

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΣΕ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΣΙΝΟΠΟΥΛΟΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΘΕΜΑ: ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΥΡΑΜΙΔΙΚΩΝ
ΝΕΥΡΩΝΩΝ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΥ ΣΕ IN VITRO
ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ ΕΠΙΜΥΟΣ



ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. ΣΑΚΕΛΛΑΡΙΔΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

2. ΜΠΟΝΑΝΟΥ-ΤΖΕΔΑΚΗ ΣΟΦΙΑ
ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

3. ΑΣΠΡΟΔΙΝΗ ΕΥΤΥΧΙΑ
ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
(ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ)

ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2004

ΛΑΡΙΣΑ



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 2756/1

Ημερ. Εισ.: 20-06-2009

Δωρεά:

Ταξιδιωτικός Κωδικός: ΠΤ-ΠΣΕ-ΙΒ

2004

ΣΙΝ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000083614

ΕΥΧΑΡΙΣΤΗΡΙΟ

Θέλω να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα τη διπλωματική μου εργασία, κυρία Ευτυχία Ασπροδίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής Λάρισας, της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την άψογη συνεργασία, τις κατευθύνσεις και παρατηρήσεις, οι οποίες συνέβαλαν ουσιαστικά στην κατανόηση του αντικειμένου και συνολικά στην εκπόνηση της εργασίας.

Πρέπει επίσης ν' αναφερθώ στη συμβολή του κ. Θωμά Κυλινδρή, Ε.Τ.Ε.Π. Ιατρικής Πληροφορικής και της κ. Γεωργίας Σιαπκαλή, αρχιτέκτονος, η βοήθεια των οποίων στην κατανόηση πολλών στοιχείων του λογισμικού που χρησιμοποιήθηκε, ήταν καθοριστική.

Εξίσου συνέβαλε ο κ. Γεώργιος Κουκούλης, Καθηγητής, και το προσωπικό του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας, επιτρέποντάς μου να χρησιμοποιήσω ένα απόλυτα αναγκαίο μέρος του εξοπλισμού.

Την ίδια αναφορά οφείλω να κάνω και στον κ. Ιωάννη Αντωνόπουλο, Αναπληρωτή Καθηγητή Ανατομικής στο τμήμα Κτηνιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και τον κ. Λιαγκούρα Ιωάννη, στρατιωτικό Κτηνίατρο, μεταπτυχιακό φοιτητή, σε ό,τι αφορά την πρόσβαση προς τις τεχνικές και τον εξοπλισμό που μου παραχώρησαν.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
SUMMARY.....	5
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	6
1. Ανατομικά στοιχεία του ιπποκάμπου.....	7
2. Στοιχεία της οργάνωσης των νευρώνων του ιπποκάμπου.....	9
3. Στοιχεία για τις συναπτικές συνδέσεις στον ιππόκαμπο.....	11
4. Στοιχεία του συναπτικού κυκλώματος των νευρώνων του ιπποκάμπου...	12
5. Στοιχεία της λειτουργίας των πυραμιδικών νευρώνων του ιπποκάμπου...	14
6. Άκανθες, μορφολογικά και λειτουργικά στοιχεία.....	16
7. Ανοσοϊστοχημική μέθοδος χρώσης νευρώνων.....	16
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	19
ΥΛΙΚΟ.....	20
ΜΕΘΟΔΟΣ - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	21
1. Ψηφιακή φωτογράφιση.....	21
2. Ανακατασκευή των νευρώνων με camera lucida	22
3. Μορφομετρική ανάλυση.....	23
4. Τέσσερις διορθώσεις στα μετρούμενα μήκη.....	24
5. Εφαρμογή του προγράμματος Adobe Photoshop.....	27
6. Εφαρμογή του προγράμματος Architectural Desktop.....	27
7. Στατιστική επεξεργασία του αριθμού των ακάνθων.....	28
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	30
1. Μία εμπειρική αντίρρηση στη χρήση ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής, έναντι της camera lucida, στον σχεδιασμό δύο διαστάσεων.....	30
2. Εμπειρική αιτιολόγηση αποκλειστικής χρήσης του φακού 40X για τη μορφομετρική ανάλυση δενδριτών, στο μικροσκόπιο που συνδέεται με την camera lucida.....	31
3. Αιτιολόγηση της σημασίας της μορφομετρικής ανάλυσης.....	32
I.....	33
II.....	35
4. Η σημασία της περιοχής CA2.....	37
5. Η αντοχή στο χρόνο της μεθόδου Sholl είναι αξιοσημείωτη.....	37
6. Η σημασία της μέτρησης των ακάνθων.....	38
7. Σημασία της χρήσης ικανού λογισμικού.....	40

8. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της τεχνολογικής ανάπτυξης:	
<u>www.cns.soton.ac.uk</u>	43
ΣΧΕΔΙΑ.....	46
ΨΗΦΙΑΚΕΣ ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	58
ΠΙΝΑΚΕΣ	60
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ.....	65
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	66

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η ανάπτυξη μεθόδου μορφομετρικής ανάλυσης νευρώνων του υποκάμπου εγκεφάλου με απώτερο στόχο το συνδυασμό των μορφολογικών, βιοχημικών, ηλεκτροφυσιολογικών χαρακτηριστικών τους για την κατανόηση της λειτουργίας των νευρώνων.

Υλικό και μέθοδος. Χρησιμοποιήθηκαν παρασκευάσματα τομών της ραχιαίας μοίρας υποκάμπου εγκεφάλου επίμυος. Πυραμιδικοί νευρώνες της περιοχής CA1 του υποκάμπου σχεδιάστηκαν με camera lucida και φωτογραφήθηκαν με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή. Έγινε ανάλυση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των νευρώνων με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου, ενώ οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με την εφαρμογή εξειδικευμένων προγραμμάτων σε Η/Υ (Adobe Photoshop, Architectural Desktop).

Συμπερασματικά, αναπτύχθηκε μέθοδος μορφομετρικής ανάλυσης νευρώνων ως βασικό εργαλείο για την εις βάθος κατανόηση των ανατομικών τους χαρακτηριστικών.

SUMMARY

The aim of this study is to develop a method of morphometric analysis and its application on pyramidal neurons of the rat hippocampus. These neurons may be used to assert its significance in the recording of the features, which constitute the way of development, anatomical differentiation and biochemical activity of these neurons.

Materials and methods. Slices from the dorsal part of the rat hippocampus were prepared. Camera lucida reconstructions, digital photographing, microscopical observation and recording and measurements were made by means of specialized microscopes and computer programs.

In conclusion, the development of this analytical method may be considered as a basic tool for the further understanding of various biochemical and electrophysiological properties of neurons.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

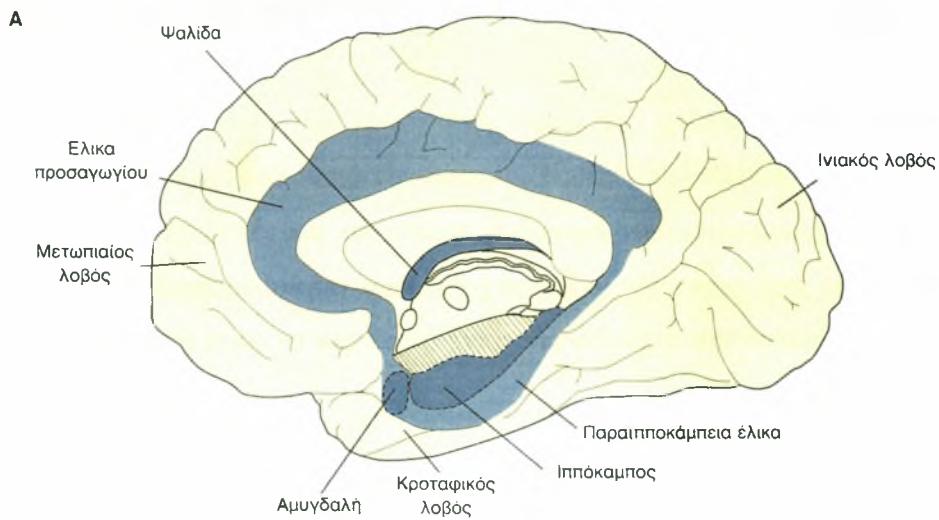
1. Ανατομικά στοιχεία του ιπποκάμπου

Το 1937 ο James Papez υποστήριξε ότι το φλοιϊκό υπόστρωμα των συναισθημάτων είναι ένας δακτύλιος φυλογενετικά πρωτόγονου φλοιού γύρω από το εγκεφαλικό στέλεχος, μια περιοχή την οποία ο Paul Broca είχε ονομάσει στεφανιαίο λοβό (1860). Ο στεφανιαίος λοβός περιλαμβάνει (1) την παραϊπποκάμπεια έλικα, η οποία αποτελεί την προς τα εμπρός και κάτω συνέχεια της έλικας του προσαγωγίου και (2) τον υποκείμενο φλοιό, δηλαδή τον ιπποκάμπειο σχηματισμό, ο οποίος είναι μορφολογικά απλούστερος από τον υπερκείμενο φλοιό (Kandel and Kupfermann, 1999)³⁵.

Ο ιπποκάμπειος σχηματισμός αποτελεί πυρήνα που περιλαμβάνεται στις τρεις εν τω βάθει κείμενες ομάδες νευρώνων, οι οποίες περιέχονται στα εγκεφαλικά ημισφαίρια και οι οποίες ονομάζονται πυρήνες. Οι άλλες δύο είναι τα βασικά γάγγλια και η αμυγδαλή (Amaral, 2000a; Amaral, 2000b; Jessel, 1999)^{3,4,32}.

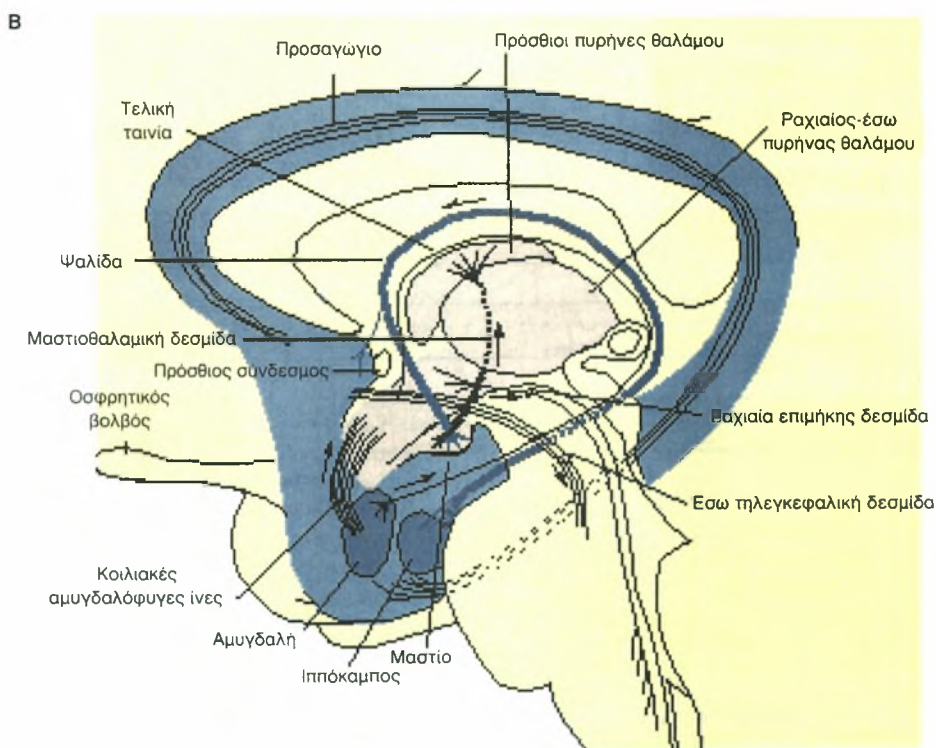
Ο ιπποκάμπειος σχηματισμός περιλαμβάνει τον ιδίως ιππόκαμπο, την οδοντωτή έλικα και το υπόθεμα του ιπποκάμπου (Kandel and Kupfermann, 1999)³⁵.

Ο ιππόκαμπος, ονομαζόμενος έτσι χάρη στην ομοιότητά του προς τον θαλάσσιο ίππο, βρίσκεται μεταξύ των καλύτερα χαρακτηρισμένων φλοιωδών δομών. Η οργάνωσή του είναι διακριτή με ικανοποιητική σαφήνεια, στοιχείο που τον καθιστά κατάλληλο για ανατομικές και φυσιολογικές έρευνες. Πολλά είναι γνωστά για τη συναπτική του οργάνωση και τα λειτουργικά χαρακτηριστικά των νευρώνων του. Το ενδιαφέρον για τη δομή του προέρχεται από τη συμμετοχή του σε μερικές κύριες νευρολογικές διαταραχές, όπως και από την προφανή του σημασία στις ομαλές γνωστικές λειτουργίες (Brown and Zador, 1990)¹³.



Εικόνα 1A (Kandel and Kupfermann, 1999)³⁵.

Το στεφανιαίο σύστημα. Η έσω όψη του εγκεφάλου δείχνει τον στεφανιαίο λοβό, που αποτελείται από αρχέγονο φλοιό (περιοχή γκρι χρώματος).

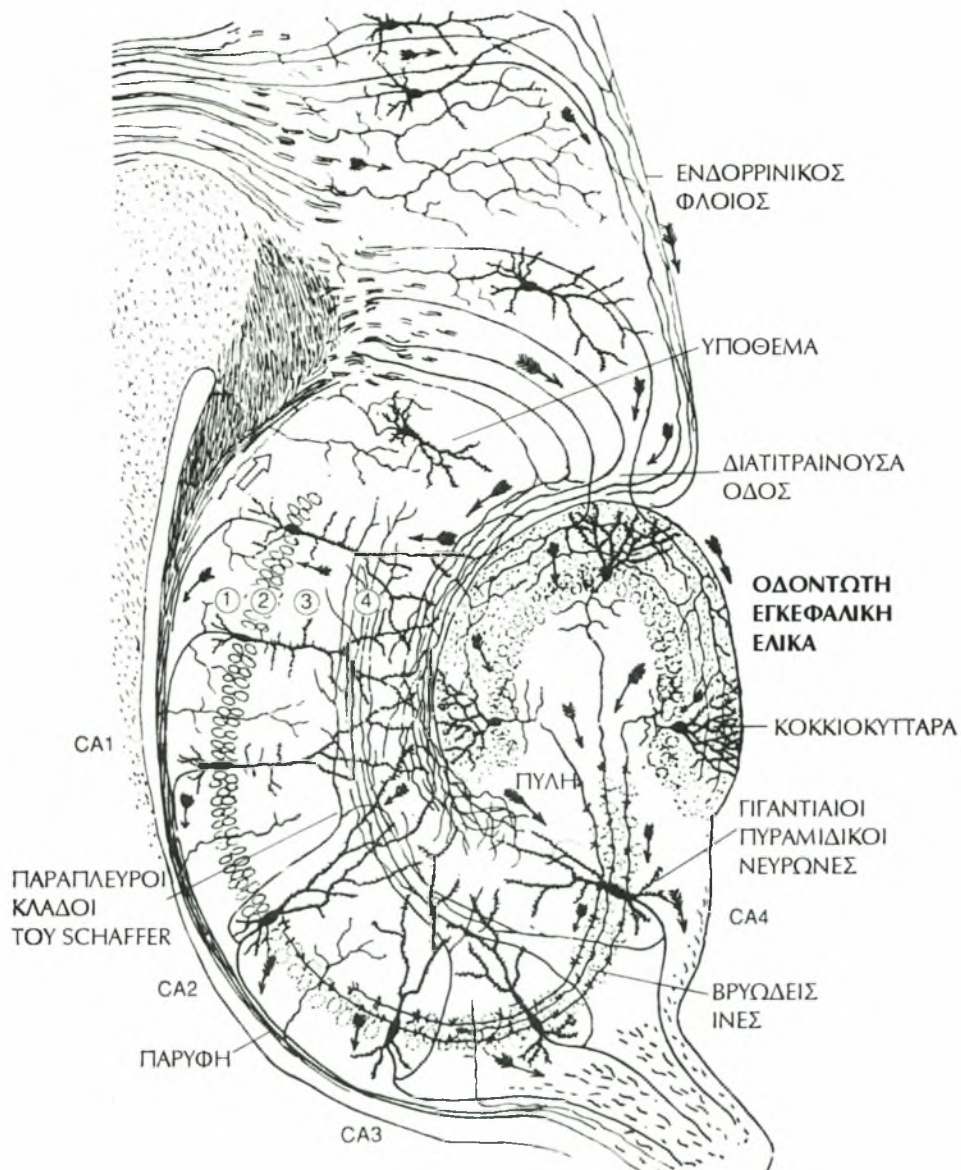


Εικόνα 1B (Kandel and Kupfermann, 1999)³⁵.

Διασυνδέσεις των εν τω βάθει δομών που περιλαμβάνονται στο στεφανιαίο σύστημα. Η κύρια κατεύθυνση της νευρικής δραστηριότητας σε κάθε δεμάτιο σημειώνεται με βέλος, αλλά η δραστηριότητα είναι συνήθως αμφίδρομη.

2. Στοιχεία της οργάνωσης των νευρώνων του ιπποκάμπου

Ο ιππόκαμπος είναι μια κυλινδρική δομή, του οποίου ο επιμήκης άξονας σχηματίζει ένα ημικόκλιο γύρω από τον θάλαμο. Η θέση του ιπποκάμπου σε σχέση με τις άλλες εγκεφαλικές δομές και σε κάποιο βαθμό με την εσωτερική του οργάνωση, δείχνει σημαντική διαφοροποίηση από είδος σε είδος. Η περιγραφή επικεντρώνεται στον επίμυ, γιατί αυτό είναι το πιο κοινό είδος για πειραματική ανάλυση (Brown and Zador, 1990)¹³.



Εικόνα 2 (Brown and Zador, 1990)¹³.

Ιππόκαμπος. Υπό Ramon y Cajal S., 1911⁶¹, τροποποιημένη.

Η εικόνα 2 δείχνει μερικά από τα νευρωνικά στοιχεία που είναι παρόντα σε μια λεπτή φέτα ιπποκάμπου που ελήφθη εγκάρσια προς τον επιμήκη άξονα. Μεγάλο μέρος του εσωτερικού κυκλώματος του ιπποκάμπου διατηρείται σε τομές που ελήφθησαν με αυτό τον προσανατολισμό, παρ' όλο που υπάρχουν επίσης σημαντικά επιμήκη μονοπάτια, κάθετα προς το επίπεδο της τομής (Amaral and Witter, 1989; Amaral, 1993)^{6,7}.

Ο ιππόκαμπος μπορεί να διαιρεθεί σε τέσσερις περιοχές (εικόνα 2), ο οποίες έχουν παραδοσιακά ονομαστεί CA1 - CA4 (από το λατινικό Cornu Ammon, ή κέρασ του Άμμωνος, χάρη στην ομοιότητά του προς το κέρασ ενός κριού). Ο Cajal διαιρεί τον ιππόκαμπο σε άνω και κάτω περιοχή (regio superior και regio inferior) (Ramon y Cajal, 1911)⁶¹. Η οδοντωτή εγκεφαλική έλικα (dentate gyrus), το υπόθεμα (subiculum) και ο ενδορρινικός φλοιός (entorhinal cortex), περιέχονται στον γενικότερο όρο ιπποκάμπειος σχηματισμός ή ιπποκαμπική περιοχή (Brown and Zador, 1990)¹³. Οι περιοχές CA1 και CA3 αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος του ιπποκάμπου (Brown and Zador, 1990; Schwartz and Westbrook, 2000)^{13,64}. Η περιοχή CA2 είναι τόσο μικρή και δύσκολα διακριτή σε μερικά είδη, ώστε συχνά δε λαμβάνεται υπ' όψη (Brown and Zador, 1990)¹³. Η περιοχή μεταξύ της οδοντωτής εγκεφαλικής έλικας και της κοκκιώδους στοιβάδας (stratum granulosum) της CA3 περιοχής ονομάζεται πολυμορφική ή πυλαία περιοχή, ή απλά πύλη (hilus) (Brown and Zador, 1990)¹³.

Ο ιππόκαμπος και η οδοντωτή εγκεφαλική έλικα είναι φλοιοί τεσσάρων στοιβάδων. Οι τέσσερις θεμελιώδεις στοιβάδες του ιπποκάμπου είναι η πολυμορφική στοιβάδα (stratum oriens), η πυραμιδική (stratum pyramidale), η ακτινωτή (stratum radiatum) και η βοθριώδης - μοριακή (stratum lacunosum - moleculare) (Brown and Zador, 1990)¹³. Η οδοντωτή εγκεφαλική έλικα αποτελείται από μια πολυμορφική στοιβάδα, την πύλη (hilus), μια κοκκιώδη (stratum granulosum) και μια μοριακή (stratum moleculare). Η μοριακή στοιβάδα της οδοντωτής εγκεφαλικής έλικας είναι συνεχόμενη με αυτή του ιπποκάμπου (Brown and Zador, 1990)¹³.

Στον επίμυ, αλλά και στο ινδικό χοιρίδιο, οι κύριοι νευρώνες του ιπποκάμπου είναι οι πυραμιδικοί. Είναι η πολυαριθμότερη τάξη νευρώνων στον ιππόκαμπο. Παρουσιάζουν παρόμοια μορφολογία με άλλους όμοιούς τους σε άλλους φλοιούς, παρ' όλο που είναι κάπως μικρότεροι (Brown and Zador, 1990)¹³.

Τα σώματα των πυραμιδικών νευρώνων αποτελούν την πυραμιδική στοιβάδα η οποία έχει πάχος δύο ή τριών κυττάρων μόνο. Τα σώματα των πυραμιδικών νευρώνων είναι κωνικά (πυραμιδικά), με βάση 20 - 40 μm και ύψος 40- 60 μm. Κάθε ένας

διαθέτει έναν παχύ κορυφαίο δενδρίτη, διαμέτρου 5 - 10 μm , ο οποίος περνά διαμέσω της ακτινωτής στοιβάδας (stratum radiatum) στη μοριακή (stratum lacunosum - moleculare) (Brown and Zador, 1990)¹³. Υπάρχουν επίσης αρκετοί βασικοί δενδρίτες, διαμέτρου 3 - 6 μm , οι οποίοι διακλαδίζονται επί 200 - 300 μm και σχηματίζουν την πολυμορφική στοιβάδα (stratum oriens). Οι κορυφαίοι και βασικοί δενδρίτες είναι καλυμμένοι με άκανθες (Brown and Zador, 1990)¹³.

Η μορφολογία των πυραμιδικών νευρώνων ποικίλει βαθμιαία. Από την CA3 προς την CA1, τα σώματά τους γίνονται μικρότερα και οι κορυφαίοι δενδρίτες επιμηκέστεροι, λεπτότεροι και ομαλότεροι στον τρόπο διακλάδωσης. Αρκετοί συγγραφείς, ονομάζουν τους νευρώνες της περιοχής CA3 ως γιγαντιαίους πυραμιδικούς νευρώνες (Brown and Zador, 1990)¹³.

Ανατομικές μελέτες καταδεικνύουν σημαντικότερες διαφορές μεταξύ του ραχιαίου και του κοιλιακού ιπποκάμπου, στις διασυνδέσεις της κάθε μοίρας με άλλες φλοιώδεις και υποφλοιώδεις περιοχές του εγκεφάλου, σε ό,τι αφορά τις προσαγωγές (Amaral et al., 1987; Amaral and Witter, 1989)^{5,6} και τις απαγωγές τους συνδέσεις (Schlessinger et al., 1978)⁶⁶.

3. Στοιχεία για τις συναπτικές συνδέσεις στον ιππόκαμπο

Οι συναπτικές συνδέσεις στον ιππόκαμπο είναι γενικά αξοδενδριτικές και αξοσωματικές, παρ' όλο που αξοαξονικές συνδέσεις έχουν επίσης παρατηρηθεί. Δεν φαίνεται να υπάρχει μεγάλη ποικιλία συναπτικών τύπων, η οποία χαρακτηρίζει μερικές περιοχές, όπως ο οσφρητικός βολβός.

Ο άξονας, δίνει τους ονομαζόμενους ως παράπλευρους, κλάδους του Schaffer. Αυτοί των CA3 πυραμιδικών νευρώνων είναι μερικώς εμμέλαιοι, με κόμβους του Ranvier να εμφανίζονται ανά 60 - 70 μm . Ένας έως τρεις αμύελοι άξονες αναδύονται από κάθε κόμβο και ακολουθούν πορεία παράλληλη προς την «πατρική» ίνα (Danscher et al., 1975)¹⁷. Κάθε ένας από αυτούς τους αμύελους κλάδους έχει πολυάριθμες προεκβολές, σε απόσταση περίπου 7 μm μεταξύ τους, κάθε μία από τις οποίες έρχεται σε επαφή με μία ή δύο δενδριτικές άκανθες (Danscher et al., 1975)¹⁷.

Σε συμφωνία με την διεγερτική δράση, οι συνάψεις των παράπλευρων του Schaffer είναι τύπου 1, δηλαδή έχουν ασύμμετρες μεμβρανικές παχύνσεις και στρογγυλά κυστίδια. Οι συνάψεις των παράπλευρων του Schaffer έχουν γενικά εντοπιστεί σε λεπτές δενδριτικές άκανθες, οι οποίες είναι τυπικά αδιακλάδωτες. Πάντως, διακλαδισμένες άκανθες έχουν παρατηρηθεί στην CA1 περιοχή. Σ' αυτές τις

περιπτώσεις περισσότερες από μία άκανθες αναδύεται από μία μόνο προεκβολή ενός δενδρίτη. Ένα χαρακτηριστικό των συνάψεων των παράπλευρων του Shaffer είναι η «ακανθιδίωση» που προεκβάλλει στο προσυναπτικό άκρο.

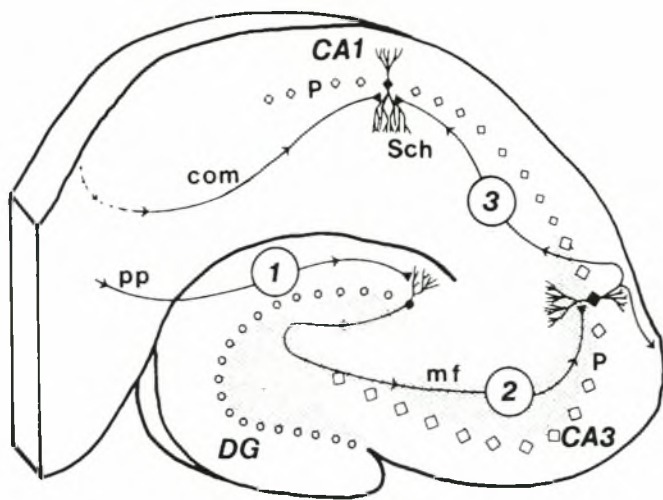
4. Στοιχεία του συναπτικού κυκλώματος των νευρώνων του ιπποκάμπου

Υπάρχουν τρεις κύριες προσαγωγές οδοί στον ιππόκαμπο: Ίνες της διατιτραίνουσας οδού (perforate path) (1) από τον ενδορρινικό φλοιό, σχηματίζουν διεγερτικές συνδέσεις με τα κοκκιοκύτταρα της οδοντωτής έλικας. Τα κοκκιοκύτταρα χορηγούν νευράξονες, οι οποίοι σχηματίζουν την οδό των βρυωδών ινών (2) και συνάπτονται με τους πυραμιδοειδείς νευρώνες της περιοχής CA3 του ιπποκάμπου. Τα κύτταρα της περιοχής CA3 προβάλλουν στους πυραμιδικούς νευρώνες της περιοχής CA1, μέσω των παράπλευρων κλάδων Schaffer (3).

