

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΠΙΛΟΓΗΣ  
"ΙΑΤΡΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ"

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΘΕΜΑ:

"ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ – ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ  
ΓΙΑ ΤΗ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΝΕΥΡΩΝΩΝ ΤΟΥ  
ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΥ ΑΡΟΥΡΑΙΟΥ"

Τριμελής Επιτροπή

Ν. Σακελλαρίδης, Καθηγητής, Φαρμακολογίας

Ε. Ασπροδίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας

(επιβλέπουσα)

Γ. Σίμος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΠΙΛΟΓΗΣ  
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

Ημερομ. 25/05/2004

Αριθ. Πρωτ. 2649

ΕΚΠΟΝΗΣΗ: Θ. ΜΕΝΟΥΝΟΥ

Λάρισα Μάιος 2004



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

Αριθ. Εισ.: 2868/1

Ημερ. Εισ.: 24/06/2004

Δωρεά: \_\_\_\_\_

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ-ΠΣΕ-ΙΒ

2004

MEN

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000057008



# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b> .....	<b>3</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	<b>4</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>6</b>
1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ.....	6
1.2 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	6
1.3 ΙΠΠΟΚΑΜΠΕΙΟΣ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΠΥΡΑΜΙΔΟΕΙΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ.....	8
1.4 ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΗΣ ΚΥΤΟΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗΣ ΤΩΝ ΝΕΥΡΩΝΩΝ.....	12
1.5 ΕΠΙΠΕΔΑ ΟΡΓΑΝΩΣΗΣ ΣΥΝΑΠΤΙΚΩΝ ΚΥΚΛΩΜΑΤΩΝ.....	12
1.6 ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΧΡΩΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΝΕΥΡΩΝΩΝ ΤΟΥ Κ.Ν.Σ.....	13
1.6.1 ΜΕΘΟΔΟΣ GOLGI.....	14
1.6.2 ΜΕΘΟΔΟΣ NISSL.....	14
1.6.3 ΜΕΘΟΔΟΣ HRP.....	15
1.6.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΧΡΩΣΗΣ ΕΚΦΥΛΙΣΜΕΝΩΝ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	16
1.7 ΙΣΤΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΧΡΩΣΗΣ – ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΑ ΕΓΧΥΣΗ ΟΥΣΙΩΝ.....	16
1.7.1 ΧΡΩΣΗ ΜΕ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΟΥΣΙΕΣ.....	16
1.7.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΧΡΩΣΗΣ ΜΕ ΒΙΟΚΥΤΙΝΗ.....	17
1.7.3 ΜΕΘΟΔΟΣ ΧΡΩΣΗΣ ΤΟΜΩΝ ΠΑΧΟΥΣ 500ΜΜ.....	19
1.8 ΣΚΟΠΟΣ.....	20
<b>2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ</b> .....	<b>21</b>
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>25</b>
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	<b>42</b>
<b>5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>45</b>
<b>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	<b>46</b>

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του Ιατρικού τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Ε. Ασπροδίνη. Η αναζήτηση και υπόδειξη της ύλης, η επίβλεψη, η καθοδήγηση και οι ουσιαστικές παραινέσεις της ήταν αποφασιστικής σημασίας για την υλοποίηση της εργασίας, δίχως τις οποίες δεν θα ήταν δυνατή η επίλυση τεχνικών και όχι μόνον δυσκολιών.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή Φαρμακολογίας κ. Ν. Σακελλαρίδη και τον Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας κ. Γ. Σίμο, μέλη της τριμελούς επιτροπής κρίσεως, για το χρόνο που αφιέρωσαν για την ολοκλήρωση και άρτια παρουσίαση της διπλωματικής εργασίας.

Ευχαριστίες πρέπει να αποδοθούν στον κ. Ε. Κουβαρά, υποψήφιο διδάκτορα του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής, για την πολύτιμη συμβολή του κατά την εκμάθηση των διαφόρων διαδικασιών που αφορούν την εκπόνηση της διπλωματικής. Ακόμη, η συμμετοχή του κ. Η. Μπέγα, μέλος ΕΤΕΠ του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας, αποδείχθηκε απαραίτητη για την ολοκλήρωση του πειραματικού σκέλους καλύπτοντας τεχνικές ανάγκες της εργασίας. Τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ι. Αντωνόπουλο και τα μέλη του Εργαστηρίου Ανατομικής της Κτηνιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ. ευχαριστώ για τη βοήθειά τους στην επίλυση τεχνικών προβλημάτων.

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την αμέριστη συμπαράσταση και τη συνεχή ηθική τους υποστήριξη.

Τέλος, ευχαριστίες οφείλονται στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας κ. Σ. Μπονάνου – Τζεδάκη η οποία, πέραν της προσωπικής αναλώσεως της σε θέματα διδασκαλίας, οργάνωσης του ΠΣΕ Ιατρική Βιοχημεία, βρέθηκε δίπλα μας σε κάθε κρίσιμη καμπή της προσωπικής μας πορείας μέσα στο θεσμό μεταλαμπαδεύοντας κάθε στιγμή τον ενθουσιασμό της και αναδύοντας έτσι την ανθρώπινη διάσταση που πρέπει να επικρατεί στο σύγχρονο απαιτητικό ακαδημαϊκό περιβάλλον.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η συναπτική ολοκλήρωση, κατά την οποία καθορίζεται η απόκριση ενός νευρώνα στα προσαγωγά συναπτικά σήματα, εξαρτάται από διάφορες παραμέτρους. Σημαντικό ρόλο στην συναπτική ολοκλήρωση διαδραματίζει η μορφολογία του νευρώνα. Πράγματι, ο αριθμός και η κατεύθυνση των βασικών αποφυάδων του νευρώνα, ο βαθμός διακλάδωσης των δενδριτών, το συνολικό μήκος του κυττάρου και το μήκος των διακλαδώσεων, κάθε τάξης, επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τη νευρωνική λειτουργία. Κατά συνέπεια, η μελέτη των μορφολογικών χαρακτηριστικών των νευρώνων παρέχει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη λειτουργία τους. Η ταυτόχρονη μελέτη των ηλεκτροφυσιολογικών ιδιοτήτων ενός νευρώνα και των μορφολογικών του χαρακτηριστικών είναι ιδιαίτερα επίπονη και αποτελεί πρόκληση για την ολοκληρωμένη μελέτη της λειτουργίας των νευρώνων. Η τεχνική αυτή προσέγγιση, πρωτοποριακή για τον Ελλαδικό χώρο, στέφθηκε με μερική μόνο επιτυχία στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας λόγω της πτωχής τεχνογνωσίας στον τομέα αυτό.

Η παρούσα μελέτη αφορά στην προσπάθεια βελτίωσης της οπτικοποίησης πυραμιδοειδών νευρώνων της CA1 περιοχής του υποκάμπου αρουραίου που είχαν προηγουμένως σημανθεί με το μόριο της βιοκυτίνης, πραγματοποιώντας τις παρακάτω τροποποιήσεις: 1) ανάπτυξη νέας μεθοδολογίας κοπής τομών, 2) προετοιμασία αντικειμενοφόρων πλακών, 3) αφυδάτωση των τομών.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής αναμένεται να συμβάλλουν στην προσπάθεια μορφομετρικής μελέτης νευρώνων υποκάμπου αρουραίου και της συσχέτισής τους με ηλεκτροφυσιολογικά δεδομένα.

## ABSTRACT

Synaptic integration, a process which determines the neuronal response to incoming signals, depends on various aspects, dendritic morphology being one of them. Dendritic branching pattern, branch complexity and length, as well as a neuron's total length are parameters that influence neuronal output. Thus, studies on neuronal morphology provide valuable information regarding the understanding and evaluation of the function of local circuits. The simultaneous characterization of electrophysiological properties and neuronal morphology is a primary goal of studies on neuronal function. Thus far, such an approach has been hindered due to technical limitations.

The present thesis is concerned with the improvement of a histological protocol used to visualize pyramidal neurons of the CA1 area of the rat hippocampus that have been previously recorded electrophysiologically with pipettes filled with biocytin. The improvement was based on the following: 1) development of a new slicing technique, 2) improvement of the mounting technique, 3) dehydration of the slices, and is expected to contribute significantly to the simultaneous morphometric evaluation and neuronal function.

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Ιστορική αναδρομή.

Ο νευρικός ιστός ως τον 18<sup>ο</sup> αιώνα θεωρούνταν αδενικός ως προς τη λειτουργία του. Με την εφεύρεση του σύνθετου μικροσκοπίου αποσαφηνίσθηκε η πραγματική κυτταρική υφή του νευρικού συστήματος. Παρ'όλα αυτά, ο νευρικός ιστός δεν αποτέλεσε αντικείμενο λεπτομερούς επιστημονικού ελέγχου μέχρι τα τελευταία χρόνια του 19<sup>ου</sup> αιώνα όταν ο Ιταλός γιατρός Camillo Golgi και ο Ισπανός ιστολόγος Santiago Ramón y Cajal περιέγραψαν λεπτομερώς την υφή των νευρικών κυττάρων.

Ο Golgi ανέπτυξε μία τεχνική αργυρούχου χρώσεως η οποία αποκάλυπτε υπό το μικροσκόπιο το σύνολο του νευρώνα, με το κυτταρικό του σώμα και τούς δύο κύριους τύπους προεκβολών (ή αποφυάδων) τους δενδρίτες και τον νευράξονα. Ο Ramón y Cajal χρησιμοποίησε αυτήν την τεχνική αργυρούχου χρώσεως για να σημάνει χωριστά κύτταρα, αποδεικνύοντας έτσι ότι ο νευρικός ιστός δεν είναι μία συνεχής μάζα αλλά ένα δίκτυο ανεξάρτητων κυττάρων. Στην πορεία της εργασίας αυτής ανέπτυξε μερικές από τις βασικές έννοιες και πολλά από τα πρώιμα αποδεικτικά στοιχεία για τη νευρωνική θεωρία – την αρχή ότι χωριστοί νευρώνες είναι οι στοιχειώδεις μονάδες μετάδοσης σημάτων στο νευρικό σύστημα.

Παρά το γεγονός ότι ο Golgi και ο Ramón y Cajal χρησιμοποίησαν παρόμοιες μεθόδους χρώσης, κατέληξαν σε αντίθετα συμπεράσματα. Ο Golgi πίστευε ότι οι νευρώνες σχηματίζουν ένα δικτυωτό και ότι οι δενδρίτες έχουν τροφική λειτουργία, ενώ ο Ramón y Cajal θεωρούσε ότι τα νευρικά κύτταρα είναι ανεξάρτητες μονάδες με ένα υποδεκτικό άκρο ( τους δενδρίτες ), ένα τμήμα αγωγής ( τον νευράξονα ) και ένα άκρο διαβίβασης ( τις νευρικές απολήξεις ).

## 1.2 Μορφολογία Νευρικών Κυττάρων.

Ένας συνήθης νευρώνας έχει τέσσερις μορφολογικά καθορισμένες περιοχές: το κυτταρικό σώμα, τους δενδρίτες, το νευράξονα και τα προσυναπτικά τελικά κομβία. Η καθεμία από τις παραπάνω περιοχές έχει ιδιαίτερη λειτουργική σημασία.

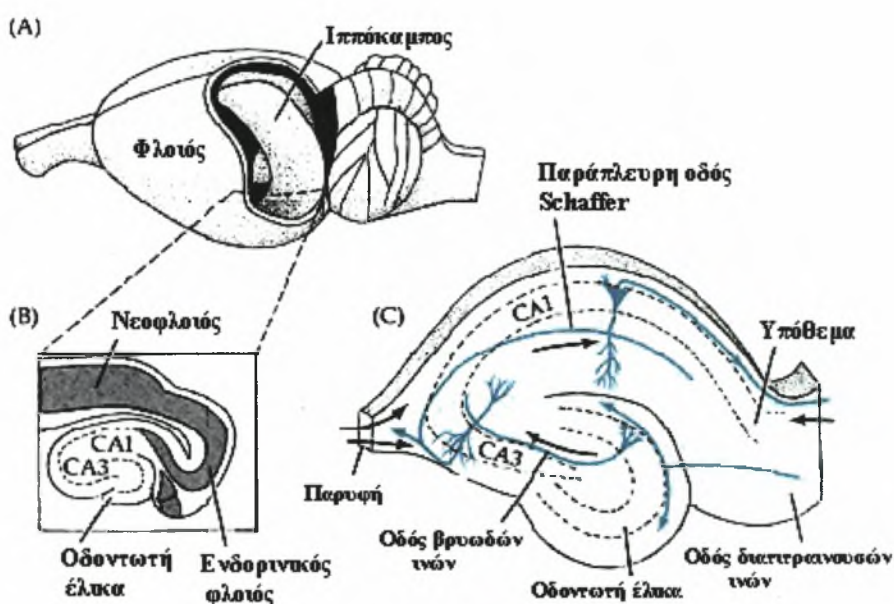
Το κυτταρικό σώμα είναι το κέντρο μεταβολισμού του κυττάρου. Περιέχει τον πυρήνα καθώς και το αδρό και λείο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου γίνεται η σύνθεση των πρωτεϊνών του κυττάρου. Το κυτταρικό σώμα χορηγεί δύο ειδών προεκβολές ή αποφυάδες, τους δενδρίτες και το νευράξονα. Οι περισσότεροι νευρώνες έχουν αρκετούς δενδρίτες οι οποίοι διακλαδίζονται, όπως ένα δέντρο, σε λεπτότερες αποφυάδες και χρησιμεύουν ως κύρια περιοχή υποδοχής σημάτων από άλλα νευρικά κύτταρα. Κάθε δενδριτικός κλάδος έχει δύο θέσεις υποδοχής των νευρικών ώσεων, το κυρίως στέλεχος και τις άκανθες. Η άκανθα είναι μία πολύ εξειδικευμένη ζώνη συναπτικής εισόδου, η οποία αποτελείται συνήθως από ένα λεπτό αυχένα και μια πιο διογκωμένη κεφαλή. Κάθε άκανθα δέχεται στην επιφάνεια της τουλάχιστον μία σύναψη και αποτελεί ένα ιδιαίτερο βιοχημικό διαμέρισμα. Αντίθετα απ'ότι ισχύει για τους δενδρίτες, μόνο ένας νευράξονας εκφύεται από το κυτταρικό σώμα. Ο νευράξονας θεωρείται ως η κύρια μονάδα αγωγής του νευρώνα. Η διάμετρος του κυμαίνεται μεταξύ 0.2 και 20  $\mu\text{m}$  και μπορεί να άγει τα ηλεκτρικά σήματα σε μήκος που κυμαίνεται από 0.1 mm και 2 m. Πολλοί νευράξονες διαιρούνται σε αρκετούς κλάδους, μεταφέροντας έτσι πληροφορίες σε διαφορετικούς στόχους. Κοντά στην απόληξή του ο νευράξονας διαιρείται σε λεπτούς κλάδους, οι οποίοι έρχονται σε επαφή με άλλους νευρώνες. Το σημείο επαφής είναι γνωστό ως σύναψη. Το κύτταρο που διαβιβάζει το σήμα ονομάζεται προσυναπτικό κύτταρο και το κύτταρο που δέχεται το σήμα μετασυναπτικό κύτταρο. Εξειδικευμένες διογκώσεις των νευραξονικών κλάδων λειτουργούν ως θέσεις διαβίβασης στο προσυναπτικό κύτταρο και ονομάζονται συναπτικά κομβία. Δύο κύτταρα που συνάπτονται μεταξύ τους δεν επικοινωνούν ανατομικά, αλλά μεσολαβεί μεταξύ τους ένα διάστημα που ονομάζεται συναπτική σχισμή (Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM, 1997).

