση απαγωγική οδός του ραβδωτού σώματος. Όταν ο φλοιός στέλνει

διεγερτικά σήματα στο ραβδωτό σώμα ενεργοποιεί επίσης MSN νευρώνες, αλλά αυτή τη φορά νευρώνες τύπου D2 (εκφράζουν κυρίως υποδοχείς ντοπαμίνης τύπου D2). Οι νευρώνες αυτοί, μέσω ενίσχυσης των ανασταλτικών νευρικών προβολών τους στην περιοχή της εξωτερικής ωχράς σφαίρας (globus pallidus external, GPe), μειώνουν την ανασταλτική επίδραση της GPe στον υπο-θαλαμικό πυρήνα (subthalamic nucleus, STN) [17,18]. Έτσι, αυξάνεται η διεγερτική επίδραση του STN στις περιοχές GPi και SNr, οι οποίες με τη σειρά τους αυξάνουν την ανασταλτική επίδραση που έχουν στην περιοχή του θαλάμου [17,18]. Οι διεγερτικές προβολές του θαλάμου προς τον φλοιό μειώνονται και ως αποτέλεσμα σταματά η κίνηση. Αυτό είναι το έμμεσο μονοπάτι ή η έμμεση απαγωγική οδός του ραβδωτού σώματος. Είναι σημαντικό να ειπωθεί ότι η συμπαγής μοίρα της μέλαινας ουσίας (SNc) διαθέτει ντοπαμινεργικές νευρικές προβολές προς τους MSN νευρώνες του ραβδωτού σώματος και έτσι μπορεί να ασκήσει επίδραση στη άμεση και έμμεση απαγωγική οδό [17,18]. Η ντοπαμίνη ασκεί αντίθετη επίδραση στο άμεσο και στο έμμεσο μονοπάτι, αφού ενεργοποιεί D1 και D2 υποδοχείς αντίστοιχα, αλλά και στις δύο περιπτώσεις το αποτέλεσμα είναι η επαγωγή/έναρξη της κίνησης [17].

Η άμεση και έμμεση απαγωγική οδός έχουν αντίθετη δράση αφού προκαλούν την έναρξη και την αναστολή της κίνησης αντίστοιχα οπότε θα ήταν λογικό να υποθέσουμε ότι κατά την εκτέλεση των κινήσεων η άμεση οδός και οι MSNs τύπου D1 είναι ενεργοί ενώ η έμμεση οδός και οι MSNs τύπου D2 είναι ανενεργοί [18]. Παρόλα αυτά, και οι δύο οδοί είναι περισσότερο ενεργές κατά την εκτέλεση των κινήσεων παρά σε περιπτώσεις ακινησίας [18]. Αυτό συμβαίνει γιατί με αυτό τον τρόπο εξασφαλίζεται ο συντονισμός των κινήσεων με την επαγωγή επιθυμητών και ταυτόχρονα αναστολή μη επιθυμητών κινήσεων [18]. Αντιθέτως, σε διεργασίες λήψης αποφάσεων, οι MSNs τύπου D1 αυξάνουν τη δραστηριότητά τους σε περίπτωση ανταμοιβής ενώ οι MSNs τύπου D2 αυξάνουν τη δραστηριότητά τους σε περίπτωση απουσίας ανταμοιβής [18]. Αντίθετο αποτέλεσμα στη δραστηριότητα των τύπου D1 και D2 MSNs υπάρχει και κατά τη διαδικασία της μάθησης κινήσεων δεξιότητας όπου οι τύπου D1 MSNs ενισχύουν τη διαδικασία της μάθησης ενώ οι τύπου D2 MSNs την μειώνουν [18].



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση του άμεσου (αριστερά) και έμμεσου (δεξιά) μονοπατιού του ραβδωτού σώματος. Στα δύο αυτά μονοπάτια συμμετέχουν διάφορες περιοχές του εγκεφάλου οι οποίες επικοινωνούν μεταξύ τους μέσω γλουταμινικών και GABAεργικών νευρικών προεκτάσεων ενώ ο ρόλος των μονοπατιών είναι η έναρξη, ο έλεγχος και ο συντονισμός των εκούσιων κινήσεων. Η συμπαγής μοίρα της μέλαινας ουσίας (SNc) επιδρά στο άμεσο και έμμεσο μονοπάτι μέσω ντοπαμινικών νευρικών προεκτάσεων που διαθέτει στην περιοχή του ραβδωτού σώματος (Striatum) (δεν φαίνεται στην εικόνα), ενεργοποιώντας D1 και D2 υποδοχείς αντίστοιχα. (Συγγραφέας: Κορσκετίδης Χρήστος)

1.6 Επίδραση της έκθεσης στην αιθανόλη στην περιοχή του ραβδωτού σώματος

Πειράματα έχουν δείξει ότι η έκθεση στην αιθανόλη έχει σημαντική επίδραση στην περιοχή του ραβδωτού σώματος η οποία σχετίζεται με τη δομή και λειτουργία των νευρώνων που το απαρτίζουν. Σε μία μελέτη (James P. Rice et al., 2012) θηλυκοί επίμυες Long-Evans ηλικίας 3-4 μηνών κατανάλωσαν νερό βρύσης με ζαχαρίνη περιεκτικότητας 0,066% για 4 ώρες κάθε μέρα [19]. Τις πρώτες 2 μέρες το νερό με τη ζαχαρίνη περιείχε 0% v/v αιθανόλη, τις μέρες 3 και 4 η περιεκτικότητα σε αιθανόλη έγινε 2,5% v/v ενώ από την μέρα 5 η περιεκτικότητα σε αιθανόλη έγινε 5% v/v. Η διαδικασία αυτή διήρκεσε 2 εβδομάδες και έπειτα οι θηλυκοί επίμυες χωρίστηκαν σε

2 ομάδες οι οποίες ήταν η ομάδα ελέγχου και η ομάδα έκθεσης σε 5% v/v αιθανόλη [19]. Έπειτα από πρόκληση εγκυμοσύνης από αρσενικούς επίμυες, από την 1^η μέρα της κύησης οι θηλυκοί επίμυες εκτέθηκαν για 4 ώρες κάθε μέρα σε νερό με ζαχαρίνη με 0% v/v (ομάδα ελέγχου) ή 5% v/v (ομάδα έκθεσης) συγκέντρωση αιθανόλης, κάτι που συνεχίστηκε για όλη την περίοδο της κύησης και σταμάτησε κατά τη γέννηση. Ο απογαλακτισμός έγινε 24 μέρες μετά τη γέννηση και κατά τη μεταγεννητική μέρα 130 πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της ενδοκαρδιακής μονιμοποίησης και απομόνωσης των εγκεφάλων στους επίμυες ελέγχου και ομάδας έκθεσης [19]. Οι εγκεφαλοι επώαστηκαν σε διάλυμα για τον σκοπό της χρώσης κατά Golgi-Cox για 14 μέρες και έπειτα σε διάλυμα 30% w/v σουκρόζης για 3 μέρες. Οι ιστοί κόπηκαν σε στεφανιαίες τομές και παρατηρήθηκαν οι μέσοι ακανθώδεις νευρώνες (MSNs) στις περιοχές του ραχιαίου (DLS, DMS) και κοιλιακού (πυρήνας και κέλυφος επικλινούς πυρήνα) ραβδωτού σώματος για μέτρηση μήκους και διακλαδώσεων των δενδριτών καθώς και πυκνότητας των ακάνθων [19]. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στους εγκεφάλους των επίμυων που εκτέθηκαν προγεννητικά στην αιθανόλη το μήκος και ο αριθμός των διακλαδώσεων των νευρώνων ήταν στατιστικώς σημαντικά μειωμένα στην περιοχή του κελύφους του επικλινούς πυρήνα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου κατά περίπου 20%, κάτι που δεν παρατηρήθηκε στην περιοχή του πυρήνα του επικλινούς πυρήνα και στις περιοχές DLS και DMS [19]. Η προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη δεν φάνηκε να έχει κάποια στατιστικώς σημαντική επίδραση στην πυκνότητα των ακάνθων σε όλες τις περιοχές που εξετάστηκαν [19]. Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη με τον τρόπο που περιγράφηκε προκάλεσε σημαντική μείωση στο μήκος και τον αριθμό των διακλαδώσεων των MSNs μόνο στο κέλυφος του επικλινούς πυρήνα από τις περιοχές που εξετάστηκαν αν και στην περιοχή DLS παρατηρήθηκε αντίστοιχη μείωση προσεγγίζοντας μόνο τη στατιστική σημαντικότητα. Καμία επίδραση δεν παρατηρήθηκε στην πυκνότητα των ακάνθων σε όλες τις περιοχές [19].

Σε μία άλλη σειρά πειραμάτων, αρσενικοί επίμυες τύπου Sprague Dawley εκτέθηκαν σε ατμούς αιθανόλης για 12 ώρες κάθε μέρα για 10 μέρες (Veronica L. Peterson¹ et al., 2015) και εξετάστηκε η επίδραση της έκθεσης στην αιθανόλη στους MSN νευρώνες στην περιοχή του πυρήνα και του κελύφους του επικλινούς πυρήνα [20]. Συγκεκριμένα, οι εγκεφαλοι απομονώθηκαν με τη μέθοδο της ενδοκαρδιακής μονιμοποίησης, την 1^η ή την 7^η μέρα μετά την τελευταία έκθεση σε ατμούς αιθανόλης, και επώαστηκαν σε

διάλυμα χρώσης κατά Golgi-Cox για 14 μέρες και έπειτα σε διάλυμα σουκρόζης 30% w/v για 3 μέρες. Μετά την κοπή σε στεφανιαίες τομές πάχους 200μm, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σχετικά με το μήκος, τις διακλαδώσεις των δενδριτών καθώς και τη πυκνότητα των ακάνθων των MSN νευρώνων στον πυρήνα και το κέλυφος του επικλινούς πυρήνα [20]. Τα αποτελέσματα αρχικά έδειξαν ότι το συνολικό μήκος των δενδριτών των MSN νευρώνων ήταν στατιστικώς σημαντικά αυξημένο στην περιοχή του πυρήνα σε σχέση με το κέλυφος του επικλινούς πυρήνα στην ομάδα επίμυων που η απομόνωση των ιστών έγινε 7 μέρες μετά την τελευταία έκθεση σε ατμούς αιθανόλης, ενώ αντίστοιχα στατιστικώς σημαντική διαφορά δεν φάνηκε στις άλλες δύο ομάδες (ελέγχου και απομόνωσης 1 μέρα μετά την έκθεση) [20]. Τα αποτελέσματα μέτρησης του μήκους των δενδριτών σε σχέση με την απόσταση από το σώμα του νευρώνα έδειξε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μόνο στην περιοχή του πυρήνα και όχι στην περιοχή του κελύφους στις 3 ομάδες. Συγκεκριμένα, η απόσταση από το σώμα χωρίστηκε σε 7 τμήματα με 40μm το καθένα και στα τμήματα 2 (80μm από το σώμα), 5 (200μm από το σώμα) και 6 (απόσταση 240μm από το σώμα) το μήκος των δενδριτών ήταν στατιστικώς σημαντικά αυξημένο στην ομάδα που οι ιστοί συλλέχθηκαν 7 μέρες μετά την έκθεση στην αιθανόλη σε σχέση με τις άλλες δύο ομάδες, ενώ ανάμεσα στις άλλες ομάδες δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική διαφορά [20]. Τα αποτελέσματα σχετικά με τις διακλαδώσεις ακολούθησαν παρόμοιο μοτίβο με αυτά του μήκους. Οι διακλαδώσεις ήταν στατιστικώς σημαντικά αυξημένες στην περιοχή του πυρήνα σε σχέση με αυτή του κελύφους μόνο στους επίμυες της ομάδας απομόνωσης 7 μέρες μετά την απόσυρση των ατμών αιθανόλης [20]. Ο αριθμός των διακλαδώσεων σε σχέση με την σειρά της διακλάδωσης (branch order) είχε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μόνο στην περιοχή του πυρήνα και στη σειρά 4 (4th order branches). Αξίζει όμως να σημειωθεί ότι αυτή η διαφορά ήταν σημαντική μόνο ανάμεσα στην ομάδα 7 μέρες μετά την έκθεση και στην ομάδα 1 μέρα μετά την έκθεση και προέκυψε εξαιτίας της παρατηρούμενης μείωσης του αριθμού διακλαδώσεων της τελευταίας ομάδας [20]. Τέλος, σχετικά με την πυκνότητα των ακάνθων, διαφορές φάνηκαν μόνο στις άκανθες τύπου stubby και mushroom. Στην περιοχή του πυρήνα η ομάδα 7 ημερών μετά την έκθεση είχε στατιστικώς σημαντικά αυξημένη πυκνότητα ακάνθων τύπου stubby σε σχέση με τις υπόλοιπες δύο ομάδες ενώ η ομάδα 1 μέρας μετά την έκθεση είχε στατιστικώς σημαντικά αυξημένη πυκνότητα mushroom ακάνθων σε σχέση με τις υπόλοιπες δύο ομάδες [20]. Στην περιοχή του κελύφους η ομάδα 7 ημερών μετά την έκθεση είχε αυξημένες τιμές πυκνότητας stubby ακάνθων σε

σχέση με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα 1 μέρας μετά την έκθεση, με μόνο την τελευταία να είναι στατιστικώς σημαντικά διαφορετική [20].

Σε μία άλλη μελέτη (Erin Clabough et al., 2022) εξετάστηκε η επίδραση της οξείας έκθεσης στην αιθανόλη κατά τη φάση της συναπτογένεσης στους MSN νευρώνες στην περιοχή του ραχιαίου ραβδωτού σώματος [21]. Συγκεκριμένα σε ποντίκια τύπου C57BL6/J τη μεταγενετική μέρα 6, που αντιστοιχεί σε περίοδο της διαδικασίας συναπτογένεσης, χορηγήθηκε με υποδόρια ένεση διάλυμα 20% αιθανόλης (δόσης 2,5g/kg) ή φυσιολογικός ορός (ζώα ελέγχου), κάτι που επαναλήφθηκε 2 ώρες αργότερα [21]. Οι εγκεφαλοι απομονώθηκαν 24 ώρες, 1 μήνα και 5 μήνες μετά την έκθεση και με τη μέθοδο Golgi-Cox οι νευρώνες βάφτηκαν για να εξεταστεί ο αριθμός, το μήκος, ο αριθμός των κόμβων των δενδριτών καθώς και η πυκνότητα των ακάνθων. Επίσης, έγινε ανάλυση κάποιων πρωτεϊνικών δεικτών [21]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η έκθεση στην αιθανόλη αύξησε το μήκος των δενδριτών των MSN νευρώνων 24 ώρες μετά την έκθεση, κάτι που όμως φαίνεται να αποκαθίσταται στους 5 μήνες καθώς εκεί δεν υπήρχε σημαντική διαφορά ανάμεσα στα ζώα ελέγχου και στα ζώα της ομάδας έκθεσης. Ο αριθμός των κόμβων των δενδριτών ήταν στατιστικώς σημαντικά αυξημένος στα ζώα της ομάδας έκθεσης σε σχέση με τα ζώα ελέγχου 24 ώρες μετά την έκθεση, αλλά αυτή η διαφορά δεν παρατηρήθηκε αντίστοιχα στον 1 μήνα. Σχετικά με τον αριθμό των δενδριτών, τα ζώα που εκτέθηκαν στην αιθανόλη είχαν στατιστικώς σημαντικά αυξημένο αριθμό δενδριτών στον 1 μήνα μετά την έκθεση σε σχέση με την αντίστοιχη ομάδα ελέγχου ενώ στις 24 ώρες δεν φάνηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά αλλά υπήρχε η τάση για αντίστοιχη αύξηση του αριθμού των δενδριτών στα ζώα που εκτέθηκαν στην αιθανόλη. Στους 5 μήνες δεν υπήρχε επαρκές μέγεθος δείγματος για να προκύψει κάποιο αποτέλεσμα με στατιστική ισχύ σχετικά με τον αριθμό των δενδριτών [21]. Η οξεία έκθεση στην αιθανόλη προκάλεσε, επίσης, στατιστικώς σημαντική μείωση στον αριθμό των ακάνθων στην ομάδα που εκτέθηκε στην αιθανόλη 24 ώρες μετά την έκθεση όμως 1 μήνα μετά ο αριθμός αυτός αντίστοιχα αυξήθηκε. Στους 5 μήνες δεν φάνηκε κάποια διαφορά στον αριθμό των ακάνθων αλλά τα αποτελέσματα δεν είχαν επαρκή στατιστική ισχύ [21]. Μελέτες για το μήκος και τον τύπο των ακάνθων δεν έδειξαν κάποια διαφορά ανάμεσα στις 2 ομάδες που μελετήθηκαν αλλά σε αυτές τις μελέτες, εκτός από τη μελέτη του μήκους των ακάνθων στον 1 μήνα, δεν υπήρχε επαρκής στατιστική ισχύ για να βγει ένα ασφαλές συμπέρασμα [21]. Τέλος, στις 24 ώρες μετά την έκθεση εκτιμήθηκαν τα επίπεδα των

πρωτεϊνών φρακταλκίνη, HSP-90 και PSD-95 που μπορούν να αποτελέσουν δείκτες μεταβολής του αριθμού των ακάνθων, των διακλαδώσεων των δενδριτών και πιθανής δημιουργίας νέων συνάψεων αντίστοιχα λόγω της επίδρασης της αιθανόλης. Τα επίπεδα της φρακταλκίνης δεν φάνηκε να επηρεάζονται από την έκθεση στην αιθανόλη σε αντίθεση με τα επίπεδα των HSP-90 και PSD-95 τα οποία αυξήθηκαν λόγω της έκθεσης στην αιθανόλη με την HSP-90 όμως να αυξάνεται μη στατιστικά σημαντικά [21]. Συμπερασματικά, η οξεία έκθεση στην αιθανόλη που πραγματοποιήθηκε προκάλεσε αύξηση στο μήκος των δενδριτών 24 ώρες μετά την έκθεση αλλά παράλληλα μείωση στον αριθμό των ακάνθων. Ο αριθμός των δενδριτών και των ακάνθων ήταν αυξημένος στα ζώα που εκτέθηκαν στην αιθανόλη 1 μήνα μετά την έκθεση αλλά οι διαφορές αυτές φαίνεται να εξαφανίζονται κατά την ενηλικίωση (5 μήνες μετά την έκθεση) [21].