Το τρισυναπτικό κύκλωμα είναι σαφώς ένα δίκτυο προωθητικής τροφοδότησης.

Οι άξονες των πυραμιδικών νευρώνων της περιοχής CA1 προβάλλουν κυρίως στο υπόθεμα (subiculum) και λιγότερο στον ενδορρινικό φλοιό (enthorinal cortex). Υπάρχει εκτεταμένη προβολή από το υπόθεμα προς τις εν τω βάθει στοιβάδες (V και VI) του ενδορρινικού φλοιού. Αυτές προβάλλουν στις επιφανειακές στοιβάδες (Kohler, 1986)³⁹, οι οποίες με τη σειρά τους δημιουργούν τις ίνες της διατιτραίνουσας οδού. Επομένως, οι εισερχόμενες ίνες της διατιτραίνουσας οδού προς τα κοκκιοκύτταρα προέρχονται από τον ενδορρινικό φλοιό και οι εξερχόμενες από την CA1 ίνες οδεύουν ευρέως προς την ίδια περιοχή και άμεσα, αλλά και δια μέσω του υποθέματος (Brown and Zador, 1990)¹³.

Το κύκλωμα της ιπποκαμπικής περιοχής μοιάζει να είναι οργανωμένο σε μια κλειστή αγκύλη που επιτρέπει ομοιόμορφη κατεύθυνση πληροφοριών. Δεν υπάρχει όμως ακριβής τοπογραφική χαρτογράφηση της δραστηριότητας κάθε περιοχής προς την επόμενη. Λίγα αποδεικτικά στοιχεία έχουν δημοσιευθεί πάνω σε αυτό το θέμα. Βάσει των στοιχείων αυτών, υποδηλώνεται ότι η «έξοδος» κάθε περιοχής καθορίζει εν μέρει τη μελλοντική της «είσοδο» και ότι μέρος της προϋποτιθέμενης ανατροφοδότησης προκύπτει εντός των ορίων της ίδιας της ιπποκαμπικής περιοχής (Brown and Zador, 1990)¹³.



pp. perforant path:
διατρητινός οδός

DG. Dentate Gyrus:
Οδοντωτή Εγκεφαλική Έλικα

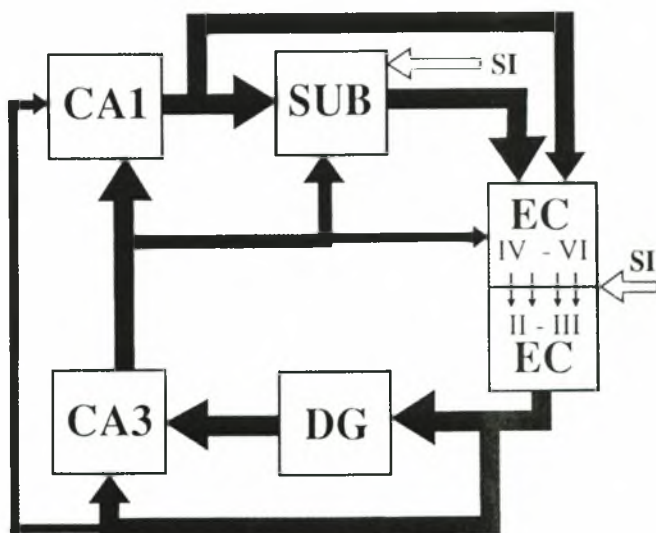
mf. mossy fibers:
βρυώδεις ίνες

P. Pyramidal neurons:
Πυραμιδικοί νευρώνες

Sch. Schaffer collaterals:
Παράπλευροι κλάδοι του Schaffer

Com. commissural pathway:
συνδεσμικό μονοπάτι

Εικόνα 3^A (Brown and Zador, 1990)¹³. Απλή αναπαράσταση του τρισυναπτικού κυκλώματος.



SI. Substantia Inominata:
Ανόνημη Ουσία

EC. Entorhinal Cortex:
Ενδορρινικός Φλοιός

DG. Dentate Gyrus:
Οδοντωτή Εγκεφαλική Έλικα

SUB. Subiculum:
Υπόθεμα

Εικόνα 3B (Brown and Zador, 1990)¹³.

Γενικό σχήμα του τρισυναπτικού κυκλώματος.

5. Στοιχεία της λειτουργίας των πυραμιδικών νευρώνων του ιπποκάμπου

Νευροφυσιολογικές μελέτες υποδεικνύουν ότι ο ιππόκαμπος παίζει ένα ρόλο-κλειδί σε διαδικασίες μάθησης ή μνήμης (Amaral, 2000; Brown and Zador, 1990)^{3,13}. Παρ' όλο που η ακριβής φύση των μνημονικών λειτουργιών που διεκπεραιώνονται από το κύκλωμα του ιπποκάμπου εξακολουθεί να είναι ασαφής, αυτή η περιοχή των κροταφικών λοβών μοιάζει να είναι ουσιαστική για το σύστημα της δηλωτικής / επιβεβαιωτικής μνήμης (declarative memory) στους ανθρώπους (Kandel et al., 2000; Squire, 1987-88)^{36,70}.

Το ενδιαφέρον για τον ιππόκαμπο προέρχεται επίσης από το γεγονός ότι η παθολογία αυτής της δομής μπορεί να έχει σοβαρές κλινικές επιπτώσεις. Για παράδειγμα, ο ιππόκαμπος είναι ένας από τους στόχους εκφυλιστικών διαταραχών όπως η νόσος του Alzheimer και ενέχεται συχνά στην επιληψία του κροταφικού λοβού (Brown and Zador, 1990)¹³.

Ο ιππόκαμπος μπορεί να αποθηκεύσει τη μακρόχρονη μνήμη επί εβδομάδες και να τη μεταφέρει σε ειδικές περιοχές του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων. Η διαδρομή ξεκινά με τη δημιουργία του νευρικού σήματος το οποίο προωθείται σε αντίστοιχο φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων. Οδηγείται στον ιππόκαμπο και από εκεί ξανά στον φλοιό, όπου αποθηκεύεται ως μακρόχρονη πλέον μνήμη (Kupfermann and Kandel, 1999)⁴³. Επίσης, ο ιππόκαμπος λειτουργεί ως σύστημα διευκόλυνσης, το οποίο είναι σημαντικό για την αποθήκευση της μνήμης κάπου αλλού στον εγκέφαλο, η οποία έχει υποστεί αρχικά επεξεργασία από τον κάτω κροταφικό φλοιό. Η περιοχή CA3 είναι ενδιάμεσος σταθμός αυτών των διαδρομών, όπως και η CA1 (Kupfermann and Kandel, 1999)⁴³.

Ερευνητές παρατήρησαν ότι με την αφαίρεση τόσο του αριστερού όσο και του δεξιού κροταφικού λοβού σε ασθενείς, ως μέσο θεραπείας της επιληψίας, προέκυπτε εμφανής και μη αναστρέψιμη διαταραχή της ικανότητάς τους να σχηματίζουν ορισμένους τύπους μακρόχρονης μνήμης. Σε αυτούς τους λοβούς υπάρχουν τμήματα του ιπποκάμπου (Kupfermann, 1999)⁴².

Ακόμη, υπάρχουν ενδείξεις ότι οι πυραμιδικοί νευρώνες αντιδρούν σε περιβαλλοντικές καινοτομίες. Έχει αναφερθεί η θεωρία του «γνωστικού χάρτη», η οποία υποθέτει ότι η έκθεση σε νέο περιβάλλον ενεργοποιεί μια σύγκριση με την προηγούμενη εμπειρία και, αν υπάρχει διαφορά, ξεκινά μια εξερευνητική συμπεριφορά (Faherty et al., 2003)²⁰. Η υπόθεση αυτή ενοείται από το εύρημα μιας σημαντικής

αύξησης της δενδριτικής περιοχής και του μήκους των δενδριτών, όπως επίσης και από αυτό μιας μεγαλύτερης συναπτικής διαθεσιμότητας στις περιοχές της CA1 και της οδοντωτής εγκεφαλικής έλικας. Παρόμοια ευρήματα υπάρχουν και στην CA3 περιοχή (Faherty et al., 2003)²⁰.

Είναι γνωστό ότι βλάβες του ιπποκάμπου έχουν ως αποτέλεσμα την απώλεια της πρόσφατης μνήμης, του προσανατολισμού στο χώρο (Moser et al., 1993)⁵⁵ και της λεκτικής / ρηματικής (verbal) μνήμης (Kandel et al., 2000)³⁶. Ο ιππόκαμπος φαίνεται ότι είναι μόνο παροδικός χώρος αποθήκευσης της μακροχρόνιας μνήμης και ότι τελικά μεταβιβάζει σε άλλες περιοχές τις πληροφορίες που αποκτήθηκαν, πιθανώς στον φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων, για μόνιμη αποθήκευση. Ο ιππόκαμπος μπορεί να μην αποθηκεύει καθόλου μακροχρόνιες πληροφορίες, αλλά να υποβοηθά στην αποθήκευση των πληροφοριών, οι οποίες υπέστησαν αρχικά επεξεργασία από τον κάτω κροταφικό φλοιό. Επομένως, ο ιππόκαμπος μπορεί να είναι είτε σταθμός για τη μακροχρόνια μνήμη, είτε σύστημα διευκόλυνσης το οποίο είναι σημαντικό για την αποθήκευση της μνήμης σε άλλο σημείο του εγκεφάλου. (Horel, 1994; Zola-Morgan and Squire, 1986).^{28.79}

Ο ιππόκαμπος θεωρείται η υπεύθυνη δομή για τη συνειδητή μάθηση. Η ιδέα αυτή ενισχύθηκε από μια περίπτωση αμνησίας σε ασθενή με κάκωση στο CA1 πεδίο (Horel, 1994; Zola-Morgan and Squire, 1986)^{28.79}. Αν και, απώλειες μνήμης μπορεί να παρατηρηθούν και σε άλλες βλάβες σε άλλα σημεία του φλοιού, ή να είναι πολύ ήπιες (Horel, 1994; Zola-Morgan and Squire, 1986)^{28.79}.

Σε άλλες κλινικές περιπτώσεις στις οποίες τμήματα του ιπποκάμπου αφαιρέθηκαν για τη μείωση επιληπτικών κρίσεων δεν προκλήθηκε, όπως αναμενόταν, αμνησία (Glaser, 1980)²⁵. Σε άλλη περίπτωση, αλλοίωσης τμήματος του ιπποκάμπου, δεν σημειώθηκε απώλεια πληροφοριών όπως είναι μεταξύ άλλων οι οσφρητικές (Kaut et al., 2003)³⁷. Μια σειρά από έρευνες σε ζώα, δείχνουν ότι περιορισμένης έκτασης βλάβες στον ιππόκαμπο δεν προκαλούν τη σφαιρική αμνησία που εκφράστηκε σε ασθενή στον οποίο έγινε δίπλευρη εκτομή των μέσων κροταφικών λοβών.

Τέλος, σύμφωνα με ευρήματα πειραμάτων συμπεριφοράς, προτείνεται ο επιμερισμός του ιπποκάμπου με κριτήριο τα λειτουργικά χαρακτηριστικά: ο ραχιαίος ιππόκαμπος θεωρείται ότι διαδραματίζει θεμελιώδη ρόλο στη χωρική (spatial) μνήμη (Hock et al., 1998; Moser et al., 1993, Moser et al., 1998)^{26.55.56}, ενώ ο κοιλιακός πιστεύεται πως ενέχεται στη διαδικασία της εμπέδωσης των πληροφοριών (Maruki et al., 2001; Witter, 1986; Witter et al., 2000)^{50.76.77}.

6. Άκανθες, μορφολογικά και λειτουργικά στοιχεία

Οι άκανθες, είναι εξειδικευμένες πλάγιες προεκβολές του στελέχους του δενδρίτη στις οποίες πραγματοποιούνται διεγερτικές συναπτικές επαφές. Αποτελούνται συνήθως από ένα λεπτό αυχένα και μια πιο διογκωμένη κεφαλή (Kandel, 1999)³³.

Οι δενδριτικές άκανθες είναι στόχοι των περισσότερων διεγερτικών προβολών στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) και είναι μορφολογικά ετερογενείς. Μελέτες της λεπτής δομής έχουν κατατάξει παραδοσιακά τις άκανθες σε τέσσερις κύριες κατηγορίες, βάσει των διακριτών τους μορφολογιών: α) νηματοπόδια, β) με μορφή κοντού κορμού ή κοντής ρίζας, γ) λεπτές και δ) με μορφή μανιταριού (Parnass et al., 2000)⁵⁷.

Στους πυραμιδικούς νευρώνες της περιοχής CA1 φαίνεται ότι οι υποδοχείς διεγερτικού διαβιβαστή NMDA (N-μεθυλο-D-ασπαραγινικό) φαίνεται ότι είναι συγκεντρωμένοι στις κεφαλές των ακάνθων και όχι στα στελέχη των δενδριτών (Kandel, 1999)³⁴. Η ενεργοποίηση των διαύλων-υποδοχέων NMDA εκπολώνει τις άκανθες σε βαθμό ικανό να απομακρύνει τα Mg^{2+} από τους διαύλους - υποδοχείς NMDA, επιτρέποντας στα Ca^{2+} να εισέλθουν στις άκανθες. Η άκανθα δρα ως ένα λειτουργικό διαμέρισμα το οποίο περιορίζει την διάχυση των Ca^{2+} , έτσι ώστε να περιορίζεται η συναπτική δράση στις συνάψεις οι οποίες είναι ενεργές (Kandel, 1999)³⁴. Σε ό,τι αφορά κυρίως την περιοχή CA1 το ασβέστιο προκαλεί τη διαρκή ενίσχυση της συναπτικής διαβίβασης ενεργοποιώντας δύο ασβέστιο - εξαρτώμενες πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης-θρεονίνης, δηλαδή την κινάση Ca^{2+} /καλμοδουλίνης και την πρωτεϊνική κινάση C, καθώς και την πρωτεϊνική κινάση της τυροσίνης. Μία από τις κινάσες αυτές, η ισομορφή της πρωτεϊνικής κινάσης C, καθίσταται τότε διαρκώς ενεργός (Kandel, 1999)³⁴.

7. Ανοσοϊστοχημική μέθοδος χρώσης νευρώνων

Εκτεταμένες ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες έδειξαν ότι η δραστηριότητα των νευρώνων σχετίζεται άμεσα με την αρχιτεκτονική τους (Rainnie, Asproдини et al., 1993; Staff et al., 2000)^{60,71}. Επιβάλλεται λοιπόν η χρήση αποτελεσματικών μεθόδων χρώσης, για τη μελέτη της δομής αυτής. Η ταυτόχρονη μελέτη των ηλεκτροφυσιολογικών και μορφολογικών χαρακτηριστικών των νευρώνων, έγινε εφικτή με τη μέθοδο της ενδοκυττάριας ιοντοφόρησης της βιοκυτίνης. Το μικρό μοριακό βάρος της ουσίας αυτής δεν επηρεάζει σημαντικά την αντίσταση των ηλεκτροδίων καταγραφής και

επομένως δεν παρεμποδίζει την ενδοκυττάρια καταγραφή και ταυτόχρονη σήμανση των νευρώνων (Hsu et al., 1983; Sternberger 1978)^{30,72}.

Προ της χρήσης της βιοκυτίνης, προτεραιότητα είχε η ενδοκυττάρια έγχυση του ενζύμου HRP (horseradish peroxidase) ως νευρωνικού δείκτη (Snow et al., 1976)⁶⁹ διότι και αυτή χρωματίζει τους νευρώνες έναν προς έναν. Όμως, η μέθοδος βιοκυτίνης άρχισε να χρησιμοποιείται αντί της μεθόδου σεσημασμένου αντισώματος υπεροξειδάσης-αντιυπεροξειδάσης (μέθοδος PAP), στις αρχές της δεκαετίας του '80, γιατί διαπιστώθηκε ότι είναι περισσότερο ευαίσθητη και ειδική (Hsu et al., 1983; Sternberger 1978)^{30,72}. Κατά συνέπεια, είναι δυνατή η ανίχνευση αντιγόνου, δηλαδή της βιοκυτίνης, σε μικρές ποσότητες στον ιστό και επομένως η μείωση του χρόνου επώασής του.

Ένα πρόβλημα στην ενδοκυττάρια χρώση των νευρώνων, με τη χρήση ουσιών όπως η βιοκυτίνη και η χρώση Golgi, αποτελεί η μεγάλη πιθανότητα διείσδυσής τους μέσω των χασματοσυνδέσεων σε γειτονικούς νευρώνες. Οι χασματικές συνδέσεις διαμεσολαβούν στη διακυτταρική επικοινωνία των περισσότερων ιστών και συστημάτων του οργανισμού (Dermietzel and Spray, 1993; Hofer and Dermietzel, 1998; Zoidl and Dermietzel, 2002)^{18,27,80} και επιτρέπουν την διπλής κατεύθυνσης ανταλλαγή ιόντων και μικρών μορίων (μέχρι 1 kDa) μεταξύ των κυττάρων, επιτυγχάνοντας με αυτό τον τρόπο την ηλεκτροτονική και μεταβολική σύζευξη μεταξύ τους. Το φαινόμενο αυτό έχει τη δική του σημασία, και παρουσιάζει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον. Δεν είναι όμως επιθυμητό στη μελέτη ξεχωριστών νευρώνων, διότι ο σκοπός είναι να χρωματίζονται διαχωρισμένα τα δενδριτικά δένδρα, με διακριτά και ολοκληρωμένα τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά.

Τα παρασκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, έχουν χρωσθεί με τη μέθοδο της βιοτινυλιωμένης αβιδίνης, δηλαδή του συμπλόκου αβιδίνης-βιοτίνης (avidin - biotin complex, ABC) (Hsu et al., 1981)²⁹. Σημαντικά στοιχεία της μεθόδου, περιληπτικά, είναι τα εξής:

Αφού προηγουμένως έχει εγχυθεί βιοκυτίνη, διέρχεται από το ηλεκτρόδιο διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) (3%), το οποίο είναι υπόστρωμα για την ενδογενή υπεροξειδάση. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να «καταλαμβάνεται» η ενδογενής υπεροξειδάση και να μην προσδένεται στη 3,3'-τετραχλωρο-διαμινοβενζιδίνη (3,3'-diaminobenzidine, DAB), η οποία θα ακολουθήσει αργότερα. Έτσι αποφεύγεται η χρώση ολόκληρης της τομής. Η διαπερατότητα της μεμβράνης αυξάνεται με τη χρήση Triton X-100 και ακολουθεί η ένθεση των τομών σε διάλυμα που περιέχει ABC. Το ABC διαθέτει επίσης και μεγάλο αριθμό μορίων υπεροξειδάσης, τα οποία είναι

πολλαπλώς συνδεδεμένα με τα μόρια της βιοτίνης. Η αβιδίνη του ABC διαθέτει τέσσερις θέσεις δέσμευσης βιοτίνης, από τις οποίες είναι κατειλημμένες οι τρεις. Η τέταρτη υποδέχεται την ήδη υφιστάμενη στο νευρώνα βιοκυτίνη, ένα σύμπλοκο βιοτίνης-λυσίνης. Έτσι, υπάρχουν τελικώς δεσμευμένα μόρια υπεροξειδάσης στις προς αναζήτηση αντιγονικές θέσεις.

Οι αντιγονικές θέσεις ανιχνεύονται με την προσθήκη της DAB. Πρόκειται για χρωμογόνο ένωση, η οποία οξειδώνεται με την προσθήκη νέου διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) (0,3%), με την καταλυτική δράση της δεσμευμένης υπεροξειδάσης στα μόρια της βιοτίνης του ABC. Με αυτό τον τρόπο η DAB παράγει ένα αδιάλυτο, καφέ χρώματος και πυκνό ίζημα. Το ίζημα αυτό είναι δυνατό να παρατηρηθεί τόσο με το οπτικό, όσο και με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Hsu et al., 1983)³⁰.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΟ

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν:

Λευκοί άρρενες (βάρους 160-250gr) επίμυες τύπου Wistar οι οποίοι προέρχονταν από την αποικία πειραματοζώων του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής. Τομές (πάχους 500μm) μοίρας του ιπποκάμπου από εγκέφαλο επίμυων, προετοιμάσθηκαν στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας. Ενδοκυττάρειες καταγραφές πραγματοποιήθηκαν από πυραμιδικούς νευρώνες της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου με μικροπιπέτες πλήρεις με 2M οξικού καλίου και 1% βιοκυτίνης. Μετά το πέρας της ηλεκτροφυσιολογικής καταγραφής οι τομές τοποθετήθηκαν σε διάλυμα παραφορμαλδεΐδης 4% για 24 ώρες. Κατόπιν, κόπηκαν περαιτέρω σε τομές πάχους 75-100μm. Ακολούθησε η διαδικασία ιστολογικής επεξεργασίας των τομών με στόχο τη μονιμοποίηση και χρώση των νευρώνων, από τους οποίους είχε πραγματοποιηθεί ηλεκτροφυσιολογική καταγραφή. Στη συνέχεια, οι τομές παρελήφθησαν και χρησιμοποιήθηκαν στη μορφολογική μελέτη.

Ανακατασκευή των νευρώνων με camera lucida.

Ψηφιακή φωτογράφιση, μετά την προαναφερόμενη επιλογή αυτών των παρασκευασμάτων και αποθήκευση με ψηφιακή μορφή.

Λεπτομερή σχέδια τα οποία είναι προϊόν οπτικής παρατήρησης και σχεδιασμού σε Η/Υ.

ΜΕΘΟΔΟΣ - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα επτά βασικά μέρη της μεθόδου, η οποία περιλαμβάνει τη μορφομετρική ανάλυση, εφαρμόστηκαν με την σειρά που ακολουθεί:

1. Ψηφιακή φωτογράφιση

Χρησιμοποιήθηκε ο ακόλουθος εξοπλισμός:

- Φωτογραφική μηχανή και κάμερα Sony Exwave HAD model no SSC-DC58AP στο εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του ΠΠΓΝΛ και Sony Hyper HAD στο εργαστήριο Ανατομικής του τμήματος Κτηνιατρικής του Α.Π.Θ.
- Μικροσκόπιο Zeiss AxioLab τεσσάρων φακών Zeiss Achromat: 40X/0.65, 2.5X/0.06, 4X/0.10, 1X/0.25. Η μεγέθυνση που μελετήθηκε έγινε με τον πρώτο από αυτούς.
- Πρόγραμμα PCTV Vision, Version 1.96 1999-2000. Τα αρχεία που δημιουργήθηκαν είναι έγγραφα εικόνας ".tif", ύψους 1200 X πλάτους 1600 pixels, με ανάλυση 100X100 dpi.

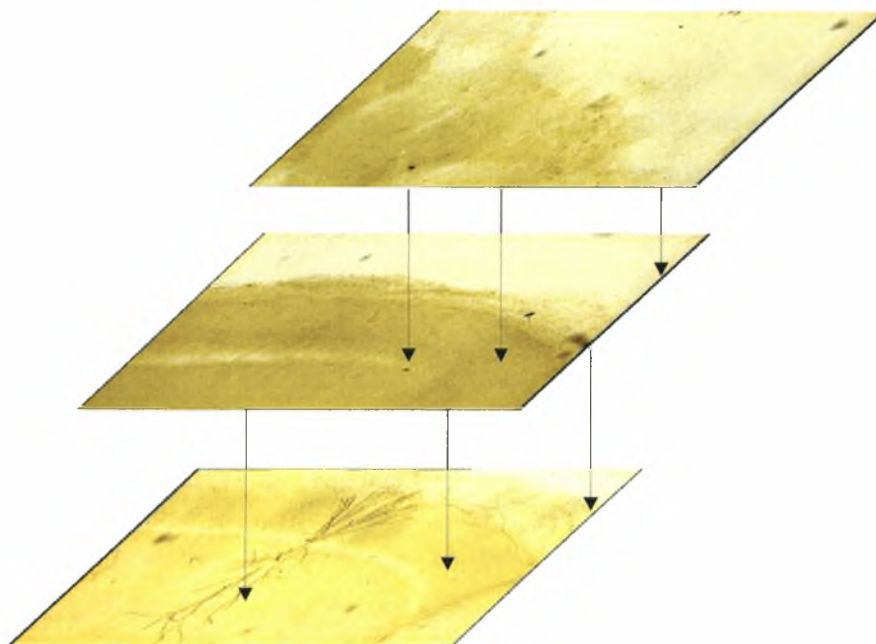
Η φωτογράφιση είναι καθοριστική για:

α) την ανακατασκευή της πραγματικής μορφής του νευρώνα με την επίθεση των φωτογραφιών από την κάθε τομή, της μιας επάνω στην άλλη, με σκοπό τη δημιουργία αρχείου για απεριόριστο αριθμό παρατηρήσεων, καθώς υπάρχει κίνδυνος σημαντικής φθοράς ή θραύσης του πρωτότυπου παρασκευάσματος εξαιτίας της συνεχούς χρήσης.

β) την παρατήρηση και μέτρηση, δειγματοληπτική ή συνολική, των ακάνθων και την περαιτέρω μορφομετρική και στατιστική τους μελέτη. Η συνδυασμένη αυτή μελέτη είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την κατανόηση του τρόπου ανάπτυξης, κατανομής και βιοχημικής συμπεριφοράς των ακάνθων, σε κάθε τύπο νευρώνα, γιατί είναι ταχύτερη από το χρονοβόρο σχεδιασμό των ακάνθων με camera lucida. Μπορεί να καταγράψει μαζικά τις άκανθες σε διάφορες φάσεις μορφολογικής διαφοροποίησής τους, ιδίως αν υπάρχει πολύ μεγάλος αριθμός παρασκευασμάτων και πολύπλοκων δενδριτικών διακλαδώσεων.

2. Ανακατασκευή των νευρώνων με camera lucida

Πραγματοποιήθηκε σε ριζόχαρτο με τη βοήθεια μικροσκοπίου το οποίο φέρει τον μηχανισμό camera lucida. Πρόκειται για ένα σύστημα φακών, που επιτρέπει να φαίνονται στο ίδιο οπτικό πεδίο το παρατηρούμενο παρασκεύασμα και μία επιφάνεια ευρισκόμενη στην δεξιά πλευρά ενός οπτικού μικροσκοπίου στην οποία σχεδιάζεται με το χέρι το αντικείμενο της παρατήρησης. Επιτυγχάνεται έτσι μία μίξη των δύο εικόνων: αυτής του παρασκευάσματος στην αντικειμενοφόρο πλάκα και αυτής του σχεδιασμού στην παράπλευρη επιφάνεια, οι οποίες επιβάλλεται να ταυτίζονται πλήρως μεταξύ τους σε όλη τη διάρκεια του σχεδιασμού. Αυτό οδηγεί στην όσο το δυνατόν ακριβέστερη αναπαράσταση του υπό παρατήρηση αντικειμένου.