Με βάση τον αριθμό των αποφυάδων που εκφύονται από το κυτταρικό σώμα, τα νευρικά κύτταρα κατατάσσονται σε τρεις μεγάλες ομάδες: τα μονόπολα, τα δίπολα και τα πολύπολα κύτταρα. Τα μονόπολα κύτταρα φέρουν μόνο μία αποφυάδα που συνήθως διαιρείται σε πολλούς κλάδους, ένας εκ των οποίων λειτουργεί ως νευράξονας και οι υπόλοιποι ως δενδριτικές δομές υποδοχής. Τα δίπολα κύτταρα φέρουν δύο αποφυάδες: ένα δενδρίτη που μεταφέρει πληροφορίες από την περιφέρεια προς το κυτταρικό σώμα και ένα νευράξονα που μεταφέρει πληροφορίες από το κυτταρικό σώμα προς το υπόλοιπο νευρικό σύστημα. Τέλος τα πολύπολα κύτταρα, τα οποία και υπερτερούν σε αριθμό στο νευρικό σύστημα των σπονδυλωτών, έχουν ένα νευράξονα και δύο ή περισσότερους δενδρίτες, οι οποίοι συνήθως εκφύονται από όλα τα μέρη του κυτταρικού σώματος. Το μέγεθος και το σχήμα των πολύπολων κυττάρων ποικίλλουν σημαντικά. Στην κατηγορία αυτή των



κυττάρων εντάσσονται και τα πυραμιδοειδή κύτταρα που βρίσκονται στον ιππόκαμπο και σε όλη την έκταση του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων (Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM, 1997).

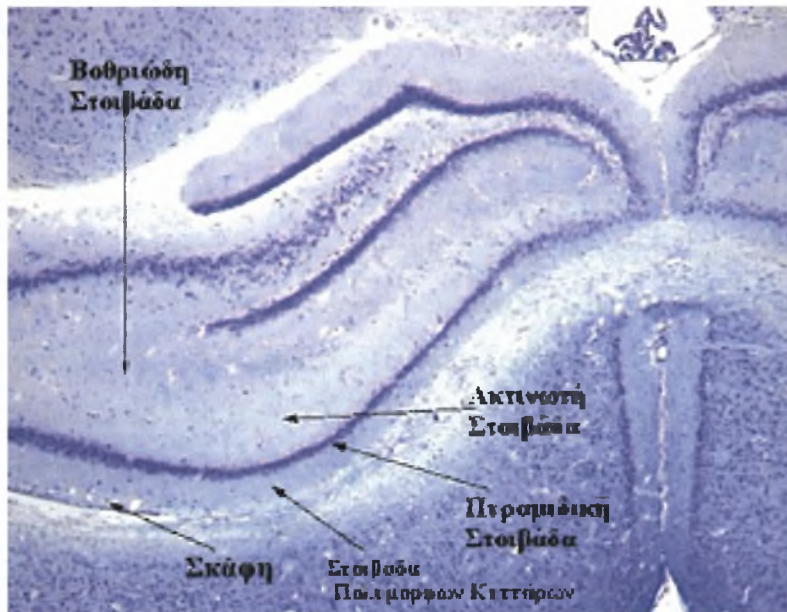
### 1.3 Ιπποκάμπειος σχηματισμός και πυραμιδοειδή κύτταρα.



Εικόνα 1: Α) Απεικόνιση του εγκεφάλου αρουραίου όπου παρουσιάζεται η θέση του ιπποκάμπου στη δομή. Β) Εγκάρσια τομή όπου απεικονίζεται ο ιππόκαμπος και οι περιβάλλουσες περιοχές. Γ) Σχεδιάγραμμα εγκάρσιας τομής του ιπποκάμπου με το τρισυναπτικό κύκλωμα.

Ο ιππόκαμπειος σχηματισμός είναι μια δομή του πρόσθιου εγκεφάλου και αποτελεί τμήμα του στεφανιαίου συστήματος. Η θέση που καταλαμβάνει στον τρισδιάστατο εγκέφαλο παρουσιάζεται στην εικόνα 1. Ως προς τον επιμήκη άξονα του διακρίνεται σε ραχιαίο και κοιλιακό ενώ σε οριζόντιες τομές παρουσιάζει τη διαστρωμάτωση εμφανίζεται στην εικόνα 2. Είναι ένα μόρφωμα που προσελκύει το έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον όχι μόνο λόγω του λειτουργικού του ρόλου, αλλά και εξαιτίας της στοιβαδωτής του δομής. Όλα τα κύτταρα του ιπποκάμπειου σχηματισμού είναι οργανωμένα σε εξαιρετικά προσδιορισμένες ζώνες, γεγονός που διευκολύνει ιδιαίτερα τη μελέτη της δομής και λειτουργίας του (Shepherd, 1998). Ο ιπποκάμπειος σχηματισμός περιλαμβάνει τον ιππόκαμπο, το υπόθεμα, τον ενδορινικό φλοιό,

την οδοντωτή έλικα το προ-υπόθεμα και το παρα-υπόθεμα. Δέχεται προσαγωγούς ίνες από: 1) τον ενδορινικό φλοιό, 2) το διάφραγμα, 3) τον υποθάλαμο 4) το άνω τμήμα του εγκεφαλικού στελέχους και 5) την αμυγδαλή. Όσον αφορά τις απαγωγούς ίνες του ιπποκάμπειου σχηματισμού αυτές νευρώνουν: 1) την έξω μοίρα του διαφράγματος, 2) τον πρόσθιο οσφρητικό πυρήνα, 3) τον επικληνή πυρήνα του διαφράγματος, 4) τον υποθάλαμο, 5) την αμυγδαλή (van Groen et al, 1990).



Εικόνα 2: Στοιβαδωτή δομή εγκάρσια τομής του ιπποκάμπειου σχηματισμού εμποτισμένη με τη χρώση Nissl. Λόγω της συγκεκριμένης μεθόδου χρώσεως διακρίνεται η πυραμιδική στοιβάδα που περιέχει τα κυτταρικά σώματα των νευρώνων του ιπποκάμπου ([Http://www.synapses.mcg.edu/anatomy](http://www.synapses.mcg.edu/anatomy)).

Όσον αφορά τον ιππόκαμπο, σε μια εγκάρσια τομή του εντοπίζονται οι ακόλουθες στοιβάδες: α) η σκάφη μία μικρού εύρους στοιβάδα που διατρέχεται από εισερχόμενες και εξερχόμενες αξονικές ίνες, β) η στοιβάδα των πολυμόρφων κυττάρων στην οποία βρίσκονται οι βασικοί δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων του ιπποκάμπου γ) η πυραμιδική στοιβάδα, που περιλαμβάνει τα κυτταρικά σώματα των πυραμιδοειδών νευρώνων, δ) η ακτινωτή και ε) η βοθριώδη-μοριακή στοιβάδα, οι οποίες περικλείουν τμήματα κορυφαίων δενδριτών των πυραμιδοειδών κυττάρων (τους εγγύς και τους άπω κορυφαίους δενδρίτες, αντίστοιχα).

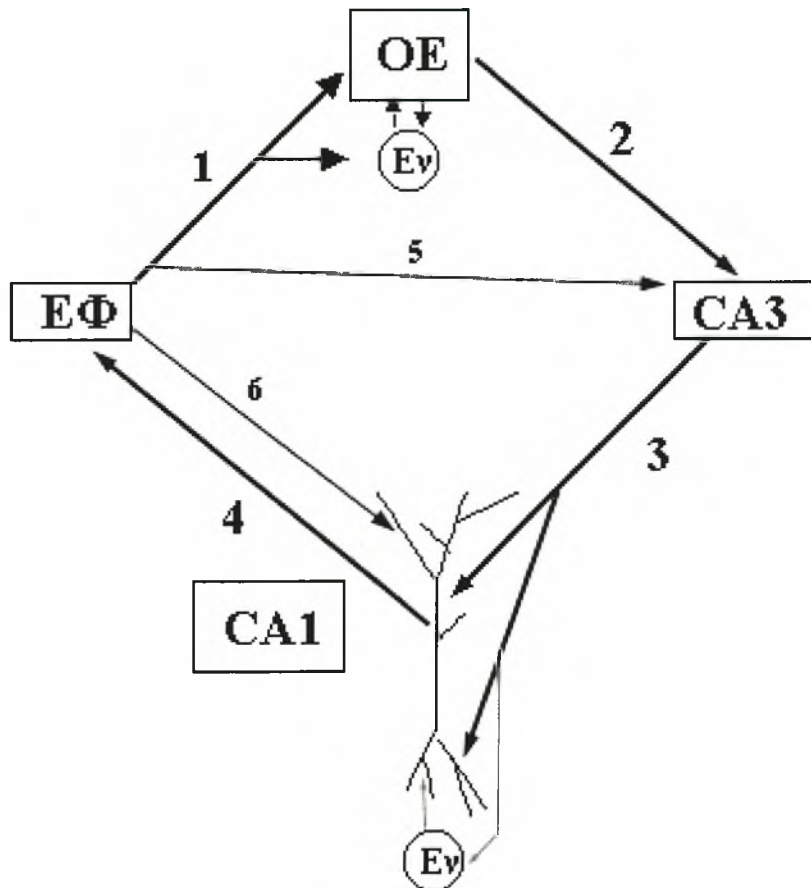
Επιπλέον, η πυραμιδική στοιβάδα διακρίνεται σε τρεις υποπεριοχές, τις CA1, CA2, και CA3. Μάλιστα, οι υποπεριοχές αυτές αποτελούνται από πυραμιδοειδείς νευρώνες με διαφορετική

για κάθε περιοχή ηλεκτροφυσιολογική συμπεριφορά (Masukawa et al., 1982). Συγκεκριμένα, οι πυραμιδοειδείς νευρώνες της περιοχής CA1b απαντούν σε εισερχόμενα ερεθίσματα μόνο με επαναλαμβανόμενες εκφορτίσεις, ενώ αντίθετα, οι νευρώνες των περιοχών CA1a και CA1c μπορούν να απαντήσουν και με ριπές (Masukawa et al., 1982). Είναι επιπλέον σημαντικό να αναφερθεί ότι το 10% των νευρώνων της πυραμιδικής στοιβάδας είναι καλαθοειδή κύτταρα (basket cells), των οποίων η ηλεκτροφυσιολογική δραστηριότητα διαφέρει από αυτή των πυραμιδοειδών νευρώνων (Buhl et al, 1994; Buhl et al, 1996).

Όσον αφορά τη συνδεσμολογία του τοπικού δικτύου του ιπποκάμπου, που έχει επικρατήσει να αναφέρεται ως τρισυναπτικό κύκλωμα, αυτό απεικονίζεται στο σχήμα 1. Συγκεκριμένα, νευρώνες της στοιβάδας II του ενδορινικού φλοιού χορηγούν άξονες που σχηματίζουν την οδό των διατιτρινουσών ιών, η οποία διατρέχει το υπόθεμα και τερματίζει τόσο σε νευρώνες της οδοντωτής έλικας όσο και σε νευρώνες της περιοχής CA3. Επιπλέον, από τα κύτταρα της οδοντωτής έλικας άγονται άξονες που σχηματίζουν την οδό των βρυωδών ιών και νευρώνουν κύτταρα της CA3 περιοχής. Τα κύτταρα της CA3 περιοχής χορηγούν τους άξονες της οδού Schaffer που καταλήγουν να νευρώνουν τα πυραμιδοειδή κύτταρα της CA1 περιοχής. Τέλος τα κύτταρα της CA1 νευρώνουν κύτταρα του υποθέματος και των εν τω βάθει στοιβάδων του ενδορινικού φλοιού. Το κύκλωμα ολοκληρώνεται με τη σύνδεση των κυττάρων των εν τω βάθει στοιβάδων του ενδορινικού φλοιού με τις επιφανειακές στοιβάδες (Shepherd et al, 1998).

Η περισσότερο μελετημένη και ευρέως αποδεκτή λειτουργία του ιπποκάμπου εντοπίζεται στις διαδικασίες της μνήμης και μάθησης (Eichenbaum, 1994). Είναι πλέον αποδεδειγμένο ότι η καταστροφή συγκεκριμένων περιοχών του εγκεφάλου έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση ενός αμνησιακού συνδρόμου που χαρακτηρίζεται από έλλειψη ικανότητας του ασθενούς να διατηρεί μνήμη των καθημερινών γεγονότων. Είναι χαρακτηριστικό το περιστατικό του ασθενούς H.M, ο οποίος υποβλήθηκε σε εγχείρηση αφαίρεσης του ιπποκάμπου σχηματισμού και των περιβαλλόντων ιστών, εξαιτίας των επαναλαμβανομένων κρίσεων επιληψίας από τις οποίες υπέφερε (Scoville and Milner, 1957). Από την ημέρα της εγχείρησης του και μετά ο ασθενής παρότι διατηρούσε μνήμη γεγονότων του παρελθόντος υπέφερε από αμνησία, όσον αφορά τις εμπειρίες της καθημερινότητας του. Δε μπορούσε δηλαδή να μετατρέψει πληροφορίες του παρόντος σε μακροχρόνια μνήμη. Είναι πλέον σαφές ότι το συγκεκριμένο αμνησιακό σύνδρομο οφείλεται στην απόσπαση του ιπποκάμπου σχηματισμού (Zola-Morgan et al., 1986). Όσον αφορά τον ιπποκάμπο κατώτερων θηλαστικών, όπως του αρουραίου, η λειτουργία του επικεντρώνεται στη

δημιουργία χωριακής μνήμης (Nadel, 1991). Μάλιστα, όταν το ζώο βρίσκεται σε συγκεκριμένη κάθε φορά περιοχή του χώρου δράσης του, τότε συγκεκριμένα κύτταρα του ιπποκάμπου ενεργοποιούνται προκαλώντας δυναμικά ενέργειας (Okeefe et al., 1978).



**Σχήμα 1:** Το τρισυναπτικό κύκλωμα. Οι έντονες γραμμές αναπαριστούν της κύριες οδούς αγωγής των νευρικών σημάτων. 1) Οδός διατιτρινουσών ινών, 2) Οδός των βρυωδών ινών, 3) Άξονες από τον ενδορινικό φλοιό (EP) που προβάλλουν σε πυραμιδικά κύτταρα της CA3, 4) Άξονες από τον ενδορινικό φλοιό (EP) που προβάλλουν σε πυραμιδικά κύτταρα της CA1, 5) Άξονες της CA1 προς τον EP, Ev: ενδονευρώνες, Βκ: Βρυώδη κύτταρα της οδοντωτής έλικας.

