



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ανοσοϊστοχημική χρώση τομών υποκάμπτου μετά από
ηλεκτροφυσιολογική καταγραφή**

Αλίκη Καντίκου

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Ευτυχία Ασπροδίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια (Επιβλέπουσα)
- Αναστάσιος Γερμενής, Καθηγητής
- Άννα Βασιλάκη, Επίκουρος Καθηγήτρια

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στην Φαρμακολογία

Λάρισα, Οκτώβριος 2014



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

**An immunohistochemical and electrophysiological study of hippocampal
slices**

By
Aliki Kantikou

Advisory committee:

- Eftihia Asproдини, Associate Professor of Pharmacology (Supervisor)
- Anastasios Gerменis, Professor of Immunology
- Anna Vasilaki, Assistant Professor of Pharmacology

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Pharmacology

Larissa, October, 2014

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες	4
Περίληψη	5
Abstract	6
Γενικό Μέρος	7
Εισαγωγή	7
Ο Ιππόκαμπος.....	7
Ανατομία του ιπποκάμπου.....	8
Περιοχές του ιπποκάμπου.....	8
Στιβάδες του ιπποκάμπου.....	8
Φυλογενετική εξέλιξη του ιπποκάμπου.....	9
Συνδεσμολογία του ιπποκάμπου.....	11
Απαγωγές και προσαγωγές ίνες.....	11
Τρισυναπτικό κύκλωμα.....	11
Περιοχή CA3.....	12
Περιοχή CA2.....	14
Περιοχή CA1.....	14
Οδοντωτή έλικα DG.....	14
Νευροδιαβιβαστές.....	15
Γλουταμινικό οξύ.....	15
γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA).....	16
Υποδοχείς του γλουταμινικού οξέος.....	16
GABA υποδοχείς.....	17
Διαφορές κοιλιακού και ραχιαίου ιπποκάμπου.....	19
Η λειτουργία του ιπποκάμπου.....	20
Σκοπός	22
Ειδικό Μέρος	23
Υλικά και Μέθοδοι	23
Αποτελέσματα	27
Συζήτηση	45
Πηγές-Βιβλιογραφία	49

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνετέλεσαν με κάθε τρόπο στην ολοκλήρωση της εργασίας αυτής. Τις θερμές ευχαριστίες μου θα ήθελα να εκφράσω στην καθηγήτριά μου κ. Ευτυχία Ασπροδίνη, επιβλέπουσα της μεταπτυχιακής μου διπλωματικής εργασίας, για την επιλογή του θέματος, τη συνεχή καθοδήγηση και στήριξη κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου, τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις, καθώς και την τελική διαμόρφωση του κειμένου. Τις ευχαριστίες μου θα ήθελα να εκφράσω προς το προσωπικό και τους συνεργάτες του εργαστηρίου και ιδιαιτέρως την κ. Βασιλάκη, τον κ. Μπέγα και τον κ. Κουβαρά. Ιδαιτέρως ευχαριστώ την κ. Γιαννακοπούλου, μέλος ΕΔΠΠ του Τομέα 1: Δομής και Λειτουργίας ζωικών οργανισμών, της Κτηνιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ, για τις πολύτιμες συμβουλές της στα πειράματα ανοσοϊστοχημείας.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου, στον αδελφό μου και στους φίλους μου για την υποστήριξη και τη συμπαράστασή τους σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Λάρισα, Οκτώβριος 2014

Αλίκη Καντίκου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η δυνατότητα ταυτόχρονης μελέτης των λειτουργικών και ανατομικών χαρακτηριστικών στον ίδιο ιστό αποτελούσε ανέκαθεν πρόκληση στο πεδίο των νευροεπιστημών. Με βάση πρόσφατα ευρήματα του εργαστηρίου μας σχετικά με την ικανοποιητική ιστολογική και ανοσοϊστοχημική χρώση τομών ιπποκάμπου ύστερα από μονιμοποίησή τους με εμβύθιση σε μονιμοποιητικό διάλυμα (*immersion*), χρησιμοποιήσαμε *in vitro* παρασκεύασμα ιπποκάμπου για να εκτιμήσουμε το κατά πόσο η νευρωνική λειτουργία μπορεί να σχετιστεί άμεσα με συγκεκριμένους ανοσοϊστοχημικούς δείκτες και να αξιολογήσουμε την αριθμητική πυκνότητα των GABAεργικών νευρώνων στο ραχιαίο και κοιλιακό ιππόκαμπο.

Εγκάρσιες φέτες ιπποκάμπου (πάχους 500 μm) παρασκευάστηκαν από αρσενικούς αρουραίους Wistar και διατηρήθηκαν σε οξυγονωμένο τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Ενδοκυττάρειες ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές πραγματοποιήθηκαν από πυραμιδικούς νευρώνες της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου. Συναπτικές απαντήσεις προκλήθηκαν μετά από διέγερση των ινών του Schaffer. Στο τέλος των καταγραφών (5-9ώρες μετά την εκτομή του ιστού από το ζώο), οι φέτες μονιμοποιήθηκαν με *immersion* (4% PFA/0,1M PB) και εγκλείστηκαν σε παραφίνη. Διαδοχικές τομές τομών πάχους 4μm χρώσθηκαν ιστολογικά με εωσίνη/αιματοξυλίνη (E/H) και ανοσοϊστοχημικά για GABA.