Η έκθεση στην αιθανόλη φαίνεται ότι μπορεί να επηρεάσει και με άλλους τρόπους την λειτουργία του ραβδωτού σώματος. Η οξεία έκθεση στην αιθανόλη (Michael S. Patton et al., 2023) συγκέντρωσης 50mM σε ποντικούς C57BL/6J 2-4 μηνών προκάλεσε ενίσχυση της GABAεργικής νευροδιαβίβασης από την ωχρά σφαίρα και τον θάλαμο προς τους GABAεργικούς ενδονευρώνες τύπου fast-spiking του ραβδωτού σώματος, κάτι που εξασθένησε με τη χρόνια έκθεση στην αιθανόλη η οποία προκύπτει με έκθεση των ποντικών σε ατμούς αιθανόλης συγκέντρωσης 1,8-2% για 16 ώρες/μέρα για 4 μέρες/εβδομάδα για συνολικά 5 εβδομάδες [22]. Ακόμα, η έκθεση σε αιθανόλη με ενδοπεριτοναϊκή ένεση σε επίμυες Long-Evans συγκέντρωσης 0,5g/kg ή 1g/kg (B.A. Blanchard et al., 1993) αλλά και η έκθεση μέσω ατμών αιθανόλης 0,1-0,15 mg/dL σε C57BL/6J ποντικούς (Sebastiano Bariselli et al., 2023) φαίνεται ότι προκαλεί μεταβολές στα επίπεδα ντοπαμίνης που απελευθερώνονται στην περιοχή του ραχιαίου ραβδωτού σώματος και του επικλινούς πυρήνα [23,24].

1.7 Επίδραση της επιληπτογένεσης στην περιοχή του ραβδωτού σώματος

Η επιληπτογένεση φαίνεται ότι προκαλεί αλλαγές στην δραστηριότητα των νευρώνων στην περιοχή του ραβδωτού σώματος. Σε μία μελέτη (Saskia Kücker et al., 2010) εφαρμόστηκε ηλεκτρικό kindling με τη βοήθεια ηλεκτροδίου σε θηλυκούς Wistar επίμυες το οποίο τοποθετήθηκε στην περιοχή της πλαγιοβασικής αμυγδαλής στο δεξί

ημισφαίριο και εξετάστηκε η επίδραση του στα νευρικά κύτταρα του ραβδωτού σώματος [25]. Διεγέρσεις σταθερού ρεύματος 500μΑ για 1 δευτερόλεπτο πραγματοποιήθηκαν την ίδια ώρα 1 φορά την ημέρα μέχρι να προκληθούν τουλάχιστον 10 κρίσεις, κάτι που αντιστοιχεί στο στάδιο 5 της ταξινόμησης κρίσεων κατά τον Racine [26]. Στην μελέτη χρησιμοποιήθηκαν και άλλες 2 ομάδες επίμυων όπου στην μία πραγματοποιήθηκε εμφύτευση ηλεκτροδίου στην περιοχή της αμυγδαλής όπως στην ομάδα kindled αλλά δεν εφαρμόστηκε ηλεκτρικό ρεύμα (Sham-kindled) ενώ στην άλλη δεν πραγματοποιήθηκε εμφύτευση ηλεκτροδίου (Naïve) [25]. Μία μέρα πριν γίνουν οι ηλεκτροφυσιολογικές μετρήσεις εφαρμόστηκε ηλεκτρικό ρεύμα στην ομάδα των kindled επίμυων μία ακόμη φορά. Για τη πραγματοποίηση των μετρήσεων δραστηριότητας των νευρώνων του ραβδωτού σώματος ένα μικροηλεκτρόδιο τοποθετήθηκε στο ραβδωτό σώμα [25]. Ο ρυθμός αυθόρμητης εκφόρτισης των νευρώνων υπολογίστηκε για χρονικό διάστημα 5 λεπτών ενώ αξιολογήθηκε και το πρότυπο των αυθόρμητων αυτών εκφορτίσεων. Ως πρώτη παρατήρηση οι νευρώνες του ραβδωτού σώματος των naïve ζώων είχαν πολύ μικρή δραστηριότητα (μέχρι 5 spikes/s) και στα δύο ημισφαίρια [25]. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι ο ρυθμός αυθόρμητης εκφόρτισης των νευρώνων στο ραβδωτό σώμα του αριστερού ημισφαιρίου στην ομάδα των kindled επίμυων ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένος σε σχέση με την ομάδα των naïve επίμυων [25]. Αντίστοιχη σημαντική διαφορά δεν υπήρχε όταν συγκρίθηκε η ομάδα των sham-kindled επίμυων με τους επίμυες της ομάδας naïve και kindled. Σημαντική διαφορά δεν υπήρχε επίσης όταν συγκρίθηκε ο ρυθμός εκφόρτισης των νευρώνων στο δεξί ημισφαίριο ανάμεσα στις 3 ομάδες [25]. Σε μία προσπάθεια προσδιορισμού της υποπεριοχής του ραβδωτού σώματος στην οποία ευθύνεται η αύξηση του ρυθμού εκφόρτισης των νευρώνων στο αριστερό ημισφαίριο που αναφέρθηκε παραπάνω βρέθηκε ότι μόνο στην πλαγιοραχιαία περιοχή του ραβδωτού σώματος στο αριστερό ημισφαίριο ο ρυθμός εκφόρτισης των νευρώνων των kindled επίμυων ήταν σημαντικά αυξημένος σε σχέση με την ομάδα naïve [25]. Σε καμία υποπεριοχή του ραβδωτού σώματος στο δεξί ημισφαίριο δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στον ρυθμό εκφόρτισης των νευρώνων στις 3 ομάδες [25]. Σχετικά με το πρότυπο εκφορτίσεων των νευρώνων στο ραβδωτό σώμα βρέθηκε ότι στο δεξί ημισφαίριο οι νευρώνες των kindled επίμυων είχαν στατιστικά σημαντικά διαφορετικό και μη φυσιολογικό πρότυπο εκφορτίσεων σε σχέση με την ομάδα naïve, κάτι που δεν παρατηρήθηκε όταν συγκρίθηκε η ομάδα των sham-kindled επίμυων με τις υπόλοιπες 2 ομάδες [25]. Πιο συγκεκριμένα, για τον προσδιορισμό της

φυσιολογικής ή μη δραστηριότητας των νευρώνων εξετάστηκαν δύο παράμετροι που ήταν ο συντελεστής διακύμανσης (coefficient of variation) και η κύρτωση (kyrtosis) στο ιστόγραμμα που κατασκευάστηκε (interspike interval histogram, ISIH) [25]. Μόνο η παράμετρος της κύρτωσης ήταν σημαντικά μειωμένη στην ομάδα kindled επίμυων σε σχέση με την ομάδα naïve στο δεξί ημισφαίριο, κάτι που υποδεικνύει το μη φυσιολογικό πρότυπο εκφόρτισης [25]. Σε αντίστοιχες μετρήσεις στο αριστερό ημισφαίριο οι παράμετροι του συντελεστή διακύμανσης και της κύρτωσης δεν είχαν σημαντικές διαφορές στις 3 ομάδες. Τέλος, εξετάστηκε αν μεταβάλλεται το πρότυπο δραστηριότητας των νευρώνων σε υποπεριοχές του ραβδωτού σώματος. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το πρότυπο εκφορτίσεων δεν μεταβάλλεται σημαντικά εξαιτίας του kindling στις υποπεριοχές του δεξιού και αριστερού ημισφαιρίου του ραβδωτού σώματος όταν εξετάστηκαν ξεχωριστά καθώς οι παράμετροι του συντελεστή διακύμανσης και της κύρτωσης δεν είχαν σημαντική διαφορά στις ομάδες naïve και kindled σε καμία υποπεριοχή και σε κανένα ημισφαίριο [25]. Επομένως η μείωση της κύρτωσης των kindled σε σχέση με των naïve επίμυων στο ραβδωτό σώμα στο δεξί ημισφαίριο που αναφέρθηκε παραπάνω δεν μπόρεσε να καταλογιστεί σε καμία υποπεριοχή. Η μόνη σημαντική διαφορά που παρατηρήθηκε ήταν ανάμεσα στις ομάδες sham-kindled και naïve όπου η κύρτωση ήταν σημαντικά μειωμένη στην πρώτη ομάδα στην πλαγιοκοιλιακή περιοχή του ραβδωτού σώματος στο δεξί ημισφαίριο [25]. Σύγκριση με την ομάδα kindled σε αυτή την υποπεριοχή δεν ήταν δυνατή λόγω του μικρού μεγέθους δείγματος [25]. Συμπερασματικά, το kindling που εφαρμόστηκε στην πλαγιοβασική αμυγδαλή στο δεξί ημισφαίριο προκάλεσε αύξηση της αυθόρμητης δραστηριότητας των νευρώνων του ραβδωτού σώματος στο αριστερό ημισφαίριο ενώ παράλληλα μη φυσιολογικό πρότυπο εκφορτίσεων των νευρώνων του ραβδωτού σώματος στο δεξί ημισφαίριο 1 μέρα μετά το kindling. Η ομάδα sham-kindled φαίνεται ότι βρίσκεται σε μία ενδιάμεση κατάσταση ανάμεσα στις ομάδες naïve και kindled [25].

Σε μία άλλη μελέτη (G. Campbell Teskey et al, 2006) εφαρμόστηκε ηλεκτρικό kindling στο μεσολόβιο αρσενικών επίμυων Long-Evans και εξετάστηκε η επίδραση αυτού στους MSNs του ραβδωτού σώματος [27]. Στην μελέτη υπήρχαν 4 ομάδες επίμυων ίδιας ηλικίας. Στις 2 από αυτές εφαρμόστηκε ηλεκτρικό kindling στην περιοχή του μεσολοβίου μέσω ηλεκτροδίου που τοποθετήθηκε στην περιοχή αυτή και οι επίμυες θυσιάστηκαν 2 και 21 μέρες μετά την τελευταία ηλεκτρική διέγερση (εξ ου και 2

ομάδες) ενώ στις υπόλοιπες 2 ομάδες τοποθετήθηκε ηλεκτρόδιο στην περιοχή του μεσολοβίου αλλά δεν εφαρμόστηκε kindling και οι επίμυες θυσιάστηκαν 2 και 21 μέρες μετά τον τελευταίο χειρισμό τους, αποτελώντας τα sham-control [27]. Το πρωτόκολλο ηλεκτρικού kindling που εφαρμόστηκε πραγματοποιούνταν 1 φορά την ημέρα και αποτελούνταν από ηλεκτρική διέγερση παλμών 60Hz με κάθε παλμό να έχει διάρκεια 1ms και να χωρίζεται με διαστήματα 1ms από τον επόμενο παλμό για συνολικό χρονικό διάστημα 1 δευτερολέπτου. Η ένταση ήταν 100μΑ μεγαλύτερη από το ADT (after discharge threshold) που καθορίστηκε για κάθε ζώο στην ομάδα kindled [27]. Οι εγκεφαλοι απομονώθηκαν με τη μέθοδο της ενδοκαρδιακής μονιμοποίησης και έπειτα τοποθετήθηκαν σε διάλυμα Golgi-Cox για 2 ημέρες. Μετά το πέρας των 2 ημερών το διάλυμα άλλαξε με νέο φρέσκο διάλυμα και η επώαση συνεχίστηκε για άλλες 14 ημέρες. Τέλος, προστέθηκαν σε διάλυμα 30% σουκρόζης για 2 μέρες και στη συνέχεια κόπηκαν σε στεφανιαίες τομές πάχους 200μm [27]. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το kindling που εφαρμόστηκε στο μεσολόβιο προκάλεσε στατιστικώς σημαντική αύξηση στο μήκος και στις διακλαδώσεις των MSNs της ομάδας kindled σε σχέση με την ομάδα control 2 ημέρες μετά την τελευταία εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος [27]. Αντίστοιχη σημαντική διαφορά στο μήκος και στις διακλαδώσεις των MSNs δεν παρατηρήθηκε όταν συγκρίθηκε η ομάδα kindled με την ομάδα control 3 εβδομάδες μετά την τελευταία ηλεκτρική επαγωγή [27]. Συμπερασματικά λοιπόν, φαίνεται ότι το kindling που εφαρμόστηκε προκάλεσε υπερτροφία στους δενδρίτες των MSNs στο ραβδωτό σώμα 2 μέρες μετά την τελευταία επαγωγή κρίσης, κάτι που όμως φαίνεται να είναι παροδικό καθώς δεν παρατηρήθηκε αντίστοιχη διαφορά στο μήκος και στις διακλαδώσεις των δενδριτών 3 εβδομάδες μετά την τελευταία επαγωγή κρίσης ανάμεσα στις ομάδες kindled και sham-control [27].

Η επαγωγή επιληπτικών κρίσεων με χρόνια χορήγηση PTZ φαίνεται ότι προκαλεί αύξηση στα επίπεδα ντοπαμίνης στην περιοχή του ραχιαίου και κοιλιακού ραβδωτού σώματος [28]. Στην μελέτη των L. Dazzi et al, 1997 αρσενικοί Sprague-Dawley CD επίμυες εκτέθηκαν σε PTZ συγκέντρωσης 30 mg/kg 3 φορές κάθε εβδομάδα για 8 εβδομάδες μέσω ενδοπεριτοναϊκής ένεσης και συγκρίθηκαν με επίμυες ελέγχου στους οποίους χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά ορός [28]. Έπειτα από 4 ημέρες μετά την τελευταία χορήγηση PTZ εκτιμήθηκαν τα επίπεδα ντοπαμίνης με την τεχνική της μικροδιαπίδυσης [28]. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συγκέντρωση της ντοπαμίνης αυξήθηκε στατιστικώς σημαντικά στους επίμυες που εκτέθηκαν στο PTZ σε σχέση με

τους επίμυες ελέγχου στην περιοχή του ραχιαίου και κοιλιακού ραβδωτού σώματος [28]. Επιπλέον δόση PTZ συγκέντρωσης 20 mg/kg (challenge administration) στις 2 ομάδες επίμυων προκάλεσε σημαντική αύξηση στα επίπεδα ντοπαμίνης στην περιοχή του ραχιαίου ραβδωτού σώματος και στις 2 ομάδες με μεγαλύτερη αύξηση να παρατηρείται στην ομάδα που προηγουμένως εκτέθηκε στο PTZ, όμως στην περιοχή του κοιλιακού ραβδωτού σώματος προκλήθηκε σημαντική αύξηση στα επίπεδα ντοπαμίνης μόνο στην ομάδα επίμυων που εκτέθηκαν προηγουμένως στο πρωτόκολλο χρόνιας έκθεσης PTZ [28]. Συμπερασματικά, η χρόνια επαγωγή επιληπτικών κρίσεων με PTZ προκάλεσε σημαντική αύξηση στα επίπεδα ντοπαμίνης στην περιοχή του ραχιαίου και κοιλιακού ραβδωτού σώματος, ενώ σε επιπλέον δόση PTZ (challenge dose) οι ομάδες που είχαν προηγουμένως εκτεθεί στο PTZ έδειξαν μεγαλύτερη ευαισθησία από τις ομάδες που δεν είχαν εκτεθεί και εμφάνισαν μεγάλη αύξηση των επιπέδων ντοπαμίνης και στις δύο περιοχές (ραχιαίο και κοιλιακό ραβδωτό σώμα). Στις ομάδες που δεν είχαν προηγουμένως εκτεθεί η επιπλέον δόση PTZ προκάλεσε αύξηση των επιπέδων ντοπαμίνης μόνο στην περιοχή του ραχιαίου ραβδωτού σώματος [28].