Εικόνα 4.

Ενδεικτική αναπαράσταση ταύτισης των τριών τομών, στις οποίες περιέχεται ο πυραμιδικός νευρώνας CA1bC1, ο οποίος αναλύεται στα «ΣΧΕΔΙΑ» και τους «ΠΙΝΑΚΕΣ».

Προϋπόθεση ενός αξιόπιστου σχεδιασμού, είναι βέβαια ο ακριβής χειρισμός των τομών στις οποίες περιέχεται κάθε νευρώνας. Υπάρχει το ενδεχόμενο, ένας νευρώνας να περιέχεται σε μία μόνο τομή. Το πιθανότερο όμως είναι ότι έχει περιληφθεί σε δύο, τρεις ή ακόμη και τέσσερις τομές λόγω της τρισδιάστατης ανάπτυξης του σώματος, των δενδριτικών και αξονικών διακλαδώσεών του. Έτσι, σχεδιάζεται πρώτα η τομή στην οποία βρίσκεται το μεγαλύτερο μέρος του νευρώνα και

ακολουθούν οι υπόλοιπες. Γίνεται ιδιαίτερη προσπάθεια να συμπίπτουν τα σημεία ταύτισης που έχουν τεθεί από τον σχεδιαστή, δηλαδή τα σημεία συνέχειας της διακλάδωσης από την προηγούμενη στην επόμενη τομή, ώστε να επιβεβαιώνεται η ομαλή συνέχεια και η ολοκλήρωση του σχεδιασμού.

3. Μορφομετρική ανάλυση

Οι αποτυπωμένοι στα σχέδια πυραμιδικοί νευρώνες, αναλύονται βάσει της μεθόδου που έχει επινοήσει και περιγράψει ο D. A. Sholl (Sholl, 1953)⁶⁷. Η μέθοδος είναι η ακόλουθη:

Κάθε νευρώνας σχεδιάζεται σε ξεχωριστή επιφάνεια. Ορίζεται η κλίμακα του σχεδιασμού, προκειμένου να γίνουν οι κατάλληλοι υπολογισμοί κατά την ποσοτική ανάλυση.

Ο αντικειμενικός φακός που χρησιμοποιείται, είναι αυτός της μεγέθυνσης 40X. Οδηγεί σε ικανοποιητική λεπτομέρεια ανακατασκευής (reconstruction), προκειμένου να μετρηθούν τα ποσοτικά χαρακτηριστικά ενός νευρώνα, αν και καθιστά τις αποστάσεις τις μικρότερες των 2μ δύσκολα διακριτές. Για να επιτευχθεί μεγαλύτερη ευκρίνεια, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί ο μεγέθυνσης 60X, ή ο καταδυτικός φακός (για την επιλογή αυτή, δείτε τμήμα 2 στο κεφάλαιο «ΣΥΖΗΤΗΣΗ», για την εμπειρική αιτιολόγηση αποκλειστικής χρήσης του φακού μεγέθυνσης 40X).

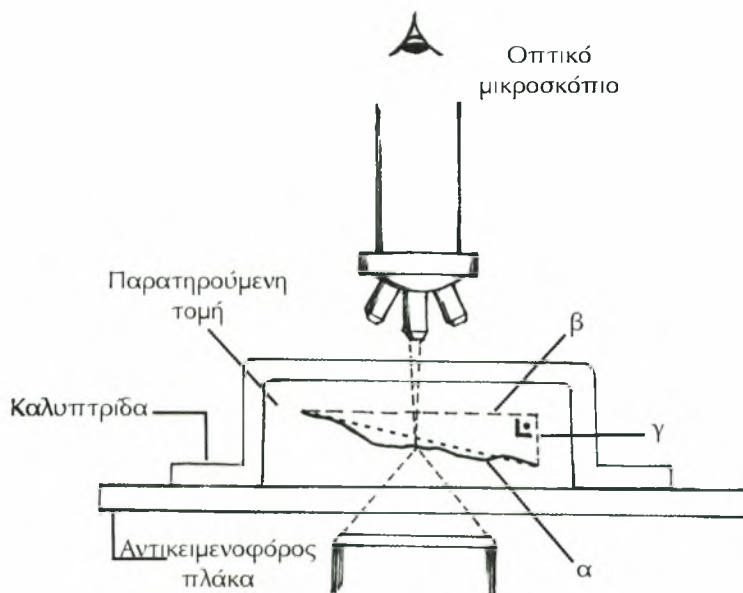
Προκειμένου να μελετηθεί ο τρόπος με τον οποίο ο αριθμός των κλάδων και η κατανομή τους (distribution) ποικίλει ανάλογα με την απόσταση από το σώμα, χρησιμοποιείται μια σειρά ομόκεντρων ημικυκλίων, ως συντεταγμένες αναφοράς. Για τους βασικούς (basal) δενδρίτες, το κοινό κέντρο των ημικυκλίων βρίσκεται στο σώμα, στο σημείο τομής του κάθετου και του οριζόντιου άξονα (σχέδιο 5). Για τις διακλαδώσεις του κορυφαίου (apical) δενδρίτη, το κοινό κέντρο των ημικυκλίων τέθηκε στην πρώτη διακλάδωση (Sholl, 1953)⁶⁷. Προκειμένου να καταγραφούν οι δενδρίτες γρήγορα και με τρόπο ώστε να ανευρίσκονται εύκολα οι σχέσεις κάθε κλάδου, γίνεται αρίθμηση (Sholl, 1953)⁶⁷ (σχέδιο 3).

Η μέθοδος αυτή παρουσιάστηκε το 1953, μια χρονολογία αρκετά μακρινή, ώστε να δημιουργεί κάποια επιφύλαξη για την ισχύ της εν έτει 2004. Όμως, το στοιχείο αυτό ομαλοποιείται, καθώς ένα πλήθος εργασιών που περιλαμβάνουν μορφομετρική ανάλυση πυραμιδικών, καθώς και άλλων ειδών νευρώνων, στον ιππόκαμπο και αλλού, χρησιμοποιούν κατά βάση την ίδια μέθοδο, το ίδιο σκεπτικό (Bartesaghi and Ravasi, 1999; Larkman, 1991a; Parnass et al., 2000; Staff et al., 2000)^{10,44,57,71}. Προσθέτουν

βέβαια επί μέρους παρατηρήσεις και στατιστικά στοιχεία, χάρη στην πρόοδο του σχετικού λογισμικού και την ανάπτυξη προγραμμάτων στατιστικής επεξεργασίας (δείτε τα σχετικά σχόλια στο τμήμα 5 του κεφαλαίου «ΣΥΖΗΤΗΣΗ») (Bartesaghi and Ravasi, 1999; Larkman, 1991a; Parnass et al., 2000)^{10,44,57}.

4. Τέσσερις διορθώσεις στα μετρούμενα μήκη

i) Το παρατηρούμενο μήκος είναι η προβολή του αληθινού μήκους στο επίπεδο της τομής (Sholl, 1953)⁶⁷ (δείτε την εικόνα 5). Οι δενδρίτες δεν βρίσκονται κατ' ανάγκη παράλληλα προς το επίπεδο της τομής. Αν πράγματι βρεθούν σε παράλληλη θέση με αυτό το επίπεδο, θα είναι τυχαίο συμβάν. Ο οφθαλμός, μέσω του αντικειμενικού φακού, διακρίνει όλα τα σημεία που απαρτίζουν το πραγματικό μήκος του δενδρίτη, αλλά, εξαιτίας της κάτοψης δεν λαμβάνει υπόψη του την κλίση του δενδρίτη, με αποτέλεσμα να σχεδιάζεται μόνο το μήκος της κάτοψης (πλευρά β ορθογωνίου τριγώνου στην εικόνα 5).



Εικόνα 5.

Η τομή έχει σχεδιαστεί δυσανάλογα μεγαλύτερη από τα μέρη του μικροσκοπίου, προκειμένου να διακρίνεται το σχηματιζόμενο ορθογώνιο τρίγωνο.

Για να πραγματοποιηθεί η διόρθωση ή έστω να επιτευχθεί η προσέγγισή της, εφαρμόζεται το Πυθαγόρειο θεώρημα. Γίνεται χρήση των «τιμών βάθους» που λαμβάνονται χάρη στη βαθμονόμηση που διαθέτει ο μηχανισμός εστίασης του

μικροσκοπίου, κατά τον κάθετο άξονα κίνησης του συστήματος των αντικειμενικών φακών. Η «τιμή βάθους» είναι η απόσταση μεταξύ του σημείου της καθαρής εστίασης επί του νευρώνα και αυτού στο οποίο η εστίαση δίνει θολή την εικόνα του νευρώνα (Larkman, 1991a)⁴⁴ (πλευρά γ ορθογωνίου τριγώνου στην εικόνα 5). Η τιμή αυτή πρέπει να υπολογιστεί σε κάθε δενδριτικό τμήμα του νευρώνα που μελετάται, αλλά συνήθως οι ερευνητές τη θεωρούν αμελητέα και δεν τη λαμβάνουν υπόψη τους.

		Ορθογώνιο τρίγωνο
Πλευρές:	α	υποτεινούσα, πραγματικό μήκος δενδρίτη
	β	μήκος κάτοψης δενδρίτη
	γ	μήκος που προκύπτει από την κίνηση του μηχανισμού εστίασης («τιμή βάθους»).

Με εφαρμογή του Πυθαγόρειου θεωρήματος: $\alpha^2 = \beta^2 + \gamma^2 \Rightarrow \alpha = \sqrt{\beta^2 + \gamma^2}$.

Με δεδομένο ότι η πλευρά α στην πραγματικότητα δεν είναι ευθεία αλλά τεθλασμένη, όπως φαίνεται στην εικόνα 5, το Πυθαγόρειο θεώρημα εφαρμόζεται με κάποια κατάχρηση.

ii) Όλα τα μετρούμενα βάθη είναι φαινομενικά, εξαιτίας του δείκτη διαθλάσεως του επικαλυπτικού μέσου μονιμοποίησης (mountant) του παρασκευάσματος (Sholl, 1953)⁶⁷. Για παρατήρηση κάθετα ως προς την παρατηρούμενη επιφάνεια, καμία φαινομενική αλλαγή βάθους δεν επέρχεται. Ισχύει ο τύπος $C = C_0 / n$, όπου C είναι η ταχύτητα του φωτός στο επικαλυπτικό υλικό και C_0 η ταχύτητα του φωτός στο κενό, ίση με $3 \cdot 10^8$ m/s. Αν γίνει παρατήρηση υπό γωνία ως προς την παρατηρούμενη επιφάνεια, η διάθλαση μεταβάλλει το φαινόμενο βάθος και περιγράφεται από τον τύπο του N. Snell: $n\mu_{\theta_s} = (1/n) \cdot n\mu_{\theta_\pi}$, όπου θ_s η γωνία διάθλασης μέσα στο υλικό και θ_π η γωνία παρατήρησης.

Ο δείκτης διάθλασης που σημειώνεται στη συσκευασία του επικαλυπτικού μέσου μονιμοποίησης (στην προκειμένη περίπτωση του DPX mounting medium, PANREAC QUIMICA SA, Barcelona, España), είναι: $n_{20/D} 1,515 - 1,525$.

Το φαινόμενο της διάθλασης μπορεί να αλλάξει το φαινόμενο βάθος στο οποίο βρίσκεται το αντικείμενο, αλλά δεν αλλάζει τις διαστάσεις του αντικειμένου. Επομένως, θα ληφθεί υπόψη μόνο αν το βάθος αποτελεί αντικείμενο μιας έρευνας σε τρεις διαστάσεις.

iii) Από τη στιγμή της ενδοκυττάριας έγχυσης της βιοκυτίνης, έως και τη μονιμοποίηση του νευρώνα, η τομή υφίσταται συνεχή αφυδάτωση. Προκύπτει έτσι νέα ανάγκη διόρθωσης των μηκών του νευρώνα. Για να μειωθεί ο κίνδυνος υπερβολικής

συρρίκνωσης, το μέσο έγκλεισης (embedding medium) πρέπει να έχει ως βασικό του συστατικό το νερό (Lübke et al., 2002; Mizrahi et al., 2000)^{47,54}. Ενδεικτικά αναφέρεται το "Mowiol" της CLARIANT, Subbachi, Taunus, Germany (Lübke et al., 2002)⁴⁷. Αν το αντικείμενο της έρευνας απαιτεί αυτό τον υπολογισμό, προτείνεται η επιλογή ενός σταθερού σημείου σε κάθε τομή, του οποίου η απόσταση από τον νευρώνα/ες που αποτελούν το αντικείμενο της έρευνας, θα υπολογιστεί δύο φορές: α) αφού εγχυθεί η χρωστική σε αυτά και β) αργότερα, αφού ολοκληρωθεί η επεξεργασία και πριν ξεκινήσει η ανάλυση. Από τη μεταξύ τους διαφορά, προκύπτει ένα ποσοστό συρρίκνωσης, το οποίο αναμένεται $\geq 10\%$ και θεωρείται επίσης ανεκτό όταν είναι 11-20%. Αν είναι μεγαλύτερο, τότε μπορεί ο νευρώνας/ες που το παρουσιάζουν, να μη ληφθούν υπόψη σε ποσοτικούς υπολογισμούς (Germain et al., 2003)²⁴. Ο υπολογισμός αυτός προϋποθέτει την ύπαρξη σταθερού σημείου, το οποίο δε θα επηρεάζεται από τη συρρίκνωση (Germain et al., 2003)²⁴.

iv) Αναφέρεται ακόμη, ένας «παράγοντας οφειλόμενος σε νευρική κίνηση» (Larkman, 1991a)⁴⁴. Αποδίδεται σε μικρές διακυμάνσεις του χειρισμού του μικροτόμου, ορθογώνια ως προς το επίπεδο της τομής, στην πορεία κατά μήκος των δενδριτών. Μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική υποτίμηση των δενδριτικών μηκών γιατί θα αποτελεί αιτία πολλαπλής τομής τους (διαπιστώθηκε αρχικά από τους Desmond and Levy, 1982)¹⁹, γεγονός για το οποίο δεν μπορεί να υπάρξει βελτίωση εκ των υστέρων. Αυτό σημαίνει ότι η ικανότητα χειρισμού του μικροτόμου πρέπει να βρίσκεται στο καλύτερο δυνατό επίπεδο. Οι τομές πρέπει να γίνονται με ομοιόμορφο τρόπο και να είναι, όσο το δυνατόν, παράλληλες μεταξύ τους (Larkman, 1991a)⁴⁴.

Αν πρόκειται να γίνει λεπτομερής ανατομική μελέτη των πραγματικών διαστάσεων των νευρώνων, είναι καλό να ληφθούν υπόψη οι αναφερθείσες διορθώσεις. Συνήθως όμως, δεν υπολογίζονται, γιατί:

α) οι αναλογίες μεταξύ των μεγεθών παραμένουν σε όλα τα μετρούμενα κύτταρα, υπό την προϋπόθεση ότι προετοιμάστηκαν όλα στην ίδια σειρά (παρτίδα), με την ίδια τεχνική και παρατηρήθηκαν και καταγράφηκαν με τα ίδια μέσα και

β) γίνεται προσπάθεια για την καλύτερη δυνατή επεξεργασία των τομών, ώστε οι διορθώσεις να είναι εκ των πραγμάτων αμελητέες. Ούτως ή άλλως, πάντα γίνεται επιλογή και απορρίπτονται οι, από οποιοδήποτε αιτία, «ελαττωματικές» τομές.

5. Εφαρμογή του προγράμματος ADOBE PHOTOSHOP

Είναι σημαντικό για το χειρόγραφο σχέδιο, προκειμένου να διαφυλαχθεί σε περίπτωση ζημίας ή καταστροφής του πρωτοτύπου, να μετρηθούν ορισμένα βασικά μεγέθη και να καθαριστεί η επιφάνειά του (κεφάλαιο «ΣΧΕΔΙΑ», σχέδιο 2).

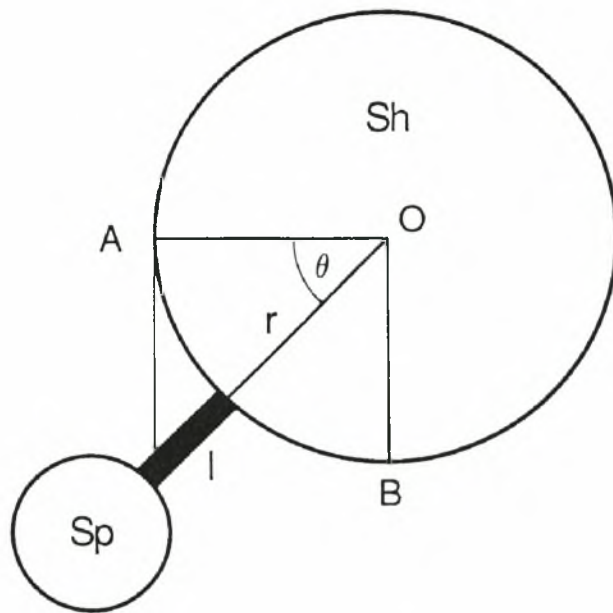
6. Εφαρμογή του προγράμματος ARCHITECTURAL DESKTOP

Χρησιμοποιούνται τα επίπεδα (layers) σχεδιασμού δύο διαστάσεων (AUTOCAD). Το πρόγραμμα δεν σχεδιάστηκε από την αρχή για τον χώρο των βιολογικών επιστημών, η χρήση του όμως ενδείκνυται για οποιουδήποτε γεωμετρικούς και αριθμητικούς υπολογισμούς πάνω σε σχέδια και θεωρείται αξιόπιστο σε επιστημονικούς χώρους, όπως αυτός της αρχιτεκτονικής. Με αυτό το πρόγραμμα, αφού προηγηθεί σάρωση σε ειδικό σαρωτή μεγάλων διαστάσεων, μετατρέπεται το χειρόγραφο σχέδιο του νευρώνα σε ψηφιακό, σχεδιάζοντας το δεύτερο, βήμα - βήμα επάνω στο πρώτο. Πρόκειται για εξαιρετικά χρονοβόρα διαδικασία, αφού υφίσταται η πρόθεση να διατηρηθεί το επίπεδο λεπτομέρειας που έχει επιτευχθεί στο χειρόγραφο σχέδιο. Το πρόγραμμα αποδίδει άριστα σε αυτή την απαίτηση, όπως και στη συνέχεια. Σημειώνονται τα χαρακτηριστικά που μας ενδιαφέρουν, σχεδιάζονται οι ομόκεντροι κύκλοι κατά Sholl, μετρούνται εμβαδά και γίνονται ποσοτικές μετρήσεις οποιωνδήποτε μηκών. Είναι δυνατή και η τρισδιάστατη ανακατασκευή του νευρώνα στο ίδιο πρόγραμμα, αλλά αυτή απαιτεί άλλης μορφής μελέτη και εξοικείωση με αυτό.

Η χρήση του AUTOCAD παρουσίασε κατά την εκτύπωση των σχεδίων, τα γνωστά μειονεκτήματα που συναντούν οι χρήστες Η/Υ, όταν απαιτούν άριστη απόδοση λεπτομερειών: όσο μεγαθύνει κάποιος το σχέδιο, τόσο μειώνεται το πάχος των γραμμών του και δημιουργούνται κενά μεταξύ ευθύγραμμων τμημάτων, ενώ αν το σμικρύνει, χάνονται πολλές λεπτομέρειες. Έτσι, διαπιστώθηκε ότι η άριστη απόδοση επιτυγχάνεται σε επιφάνεια χαρτιού Α3. Αυτού του μεγέθους είναι οι εκτυπώσεις των σχεδίων 2-5 και 7-10, στο κεφάλαιο «ΣΧΕΔΙΑ».

7. Στατιστική επεξεργασία του αριθμού των ακάνθων

Λαμβάνεται υπόψη η ύπαρξη ακάνθων στην αθέατη πλευρά κάθε δενδρίτη, οι οποίες πρέπει να συνυπολογιστούν. Κατά το παρελθόν, οι ερευνητές επέλεξαν έναν «παράγοντα διόρθωσης», τον ίδιο για όλους τους δενδρίτες του ίδιου νευρώνα (Feldman and Peters, 1979)²¹. Το 1991 προτάθηκε μια άλλη προσέγγιση (Larkman, 1991c)⁴⁶. Για δενδριτικά τμήματα διαμέτρου μικρότερης του 1μm, θεωρήθηκε ότι είναι δυνατή η μέτρηση του συνόλου των ακάνθων, καθώς εξέχουν και αυτές της αθέατης πλευράς, στοιχείο που επιβεβαιώνεται με μικρές αλλαγές εστίασης του φακού του μικροσκοπίου. Για τους υπόλοιπους, μεγαλύτερης διαμέτρου δενδρίτες, έγινε η υπόθεση ότι οι άκανθες προεκβάλλουν ακτινωτά από τον κυλινδρικό δενδρίτη και κατανέμονται ομογενώς κατά μήκος του (Larkman, 1991c)⁴⁶.



Εικόνα 6.

Σχηματική απεικόνιση των ακάνθων στην αθέατη πλευρά δενδρίτη, για τον υπολογισμό του «παράγοντα διόρθωσης» F (Larkman, 1991c)⁴⁶.

Οι άκανθες (Sp) οι οποίες δεν μετρώνται με την οπτική παρατήρηση, είναι αυτές που σκιάζονται από το τεταρτημόριο AB του δενδριτικού κορμού (Sh). Το κλάσμα της γωνίας AOB, καταλαμβάνεται από τη γωνία θ , η οποία εξαρτάται από την ακτίνα r του κορμού και το μήκος l του μίσχου της άκανθας. Επομένως, $\cos\theta = (r / r+l)$. Καθώς το ίδιο ισχύει και για τα τέσσερα τεταρτημόρια, ο «παράγοντας διόρθωσης» F

ισούται με $90^\circ / \theta$ και με αντικατάσταση της γωνίας θ , προκύπτει $F = 90^\circ / \cos^{-1} (r / r+l)$ (Larkman, 1991c; Bannister and Larkman, 1995)^{9,46}.

Τα μήκη l υπολογίζονται βάσει του πίνακα:

Διάμετρος δενδριτών	1,1 - 1,4 μm	1,5 - 2,0 μm	2,0 > μm
Μήκος μίσχου ακάνθων (l)	1,1 μm	0,8 μm	0,7 μm

Ο πίνακας αυτός συντάχθηκε από τους Peters και Kaiserman – Abramof (1970)⁵⁸, με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Επιβεβαιώθηκε από ανάλογη εργασία των Feldman και Peters (1979)²¹. Στον πίνακα εμπεριέχεται η παρατήρηση ότι όσο αυξάνει η διάμετρος του δενδρίτη, τόσο μειώνεται το μήκος του μίσχου της άκανθας (Feldman and Peters 1979; Peters and Kaiserman – Abramof, 1970)^{21 58}. Γενικά, η πλειοψηφία των δενδριτών έχει διάμετρο κορμού $\leq 1\mu\text{m}$. Αυτό σημαίνει ότι η διόρθωση εφαρμόζεται σε μικρό μόνο ποσοστό του συνόλου τους (Larkman, 1991c)⁴⁶.

Με τα υπάρχοντα μέσα, όπως αυτά περιγράφονται προηγουμένως στο τμήμα 1: «ψηφιακή φωτογράφιση» του κεφαλαίου αυτού, δεν κατέστη δυνατή η αξιόπιστη και όσο το δυνατόν αντικειμενικότερη μέτρησή τους. Η χρώση, με τη χρήση βιοκυτίνης, κάνει το σώμα και τους δενδρίτες διακριτούς σε ικανοποιητικό βαθμό, αν και οι εν τω βάθει ευρισκόμενοι δενδρίτες απαιτούν συνεχείς αλλαγές εστίασης και εκ νέου φωτογράφιση του ίδιου πεδίου. Οι άκανθες όμως διακρίνονται σποραδικά, σε μεγάλες αποστάσεις μεταξύ τους και, όπου η πυκνότητά τους είναι μεγάλη, δε διαχωρίζονται μεταξύ τους. Όλες οι διαθέσιμες μεγεθύνσεις στο μικροσκόπιο, επιβεβαιώνουν αυτή την εκτίμηση. Κατά συνέπεια, δεν ήταν δυνατή η χρήση του κατάλληλου προγράμματος καταμέτρησης ακάνθων, το οποίο ήταν διαθέσιμο για περιορισμένο χρονικό διάστημα στο Τμήμα Κτηνιατρικής του Α.Π.Θ. Μικρό δείγμα των 42 ψηφιακών φωτογραφιών με τις οποίες καλύφθηκε ο υπό μελέτη νευρώνας, παρουσιάζονται στο κεφάλαιο «ΨΗΦΙΑΚΕΣ ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΕΣ».

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Μία εμπειρική αντίρρηση στη χρήση ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής, έναντι της camera lucida, στον σχεδιασμό δύο διαστάσεων.

Ενώ η φωτογράφιση είναι αναγκαία, για λόγους που παρατέθηκαν στο κεφάλαιο «ΜΕΘΟΔΟΣ - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ», η λεπτομερέστερη απεικόνιση είναι αυτή του σχεδιασμού με camera lucida και συνακόλουθα με τη μέθοδο Sholl (Sholl, 1953)⁶⁷. Ίσως μοιάζει παράδοξο, αλλά η εικόνα που παράγεται από την ψηφιακή φωτογράφιση, σε οποιαδήποτε μεγέθυνση, δεν δίνει τόσο ευκρινή συνολική εικόνα, όσο θα περίμενε κάποιος, προκειμένου να μετρηθούν με ακρίβεια μήκη και διακλαδώσεις. Αυτό βέβαια εξαρτάται και από την ποιότητα του παρασκευάσματος, αλλά η ακινητοποιημένη εικόνα δεν έχει τις εξής δυνατότητες:

α. Ο χειροκίνητος χειρισμός του μικροσκοπίου με camera lucida και ο χειρωνακτικός σχεδιασμός, εμπεριέχει πολύ ευαίσθητες και ανεπαίσθητες αλλαγές της εστίασης. Έτσι ο παρατηρητής λαμβάνει μια πιο ολοκληρωμένη άποψη της μορφολογίας του σχεδιαζόμενου τμήματος του νευρώνα. Στην ίδια ολοκληρωμένη εντύπωση συντείνουν και οι συνεχείς αλλαγές μεγεθυντικών φακών. Αυτές γίνονται πάντα από τον παρατηρητή για να προσανατολιστεί και να γνωρίζει κάθε στιγμή που βρίσκεται, τοπολογικά. Αυτοί οι χειρισμοί, όταν λαμβάνεται μια φωτογραφία, μπορούν να γίνουν, αλλά ο συνδυασμός των συμπερασμάτων που αποκομίζονται από αυτούς, δεν είναι δυνατό να ενσωματωθούν στη φωτογραφία. Η φωτογραφία είναι «ακίνητη».