Οι νευρώνες παρουσίασαν βασικές ηλεκτροφυσιολογικές παθητικές και ενεργητικές μεμβρανικές ιδιότητες (δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης, αντίσταση εισόδου, μετασυναπτική πυροδότηση) σύμφωνα με προγενέστερες μελέτες του εργαστηρίου. Η GABAεργική συναπτική αναστολή σχετίστηκε με την παρουσία GABA-ανοσοθετικών νευρώνων ιππόκαμπου σε όλες τις στιβάδες. Η χρώση E/H βοήθησε στην αξιολόγηση των νευρώνων (φυσιολογική δομή και σαφής και εμφανής παρουσία πυρήνων και πυρηνίσκων). Η αριθμητική πυκνότητα των GABA-ανοσοθετικών νευρώνων βρέθηκε υψηλότερη στην κοιλιακή σε σύγκριση με τη ραχιαία μοίρα του ιππόκαμπου.

Εν κατακλείδι, η μονιμοποίηση με *immersion* μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ιστολογική και ανοσοϊστοχημική μελέτη τομών ιπποκάμπου στις οποίες έχει προηγηθεί λειτουργική διερεύνηση του ιστού.

Λέξεις κλειδιά: ιππόκαμπος, ραχιαίος, κοιλιακός, GABA, ανοσοϊστοχημεία, CA1 περιοχή

ABSTRACT

The hippocampal formation is differentiated along its longitudinal axis in terms of its anatomy, biochemistry and function. The controversy between functional and anatomical data could be elucidated if one could study both function and anatomy within the same tissue. Based on a recent report of our lab that immersion-fixation of hippocampal slices shows satisfactory histological and immunohistochemical staining, we used the in vitro slice preparation to assess whether neuronal function can be related directly to specific immunohistochemical markers and also to evaluate GABA immunoreactivity in the dorsal and ventral hippocampus.

Hippocampal transverse slices (500µm thick) were prepared from male Wistar rats and maintained in oxygenated ACSF. Conventional sharp-electrode intracellular recordings were obtained from CA1 pyramidal neurons. Synaptic responses were evoked by stimulation of Schaffer collaterals. At the end of the electrophysiological recordings (5-9hours post brain excision), slices were fixed by immersion (4% PFA/0.1M PB) and embedded in paraffin. Consecutive paraffin 4µm-thick slices were stained histologically using Eosin/Hematoxylin or immunohistochemically for GABA using primary polyclonal rabbit antibody against GABA (1:500) and fluorescein-conjugated secondary goat anti-rabbit IgG (H+L) (1:400).

Neurons exhibited basic electrophysiological passive and active membrane properties (resting membrane potential, input resistance, postsynaptic firing patterns) similar to previously described. Pronounced GABA-mediated synaptic inhibition was associated with the presence of numerous GABA-immunofluorescent neurons in all hippocampal layers. Eosin/Hematoxylin-stained thin slices were characterized by the presence of neurons with normal ultrastructure and clear and evident nuclei and nucleoli. In addition, and in accordance to previously published results, the numeric density of GABA-immunoreactive neurons was higher in the ventral compared to the dorsal hippocampus.

In conclusion, histological and immunohistochemical staining combined with electrophysiological recordings can elucidate differences that appear between the dorsal and the ventral hippocampus.

Key words: hippocampus; dorsal; ventral; GABA neuron; immunohistochemistry; CA1 area

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

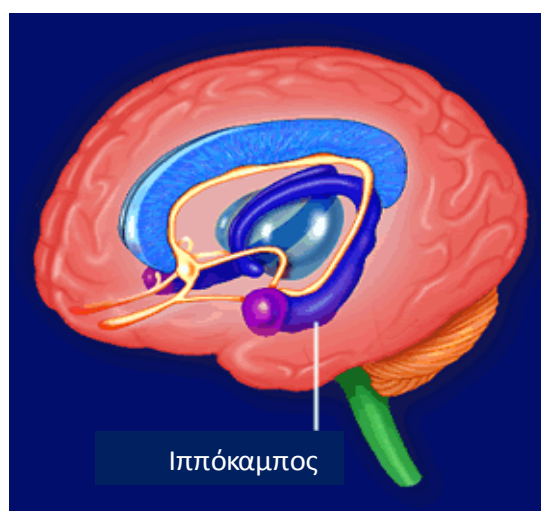
Ο ιππόκαμπος

Ο ιππόκαμπος του εγκεφάλου είναι από τις περιοχές του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) που έχουν ερευνηθεί διεξοδικά. Το όνομά του σχετίζεται άμεσα με τον ιππόκαμπο της θάλασσας λόγω της σχηματικής τους ομοιότητας (εικόνα 1).