2. ΣΚΟΠΟΣ

Στην παρούσα εργασία εξετάζεται η επίδραση της προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη και της επιληπτογένεσης στον εγκέφαλο επίμυων Sprague Dawley. Οι επίμυες εκτέθηκαν στην αιθανόλη σε όλη τη διάρκεια της προγεννητικής περιόδου και για 2 εβδομάδες μετά τη γέννηση και επίσης εκτέθηκαν στην επιληπτογόνο ουσία PTZ με ενδοπεριτοναϊκή ένεση τη μεταγεννητική μέρα 21. Η χορήγηση PTZ έγινε για τον σκοπό της επαγωγής και μελέτης επιληπτικών κρίσεων στους επίμυες που κατά την εμβρυική τους περίοδο εκτέθηκαν στην αιθανόλη καθώς, όπως αναφέρθηκε, άτομα που εκτέθηκαν προγεννητικά στην αιθανόλη μπορούν να εμφανίσουν επιληπτικές κρίσεις στη ζωή τους [1,10]. Έμφαση δόθηκε στην περιοχή του ραχιαίου και κοιλιακού ραβδωτού σώματος, καθώς μελέτες δείχνουν ότι η προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη [19,20,21] και η επιληπτογένεση [25,27,28] μπορούν να προκαλέσουν αλλαγές στη δομή και λειτουργία των νευρώνων που απαρτίζουν την περιοχή αυτή. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση της προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη και της επιληπτογένεσης στην περιοχή του ραχιαίου και κοιλιακού ραβδωτού σώματος:

- I. Στην ένταση σήματος των σωματιδίων Nissl των νευρώνων
- II. Στον αριθμό των νευρικών κυττάρων, των αστροκυττάρων και τον συνολικό αριθμό των κυττάρων
- III. Στην αρχιτεκτονική των νευρικών κυττάρων

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1 Πειραματόζωα

Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν επίμυες τύπου Sprague Dawley. Οι επίμυες στεγάστηκαν σε πλαστικά κλουβιά με μέγιστο τρεις αρουραίους ανά κλουβί. Οι απόγονοι διαχωρίστηκαν από τη μητέρα 21 ημέρες μετά τη γέννηση και κάθε κλουβί φιλοξενούσε αποκλειστικά είτε αρσενικούς είτε θηλυκούς επίμυες, ενώ η πρόσβαση σε τροφή και νερό ήταν απεριόριστη. Οι συνθήκες διαβίωσης διατηρήθηκαν σταθερές με θερμοκρασία 21 ± 2 °C και εφαρμόστηκε ένας κύκλος φωτός/σκότους 12 ωρών (από τις 8 π.μ. έως τις 8 μ.μ. για το φως και από τις 8 μ.μ. έως τις 8 π.μ. για το σκοτάδι). Οι συνθήκες διαβίωσης και οι πειραματικές διαδικασίες συμμορφώνονται με τις κατευθυντήριες γραμμές που περιγράφονται στις οδηγίες του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 22ας Σεπτεμβρίου 2010 σχετικά με την προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς (2010/63/EE). Καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων, καταβλήθηκε κάθε προσπάθεια για να ελαχιστοποιηθεί τόσο η ταλαιπωρία των πειραματόζωων όσο και ο συνολικός αριθμός των ζώων που χρησιμοποιήθηκαν.

3.2 Πρωτόκολλο έκθεσης στην αιθανόλη και πρόκλησης επιληπτικών κρίσεων

3.2.1 Έκθεση στην αιθανόλη

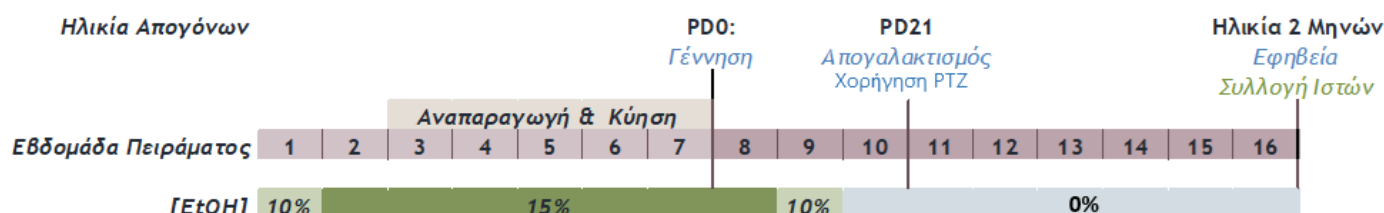
Το πρωτόκολλο έκθεσης στην αιθανόλη και πρόκλησης επιληπτικών κρίσεων πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Σχετικά με την έκθεση στην αιθανόλη, νεαροί άτοκοι ενήλικες θηλυκοί αρουραίοι Sprague Dawley υποβλήθηκαν σε χορήγηση διαλύματος αιθανόλης ως μοναδική παροχή νερού για 2 εβδομάδες. Την πρώτη εβδομάδα, δόθηκε ένα διάλυμα αιθανόλης 10% v/v, που αποτελούσε τη μοναδική πηγή νερού. Μετά από αυτό, την επόμενη εβδομάδα, εκτέθηκαν σε διάλυμα αιθανόλης 15% v/v ως αποκλειστική πηγή νερού. Αυτή η έκθεση σε διάλυμα αιθανόλης 15% v/v παρέμεινε σε όλη την περίοδο αναπαραγωγής και κύησης η οποία ξεκίνησε την τρίτη εβδομάδα. Μετά τη γέννηση, η συγκέντρωση αιθανόλης 15% v/v διατηρήθηκε την πρώτη

εβδομάδα, μειώθηκε στο 10% τη δεύτερη εβδομάδα και σταμάτησε εντελώς στην έναρξη της τρίτης εβδομάδας μετά τον τοκετό (Εικόνα 5).

3.2.2 Πρόκληση επιληπτικών κρίσεων

Η πρόκληση επιληπτικών κρίσεων έγινε με τη χρήση πεντυλενοτετραζόλης (PTZ- pentylenetetrazole, Sigma Chemical Co), διαλυμένης σε φυσιολογικό ορό (διάλυση PTZ σε αποστειρωμένο 0,9% w/v NaCl). Η πεντυλενοτετραζόλη είναι ένας ανταγωνιστής των GABA_A υποδοχέων. Η χορήγηση της ουσίας έγινε ενδοπεριτοναϊκά (i.p.) σε νεαρούς επίμυες 21 μέρες μετά τη γέννηση (PND21) και σε δόση 70mg/kg. Μετά τη χορήγηση της δόσης αυτής ακολούθησε παρατήρηση διάρκειας μισής ώρας (30min) για να εξακριβωθεί αν το ζώο εμφανίσει συμπεριφορικά χαρακτηριστικά τα οποία αντιστοιχούν σε κρίση σταδίου >5 της νέας κλίμακας που κατασκευάστηκε (Πίνακας 1) για τις ανάγκες του πειράματος. Η νέα κλίμακα κατασκευάστηκε με βάση την κλίμακα του Racine [26]. Αν το ζώο δεν εμφάνιζε κρίση σταδίου >5 τότε χορηγούνταν επιπλέον δόση 10mg/Kg και επομένως η τελική δόση ήταν 80mg/Kg (Εικόνα 6). Στη συνέχεια, ακολουθούσε παρατήρηση τουλάχιστον 4 ωρών και όταν πλέον όλα τα ζώα είχαν παρουσιάσει κρίση σταδίου >5 και είχαν συνέλθει πλήρως επέστρεφαν στο κλουβί τους. Η συνολική διαδικασία έκθεσης των επίμυων στην αιθανόλη και πρόκλησης επιληπτικών κρίσεων περιγράφεται συνοπτικά στην Εικόνα 5.

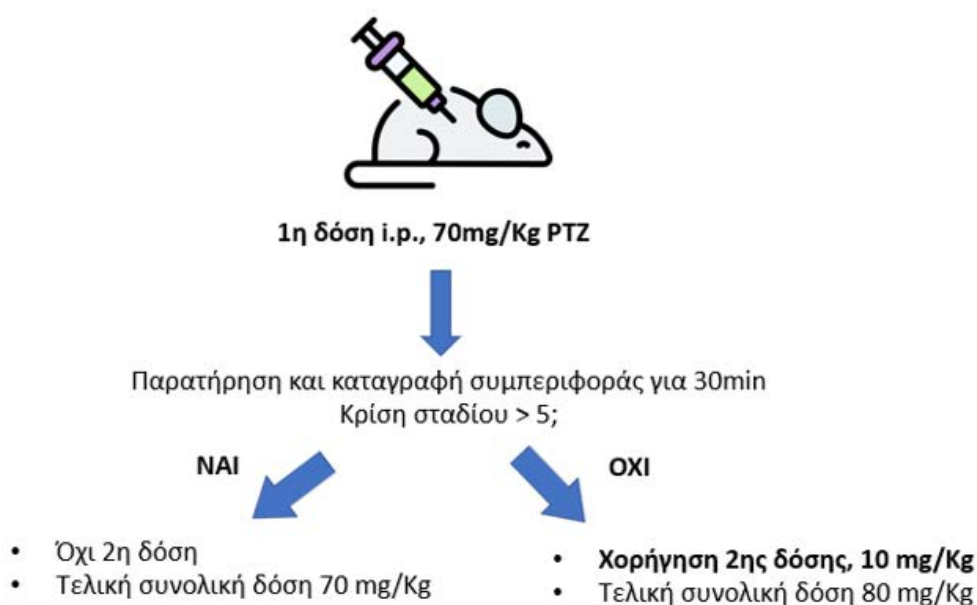
Από την πειραματική αυτή διαδικασία προέκυψαν 4 ομάδες επίμυων: Α. **Ομάδα ελέγχου** (4 επίμυες), Β. **Ομάδα PAE** (4 επίμυες), Γ. **Ομάδα PTZ** (4 επίμυες), Δ. **Ομάδα PAE-PTZ** (4 επίμυες). Όλοι οι επίμυες θυσιάστηκαν και συλλέχθηκαν οι ιστοί τους σε ηλικία 2 μηνών μετά τη γέννηση.



Εικόνα 5: Απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας έκθεσης των επίμυων στην αιθανόλη και πρόκλησης επιληπτικών κρίσεων.

Πίνακας 1: Η κλίμακα σταδίων επιληπτικών κρίσεων και συμπεριφορικών χαρακτηριστικών που αντιστοιχούν σε κάθε στάδιο που δημιουργήθηκε για την καλύτερη περιγραφή του πειράματος.

Στάδιο	Συμπεριφορά Χαρακτηριστικά
0	Ελαφρύ τρέμουλο σε όλο το σώμα.
1	Ξαφνική απώλεια οποιασδήποτε συμπεριφοράς και/ή επίμονο βλέμμα.
2	Συσπάσεις χαρακτηριστικών προσώπου, συμπεριλαμβανομένου της μουσούδας ή της μουσούδας και των ματιών.
3	Ρυθμικό κούνημα κεφαλιού.
4	Ανύψωση και εμφάνιση σπασμών στα πρόσθια άκρα που μπορεί να επεκτείνονται μόνο στο ένα άκρο (unilateral) ή και στα δύο άκρα (bilateral). Σε ορισμένες περιπτώσεις, παρατηρείται εναλλαγή αυτών των δύο συμπεριφορών.
5	Κλονική κρίση σε καθιστή θέση.
6	Κλονική και/ή τονικοκλονική κρίση ενώ το ζώο είναι ξαπλωμένο στην κοιλιά του ή στο πλάι.
7	Τονικοκλονικές κρίσεις συνοδευόμενες από απότομο άλμα και/ή ξαφνική ορμή και/ή κραυγές.
8	Έντονες, επαναλαμβανόμενες τονικές κρίσεις οι οποίες συχνά οδηγούν σε θάνατο.

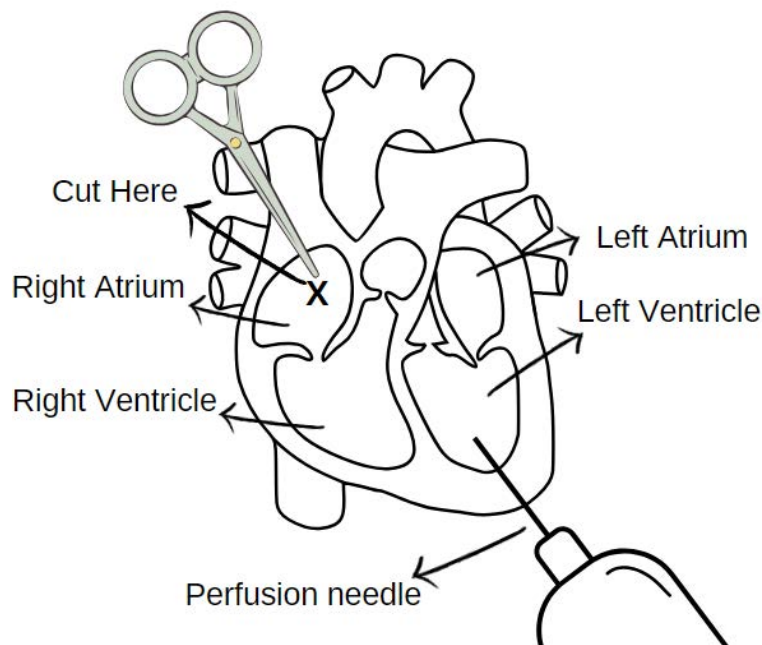


Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την πρόκληση επιληπτικών κρίσεων σταδίου >5 στους επίμυες.

3.3 Ενδοκαρδιακή Μονιμοποίηση επίμυων

Πριν από τη διαδικασία ενδοκαρδιακής μονιμοποίησης, εφαρμόστηκε αναισθησία στους επίμυες για να διευκολυνθεί ο χειρισμός τους. Αρχικά, ο επίμυς μεταφέρθηκε σε ένα γυάλινο κλειστό δοχείο με βαμβάκι εμποτισμένο με διαιθυλαιθέρα για να προκληθεί αποπροσανατολισμός του ζώου. Στη συνέχεια ζυγίστηκε και του χορηγήθηκαν 2 ml προποφύλης ενδοπεριτοναϊκά ακολουθούμενα από 200 μ L κεταμίνης τα οποία χορηγήθηκαν στον μηρό για την πρόκληση βαθιάς αναισθησίας. Η αποτελεσματικότητα της αναισθησίας αξιολογήθηκε με την παρατήρηση της έλλειψης απόσυρσης του ποδιού ως απόκριση σε ένα ερέθισμα πόνου. Αυτή η προσέγγιση είχε ως στόχο να εξασφαλίσει μια πλήρη και ελεγχόμενη κατάσταση αναισθησίας, ώστε να αποφευχθεί ο πόνος του ζώου από τη διαδικασία ενδοκαρδιακής μονιμοποίησης που πραγματοποιήθηκε μετά.

Στη συνέχεια, έγιναν αμφίπλευρες τομές, εκτεινόμενες προς το στήθος μέχρι να αποκαλυφθεί η καρδιά. Όταν συνέβη αυτό, μία βελόνα εισήχθη στην αριστερή κοιλία της καρδιάς, συνδεδεμένη με μια αντλία (Gilson MINIPULS 3) μέσω ενός ειδικού σωλήνα (Εικόνα 7). Η αντλία, ενεργοποιημένη στις 48 στροφές, ξεκίνησε την έγχυση ορού (διάλυμα NaCl 0,9%) για 15-20 λεπτά. Ταυτόχρονα, έγινε μια τομή στον δεξιό κόλπο της καρδιάς για να διευκολυνθεί η έξοδος τόσο του ορού όσο και του αίματος (Εικόνα 7). Αφού διαπιστώθηκε ότι απομακρύνθηκε όλο το αίμα, κάτι που φαινομενικά έχει ως αποτέλεσμα, για παράδειγμα, το λευκό χρώμα των ματιών και είναι πολύ σημαντικό κατά την περεταίρω επεξεργασία του ιστού με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας για να μην προκύψουν λανθασμένα αποτελέσματα αφού αντισώματα μπορούν να συνδεθούν με ερυθρά αιμοσφαίρια, χορηγήθηκε κρύο 0.1M PB (Phosphate Buffer) διάλυμα 4% παραφορμαλδεΰδης (PFA) που προκαλεί μονιμοποίηση του ιστού για 25-30 λεπτά. Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία της μονιμοποίησης, το ζώο τοποθετήθηκε σε πρηνή θέση για το σκοπό της απομόνωσης του εγκεφάλου. Αρχικά, αφαιρέθηκε το δέρμα και οι μύες γύρω από το κρανίο και ακολούθησε διάσπαση του κρανίου με οστεοκόπτη. Ο εγκέφαλος παραλήφθηκε με τη βοήθεια σπάτουλας αφού πρώτα εξασφαλίστηκε η προστασία του από ενδεχόμενο τραυματισμό για παράδειγμα λόγω της μη σωστής αφαίρεσης των μηνίγγων.



Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση της τοποθέτησης ειδικής βελόνας στην αριστερή κοιλία της καρδιάς επίμυων κατά τη διαδικασία ενδοκαρδιακής μονιμοποίησης. (Συγγραφέας: Κορσκετίδης Χρήστος)

Ο εγκέφαλος βυθίστηκε σε διάλυμα 4% παραφορμαλδεΰδης και αφέθηκε όλη τη νύχτα μέσα στους 4°C για περεταίρω μονιμοποίηση. Την επόμενη ημέρα, το διάλυμα μέσα στο σωλήνα αντικαταστάθηκε με διάλυμα 30% σουκρόζης σε 0.1M PB. Αυτό έγινε για την κρυοπροστασία του εγκεφάλου ο οποίος παρέμεινε σε αυτό το διάλυμα μέχρι την πλήρη βύθιση του, η οποία έλαβε χώρα σε περίπου 48 ώρες. Η σουκρόζη, λόγω της διαφοράς οσμωμοριακότητας που υπάρχει μεταξύ του διαλύματος και του κυτταροπλάσματος των κυττάρων του εγκεφάλου, αντικαθιστά το νερό που υπάρχει μέσα σε αυτά και με αυτόν τον τρόπο ο εγκέφαλος προστατεύεται από τη δημιουργία κρυστάλλων πάγου σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες. Τέλος, για την ταχεία ψύξη τους οι ιστοί τοποθετήθηκαν για 1 λεπτό σε ισοπεντάνιο σε θερμοκρασία -45°C και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -80°C μέχρι τη κοπή τους.