β. Σε πρώτη άποψη, φαίνεται να υπάρχει αξιοσημείωτο πλεονέκτημα, όταν ο νευρώνας βρίσκεται σε περισσότερες από μία τομές. Οι τομές αυτές πρέπει να ταυτιστούν, η προηγούμενη επάνω στην επόμενη, για να ολοκληρωθεί η ανακατασκευή του συνόλου του νευρώνα (αδρό παράδειγμα στην εικόνα 4). Όμως, οι λαμβανόμενες φωτογραφίες, θα πρέπει και πάλι να συνταιριαστούν με βάση τις προσωπικές ικανότητες του χειριστή. Η φωτογραφική μηχανή, ή ο ίδιος ο υπολογιστής, αδυνατούν να πάρουν τέτοιες αποφάσεις. Οι ίδιες προσωπικές ικανότητες απαιτούνται και κατά τον σχεδιασμό με το χέρι, επομένως η τεχνολογική υπεροχή εξανεμίζεται. Επιπλέον, όσο μεγαλώνει η μεγέθυνση (40X και άνω), θα χρειαζόταν ένα απροσδιόριστο πλήθος φωτογραφιών του ίδιου νευρώνα, προκειμένου να καλυφθεί όλη του η έκταση. Παράλληλα, με την αύξηση της μεγέθυνσης του αντικειμενικού φακού χάνουμε βάθος

πεδίου. Ο συνταιριασμός των φωτογραφιών καθίσταται εξαιρετικά δυσκολότερος από αυτόν που χρειάζονται οι πολύ λιγότερες (τρεις ή τέσσερις μεγέθους A3, μία ή δύο μεγέθους A2) επιφάνειες χαρτιού, στο χειρωνακτικό σχεδιασμό.

Επομένως, μπορεί η ψηφιακή φωτογράφιση και παρατήρηση παρασκευασμάτων να βοηθούν αποτελεσματικά στην παρουσίαση και αρχειοθέτηση μορφολογικά ταυτοποιημένων νευρώνων, στην παρατήρηση ενός μικρού τμήματος τους σε πολύ μεγάλη μεγέθυνση, ή ενδεχομένως στην τήρηση του ιστορικού ενός ασθενούς. Δεν βελτιώνουν όμως τη μορφομετρική ανάλυση, εκτός από την καταμέτρηση ακάνθων. Το τελευταίο ισχύει αν η χρώση των ακάνθων είναι αποτελεσματική και λεπτομερής, όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, στο τμήμα 7: «στατιστική επεξεργασία του αριθμού των ακάνθων». Η καταμέτρηση αυτή γίνεται: α) ξεκούραστα, στην οθόνη του H/Y με τον οποίο είναι συνδεδεμένη η φωτογραφική μηχανή και β) όταν έχει σκοπό την στατιστική επεξεργασία και όχι την πιστή αναπαράσταση της μορφής κάθε άκανθας στο σύνολο του νευρώνα. Για την πιστή τους αναπαράσταση (reconstruction), προτιμάται και πάλι ο σχεδιασμός με camera lucida (McEwen et al., 1999)⁵¹, σε μεγέθυνση 60X ή μεγαλύτερη.

2. Εμπειρική αιτιολόγηση αποκλειστικής χρήσης του φακού 40X για τη μορφομετρική ανάλυση δενδριτών, στο μικροσκόπιο που συνδέεται με την camera lucida.

Αποφασίσαμε την αφαίρεση των αντικειμενικών φακών μεγαλύτερης ή μικρότερης μεγέθυνσης από αυτής του 40X, από την παρατήρηση και τον σχεδιασμό. Ήδη, με τη χρήση αυτού του φακού, ικανότητας μεγέθυνσης 40X, το πλήρες σχέδιο του νευρώνα καταλαμβάνει σημαντική επιφάνεια, εκτιμώμενη κατά προσέγγιση στα $55 \times 55 = 3025 \text{cm}^2$, δηλαδή περίπου $1/3$ του m^2 . Άλλοι νευρώνες μπορεί να είναι μικρότερης, αλλά και πολύ μεγαλύτερης έκτασης. Έτσι, αν χρησιμοποιήσουμε τον καταδυτικό φακό, τότε:

α) Αν η μεγέθυνση 40X δίνει επιφάνεια σχεδίου περίπου $1/3$ του m^2 , η 60X και η 100X (μικρότερου βάθους πεδίου) του καταδυτικού φακού καθιστούν το εμβαδό του σχεδίου μεγαλύτερο, ενδεχομένως άνω του ενός m^2 . Η επιφάνεια του χαρτιού γίνεται φανερά δύσχρηστη. Δύσκολα εισάγεται στη μνήμη ενός H/Y με σάρωση και δύσκολα αποδίδει ως ψηφιακή. Όσο μεγαλύτερο είναι το πρωτότυπο, τόσο οι σμικρύνσεις αφαιρούν λεπτομέρειες και τόσο οι μεγεθύνσεις περιορίζουν το οπτικό πεδίο.

Αναγκάζεται επομένως ο χειριστής να κάνει συμβατικές μετρήσεις, με χάρακα και διαβήτη. Αυτό το στοιχείο αυξάνει την υποκειμενικότητα στις ποικίλες μετρήσεις.

β) Αυξάνονται οι πιθανότητες να γίνουν πολλά λάθη αναντιστοιχίας στην ταύτιση ταυτοποιημένου σε εγκεφαλική τομή νευρώνα και σχεδίου, στη διάρκεια της ανακατασκευής. Όσο μεγαλώνει η μεγέθυνση, τόσο μικρότερο μέρος του παρατηρούμενου κυττάρου χωράει στο οπτικό πεδίο, με συνέπεια να γίνονται αναγκαστικά συνεχείς προσπάθειες μετακίνησης του οπτικού πεδίου για να σαρωθεί όλη η έκταση που καταλαμβάνει ο νευρώνας. Συνακόλουθα, μετατοπίζεται η σχεδιαζόμενη επιφάνεια ισάριθμες φορές, με αποτέλεσμα να καθίσταται όλο και πιο εύκολη η βαθμιαία απώλεια της ακρίβειας της συνολικής ταύτισης.

γ) Ίσως απαιτηθεί πέμπτη στη σειρά διόρθωση στα μετρούμενα μήκη, εξαιτίας της διάθλασης που προκαλεί το καταδυτικό έλαιο. Θα πρέπει δηλαδή να συνυπολογιστεί στη μορφομετρική ανάλυση ο δείκτης διάθλασης του καταδυτικού ελαίου. Πιστεύω ότι η συσσώρευση διορθώσεων αυξάνει τον κίνδυνο αριθμητικών και στατιστικών λαθών (δείτε την περιγραφή των διορθώσεων, η οποία προηγείται, στο τμήμα «τέσσερις διορθώσεις στα μετρούμενα μήκη»).

δ) Η χρήση των μικρότερων φακών, μεγέθυνσης 10X και 25X, επίσης δεν έχει μεγάλη πρακτική αξία στη μορφομετρική ανάλυση. Οι δενδρίτες μικρής διαμέτρου, $\approx 1 \mu\text{m}$, όπως επίσης και μικρού μήκους, διαφεύγουν της προσοχής και δεν σχεδιάζονται, οι πολύπλοκες διακλαδώσεις είναι ασαφείς και οι άκανθες δε διακρίνονται.

3. Αιτιολόγηση της σημασίας της μορφομετρικής ανάλυσης

Η μορφομετρική ανάλυση, είναι μέθοδος διερεύνησης του τρόπου με τον οποίο αναπτύσσονται σε δύο διαστάσεις, ή/και στο χώρο, οι πυραμιδικοί νευρώνες και κατ' επέκταση κάθε είδος νευρώνα. Υπάρχει ένας αυξανόμενος αριθμός στοιχείων, που κλίνει προς την κατεύθυνση του όχι τυχαίου τρόπου ανάπτυξης.

Αναφέρεται ότι, παραδοσιακά, οι πηγές καθοδήγησης για την δενδριτική ανάπτυξη σχετίζονται κυρίως με εξωτερικούς παράγοντες περισσότερο, παρά με τον ίδιο το νευρώνα, από τον οποίο προέρχονται οι δενδρίτες (Samsonovich and Ascoli, 2002)⁶³. Βρέθηκε όμως ότι η κυρίαρχη προτίμηση κατεύθυνσης (τροπισμός) που φαίνεται στις δενδριτικές αλλαγές κατεύθυνσης, είναι να αναπτύσσονται μακριά από το σώμα περισσότερο, παρά προς την κατεύθυνση εισερχόμενων ιών (άλλων νευρώνων) (Samsonovich and Ascoli, 2002)⁶³. Ούτε προς άλλη συγκεκριμένη κατεύθυνση οδηγούνται, όπως προς μια βαθμίδωση συγκέντρωσης χημικών ουσιών οι οποίες θα

εκκρίνονταν γι' αυτό το σκοπό. Η δενδριτική αυτή καθοδήγηση συμβαίνει κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του κάθε νευρώνα και όχι μετά, όταν είναι ενήλικοι. Έχουν παρατηρηθεί πολλά φαινόμενα απομάκρυνσης μεταξύ δενδριτικών κλάδων, μετά σύγκλισής τους και εκ νέου απομάκρυνσής τους. Αυτό είναι από μόνο του ένα φαινόμενο τροπισμού (Samsonovich and Ascoli, 2002)⁶³.

Προς αυτή την κατεύθυνση, φαίνεται ότι συμβάλλουν ορισμένες θεωρίες, τις οποίες οι ερευνητές διαμορφώνουν στις μέρες μας συλλέγοντας στοιχεία, και ακολουθώντας μεθοδολογία, η οποία περιλαμβάνει τη μορφομετρική ανάλυση. Συνοπτικά, πρόκειται για τις εξής δύο τάσεις, οι οποίες ενδέχεται να ισχύουν εκ παράλληλου:

I.

Μία από αυτές περιγράφει τον επηρεασμό από χημικές ουσίες εκκρινόμενες από τον ίδιο το νευρώνα, οι οποίες βοηθούν στη διατήρηση των αποστάσεων μεταξύ των δενδριτών, ή /και στη διατήρηση της πορείας τους. Αυτό βέβαια θα προϋπέθετε την παρουσία συγκεκριμένης ουσίας - δείκτη στον κάθε νευρώνα ξεχωριστά. Αυτό είναι δύσκολο να επιβεβαιωθεί, αλλά δε μπορεί να αποκλειστεί, γιατί ήδη έχουν βρεθεί δύο ομάδες ουσιών που φαίνεται να συμβάλλουν προς αυτή την κατεύθυνση: α) οι πρωτοκαδερίνες (Angst et al., 2001)⁸ και β) οι DSCAM (Agarwala et al., 2001a; Agarwala et al., 2001b)^{1,2}.

α) Η ποικιλομορφία στο εξωκυττάριο τμήμα των πρωτοκαδερινών οδηγεί σε ευρεία ποικιλία ιδιοτήτων βάσει των οποίων αναγνωρίζονται και ξεχωρίζουν μεταξύ τους τα μέλη της υπεροικογένειάς τους. Οι πρόσφατα ανακαλυφθείσες FYN-προσδεδεμένες (FYN: μορφή τυροσινικής κινάσης) CNR-πρωτοκαδερίνες (CNR: εξωκυττάρια δομή υποδοχέα), επιδεικνύουν εναλλακτική έκφραση του εξωκυττάριου τμήματος η οποία θα μπορούσε να οδηγήσει σε διακριτή κυτταρική αναγνώριση από διαφορετικούς νευρωνικούς πληθυσμούς στους οποίους το κυτοπλασματικό τους τμήμα, και επομένως οι ενδοκυτταρικές αλληλεπιδράσεις, είναι σταθερό (Angst et al., 2001)⁸.

Γενικά οι καδερίνες ενέχονται σε κυτταρική αναγνώριση, κυτταρική σηματοδότηση, κυτταρική επικοινωνία, μορφογένεση, αγγειογένεση, πιθανόν ακόμη και σε νευροδιαβίβαση.

Οι πρωτοκαδερίνες είναι πολύ περισσότερες στον εγκέφαλο, παρά σε οποιονδήποτε άλλον ιστό των θηλαστικών. Στον ιππόκαμπο επίμυος έχει βρεθεί η

ARCADLIN (activity - regulated, cadherin - like, protein) (Yamagata et al., 1999)⁷⁸. Αυτή είναι παρούσα στα σώματα και τους δενδρίτες των νευρώνων του ιπποκάμπου και του εγκεφαλικού φλοιού σε εγκέφαλο ενηλίκου επίμυος. Η ARCADLIN έχει βρεθεί και στο σώμα και στις συνάψεις σε σχέση με την συναπτοφυσίνη.

Διαφοροποιημένες κλωνικές τεχνικές αναγνώρισαν ένα νέο γονίδιο, του οποίου η έκφραση επάγεται από συναπτική δραστηριότητα, η οποία συνδέεται με επιληπτικούς παροξυσμούς (seizures) ή με την μακροπρόθεσμη ενδυνάμωση (long term potentiation, LTP) στον ιππόκαμπο επίμυος. Η κωδικοποιούμενη πρωτεΐνη είναι η ARCADLIN. Αντισώματα προς αυτή, εμποδίζουν την συναπτική διαβίβαση και την LTP (Yamagata et al., 1999)⁷⁸. Επίσης, οι κλασικές καδερίνες παίζουν ρόλο στην LTP (Tang et al., 1998)⁷⁴.

β) Το μόριο DSCAM (Down Syndrome Cell Adhesion Molecule) είναι μόριο κυτταρικής «συγκόλλησης» (adhesion) που ανήκει στην υπεροικογένεια Ig και επάγει την διακυτταρική «συγκόλληση» κυττάρων του ίδιου τύπου (Agarwala et al., 2001)¹.

Έχουν βρεθεί τρεις κύριες οικογένειες CAMs: 1. Οικογένεια καδερινών (calcium - dependent CAMs) (Takeishi, 1988)⁷³, οι οποίες ελήφθησαν από το ήπαρ. 2. Οικογένεια ιντεγκρινών (Hynes, 1987)³¹, όπως η βήτα2-ιντεγκρίνη, που παίζει ρόλο στις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις των λευκοκυττάρων. 3. Η υπεροικογένεια ανοσοσφαιρινών (Ig), της οποίας μέλος είναι η νευρωνική N-CAM (Cunningham et al., 1987)¹⁶. Μέχρι στιγμής, 24 μόρια έχουν βρεθεί με ρόλο στη διαφοροποίηση του νευρικού συστήματος και επάγουν την ανεξάρτητη από ασβέστιο κυτταρική «συγκόλληση» και είναι όλα της υπεροικογένειας Ig. Ένα από αυτά είναι το DSCAM.

Εκφράζεται με αφθονία παντού στο νευρικό σύστημα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης σε πειραματόζωα και στον άνθρωπο (Agarwala et al., 2001a; Agarwala et al., 2001b)^{1,2}. Στον ενήλικο εγκέφαλο εκφράζεται κατά κύριο λόγο στην παρεγκεφαλίδα, στον ιππόκαμπο και στον οσφρητικό βολβό. Με διπλή σήμανση ανοσοφθορισμού, βρέθηκε ότι σχετίζεται με τις αξονικές και δενδριτικές προεκβολές. Από τους ίδιους ερευνητές (Agarwala et al., 2001a)¹, προτείνεται η ανάμιξή του στις κυτταρο - κυτταρικές αλληλεπιδράσεις κατά την ανάπτυξη δενδριτών και αξόνων και στη συντήρηση λειτουργικών νευρωνικών δικτύων.

Υποψίες υπάρχουν για συμμετοχή του DSCAM, με ανεβασμένα επίπεδα, σε ορισμένους τύπους συνδρόμου Down, καθώς επάγει την ανεξάρτητη από κατιόντα, ομοτυπική διακυτταρική «συγκόλληση». Το γονίδιο είναι υψηλά συντηρημένο και ο

γονιδιακός τόπος (locus) στον οποίο βρίσκεται, σχετίζεται με πνευματική καθυστέρηση της μορφής του συνδρόμου Down (Agarwala et al., 2001a)¹.

Ακόμη, βρέθηκε ισχυρή έκφραση DSCAM στα πυραμιδικά κύτταρα των CA1 και CA3 περιοχών του ιπποκάμπου ενηλίκων επίμυων, καθώς και σε κοκκιοκύτταρα της οδοντωτής έλικας και του ιπποκάμπου. Πιστεύεται ότι είναι διαμεμβρανική πρωτεΐνη και ότι παίζει μεγάλο ρόλο στην αξονική επιμήκυνση, στην καθοδήγηση προς μια κατεύθυνση, και στη συντήρηση και πλαστικότητα των νευρωνικών δικτύων (Agarwala et al., 2001a)¹.

II.

Μία ακόμη θεωρία αναφέρεται στον επηρεασμό από τη δραστηριότητα επαναλαμβανόμενων εκφορτίσεων (spiking) και ριπών (bursting), από τον ίδιο τον αναπτυσσόμενο και διακλαδούμενο νευρώνα, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης (Samsonovich and Ascoli, 2002)⁶³. Ο χρόνος μιας τέτοιας δραστηριότητας είναι ελάχιστος, με αποτέλεσμα να καθίσταται απίθανο να συμβεί ταυτόχρονα με αυτή ενός γειτονικού νευρώνα. Έτσι, οι αναπτυσσόμενοι δενδρίτες γειτονικών νευρώνων δεν παραπλανούνται (Samsonovich and Ascoli, 2002)⁶³. Αν και, για την αποφυγή της παραπλάνησης όσων ενδεχομένως θα εκπολώνονται ταυτόχρονα, δεν έχει ακόμη δοθεί ικανοποιητική εξήγηση (Chiu and Weliky, 2001; Samsonovich and Ascoli, 2002)^{15,63}. Τα νηματοπόδια ή ψευδοπόδια (filopodia) των αναπτυσσόμενων δενδριτικών κώνων, μπορεί επίσης να έχουν υποδοχείς, οι οποίοι αισθάνονται αυτή τη διαφορά δυναμικού (στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης) (Ming et al., 2001; Samsonovich and Ascoli, 2002)^{53,63}.

Προσθέτοντας ένα ακόμη στοιχείο στην έννοια των στιγμιαίων εκπολώσεων, ώστε να «γνωρίζουν» οι δενδρίτες που κατευθύνονται και από πού προέρχονται, άλλοι ερευνητές λένε ότι στο νεογέννητο επίμυ, παρατηρούνται GDPs κατά τη νευρωνική ανάπτυξη του ιπποκάμπου και κατά τη συναπτογένεση. Τα GDPs είναι περιοδικοί παλμοί, γιγαντιαία εκπολωτικά δυναμικά (giant depolarizing potentials), τα οποία παρατηρούνται στο κύκλωμα του ιπποκάμπου επίμυος. Παρατηρούνται τις πρώτες δύο μεταγεννητικές εβδομάδες, μια περίοδο έντονης νευρωνικής ανάπτυξης και συναπτογένεσης (Ben-Ari et al., 1989; Khazipov et al., 2001)^{11,38}. Τα GDPs είναι πολύ σημαντικά για τη φυσιολογία των νευρώνων καθότι προκαλούν (drive) συγχρονισμένους παλμούς/ταλαντώσεις (oscillations) ενδοκυτταρικού ασβεστίου στους νευρώνες ιπποκάμπου επίμυος (Garaschuk et al., 1998)²³ και παρέχουν τις συνθήκες για την πλαστικότητα κατά Hebb στις αναπτυσσόμενες συνάψεις (Khazipov et al., 2001)³⁸.

Σε νεογνά επίμυων το χρονικό παράθυρο παρατήρησης των GDPs συμπίπτει με αυτό της εκπόλωσης εξαιτίας του ανασταλτικού διαβιβαστή γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA). Στη συνέχεια οι νευρώνες διεγείρονται (Ben-Ari et al., 1989; Garaschuk et al., 1998; Khazipov et al., 2001)^{11,23,38}. Προτείνεται η συμμετοχή των GDPs στην εξαρτώμενη από δραστηριότητα διαμόρφωση του κυκλώματος του ιπποκάμπου, παρόμοια με άλλες, εσωτερικά παραγόμενες αυθόρμητες δραστηριότητες, οι οποίες έχουν παρατηρηθεί σε ποικίλες αναπτυσσόμενες εγκεφαλικές δομές πριν από την εξωτερική εισαγωγή εκπολώσεων (Ben-Ari, 2001; Khazipov et al., 2001)^{12,38}. Οι νευρώνες εγκαθιστούν συνάψεις από τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης και τα αναπτυσσόμενα δίκτυα παράγουν συγκεκριμένα σχέδια (τύπους) αυθόρμητης συντονισμένης νευρωνικής δραστηριότητας ίσως και σε όλες τις περιφερικές και κεντρικές δομές που μελετήθηκαν ως τώρα (Ben-Ari, 2001; Khazipov et al., 2001)^{12,38}.

Τέλος, έχουν παρατηρηθεί διαφορές στο μέγεθος του δενδριτικού δένδρου των CA3 πυραμιδικών κυττάρων οι οποίες επηρεάζουν σημαντικά την ποιοτική και ποσοτική ηλεκτροφυσιολογική απόκριση επαναλαμβανόμενων εκφορτίσεων έναντι ριπών και τύπων ριπών (Krichmar et al., 2002)⁴¹. Το μέγεθος του δενδριτικού δένδρου βέβαια δεν φτάνει από μόνο του για να δικαιολογήσει όλες τις διαφορές των ηλεκτροφυσιολογικών αποκλίσεων. Όμως, διαφορές στην διακλάδωση των κορυφαίων δενδριτών, όπως η κατανομή των σημείων διακλάδωσης και οι απολήξεις ανά τάξη διακλάδωσης, φαίνεται ότι επηρεάζουν τη διάρκεια της ριπής (Krichmar et al., 2002)⁴¹.

Υπάρχει βέβαια και ο αντίλογος, από προηγούμενες μελέτες, που υποστηρίζουν ότι η νευρωνική ανάπτυξη καθορίζεται από εξωτερικούς παράγοντες, όπως οι γειτονικοί νευρώνες (McFarlane, 2000; Polleux et al., 2000; Sestan et al., 1999)^{52,59,65}.

Γίνεται επομένως φανερό, ότι η συλλογή, η κατηγοριοποίηση και η στατιστική επεξεργασία όσο το δυνατόν περισσότερων μορφολογικών χαρακτηριστικών των νευρώνων, αναπτυσσόμενων και ενηλίκων, βοηθά στη συλλογή στοιχείων, σε βιοχημικές και ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες των ως άνω αναφερόμενων μορφών, προκειμένου να οριστικοποιηθεί ο πιθανότερος τρόπος με τον οποίο αναπτύσσονται και λειτουργούν οι πυραμιδικοί νευρώνες.

4. Η σημασία της περιοχής CA2

Η περιοχή CA2 είναι αυξανόμενης πλέον σημασίας, γιατί διαθέτει και αυτή προσαγωγές και απαγωγές συνδέσεις, ειδική ανοσοαντίδραση έναντι οπιούχων, υποδοχέων βενζοδιαζεπίνης, επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF), αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών (FGF) και ισχυρότερη ανοσοσήμανση (immunolabeling) για ολιγοδενδροκύτταρα, σε σχέση με τις άλλες περιοχές του υποκάμπου (Krichmar et al., 2002)⁴¹. Επίσης, στον άνθρωπο και τον πίθηκο φαίνεται ότι υπάρχει ειδική ανοσοδραστικότητα για την ακετυλοχολινεστεράση και τις προσδένουσες ασβέστιο πρωτεΐνες (Krichmar et al., 2002)⁴¹.

Η CA2 λοιπόν δεν είναι μόνο «μεταβατική» ζώνη μεταξύ των περιοχών CA1 και CA3, επομένως πρέπει και αυτή να χαρτογραφηθεί και να μελετηθεί με μορφομετρική ανάλυση (Krichmar et al., 2002)⁴¹.

5. Η αντοχή στο χρόνο της μεθόδου Sholl είναι αξιολογική

Η ανάλυση του D. H. Sholl (Sholl, 1953)⁶⁷ έχει δεχθεί κριτική γιατί συνδυάζει παραμέτρους τοπολογίας και μετρήσεων σε δύο διαστάσεις και δεν είναι ευαίσθητη ως προς τον προσανατολισμό (Uylings et al., 1986)⁷⁵. Παρ' όλα αυτά, είναι η πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδος στη χωρική ανάλυση δενδριτικών διακλαδώσεων. Ο χωρικός προσανατολισμός και η πυκνότητα των δενδριτικών διακλαδώσεων έχει επίσης μελετηθεί με τη χρήση διαφορετικών μεθόδων, περιλαμβανομένων των «κύριων αξόνων», «κυκλικού προσανατολισμού» και «καρτεσιανής πυκνότητας πλέγματος» (Bartesaghi and Ravasi, 1999; Mizrahi et al., 2000; Uylings et al., 1986)^{10,54,75}. Αυτές οι μέθοδοι συνήθως καταλήγουν μόνο σε γενικούς προσανατολισμούς / κατευθύνσεις των δενδριτικών διακλαδώσεων, όπου σημαντικές γεωμετρικές πληροφορίες χάνονται. Πιο πρόσφατα, έχουν αναπτυχθεί και εφαρμοστεί μέθοδοι που βασίζονται σε ανάλυση fractals, για να περιγράψουν την πολυπλοκότητα των δενδριτικών διακλαδώσεων (Bartesaghi and Ravasi, 1999; Caserta et al., 1995; Mizrahi et al., 2000; Smith et al., 1989)^{10,14,54,68}. Ένα κύριο μειονέκτημα όλων αυτών των μορφομετρικών εργαλείων, είναι ότι δεν κάνουν διάκριση μεταξύ δενδριτικών διακλαδώσεων με παρόμοιους βαθμούς πολυπλοκότητας, αλλά με διαφορετικές χωρικές (spatial) μορφολογίες (Bartesaghi and Ravasi, 1999; Mizrahi et al., 2000)^{10,54}.

Μέθοδοι οπτικής παρατήρησης σε πραγματικό χρόνο και ανοσοφθορισμού, έχουν προοδεύσει πάρα πολύ τα τελευταία χρόνια. Αυτές οι μέθοδοι επιτρέπουν την

ανάλυση του ίδιου δενδριτικού δένδρου υπό διαφορετικούς πειραματικούς χειρισμούς (Bartesaghi and Ravasi, 1999; Maletic-Savatic et al., 1999; Mizrahi et al., 2000)^{10,49,54}. Η εικονοποίηση σε πραγματικό χρόνο (in vivo) έλκει τους επιστήμονες, πολλά όμως προβλήματα περιμένουν τη λύση τους. Αρχικά κατά την ανάκτηση, τα κύτταρα υπόκεινται σε βλάβη από την έκθεση στο φως και τη φωτολεύκανση (αποχρωματισμός, κηλίδες). Στη συνέχεια, η αδυναμία εκτέλεσης ιστολογικών χειρισμών μειώνει δραματικά την ευκρίνεια της εικονοποίησης ζωντανού ιστού, έναντι του παρασκευασμένου. Τρίτο, το παράθυρο χρόνου για το πείραμα περιορίζεται από την επιμήκυνση διάρκειας της προπαρασκευής, η οποία συνήθως διαρκεί αρκετές ώρες. Παρά τους περιορισμούς αυτούς, η χρήση της «πριν και μετά» (in vivo και in vitro) προσέγγισης χαμηλώνει τον «θόρυβο» στην μορφομετρική ανάλυση, ο οποίος προκύπτει όταν δειγματίζονται νευρώνες από διαφορετικά παρασκευάσματα. Χρειάζονται λοιπόν αυτοματοποιημένες μέθοδοι για να ποσοτικοποιήσει και να εξάγει κάποιος αποτελεσματικά ομοιότητες και διαφορές μεταξύ τέτοιων «πριν και μετά» δενδριτικών ζευγών, οι οποίες όμως απαιτούν τρισδιάστατη μορφολογία νευρώνων (Bartesaghi and Ravasi, 1999; Mizrahi et al., 2000; Staff et al., 2000)^{10,54,71}.