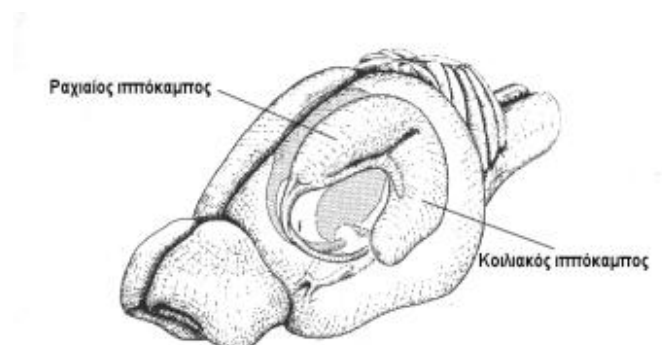
Εικόνα 1. Απεικόνιση ιππόκαμπου του εγκεφάλου και του ομώνυμου της θάλασσας αντίστοιχα [61].

Στον ανθρώπινο εγκέφαλο, ο ιππόκαμπος εντοπίζεται στον έσω κροταφικό λοβό, έχει δομή σχήματος C και εκτείνεται συμμετρικά ως προς τη μέση γραμμή του εγκεφάλου από το πίσω μέρος της υπομεσολοβίας περιοχής ως το κάτω κέρασ της πλάγιας κοιλίας (εικόνα 2), [25].



Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση της μορφής και της θέσης του ιπποκάμπου στον ανθρώπινο εγκέφαλο [57 (τροποποιημένη)].

Αντίστοιχη είναι η μορφή και η θέση του ιπποκάμπου στον εγκέφαλο του αρουραίου όπως παρατηρούμε στην εικόνα 3. Το τμήμα του ιπποκάμπου πλησιέστερα των πυρήνων του διαφράγματος αποτελεί το ραχιαίο (διαφραγματικό) ιππόκαμπο του αρουραίου και αντιστοιχεί στην οπίσθια μοίρα του ιπποκάμπου του ανθρώπου, ενώ το τμήμα προς τον κροταφικό λοβό αποτελεί τον κοιλιακό (κροταφικό) ιππόκαμπο που αντιστοιχεί στην πρόσθια μοίρα του ιπποκάμπου του ανθρώπου [25].



Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση της μορφής και της θέσης του ιπποκάμπου στον εγκέφαλο αρουραίου.
[58 (τροποποιημένη)].

Ανατομία του ιπποκάμπου

Περιοχές του ιπποκάμπου

Ο ιππόκαμπος ονομάζεται επίσης και κέρασ του Άμμωνος (από το κέρασ του θεού Άμμωνα, Cornu Ammonis) και υποδιαιρείται στις εξής 6 περιοχές:

Οδοντωτή έλικα (Dentate gyrus)

Κυρίως ιππόκαμπος (CA1, CA2 και CA3)

Υπόθεμα (Subiculum)

Προϋπόθεμα (presubiculum)

Παραϋπόθεμα (parasubiculum)

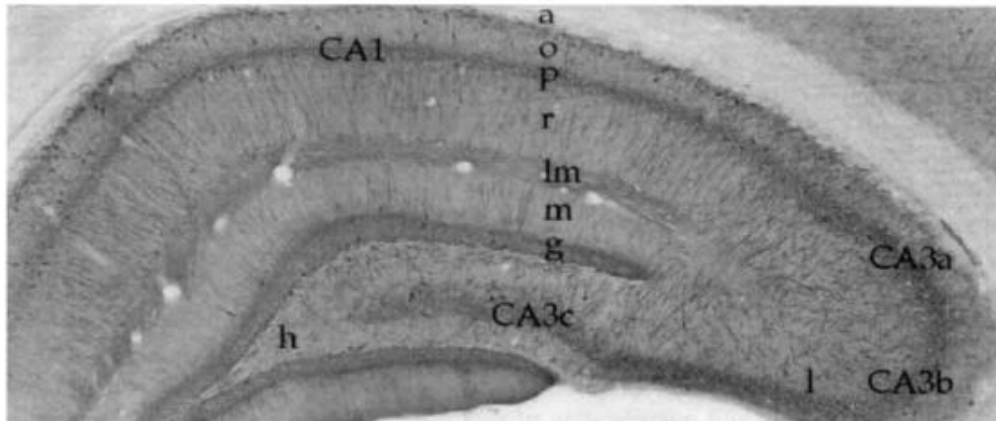
Ενδορινικός φλοιός (Entorhinal cortex)

Τα υπόθεμα, προϋπόθεμα και παραϋπόθεμα αναφέρονται και ως υποθεματικό σύμπλοκο [4].