3.4 Συλλογή στεφανιαίων τομών εγκεφάλου

Ο τεμαχισμός του εγκεφάλου σε στεφανιαίες τομές έγινε με τη χρήση της κρυοτόμου Leica CM1850. Οι ιστοί σταθεροποιήθηκαν με τη βοήθεια στερεοποιητικής ουσίας

OCT (Optimal Cutting Temperature compound) σε ειδική βάση της κρυτοτόμου και κόπηκαν σε θερμοκρασία -20°C . Οι τομές είχαν πάχος 10 μm και συλλέχθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες στις οποίες προηγουμένως εφαρμόστηκε ένα πρωτόκολλο ζελατινοποίησης. Οι αντικειμενοφόρες αυτές πλάκες τοποθετήθηκαν σε ειδικά κουτιά και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -20°C .

Για τη ζελατινοποίηση των αντικειμενοφόρων πλακών, οι πλάκες τοποθετήθηκαν σε διάλυμα ζελατίνης και δωδεκάυδρου θειϊκού χρωμιούχου καλίου $[\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}]$ θερμοκρασίας 45°C . Έπειτα, σκουπίστηκαν ελαφρά με χαρτί και τοποθετήθηκαν στον πάγκο εργασίας για 48 ώρες περίπου μέχρι να στεγνώσουν πλήρως. Αφότου στέγνωσαν, οι πλάκες φυλάχθηκαν στα κουτιά τους μέχρι τη χρήση τους.

3.5 Χρώση των σωματιδίων Nissl με Cresyl Violet

Τα σωματίδια Nissl εντοπίζονται σε νευρικά κύτταρα και συγκεκριμένα στα κυτταρικά σώματα και στους δενδρίτες [29]. Αποτελούν μέρος του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου και η σύστασή τους απαρτίζεται κυρίως από ριβοσώματα, ενώ η κύρια λειτουργία τους είναι η πρωτεϊνοσύνθεση. Τα σωματίδια Nissl μπορούν να σημανθούν με βασικές χρωστικές όπως η Cresyl Violet, κάτι που χρησιμοποιείται για την απεικόνιση νευρώνων [29].

Αρχικά, οι ιστοί βγήκαν από την κατάψυξη (-20°C) και αφού ξεπαγώσαν για περίπου 30 λεπτά ξεκίνησε η διαδικασία χρώσης τους με το πέρασμα των πλακών διαδοχικά μέσα από ειδικά πλαστικά δοχεία που περιείχαν τα εξής:

- Διάλυμα Αιθανόλης-Χλωροφορμίου-Οξικού οξέος για 10 λεπτά ώστε να γίνει αρχικά καθαρισμός των τομών
- H_2O για 3 λεπτά ώστε οι τομές να ενυδατωθούν
- Διάλυμα χρωστικής Cresyl violet-οξικού νατρίου pH 4.5 για 5 λεπτά
- H_2O για 2 λεπτά
- Διαλύματα αιθανόλης συγκέντρωσης 50%, 75%, 95%, 100% διαδοχικά και για 5 δευτερόλεπτα σε κάθε συγκέντρωση ώστε να αφυδατωθούν οι τομές
- Ξυλένιο

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες παρέμειναν στο δοχείο με το ξυλένιο μέχρι την τοποθέτηση καλυπτρίδων. Κατά τη διαδικασία αυτή, οι πλάκες πρώτα σκουπίστηκαν με χαρτί ελαφρά ώστε να απομακρυνθεί όσο γίνεται το ξυλένιο από αυτές και έπειτα

οι ιστοί στις πλάκες καλύφθηκαν με καστορέλαιο ως μέσο κάλυψης των ιστών. Πάνω από το καστορέλαιο τοποθετήθηκε καλυπτρίδα, η οποία σφραγίστηκε με περιφερική τοποθέτηση βερνικιού για νύχια. Αφού το βερνίκι στέγνωσε, οι πλάκες ήταν έτοιμες για παρατήρηση και φωτογράφιση σε στερεοσκόπιο. Το στερεοσκόπιο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το KERN OZL 463 και διέθετε την κάμερα KERN ODC 832 μέσω της οποίας λήφθηκαν οι φωτογραφίες.

3.5.1 Ανάλυση Εικόνας

Οι φωτογραφίες αναλύθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος ImageJ για τον σκοπό της μέτρησης εντάσεως σήματος του ιστού υπό μελέτη. Αρχικά στο παράθυρο **Set Measurements (Analyze>Set Measurements)** τσεκάρονται οι επιλογές “Area”, “Mean grey value”, “Standard deviation”, “Mean & max grey value”, “Display Label” και “Add to overlay”. Ακολουθεί η ενεργοποίηση του Διαχειριστή των Περιοχών Ενδιαφέροντος (**ROI Manager : Analyze>Tools>ROI Manager**) και ορίζεται η περιοχή που πρόκειται να μετρηθεί με το **Εργαλείο Πολυγωνικής Επιλογής (Polygonal selection)** πάνω στη φωτογραφία. Με τη συντόμευση **Ctrl+y** η περιοχή ονομάζεται κατάλληλα και προστίθεται στο ROI Manager με τη συντόμευση **Ctrl+t**. Η φωτογραφία αποθηκεύεται σε μορφή tiff μέσω της επιλογής **File>Save As** αφού προηγηθεί η επιλογή **Image>Overlay>From ROI Manager** ώστε να φαίνεται η περιοχή ή περιοχές που πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις. Έτσι δημιουργείται ένα πρόσθετο επίπεδο που μπορεί να μεταφερθεί στο ROI Manager με την επιλογή **Image>Overlay>To ROI Manager** την επόμενη φορά που θα ανοίξει η φωτογραφία. Η περεταίρω επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε αρχικά στο πρόγραμμα Excel και στη συνέχεια στο πρόγραμμα GraphPad Prism.

Για την αντιστοίχιση του αριθμού των εικονοστοιχείων (pixels) σε μονάδα μήκους (μm) έγινε προσθήκη κλίμακας (scale bar) στις φωτογραφίες. Η κλίμακα αρχικά φωτογραφήθηκε με την ίδια κάμερα και στην ίδια μεγέθυνση που τραβήχτηκαν και οι φωτογραφίες και έπειτα σε αυτή τοποθετήθηκε μια ευθεία γραμμή με το **Εργαλείο Ευθείας Γραμμής (Straight)** στο πρόγραμμα ImageJ. Με την επιλογή **Analyze>Set Scale** το αποτέλεσμα της μέτρησης της κλίμακας μεταφέρθηκε στο παράθυρο Ορισμού Κλίμακας (Set Scale) και συμπληρώθηκαν τα στοιχεία απόσταση που μετρήθηκε (*Known distance*) και μονάδα μέτρησης μήκους (*Unit of length*).

3.6 Ανοσοϊστοχημεία

Στην πρώτη φάση της διαδικασίας, οι πλάκες που περιέχουν τις τομές που αντιστοιχούν στην επιθυμητή περιοχή του εγκεφάλου επιλέγονται προσεκτικά και αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για περίοδο 30 λεπτών προκειμένου να γίνει η απόψυξη τους. Μετά από αυτό, πραγματοποιούνται δύο πλύσεις, η καθεμία διάρκειας 10 λεπτών, χρησιμοποιώντας ένα διάλυμα 0,1M PBS (Phosphate Buffer Saline) με pH 7,4 και ακολουθεί περίοδος επώασης 30 λεπτών με διάλυμα 3,3% NDS (Normal Donkey Serum) σε 0,1M PBS. Η χρήση ορού γαϊδουριού αποδίδεται στο ότι τα 2^α αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από γαϊδούρι. Ο πρωταρχικός στόχος αυτής της επώασης είναι να καταληφθούν οι μη ειδικές θέσεις δέσμησης των δεύτερων αντισωμάτων, ελαχιστοποιώντας έτσι πιθανά σφάλματα από τη μη ειδική δέσμηση των αντισωμάτων αυτών. Πραγματοποιήθηκαν, στη συνέχεια, τρεις κύκλοι πλύσης, ο καθένας διάρκειας 5 λεπτών, χρησιμοποιώντας το διάλυμα 0,1M PBS και ακολούθησε επώαση για 3 μέρες με διάλυμα που περιείχε τα 1^α αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν (Πίνακας 2). Η σύσταση του διαλύματος αυτού (Ab-1) ήταν 3% v/v NDS και 0,5% v/v Triton X-100 διαλυμένα σε 0,1M PBS. Η προσθήκη του απορρυπαντικού Triton X-100 έγινε έτσι ώστε να δημιουργηθούν ανοίγματα στη μεμβράνη των κυττάρων και να διευκολυνθεί η διέλευση των αντισωμάτων μέσα σε αυτά ενώ αζίδιο του νατρίου (NaN₃) προστέθηκε ώστε να είναι η δυνατή η επώαση του διαλύματος των αντισωμάτων με τις τομές πάνω στις πλάκες για 3 μέρες αντί για overnight (16-18 ώρες) επώαση που πραγματοποιήθηκε σε προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου. Τις μέρες αυτές οι πλάκες φυλάχθηκαν σε θάλαμο ψύξης 4°C (cold room).

Όπως προαναφέρθηκε, το διάλυμα Ab-1 περιείχε δύο αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη διαδικασία ώστε να γίνει ανοσοανίχνευση και εντοπισμός ταυτόχρονα των νευρικών κυττάρων και των αστροκυττάρων. Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε για τον εντοπισμό των νευρικών κυττάρων στόχευε τον παράγοντα NeuN (Neuronal Nuclei antigen). Ο παράγοντας αυτός έχει θεωρηθεί αξιόπιστος δείκτης για τον εντοπισμό των ώριμων νευρικών κυττάρων τις τελευταίες δύο δεκαετίες καθώς παράγεται αποκλειστικά σε ώριμους νευρώνες και πολλές μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει αντισώματα κατά του παράγοντα αυτού για την ανίχνευση νευρικών κυττάρων παρά τις αναφορές που τον παρουσιάζουν μη κατάλληλο για δείκτη σε διάφορες ασθένειες ή καταστάσεις εξαιτίας της ενδεχόμενης απουσίας φθορισμού του στις περιπτώσεις αυτές [30]. Ο παράγοντας NeuN εντοπίζεται στον

πυρήνα των νευρικών κυττάρων και στο κυτταρόπλασμα σε μικρές ποσότητες και είναι προϊόν της έκφρασης του γονιδίου *Rbfox3*, μέλος της οικογένειας *Rbfox1*, που σχετίζεται με διαδικασίες εναλλακτικού ματίσματος. Ο ακριβής ρόλος του NeuN δεν έχει καθοριστεί όμως εξαιτίας της ικανότητάς του να προσδένεται στο DNA θεωρείται ότι είναι μεταγραφικός ρυθμιστής [30]. Για την ανίχνευση των αστροκυττάρων χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα που στοχεύει την όξινη πρωτεΐνη των ενδιάμεσων ινιδίων της γλοίας (GFAP, Glial Fibrillary Acidic Protein). Η πρωτεΐνη αυτή παράγεται μόνο στα αστροκύτταρα στο κεντρικό νευρικό σύστημα [31], κάτι που την καθιστά κατάλληλο δείκτη των αστροκυττάρων [32]. Η GFAP συμβάλει στη διαμόρφωση της δομής του κυτταροσκελετού των αστροκυττάρων και στη μηχανική υποστήριξή τους, ενώ έχει και υποστηρικτικό ρόλο για γειτονικούς νευρώνες καθώς και για τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό [31]. Η ενεργοποίηση του γονιδίου και η αύξηση της παραγωγή της πρωτεΐνης GFAP φαίνεται να έχει καταλυτικό ρόλο στη διαδικασία της αστρογλοίωσης. Κατά τη διαδικασία αυτή η οποία συμβαίνει ως απόκριση σε κάποιο τραυματισμό του εγκεφάλου ή φλεγμονή, τα αστροκύτταρα αυξάνονται σε αριθμό αλλά και σε όγκο [31].

Κατά τη δεύτερη φάση της διαδικασίας, οι πλάκες μεταφέρθηκαν από τον θάλαμο ψύξης στον πάγκο εργασίας και πραγματοποιήθηκαν τρεις πλύσεις, η καθεμία διάρκειας 5 λεπτών, με διάλυμα 0,1M PBS. Ακολούθως, οι πλάκες επώστηκαν με διάλυμα που περιείχε τα 2^α αντισώματα (Πίνακας 2) για 1,5 ώρα με τις διαδικασίες που αφορούν τα αντισώματα αυτά να πραγματοποιούνται σε συνθήκες σκότους για την προστασία του φθορισμού των αντισωμάτων. Αφού ολοκληρώθηκε η επώαση, έγιναν τρεις πλύσεις 5 λεπτών η καθεμία με διάλυμα 0,1M PBS και, στο τέλος της διαδικασίας, προστέθηκε στις πλάκες μέσο κάλυψης (mounting medium) το οποίο περιείχε DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) και οι πλάκες καλύφθηκαν με καλυπτρίδες και σφραγίστηκαν περιφερικά με βερνίκι νυχιών. Το DAPI είναι μία φθορίζουσα χρωστική που έχει την ικανότητα να προσδένεται σε νουκλεοτιδικές αλληλουχίες του DNA αδενίνης και θυμίνης (A-T) γι' αυτό και χρησιμοποιείται συχνά για σήμανση πυρήνων. Οι πλάκες φυλάχθηκαν σε ψυχρό θάλαμο (4°C) μέχρι την παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού. Το μικροσκόπιο φθορισμού που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Leica DM2000 το οποίο διέθετε την κάμερα Leica DFC420C.

Πίνακας 2: Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη διαδικασία της ανοσοϊστοχημείας.

Αντίσωμα	Στόχος	Οργανισμός προέλευσης	Ονομασία	Συγκέντρωση
1 ^ο	NeuN	κουνέλι	MABN 140	1/400
1 ^ο	GFAP	ποντικός	MABN 360	1/500
2 ^ο	IgG (H+L) κουνελιού	γαϊδούρι	CF 4884	1/500
2 ^ο	IgG (H+L) ποντικού	γαϊδούρι	CF 594	1/500

3.6.1 Ανάλυση εικόνας

Οι φωτογραφίες αναλύθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος ImageJ για τον σκοπό της μέτρησης του συνολικού αριθμού κυττάρων (χρώση με DAPI), του αριθμού των νευρικών κυττάρων (αντίσωμα NeuN) και του αριθμού των αστροκυττάρων (αντίσωμα GFAP). Ως μία αρχική παρατήρηση, τα αντισώματα κατά του παράγοντα NeuN και GFAP δεν φάνηκε να σημαίνουν κατάλληλα τα νευρικά κύτταρα και τα αστροκύτταρα αντίστοιχα στην περιοχή του ραβδωτού σώματος και ως συνέπεια δεν ήταν δυνατή η μέτρηση των κυττάρων αυτών. Το χρώμα του φθορισμού των αντισωμάτων παρατηρήθηκε μόνο στο φόντο (background) των φωτογραφιών χωρίς να σημαίνονται τα κύτταρα. Ο λόγος για τον οποίο συνέβη αυτό εικάζεται ότι είναι η παλαιότητα των τομών που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς οι ιστοί συλλέχθηκαν περίπου 2 έτη πριν διεξαχθεί το πείραμα, ενώ το ότι κύτταρα σε κάποιες άλλες περιοχές εκτός του ραβδωτού σώματος, για παράδειγμα στον φλοιό, σημάνθηκαν κανονικά αποτελούν ένδειξη ότι πιθανότατα δεν έγινε κάποιο λάθος στην πειραματική διαδικασία. Παρόμοιο πρόβλημα δεν παρατηρήθηκε στην χρώση με DAPI και, ως εκ τούτου, μετρήθηκαν μόνο τα κύτταρα που σημάνθηκαν με DAPI.

Οι φωτογραφίες άνοιξαν με το πρόγραμμα ImageJ και επιλέχθηκε η επιθυμητή περιοχή για μέτρηση κυττάρων με το **Εργαλείο Ορθογώνιας Επιλογής (Rectangular Selection)**. Με την συντόμευση **Ctrl+t** η περιοχή προστέθηκε στο ROI Manager όπου μετρήθηκε αρχικά η επιφάνειά της (Area) και στη συνέχεια ο συνολικός αριθμός των κυττάρων μέσω τη επιλογής **Process>Find>Maxima** και προσαρμογής της τιμής **Prominence** για την επιτυχή ανίχνευση όλων των κυττάρων στην περιοχή αυτή. Τέλος, οι τιμές μέτρησης μεταφέρθηκαν στο πρόγραμμα excel και έπειτα στο πρόγραμμα GraphPad Prism όπου επεξεργάστηκαν περαιτέρω.

3.7. Χρώση με τη μέθοδο Golgi-Cox

Για την παρατήρηση της αρχιτεκτονικής των νευρικών κυττάρων, δηλαδή των κυτταρικών σωμάτων, των αξόνων και των διακλαδώσεων τους, εφαρμόστηκε η τεχνική της χρώσης κατά Golgi-Cox. Η χρώση πραγματοποιήθηκε με την εμπότιση του ιστού σε άλατα χρωμίου τα οποία προσδένονται σε πρωτεΐνες των νευρώνων και προσδίδουν σκούρο χρώμα σε αυτούς [33]. Επειδή η μέθοδος αυτή δεν είχε διεξαχθεί ξανά στο εργαστήριο, για δοκιμαστικούς σκοπούς εφαρμόστηκε αρχικά σε Wistar επίμυες. Από αυτούς απομονώθηκε ο εγκεφαλικός ιστός και χρησιμοποιήθηκε απευθείας στην διαδικασία της χρώσης σε αντίθεση με τους ιστούς που προέρχονταν από Sprague Dawley επίμυες, και ήταν οι ιστοί προς μελέτη, οι οποίοι βρίσκονταν αποθηκευμένοι στους -80°C για μεγάλο χρονικό διάστημα και έγινε σταδιακή απόψυξή τους αρχικά στους -20°C , έπειτα στους 4°C και τέλος σε θερμοκρασία δωματίου όπου και χρησιμοποιήθηκαν.