6. Η σημασία της μέτρησης των ακάνθων

Η ανακατασκευή όσο το δυνατόν περισσότερων δενδριτικών διακλαδώσεων με τις άκανθές τους, είτε με camera lucida, είτε με ψηφιακή φωτογράφιση, πάντα στο πλαίσιο της μορφομετρικής ανάλυσης, οδηγεί στην εξαγωγή πολύ σημαντικών συμπερασμάτων.

Ένα από αυτά, και μάλιστα πρόσφατο, αφορά το φαινόμενο της ταχείας μορφολογικής πλαστικότητας των ακάνθων (Parnass et al., 2000)⁵⁷. Οι κατηγορίες στις οποίες διακρίνονται οι άκανθες, αντί να είναι μάλλον ενυπάρχοντες διαφορετικοί πληθυσμοί, αντιπροσωπεύουν προσωρινά στιγμιότυπα ενός και μόνο δυναμικού φαινομένου. Έχουν βρεθεί σημαντικές μορφολογικές μετατροπές μεταξύ όλων των κατηγοριών ακάνθων, ενώ ανιχνεύτηκαν και συστηματικά χαρακτηριστικά (traits) μετατροπής (Parnass et al., 2000)⁵⁷. Οι περισσότερες άκανθες με μορφή κοντού κορμού ή κοντής ρίζας και οι άκανθες με συνδυασμό λεπτών και μανιταροειδών προεκβολών, διατηρούν τις βασικές τους μορφολογίες. Όμως, οι περισσότερες με μορφή νηματοποδίου, μετατρέπονταν στις δύο πρώτες, παρ' όλο που μπορούσαν επίσης να διατηρούνται, προεξέχοντας από τις υπόλοιπες άκανθες (Parnass et al., 2000)⁵⁷.

Φαίνεται ότι κατά την ανάπτυξη των πυραμιδικών νευρώνων του ιπποκάμπου οι παραδοσιακές μορφολογικές διακρίσεις είναι σταθερές για σύντομα διαστήματα (<4h), αλλά ταυτόχρονα συμβαίνουν αρκετές μίξεις μεταξύ αυτών των παραπάνω ομάδων (Parnass et al., 2000)⁵⁷.

Ένα άλλο συμπέρασμα πραγματεύεται τη λειτουργική ερμηνεία της μορφολογίας των ακάνθων. Με μικροσκοπία φωτός και ποικίλες χρώσεις (όπως και η Golgi), μπορούν να ανασυγκροτηθούν χιλιάδες άκανθες πυραμιδικών νευρώνων, περιοχών όπως αυτές του κύριου οπτικού φλοιού και της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου ποντικού (Konur et al., 2003)⁴⁰. Γίνονται μετρήσεις της διαμέτρου και των πυκνοτήτων των κεφαλών των ακάνθων. Αυτές ποικίλουν από τον ένα στον άλλο νευρώνα, όπως και κατά μήκος του ίδιου νευρώνα, αλλά είναι παρόμοιες ανάμεσα στους κορυφαίους και τους βασικούς δενδρίτες (Konur et al., 2003)⁴⁰.

Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι, συγκρινόμενοι με άλλες περιοχές, οι νευρώνες της 5^{ης} στοιβάδας του κύριου οπτικού φλοιού έχουν μεγαλύτερες κεφαλές ακάνθων και αυτοί της CA1 περιοχής υψηλότερες πυκνότητες ακάνθων (Konur et al., 2003)⁴⁰. Κατά ενδιαφέροντα τρόπο, ανιχνεύεται ένας συσχετισμός μεταξύ διαμέτρου κεφαλών ακάνθων και της δια - ακανθικής απόστασης κατά μήκος των νευρώνων, δηλαδή οι μεγαλύτερες άκανθες τείνουν να τοποθετούνται πιο μακριά η μία από την άλλη, σε σύγκριση με τις μικρότερες άκανθες (Konur et al., 2003)⁴⁰. Τελικά, στους νευρώνες της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου, οι διάμετροι των κεφαλών των ακάνθων είναι μεγαλύτερες και η πυκνότητα των ακάνθων χαμηλότερη, στους απομακρυσμένους (distal) κορυφαίους δενδρίτες (>200 μικρομέτρων από το σώμα), σε σύγκριση με τις πλησιέστερες / εγγύτερες περιοχές (Konur et al., 2003)⁴⁰. Αυτά τα αποτελέσματα αποκαλύπτουν ότι οι μορφολογίες και οι πυκνότητες των κορυφαίων και βασικών ακάνθων, επομένως και οι συναπτικές ιδιότητες, ρυθμίζονται με όχι τυχαίο τρόπο (Konur et al., 2003)⁴⁰.

Επίσης, είναι γεγονός ότι, παρ' όλο που η συναπτογένεση είναι μια δυναμική διαδικασία με πολλές γλουταμινεργικές συνάψεις που σχηματίζονται στο δενδριτικό κορμό ή σε ανώριμες άκανθες (νηματοπόδια), οι λειτουργικές συνάψεις σχηματίζονται κυρίως στις ώριμες άκανθες (Fiala et al., 1998; Khazipov et al., 2001; Luscher et al., 2000; Rao et al., 1998)^{22,38,48,62}. Βάσει των αλλαγών του αριθμού των ακάνθων, φαίνεται ότι εκατοντάδες νέων γλουταμινεργικών συνάψεων σχηματίζονται και καταστρέφονται κάθε μέρα σ' ένα πυραμιδικό κύτταρο, ιδίως κατά τη διάρκεια του

τελευταίου τρίτου της κύησης (Khazipov et al., 2001)³⁸. Ο αριθμός των δενδριτικών ακάνθων αυξομοιώνεται κατά τη διάρκεια του οιστρικού κύκλου των θηλυκών ινδικών χοιριδίων, πράγμα που σημαίνει ότι πρέπει να ελέγχεται η φάση του κύκλου του θηλυκού πειραματόζωου κάθε είδους, για να διαπιστωθεί αν αυτή η παρατήρηση έχει γενικότερη σημασία (Bartesaghi and Ravasi, 1999)¹⁰.

Υπό το πρίσμα παρατηρήσεων αυτής της μορφής, πρέπει να σημειωθεί ότι η μέτρηση των ακάνθων οφείλει να πραγματοποιηθεί με όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ακρίβεια. Ενδέχεται να τεθεί σε αμφισβήτηση, αν εξαρτάται αποκλειστικά από την αίσθηση της όρασης του παρατηρητή. Γι' αυτό χρειάζεται η διεισδυτικότερη δυνατή χρώση του νευρώνα, ένα καθοριστικό στοιχείο που όπως ήδη έχει αναφερθεί δεν ήταν επαρκές, με αποτέλεσμα να μην αξιοποιηθεί το παρασκεύασμα και μαζί του ένας αυτοματοποιημένος τρόπος μέτρησης, με μεγάλη ακρίβεια και επαναληψιμότητα.

7. Σημασία της χρήσης ικανού λογισμικού

Υπάρχει συνεχής αναφορά στα άρθρα της τελευταίας δεκαετίας, ιδίως σε αυτά των τριών - τεσσάρων τελευταίων ετών, σε εργαλεία λογισμικού, τα οποία βρίσκουν εφαρμογή σε μορφομετρικές αναλύσεις. Αναφέρω ενδεικτικά ορισμένα.

Για το συσχετισμό ηλεκτροφυσιολογικών με μορφομετρικά δεδομένα, τα "Acquis" (G. Sadoe, Paris, France), "Clampex" (Axon Instruments) και "Origin" (Microcal Software, Norhampton, MA) (Khazipov et al., 2001)³⁸.

Η camera lucida ενδείκνυται για μορφομετρική ανάλυση σε δύο διαστάσεις. Για την ανάλυση σε τρεις διαστάσεις, η οποία βοηθάει περισσότερο στη διερεύνηση επαφών (όπως συνάψεων και χασματικών συνδέσεων), απαιτείται η σύνδεσή της με Η/Υ που χρησιμοποιεί το πρόγραμμα "3D Neurolucida" ή "Neurolucida Image Analysis system" (MicroBrightField, Colchester, VT ή MicroBrightField Ltd., Brattleboro, VT) (Faherty et al., 2003; Lübke et al., 2003; McEwen et al., 1999)^{20,47,51}. Έχει μάλιστα υποστηριχθεί η χρήση του από χειριστή που δεν γνωρίζει τις συνθήκες διεξαγωγής του όποιου πειράματος ή έρευνας, ώστε να αποφευχθεί οποιαδήποτε προκατάληψη (bias) (Faherty et al., 2003; Lübke et al., 2003)^{20,47}. Καθοριστική είναι επίσης η συμβολή του προγράμματος στο διαχωρισμό σωμάτων και δενδριτικών διακλαδώσεων νευρώνων που επικαλύπτουν ο ένας τον άλλο στην ίδια τομή.

Πρόσφατα δημοσιευμένες εργασίες, αναφέρουν τη χρήση άλλου εξειδικευμένου λογισμικού που ονομάζεται "GENESIS" (GEneral NEural SImulation

System) (Krichmar et al., 2002)⁴¹. Αυτό όμως είναι σχεδιασμένο να αντλεί ψηφιακά σχέδια από τράπεζες δεδομένων (όπως αυτή που αναφέρεται στην ενότητα που ακολουθεί) για εξειδικευμένη μελέτη. Ακόμη, η μέτρηση των ακάνθων πραγματοποιείται με ευκολία, αν η camera lucida συνδεθεί με το πρόγραμμα "Zeiss Interactive Digitizing Analysis System" (McEwen et al., 1999)⁵¹.

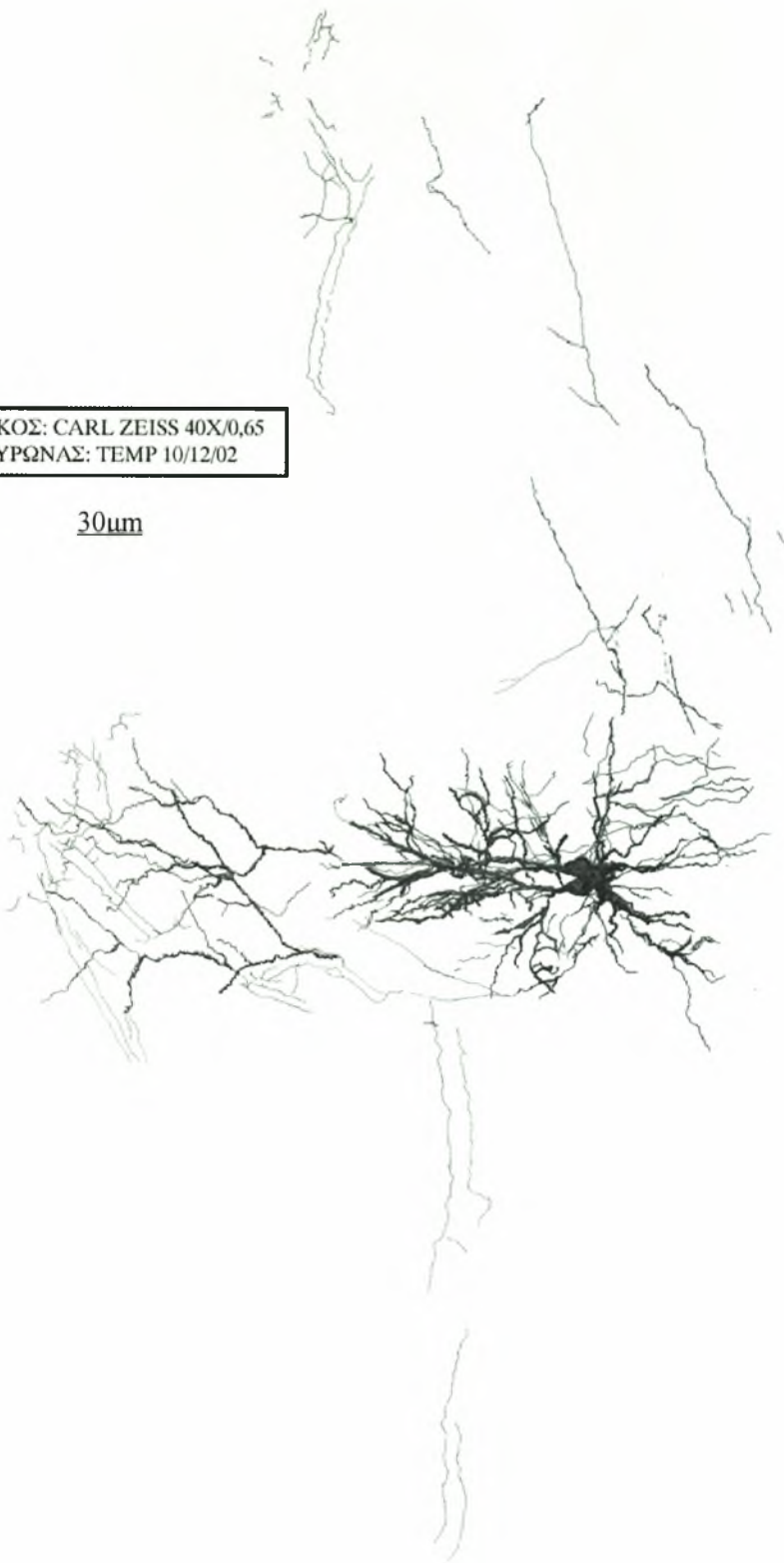
Για τη στατιστική ανάλυση αναφέρεται πληθώρα προγραμμάτων, όπως τα: "Origin Software" (Microcal, Northampton, MA) (Khazipov et al., 2001)³⁸, "Matlab Environment" (The MathWorks, Natick, MA; version 5.3.1.29215a-R11.1) (Samsonovich and Ascoli, 2002)⁶³, τα "AN(C)OVA" (Analysis of Variance and Covariance) (Bartesaghi and Ravasi, 1999; McEwen et al., 1999; Mizrahi et al., 2000)^{10,51,54} και "Newman-Keuls post-hoc analysis" (Statview, SAS software) (Faherty et al., 2003)²⁰.

Συχνά επίσης, γίνεται αναφορά στη δημιουργία λογισμικού κατά περίπτωση, στο κάθε εργαστήριο. Ερευνητές σημειώνουν ότι ανέπτυξαν λογισμικό προσαρμοσμένο στις ανάγκες τους (Mizrahi et al., 2000; Samsonovich and Ascoli, 2002)^{54,63}, ώστε να αξιοποιήσουν τα σχέδια των νευρώνων και να προχωρήσουν σε μορφομετρική ανάλυση.

Είναι φανερό ότι η αγορά τέτοιων προγραμμάτων, ή η ανάπτυξη τους από προγραμματιστές ξεπερνά τους σκοπούς αυτής της εργασίας τουλάχιστον σε επίπεδο κόστους. Θα ήταν ασφαλώς αναγκαία αν καταχωρούνταν και αναλύονταν δεκάδες νευρώνες, αλλά στο πλαίσιο στο οποίο κινούμαστε αρκούν οι μετρήσεις με το AUTOCAD.

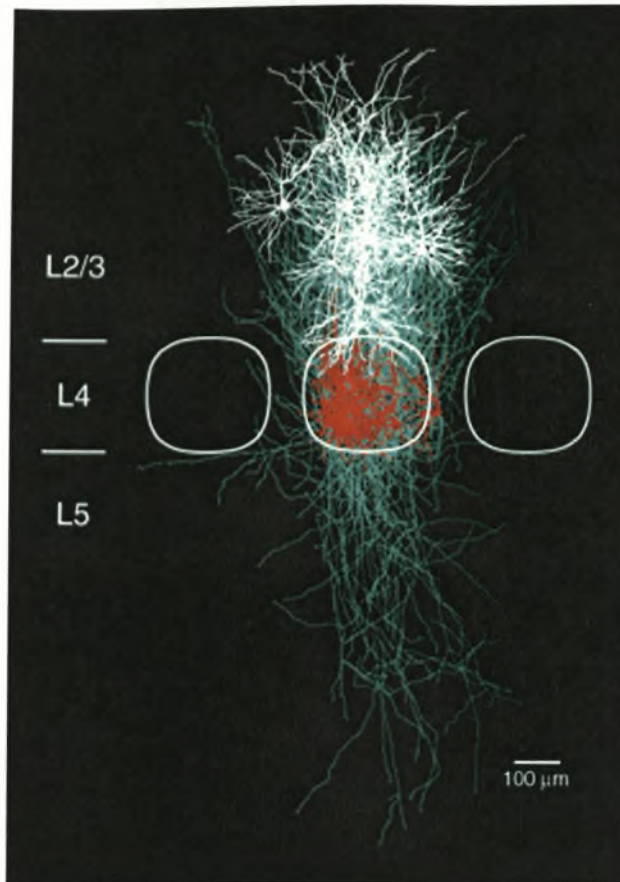
ΦΑΚΟΣ: CARL ZEISS 40X/0,65
ΝΕΥΡΩΝΑΣ: TEMP 10/12/02

30μm



Σχέδιο 1.

Επικαλυπτόμενοι πυραμιδικοί νευρώνες στο ίδιο παρασκεύασμα, σχεδιασμένοι με συμβατική camera lucida δύο διαστάσεων στο Τμήμα Κτηνιατρικής του Α.Π.Θ. Δεν είναι δυνατός ο διαχωρισμός των δενδριτικών δένδρων.



Εικόνα 7 (Lübke et al., 2003)⁴⁷.

Διαχωρισμός δενδριτικών δένδρων με camera lucida τριών διαστάσεων (3D).

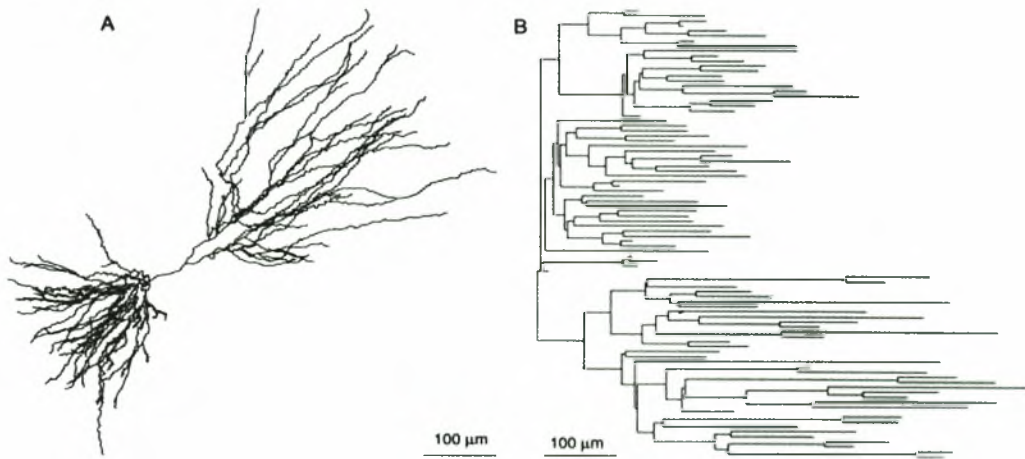
8. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της τεχνολογικής ανάπτυξης:

www.cns.soton.ac.uk

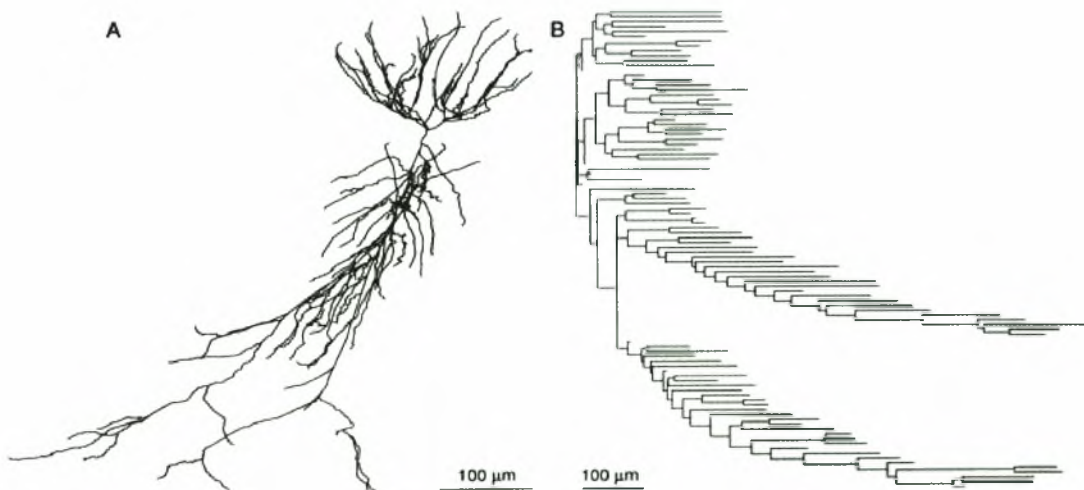
Ιδιαίτερη μνεία θα πρέπει να γίνει σε μια τράπεζα δεδομένων στο διαδίκτυο, η οποία δημιουργήθηκε από την ομάδα επιστημόνων Southampton Neurosciences Group, της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου του Southampton, U.K., με τη συνεργασία του πανεπιστημίου Duke, U.S.A.. Η διεύθυνση του εργαστηρίου είναι www.cns.soton.ac.uk και έχει άμεση διασύνδεση με την τράπεζα, η οποία είναι προσβάσιμη χωρίς διατυπώσεις και προσφέρεται για φόρτωση σε H/Y (downloading), αρκεί αυτός να περιέχει ένα περιβάλλον γλώσσας JAVA. Πολλές δημοσιευμένες εργασίες των τελευταίων 4 -5 ετών αναφέρονται σε αυτή την τράπεζα δεδομένων (Krichmar et al., 2002; Samsonovich and Ascoli 2002)^{41,63} και μάλιστα χρησιμοποιούν τους νευρώνες που είναι καταχωρημένοι, μεταξύ αυτών και δεκάδες πυραμιδικούς νευρώνες των περιοχών CA1 και CA3 του ιπποκάμπου επίμυος, για μορφομετρικές αναλύσεις και

εικονικές ενδοκυττάρειες καταγραφές ηλεκτροφυσιολογίας. Οι δυνατότητες μελέτης αυξάνονται, καθώς οι νευρώνες υφίστανται και σε τρισδιάστατη μορφή με δυνατότητα περιστροφής.

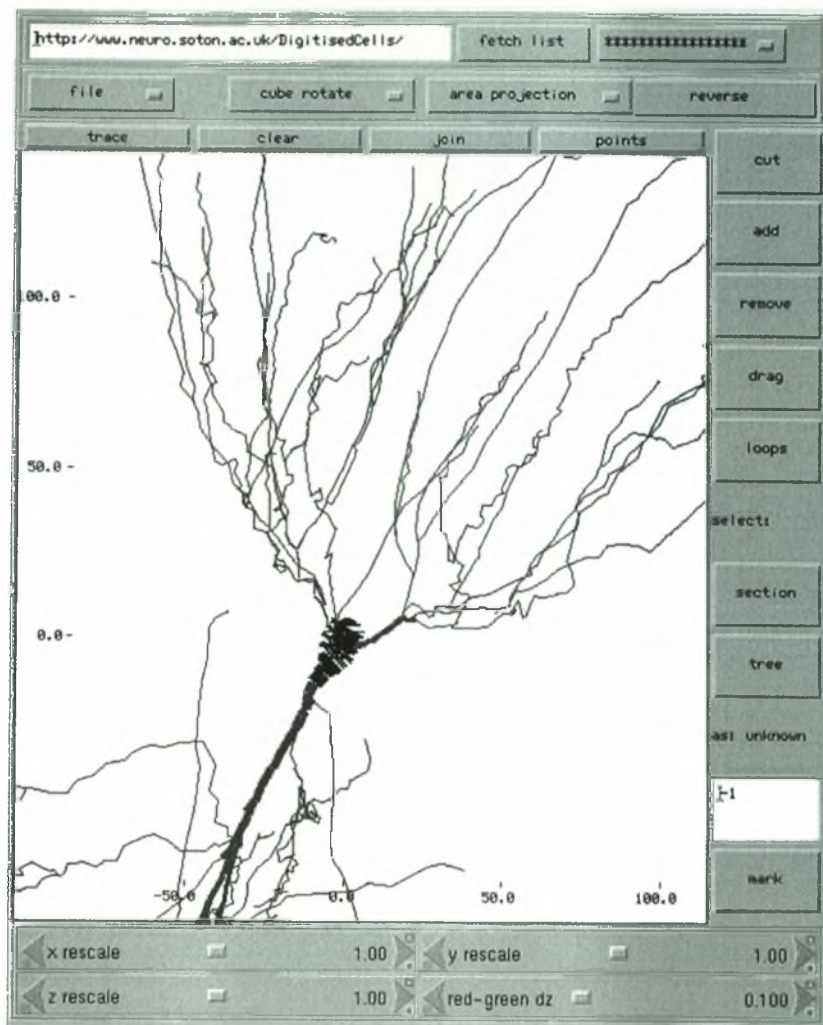
Η μορφομετρική ανάλυση του συνόλου που ανέρχεται σε 145 νευρώνες, δείχνει την τεχνολογική πρόοδο σε ό,τι αφορά την εξαντλητική ακρίβεια και λεπτομέρεια των μετρήσεων και βέβαια τη συνακόλουθη στατιστική επεξεργασία. Υπάρχει δυνατότητα υποκειμενικής πρόσθεσης και αφαίρεσης οποιουδήποτε τμήματος στο νευρώνα και μελέτη των εικονικών επιπτώσεων στα μορφολογικά και ηλεκτροφυσιολογικά χαρακτηριστικά του.



Εικόνα 8. Παράδειγμα ανακατασκευής πυραμδικού νευρώνα και σχεδιασμού των δένδριτικών του κλάδων, όπως παρουσιάζονται στον δικτυακό τόπο www.cns.soton.ac.uk.



Εικόνα 9. Ένα ακόμη παράδειγμα ανακατασκευής πυραμδικού νευρώνα, στον ίδιο δικτυακό τόπο.



Εικόνα 10. Περιβάλλον μελέτης των εικονικών επιπτώσεων στα μορφολογικά και ηλεκτροφυσιολογικά χαρακτηριστικά πυραμιδικού νευρώνα, στον ίδιο δικτυακό τόπο.