Στιβάδες του ιπποκάμπου

Ο ιππόκαμπος και το υπόθεμα περιλαμβάνουν την πυραμιδική στιβάδα (*stratum pyramidale*) στην οποία εντοπίζεται το σύνολο των σωμάτων των πυραμιδικών κυττάρων (απαγωγοί νευρώνες), την ακτινωτή στιβάδα (*stratum radiatum*) που περιλαμβάνει τον

κορυφαίο δένδριτη των πυραμιδικών κυττάρων, και τις εγγύς διακλαδώσεις του, την βοθριώδη-μοριώδη στιβάδα (*stratum lacunosum-moleculare*), στην οποία εντοπίζονται οι άπω διακλαδώσεις των πυραμιδικών κυττάρων και την στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων (*stratum oriens*) η οποία περιλαμβάνει τους βασικούς δένδριτες και τους άξονες των πυραμιδικών νευρώνων (εικόνα 4).



Εικόνα 4. Στεφανιαία τομή του κροταφικού ιπποκάμπου. Διακρίνονται οι στιβάδες των CA1, CA2 και CA3 περιοχών και αυτές της οδοντωτής έλικας. CA1 περιοχή: **a:** σκάφη, **o:** πολύμορφη στιβάδα, **p:** πυραμιδική στιβάδα, **r:** ακτινωτή, **lm:** βοθριώδης-μοριώδης, CA3 περιοχή: **l:** διαυγής στιβάδα. DG περιοχή: **h:** πολύμορφη στιβάδα, **g:** στιβάδα κοκκιωδών κυττάρων, **m:** μοριώδης στιβάδα [11].

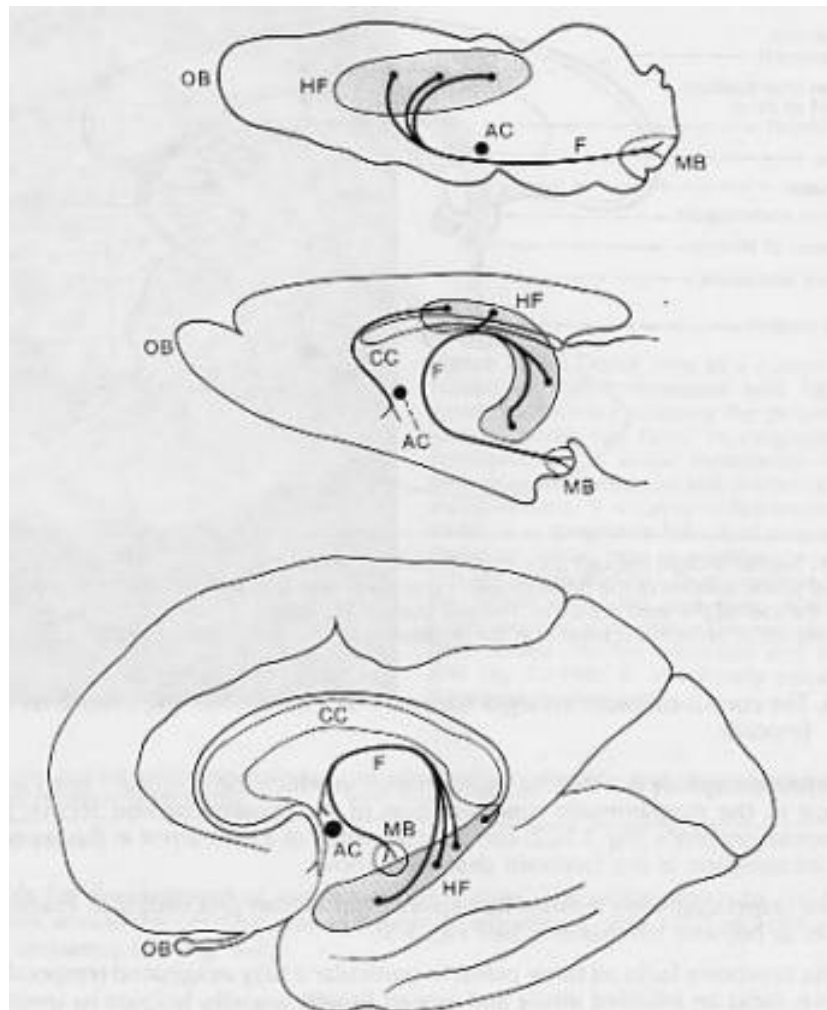
Η οδοντωτή έλικα αποτελείται από την κοκκιώδη κυτταρική στιβάδα (*granule cell layer*) που περιέχει τα κοκκιώδη κύτταρα, την μοριώδη στιβάδα (*molecular cell layer*) που περιλαμβάνει δένδριτες των κοκκιωδών κυττάρων και την πολύμορφη στιβάδα ή πύλη της οδοντωτής έλικας (*hilus*) που περιλαμβάνει ποικιλία νευρικών κυττάρων (πχ. βρωδή κύτταρα) [60].