Τέτοιου είδους έρευνες συνέβαλαν στη δημιουργία της άποψης ότι ο ιππόκαμπος λειτουργεί στα ζώα αυτά σαν ένας γνωστικός χάρτης του περιβάλλοντος. Είναι τέλος πολύ σημαντική η αποδεδειγμένη αυξημένη διεγερσιμότητα του ιπποκάμπου, αφού θεωρείται ως μια από τις δομές του εγκεφάλου με πολύ χαμηλό ουδό διέγερσης (Green, 1964), καθώς και ο κεντρικός ρόλος που του αποδίδεται σε παθολογικές διεργασίες όπως επιληψία και

σχιζοφρένεια (Moser et al., 1993; Heckers and Konradi, 2002).

#### **1.4 Χρησιμότητα μελέτης της κυτοαρχιτεκτονικής των νευρώνων.**

Ο χαρακτηρισμός της δομής και των ηλεκτροφυσιολογικών ιδιοτήτων των νευρώνων είναι απαραίτητος για την κατανόηση του τρόπου που ο μεμονωμένος νευρώνας συμβάλλει στην ολοκλήρωση πληροφοριών που επεξεργάζεται ένα νευρωνικό δίκτυο. Η αρχιτεκτονική δομή ενός νευρώνα είναι σημαντική για ποικίλους λόγους, αφού: αποτελεί το μέσο διεκπεραίωσης και ολοκλήρωσης των ηλεκτρικών σημάτων του νευρώνα, μπορεί να επηρεάσει το βαθμό και την έκταση της ολοκλήρωσης εισερχομένων πληροφοριών, και στη συνέχεια να συμβάλλει στη τροποποίησή τους. Είναι λοιπόν ιδιαίτερα σημαντικό να κατανοήσουμε σε βάθος την ηλεκτροτονική τους αρχιτεκτονική και τις επιπτώσεις της στη νευρωνική λειτουργία (Rainnie et al., 1993; Shepherd et al., 1989).

#### **1.5 Επίπεδα οργάνωσης συναπτικών κυκλωμάτων.**

Προκειμένου να γίνει περισσότερο αντιληπτή η σημασία της μελέτης της κυτοαρχιτεκτονικής των νευρώνων είναι απαραίτητο να διασαφισθεί ο τρόπος οργάνωσης των συναπτικών κυκλωμάτων. Με μια πρώτη ματιά μπορεί να φαίνεται ότι η σύνδεση νευρώνων μέσω συνάψεων δημιουργεί κυκλώματα τα οποία ρυθμίζουν τη συμπεριφορά, ωστόσο η οργάνωση είναι πολύ περισσότερο πολύπλοκη. Όπως αναφέρθηκε η δομή που είναι απαραίτητη για το σχηματισμό συνδέσεων μεταξύ νευρώνων είναι η σύναψη. Το αμέσως επόμενο επίπεδο οργάνωσης που αφορά την επικοινωνία που αναπτύσσεται μεταξύ μικρού αριθμού εγγύς ευρισκομένων συνάψεων είναι τα μικροκυκλώματα. Τα μικρότερα μικροκυκλώματα έχουν μέγεθος της τάξης των  $\mu\text{m}$  και η μεγαλύτερη ταχύτητα λειτουργίας τους μετράται σε msec (Shepherd, 1978). Τα ανωτέρω ομαδοποιούνται προκειμένου να σχηματιστούν οι δενδριτικές υπομονάδες (Shepherd, 1972b). Οι διάφορες δενδριτικές υπομονάδες σχηματίζουν το επόμενο επίπεδο οργάνωσης, δηλαδή το νευρωνικό δένδρο. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των νευρώνων συνιστούν τα τοπικά κυκλώματα (Rakic, 1976) που είναι εκείνα τα οποία επιτελούν τις λειτουργίες που είναι χαρακτηριστικές μίας συγκεκριμένης περιοχής του εγκεφάλου. Το αμέσως επόμενο επίπεδο οργάνωσης είναι τα διατμηματικά κυκλώματα, δηλαδή κυκλώματα που συνδέουν λειτουργικά γειτονικές ή

περισσότερο απομακρυσμένες περιοχές του εγκεφάλου. Όλες οι περιοχές του εγκεφάλου συνδεόμενες καθορίζουν διαφόρους τύπους συμπεριφοράς.

Τύποι συμπεριφοράς
Διατμηματικά κυκλώματα
Τοπικά κυκλώματα
Νευρώνες
Δενδριτικές υπομονάδες
Μικροκυκλώματα
Συνάψεις

**Σχεδιάγραμμα 1:** Επίπεδα οργάνωσης συναπτικών κυκλωμάτων.

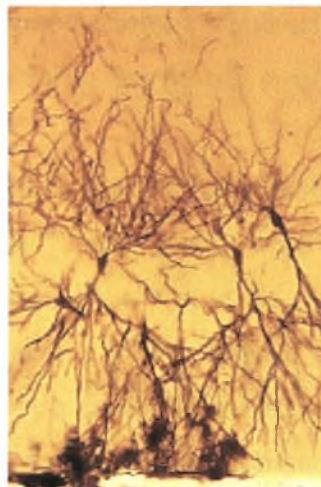
## 1.6 Ιστολογικές Μέθοδοι Χρώσης για τη μελέτη νευρώνων του Κ.Ν.Σ.

Ακολουθεί πίνακας με τις περισσότερο διαδεδομένες μεθόδους χρώσης που εφαρμόστηκαν ή συνεχίζουν να εφαρμόζονται για τη μελέτη του Κ.Ν.Σ., μερικές εκ των οποίων περιγράφονται αναλυτικότερα στη συνέχεια.

Μέθοδος χρώσης ή εμποτισμού.	Χρησιμοποιούμενα Αντιδραστήρια.	Δομές του νευρικού ιστού που εντοπίζονται.	Δυνατότητα συνδυασμού με άλλες μεθόδους χρώσεως.
Nissl	Βασικές χρωστικές, π.χ: cresyl violet, methylene blue, thionine.	Πυρήνας νευρικών κυττάρων, σωματία Nissl.	Δυνατότητα συνδυασμού με τη μέθοδο της μυελίνης.
Golgi	Νιτρώδης άργυρος	Περίγραμμα περιορισμένου αριθμού κυττάρων (σώμα-δενδρίτες-άξονας).	Καμία.
Myelin	Haematoxylin, Luxol blue.	Το μυελώδες έλυτρο.	Δυνατότητα συνδυασμού με τη μέθοδο Nissl.
Neuroglia	Άλας ανθρακικού αργύρου.	Αστροκύτταρα, Ολιγοδενδροκύτταρα, Μικρογλοία.	Καμία
Frink-Heimer	Αναγμένος Νιτρώδης άργυρος.	Άξονες κυττάρων που έχουν υποστεί εκφυλισμό τύπου Wallerian.	Καμία.

### 1.6.1 Μέθοδος Golgi.

Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι η πιο γνωστή μέθοδος χρώσης στο χώρο των νευροεπιστημών (εικόνα 3). Η διαδικασία Golgi επιτρέπει τη λεπτομερή οπτικοποίηση ολόκληρου του νευρώνα και αποτελείται από δύο στάδια: αρχικά, ο ιστός μονιμοποιείται με τη χρήση διαλύματος που περιέχει διχρωμιούχο κάλιο. Στη συνέχεια, εμβαπτίζεται σε διάλυμα νιτρώδους αργύρου. Κύτταρα που εμποτίζονται με τον παραπάνω τρόπο αποκτούν σκουρόχρωμη όψη σε αντίθεση με τον υπόλοιπο ιστό που βάφεται σε πορτοκαλί φόντο. Για λόγους που μέχρι σήμερα παραμένουν άγνωστοι, η συγκεκριμένη μέθοδος χρώσης επιτρέπει την οπτικοποίηση και κατά συνέπεια τη μελέτη περιορισμένων μόνο νευρώνων του ιστού και όχι το σύνολο τους (Looij et al., 1997).



Εικόνα 3: Νευρώνες ιπποκάμπου εμποτισμένοι με τη χρώση Golgi. Αυθεντική φωτογραφία από δείγμα που εκτίθεται στο εργαστήριο του Golgi, Πανεπιστήμιο της Πάβια (<http://www.neurostructural.org>).

### 1.6.2 Μέθοδος Nissl.

Η μέθοδος Nissl πήρε το όνομα της από το Γερμανό νευρολόγο Franz Nissl. Θεωρείται ως η πιο κλασσική μέθοδος οπτικής μικροσκοπίας για την μελέτη των κυτταρικών σωμάτων των νευρώνων και παρότι χρησιμοποιήθηκε πριν από περισσότερο από 100 χρόνια συνεχίζει να χρησιμοποιείται ευρέως. Η οπτικοποίηση των κυτταρικών σωμάτων βασίζεται στη χρώση με τη χρησιμοποίηση βασικών ανιλινικών χρωστικών όπως η ουσία cresyl violet (εικόνα 2). Με τη τεχνική αυτή επιτυγχάνεται η εξειδικευμένη χρώση του κυτταρικού πυρήνα

και των βασεόφιλων σωματίων Nissl. Τα σωματία Nissl, που σήμερα πλέον γνωρίζουμε ότι αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις αδρού ενδοπλασματικού δικτύου, εντοπίζονται στα κυτταρικά σώματα και στους εγγύς δενδρίτες, αλλά απουσιάζουν πλήρως από τις υπόλοιπες δομές του νευρώνα. Υπάρχουν πολλές παραλλαγές της αρχικής χρώσης Nissl οι οποίες χρησιμοποιούνται για αποτίμηση ενδεχόμενης παθολογίας ιστών.

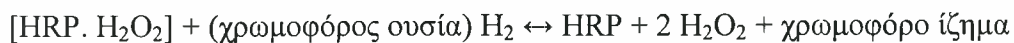
### 1.6.3 Μέθοδος HRP.

Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της εξάπλωσης νευραξόνων προκειμένου να προσδιορισθεί η νευρώση διαφόρων πυρήνων του εγκεφάλου. Η ευρεία χρησιμοποίησή της οφείλεται στο γεγονός ότι είναι σύντομη, αρκετά εύκολη στη εφαρμογή της, δεν απαιτείται η χρησιμοποίηση εξειδικευμένων συσκευών, η διαδικασία οπτικοποίησης στηρίζεται σε μία απλή ιστοχημική αντίδραση και το αποτέλεσμα είναι αρκετά σταθερό.

Συγκεκριμένα, το ένζυμο Horse Radish Peroxidase (HRP) (MB 44Kd) εκχυλίζεται από το φυτό *Cochlearia armoracia* L, και χρησιμοποιείται είτε αυτούσιο, χωρίς καμία τροποποίηση, είτε συζευγμένο με λεκτίνες (πχ: η ουσία αγκλουτινίνη από φύτρο σιταριού) (Broadwell et al., 1984; Gonatas et al., 1979). Τόσο η HRP όσο και τα παράγωγα της μεταφέρονται τόσο κατά τη διεύθυνση διάδοσης των νευρικών ερεθισμάτων (ορθόδρομα) όσο και κατά την αντίθετη κατεύθυνση (ανάδρομα) (Kristensson et al., 1971; La vail et al., 1974). Η μεταφορά κατά την ανάδρομη πορεία γίνεται με τη διαμεσολάβηση μικρών κυστιδίων τα οποία τελικά ενσωματώνονται σε κενοτόπια που ομοιάζουν με λυσοσώματα, αλλά και στη συσκευή Golgi των νευρικών κυττάρων. Τα κυστίδια αυτά εύκολα συγχωνεύονται διευκολύνοντας έτσι την καλύτερη οπτικοποίηση των νευρώνων (Broadwell et al., 1980; Joseph et al., 1978). Αντίθετα, τα κυστίδια με τα οποία η HRP μεταφέρεται κατά την ορθή κατεύθυνση διαφέρουν ως προς τις μεμβρανικές τους ιδιότητες από τα κυστίδια μεταφοράς προς την ανάδρομη κατεύθυνση με αποτέλεσμα η σύντηξη τους να μην είναι ιδιαίτερα εντοπισμένη και να απαιτούνται εξειδικευμένες μέθοδοι οπτικοποίησης (Gu et al, 1992; Holstege, 1987). Προκειμένου να επιτευχθεί η οπτικοποίηση της μεταφερθείσας HRP χρησιμοποιείται η παρακάτω αντίδραση:







Οι χρωμοφόρες ουσίες που χρησιμοποιούνται ευρέως είναι η DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) και η TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine).

#### **1.6.4 Μέθοδοι χρώσης εκφυλισμένων νευρικών κυττάρων.**

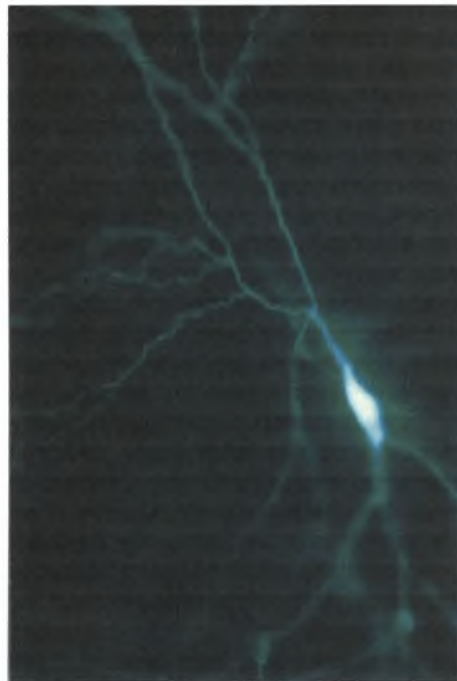
Για ένα αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα η έρευνα στο χώρο της νευροανατομίας είχε επικεντρωθεί στη μελέτη παθολογικών μεταβολών του Κ.Ν.Σ. μετά από πρόκληση τραύματος. Άξονες νευρώνων οι οποίοι αποσυνδέθηκαν από το κυτταρικό σώμα ή των οποίων το κυτταρικό σώμα είχε καταστραφεί υφίστανται μία σταδιακή αποδιοργάνωση η οποία είναι γνωστή ως εκφυλισμός Wallerian. Από τη στιγμή που βρέθηκε ότι άξονες που υπόκεινται σε τέτοιο εκφυλισμό είναι δυνατό να υποβληθούν σε επιλεκτική χρώση με διάφορα άλατα αργύρου, οι συγκεκριμένες τεχνικές προκλητού εκφυλισμού και χρώσεως αποτέλεσαν ένα ιδιαίτερα σημαντικό εργαλείο στον ερευνητικό χώρο της νευροανατομίας (<http://wberesford.hsc.wvu.edu/histolch10.htm>). Εντούτοις, οι έρευνες με τη χρήση προκλητών βλαβών των νευρώνων παρουσιάζουν αρκετά μειονεκτήματα όσον αφορά την εφαρμογή και ερμηνεία τους. Καταρχήν, όταν η βλάβη προκληθεί δεν είναι εύκολο να περιοριστεί σε κάποια ιδιαίτερα εντοπισμένη περιοχή. Αντίθετα, προκαλούνται τραυματισμοί και σε νευρώνες εκτός της περιοχής άμεσου ενδιαφέροντος. Εκτός αυτού, δεδομένου ότι ο τραυματισμός και ο επακόλουθος εκφυλισμός μεταβάλλει τη φυσιολογική μορφολογία των νευρώνων και την κυτταρική οργάνωση ολόκληρης της περιβάλλουσας περιοχής καθίσταται δύσκολη η προσπάθεια συσχέτισμού της μορφολογίας των εκφυλισμένων νευρώνων με αυτή των φυσιολογικών.