Σε ότι αφορά τους Wistar επίμυες, αρχικά τοποθετήθηκαν σε γυάλινο δοχείο με βαμβάκι εμποτισμένο με διαιθυλαιθέρα ώστε να προκληθεί ζάλη και να διευκολυνθεί ο χειρισμός τους. Μετά την αναισθησία, με χρήση λαιμητόμου διαχωρίστηκε το κεφάλι από το σώμα και ξεκίνησε η διαδικασία απομόνωσης του εγκεφαλικού ιστού με αφαίρεση του δέρματος και των μυών και τη διάνοιξη του κρανίου με οστεοκόπτη, όπως έγινε και στη διαδικασία της ενδοκαρδιακής μονιμοποίησης. Μετά τη προσεκτική αφαίρεση του εγκεφάλου με τη χρήση σπάτουλας, έγινε διαχωρισμός των εγκεφαλικών ημισφαιρίων τα οποία αποθηκεύτηκαν σε σωληνάρια Eppendorf στους -80°C για μικρό χρονικό διάστημα μέχρι τη χρήση.

Κατά τη διαδικασία χρώσης, τα εγκεφαλικά ημισφαίρια τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς σωλήνες τύπου Falcon στους οποίους προστέθηκε επίσης διάλυμα εμποτισμού με σύσταση Διάλυμα A: Διάλυμα B: Διάλυμα C: dH_2O σε αναλογία 5: 5: 4: 10 όπου:

- Διάλυμα A: 5% υδατικό διάλυμα διχρωμικού καλίου ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$).
- Διάλυμα B: 5% υδατικό διάλυμα διχλωριούχου υδραργύρου (HgCl_2) σε θερμοκρασία 60°C .
- Διάλυμα C: 5% υδατικό διάλυμα χρωμικού καλίου (K_2CrO_4).

Το διάλυμα εμποτισμού μόλις παρασκευάστηκε παρέμεινε για 2 μέρες σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα από φιλτράρισμα ήταν έτοιμο προς χρήση. Η επώαση των ιστών

με το διάλυμα εμποτισμού διήρκησε 15 μέρες σε συνθήκες σκότους καθώς το διάλυμα είναι φωτοευαίσθητο.

Αφού ολοκληρώθηκε η επώαση, οι ιστοί απομονώθηκαν από το διάλυμα εμποτισμού και επωάστηκαν σε νέο διάλυμα κρυοπροστασίας του οποίου η σύσταση ήταν 20% σουκρόζη, 15% γλυκερόλη διαλυμένα σε διάλυμα φωσφορικών PB (Phosphate Buffer). Οι ιστοί παρέμειναν στο διάλυμα κρυοπροστασίας μέχρι να καταβυθιστούν και ακολούθησε ο διαμερισμός τους σε στεφανιαίες τομές πάχους 60μm με χρήση κρυοτόμου Leica CM1850. Για τον σκοπό αυτό η κρυοτόμος ρυθμίστηκε σε θερμοκρασία -20°C και οι ιστοί τοποθετήθηκαν σε ειδική βάση με τη βοήθεια OCT (Optimal Cutting Temperature compound). Η συλλογή των τομών έγινε με τη βοήθεια ζελατινοποιημένων αντικειμενοφόρων πλακών οι οποίες στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν σε σκοτεινό μέρος και σε θερμοκρασία δωματίου.

Στη συνέχεια της διαδικασίας οι τομές επωάστηκαν με διαλύματα χρώσης. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν δύο πλύσεις των 5 λεπτών με dH₂O με σκοπό την ενυδάτωση και καθαρισμό των ιστών και ακολούθησε επώαση για 10 λεπτά με το 1^ο διάλυμα χρώσης που ήταν διάλυμα 20% αμμωνίας (25-28% NH₄OH σε dH₂O). Έπειτα από δύο κύκλους πλύσεων διάρκειας 5 λεπτών ο καθένας, πραγματοποιήθηκε επώαση με το δεύτερο διάλυμα χρώσης το οποίο ήταν 1% υδατικό διάλυμα ένυδρου θειοθειϊκού νατρίου (Na₂S₂O₃ - H₂O) για 10 λεπτά και ακολούθησαν άλλες δύο πλύσεις 5 λεπτών η καθεμία. Στη συνέχεια, οι πλάκες τοποθετήθηκαν διαδοχικά σε διαλύματα αιθανόλης αυξανόμενης συγκέντρωσης με σκοπό την αφυδάτωση των ιστών και συγκεκριμένα σε 50%, 75%, 95%, 100% συγκέντρωση για 5 λεπτά σε κάθε συγκέντρωση και τέλος σε ξυλένιο. Στο τέλος της διαδικασίας, οι τομές καλύφθηκαν με καστορέλαιο ως μέσο κάλυψης ιστών και πάνω από αυτό τοποθετήθηκαν καλυπτρίδες οι οποίες σφραγίστηκαν περιφερικά με βερνίκι νυχιών.

3.8. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

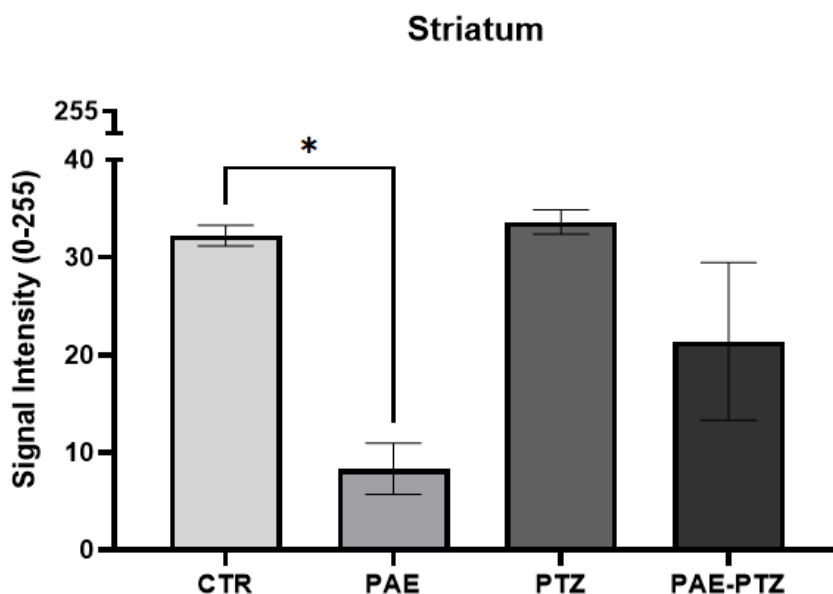
Για την οργάνωση και απεικόνιση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε αρχικά το πρόγραμμα excel ενώ η στατιστική ανάλυση και επεξεργασία των δεδομένων από όλα τα πειράματα που διεξήχθησαν έγινε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism. Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη χρήση one-way Anova και συγκρίθηκαν οι 4 ομάδες επίμυων που μελετήθηκαν ενώ τιμές $p < 0,05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

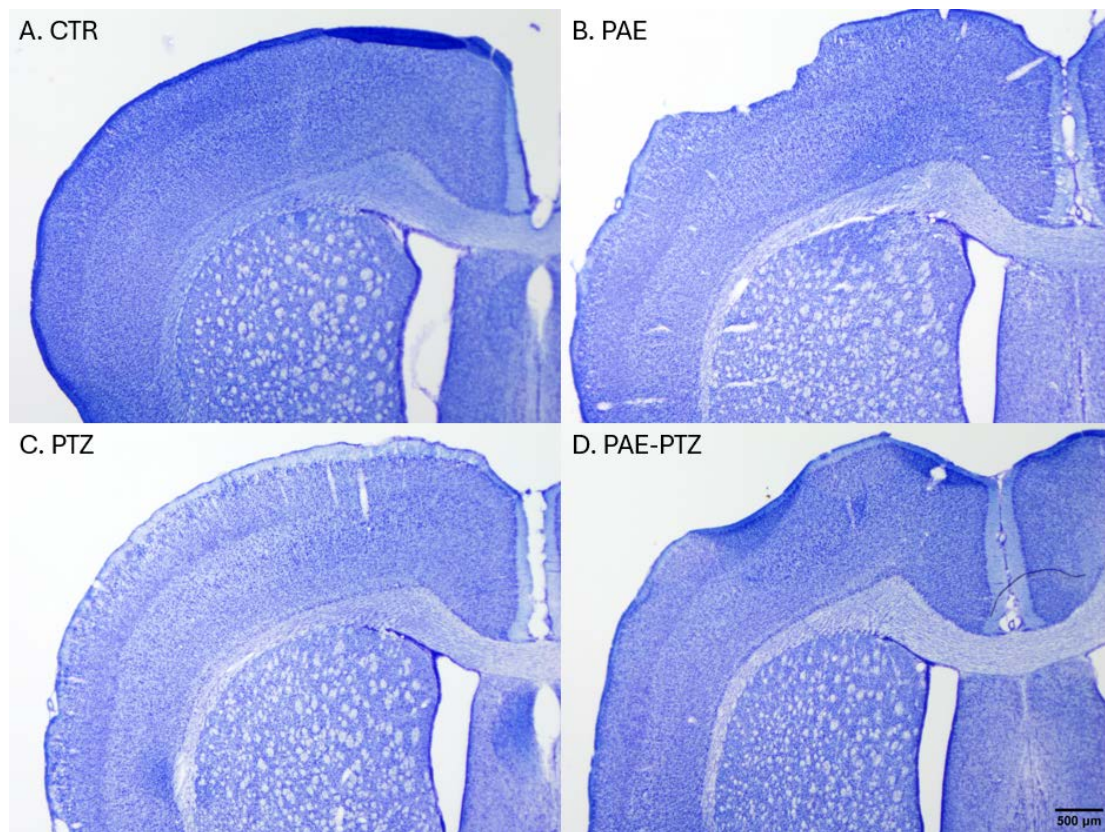
4.1 Επίδραση της προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη και της επιληπτογένεσης στην πυκνότητα των σωματιδίων Nissl

4.1.1 Ραχιαίο ραβδωτό σώμα (κερκοφόρος πυρήνας & κέλυφος)

Η ένταση σήματος των σωματιδίων Nissl μετά από χρώση με Cresyl violet στην περιοχή του ραχιαίου ραβδωτού σώματος (κερκοφόρος πυρήνας & κέλυφος) ήταν κατά μέσο όρο $32,23 \pm 2,12$ στα ζώα της ομάδας ελέγχου, $8,32 \pm 4,53$ στα ζώα της ομάδας PAE, $33,62 \pm 2,49$ στα ζώα της ομάδας PTZ και $21,38 \pm 16,16$ στα ζώα της ομάδας PAE-PTZ σύμφωνα με την κλίμακα έντασης σήματος 256 σημείων. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων στο πρόγραμμα GraphPad Prism με τη χρήση one-way Anova έδειξε στατιστικώς σημαντική μείωση στην ένταση σήματος των σωματιδίων Nissl της ομάδας PAE σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0,05$) ενώ αντίστοιχη σημαντική διαφορά δεν φάνηκε ανάμεσα στις υπόλοιπες ομάδες που συγκρίθηκαν (Εικόνα 8). Ενδεικτικές φωτογραφίες στεφανιαίων τομών χρωματισμένων με Cresyl violet στην περιοχή του ραχιαίου ραβδωτού σώματος από τις ομάδες που έγινε η ανάλυση παρατίθενται στην Εικόνα 9.



Εικόνα 8: Ένταση σήματος των σωματιδίων Nissl στην περιοχή του ραχιαίου ραβδωτού σώματος των ομάδων που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία.



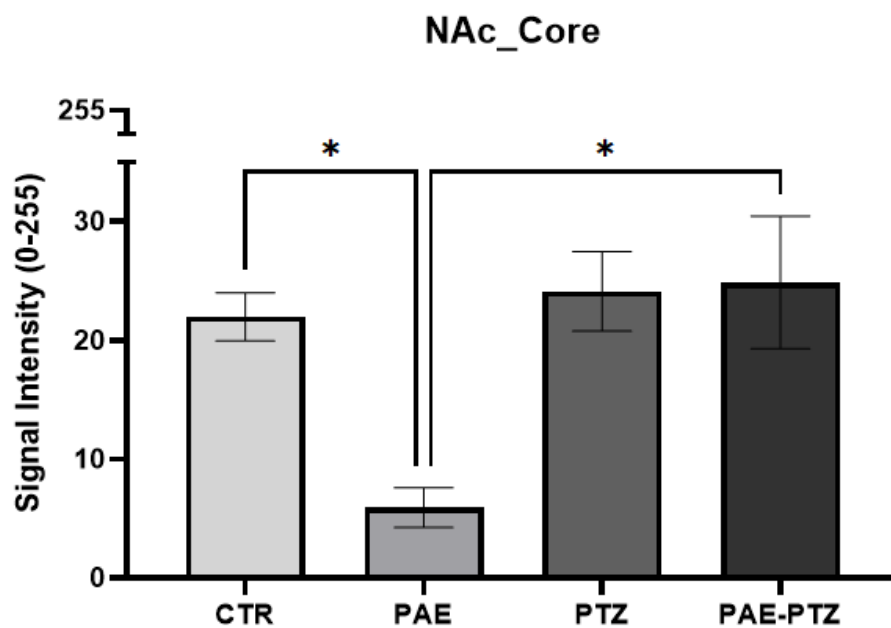
Εικόνα 9: Στεφανιαίες τομές χρωματισμένες με Cresyl violet στην περιοχή του ραχιαίου ραβδωτού σώματος.

4.1.2 Κοιλιακό ραβδωτό σώμα (επικλινής πυρήνας)

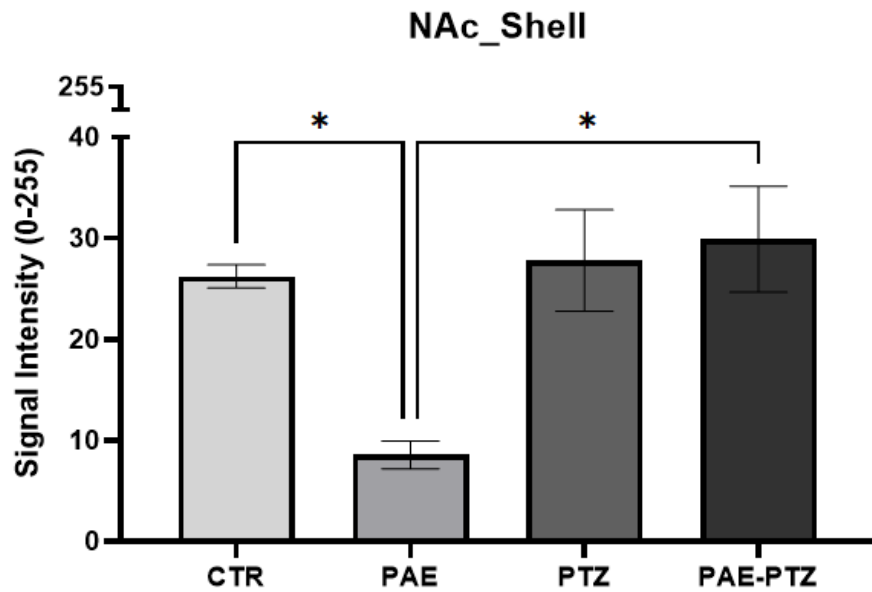
Η ένταση σήματος των σωματιδίων Nissl μετά από χρώση με Cresyl violet στην περιοχή του κεντρικού τμήματος (πυρήνας) του επικλινούς πυρήνα ήταν κατά μέσο όρο $21,99 \pm 4,05$ στα ζώα της ομάδας ελέγχου, $5,92 \pm 2,88$ στα ζώα της ομάδας PAE, $24,12 \pm 6,7$ στα ζώα της ομάδας PTZ και $24,88 \pm 9,68$ στα ζώα της ομάδας PAE-PTZ σύμφωνα με την κλίμακα έντασης σήματος 256 σημείων. Με στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων στο πρόγραμμα GraphPad Prism με τη μέθοδο one-way Anova φάνηκε στατιστικώς σημαντικά μειωμένη η ένταση σήματος των σωματιδίων Nissl στα ζώα της ομάδας PAE σε σχέση με τα ζώα της ομάδας ελέγχου ($p < 0,05$) καθώς και σε σχέση με τα ζώα της ομάδας PAE-PTZ ($p < 0,05$, Εικόνα 10). Αντίστοιχη σημαντική διαφορά δεν φάνηκε ανάμεσα στις υπόλοιπες ομάδες που συγκρίθηκαν.