Φυλογενετική εξέλιξη του ιπποκάμπου

Ο ιππόκαμπος του εγκεφάλου είναι πολύπλοκη δομή και από τις φυλογενετικά αρχαιότερες. Ο αρχαιοφλοιός (*archicortex*) αποτελεί σημαντική περιοχή στο πρόσθιο τοίχωμα του εγκεφάλου των πρωτόγονων σπονδυλωτών ο οποίος κατά τη φυλογενετική του εξέλιξη διαφοροποιείται για να πάρει τη σημερινή του μορφή. Κατά την εξέλιξη, ο πρόσθιος εγκέφαλος μεγαλώνει, ο ιππόκαμπος (αρχαιοφλοιός) πιέζεται και επεκτείνεται προς το εσωτερικό του εγκεφάλου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη επαφή του ιπποκάμπου με τον κροταφικό λοβό ο οποίος, καθώς επιμηκύνεται, σύρει τον ιππόκαμπο. Έτσι, ο ιππόκαμπος σχηματίζει μια καμπυλωτή δομή από το ραχιαίο πρόσθιο εγκέφαλο προς τον

κροταφικό λοβό και καταλήγει ολόκληρος στο εσωτερικό του κροταφικού λοβού, σε στενά περιορισμένο χώρο, έναντι της αμυγδαλής (εικόνα 50) [60].

Η πρωτόγονη σύνδεση του ιπποκάμπου με το διάφραγμα επιτυγχάνεται με την ψαλίδα (παχιά ταινία, το σχήμα της οποίας αντιπροσωπεύει την τροχιά της εξέλιξης του ιπποκάμπου) [54].



Εικόνα 5. Φυλογενετική μετανάστευση ιππόκαμπου σε ημικόκλιο τόξο [62].

ΣΥΝΔΕΣΜΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΥ

Απαγωγές και προσαγωγές ίνες

Από τα πυραμιδικά κύτταρα του ιππόκαμπου και το υπόθεμα ξεκινούν απαγωγές νευρικές ίνες που κατευθύνονται προς διάφορες υποφλοιϊκές δομές και προς τον ετερόπλευρο ιπποκάμπειο σχηματισμό. Έτσι δημιουργείται στην κοιλιακή επιφάνεια του ιππόκαμπου και του υποθέματος η σκάφη (alveus). Ως συνέχεια των ινών αυτών σχηματίζεται παχύτερη δέσμη που ονομάζεται παρυφή (fimbria). Οι ίνες αυτές απαρτίζουν την ψαλίδα (Fornix) του εγκεφάλου και καταλήγουν στον πρόσθιο εγκέφαλο [5].

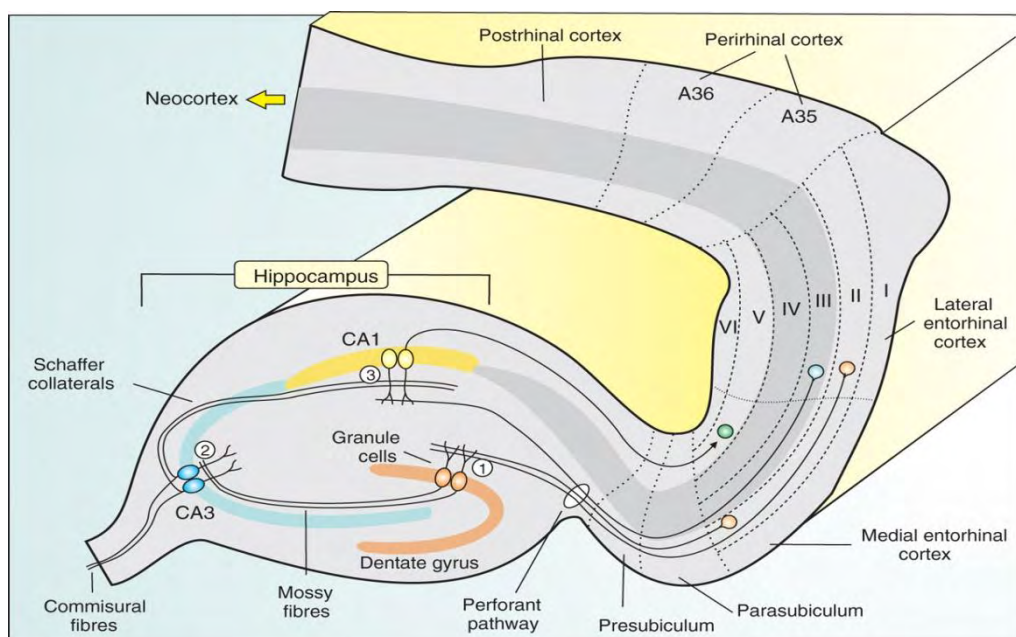
Το σημείο εισόδου προσαγωγών προβολών στον ιππόκαμπο είναι η οδοντωτή έλικα. Πράγματι, ο ιπποκάμπειος σχηματισμός δέχεται πληροφορίες από την τοξοειδή έλικα και από διάφορα σημεία του μεταιχμιακού συστήματος τα οποία συγκλίνουν στον ενδορινικό φλοιό και φτάνουν στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου μέσω της διατιτραίνουσας οδού (βλ. παρακάτω τρισυναπτικό κύκλωμα; Amaral and Witter, 1995). Επιπλέον, ο σχηματισμός του ιππόκαμπου δέχεται προσαγωγές ίνες από τους πυρήνες του διαφράγματος (χολινεργικές) και από τον ιπποκάμπειο σχηματισμό του ετερόπλευρου εγκεφαλικού ημισφαιρίου. Ως εκ των ανωτέρω, ο ιππόκαμπος δέχεται και αποστέλλει τεράστιο όγκο πληροφοριών.