### **1.7 Ιστοχημικές μέθοδοι χρώσης – Ενδοκυττάρια έγχυση ουσιών.**

#### **1.7.1 Χρώση με φθορίζουσες ουσίες.**

Εκτός από τη βιοκυτίνη και την HRP η Lucifer Yellow (LY) είναι μια ακόμη ουσία που χρησιμοποιήθηκε εκτεταμένα για την ενδοκυττάρια σήμανση νευρώνων (Higure et al., 2003; Valiante et al., 1995). Η LY είναι μία φθορίζουσα χρωστική η οποία προκύπτει από τη χημική ένωση λουσιφερίνη, που έχει εντοπιστεί σε ποικίλους φθορίζοντες οργανισμούς, και

δε μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη. Η συγκεκριμένη χρωστική όταν διεγερθεί με τη χρήση οπτικής ακτινοβολίας συγκεκριμένου μήκους κύματος φθορίζει εκπέμποντας φως έντονου πράσινου χρώματος. Από τη στιγμή που θα ιοντοφορησθεί στο εσωτερικό του κυττάρου, μετά τη λήξη της ηλεκτροφυσιολογικής μελέτης του, η LY θα διαχυθεί σε ολόκληρο τον ενδοκυττάριο χώρο. Κατά συνέπεια με τη χρήση πηγής φωτός, οπτικών φίλτρων και κατάλληλου μικροσκοπίου (μικροσκόπιο φθορισμού) παρέχεται η δυνατότητα της άμεσης οπτικοποίησης του νευρώνα. Επιπλέον είναι δυνατή και η εκ των υστέρων οπτικοποίηση των νευρώνων, σε μονιμοποιημένες τομές, προκειμένου αυτές να μελετηθούν εκτενέστερα.



Εικόνα 5. Νευρώνας αμυγδαλοειδούς πυρήνα εμποτισμένο με φθορίζουσα χρωστική Lucifer Yellow.

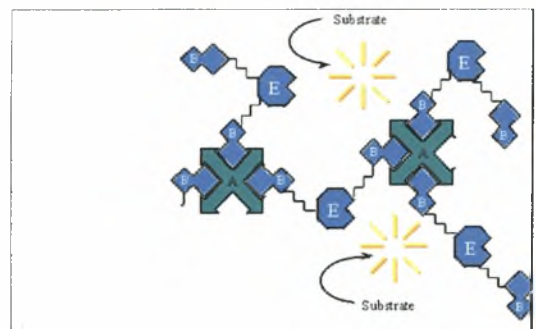
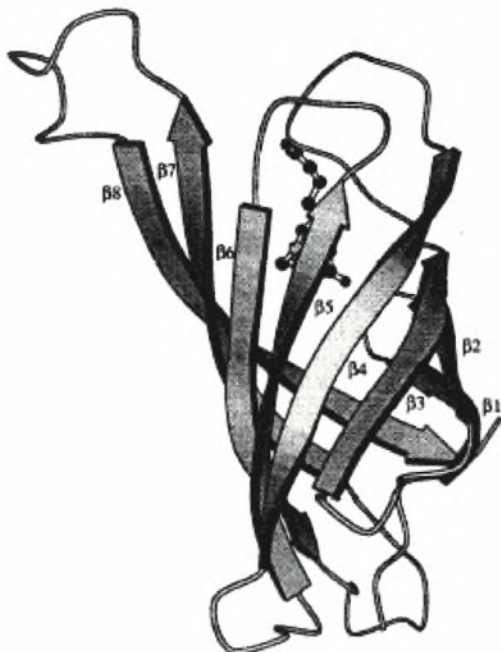
### 1.7.2 Μέθοδος χρώσης με Βιοκυτίνη.

Η συγκεκριμένη μέθοδος επιτρέπει την οπτικοποίηση νευρώνων, οι οποίοι είχαν προηγουμένως μελετηθεί ηλεκτροφυσιολογικά (Horikawa and Armstrong, 1988). Το μικρό μοριακό βάρος της βιοκυτίνης δεν επηρεάζει σημαντικά την αντίσταση των ηλεκτροδίων καταγραφής και επομένως δεν παρεμποδίζει την ενδοκυττάρια καταγραφή. Συγκεκριμένα, γίνεται ενδοκυττάρια ιοντοφόρηση του μορίου της βιοκυτίνης (βιοτίνη-λυσίνη) και αφού

ολοκληρωθεί η ηλεκτροφυσιολογική μελέτη του κυττάρου, ο ιστός μονιμοποιείται και αντιδρά με ένα σύμπλοκο αβιδίνης και βιοτίνης-υπεροξειδάσης. Η αβιδίνη (68,000 MW) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που περιέχεται στο ασπράδι των αυγών και εμφανίζει τον υψηλότερο βαθμό συγγένειας ( $10^{15}M^{-1}$ ) που έχει βρεθεί μέχρι στιγμής στη φύση μεταξύ συνδέτη (ligand) και πρωτεΐνης όσον αφορά την σύνδεση της με τη βιταμίνη βιοτίνη. Το μόριο της αβιδίνης είναι ένα τεταρτομερές μόριο του οποίου κάθε μονομερές (εικόνα 4) σχηματίζει μια εντελώς εξειδικευμένη θέση σύνδεσης με ένα μόριο βιοτίνης ή οποιασδήποτε βιοτυνιλωμένης πρωτεΐνης αντίστοιχα (Livnah et al., 1993). Η αναλογία των συστατικών του συμπλόκου είναι τέτοια που να διατηρείται πάντα μία ελεύθερη θέση στο μόριο της αβιδίνης για την επιλεκτική πρόσδεση ενός μορίου βιοτίνης, όπως αυτό που περιέχεται στο μόριο της βιοκυτίνης, με το οποίο είχε προηγουμένως σημειωθεί ο νευρώνας. Στη συνέχεια, για την οπτικοποίηση του νευρώνα προστίθεται μία χρωμογόνος ένωση μαζί με υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η χρωμογόνος ένωση οξειδώνεται από υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) με την καταλυτική δράση της δεσμευμένης υπεροξειδάσης στα μόρια της βιοτίνης του συμπλόκου και παράγεται ένα αδιάλυτο, καφέ χρώματος και ηλεκτρονικώς πυκνό ίζημα.

A.

B.



**Εικόνα 4:** Α. Απεικόνιση της δομής του μονομερούς του μορίου της αβιδίνης. Β. Αναπαράσταση του τρόπου σύνδεσης του τεταρμερούς μορίου της αβιδίνης με το μικρού μοριακού βάρους μόριο της βιοτίνης στο σύμπλοκο ABC.

### **1.7.3 Μέθοδος χρώσης τομών πάχους 500μm.**

Η τεχνική αυτή έχει δημοσιευθεί πρόσφατα και χρησιμοποιεί τις ήδη υπάρχουσες ουσίες ενδοκυττάριας σήμανσης νευρώνων καθώς και τις ευρέως εφαρμοσμένες τεχνικές χρώσης. Η καινοτομία της στηρίζεται στην οπτικοποίηση νευρώνων σε τομές πάχους 500μm. Τέτοιο πάχος τομής θεωρούνταν μέχρι σήμερα περιοριστικό για τη λεπτομερή μορφολογική μελέτη νευρώνων λόγω της ιδιαίτερα χαμηλής οπτικής ευκρίνειας των οπτικοποιημένων νευρώνων. Η τεχνική αυτή παρουσιάζει συγκεκριμένα πλεονεκτήματα και θεωρήθηκε ότι η εξοικοίωση με αυτή και η υιοθέτηση της από το εργαστήριο Φαρμακολογίας θα συνέβαλε στην προώθηση της αποτελεσματικότητας του ερευνητικού έργου του εργαστηρίου.

## 1.8 Σκοπός.

Παρά την επιτυχή ενδοκυττάρια ιοντοφόριση της βιοκυτίνης σε νευρώνες του ιπποκάμπου που πραγματοποιείται στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας, η πτωχή ιστολογική ανάπτυξη των τομών δεν επέτρεψε μέχρι σήμερα τη λεπτομερή ανάλυση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των νευρώνων που έχουν χρωσθεί με βιοκυτίνη. Επομένως, **στόχος της μελέτης** είναι η βελτιστοποίηση της υπάρχουσας ιστολογικής μεθόδου ή/και ανάπτυξη νέας ιστολογικής επεξεργασίας των τομών με σκοπό τη δυνατότητα αναπαραγωγής και μορφομετρικής ανάλυσης των νευρώνων της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου αρουραίου.

## 2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Η συλλογή των πειραματικών δεδομένων συνίσταται στην προετοιμασία των τομών για ενδοκυττάρια καταγραφή *in vitro*, την έγχυση βιοκυτίνης στο εσωτερικό των νευρώνων του ιπποκάμπου, και τέλος την ιστοχημική επεξεργασία τομών του εγκεφάλου του πειραματοζώου. Αναλυτικά οι μεθοδολογίες που χρησιμοποιήθηκαν έχουν ως εξής:

**Προετοιμασία των τομών του εγκεφάλου:** Τα πειραματόζωα αναισθητοποιούνται με χορήγηση αιθέρα και εν συνεχεία το ζώο αποκεφαλίζεται, ο εγκέφαλος αφαιρείται από το κρανίο τοποθετείται σε κρύο τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό (TENY) σύστασης (σε mM) : 124 NaCl; 4 KCl; 2 MgSO<sub>4</sub>; 2 CaCl; 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 26 NaHCO<sub>3</sub>; 10 γλυκόζη σε pH 7.4, που συνεχώς οξυγονώνεται με 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>. Κατόπιν, αφαιρείται ο ιπποκάμπος σχηματισμός, και των δύο ημισφαιρίων, από τις περιβάλλουσες δομές και εν συνεχεία με τη βοήθεια μικροτόμου ετοιμάζονται εγκάρσιες τομές, τόσο από τη ραχιαία όσο και από την κοιλιακή μοίρα, πάχους 500 μm. Οι τομές τοποθετούνται στο λουτρό καταγραφής όπου επωάζονται σε ατμόσφαιρα κορεσμένη σε O<sub>2</sub> και θερμοκρασία 33°C για τουλάχιστον 1h, ενώ διαβρέχονται συνεχώς από οξυγονωμένο TENY.

**Ενδοκυττάρια καταγραφές:** Μετά την επώαση πραγματοποιούνται ηλεκτροφυσιολογικές ενδοκυττάρια καταγραφές με γυάλινες μικροπιπέττες που περιέχουν διάλυμα 2M οξείκου καλίου και 2% βιοκυτίνης, αντίστασης 80-120 MΩ. Η αντίσταση των ηλεκτροδίων θα έπρεπε να είναι όσο το δυνατό μικρότερη ώστε να μην επηρεάζονται οι ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές και ταυτόχρονα να επιτυγχάνεται η μέγιστη δυνατή έγχυση βιοκυτίνης στο νευρώνα. Η καταγραφή γίνεται από νευρώνες της CA1 περιοχής της πυραμιδικής στοιβάδας του ιπποκάμπου. Για την καταγραφή των αποκρίσεων των κυττάρων χρησιμοποιείται ο ενισχυτής Axoclamp 2B (Axon Instruments) και το πρόγραμμα πρόσληψης και ανάλυσης δεδομένων pCLAMP 5.03 (Axon Instruments). Τα πειραματικά αποτελέσματα αποθηκεύονται με τη μορφή αναλογικού σήματος σε κασέτες ενός καταγραφέα εικόνας-ήχου (DTR 1204 digital tape recorder) και σε χαρτί με τη χρησιμοποίηση ενός καταγραφικού χάρτου (Astromed, DASH IV, Model XL).

## Ιστολογία:

Μετά την ολοκλήρωση της καταγραφής των ηλεκτροφυσιολογικών ιδιοτήτων των νευρώνων ακολουθεί ενδοκυτταρική ιοντοφόρηση βιοκυτίνης με χορήγηση παλμών καθοδικού ρεύματος για περίπου σαράντα (40) λεπτά (συνεχές υπερπολωτικό ρεύμα πλάτους, 0,5 nA, σε συνδυασμό με παροδικό ρεύμα ορθογώνιου παλμού πλάτους 0,5 nA και διάρκειας 1 sec). Οι τομές παραμένουν στο καταγραφικό λουτρό για 30-60 λεπτά περαιτέρω προκειμένου η βιοκυτίνη να διαχυθεί ως τους πιο απομακρισμένους δενδρίτες. Για την παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν μονιμοποιημένες τομές.

### A) Πρωτόκολλο χρώσης τομής πάχους 80μm.

- Οι τομές τοποθετούνται για 24 ώρες σε 4° C σε γυάλινα τρυβλία Petri σε διάλυμα 4% παραφορμαλδεΐδης σε 0,1 M φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (PBS, pH 7,2). Η μονιμοποίηση είναι απαραίτητη για την αποτροπή ενζυμικών ή οποιουδήποτε άλλου είδους αλλαγών που ενδεχομένως να αλλοιώσουν τη δομή του ιστού.
- Από τις αρχικές τομές προετοιμάζονται με τη βοήθεια μικροτόμου λεπτότερες τομές πάχους 80 μm.
- Οι τομές επωάζονται σε ατομικά ιστολογικά πηγαδάκια σε διάλυμα 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (12') για την εξουδετέρωση της δράσης της ενδογενούς υπεροξειδάσης και την αφαίρεση των μη ειδικών ενεργών συστατικών του περιβάλλοντος της τομής.
- Ακολουθεί ημίωρη επώαση των τομών ανά 10' σε διάλυμα 0,4% Triton X-100 PBS για την αύξηση της διαπερατότητας του ιστού και την απομάκρυνση της περίσσειας του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Οι τομές επωάζονται, για 3 ώρες σε ανακινούμενο δίσκο, με το σύστημα αβιδίνης-βιοτίνης (avidin-biotin-horseradish peroxidase, ABC kit Standard, Vector Labs., Vectastain) σε διάλυμα 0,4% Triton X-100 PBS.
- Στη συνέχεια ξεπλένονται αλληπάλληλα με 0,4% Triton X-100 PBS (3 φορές για 10' έκαστη) και γίνεται οπτικοποίηση των νευρώνων με ειδική αντίδραση σε διάλυμα 0,03% υπεροξειδίου και 0,1% τετραχλωρο-διαμινοβενζιδίνη (DAB, Fluka chemicals) διαλύματος Tris (pH 7,2), για 3-6 min.