Είναι φανερό ότι απασχολήθηκαν πολυάριθμοι επιστήμονες, δαπανήθηκαν πολλές εργατοώρες και διατέθηκαν πολλά χρήματα για την ανακατασκευή τώσων νευρώνων, την κατασκευή ειδικού προγράμματος ψηφιακής επεξεργασίας τους και ειδικού τόπου στο διαδίκτυο.

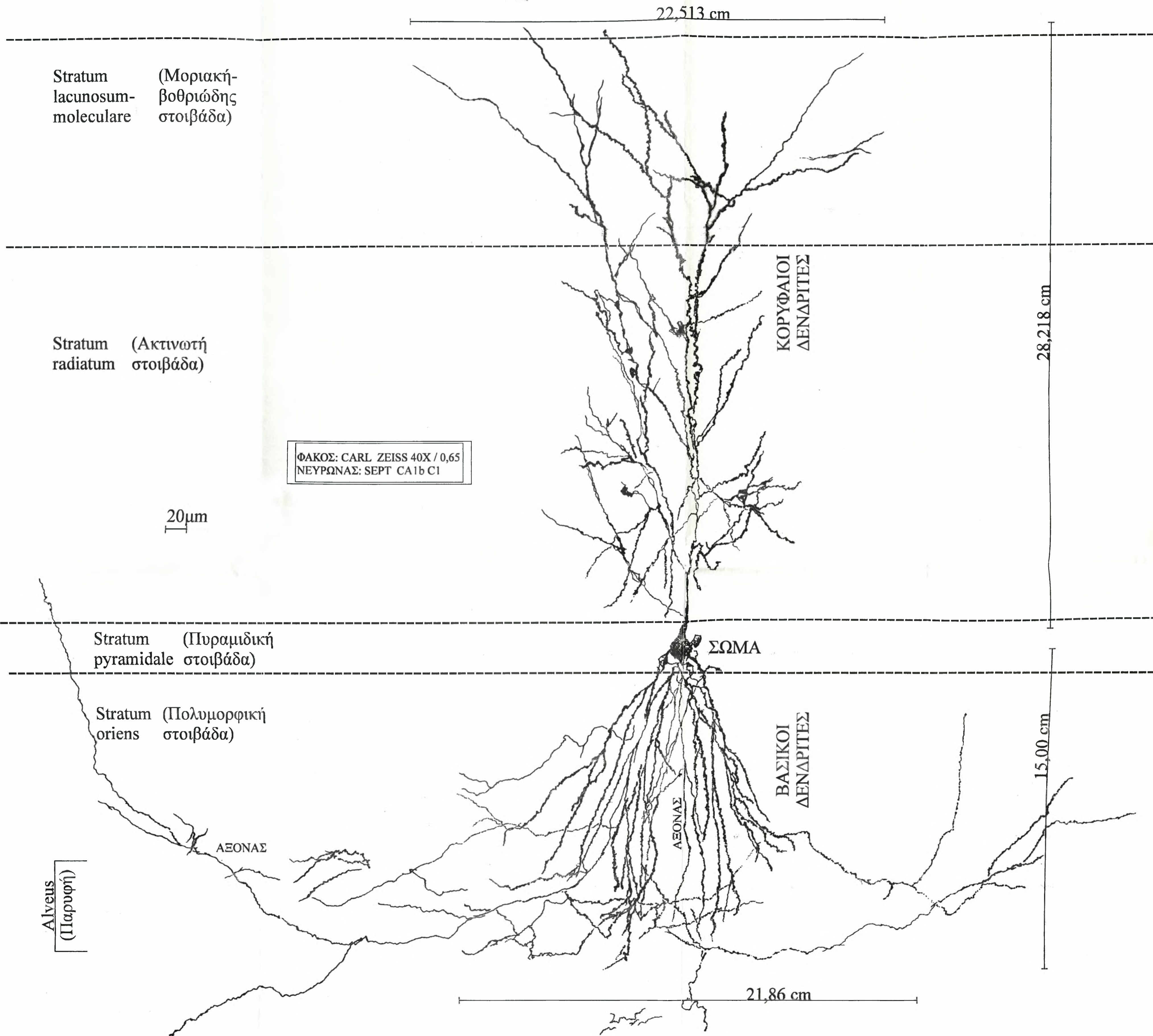
Και πάλι όμως, η εκκίνηση της προσπάθειας γίνεται από τα βασικά μετρούμενα ποσοτικά μεγέθη, τα οποία συμπίπτουν με αυτά που έλαβε υπόψη του ο Sholl το 1953, στοιχείο που επιβεβαιώνει την αξία της ανάλυσής του στις μέρες μας.

ΣΧΕΔΙΑ

Σχέδιο 2.

Αυτό είναι το σχήμα του πυραμιδικού νευρώνα που προέκυψε από την ανακατασκευή του στο μικροσκόπιο που φέρει camera lucida, στο Τμήμα Κτηνιατρικής του Α.Π.Θ. Η ανακατασκευή πραγματοποιήθηκε με φακό μεγέθυνσης 40X. Η κλίμακα στο σχέδιο για τη μεγέθυνση αυτή είναι: 1cm στο σχέδιο 1:1 αντιστοιχεί σε 0,02mm ή 20μm στον πραγματικό νευρώνα. Το σχέδιο εκτυπώθηκε σε χαρτί επιφάνειας A2.

Τα βασικά μεγέθη που εγγράφονται, μετρήθηκαν σε cm, ψηφιακά, πάνω στην επιφάνεια του σχεδίου 1:1 με το πρόγραμμα ADOBE PHOTOSHOP. Η αναγκαία αναγωγή τους στα πραγματικά μεγέθη, σε μm, βάσει της κλίμακας, πραγματοποιείται στον πίνακα 2. Μετρώνται οι βασικές διαστάσεις του νευρώνα και σημειώνονται στα λατινικά οι στοιβάδες (stratum) στις οποίες εκτείνεται.



Σχέδιο 3.

Πάνω στον ίδιο ανακατασκευασμένο νευρώνα, παρουσιάζεται η χαρτογράφηση της μέτρησης των χαρακτηριστικών των δενδριτικών διακλαδώσεων, πάντα υπό κλίμακα.

Όταν ο νευρώνας έχει μια απλή και περιορισμένη διακλάδωση, η αρίθμηση γίνεται ως ακολούθως: κλάδοι που αναφύονται απευθείας από το σώμα του νευρώνα είναι οι 01, 02, 03 κ.ο.κ. Οι κλάδοι που ακολουθούν έχουν τους αριθμούς 011, 012, 021, 022 κ.ο.κ., όπου 011 και 022 είναι οι δύο κλάδοι που αναφύονται από τον κλάδο 01. Αν τυχόν υπάρχει τρίτος κλάδος που προκύπτει από τον 01, θα έχει τον αριθμό 013 (Sholl, 1953)⁶⁷. Αυτός ο τρόπος δεν μπορεί να εφαρμοστεί όταν η διακλάδωση είναι εκτεταμένη και πολύπλοκη, καθώς τα ψηφία που θα περιείχε κάθε ένας από αυτούς τους αριθμούς, θα έφταναν τα δέκα ή και περισσότερα. Πρέπει λοιπόν να επιλεγεί η απλούστερη δυνατή αρίθμηση, δηλαδή κατά αύξοντα αριθμό.

Οι κορυφαίοι δενδρίτες ξεκινούν με τον α, ο οποίος δίνει τους α01, α021, α022 και X.

Ο α01 δίνει τους: α011 – α016,2.

Ο α021 δίνει τους: 41 – 109.

Ο α022 δίνει τους: 1 – 40.

Ο X δίνει τους: X1 – X16.

Οι βασικοί δενδρίτες είναι: β01 ο οποίος δίνει τους: β011, β012, β013.

β02 ο οποίος δίνει τους: β021, β022.

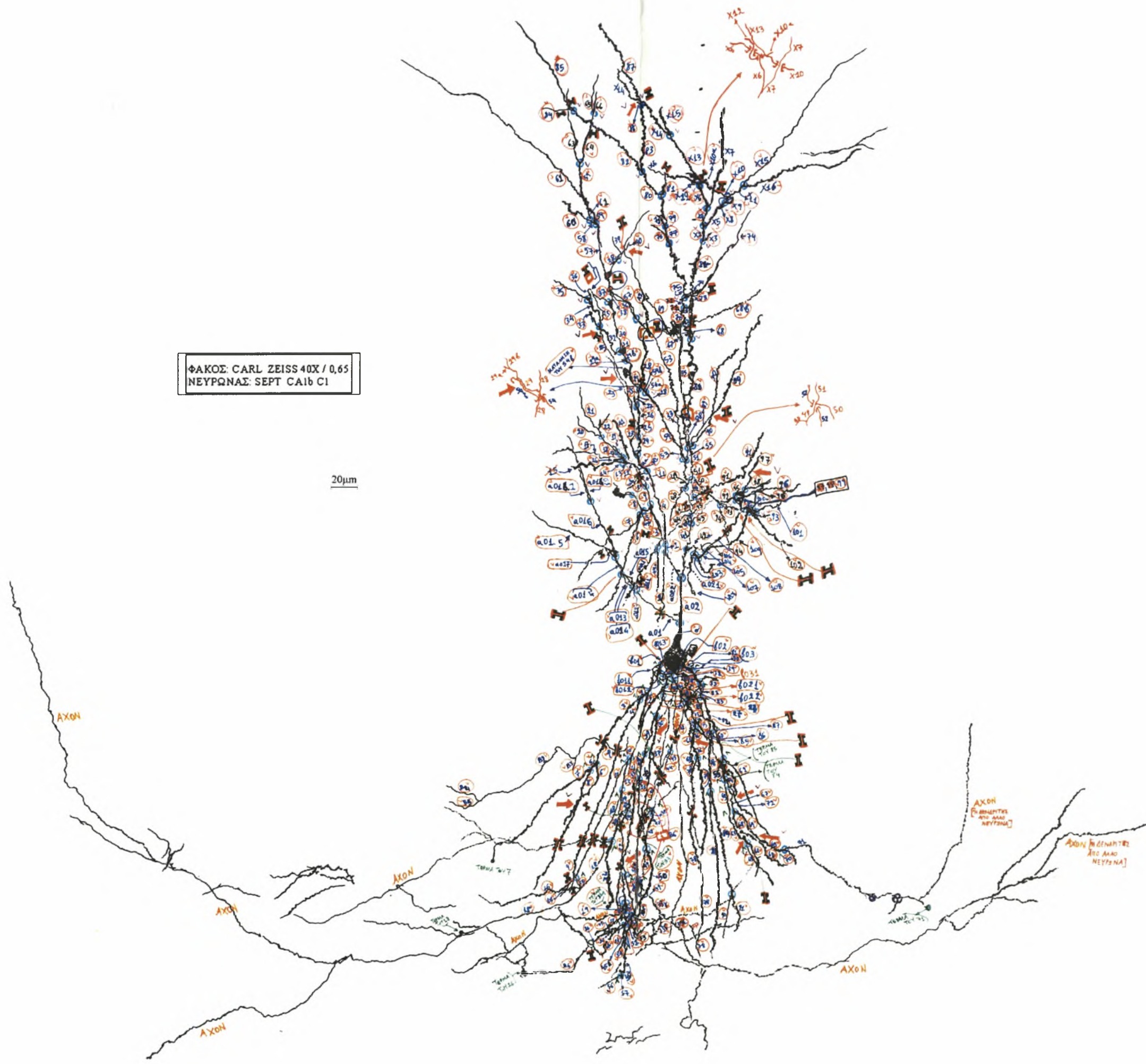
β023 ο οποίος δίνει τους: 80 – 91.

Ο β011 δίνει τους: 1 – 8. Ο β012 δεν διακλαδίζεται. Ο β013 δίνει τους: 38 – 79. Ο β021 δίνει τους: 9 – 26. Ο β022 δίνει τους: 27 – 37.

Οι επισημάνσεις **I** με κόκκινο και πράσινο χρώμα υποδηλώνουν σημεία διασταύρωσης δενδριτικών κλάδων και όχι διακλαδώσεις.

ΦΑΚΟΣ: CARL ZEISS 40X / 0,65
ΝΕΥΡΩΝΑΣ: SEPT CA1b C1

20μm



Σχέδιο 4 στο AUTOCAD.

Οι μετρήσεις στο AUTOCAD έγιναν στην αναλογία 1:1 ως προς το σχέδιο 2, το οποίο προέκυψε από τη χρήση της camera lucida. Η εκτύπωση των σχεδίων στο AUTOCAD έγινε σε αυτή ακριβώς την αναλογία, σε επιφάνεια μεγέθους A2. Γενικότερα, ο Η/Υ διατηρεί την κλίμακα και την προσαρμόζει κάθε στιγμή, σε κάθε μεγέθυνση ή σμίκρυνση.

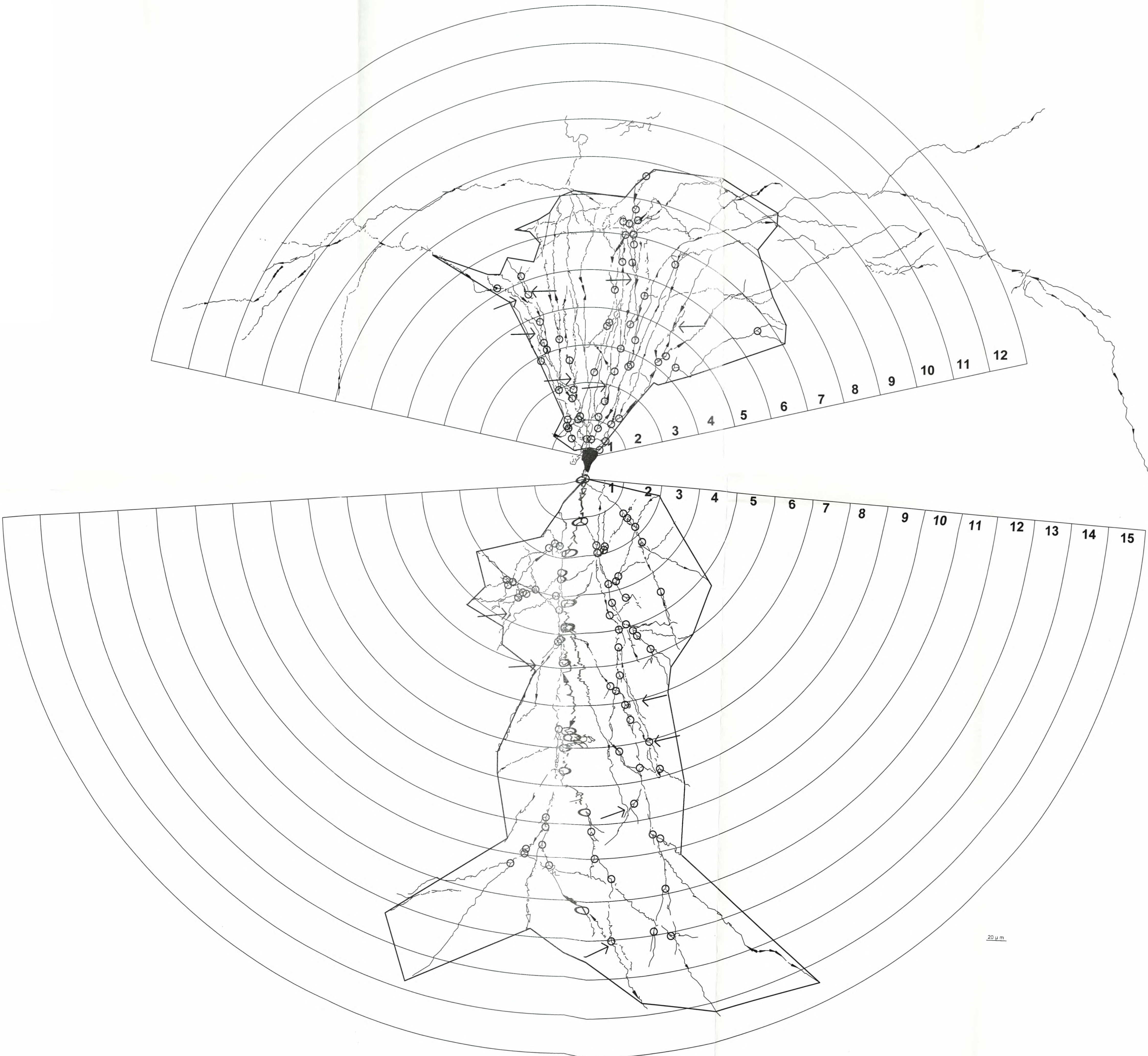
Τα ομόκεντρα ημικύκλια έχουν απόσταση μεταξύ τους 2cm, στην απόδοση του σχεδίου 1:1. Αυτό σημαίνει ότι η πραγματική μεταξύ τους απόσταση είναι 40 μm, σύμφωνα με την κλίμακα που αναφέρθηκε προηγουμένως. Το πρώτο ημικύκλιο, έχει ακτίνα 2cm (ή, βάσει της κλίμακας, 40μm). Τα διαστήματα μεταξύ τους αριθμούνται από το 1 έως το 12 για τους βασικούς δενδρίτες και από το 1 έως το 15 για τους κορυφαίους δενδρίτες. Η ίδια αρίθμηση ισχύει και για τα αντίστοιχα ημικύκλια.

Οι μετρήσεις του μήκους των δενδριτικών κλάδων έγιναν λαμβάνοντας υπόψη την κλίμακα και προς την κατεύθυνσή τους.

Οι μικροί κύκλοι επισημαίνουν τις διακλαδώσεις των κορυφαίων και βασικών δενδριτών.

Οι δύο τεθλασμένες κλειστές περιμετρικές γραμμές, οριοθετούν το εμβαδό του κορυφαίου και βασικού δενδριτικού δένδρου. Το εμβαδό αυτό είναι της κάτοψης που παρατηρείται στο οπτικό μικροσκόπιο, όπως αυτή προκύπτει από τις τομές που περιέχουν τον νευρώνα.

Τα βέλη υποδεικνύουν δενδρίτες που συγκλίνουν και συμπορεύονται για ένα διάστημα, δίνοντας μια ένδειξη βιοχημικής δραστηριότητας ή/και τροπισμού, σύμφωνα με τα λεχθέντα στο κεφάλαιο «ΣΥΖΗΤΗΣΗ», τμήμα 3: «αιτιολόγηση της σημασίας της μορφομετρικής ανάλυσης».



20 μm

Σχέδιο 5 στο AUTOCAD. μεγέθυνση.

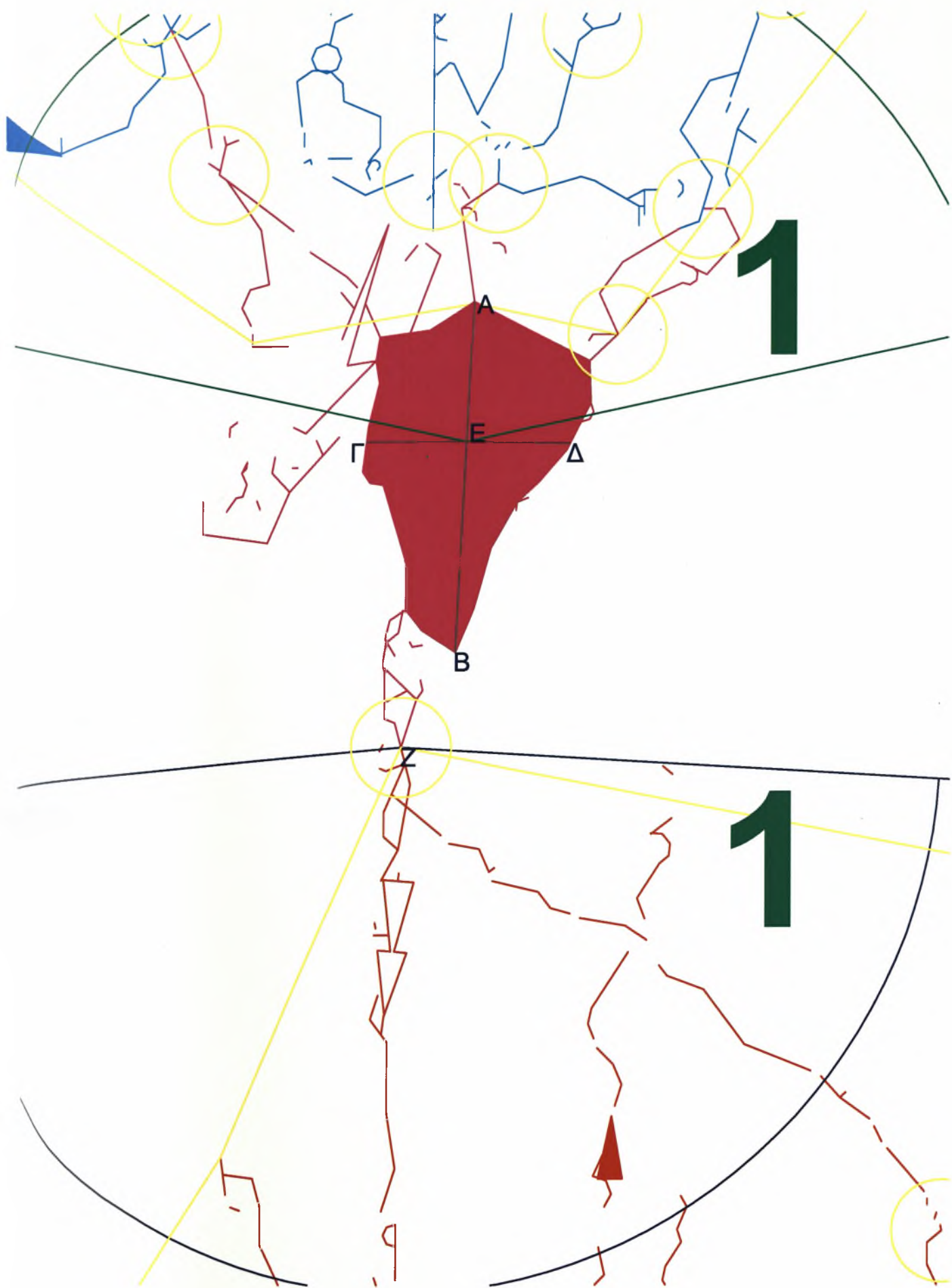
Σε ό,τι αφορά το σώμα, δεν είναι δυνατός ο ακριβής υπολογισμός του ακανόνιστου όγκου του. Μετράται όμως κατά προσέγγιση ένα μέγεθος, ονομαζόμενο ως «περιοχή σώματος (ΠΣ)». Αυτό αναφέρεται στην έκταση που υπολογίζεται, βάσει της κάτοψης του περιγράμματός του, με τη βοήθεια του τύπου: $ΠΣ = ε \cdot β$, όπου ε: επιμήκης άξονας, (κάθετα) και β: βραχύς άξονας, (οριζόντια) (Larkman, 1991b)⁴⁵. Οι άξονες αυτοί είναι ορατοί στο σχέδιο. Ακόμη, διακρίνονται τα σημεία, τα οποία ελήφθησαν υπόψη για να αποτελέσουν τα κέντρα χάραξης των ομόκεντρων ημικυκλίων. Συγκεκριμένα:

(ΑΒ): επιμήκης άξονας, (κάθετα)

(ΓΔ): βραχύς άξονας, (οριζόντια)

Ε: σημείο τομής των αξόνων και κέντρο χάραξης των ημικυκλίων των βασικών δενδριτών.

Ζ: σημείο εκκίνησης της διακλάδωσης των κορυφαίων δενδριτών και κέντρο χάραξης των ημικυκλίων τους.