Ο κεντρικός διαφραγματικός πυρήνας και ο πυρήνας της διαγώνιας περιοχής του Broca αποτελούν την έναρξη των διαφραγματικών ινών που έχουν κατάληξη στον ιππόκαμπο, με ισχυρή νεύρωση της πολυμορφικής στιβάδας και πιο ασθενή της μοριώδους στιβάδας. Κύτταρα σε κεντρική θέση στον κεντρικό διαφραγματικό πυρήνα δίνουν προβολή σε διαφραγματικά τμήματα του ιπποκάμπειου σχηματισμού και κύτταρα σε πιο πλευρική θέση δίνουν σε κροταφικά τμήματα του.

Τρισυναπτικό κύκλωμα

Το τρισυναπτικό κύκλωμα αποτελεί το πρότυπο της συναπτικής διαβίβασης στον ιππόκαμπο μέσω του οποίου πραγματοποιείται η βασική ροή πληροφοριών. Το τρισυναπτικό κύκλωμα εμπλέκει τρεις μεγάλες ομάδες κυττάρων: τα κοκκώδη κύτταρα της οδοντωτής έλικας, τους πυραμιδικούς νευρώνες της CA3 περιοχής, και τα πυραμιδικά κύτταρα της CA1 περιοχής καθώς και τις μεταξύ τους προβλητικές ίνες. Η πρώτη προβολή ινών εκκινεί από τον ενδορινικό φλοιό και καταλήγει στα κοκκώδη κύτταρα της οδοντωτής έλικας μέσω νευραξόνων που συνιστούν την διατιτραίνουσα οδό (perforant

pathway). Η οδοντωτή έλικα στέλνει ίνες, που ονομάζονται βρυώδεις ίνες (mossy fibers), προς τους κορυφαίους δενδρίτες των πυραμδικών κυττάρων της CA3 περιοχής. Στη συνέχεια, τα πυραμδικά κύτταρα της CA3 περιοχής μέσω των παράπλευρων ιών του Schaffer (Schaffer collaterals) προβάλλουν στα πυραμδικά κύτταρα της CA1 περιοχής. Τα τελευταία, μέσω του υποθέματος, προβάλλουν πίσω στον ενδορρινικό φλοιό στη στιβάδα V ή VI. Το κύκλωμα αυτό αποτελεί το τρισυναπτικό ιπποκάμπειο κύκλωμα και απαντάται σε όλο τον επιμήκη άξονα του (εικόνα 6) [4].



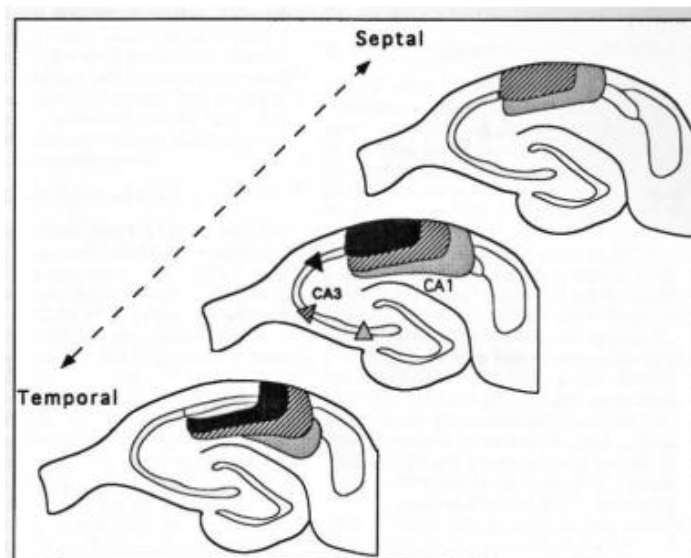
Εικόνα 6. Βασικό τρισυναπτικό κύκλωμα ιπποκάμπου [56].

Περιοχή CA3

Οι άξονες της περιοχής αυτής διακλαδίζονται στις ιπποκάμπειες περιοχές CA3, CA2 και CA1 (εικόνα 7) και στις αντίστοιχες περιοχές του ετερόπλευρου ημισφαιρίου. Επίσης, προβολές των αξόνων που εκκινούν από τη CA3 περιοχή φτάνουν υποφλοιϊκώς στον πλευρικό διαφραγματικό πυρήνα. Κλάδοι εξ αυτών δεν προβάλλουν προς το υπόθεμα, το παραυπόθεμα και τον ενδορρινικό φλοιό. Κάποιες κυτταρικές μονάδες της CA3 και της CA2 έχουν προβολές στην πολύμορφη στιβάδα της οδοντωτής έλικας [4].