Η ένταση σήματος των σωματιδίων Nissl μετά από χρώση με Cresyl violet στην περιοχή του κελύφους του ραβδωτού σώματος ήταν κατά μέσο όρο $26,23 \pm 2,29$ στα ζώα ελέγχου, $8,56 \pm 2,4$ στα ζώα της ομάδας PAE, $27,8 \pm 10,03$ στα ζώα της ομάδας PTZ και $29,91 \pm 9,07$ στα ζώα της ομάδας PAE-PTZ σύμφωνα με την κλίμακα έντασης

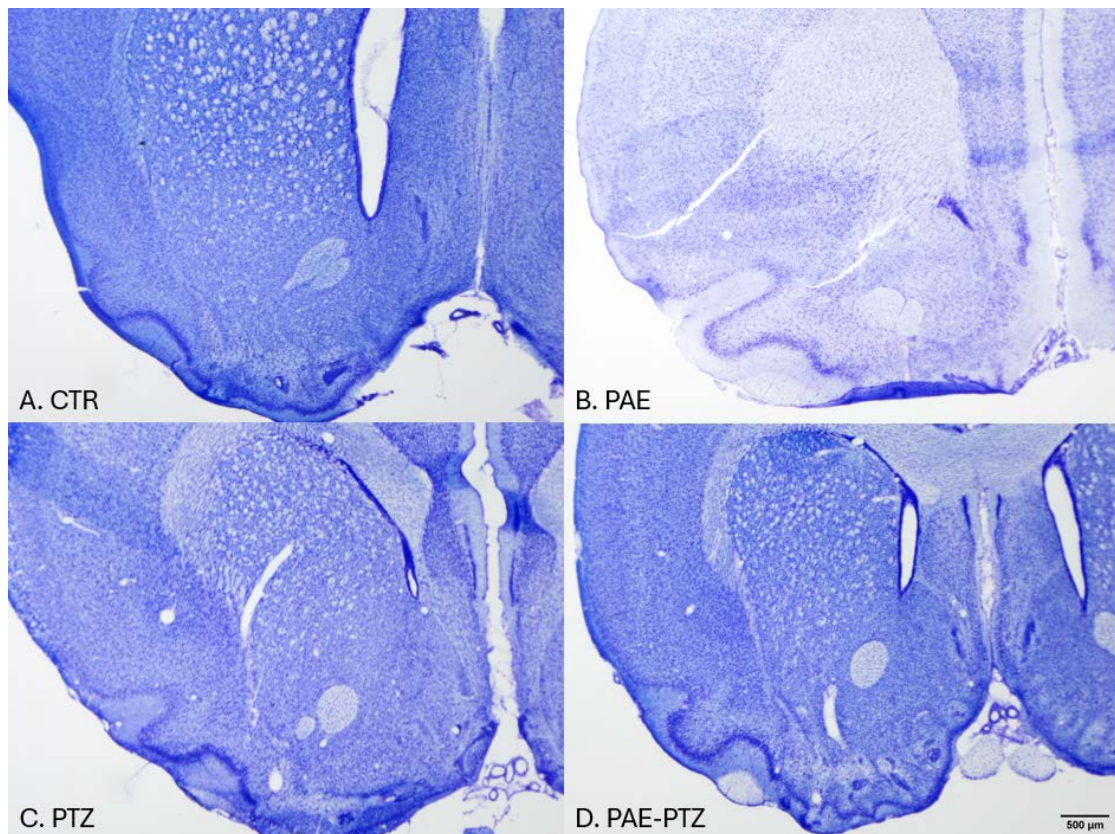
σήματος 256 σημείων. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων στο πρόγραμμα GraphPad Prism με τη μέθοδο one-way Anova έδειξε στατιστικώς σημαντικά μειωμένη την ένταση σήματος των σωματιδίων Nissl στα ζώα της ομάδας PAE σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0,05$) καθώς και σε σχέση με την ομάδα PAE-PTZ ($p < 0,05$) ενώ αντίστοιχη σημαντική διαφορά δεν φάνηκε ανάμεσα στις υπόλοιπες ομάδες που συγκρίθηκαν (Εικόνα 11). Στην Εικόνα 12 παρουσιάζονται φωτογραφίες τομών χρωματισμένες με Cresyl violet στην περιοχή του κεντρικού τμήματος (πυρήνας) και του κελύφους του επικλινούς πυρήνα.



Εικόνα 10: Ένταση σήματος των σωματιδίων Nissl στην περιοχή του κεντρικού τμήματος (πυρήνας) του επικλινούς πυρήνα των ομάδων που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση.



Εικόνα 11: Ένταση σήματος των σωματιδίων Nissl στην περιοχή του κελύφους του επικλινούς πυρήνα ανάμεσα στις ομάδες που μελετήθηκαν.

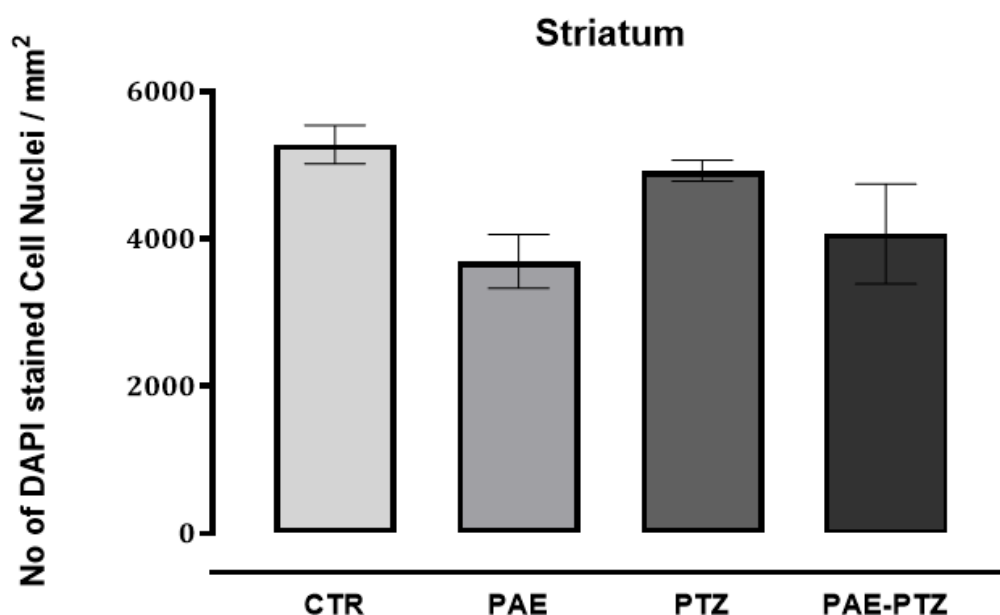


Εικόνα 12: Στεφανιαίες τομές χρωματισμένες με Cresyl violet στην περιοχή του κοιλιακού ραβδωτού σώματος (επικλινής πυρήνας).

4.2 Επίδραση της προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη και της επιληπτογένεσης στον αριθμό των κυττάρων.

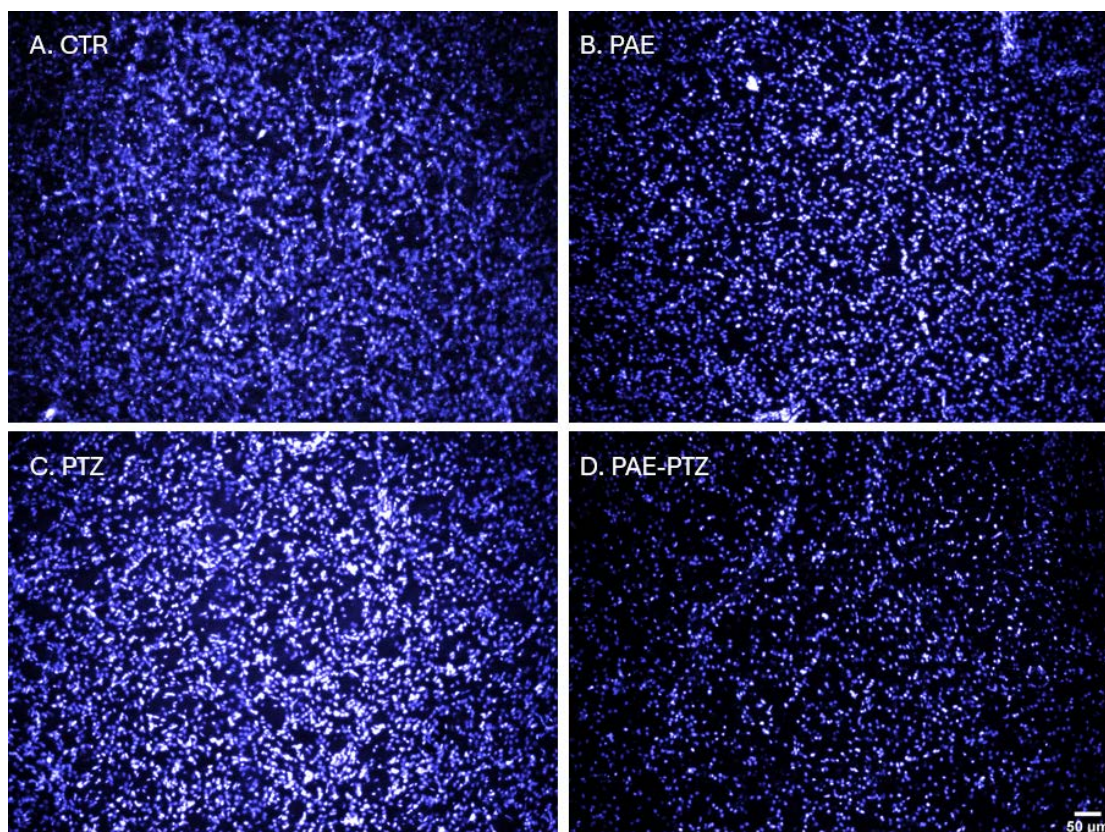
4.2.1 Ραχιαίο ραβδωτό σώμα (κερκοφόρος πυρήνας & κέλυφος)

Ο συνολικός αριθμός των κυττάρων στην περιοχή του ραχιαίου ραβδωτού σώματος μετά από χρώση με DAPI ήταν κατά μέσο όρο $5280 \pm 451,3$ στα ζώα της ομάδας ελέγχου, $3694 \pm 731,5$ στα ζώα της ομάδας PAE, $4925 \pm 287,5$ στα ζώα της ομάδας PTZ και 4065 ± 1355 στα ζώα της ομάδας PAE-PTZ. Με στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων στο πρόγραμμα GraphPad Prism με τη μέθοδο one-way Anova δεν φάνηκε κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά στον συνολικό αριθμό κυττάρων ανάμεσα στις ομάδες που εξετάστηκαν ($p > 0,05$, Εικόνα 13). Στην Εικόνα 14 παρατίθενται ενδεικτικές φωτογραφίες στεφανιαίων τομών στην περιοχή του ραχιαίου ραβδωτού σώματος μετά από χρώση με DAPI των ομάδων που μελετήθηκαν.



Εικόνα 13: Συνολικός αριθμός κυττάρων στην περιοχή του ραχιαίου ραβδωτού σώματος ανάμεσα στις ομάδες που μελετήθηκαν.

Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα αντί του παράγοντα NeuN και GFAP ώστε να γίνει μέτρηση μόνο των νευρικών κυττάρων και των αστροκυττάρων αντίστοιχα. Παρόλα αυτά, αυτές οι μετρήσεις δεν ήταν δυνατές καθώς, όπως παρατηρήθηκε, δεν μπόρεσε να πραγματοποιηθεί η απεικόνιση και σήμανση των νευρικών κυττάρων και των αστροκυττάρων για τον σκοπό της μέτρησης τους με τη χρήση των αντισωμάτων αυτών.



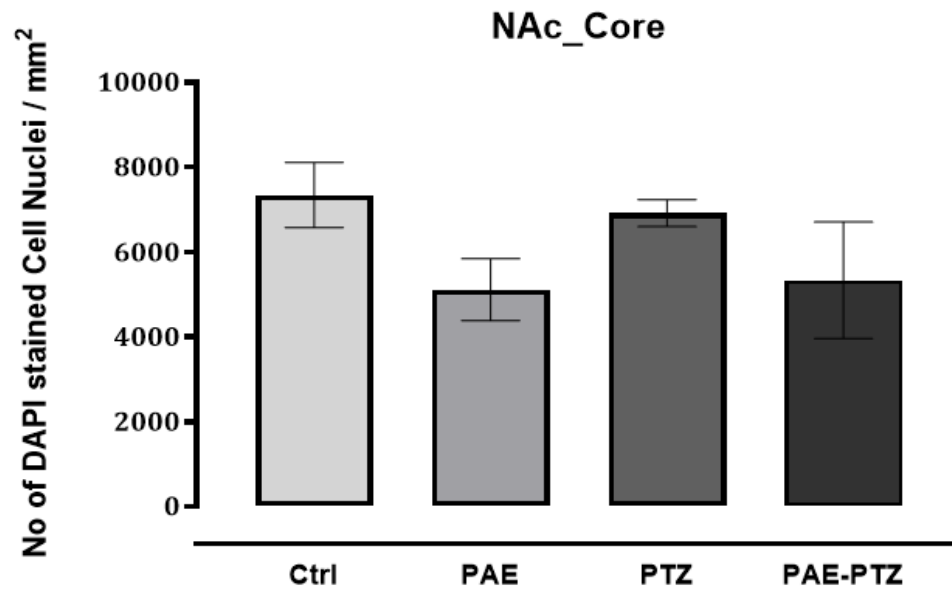
Εικόνα 14: Στεφανιαίες τομές στην περιοχή του ραχιαίου ραβδωτού σώματος έπειτα από χρώση με DAPI.

4.2.2 Κοιλιακό ραβδωτό σώμα (επικλινής πυρήνας)

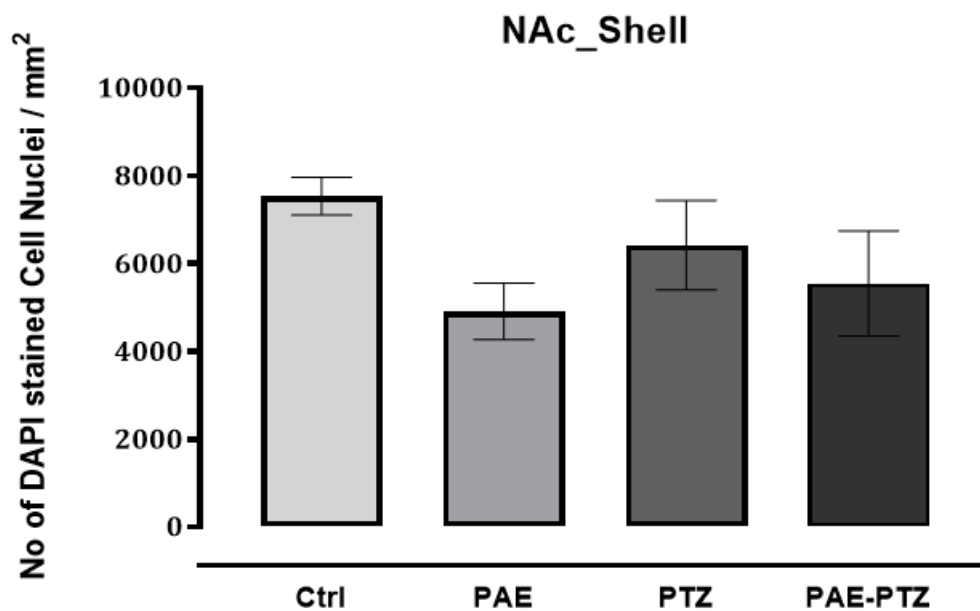
Ο συνολικός αριθμός των κυττάρων στην περιοχή του κεντρικού τμήματος (πυρήνας) του κοιλιακού ραβδωτού σώματος μετά από χρώση με DAPI ήταν κατά μέσο όρο 7346 ± 1330 στα ζώα της ομάδας ελέγχου, 5112 ± 1258 στα ζώα της ομάδας PAE, 6915 ± 450 στα ζώα της ομάδας PTZ και 5333 ± 1943 στα ζώα της ομάδας PAE-PTZ. Με στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων στο πρόγραμμα GraphPad Prism και χρήση της μεθόδου one-way Anova δεν φάνηκε κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά στον συνολικό αριθμό των κυττάρων στην περιοχή αυτή ανάμεσα στην ομάδες που εξετάστηκαν ($p > 0,05$, Εικόνα 15).

Σχετικά με την περιοχή του κελύφους του κοιλιακού ραβδωτού σώματος, ο συνολικός αριθμός των κυττάρων μετά από χρώση με DAPI ήταν κατά μέσο όρο $7535 \pm 747,7$ στα ζώα της ομάδας ελέγχου, 4911 ± 1112 στα ζώα της ομάδας PAE, 6420 ± 1771 στα ζώα της ομάδας PTZ και 5545 ± 1695 στα ζώα της ομάδας PAE-PTZ. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων στο πρόγραμμα GraphPad Prism και χρήση της μεθόδου one-way Anova δεν έδειξε κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά στον συνολικό

αριθμό των κυττάρων ανάμεσα στις ομάδες που εξετάστηκαν ($p > 0,05$, Εικόνα 16). Στην Εικόνα 17 παρατίθενται φωτογραφίες τομών στο κοιλιακό ραβδωτό σώμα μετά από χρώση με DAPI των ομάδων που εξετάστηκαν.