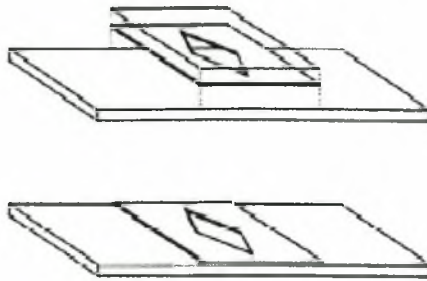
- Οι τομές τοποθετούνται σε επιζελατινωμένες αντικειμενοφόρες πλάκες και τις αφήνουμε να στεγνώσουν για 24 ώρες.
- Ακολουθεί εμποτισμός με ξυλένιο, προκειμένου να απομακρυνθούν τα λιπίδια του ιστού.
- Τελικώς, οι τομές καλύπτονται με καλυπτρίδες χρησιμοποιώντας το σταθεροποιητή DPX.

#### B) Πρωτόκολλο χρώσης τομής πάχους 500μm.

- Οι τομές τοποθετούνται για 24 ώρες σε 4° C σε γυάλινα τρυβλία Petri σε διάλυμα 4% παραφορμαλδεϋδης σε 0,1 M φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (PBS, pH 7,2).
- Κατόπιν οι τομές ξεπλένονται τρεις φορές, από 5' την καθεμία, σε 200 μl διαλύματος 0.1M PBS.
- Η καταστολή της δραστηριότητας της ενδογενούς υπεροξειδάσης επιτυγχάνεται μετά από επώαση των τομών σε 1ml διαλύματος 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε 70% μεθανόλη για 30 min.
- Για να αυξηθεί η διαπερατότητα των μεμβρανών οι τομές επωάζονται σε διάλυμα 0.3% triton X-100, 0.1M PBS, (pH 7.5), για χρονικό διάστημα 2h.
- Στη συνέχεια οι τομές επωάζονται στο διάλυμα αβιδίνης-βιοτίνης (avidin-biotin-horseradish peroxidase, ABC kit Standard, Vector Labs., Vectastain) ολονύχτια, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Την επόμενη ημέρα οι τομές ξεπλένονται: αρχικά υφίστανται πέντε πλύσεις, από τρία λεπτά έκαστη, στη συνέχεια μία για 30 min, ακολούθως έξι πλύσεις, από 1h έκαστη, και μία τελευταία καθόλη τη διάρκεια της νύχτας.
- Την τελευταία ημέρα της διαδικασίας οι τομές επωάζονται σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris (TBS, pH 7.6) από τρεις φορές για 10' την κάθε μια και στη συνέχεια χρησιμοποιείται διάλυμα διαμινοβενζιδίνης (DAB Fluka chemicals, 0.5 mg/ml), 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για την ανάπτυξη της χρώσης.

Λόγω του πάχους της τομής παρουσιάστηκε πρόβλημα στη διαδικασία κάλυψης της μετά την τοποθέτηση σε γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε ειδικό πλαστικό κάλυμμα, στο οποίο είχαμε προηγουμένως διανοίξει οπή εντός της οποίας τοποθετήθηκε ο ιστός (εικόνα 5α). Ακολούθως τοποθετήθηκε γυάλινη καλυπτρίδα η οποία με τη βοήθεια ακριλικής κόλλας σφράγισε το άνοιγμα (εικόνα 5β).





Εικόνα 6. Διαδικασία καθήλωσης τομής πάχους 500µm. Τοποθέτηση πλαστικού επικαλύμματος και γυάλινης καλυπτρίδας (πάνω). Σταθεροποίηση της κατασκευής με χρήση ειδικής κόλλας (κάτω).

### **Ψηφιακή φωτογράφιση**

Χρησιμοποιήθηκε ο ακόλουθος εξοπλισμός:

- Φωτογραφική μηχανή και κάμερα Sony Exwave HAD model no SSC-DC58AP στο εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του ΠΓΝΛ και Sony Hyper HAD στο εργαστήριο Ανατομικής του τμήματος Κτηνιατρικής του Α.Π.Θ.
- Μικροσκόπιο Zeiss Axiolab τεσσάρων φακών Zeiss Achroplan.
- 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 σημαντική για τη δημιουργία αρχείου που θα επιτρέψει την παρατήρηση των κυττάρων χωρίς τον κίνδυνο φθοράς ή θραύσης του πρωτότυπου παρασκευάσματος εξαιτίας της συνεχούς χρήσης.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η προβληματική ιστολογική ανάπτυξη των τομών δεν επέτρεψε μέχρι σήμερα τη λεπτομερή ανάλυση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των νευρώνων που έχουν χρωσθεί με βιοκυτίνη. Ως εκ τούτου, στο πρωτόκολλο χρώσης τομών πάχους 80 μm κρίθηκαν απαραίτητες σημαντικές τροποποιήσεις.

Η **πρώτη** ουσιαστική τροποποίηση της μεθόδου έγκειται στην προετοιμασία τομών πάχους 80 μm από μια αρχική τομή πάχους 500 μm (από την οποία είχε προηγηθεί ηλεκτροφυσιολογική μελέτη των νευρώνων).

Συγκεκριμένα, προκειμένου να κοπεί η αρχική εγκάρσια τομή του ιπποκάμπου τοποθετούνταν σε χάλκινο δακτύλιο ο οποίος γέμιζε με διάλυμα αγαρόζης 2%. Το διάλυμα της αγαρόζης στερεοποιούνταν, σε θερμοκρασία δωματίου, και μετά την απομάκρυνση του χάλκινου περιβλήματος προέκυπτε ένας συμπαγής κύλινδρος αγαρόζης, στο εσωτερικό του οποίου βρισκόταν εγκλεισμένη, σε οριζόντια θέση, η τομή. Ο κύλινδρος τοποθετούνταν με κόλλα πάνω σε ειδική βάση μηχανήματος κοπής τομών (vibroslice). Ωστόσο, με τη συγκεκριμένη μέθοδο οι τομές που λαμβάνονταν ήταν μεγαλύτερου πάχους από το επιθυμητό (με αποτέλεσμα με τη χρήση του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου η οπτικοποίηση των νευρώνων να είναι προβληματική). Επιπλέον συχνά προέκυπταν τομές που ήταν ανισοϋψείς εκατέρωθεν και καθιστούσαν τη συνέχιση της λήψης των τομών ιδιαίτερα δύσκολη.

Λόγω των παραπάνω δυσκολιών αναπτύχθηκε μια νέα τεχνική, χωρίς τη χρήση αγαρόζης, με την οποία έγινε δυνατή η απρόσκοπτη λήψη διαδοχικών τομών του επιθυμητού πάχους. Σύμφωνα με αυτή τη τεχνική ο αρχικός ιστός (πάχους περίπου 500 μm) σταθεροποιούνταν με κόλλα κατευθείαν πάνω στην έδρα κατάτμησης των τομών του μικροτόμου. Η τεχνική αυτή βελτίωσε την κοπή των τομών και διευκόλυνε σημαντικά την περαιτέρω ιστολογική διαδικασία. Το μειονέκτημα της τεχνικής αυτής έγκειται στο γεγονός ότι σημαντικό μέρος του νευρώνα (σώμα, δενδρίτες) θα μπορούσε να βρίσκεται στο κατώτατο τμήμα της τομής (δηλαδή στην επιφάνεια του ιστού που έρχεται σε επαφή με τη βάση) με κίνδυνο να μην ανακτηθεί.

Η **δεύτερη** σημαντική τροποποίηση της μεθόδου έγκειται στην προετοιμασία των αντικειμενοφόρων με στόχο το σωστό καθαρισμό τους. Συγκεκριμένα:

1. χρησιμοποιούνται ατρόχιστες αντικειμενοφόροι (Marienfeld) τοποθετημένες σε ειδικά γυάλινα δοχεία (Borel) κατά τρόπο ώστε να είναι κατακόρυφες και παράλληλες μεταξύ τους.
2. Οι υποδοχείς βυθίζονται εν συνεχεία σε διάλυμα αιθυλικής αλκοόλης 70% με προσθήκη 2ml CH<sub>3</sub>COOH όπου παραμένουν για μισή ώρα. Η προσθήκη της αιθυλικής αλκοόλης και CH<sub>3</sub>COOH συντελεί στον πλήρη καθαρισμό των αντικειμενοφόρων από λίπη ή εξωτερικούς παράγοντες π.χ. σκόνη.
3. Επακολουθεί πλύση των αντικειμενοφόρων για μισή ώρα σε τρεχούμενο νερό βρύσης για να καθαριστούν από την αλκοόλη και η εμβάπτιση τους σε απεσταγμένο H<sub>2</sub>O (τουλάχιστον δύο φορές) ώστε να απομακρυνθούν τα άλατα του νερού της βρύσης.
4. Κατόπιν, οι αντικειμενοφόρες τινάζονται με δύναμη προκειμένου να απομακρυνθούν τα υπολείμματα νερού και τοποθετούνται σε κλίβανο στους 65 °C για 2h για να στεγνώσουν.
5. Ακολουθεί εμβάπτισή τους σε διάλυμα ζελατίνης, το οποίο παρασκευάζεται με την προθήκη 5g ζελατίνης σε 500ml απεσταγμένου νερού σε θερμοκρασία 50 °C.
6. Οι αντικειμενοφόρες τινάζονται με δύναμη για την αποτροπή δημιουργίας σταγόνων διαλύματος στην επιφάνειά τους και επανατοποθετούνται σε κλίβανο μέχρι να στεγνώσουν. Οι αντικειμενοφόρες οι οποίες δεν χρησιμοποιούνται άμεσα φυλάσσονται στον κλίβανο στους 37 °C τυλιγμένες σε αλουμινόχαρτο.
7. Εν συνεχεία με τη βοήθεια ενός πινέλου οι τομές μεταφέρονται πάνω στην επιξελατινωμένη αντικειμενοφόρο και τοποθετούνται σε κλίβανο στους 37 °C για 24h μέχρι να στεγνώσουν.

Η **τρίτη** κρίσιμη τροποποίηση έγκειται στην αφυδάτωση των τομών:

1. Η αφυδάτωση έγινε με διαδοχικές εμβάπτισεις των αντικειμενοφόρων πλακών σε διαλύματα αιθυλικής αλκοόλης 25%, 50%, 70%, 95% και δύο φορές σε 100% αντίστοιχα, για 3-5 min.
2. Επακολούθησε τοποθέτησή τους σε ξυλόλη δύο φορές για 3-5 min σε δύο διαφορετικά Borel προκειμένου να απομακρυνθούν τα λιπίδια του ιστού και κατόπιν σκουπίστηκαν ελαφρά.

3. Στη συνέχεια προστέθηκαν 2-3 σταγόνες σταθεροποιητή DPX, ο οποίος παραλήφθηκε από τον περιέκτη του με τη χρήση γυάλινης πιπέτας για την αποφυγή δημιουργίας φυσαλίδων.
4. Τέλος, τοποθετήθηκε καλυπτρίδα και οι αντικειμενοφόρες διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, για μισή ώρα περίπου, για να στεγνώσουν έτσι ώστε να είναι έτοιμες για μικροσκοπική παρατήρηση.

Η διαδικασία της προετοιμασίας των αντικειμενοφόρων πλακών και της αφυδάτωσης των τομών του ιπποκάμπου πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακολογίας της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με τεχνογνωσία που μεταφέρθηκε από το εργαστήριο Ανατομικής της Κτηνιατρικής σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

Οι τρεις αυτές τροποποιήσεις αποδείχθηκαν και οι πλέον σημαντικές για την επίτευξη των στόχων της μελέτης και εφαρμόστηκαν στις δύο παρακάτω κατηγορίες τομών: Α. επεξεργασία εγκλεισμένων τομών και Β. επεξεργασία νέων τομών. Σε όλες τις τομές που υπέστησαν επεξεργασία στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν αντικειμενοφόρες πλάκες οι οποίες προετοιμάσθηκαν σύμφωνα με την τροποποιημένη μέθοδο που ήδη αναφέρθηκε.

#### **A. Επεξεργασία εγκλεισμένων τομών.**

Η βελτιστοποίηση της ιστολογικής μεθόδου εφαρμόστηκε αρχικά, σύμφωνα με τις παραπάνω τροποποιήσεις, σε ήδη υπάρχουσες (εγκλεισμένες) τομές του εργαστηρίου Φαρμακολογίας. Δεν χρησιμοποιήθηκαν τομές που προέκυψαν από νέες ενδοκυττάρια καταγραφές για τους παρακάτω λόγους: πρώτον, η εγγενής δυσκολία των ενδοκυττάρια ηλεκτροφυσιολογικών καταγραφών καθιστά ιδιαίτερα πολύτιμες τις τομές από τις οποίες πραγματοποιούνται οι καταγραφές και επομένως δεν είναι επιθυμητή η εξ αρχής εφαρμογή των τροποποιήσεων της μεθόδου στις τομές αυτές σε περίπτωση ενδεχόμενης αποτυχίας. Δεύτερον, οι ήδη εγκλεισμένες τομές ήταν ιδιαίτερα περιορισμένης οπτικής ευκρίνειας και επομένως ενδεχόμενη αποτυχία της μεθόδου δεν θα επέφερε περαιτέρω αρνητικές επιπτώσεις στη μορφολογία του κυττάρου.

Στις εγκλεισμένες τομές εφαρμόστηκαν μόνο οι δύο τελευταίες τροποποιήσεις, καθώς στις τομές αυτές είχε ήδη εφαρμοσθεί το υπάρχον πρωτόκολλο κοπής. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

- αρχικά οι τομές τοποθετήθηκαν μέσα σε Borel το οποίο εμπεριείχε ξυλόλη για 48h έτσι ώστε να απομακρυνθούν οι καλυπτρίδες.

- Στην συνέχεια για την ενυδάτωση των τομών έγινε η εμβάπτιση τους διαδοχικά για 3-5min σε διάλυματα αλκοόλης περιεκτικότητας 100%, 95%, σε 70%, και 50%.
- Επακολούθησε η εμβάπτιση τους σε απεσταγμένο H<sub>2</sub>O για 5min σε δυο διαφορετικά Borel.

Κατόπιν μεταφέρονται σε νέα επιζελατινωμένη αντικειμενοφόρο και στην συνέχεια ακολουθεί η αφυδάτωση των τομών με τον τρόπο τον οποίο προαναφέρθηκε.

Στις εικόνες 7-17 εμφανίζονται πυραμιδικοί νευρώνες ιπποκάμπου που οπτικοποιήθηκαν με τη μέθοδο χρώσης με βιοκυτίνη. Είναι έκδηλη η βελτίωση του οπτικού αποτελέσματος μετά την επεξεργασία που υπέστησαν οι τομές (κάτω φωτογραφία) σε σύγκριση με την προηγούμενη τους κατάσταση (πάνω φωτογραφία). Διαφορές στον τρόπο εμφάνισης των φωτογραφιών (φωτεινότητα, χρώμα) πριν και μετά την επεξεργασία τους οφείλονται σε διαφορετικές ρυθμίσεις κατά τη λήψη των φωτογραφιών.

Όπως προκύπτει από αριθμό τομών στίς οποίες παραλήφθηκε το στάδιο της αφυδάτωσης, η επίδραση της στο οπτικό αποτέλεσμα είναι καθοριστική όσον αφορά τη βελτίωση της οπτικής ευκρίνειας των νευρικών κυττάρων.