Η CA3 δεν προβάλλει με τυχαίο τρόπο στη CA1. Πράγματι, οι κυτταρικές μονάδες της πλησιέστερα της οδοντωτής έλικας προβάλλουν σε διαφραγματικά τμήματα της CA1, ενώ αυτές πλησιέστερα της CA1 προβάλλουν σε κροταφικά τμήματά της.

Επίσης, τα πυραμιδικά κύτταρα της CA3 πλησιέστερα της οδοντωτής έλικας προβάλλουν ισχυρότερα στα απομακρυσμένα τμήματα της CA1, ενώ αυτά πλησιέστερα της CA1 περιοχής προβάλλουν στα πυραμιδικά της CA1 κοντά σε αυτά της CA2, (εικόνα 8) [25].



Εικόνα 7. Προβολές της CA3 στη CA1 περιοχή. Τα τρίγωνα αποτελούν εκκίνηση προβολών με κατάληξη στις περιοχές ίδιας σκίασης [5].

Οι άξονες των νευρώνων της CA3 περιοχής έχουν ευθεία ή διαγώνια τροχιά και δημιουργούν συνάψεις με τους κορυφαίους δενδρίτες πυραμιδικών κυττάρων της CA1 περιοχής. Επίσης, παράπλευροι άξονες της CA3 περιοχής δημιουργούν συνάψεις με τους βασικούς δενδρίτες γειτονικών πυραμιδικών κυττάρων της CA3 περιοχής.

Η πολυμορφική στιβάδα της CA3 περιοχής, και λιγότερο η ακτινωτή στιβάδα, δέχονται χολινεργικές συνάψεις από υποφλοιϊκές περιοχές όπως τον κεντρικό διαφραγματικό πυρήνα και τον πυρήνα της διαγώνιας ταινίας του Broca. Τέλος, η CA3 περιοχή δέχεται νοραδρενεργική, σεροτονινεργική και σε μικρότερη έκταση ντοπαμινεργική από τον υπομέλα τόπο, τον πυρήνα της ραφής και την μέλαινα ουσία, αντίστοιχα [5].

Περιοχή CA2

Από αυτήν την περιοχή εκκινούν προβολές των πυραμιδικών κυττάρων προς τη CA1 περιοχή, όχι όμως οργανωμένα, όπως συμβαίνει στις περιοχές CA3 και CA1. Οι παράπλευρες ίνες της κατανέμονται επί το πλείστον στην πολυμορφική στιβάδα της

οδοντωτής έλικας. Μεγάλο ποσοστό αξόνων εισέρχονται στη CA2 περιοχή από τον οπίσθιο υποθάλαμο, την υπερηλώδη περιοχή και τον φυματιοθηλώδη πυρήνα [5].

Περιοχή CA1

Από τα πυραμιδικά κύτταρα αυτής της περιοχής εκκινούν ενδοϊποκάμπειες προβολές που καταλήγουν στο υπόθεμα και στις εν τω βάθει στιβάδες του ενδορινικού φλοιού.

Εμφανίζει περισσότερες εξωτερικές συνδέσεις σε σχέση με τη CA3 περιοχή, καθώς προβάλλει σε υποφλοιϊκές (πλευρικός διαφραγματικός πυρήνας) και φλοιϊκές περιοχές. Οι προβολές αυτές εκκινούν από τη διαφραγματική μοίρα της CA1 περιοχής και έχουν ως κύρια κατάληξη τον πλευρικό διαφραγματικό πυρήνα και τον πυρήνα της διαγώνιας ταινίας του Broca (προβολές κυρίως μονόδρομης κατεύθυνσης). Επίσης, ίνες προβάλλουν προς την καλυπτική ταινία, την υπερακτινωτή περιοχή, τον πρόσθιο οσφρητικό πυρήνα, τον οσφρητικό λοβό, τον επικλινή πυρήνα, το βασικό πυρήνα της αμυγδαλής και τις πρόσθιες και ραχαιοκεντρικές υποθαλάμειες περιοχές. Τέλος κι αυτή η περιοχή, όπως κι η CA3 περιοχή, δέχεται λίγες νοραδρενεργικές και σεροτονινεργικές ίνες. Η ακριανή της πλευρά δέχεται προβολή από την αμυγδαλή ($\approx 1/3$ κροταφικού τμήματος) [5].

Οδοντωτή έλικα DG

Η οδοντωτή δεν υφίσταται προβολή από φλοιϊκή περιοχή όμως υφίσταται από υποφλοιϊκά τμήματα όπως ο διαφραγματικός πυρήνας (μία περιοχή του οπίσθιου υποθαλάμου), ο πυρήνας της ραφής και ο υπομέλανας τόπος.