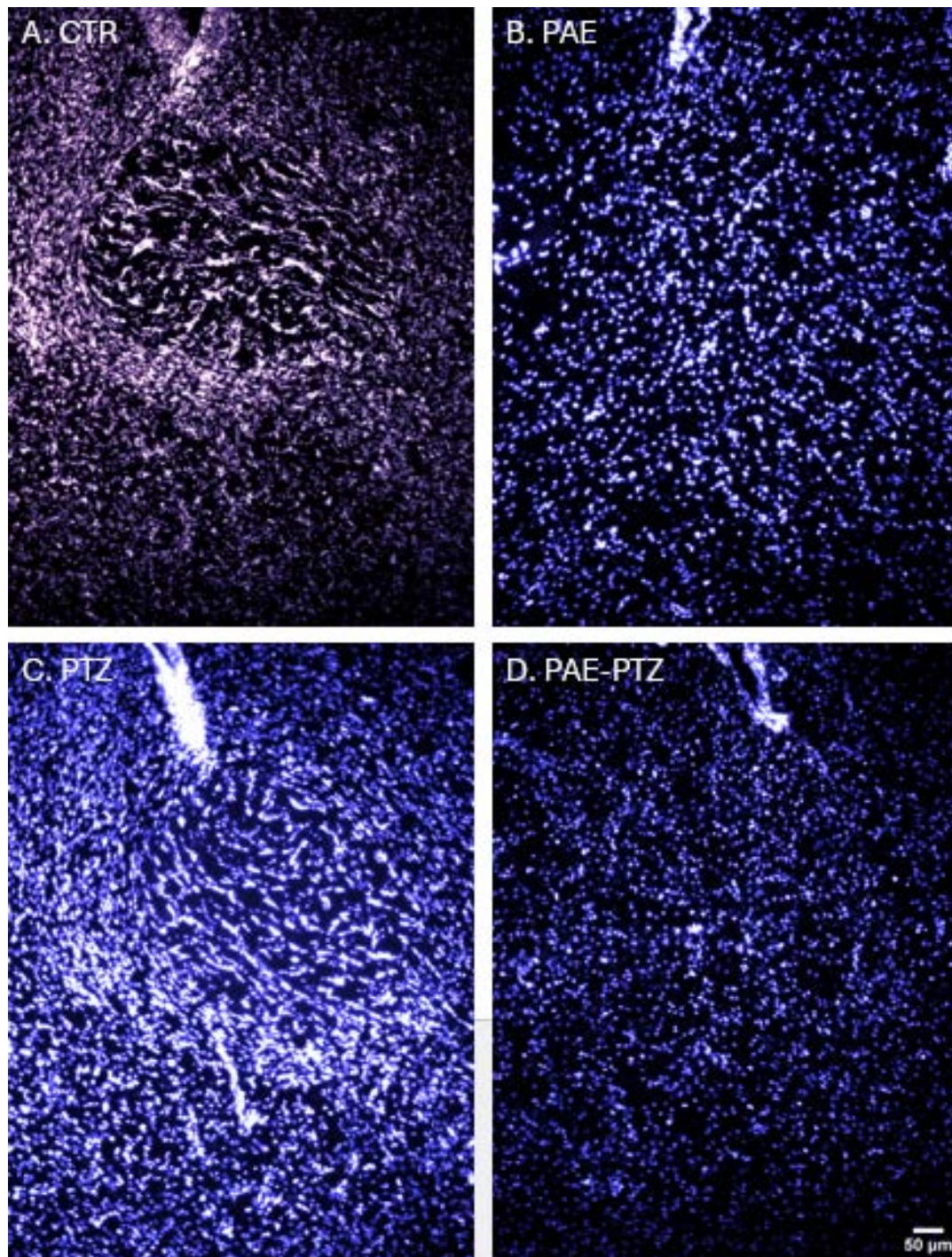


Εικόνα 15: Συνολικός αριθμός κυττάρων στην περιοχή του κεντρικού τμήματος (πυρήνας) του κοιλιακού ραβδωτού σώματος ανάμεσα στις ομάδες που μελετήθηκαν.



Εικόνα 16: Συνολικός αριθμός κυττάρων στην περιοχή του κελύφους του κοιλιακού ραβδωτού σώματος ανάμεσα στις ομάδες που μελετήθηκαν.

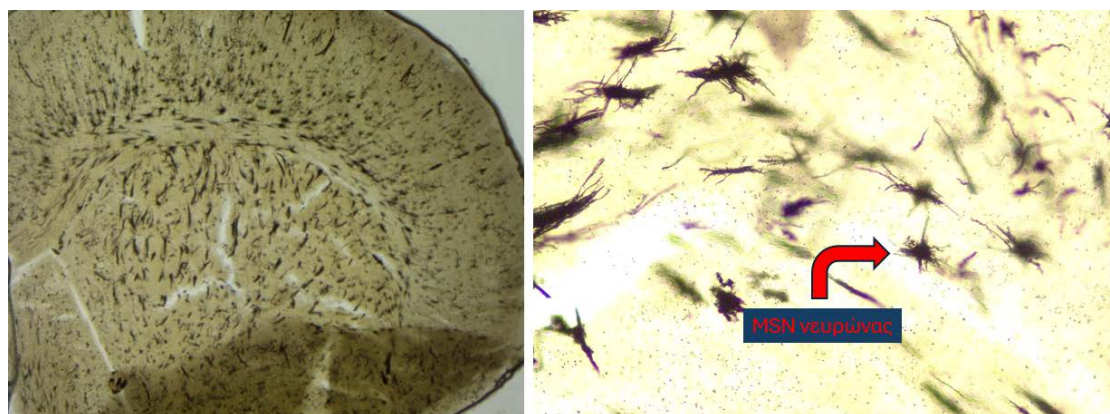
Στο κοιλιακό ραβδωτό σώμα έγινε προσπάθεια μέτρησης του αριθμού μόνο των νευρικών κυττάρων και μόνο των αστροκυττάρων με χρήση αντισωμάτων αντί του παράγοντα NeuN και GFAP αντίστοιχα όπως αναφέρθηκε και για το ραχιαίο ραβδωτό σώμα. Όμως, δεν μπόρεσε να πραγματοποιηθεί η σήμανση και ο εντοπισμός των νευρικών κυττάρων και των αστροκυττάρων και, ως αποτέλεσμα, οι μετρήσεις αυτές δεν ήταν δυνατές.



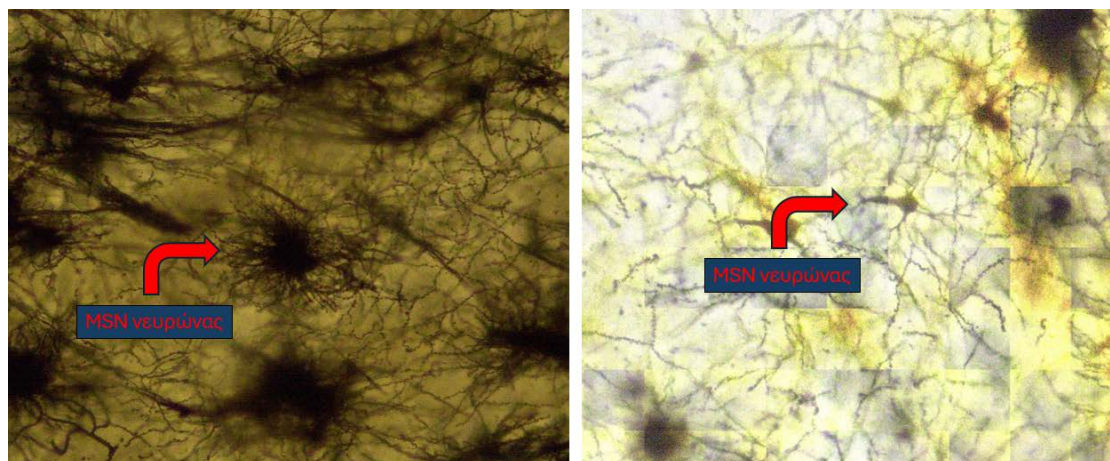
Εικόνα 17: Στεφανιαίες τομές στην περιοχή του κοιλιακού ραβδωτού σώματος έπειτα από χρώση με DAPI.

4.3 Επίδραση της προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη και της επιληπτογένεσης στην αρχιτεκτονική των νευρικών κυττάρων

Η αρχιτεκτονική των MSN νευρώνων των Sprague Dawley επίμυων στην περιοχή του ραβδωτού σώματος μετά από χρώση Golgi-Cox δεν ήταν ικανή να δώσει ασφαλή συμπεράσματα καθώς οι νευρώνες είχαν ακανόνιστο σχήμα (Εικόνα 18). Αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στην ψύξη (-80°C) των εγκεφάλων αυτών για μεγάλο χρονικό διάστημα πριν χρησιμοποιηθούν στην διαδικασία της χρώσης. Αυτό το συμπέρασμα προκύπτει καθώς εγκεφαλοι επίμυων Wistar που χρησιμοποιήθηκαν δοκιμαστικά δεν καταψύχθηκαν για μεγάλο χρονικό διάστημα και οι φωτογραφίες MSN νευρώνων στο ραβδωτό σώμα των επίμυων αυτών μετά από τη χρώση με Golgi-Cox δείχνουν φυσιολογική μορφολογία (Εικόνα 19). Έτσι, δεν ήταν δυνατό να προκύψουν ασφαλή συμπεράσματα για την επίδραση της προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη και της επιληπτογένεσης στην αρχιτεκτονική των MSN νευρώνων του ραχιαίου και κοιλιακού ραβδωτού σώματος.



Εικόνα 18: Μη φυσιολογική μορφολογία MSN νευρώνων στην περιοχή του ραβδωτού σώματος. Στην φωτογραφία απεικονίζονται στεφανιαίες τομές που προέρχονται από Sprague Dawley επίμυες ομάδας ελέγχου μετά από χρώση με Golgi-Cox.



Εικόνα 19: Φωτογραφίες MSN νευρώνων στην περιοχή του ραβδωτού σώματος οι οποίοι έχουν φυσιολογική μορφολογία. Οι φωτογραφίες απεικονίζουν στεφανιαίες τομές από φυσιολογικούς Wistar επίμυες μετά από χρώση με Golgi-Cox.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως αναφέρθηκε, η προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη που έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση κάποιας μορφής FASD έχει αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση επιληπτικών κρίσεων και επιληψίας [10]. Παρόλο που η προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη μπορεί να έχει διαφορετικά αποτελέσματα στα πειραματόζωα σε σχέση με τον άνθρωπο [11], η παρούσα μελέτη εξέτασε την επίπτωση της χρόνιας έκθεσης στην αιθανόλη κατά την εγκυμοσύνη και της επιληπτογένεσης με χορήγηση της ουσίας PTZ στον εγκέφαλο επίμυων Sprague Dawley. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η επίπτωση των παραπάνω στην περιοχή του ραχιαίου και κοιλιακού ραβδωτού σώματος σχετικά με την πυκνότητα των σωματιδίων Nissl, τον αριθμό και την αρχιτεκτονική των κυττάρων. Η επιλογή της περιοχής έγινε καθώς μελέτες έχουν δείξει ότι η προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη [19-24] και η επιληπτογένεση [25,27,28] μπορούν να επηρεάσουν με ποικίλους τρόπους την περιοχή αυτή.

Σχετικά με τα σωματίδια Nissl, όπως αναφέρθηκε, ο βασικός τους ρόλος είναι η πρωτεϊνοσύνθεση και μπορούν να αποτελέσουν δείκτη μεταφραστικής δράσης των νευρικών κυττάρων αφού σημανθούν με βασικές χρωστικές όπως η Cresyl violet και μετρηθεί η πυκνότητά τους [29]. Για να διαπιστωθεί αν οι μεταβολές στη συνολική μεταφραστική δραστηριότητα των νευρικών κυττάρων λόγω της επίδρασης της προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη και της επιληπτογένεσης οφείλονται σε μεταβολές στον αριθμό των κυττάρων, χρησιμοποιήθηκε η χρώση DAPI για σήμανση πυρήνων καθώς και αντισώματα για τον εντοπισμό των νευρώνων (NeuN) και των αστροκυττάρων (GFAP). Επίσης, έγινε προσπάθεια απεικόνισης των νευρικών κυττάρων με χρώση κατά Golgi-Cox ώστε να διαπιστωθεί αν η προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη και η επιληπτογένεση έχουν κάποια επίδραση στην αρχιτεκτονική των κυττάρων.

5.1 Ραχιαίο ραβδωτό σώμα

Στην περιοχή του ραχιαίου ραβδωτού σώματος η προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη φαίνεται να επηρέασε την πυκνότητα των σωματιδίων Nissl καθώς η ένταση σήματος των σωματιδίων Nissl ήταν στατιστικώς σημαντικά μειωμένη στα ζώα της ομάδας που εκτέθηκαν προγεννητικά στην αιθανόλη σε σχέση με τα ζώα της ομάδας ελέγχου. Η

χορήγηση PTZ δεν φάνηκε να έχει κάποια σημαντική επίδραση στην πυκνότητα των σωματιδίων Nissl καθώς ζώα της ομάδας που έγινε χορήγηση PTZ δεν είχαν σημαντικές διαφορές στην ένταση σήματος των σωματιδίων Nissl σε σχέση με τα ζώα της ομάδας ελέγχου ενώ σημαντικές διαφορές δεν υπήρχαν ανάμεσα στα ζώα της ομάδας που εκτέθηκαν στην αιθανόλη και έγινε χορήγηση PTZ σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες που συγκρίθηκαν. Η διαφορά στην ένταση σήματος των σωματιδίων Nissl ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και την ομάδα PAE δεν φαίνεται να ακολουθεί το ίδιο πρότυπο και στον συνολικό αριθμό των κυττάρων, αφού σύγκριση του συνολικού αριθμού κυττάρων της ομάδας ελέγχου με την ομάδα PAE δεν είχε σημαντική διαφορά. Η έκθεση στο PTZ επίσης δεν φάνηκε να προκαλεί σημαντική μεταβολή στον συνολικό αριθμό των κυττάρων, κάτι που ισχύει και για την ομάδα PAE-PTZ.

Βιβλιογραφικές αναφορές δείχνουν ότι η έκθεση στην αιθανόλη και η επιληπτογένεση μπορούν να επηρεάσουν την περιοχή του ραχιαίου ραβδωτού σώματος. Μείωση στο μήκος και τον αριθμό των διακλαδώσεων στην περιοχή DLS φάνηκε να προκύπτει μετά από χρόνια έκθεση στην αιθανόλη κατά την προγεννητική περίοδο αν και με τρόπο που μόνο προσέγγιζε την σημαντικότητα [19]. Αυτό συμβαδίζει με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας καθώς η μείωση στην πυκνότητα των σωματιδίων Nissl στο ραχιαίο ραβδωτό σώμα που παρατηρήθηκε στην ομάδα PAE σε σχέση με την ομάδα ελέγχου μπορεί να ερμηνευτεί ως μείωση στο μήκος ή τον αριθμό των διακλαδώσεων αφού τα σωματίδια Nissl βρίσκονται στα κυτταρικά σώματα και στους δενδρίτες [29]. Σε μία άλλη μελέτη όμως φάνηκε ότι η οξεία έκθεση στην αιθανόλη την μεταγεννητική μέρα 6 μπορεί να προκαλέσει αύξηση στο μήκος των δενδριτών των MSN νευρώνων 24 ώρες μετά την έκθεση και αύξηση στον αριθμό των δενδριτών και των ακάνθων 1 μήνα μετά την έκθεση [21]. Αυτά τα αποτελέσματα έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής στην οποία όμως υπάρχει η διαφορά ότι εξετάστηκε η επίδραση της χρόνιας και όχι της οξείας έκθεσης στην αιθανόλη. Σχετικά με την επιληπτογένεση, μελέτες δείχνουν ότι επαγωγή κρίσεων με ηλεκτρικό kindling στο μεσολόβιο επίμυων μπορούν να προκαλέσουν υπερτροφία και αύξηση στο μήκος και στις διακλαδώσεις των MSN νευρώνων στο ραβδωτό σώμα 2 μέρες μετά την τελευταία εφαρμογή ρεύματος αλλά με τις μεταβολές αυτές να είναι παροδικές αφού 3 εβδομάδες μετά την επαγωγή κρίσεων δεν παρατηρήθηκαν αντίστοιχες αλλαγές στο μήκος και στις διακλαδώσεις των MSNs [27]. Δεδομένου ότι οι ιστοί στην παρούσα εργασία απομονώθηκαν στην ηλικία των 2 μηνών και η επαγωγή κρίσεων με χορήγηση PTZ

έγινε την μεταγεννητική μέρα 21, μπορεί να θεωρηθεί ότι τα αποτελέσματα συμβαδίζουν με την παραπάνω μελέτη αφού δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική διαφορά από την επίδραση PTZ στην πυκνότητα των σωματιδίων Nissl ή στον συνολικό αριθμό των κυττάρων που ακόμα και να προκλήθηκε κάποια αλλαγή τις πρώτες μέρες μετά τη χορήγηση PTZ, τελικά με το πέρασ του χρόνου εξαλείφθηκε.

5.2 Κοιλιακό ραβδωτό σώμα

Στην περιοχή του πυρήνα και του κελύφους του κοιλιακού ραβδωτού σώματος η προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη προκάλεσε σημαντική μείωση στην πυκνότητα των σωματιδίων Nissl στα ζώα της ομάδας που εκτέθηκαν προγεννητικά στην αιθανόλη σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επίσης, σημαντικά μειωμένη ήταν η ένταση σήματος των σωματιδίων Nissl στα ζώα της ομάδας που εκτέθηκαν στην αιθανόλη σε σχέση με τα ζώα της ομάδας που εκτέθηκαν στην αιθανόλη και τους χορηγήθηκε PTZ. Η χορήγηση PTZ μόνο δεν φάνηκε να προκαλεί σημαντική αλλαγή στην πυκνότητα των σωματιδίων Nissl καθώς ζώα της ομάδας που χορηγήθηκε PTZ δεν εμφάνισαν σημαντικές διαφορές στην πυκνότητα των σωματιδίων Nissl σε σχέση με τα ζώα ελέγχου. Από τα παραπάνω μπορεί να προκύψει το συμπέρασμα ότι η χορήγηση PTZ μεταγεννητικά μπορεί ενδεχομένως να μειώσει τον βαθμό επίδρασης της προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη στους MSNs στο κοιλιακό ραβδωτό σώμα. Σχετικά με τον συνολικό αριθμό κυττάρων, η προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη και η χορήγηση PTZ δεν φάνηκε να είχαν κάποια σημαντική επίδραση στην περιοχή του πυρήνα και του κελύφους.