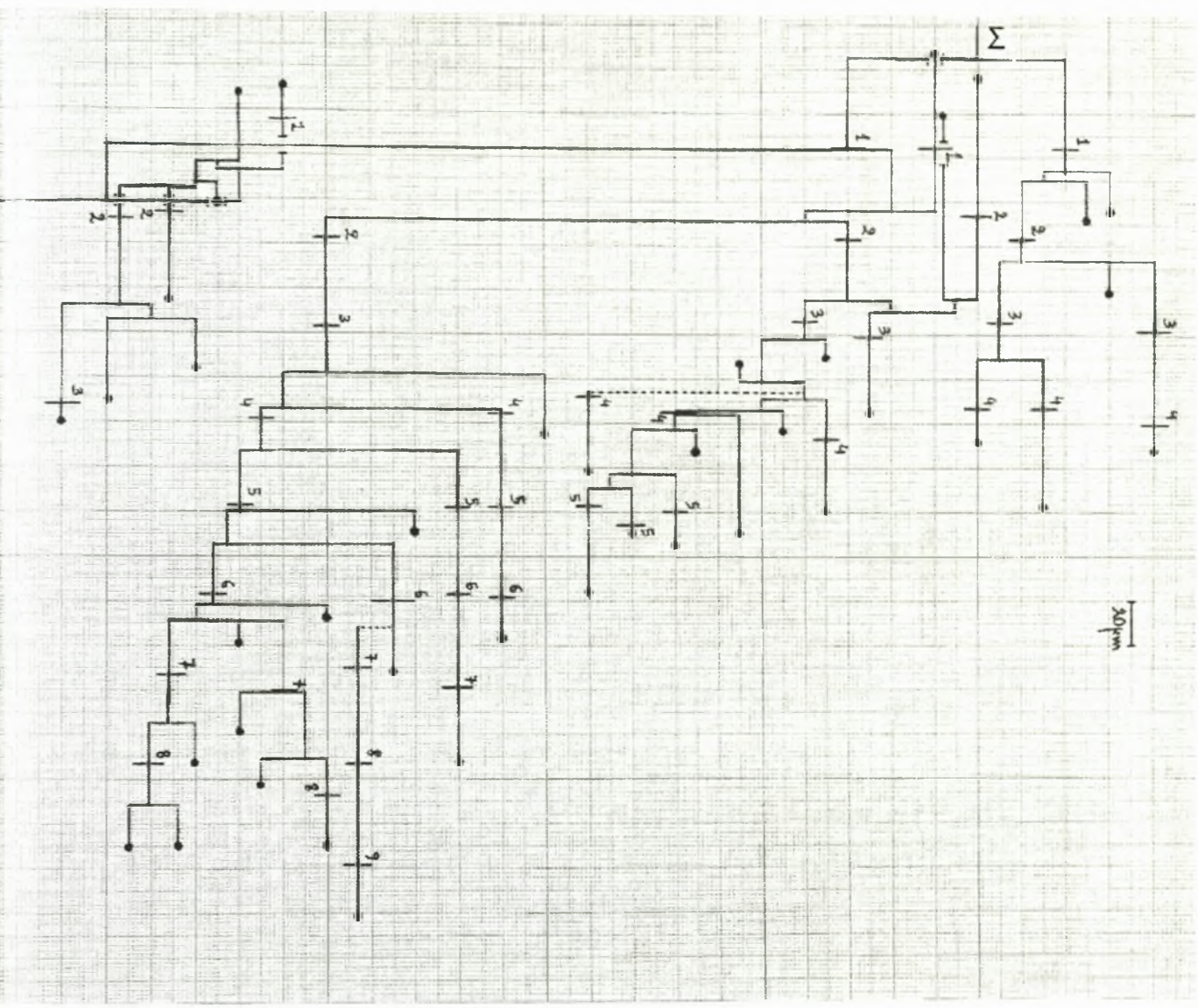
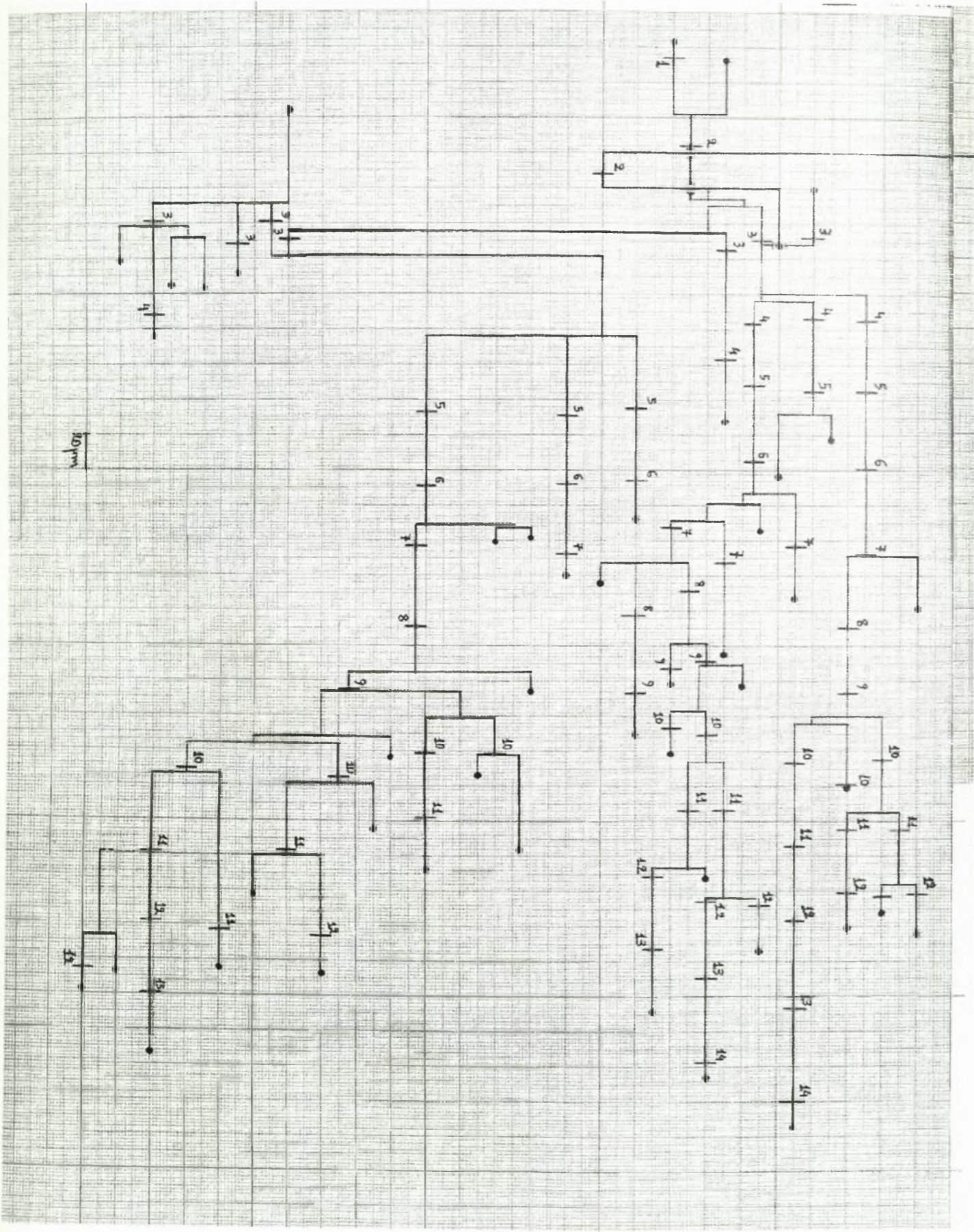


Σχέδια κορυφαίων και βασικών δενδριτικών δένδρων (6, 7, 8).

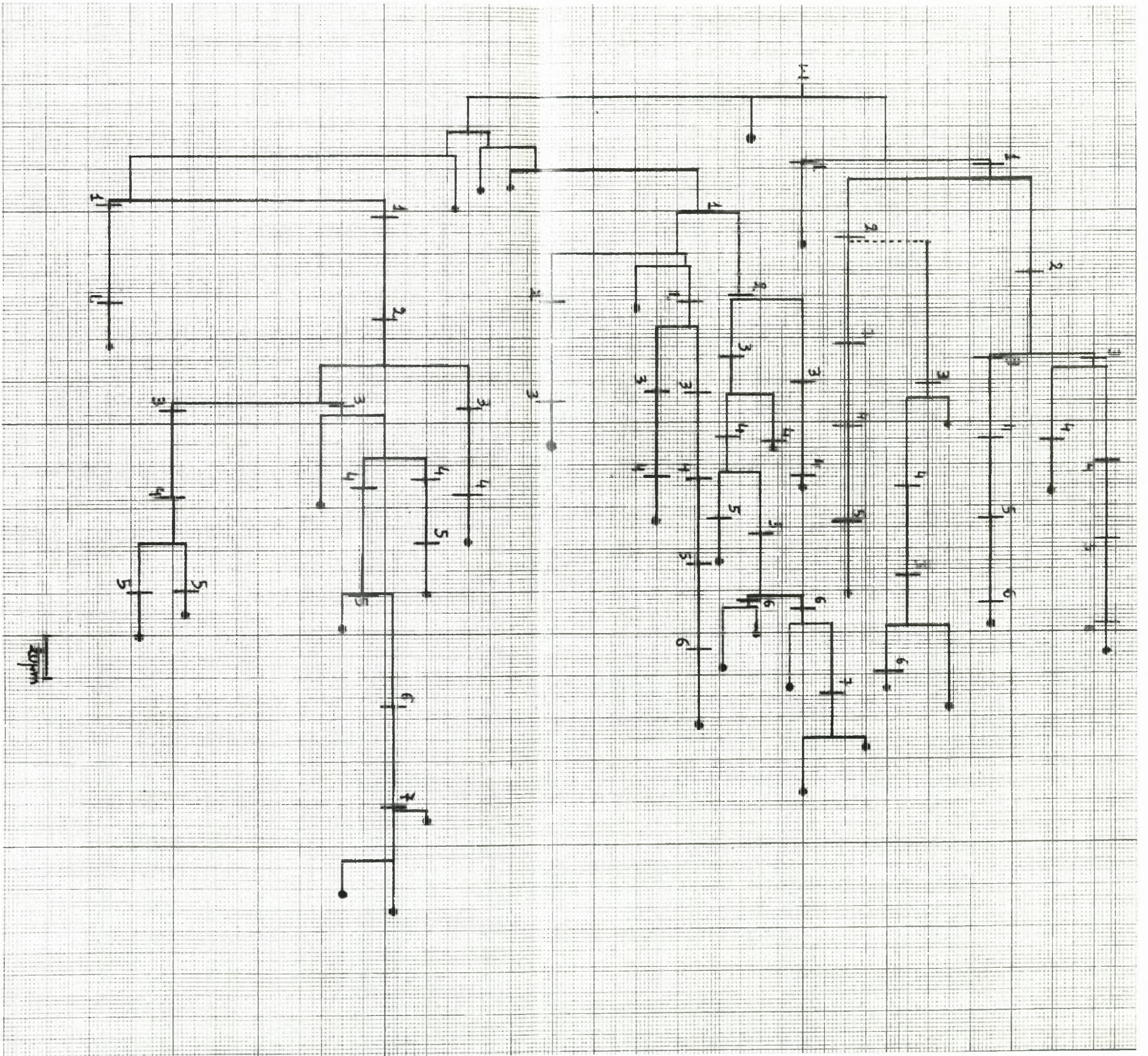
Βάσει των μετρήσεων που διαπιστώθηκαν με τη χρήση του AUTOCAD, οι δενδρίτες σχεδιάστηκαν στο σύνολό τους σε αναλογία 1:1 ως προς το αρχικό χειρόγραφο σχέδιο 2. Ισχύει ότι 1cm σχεδίου 1:1 αντιστοιχεί σε 20 μm πραγματικού μήκους. Τα μήκη των κάθετων ευθύγραμμων τμημάτων, τα οποία ενώνουν τους κλάδους, δεν έχουν αντιστοιχία στην πραγματικότητα, γιατί δείχνουν απλώς το σημείο της διακλάδωσης (Sholl, 1953)⁶⁷. Τα μικρά κάθετα αριθμημένα ευθύγραμμα τμήματα κατά μήκος του διαγράμματος, αναπαριστούν τα αντίστοιχα ημικύκλια.

Το γράμμα «Σ» δηλώνει την αρχή της έκφυσης των δενδριτικών κλάδων από το σώμα.

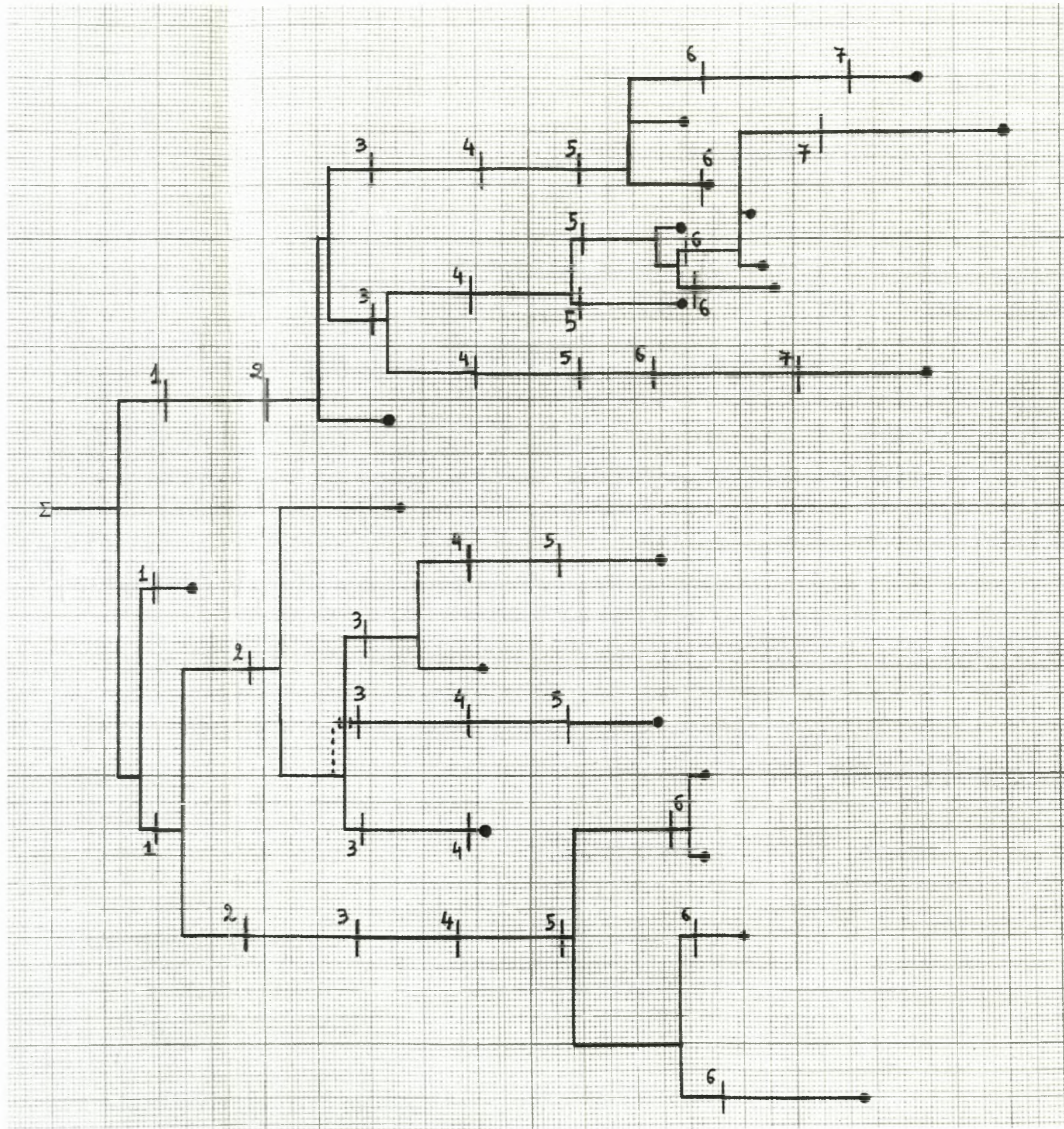
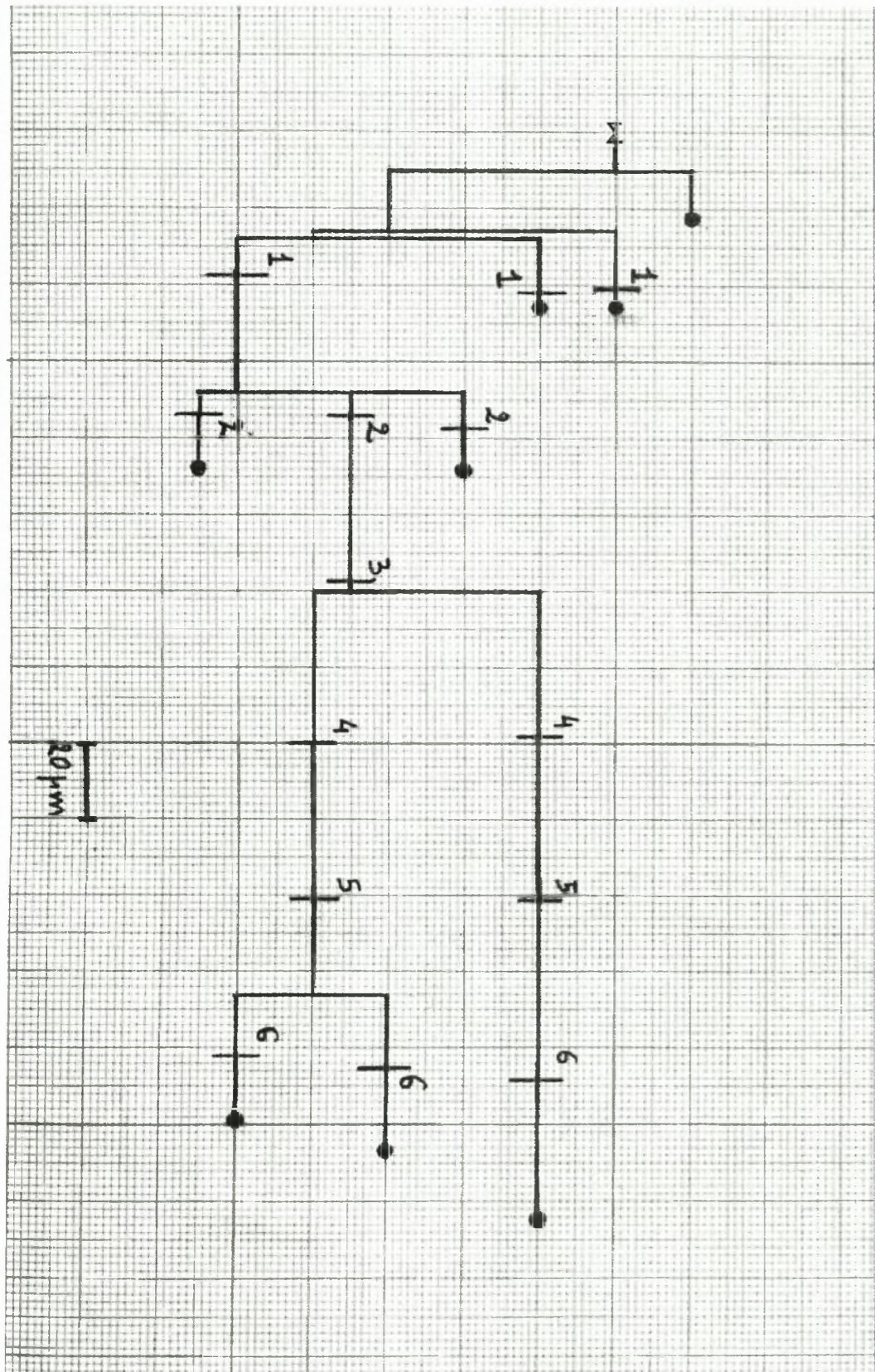
6. ΔΕΝΔΡΙΤΙΚΗ ΔΙΑΚΛΑΔΩΣΗ ΚΟΡΥΦΑΙΩΝ ΔΕΝΔΡΙΤΩΝ



7. ΔΕΝΔΡΙΤΙΚΗ
ΔΙΑΚΛΑΔΩΣΗ
ΒΑΣΙΚΩΝ
ΔΕΝΔΡΙΤΩΝ

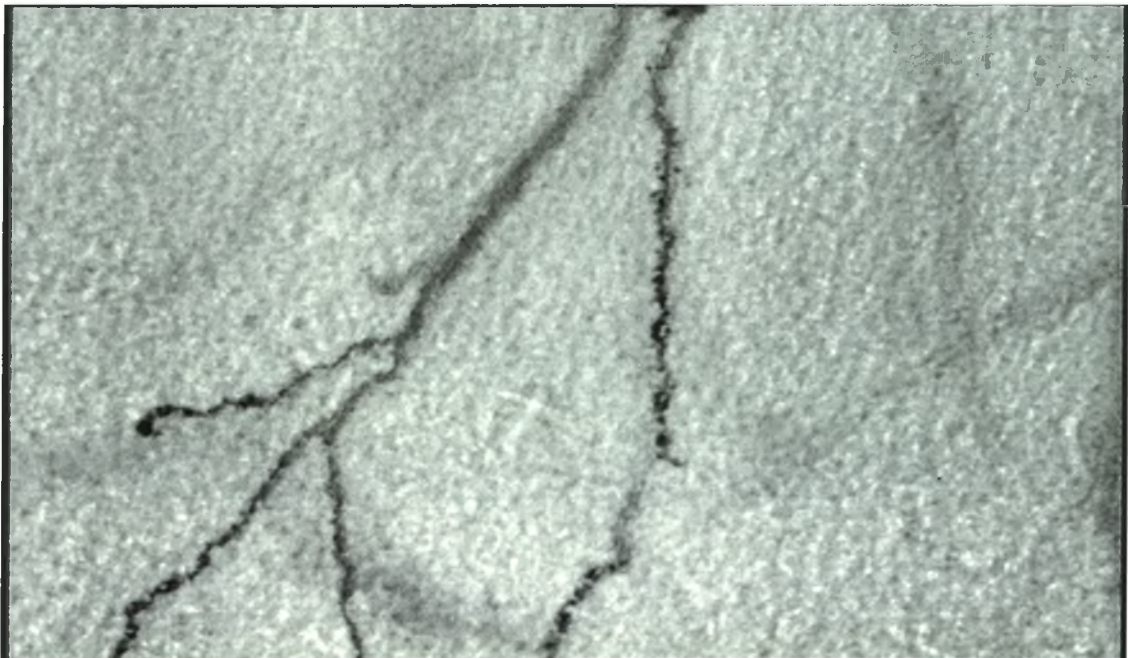
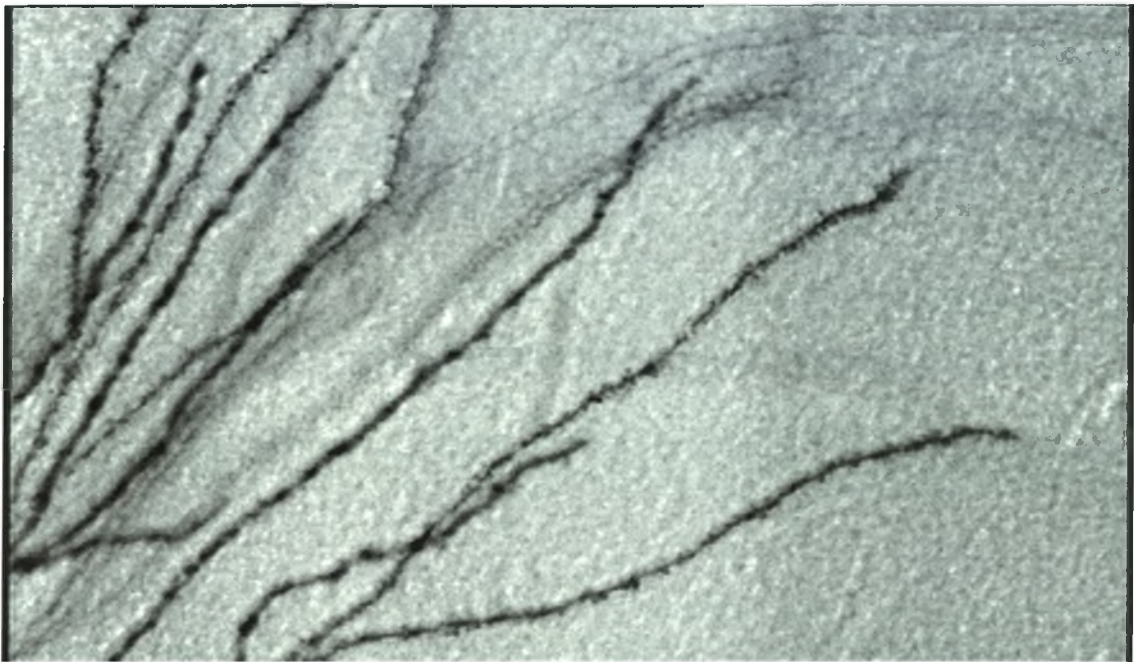


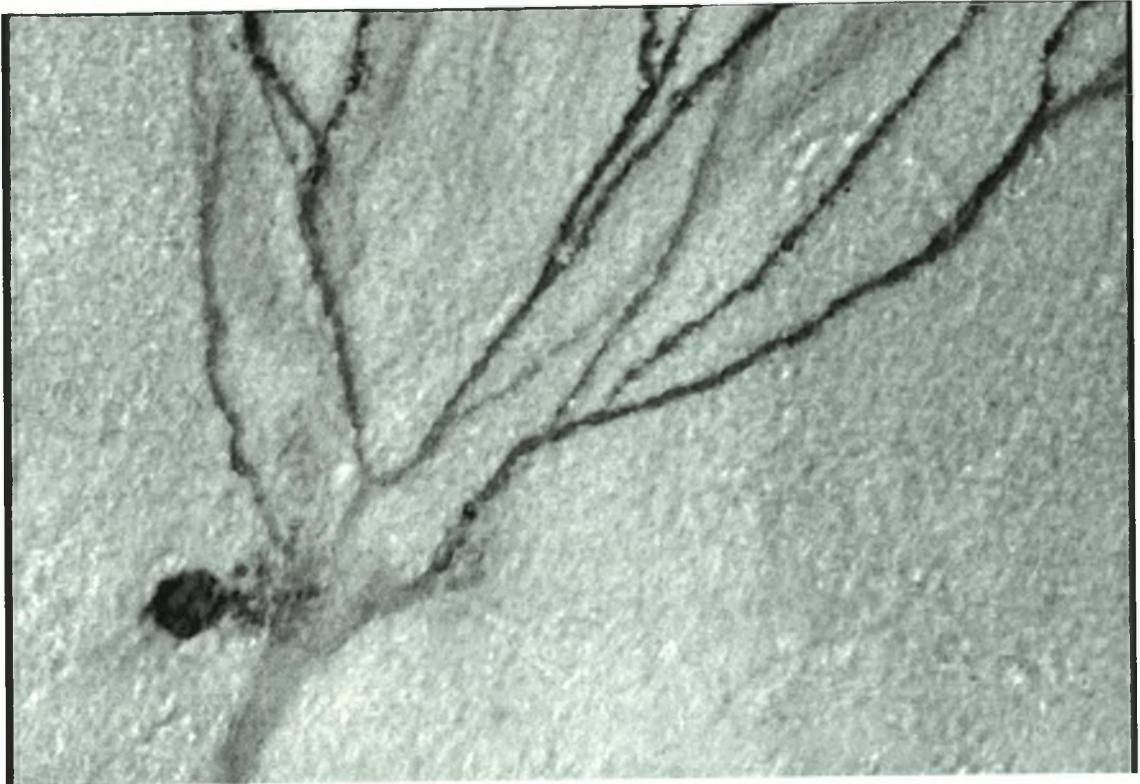
8. ΔΕΝΔΡΙΤΙΚΗ ΔΙΑΚΛΑΔΩΣΗ ΒΑΣΙΚΩΝ ΔΕΝΔΡΙΤΩΝ



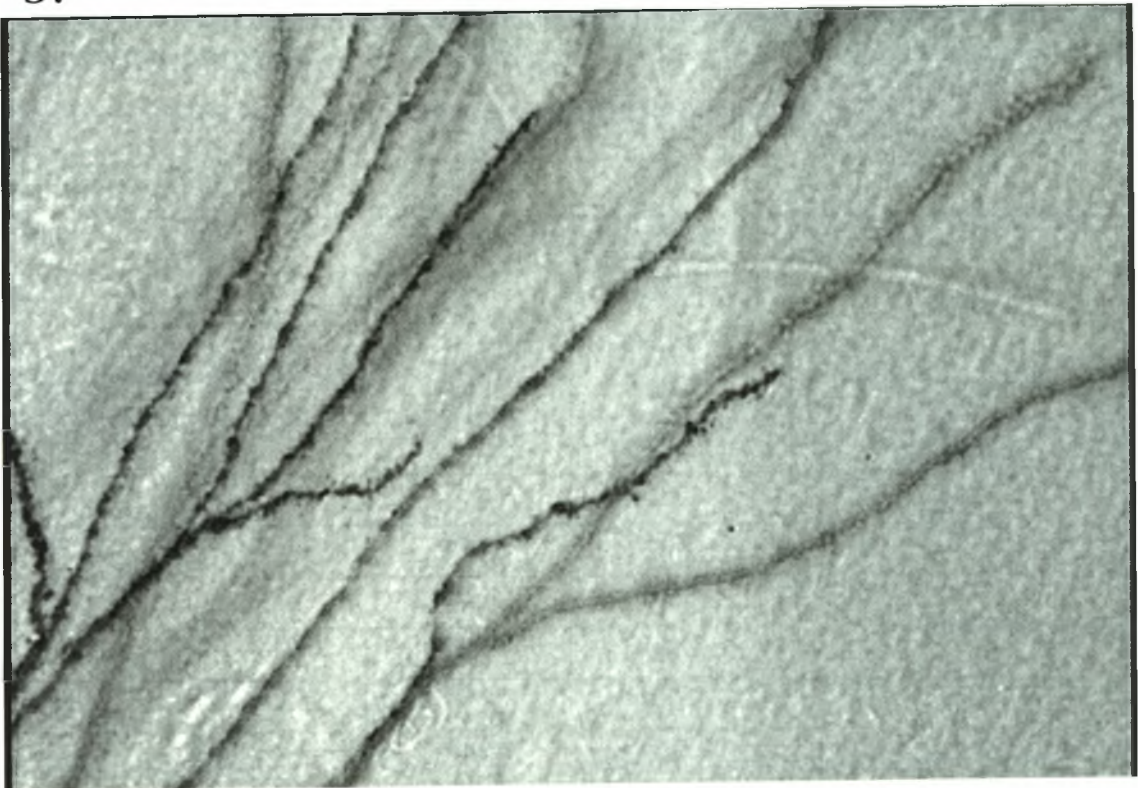
ΨΗΦΙΑΚΕΣ ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΕΣ

Δείγμα τεσσάρων φωτογραφιών, στις οποίες διακρίνονται καθαρά οι διακλαδιζόμενοι δενδρίτες και ορισμένες μόνο από τις άκανθές τους. Οι δύο πρώτες φωτογραφίες αφορούν στους βασικούς δενδρίτες και οι δύο επόμενες στους κορυφαίους δενδρίτες.