## **B. Επεξεργασία νέων τομών.**

Κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Φαρμακολογίας νέες ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές οι οποίες περιελάμβαναν ενδοκυττάρια έγχυση βιοκυτίνης. Ωστόσο, ο αριθμός αυτών των καταγραφών ήταν αρκετά περιορισμένος ώστε να μην επιτρέψει παρά μόνο την ιστολογική ανάπτυξη περιορισμένου αριθμού τομών. Στίς νέες αυτές τομές που προέκυψαν ακολουθήθηκαν, σε αντίθεση με την προηγούμενη κατηγορία, όλα τα στάδια μετατροπής που περιγράφηκαν παραπάνω (εικόνα 18).

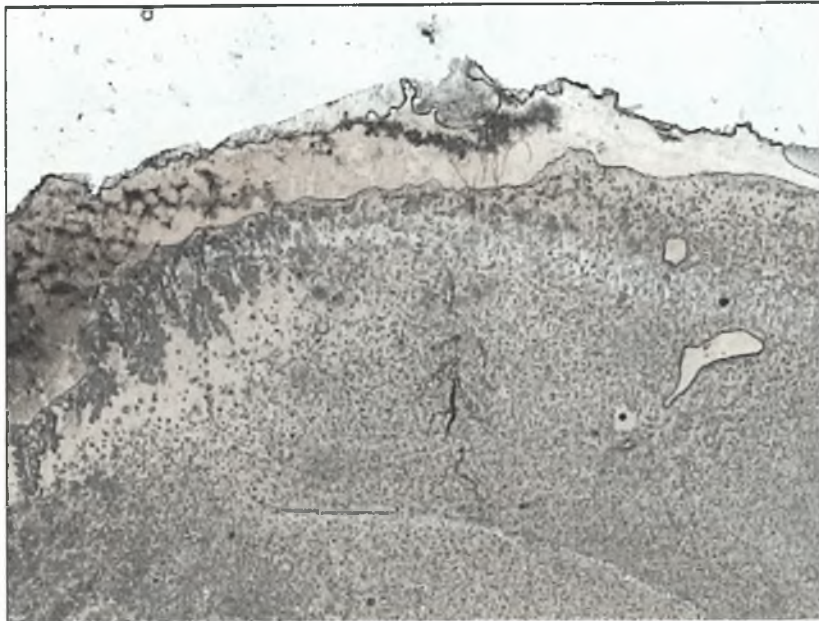
ΚΩΔΙΚΟΣ ΝΕΥΡΩΝΑ	ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ 1	ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ 2	ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ 3
<b>Εγλεισμένες τομές</b>			
101202		√	√
051202		√	√
200203		√	√
041202		√	√
160702		√	√
041202		√	√
130302		√	√
190302		√	√
130203		√	
180702		√	
110702		√	
<b>Νέες τομές</b>			
020304	√	√	√
250204	√	√	√
091103	√	√	√

Τροποποίηση 1: ανάπτυξη νέας μεθοδολογίας κοπής τομών.

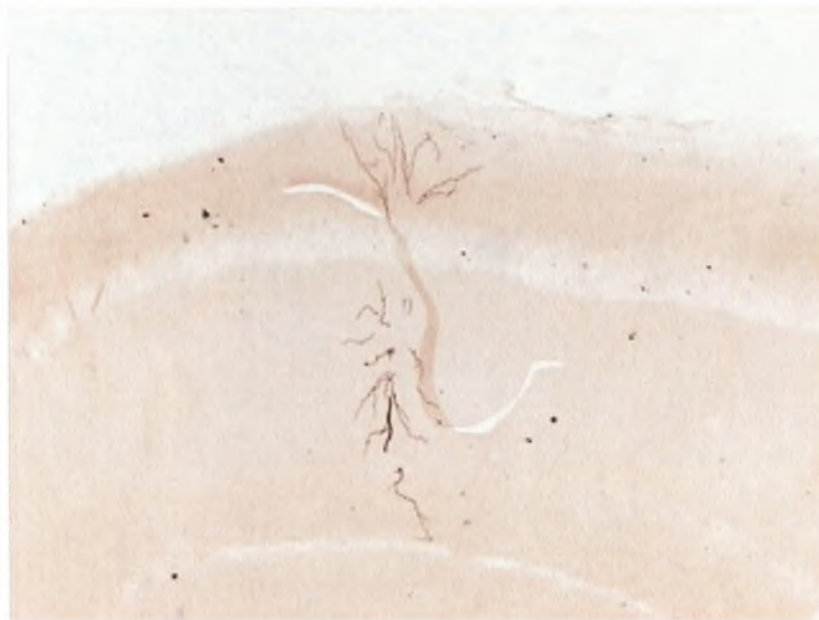
Τροποποίηση 2: προετοιμασία αντικειμενοφόρων πλακών.

Τροποποίηση 3: αφυδάτωση των τομών.

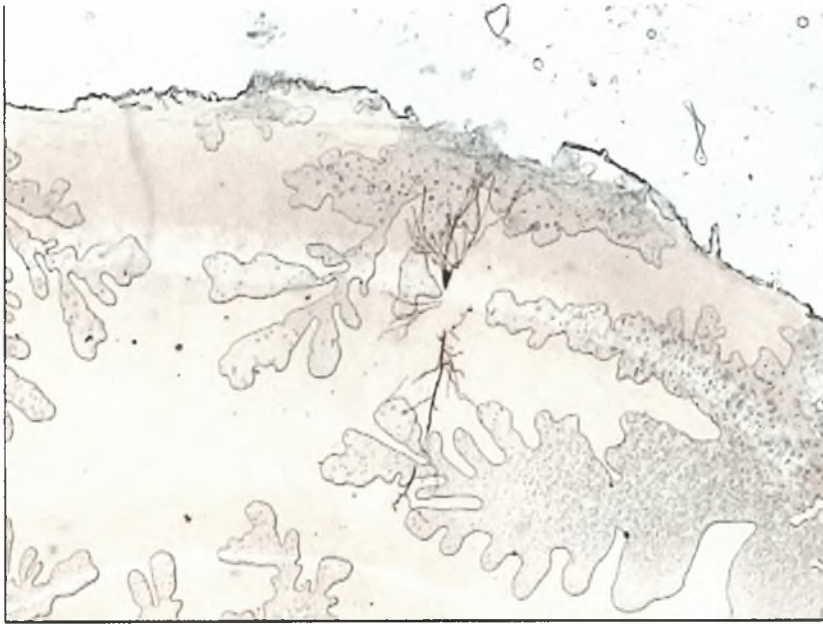
**Πίνακας 1:** Συγκεντρωτικός πίνακας πυραμιδικών νευρώνων οι οποίοι έχουν υποστεί ιστολογική επεξεργασία.



350  $\mu\text{m}$



Εικόνα 7: νευρώνας 05122, τομή 1, μεγένθυση 4X.

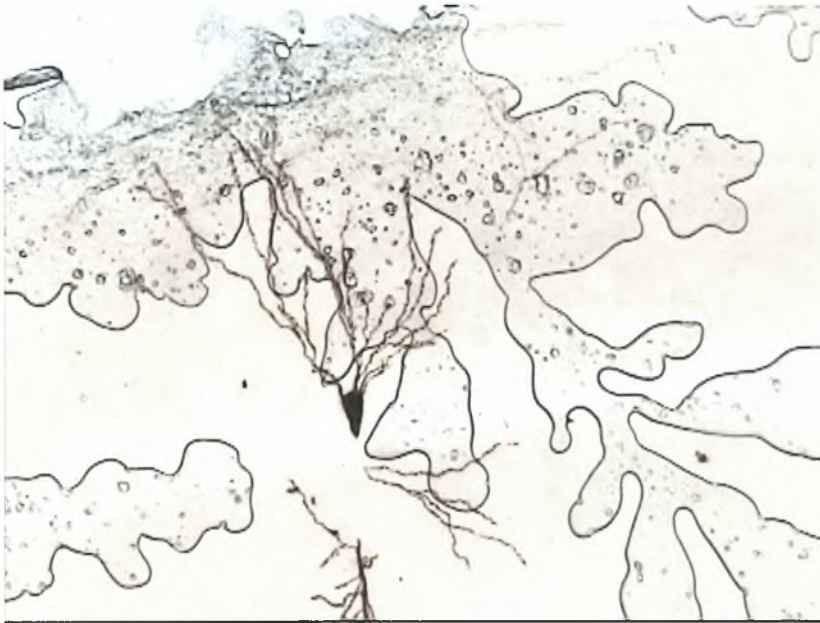


350  $\mu\text{m}$



Εικόνα 8: νευρώνας 05122, τομή 2, μεγένθυση 4X.





140  $\mu\text{m}$

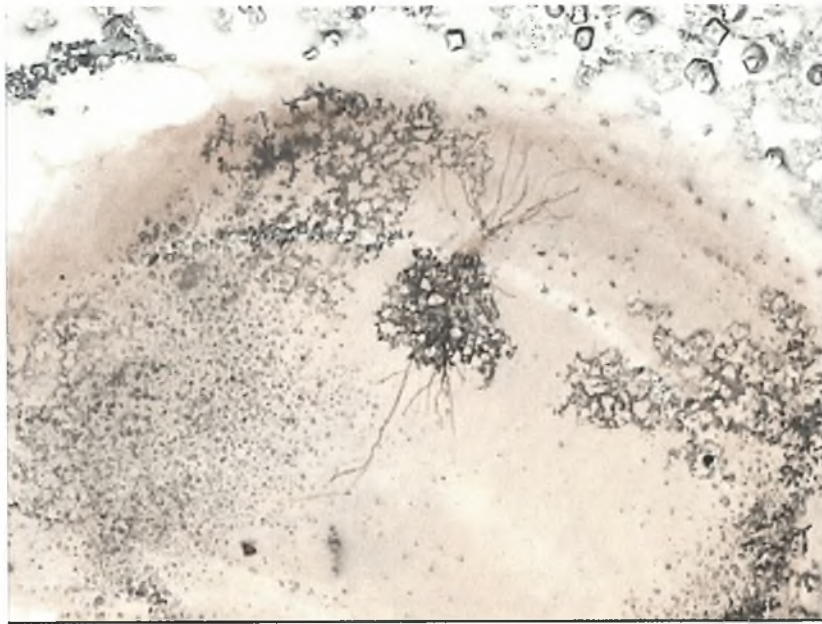


Εικόνα 9: νευρώνας 05122, τομή 2, μεγένθυση 10X.

70  $\mu\text{m}$



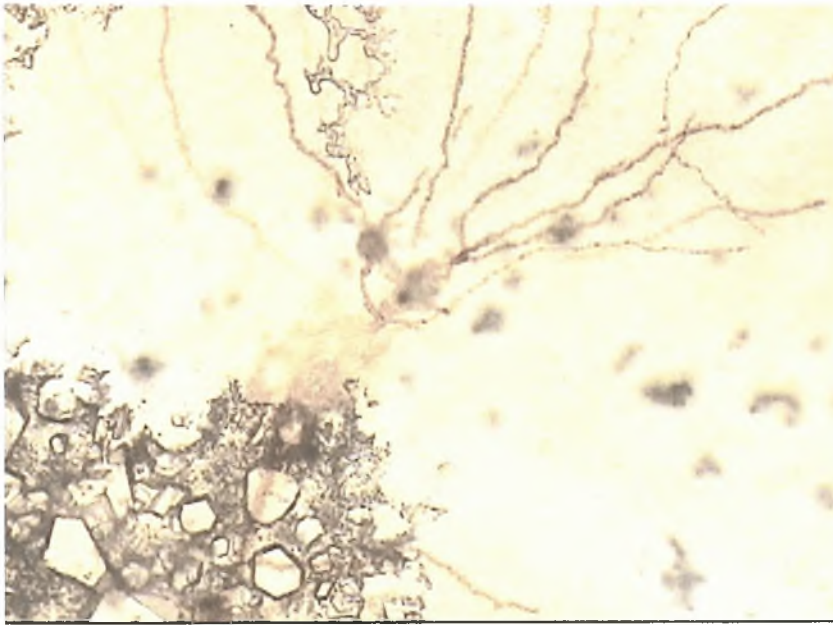
**Εικόνα 10:** νευρώνας 05122, τομή 2, μεγένθυση 20X.