Βιβλιογραφικές αναφορές αποδεικνύουν ότι η έκθεση στην αιθανόλη και η επιληπτογένεση μπορούν να έχουν επίπτωση στην περιοχή του κοιλιακού ραβδωτού σώματος. Σε μία μελέτη, η χρόνια προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη προκάλεσε μείωση με στατιστικώς σημαντικό τρόπο στο μήκος και τον αριθμό των διακλαδώσεων των νευρώνων στο κέλυφος αλλά όχι στον πυρήνα του κοιλιακού ραβδωτού σώματος [19]. Σχετικά με την περιοχή του κελύφους, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας μπορεί να ειπωθεί ότι συμφωνούν αφού η προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη προκάλεσε σημαντική μείωση στην πυκνότητα των σωματιδίων Nissl στην περιοχή του κελύφους, κάτι που μπορεί να υποδηλώνει μείωση στο μήκος ή/και στον αριθμό διακλαδώσεων των νευρώνων της περιοχής αυτής. Στην παρούσα εργασία όμως

βρέθηκε και σημαντική μείωση στην πυκνότητα των σωματιδίων Nissl από την επίδραση της αιθανόλης στην περιοχή του πυρήνα του κοιλιακού ραβδωτού σώματος σε αντίθεση με την παραπάνω μελέτη που η έκθεση στην αιθανόλη δεν φάνηκε να επηρεάζει τα νευρικά κύτταρα στην περιοχή του πυρήνα. Σε μία άλλη μελέτη, επίμυες εκτέθηκαν σε ατμούς αιθανόλης για 10 μέρες και εξετάστηκε η επίδραση της έκθεσης αυτής στους MSNs του πυρήνα και του κελύφους του κοιλιακού ραβδωτού σώματος [20]. Η έκθεση στους ατμούς αιθανόλης προκάλεσε σημαντική αύξηση στο μήκος και στις διακλαδώσεις των νευρικών κυττάρων μόνο στην περιοχή του πυρήνα του κοιλιακού ραβδωτού σώματος και όχι στο κέλυφος στους επίμυες που ιστοί απομονώθηκαν 7 μέρες μετά την τελευταία έκθεση στους ατμούς αιθανόλης. Στην ίδια μελέτη, η έκθεση στους ατμούς αιθανόλης προκάλεσε και αύξηση στην πυκνότητα συγκεκριμένων τύπων ακάνθων στην περιοχή του πυρήνα και του κελύφους του κοιλιακού ραβδωτού σώματος [20]. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έρχονται σε αντίθεση με αυτά της παρούσας εργασίας αφού η έκθεση στην αιθανόλη που εφαρμόστηκε δεν προκάλεσε αύξηση σε καμία περίπτωση είτε σχετικά με την πυκνότητα των σωματιδίων Nissl είτε σχετικά με τον αριθμό κυττάρων στην περιοχή του πυρήνα και του κελύφους του κοιλιακού ραβδωτού σώματος. Υπήρχαν βέβαια διαφορές στο πειραματικό πρωτόκολλο αφού στην εργασία αυτή εξετάστηκε η χρόνια έκθεση στην αιθανόλη προγεννητικά ενώ στην παραπάνω μελέτη εξετάστηκε η επίδραση της έκθεσης σε ατμούς αιθανόλης. Σχετικά με την επιληπτογένεση, σε μία μελέτη εφαρμόστηκε ηλεκτρικό kindling στην περιοχή της δεξιάς πλαγιοβασικής αμυγδαλής και εξετάστηκε η επίδραση αυτού στο ραβδωτό σώμα [25]. Παρατηρήθηκε αύξηση στον ρυθμό αυθόρμητης εκφόρτισης των νευρώνων μόνο στο ραβδωτό σώμα του αριστερού ημισφαιρίου η οποία αύξηση όμως καταλογίστηκε στην πλαγιοραχιαία περιοχή του ραβδωτού σώματος με το κοιλιακό ραβδωτό σώμα να μην επηρεάζεται από το kindling. Επίσης, βρέθηκε μη φυσιολογικό πρότυπο εκφορτίσεων στους νευρώνες του ραβδωτού σώματος στο δεξί ημισφαίριο το οποίο όμως δεν ήταν δυνατό να καταλογιστεί σε κάποια υποπεριοχή του ραβδωτού σώματος και συνεπώς το κοιλιακό ραβδωτό σώμα δεν φάνηκε να επηρεάζεται [25]. Τα συμπεράσματα της μελέτης αυτής φαίνεται να συνάδουν με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αφού η επιληπτογένεση με χορήγηση PTZ δεν επηρέασε σημαντικά το κοιλιακό ραβδωτό σώμα σχετικά με την πυκνότητα των σωματιδίων Nissl και τον συνολικό αριθμό των κυττάρων. Σε μία άλλη μελέτη, η χρόνια έκθεση στο PTZ μέσω ενδοπεριτοναϊκής χορήγησης προκάλεσε σημαντική αύξηση των επιπέδων ντοπαμίνης στο κοιλιακό

ραβδωτό σώμα κάτι που υποδηλώνει ότι το PTZ μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στην περιοχή αυτή [26]. Στη συγκεκριμένη εργασία που επίσης έγινε έκθεση στο PTZ μέσω ενδοπεριτοναϊκής χορήγησης, αλλά η έκθεση ήταν οξεία και όχι χρόνια όπως στην παραπάνω μελέτη, δεν εξετάστηκε αν το PTZ προκάλεσε μεταβολές στα επίπεδα ντοπαμίνης στο κοιλιακό ραβδωτό σώμα αλλά είτε προκλήθηκαν μεταβολές είτε όχι δεν επηρεάστηκε η ένταση σήματος των σωματιδίων Nissl όπως και ο συνολικός αριθμός των κυττάρων στην περιοχή αυτή.

5.3 Περιορισμοί της εργασίας

Όπως αναφέρθηκε, η σήμανση των νευρικών κυττάρων και των αστροκυττάρων με χρήση αντισωμάτων δεν ήταν δυνατή όπως δυνατή δεν ήταν και η εξαγωγή συμπερασμάτων για την επίδραση της προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη και της επιληπτογένεσης στην αρχιτεκτονική των κυττάρων στο ραβδωτό σώμα. Στη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν δεν σήμαναν τα νευρικά κύτταρα και τα αστροκύτταρα στην περιοχή του ραβδωτού σώματος. Εικάζεται ότι ο λόγος για τον οποίο συνέβη αυτό ήταν η παλαιότητα των τομών εγκεφαλικού ιστού που χρησιμοποιήθηκαν αφού η απομόνωση των εγκεφάλων έγινε περίπου 2 χρόνια πριν διεξαχθεί η διαδικασία της ανοσοϊστοχημείας και όλο αυτό το διάστημα οι τομές φυλάσσονταν σε ειδικά κουτιά και στην κατάψυξη σε θερμοκρασία -20°C . Ένδειξη ότι δεν έγινε κάποιο λάθος στην πειραματική διαδικασία, στα υλικά και στα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ότι σε άλλες περιοχές εκτός του ραβδωτού σώματος, όπως για παράδειγμα στην περιοχή του φλοιού, τα αντισώματα σήμαναν κανονικά τα νευρικά κύτταρα και τα αστροκύτταρα. Για την αξιολόγηση της αρχιτεκτονικής των νευρικών κυττάρων στο ραβδωτό σώμα χρησιμοποιήθηκε η χρώση κατά Golgi-Cox. Ενώ η χρώση των κυττάρων στο ραβδωτό σώμα ήταν επιτυχημένη, διαπιστώθηκε ότι οι νευρώνες στην περιοχή αυτή σε όλες τις συνθήκες δεν είχαν φυσιολογική μορφολογία. Αυτό εικάζεται ότι συνέβη γιατί οι εγκεφαλικοί ιστοί πριν χρησιμοποιηθούν στη διαδικασία χρώσης κατά Golgi-Cox διατηρούνταν για μεγάλο χρονικό διάστημα στην κατάψυξη σε θερμοκρασία -80°C , κάτι που όπως φάνηκε επηρέασε τη μορφολογία των κυττάρων. Τέλος, ένας ακόμη περιορισμός της εργασίας ήταν το μικρό μέγεθος δείγματος (n). Κάθε συνθήκη αποτελούνταν από 4 εγκεφάλους (n=4), κάτι που μπορεί να επηρέασε τη στατιστική ανάλυση.

5.4 Σύνοψη

Η εργασία αυτή είχε σκοπό να παρουσιάσει τις επιπτώσεις της χρόνιας προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη και της επιληπτογένεσης στην περιοχή του ραχιαίου και κοιλιακού ραβδωτού σώματος επίμυων Sprague Dawley ηλικίας 2 μηνών. Επειδή ασθενείς που εκτέθηκαν προγεννητικά στην αιθανόλη έχουν αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης επιληπτικών κρίσεων στη ζωή τους [10], στους επίμυες έγινε πρόκληση επιληπτικών κρίσεων με χορήγηση της ουσίας PTZ ώστε να μελετηθούν ταυτόχρονα οι επιπτώσεις της προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη και της επιληπτογένεσης. Περαιτέρω μελέτες είναι ανάγκη να διεξαχθούν για την καλύτερη κατανόηση των επιπτώσεων της προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη στον άνθρωπο καθώς, όπως αναφέρθηκε, το ποσοστό εμφάνισης ατόμων με κάποια διαταραχή λόγω προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη τείνει να αυξάνεται.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

6.1 Άρθρα

- [1] Sarah N. Mattson, Gemma A. Bernes, Lauren R. Doyle (2019), *Fetal Alcohol Spectrum Disorders: A review of the neurobehavioral deficits associated with prenatal alcohol exposure*, Alcoholism: Clinical and Experimental Research, 43(6):1046-1062.
- [2] Keshav K. Gupta, Vinay K. Gupta, Tomohiro Shirasaka (2016), *An Update on Fetal Alcohol Syndrome-Pathogenesis, Risks, and Treatment*, Alcoholism: Clinical and Experimental Research, 40(8):1594-602.
- [3] Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2002), *Fetal Alcohol Syndrome-Alaska, Arizona, Colorado, and New York, 1995-1997*, Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR), 51(20):433-5.
- [4] Deborah J. Fox, Sydney Pettygrove, Christopher Cunniff, et al. (2015), *Fetal Alcohol Syndrome Among Children Aged 7-9 Years-Arizona, Colorado, and New York, 2010*, Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR), 64(3):54-7.
- [5] Philip A. May, Amy Baete, Jaymi Russo, et al. (2014), *Prevalence and Characteristics of Fetal Alcohol Spectrum Disorders*, Pediatrics, 134(5):855-66.
- [6] Roland D Thijs, Rainer Surges, Terence J O'Brien, Josemir W Sander (2019), *Epilepsy in adults*, Lancet, 393(10172):689-701.
- [7] Robert S. Fisher, Carlos Acevedo, Alexis Arzimanoglou, et al. (2014), *A practical clinical definition of epilepsy*, Epilepsia, 55(4):475-82.
- [8] Gail S. Bell, Aidan Neligan, Josemir W. Sander (2014), *An unknown quantity-The worldwide prevalence of epilepsy*, Epilepsia, 55(7):958-62.
- [9] David W. Cope, Giuseppe Di Giovanni, Sarah J. Fyson, et al. (2009), *Enhanced tonic GABA_A inhibition in typical absence epilepsy*, Nature Medicine, 15(12):1392-8.
- [10] Stephanie H. Bell, Brenda Stade, James N. Reynolds, et al. (2010), *The Remarkably High Prevalence of Epilepsy and Seizure History in Fetal Alcohol Spectrum Disorders*, Alcoholism: Clinical and Experimental Research, 34(6):1084-9.
- [11] Ernest L. Abel, Robert F. Berman, Michael W. Church (1993), *Prenatal Alcohol Exposure Attenuates Pentylene-tetrazol-Induced Convulsions in Rats*, Alcohol, 10(2):155-7.
- [12] Boris Tabakoff, Paula L. Hoffman (2000), *Animal Models in Alcohol Research*, Alcohol Research & Health, 24(2): 77-84.
- [13] Cleopatra S. Planeta (2013), *Animal models of alcohol and drug dependence*, Brazilian Journal of Psychiatry, 35 Suppl 2:S140-6.
- [14] Yilin Wang, Penghu Wei, Feng Yan (2022), *Animal Models of Epilepsy: A Phenotype-oriented Review*, Aging and disease, 13(1):215-231.

- [15] Ludmyla Kandratavicius, Priscila Alves Balista, Cleiton Lopes-Aguiar, et al. (2014), *Animal models of epilepsy: use and limitations*, Neuropsychiatric Disease and Treatment, 10:1693-705.
- [16] Wolfgang Loeschner (2011), *Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs*, Seizure, 20(5):359-68.
- [17] Anatol C. Kreitzer, Robert C. Malenka (2008), *Striatal plasticity and basal ganglia circuit function*, Neuron, 60(4):543-54.
- [18] Julia Cox, Ilana B. Witten (2019), *Striatal circuits for reward learning and decision-making*, Nature reviews. Neuroscience, 20(8):482-494.
- [19] James P. Rice, Lisa E. Suggs, Alexandra V. Lusk, et al. (2012), *Effects of exposure to moderate levels of ethanol during prenatal brain development on dendritic length, branching, and spine density in the nucleus accumbens and dorsal striatum of adult rats*, Alcohol, 46(6):577-84.
- [20] Veronica L. Peterson, Brian A. McCool, Derek A. Hamilton (2015), *Effects of ethanol exposure and withdrawal on dendritic morphology and spine density in the nucleus accumbens core and shell*, Brain Research, 1594:125-135.
- [21] Erin Clabough, James Ingersoll, Tyler Reekes, et al. (2021), *Acute Ethanol Exposure during Synaptogenesis Rapidly Alters Medium Spiny Neuron Morphology and Synaptic Protein Expression in the Dorsal Striatum*, International journal of molecular sciences, 23(1):290.
- [22] Michael S. Patton, Samuel H. Sheats, Allison N. Siclair, Brian N. Mathur (2023), *Alcohol potentiates multiple GABAergic inputs to dorsal striatum fast-spiking interneurons*, Neuropharmacology, 232:109527.
- [23] B. A. Blanchard, S. Steindorf, S. Wang (1993), *Prenatal Ethanol Exposure Alters Ethanol-Induced Dopamine Release in Nucleus Accumbens and Striatum in Male and Female Rats*, Alcoholism, clinical and experimental research, 17(5):974-81.
- [24] Sebastiano Bariselli, Yolanda Mateo, Noa Reuveni, David M. Lovinger (2023), *Gestational ethanol exposure impairs motor skills in female mice through dysregulated striatal dopamine and acetylcholine function*, Neuropsychopharmacology, 48(12):1808-1820.
- [25] Saskia Kücker, Kathrin Töllner, Marion Piechotta, Manuela Gernert (2010), *Kindling as a model of temporal lobe epilepsy induces bilateral changes in spontaneous striatal activity*, Neurobiology of disease, 37(3):661-72.
- [26] Ronald J. Racine (1972), *Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure*, Electroencephalography and clinical neurophysiology, 32(3):281-94.
- [27] G. Campbell Teskey, Marie-H Monfils, Greg Silasi, Bryan Kolb (2006), *Neocortical kindling is associated with opposing alterations in dendritic morphology in neocortical layer V and striatum from neocortical layer III*, Synapse, 59(1):1-9.
- [28] L. Dazzi, M. Serra, M. L. Porceddu (1997), *Enhancement of basal and pentylentetrazol (PTZ)-stimulated dopamine release in the brain of freely moving rats by PTZ-induced kindling*, Synapse, 26(4):351-8.

- [29] Jay B. Angevine, Jr (2002), *Nervous System, Organization of*, Elsevier
- [30] Wei Duan, Yu-Ping Zhang, Zhi Hou (2016), *Novel Insights into NeuN: from Neuronal Marker to Splicing Regulator*, *Molecular neurobiology*, 53(3):1637-1647.
- [31] Zhihui Yang, Kevin K.W. Wang (2015), *Glial Fibrillary acidic protein: From intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker*, *Trends in neurosciences*, 38(6):364-74.
- [32] Glenda M. Halliday, Karen M. Cullen, Jillian J. Kril (1996), *Glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunohistochemistry in human cortex: a quantitative study using different antisera*, *Neuroscience letters*, 209(1):29-32.
- [33] Feng Zhong, Lei Liu, Jia-Li Wei, Ru-Ping Dai (2019), *Step by Step Golgi-Cox Staining for Cryosection*, *Frontiers in neuroanatomy*, 13:62.

6.2 Ιστοσελίδες

- [34] <https://www.epilepsy.com/what-is-epilepsy/seizure-types>
- [35] <https://www.cdc.gov/epilepsy/about/types-of-seizures.htm>