3.



4.

ΠΙΝΑΚΕΣ

Οι πίνακες 1-6 περιέχουν τα αποτελέσματα των μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν στα σχέδια που προηγήθηκαν.

Ως διάστημα, περιγράφεται ο ημικυκλικός χώρος που δημιουργείται μεταξύ δύο ημικυκλίων. Ως πρώτο διάστημα, αριθμείται αυτό μεταξύ του κέντρου των κύκλων και του 1^{ου} ημικυκλίου.

Στους πίνακες 1α και 1β σημειώνονται τα μήκη των δενδριτών, όπως έχουν μετρηθεί επί του σχεδίου στο AUTOCAD (σχέδιο 4), το ποσοστό του μήκους τους που περιλαμβάνεται σε κάθε διάστημα σε σχέση με το συνολικό μήκος τους, όπως και οι διακλαδώσεις των δενδριτών και οι απολήξεις τους ανά διάστημα. Τα μήκη σε μm είναι τα πραγματικά, βάσει της κλίμακας.

Στον πίνακα 1α λαμβάνονται υπόψη μόνο τα 8 από τα 12 διαστήματα για τους βασικούς δενδρίτες (σχέδιο 4), γιατί στα διαστήματα 9-12 επικρατούν άξονες και διακλαδώσεις τους, που συνιστούν τον χώρο της παρυφής (alveus), όπως αυτή σημειώνεται στο σχέδιο 2.

Πίνακας 1α

ΒΑΣΙΚΟΙ ΔΕΝΔΡΙΤΕΣ					
Διαστήματα	Μήκη σχεδίου 1:1 (cm)	Πραγματικά μήκη (μm)	Ποσοστό μήκους % του συνολικού	Διακλαδώσεις	Απολήξεις
1	16,61	332,2	6,649	11	5
2	24,57	491,4	9,8354	5	4
3	34,7	694	13,89	9	5
4	48,82	976,4	19,542	8	3
5	40,7	814	16,292	4	7
6	43,4	868	17,3732	8	10
7	29,85	597	11,949	4	17
8	11,16	223,2	4,4674	3	8
Σύνολο	248,91	4.996,2			

Πίνακας 1β

ΚΟΡΥΦΑΙΟΙ ΔΕΝΔΡΙΤΕΣ					
Διαστήματα	Μήκη σχεδίου 1:1 (cm)	Πραγματικά μήκη (μm)	Ποσοστό μήκους επί % του συνολικού	Διακλαδώσεις	Απολήξεις
1	7,95	159	2,163	1	3
2	22,13	442,6	7,274	11	7
3	36,56	731,2	12,017	11	7
4	31,07	621,4	10,213	13	10
5	34,09	681,8	11,205	5	8
6	23,33	466,6	7,668	3	6
7	22,32	446,4	7,3368	7	8
8	24,33	486,6	7,997	5	8
9	13,97	279,4	4,592	3	4
10	17,29	345,8	5,683	8	5
11	24,1	482	7,9219	4	5
12	23,44	468,8	7,705	5	5
13	14,29	285,8	4,697	-	6
14	8,35	167	2,7447	-	2
15	1,0	20	0,3287	-	2
Σύνολο	304,22	6.084,4			

Πίνακας 2: Μέτρηση επιφάνειας δενδριτών

Οι μετρήσεις σε cm φαίνονται και στην κάτοψη του σχεδίου 2.

Βασικές διαστάσεις	κορυφαίων δενδριτών		βασικών δενδριτών	
	σχέδιο 1:1 (cm)	Πραγματικές (μm)	σχέδιο 1:1 (cm)	Πραγματικές (μm)
Μέγιστο ύψος	28,218	404,36	15,0	300
Μέγιστο πλάτος	22,513	450,26	21,86	437,2

Πίνακας 3

Μετράται το μέγεθος «περιοχή σώματος», όπως περιγράφεται και φαίνεται στο σχέδιο 5 στο AUTOCAD.

Μέτρηση περιοχής σώματος, κάτοψη		
Άξονες	σχέδιο 1:1 (cm)	πραγματικές (μm)
Επιμήκης (κάθετα)	1,85	37
Βραχύς (οριζόντια)	0,76	15,2
Περιοχή σώματος	1,406 cm ²	562,4 μm ²

Πίνακας 4

Μετράται ψηφιακά το εμβαδό που περικλείεται από τις δύο περιμέτρους, οι οποίες φαίνονται στο σχέδιο 4 στο AUTOCAD. Η μία περικλείει τους κορυφαίους και η άλλη τους βασικούς δενδρίτες.

Εμβαδό επιφάνειας κάτοψης δενδριτών		
Δενδρίτες	σχέδιο 1:1 (cm ²)	πραγματικές (μm ²)
Βασικοί	146,925	58.770
Κορυφαίοι	271,415	108.566

Στους πίνακες 5 και 6, μετρώνται ανά διάστημα οι ευθείες αποστάσεις των διακλαδώσεων των βασικών (πίνακας 5) και κορυφαίων (πίνακας 6) δενδριτών, από τα αντίστοιχα κέντρα των ημικυκλίων (σχέδιο 4) και ο μέσος όρος (Μ.Ο.) αυτών των αποστάσεων, επίσης ανά διάστημα. Για παράδειγμα, στον πίνακα 5, στο πρώτο (1) διάστημα, περιέχονται 11 διακλαδώσεις, σημειώνονται οι αντίστοιχες 11 αποστάσεις τους από το κέντρο των ημικυκλίων και ο μέσος όρος τους =1,289cm, ή 25,7818μm.

Τα μήκη σε cm έχουν μετρηθεί επί του σχεδίου στο AUTOCAD (σχέδιο 4), το οποίο μεταφέρθηκε αυτούσιο και βρίσκεται σε αναλογία 1:1 ως προς αυτό που ελήφθη με την camera lucida (σχέδια 2, 3). Τα μήκη σε μm είναι τα πραγματικά, πάντα βάσει της κλίμακας. Στον πίνακα 5 λαμβάνονται υπόψη μόνο τα 8 από τα 12 διαστήματα (σχέδιο 4) για τους βασικούς δενδρίτες, όπως έγινε πιο πάνω και για τον πίνακα 1α.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5

ΒΑΣΙΚΟΙ ΔΕΝΔΡΙΤΕΣ

Διαστάματα

Αριθμός διακλα- δώσεων	1		2		3		4		5		6		7		8	
	cm	μm	cm	μm	cm	μm	cm	μm	cm	μm	cm	μm	cm	μm	cm	μm
	1	0,7	14	2,8	56	5,95	119	6,27	125,4	8,98	179,6	11,05	221	12,36	247,2	14,1
2	0,85	17	2,41	48,2	4,59	91,8	7,43	148,6	8,7	174	10,25	205	12,30	246	14,9	298
3	0,67	13,4	3,0	60	4,2	84	6,2	124	8,8	176	11,0	220	12,38	247,6	14,65	293
4	0,88	17,6	3,3	66	4,45	89	6,95	139	10,0	200	11,34	226,8	13,08	261,6		
5	0,98	19,6	3,7	74	4,95	99	7,1	142			11,85	237				
6	1,25	25			5,15	103	6,4	128			10,90	236				
7	1,55	31			5,9	118	6,3	126			10,98	219,6				
8	1,85	37			5,65	113	6,35	127			11,80	218				
9	1,76	35,2			4,95	99										
10	2	40														
11	1,69	33,8														
M.O.	1,289	25,7818	3,042	60,84	5,087	101,7555	6,625	132,5	9,12	182,4	11,14625	222,925	12,53	250,6	14,55	291

ΠΙΝΑΚΑΣ 6

ΚΟΡΥΦΑΙΟΙ ΔΕΝΔΡΙΤΕΣ

Διαστάγματα

Αριθμός διακλά- δωσης	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
	cm	μm	cm	μm	cm	μm	cm	μm	cm	μm	cm	μm	cm	μm	cm	μm	cm	μm	cm	μm	cm	μm	cm	μm
1	0,8	16	2,82	56,40	4,80	96,00	7,45	149,00	8,71	174,20	11,43	228,60	13,43	268,60	16,10	322,00	17,50	350,00	19,40	388,00	22,25	445,00	24,68	493,60
2			3,01	60,20	5,90	118,00	7,00	140,00	9,00	180,00	10,93	218,60	13,00	260,00	15,70	314,00	18,15	363,00	19,60	392,00	21,50	430,00	24,38	487,60
3			3,21	64,20	6,18	123,60	7,14	142,80	9,90	198,00	11,60	232,00	14,65	293,00	14,71	294,20	18,28	365,60	18,90	378,00	20,80	416,00	24,50	490,00
4			3,95	79,00	6,15	123,00	7,80	156,00	10,22	204,40			13,20	264,00	15,69	313,80			18,90	378,00	20,90	418,00	23,02	460,40
5			4,04	80,80	5,40	108,00	8,68	173,60	10,05	201,00			14,15	283,00	14,71	294,20			20,30	406,00			23,95	479,00
6			4,45	89,00	5,70	114,00	6,95	139,00					13,72	274,40					19,79	395,80				
7			4,20	84,00	6,65	133,00	7,35	147,00					14,00	280,00					20,30	406,00				
8			4,32	86,40	6,55	131,00	6,97	139,40											20,29	405,80				
9			3,89	77,80	6,70	134,00	7,00	140,00																
10			4,00	80,00	6,70	134,00	7,62	152,40																
11			4,25	85,00	6,59	131,80	8,20	164,00																
12							8,80	176,00																
13							8,80	176,00																
M.O.	0,8	16	3,83	76,6181	6,12	122,40	7,6738	153,4766	9,576	191,52	11,32	226,40	13,7357	274,7142	15,382	307,64	17,9766	359,533	19,685	393,70	21,3625	427,25	24,725	482,12

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Ο απώτερος σκοπός κάθε μορφής μελέτης στο ΚΝΣ, είναι να γίνει γνωστή η λειτουργικότητα των νευρώνων του και η χρησιμότητά τους. Μέσα σε ένα συνολικότερο αριθμό μετρήσεων, ηλεκτροφυσιολογικών και βιοχημικών, η μορφομετρική ανάλυση παρέχει πληροφορίες, οι οποίες θεωρούνται αναγκαίες, προκειμένου να επιτευχθεί ο σκοπός αυτός. Είναι εξαιρετικά λεπτομερής τρόπος ανάλυσης και ιδιαίτερα ευέλικτος γιατί περιλαμβάνονται πολλά μεγέθη και μπορούν να προστεθούν από τους εκάστοτε ερευνητές και νεότερα, ανάλογα με τις αναζητήσεις τους και τις τεχνολογικές δυνατότητες. Όλες οι μετρήσεις, αφού πραγματοποιηθούν σε όσο το δυνατόν περισσότερους νευρώνες του ίδιου τύπου, αποκτούν στατιστική αξία. Μπορούν να γίνουν συγκρίσεις μεταξύ ομοειδών μετρήσεων στον ίδιο νευρώνα ή σε νευρώνες διαφορετικού τύπου. Ακόμη, όλες οι μετρήσεις μπορούν να γίνουν αντικείμενο σύγκρισης μεταξύ περιοχών όπως οι CA1, CA2 και CA3 του ιπποκάμπου, καθώς και μεταξύ νευρώνων οργανισμών αρσενικού και θηλυκού φύλου (McEwen et al., 1999)⁵¹.

Η συσσώρευση και, προϊόντος του χρόνου, η συνδυασμένη εκμετάλλευση αυτών των πληροφοριών, θα οδηγήσει στην πρόοδο της αντιμετώπισης ασθενειών που οφείλονται σε βλάβες του ΚΝΣ.

Επισημαίνεται ένα μειονέκτημα, όχι σπάνιο στον χώρο της έρευνας: υπεισέρχεται, σε αρκετά σημεία της όλης μεθοδολογίας, ο υποκειμενικός παράγοντας. Η ακρίβεια των επίπονων ποσοτικών μετρήσεων, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον ερευνητή. Ένας αυτόματος τρόπος, με την παρεμβολή της τεχνολογίας, με προγράμματα και συσκευές που «βλέπουν» ό,τι βλέπει και ο ερευνητής, μειώνει το στοιχείο της προκατάληψης, καθώς και τον χρόνο που απαιτείται για τη συλλογή μεγάλου αριθμού πληροφοριών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Agarwala KL, Ganesh S, Suzuki T, Akagi T, Kaneko K, Amano K, Yukie T, Yamaguchi K, Hashikawa K, Yamakawa T. Dscam is associated with axonal and dendritic features of neuronal cells. *J. neurosci. Res.* 66(3):337-346, 2001(a).
2. Agarwala KL, Ganesh S, Amano K, Suzuki T, Yamakawa K. DSCAM, a highly conserved gene in mammals, expressed in differentiating mouse brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281:697-705, 2001(b).
3. Amaral DG. "The anatomical organization of the central nervous system" in the "Principles of neural science", p. 317-336. Fourth edition, McGraw-Hill, 2000(a).
4. Amaral DG. "The functional organization of perception and movement" in the "Principles of neural science", p. 337-348. Fourth edition, McGraw-Hill, 2000(b).
5. Amaral DG, Insausti R, Conan WM. The entorhinal cortex of the monkey: I. Cytoarchitectonic organization. *J. Comp. Neurol.* 264(3):326-55, 1987.
6. Amaral DG, Witter MP. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience.* 31(3):571-91, 1989.
7. Amaral DG. Emerging principles of intrinsic hippocampal organization. *Curr. Opin. Neurobiol.* 3(2):225-9, 1993.
8. Angst DB, Markozzi C, Magee IA. The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J. Cell Science.* 114: 629-641, 2001.
9. Bannister NJ, Larkman AU, Dendritic morphology of CA1 pyramidal neurones from the rat hippocampus: II. Spine distributions. *J. Comp. Neurol.* 360:161-171, 1995.
10. Bartesaghi R, Ravasi L. Pyramidal neuron types in field CA2 of the guinea pig. *Brain Research Bulletin.* 50(4):263-273, 1999.
11. Ben-Ari Y, Cherubini E, Corradetti R, Gaiarsa JL. Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J. Physiol. (Lond.).* 416:303-325, 1989.
12. Ben-Ari Y. Developing networks play a similar melody. *Trends Neurosci.* 24:353-360, 2001.
13. Brown HT, Zador MA. Edited by Shepherd MG. "Hippocampus", in "The synaptic organization of the brain", p. 346-388. Third edition, Oxford University Press, 1990.
14. Caserta F, Eldred WD, Fernandez E, Hausman RE, Stanford LR, Bulderev SV, Schwarzer S, Stanley HE. Determination of fractal dimension of physiologically

- characterized neurons in two and three dimensions. *J. Neurosci. Methods.* 56:133-134, 1995.
15. Chiu C, Weliky M. Spontaneous activity in developing ferret visual cortex in vivo. *J. Neurosci.* 21:8906-8914, 2001.
16. Cunningham BA, Hemperly JJ, Murray BA, Prediger EA, Brackenbury R, Edelman GM. Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science.* 236:799-806, 1987.
17. Danscher G, Shipley MT, Andersen P. Persistent function of mossy fibre synapses after metal chelation with DEDTC (Antabuse). *Brain Res.* 85(3):522-6, 1975.
18. Dermietzel R., Spray DC. Gap junctions in the brain: where, what type, how many and why? *Trends Neurosci.* 16(5):186-92, 1993.
19. Desmond NL, Levy WB. A quantitative anatomical study of the granule cell dendritic fields of the rat dentate gyrus using a novel probabilistic method. *J. Comp. Neurol.* 212:131-145, 1982.
20. Faherty JC, Kerley D, Smeyne RJ. A Golgi-Cox morphological analysis of neuronal changes, induced by environmental enrichment. *Develop. Brain Res.* 141(1-2):55-61, 2003.
21. Feldman ML, Peters A. A technique for estimating total spine numbers on Golgi impregnated dendrites. *J. Comp. Neurol.* 188:527-542, 1979.
22. Fiala JC, Feinberg M, Popov V, Harris KM. Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. *Neurosci.* 18:8900-8911, 1998.
23. Garaschuk O, Hanse E, Konnerth A. Developmental profile and synaptic origin of early network oscillations in the CA1 region of rat neonatal hippocampus. *J. Physiol. (Lond.).* 507:219-236, 1998.
24. Germain F, Fernández E, de la Villa P. Morphometrical analysis of dendritic arborization in axotomized retinal ganglion cells. *Europ. J. Neurosci.* 18(5):1103, 2003.
25. Glaser GH. Treatment of intractable temporal lobe-limbic epilepsy (complex partial seizures) by temporal lobectomy. *Ann. Neurol.* 8(5):455-9, 1980 Nov.
26. Hock BJ Jr, Bunsey MD. Differential effects of dorsal and ventral hippocampal lesions. *J. Neurosci.* 18(17):7027-32, 1998.
27. Hofer A, Dermietzel R. Visualisation and functional blocking of gap junction hemichannels (connexons) with antibodies against external loop domains in astrocytes. *Glia.* 24(1):141-54, 1998.

28. Horel JA. Some comments on the special cognitive functions claimed for the hippocampus. *Cortex*. 30(2):269-80, 1994.
29. Hsu SM, Raine L. Protein A., avidin, and viotin in immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 29(11):1349-53, 1981.
30. Hsu SM, Cossman J, Jaffe ES. A comparison of ABC, unlabeled antibody and conjugated immunohistochemical methods with monoclonal and polyclonal antibodies - an examination of germinal center of tonsils. *Am. J. Clin. Pathol.* 80(4):429-35, 1983.
31. Hynes RO. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 48:549-554, 1987.
32. Jessell MT. «Το νευρικό σύστημα» στο «Νευροεπιστήμη και συμπεριφορά», σελ. 77-95. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 1999.
33. Kandel E. «Κυτταρικοί μηχανισμοί μάθησης και μνήμης» στο «Νευροεπιστήμη και συμπεριφορά», σελ. 699-728. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 1999.
34. Kandel E. «Συναπτική ολοκλήρωση» στο «Νευροεπιστήμη και συμπεριφορά», σελ. 231-255. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 1999.
35. Kandel E, Kupfermann I. «Συναισθηματικές καταστάσεις» στο «Νευροεπιστήμη και συμπεριφορά», σελ. 623-640. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 1999.
36. Kandel E, Kupfermann I, Iversen S. "Learning and memory" in the "Principles of neural science", p. 1227-1246. Fourth edition, McGraw-Hill, 2000.
37. Kaut KP, Bunsey MD, Riccio DC. Olfactory learning and memory impairments following lesions to the hippocampus and perirhinal-entorhinal cortex. *Behav. Neurosci.* 117(2):304-19, 2003.
38. Khazipov R, Esclapez M, Caillard O, Bernard C, Khalilov I, Tyzio R, Hirsch J, Dzhalal V, Berger B, Ben-Ari Y. Early Development of Neuronal Activity in the Primate Hippocampus in Utero. *J. Neurosci.* 21(24):9770-9781, 2001.
39. Kohler C. Intrinsic connections of the retrohippocampal region in the rat brain. II. The medial entorhinal area. *J. Comp. Neurol.* 246(2): 149-69, 1986 Apr. 8.
40. Konur S., Rabinovitz D., Festermaker V.L., Yuste R., Systematic regulation of spine sizes and densities in pyramidal neurons. *J. Neurobiol.*, 56(2): 95-112, 2003.

41. Krichmar LJ, Nasuto JS, Scorcioni R, Washington DS, Ascoli AG. Effects of dendritic morphology on CA3 pyramidal cell electrophysiology: a simulation study. *Brain Res.* 941:11-28, 2002.
42. Γνωστική λειτουργία και φλοιός. Kupfermann I. Νευροεπιστήμη και συμπεριφορά. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 1999.
43. Μάθηση και μνήμη. Kupfermann I, Kandel E. Νευροεπιστήμη και συμπεριφορά. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 1999.
44. Larkman UA. Dendritic morphology of pyramidal neurones of the visual cortex of the rat: I. Branching patterns. *J. Comparative Neurol.* 306 (2), 307-319, 1991(a).
45. Larkman UA. Dendritic morphology of pyramidal neurones of the visual cortex of the rat: II. Parameter Correlations. *J. Comparative Neurol.* 306 (2), 320-331, 1991(b).
46. Larkman UA. Dendritic morphology of pyramidal neurones of the visual cortex of the rat: III. Spine distributions. *J. Comparative Neurol.* 306 (2), 320-331, 1991(c).
47. Lübke J, Roth A, Feldmeyer D, Sakman B. Morphometric analysis of the columnar innervation domain of neurons connecting layer 4 and layer 2/3 of juvenile rat barrel cortex. *Cerebral Cortex.* 13(10):1051-1063, 2003.
48. Luscher C, Nicoll RA, Malenka RC, Muller D. Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane. *Nat. Neurosci.* 3:545-550, 2000.
49. Maletic-Savatic M, Malinow R, Svoboda K. Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science* 283:1923-1927, 1999.
50. Maruki K, Izaki Y, Nomura M, Yamauchi T. Differences in paired-pulse facilitation and long-term potentiation between dorsal and ventral CA1 regions in anesthetized rats. *Hippocampus* 11(6):655-61, 2001.
51. McEwen SB, Tanapat P, Weiland GN. Inhibition of dendritic spine induction on hippocampal CA1 pyramidal neurons by a nonsteroidal estrogen antagonist in female rats. *Endocrinology*, 140(3):1044-1047, 1999.
52. McFarlane S. Dendritic morphogenesis: building an arbor. *Mol. Neurobiol.* 22:1-9, 2000.
53. Ming G, Henley J, Tessier-Lavigne M, Soug H, Poo M. Electrical activity modulates growth cone guidance by diffusible factors. *Neuron* 29:441-452, 2001.

54. Mizrahi A, Ben-Ner E, Katz JM, Kedem K, Glusman JG, Libersat F. Comparative analysis of dendritic architecture of identified neurons using the Hausdorff distance metric. *J. Comparative Neurol.* 422(3):415-428, published online: 2000.
55. Moser E, Moser MB, Andersen P. Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *J. Neurosci.* 13(9):3916-25, 1993.
56. Moser EI, Krobot KA, Moser MB, Morris RG. Impaired spatial learning after saturation of long-term potentiation. *Science.* 281(5385):2038-42, 1998.
57. Parnass Z., Tashiro A., Yuste R. Analysis of spine morphological plasticity in developing hippocampal pyramidal neurons. *Hippocampus*, 10(5):561-8, 2000.
58. Peters A, Kaiserman-Abramof IR. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *Am. J. Anat.* 127:321-356, 1970.
59. Polleux F, Morrow T, Ghosh A. Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature* 404:567-573, 2000.
60. Rainnie DG, Asprodini EK, Shinnick-Gallagher P. Intracellular recordings from morphologically identified neurons of the Basolateral amygdala. *J. Neurophysiol.* 69(4):1350-62, 1993.
61. Ramon y Cajal, S. "Histologie du Système nerveux de l' homme et des vertébrés". Ed. A. Maloine. Paris, 1911.
62. Rao A, Kim E, Sheng M, Craig AM. Heterogeneity in the molecular composition of excitatory postsynaptic sites during development of hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* 18:1217-1229, 1998.
63. Samsonovich VA, Ascoli AG. Statistical morphological analysis of hippocampal principal neurons indicates cell specific repulsion of dendrites from their own cell. *J Neurosci Research.* 71(2):173-187, 2003; published online: 2002.
64. Schwartz JH, Westbrook GL. "The cytology of neurons" in the "Principles of neural science", p. 67-87. Fourth edition, McGraw-Hill, 2000.
65. Sestan N, Artanakis-Tsakonas S, Rakic P. Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling. *Science* 286:741-746, 1999.
66. Schlessinger AR, Cowan WM, Swanson LW. The time of origin in Ammon's horn and the associated retrohippocampal fields. *Anat. Embryol. (Berl.)*. 154(2):153-73, 1978.
67. Sholl D. A. Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J. Anat. (London)*, 87:387-406, 1953.

68. Smith TG Jr, Marks WB, Lange GD, Sheriff WH Jr. A fractal analysis of cell images. *J. Neurosci. Methods.* 27:173-180, 1989.
69. Snow PJ, Rose PK, Brown AG. Tracing axons and axon collaterals of spinal neurons using intracellular injection of horseradish peroxidase. *Science.* 191(4224):312-3, 1976.
70. Squire LR. The organization and neural substrates of human memory. *Int. J. Neurol.* 21-22:218-22, 1987-88.
71. Staff PN, Jung H-Y, Thiagarajan T, Yao M, Spruston N. Resting and active properties of pyramidal neurons in subiculum and CA1 of rat hippocampus. *J. physiol.* 84(5):2398-2408, 2000.
72. Sternberger NH, Itoyama Y, Kies MW, Webster H de F. Immunocytochemical method to identify basic protein in myelin-forming oligodendrocytes of newborn rat C.N.S. *J. Neurocytol.* 7(2):251-63, 1978.
73. Takeishi M. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development* 102:639-655, 1988.
74. Tang L, Hung CP, Schuman EM. A role for the cadherin family of cell adhesion molecules in hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 20, 1165-1175, 1998.
75. Uylings HBM, Ruiz-Marcos A, van Pelt J. The metric analysis of three dimensional dendritic tree patterns: a methodological review. *J. Neurosci. Methods.* 18:127-151, 1986.
76. Witter MP. A survey of the anatomy of the hippocampal formation, with emphasis on the septotemporal organization of its intrinsic and extrinsic connections. *Adv. Exp. Med. Biol.* 203:67-82, 1986.
77. Witter MP, Naber PA, van Haeften T, Machielsen WC, Rombouts SA, Barkhof F, Scheltens P, Lopes da Silva FH. Cortico-hippocampal communication by way of parallel parahippocampal-subicular pathways. *Hippo.* 10(4):398-410, 2000.
78. Yamagata K, Andreasson KI, Sugiura H, Maru E, Dominique M, Irie Y, Miki N, Hayashi Y, Yoshioka M, Kneko K, Kato H, Worley PF. Arcadlin is a neural activity-regulated cadherin involved in long term potentiation. *J. Biol. Chem.* 274, 19473-19479, 1999.
79. Zola-Morgan S, Squire LR. Memory impairment in monkeys following lesions limited to the hippocampus. *Behav. Neurosci.* 100(2):155-60, 1986.
80. Zoidl G, Dermietzel R. On the search for the electrical synapse: a glimpse at the future. *Cell Tissue Res.* 310(2):137-43, 2002.