350  $\mu\text{m}$

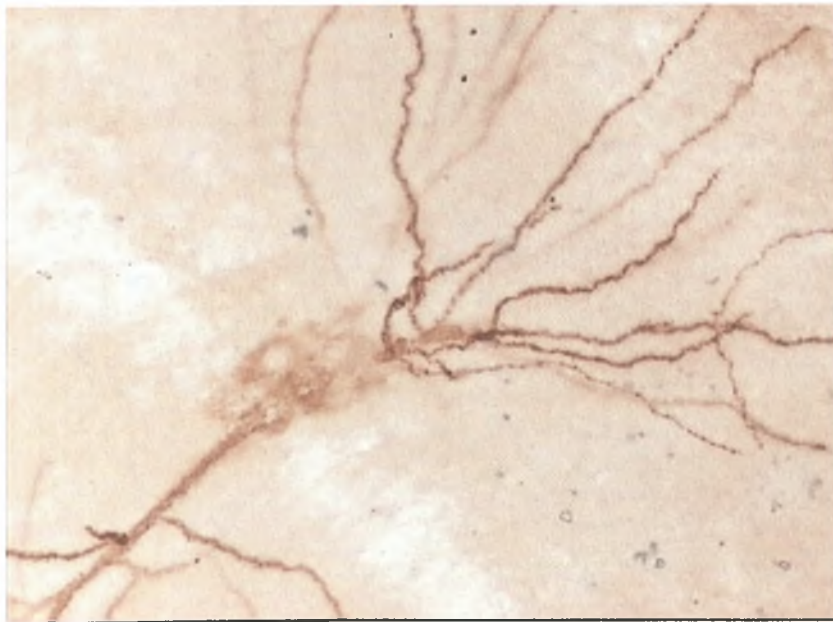


**Εικόνα 11:** νευρώνας 16072, τομή 1, μεγένθυση 4X.

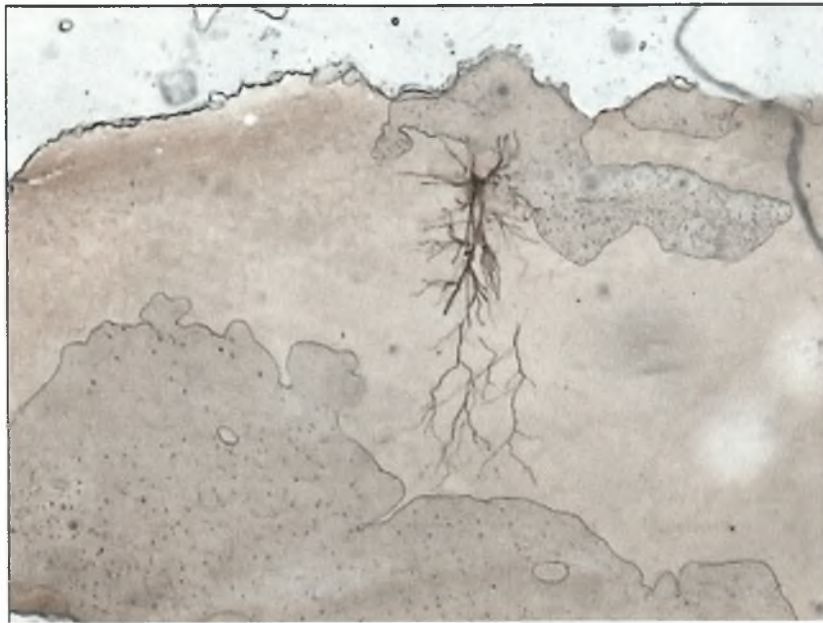


70  $\mu\text{m}$

---



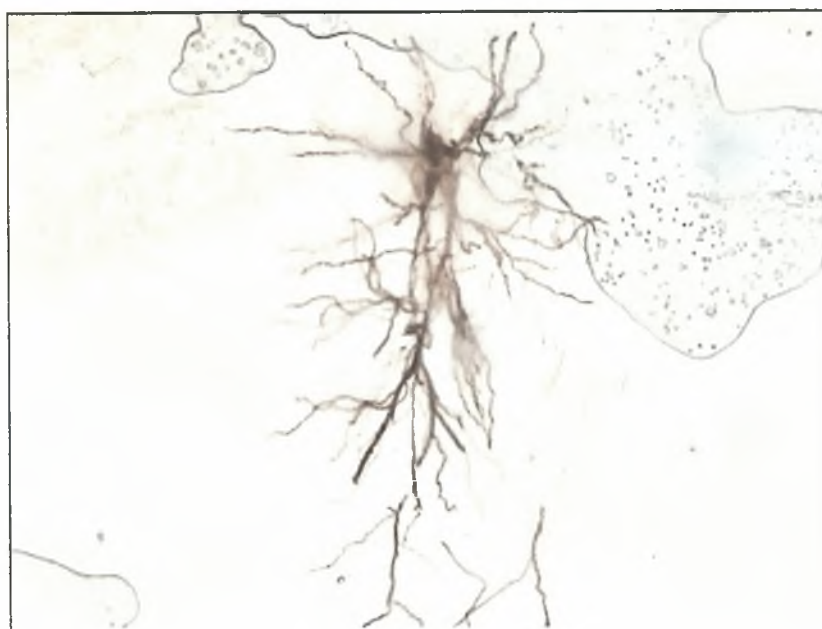
**Εικόνα 12:** νευρώνας 16072, τομή 1, μεγένθυση 20X.



350  $\mu\text{m}$



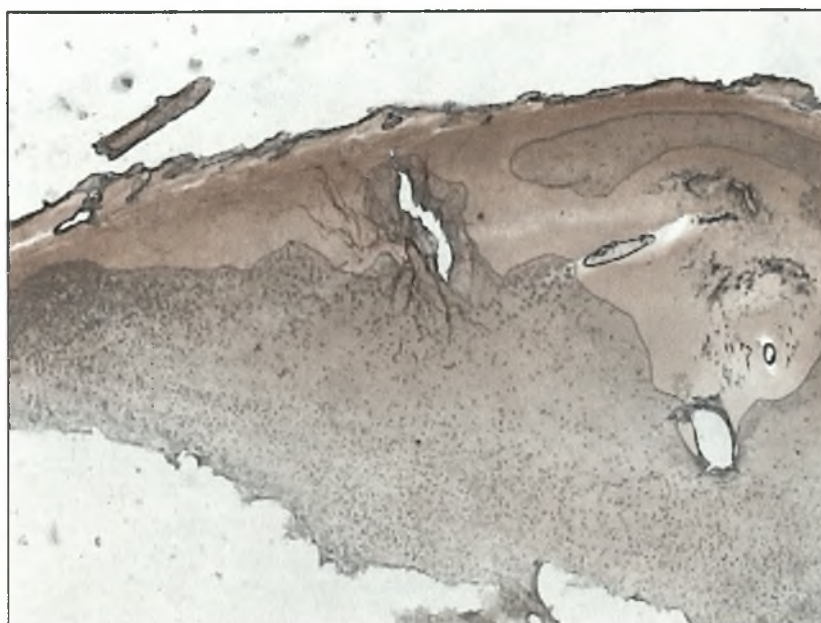
Εικόνα 13: νευρώνας 11072, τομή 1, μεγένθυση 4X.



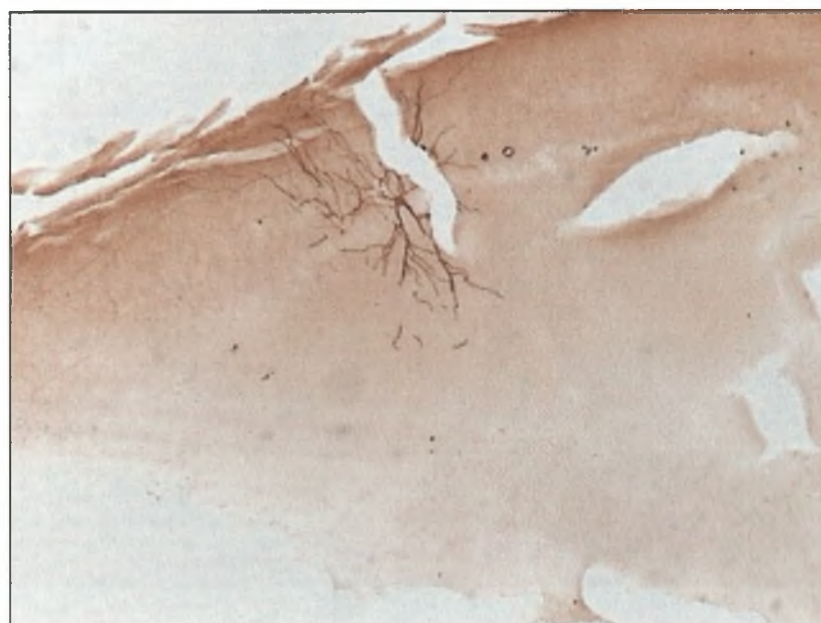
140  $\mu\text{m}$



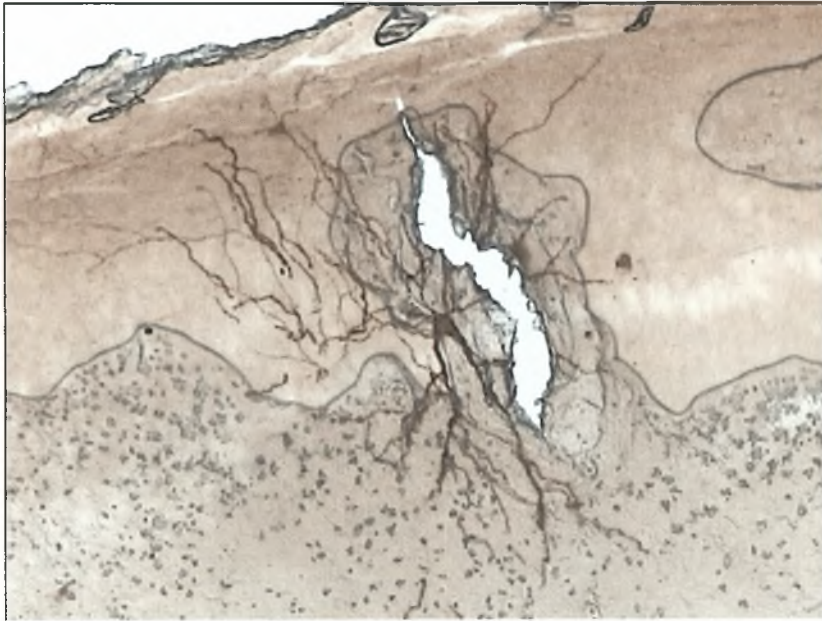
**Εικόνα 14:** νευρώνας 10122, τομή 1, μεγένθυση 10X.



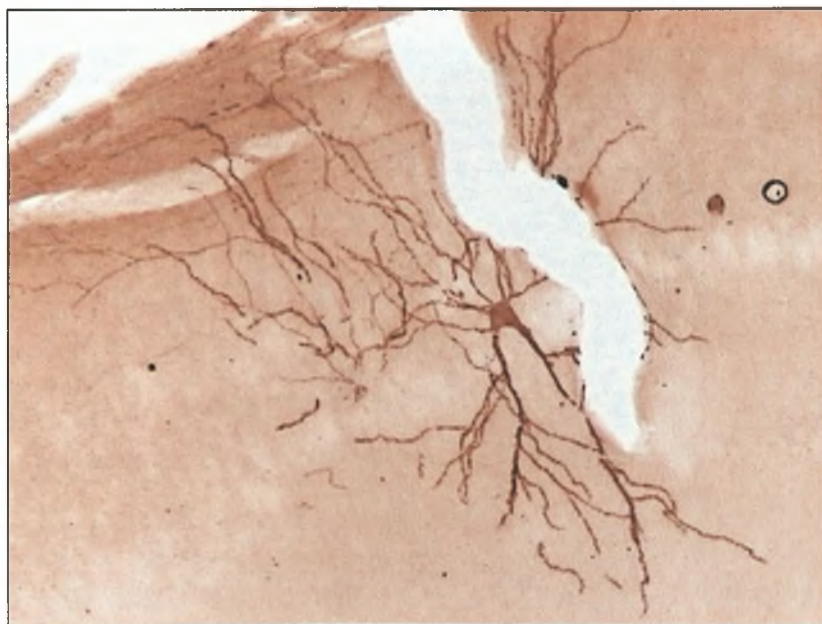
350  $\mu\text{m}$



**Εικόνα 15:** νευρώνας 10122, τομή 2, μεγένθυση 4X.



140  $\mu\text{m}$



**Εικόνα 16:** νευρώνας 10122, τομή 2, μεγένθυση 10X.





350  $\mu\text{m}$



Εικόνα 17: νευρώνας 11072, τομή 2, μεγένθυση 4X.

140  $\mu\text{m}$



**Εικόνα 18:** νευρώνας 020304, τομή 1, μεγένθυση 10X

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αρχικός σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανάγκη να βελτιστοποιηθεί η μέθοδος οπτικοποίησης νευρώνων χρωσμένων με το σύστημα αβιδίνης-βιοτίνης. Η συγκεκριμένη τεχνική χρώσης χρησιμοποιούνταν ήδη στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας χωρίς, ωστόσο, τα αποτελέσματα να είναι τα αναμενόμενα. Τα προβλήματα στην προσπάθεια αυτή εντοπιζόταν κυρίως στην πτωχή ιστολογική ανάπτυξη του ιστού με επακόλουθο τη ποιοτικά μέτρια οπτικοποίηση των νευρώνων και τη χαμηλή ευκρίνεια τους κατά την εξέταση υπό το οπτικό μικροσκόπιο. Στην παρούσα εργασία έγινε τροποποίηση του υπάρχοντος πρωτοκόλλου με την εφαρμογή τριών νέων σταδίων. Τα στάδια αυτά, τα οποία περιλαμβάνουν την ανάπτυξη νέας μεθοδολογίας κοπής τομών, την προετοιμασία των αντικειμενοφόρων πλακών και την αφυδάτωση των τομών, συνετέλεσαν καθοριστικά στη βελτιστοποίηση της ιστολογικής ανάπτυξης των τομών και επιτρέπουν πλέον την απρόσκοπτη ανακατασκευή των νευρώνων και μορφομετρικής τους ανάλυση.

Όσον αφορά στην ιστολογική ανάπτυξη τομών πάχους 500  $\mu\text{m}$ , η συγκεκριμένη τεχνική είναι μια πρόσφατα δημοσιευμένη μέθοδος (Bassam et al., 2003) που παρέχει τη δυνατότητα οπτικοποίησης νευρώνων του εγκεφάλου που προηγουμένως έχουν σημανθεί είτε ανοσοϊστοχημικά είτε με ιοντοφόρηση βιοκυτίνης μετά από ενδοκυττάρια καταγραφές ή καταγραφές με τη μέθοδο patch clamp. Η καινοτομία της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ότι επιτρέπει την οπτικοποίηση των νευρώνων χωρίς να έχει προηγηθεί κατάτμηση του αρχικού ιστού σε λεπτότερες τομές και παρέχει ικανή ευκρίνεια προκειμένου να εξετασθεί η λεπτή δομή ξεχωριστών νευρώνων. Στην παρούσα εργασία η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε σε περιορισμένο αριθμό τομών, ενώ τα αποτελέσματα που προέκυψαν δεν ήταν τα αναμενόμενα. Κρίνεται λοιπόν ότι είναι απαραίτητη η τελειοποίηση της η οποία ωστόσο ξεπερνά τα χρονικά περιθώρια της συγκεκριμένης εργασίας.

Δεδομένης της αξιόπιστης, πλέον, εφαρμογής της συγκεκριμένης τεχνικής κατέστη δυνατή η αναγνώριση και ταυτοποίηση των καταγραφομένων νευρώνων στην πυραμιδική στοιβάδα της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου. Όπως προαναφέρθηκε στο εισαγωγικό μέρος της εργασίας, η πυραμιδική στοιβάδα, περιέχει εκτός από τα κυτταρικά σώματα των πυραμιδοειδών νευρώνων και σώματα ενδονευρώνων τα οποία αποτελούν ποσοστό 10% επί του συνόλου των κυττάρων της στοιβάδας αυτής. Η ταυτοποίηση του καταγραφομένου νευρώνα (ενδονευρώνας-πυραμιδικός νευρώνας) είναι μέγιστης σημασίας καθότι το κάθε είδος νευρώνα χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένα ηλεκτροφυσιολογικά χαρακτηριστικά και

επομένως διαφορετικές λειτουργικές ιδιότητες. Προκειμένου να γίνει σωστή αξιολόγηση των ηλεκτροφυσιολογικών δεδομένων που λαμβάνονται σε κάθε καταγραφή, θα πρέπει να είναι γνωστή η ταυτότητα του νευρώνα από τον οποίο πραγματοποιείται η καταγραφή. Επομένως, η τελειοποίηση της ιστολογικής μεθόδου παρέχει τη δυνατότητα ορθής αξιολόγησης των αποτελεσμάτων, δηλαδή της απόδοσης των εκάστοτε ηλεκτροφυσιολογικών ευρημάτων στους αντίστοιχους μορφολογικά αναγνωρισμένους πλέον νευρώνες.

Επιπρόσθετα, η βελτίωση της συγκεκριμένης τεχνικής, παρέχει τη δυνατότητα συγκριτικής μελέτης και ανάλυσης της ανάπτυξης των δενδριτικών κλάδων και των αξονικών διακλαδώσεων, της πυκνότητας των ακάνθων καθώς και τη μορφολογία των κυτταρικών σωμάτων των νευρώνων (κυτοαρχιτεκτονική). Από αυτή τη διαδικασία αναμένεται να προκύψουν χρήσιμα συμπεράσματα όσον αφορά τη διεγερσιμότητα των νευρώνων του ιπποκάμπου και του τρόπου που οργανώνονται σε νευρωνικά δίκτυα και συμβάλλουν στη διαμόρφωση ηλεκτρικών σημάτων προερχόμενα από άλλες περιοχές του εγκεφάλου. Μετά από σύντομη μελέτη των νευρώνων που οπτικοποιήθηκαν στο πλαίσιο της συγκεκριμένης εργασίας πιστοποιήθηκαν ορισμένα κοινά μορφολογικά χαρακτηριστικά των πυραμιδοειδών νευρώνων της CA1 περιοχής της πυραμιδικής στοιβάδας, όπως: α) η έντονα διακλαδιζόμενη βασική δενδριτική δομή που εκτείνεται σε όλο το εύρος της στοιβάδας των πολύμορφων κυττάρων, β) ο κύριος κορυφαίος δενδρίτης που εκφύεται από το σώμα και συνήθως δεν διακλαδίζεται στο αρχικό του τμήμα, γ) δενδρίτες που εκφύονται από τμήμα του κύριου κορυφαίου δενδρίτη πλησίον της πυραμιδικής στοιβάδας και εκτείνονται σε όλο το εύρος της ακτινωτής στοιβάδας, δ) δενδρίτες που εκφύονται από τμήμα του κύριου κορυφαίου δενδρίτη και διακλαδίζονται στο χώρο που ορίζεται από τη βοθριώδη στοιβάδα. Οι παραπάνω παρατηρήσεις που ταυτίζονται με ευρήματα της ήδη υπάρχουσας βιβλιογραφίας (Amaral et al., 1990; Bannister and Larkman, 1995; Pyapali et al., 1998), υποδεικνύουν τη διαφοροποίηση μεταξύ της μορφολογίας των νευρώνων της CA1 περιοχής της πυραμιδικής στοιβάδας και της μορφολογίας των νευρώνων της γειτνιαζουσας CA3 περιοχής. Οι νευρώνες της τελευταίας αν και έχει βρεθεί ότι είναι μεγαλύτεροι τόσο όσον αφορά τις διαστάσεις του κυτταρικού σώματος όσο και του δενδριτικού μήκους, παρουσιάζουν σημαντικά μικρότερη τάξη διακλάδωσης η οποία φτάνει μέχρι τη 12<sup>η</sup> τάξη, ενώ οι νευρώνες της CA1 περιοχής εμφανίζουν μέχρι 25<sup>η</sup>-30<sup>η</sup> τάξης διακλάδωση. Επιπλέον, παρότι ο συνολικός όγκος που καταλαμβάνουν οι νευρώνες της CA3 είναι μεγαλύτερος, το συνολικό δενδριτικό τους μήκος είναι συγκρίσιμο με αυτό των νευρώνων της CA1 περιοχής (Pyapali et al., 1998). Οι προαναφερθείσες διαφορές σε συνδυασμό με τη διαφορετικότητα όσον αφορά το είδος, τον

αριθμό και την κατανομή ιοντικών διαύλων (ηλεκτροτονική δομή) σε νευρώνες των δύο αυτών περιοχών μπορούν να ερμηνεύσουν τη διαφορετική ηλεκτροφυσιολογική συμπεριφορά που έχει παρατηρηθεί μεταξύ των περιοχών CA1 και CA3. Έτσι, τα κύτταρα της CA1 περιοχής απαντούν στη χορήγηση ενδοκυττάριου τετράγωνου παλμού διέγερσης με επαναλαμβανόμενες εκφορτίσεις, συνήθως, ενώ τα κύτταρα της CA3 με ριπές δυναμικών ενεργείας (Hablitz and Johnston, 1981; Wong and Stuart, 1993).

Η σημασία της μορφομετρικής μελέτης των νευρώνων προκύπτει από μελέτες σύμφωνα με τις οποίες η μορφή και η λειτουργικότητα της δενδριτικής κατασκευής μεταβάλλονται με την ηλικία (Paryali and Terner, 1994, 1996). Παρόμοιες πιο δραστικές αλλαγές παρατηρούνται σε νευρώνες σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Συγκεκριμένα, σε διάφορα πειραματικά μοντέλα επιληψίας, έχουν παρατηρηθεί διάφορες δομικές μεταβολές σε κύτταρα της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου. Η σημαντικότερη και περισσότερο μελετημένη αφορά την ανάπτυξη νέων παράπλευρων αξόνων (axonal sprouting) σε μια σημαντική οδό του τρισυναπτικού κυκλώματος, την οδό των βρυωδών ινών (Scharfman, 2002), ενώ δομικές αλλαγές σε μοντέλα επιληψίας έχουν παρατηρηθεί και σε ενδονευρώνες (Morin et al., 1999). Επιπρόσθετα, έχει παρατηρηθεί ότι το χρόνιο stress μπορεί να προκαλέσει διάφορες μεταβολές σε νευρώνες του ιπποκάμπου όπως ατροφία των κορυφαίων δενδριτών (Magarinos et al., 1995), μεταβολές σε υποκυττάριο επίπεδο (Magarinos et al., 1997), αλλά και γενικευμένη καταστροφή κυττάρων του ιπποκάμπου (Hu et al., 1998).

Παρόμοιες μεταβολές έχουν παρατηρηθεί και σε μελέτες που αφορούν την επιληψία κροταφικού λοβού στον άνθρωπο (Babb et al., 1991). Επιπλέον έρευνες σε κλινικό επίπεδο καταδεικνύουν τη συσχέτιση της ατροφίας, ελάττωσης του όγκου και νέκρωσης κυττάρων του ιπποκάμπου, με την ανάπτυξη διαφόρων ψυχικών διαταραχών (Bremner, 1999).

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία έγιναν οι παρακάτω τροποποιήσεις στο πρωτόκολλο ιστολογικής ανάπτυξης τομών του ιπποκάμπου στις οποίες πραγματοποιήθηκαν ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές και ενδοκυττάρια έγχυση βιοκυτίνης:

1. ανάπτυξη νέας μεθοδολογίας κοπής τομών
2. προετοιμασία αντικειμενοφόρων πλακών
3. αφυδάτωση των τομών

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα οι παραπάνω τροποποιήσεις αποτέλεσαν ουσιαστικές παρεμβάσεις οι οποίες βελτίωσαν σημαντικά την υπάρχουσα ιστολογική μέθοδο και κρίνονται απαραίτητες σε μελέτες που στοχεύουν στην οπτικοποίηση νευρώνων και μορφομετρική τους ανάλυση.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Amaral D.G., Ishizuka N and Claiborne B** (1990). Neurons, numbers and the hippocampal network. In: Progress in Brain Research, Understanding the Brain Through the Hippocampus: The hippocampal region as a Model for Studing Structure and Function (Storm-Mathisen J, Zimmer J and Ottersen O.P. eds.). Amsterdam: Elsevier, pp. 1-11.
2. **Babb T.L., Kupfer W.R., Pretorius J.K., Crandall P.H., Levesque M.F.** (1991). Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata. Neuroscience 42: 351-353.
3. **Bannister N.J. and Larkman A.U.** (1995). Dendritic morphology of CA1 pyramidal neurons from the rat hippocampus: 1. Branching patterns. J. Comp. Neurol. 360: 150-160.
4. **Bassam N, Hamam and Timothy E Kennedy.** (2003). Visualization of the dendritic arbor of neurons in intact 500 $\mu$ m thick brain slices. J. Neurosci. Methods. 123: 61-67.
5. **Bremner J.D.** (1999). Does stress damage the brain? Biol Psychiatry 45: 797-805.
6. **Broadwell R.D., Cataldo A.M., and Balin B.J.** (1984). Further studies of the secretory process in hypothalamoneurohypophyseal neurons. An analysis using immuno-cytochemistry, wheat germ agglutinin-peroxidase and native peroxidase. J. Comp. Neurol 228: 155-167.
7. **Buhl E.H, Halasy K, Somogyi P** (1994). Diverse sources of hippocampal unitary inhibitory postsynaptic potentials and the number of synaptic released sites. Nature 368: 823-828.
8. **Buhl E.H, Szilagyi, Halasy K, Somogyi P** (1996). Physiological properties of anatomically identified basket cells and bistratified cells in the CA1 area of the rat hippocampus in vitro.
9. **Eichenbaum** (1994). The hippocampal system and the declarative memory in humans and animals: Experimental analysis and historical origins. In memory systems (Schacter, D.L. and Tylving, E., eds.) Cambridge, MA: MIT Press, pp. 147-201.
10. **Gonatas N.K., Harper C, Mizutani T, and Gonatas J.O.** (1979). Superior sensitivity of conjugates of horseradish peroxidase with wheat germ agglutinin for studies of retrograde axonal transport. J. Histochem. Cytochem 27: 728-734.
11. **Green J.D.** (1964). The hippocampus. Physiol Rev 44: 561-608.

12. **Gu Y, Chen Y, Ye, L.** (1992). Electron microscopical demonstration of horseradish peroxidase by use of tetramethylbenzidine as chromogen and sodium tungstate as stabilizer (TMB-ST method): a tracing method with high sensitivity and well preserved ultrastructural method. *J. Neurosci. Methods* 42: 1-12.
13. **Hablitz J.J and Johnston D.** (1981). Endogenous nature of spontaneous bursts in hippocampal neurons. *Cell. Moll. Neurobiol.* 1: 325-334.
14. **Heckers S. and Konradi C.** (2002). Hippocampal neurons in schizophrenia. *J. Neural Transm.* 109(5-6), 891-905.
15. **Higure Y, Katayama Y, Takeuchi K, Ohtubo Y and Yoshii K.** (2003). Lucifer Yellow slows voltage-gated Na<sup>+</sup> current inactivation in a light-dependent manner in mice. *J. Physiol.* 550.1:159-167.
16. **Holstege J.C.** (1987). Brainstem projections to lumbar motoneurons in rat. An ultrastructural study by means of the anterograde transport of wheat-germ agglutinin coupled to horseradish peroxidase and using the tetramethyl benzidine reaction. *Neuroscience* 21:368-376.
17. **Horikawa K. and Armstrong W.E.** (1988). A versatile means of intracellular labeling: injection of biocytin and its detection with avidin conjugates. *J. Neurosci. Methods.* 25: 1-11.
18. **Hu W.P., Yan J, Lu C.L., Hua C.L.** (1998). Effect of ciliary neurotrophic factors on behavior and hippocampus neuron in stress rats. *Chin. J. Behav. Med. Sci.* 7: 174-175.
19. **Johnston D, Amaral D.G.** (1998). Hippocampus, In *The Synaptic Organization of the Brain* (Shepherd, G.M) New York, Oxford: Oxford University Press, fourth edition, pp 417-458.
20. **Joseph K.C., Kim S.U., Stieber A, and Gonatas K.** (1978). Endocytosis of cholera toxin into neural GERL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 2815-2819.
21. **Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M.,** (1997). *Νευροεπιστήμη και Συμπεριφορά.* Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
22. **Kristensson K, Olson Y and Sjöstrand J.** (1971). Axonal uptake and retrograde transport of exogenous proteins in hypoglossal nerve. *Brain Res* 32: 399-406.
23. **La Vail J.H., and La Vail M.M.** (1974). The retrograde intraaxonal transport of horseradish peroxidase in the chick visual system: a light and electron microscopy study. *J. Comp. Neurol* 157: 303-358.



24. **Livnah O, Bayer E.A., Wilchek M, Sussman J.L.** (1993). Three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 5076-5080.
25. **Loopuijt D.L., Groenewegen H.J., Wouterlood F.G.** (1997). Injection of dye into neurones in rat and human post-mortem brain, in combination with acetylcholinesterase histochemistry: permanent preparations. *J. Neurosci. Methods* 75: 161-169.
26. **Magarinos A.M., McEwen B.S.** (1995). Stress induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: Comparison of stressors. *Neuroscience* 69: 83-88.
27. **Magarinos A.M., Verdugo J.M., McEwen B.S.** (1997). Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 1402-1408.
28. **Masukawa L.M., Benardo L.S., and Prince D.A.** (1982). Variations in electrophysiological properties of hippocampal neurons in different subfield. *Brain Res.* 242: 341-344.
29. **Moser E., Moser M.B., and Andersen P.** (1993). Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions but is hardly present following ventral lesions. *J. Neurosci.* 13: 3916-3925.
30. **Morin F, Bealieu C, Lacaille J.C.** (1999). Alterations of perisomatic GABA synapses on hippocampal CA1 inhibitory interneurons and pyramidal cells in the kainite model of epilepsy. *Neuroscience* 93: 457-467.
31. **Nadel I.** (with commentaries)(1991). Is the hippocampal formation preferentially involved in spatial behavior? *Hippocampus* 1:221-292.
32. **O'Keefe J and Conway D.H.** (1978). Hippocampal place units in the freely moving rat: why they fire when they fire. *Exp Brain Res* 31: 573-590.
33. **Pyapali G.K. and Turner D.A.** (1994). Denervation-induced alterations in CA1 pyramidal neurons following kainic acid lesions in rats. *Brain. Res.* 652:279-290.
34. **Pyapali G.K. and Turner D.A.** (1996). Increased dendritic extend in hippocampal CA1 pyramidal neurons from aged Fischer 344 rats. *Neurobiol Aging.* 17: 601-611.
35. **Pyapali G.K., Sik A, Penttonen M, Buzsaki G and Turner D.A.** (1998). Dendritic properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons in the rat: intracellular staining in vivo and in vitro. *J. Comp. Neurol.* 391:335-352.

36. **Rainnie D.G., Asprodini E.K., and Shinnick-Gallagher P.** (1993). Intracellular recordings from morphologically identified neurons of the basolateral amygdala. *J. Neurophysiol.* 69: 1350-1362.
37. **Rakic P** (1976). *Local Circuit Neurons*. Cambridge, MA: MIT Press.
38. **Ramon y Cajal, S.** *Recollections of my life 1852-1937*. E.H Craigie (trans). Philadelphia : American Philosophical Society. Republished 1989, Cambridge Mass. MIT Press.
39. **Scharfman H.E.** (2002). Epilepsy as an example of neural plasticity. *Neuroscientist.* 8(2): 154-173.
40. **Shepherd G.M.** (1972b). Synaptic organization of the mammalian olfactory bulb. *Physiol. Rev* 52: 864-917.
41. **Shepherd G.M.** (1978). Microcircuits in the nervous system. *Sci. Am.* 238: 93-103.
42. **Shepherd G.M ., Wolf T.B., and Carnevale N.T.** (1989). Comparisons of active properties of distal dendritic branchew and spines; implications for neuronal computations. *J. Cognit. Neurosci.* 1: 273-286
43. **Shepherd G.M.** (1998). *The Synaptic Organization of the Brain*. 4<sup>th</sup> Edition, Oxford University Press.
44. **Scoville W.B. and Milner, B.** (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Psychiatry* 20: 11-21.
45. **Valiante T.A., Perez Velasquez J.I., Jahromi S.S. and Carlen P.** (1995). Coupling potentials in CA1 neurons during calcium-free-induced field burst activity. *J. Neurosci.* 15: 6946-6956.
46. **Wong R.K.S., and Stewart M.** (1992). Different firing patterns generated in dendrites and somata of CA1 pyramidal neurons in guinea-pig hippocampus. *J. Physiol.* 457: 675-687.
47. **Zola-Morgan S, Squire R.L. and Amaral D.G.** (1986). Human amnesia and the medial temporal region: Enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to gield CA1 of the hippocampus. *J. Neurosci.* 6: 2950-2967.