Στην οδοντωτή έλικα, η κύρια υποθαλαμική προβολή προέρχεται από πληθυσμό μεγάλων κυττάρων που πλαισιώνουν τον θηλώδη πυρήνα, σε μια περιοχή που ονομάζεται υπερηλώδης. Επιπλέον, στην οδοντωτή έλικα προβάλλονται νοραδρενεργικές ίνες από τον υπομέλανα τόπο και σεροτονινεργικές ίνες από τον πυρήνα της ραφής (που καταλήγουν αμφότερες στην πολυμορφική στιβάδα) και λίγες ντοπαμινεργικές ίνες από κύτταρα της κοιλιακής καλυπτικής περιοχής. Μοναδική έξοδο της οδοντωτής έλικας αποτελεί η προβολή μέσω των βρυωδών ινών σε όλον τον κάθετο άξονα της CA3 περιοχής, άσχετα από την τοποθεσία των κοκκοειδών κυττάρων. Αυτές οι ίνες είναι κατά κύριο λόγο γλουταμινεργικές. Κάποιες εξ αυτών περιέχουν και οπιοειδή πεπτίδια (δυνορφίνη). Χαρακτηριστικά να αναφέρω ότι μία βρυώδης ίνα μπορεί να δημιουργήσει μέχρι 37 συνάψεις με έναν δενδρίτη πυραμιδικού κυττάρου και κάθε κοκκοειδές κύτταρο μπορεί να

επηρεάζει 14-28 πυραμιδικά. Από τη άλλη, κάθε πυραμιδικό κύτταρο μπορεί να δεχτεί είσοδο από 50 περίπου κοκκοειδή κύτταρα [5].

Νευροδιαβιβαστές του ιπποκάμπου

Μεγάλος αριθμός νευροδιαβιβαστών και νευροτροποποιητών εντοπίζεται στον ιππόκαμπο του εγκεφάλου (Πίνακας 1). Παρόλα αυτά το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) φαίνεται να είναι ο κύριος ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής, ενώ το γλουταμινικό οξύ είναι ο πιο σημαντικός διεγερτικός νευροδιαβιβαστής του ιπποκάμπου. Αρκετές άλλες ουσίες, συμπεριλαμβανομένων των οπιοειδών, της σεροτονίνης και του αγγειοενεργού εντερικού πολυπεπτιδίου (VIP) είναι επίσης παρούσες σε σημαντικές συγκεντρώσεις.

Πίνακας 1. Νευροδιαβιβαστές και νευροτροποποιητές του ιπποκάμπου. [55 (τροποποιημένη)].

Γλουταμινικό οξύ	Εγκεφαλίνη	Δυνερφίνη
Ασπαρτικό	γ-αμινοβουτυρικό οξύ GABA	Αγγειοτενσίνη
Ακετυλοχολίνη	Νορεπινεφρίνη	Σεροτονίνη
Αδενosίνη	Ισταμίνη	Ντοπαμίνη
Σωματοστατίνη	Χολοκυστοκίνη	Ουσία P
Γαλανίνη	Νευροπεπτίδιο Y	
Αγαιοδραστικό εντερικό νευροπεπτίδιο (VIP)		
Παράγοντας απελευθέρωσης κορτικοτροπίνης		

Γλουταμινικό οξύ

Έχει πάντα διεγερτική δράση που οφείλεται σε υποδοχείς που αυξάνουν τη ροή των θετικών ιόντων ανοίγοντας ιοντικά κανάλια. Η διέγερση αυτή τερματίζεται από ένα σύστημα μεταφοράς μεμβράνης που χρησιμοποιείται μόνο για την εκ νέου απορρόφηση γλουταμινικού και ασπαρτικού οξέος διαμέσου της προ-συναπτικής μεμβράνης. Το γλουταμινικό και το ασπαρτικό εισέρχονται εκ νέου στο κύτταρο από ένα μεταφορέα που οδηγείται από τις υψηλές εξωκυτταρικές συγκεντρώσεις των ιόντων Na^+ και τις υψηλές ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις K^+ .

Το γλουταμινικό οξύ που απελευθερώνεται στις συνάψεις είτε επαναπροσλαμβάνεται άμεσα από τους νευρώνες μέσω του συστήματος ανταλλαγής ιόντων είτε προσλαμβάνεται από τα νευρογλοιακά κύτταρα, τα οποία μετατρέπουν το γλουταμινικό σε γλουταμίνη. Η

γλουταμίνη μπορεί στη συνέχεια να μεταφερθεί πίσω στους νευρώνες για την εκ νέου μετατροπή της σε γλουταμινικό.

γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA)

Το GABA είναι ο πιο σημαντικός ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής του ΚΝΣ. Η γλυκόζη αποτελεί αρχική ένωση στην βιοσύνθεση του GABA. Σε κάποιες περιπτώσεις και το α-κετογλουταρικό οξύ μπορεί να αποτελέσει αρχική ένωση που τρανσαμινώνεται σε γλουταμινικό οξύ και μετέπειτα με τη δράση του ενζύμου αποκαρβοξυλάση του γλουταμινικού οξέος (GAD) μετατρέπεται σε GABA. Κύριες ιδιότητες ενός GABAεργικού νευρώνα είναι η ικανότητα παραγωγής και έκλυσης GABA και εντοπισμού σε αυτόν του ενζύμου της GAD.

Το GABA με τη δράση του ενζύμου GABA-T μετατρέπεται σε ημιαλδεύδη και μπορεί να καταβολισθεί μόνο όταν το κετογλουταρικό οξύ δεν είναι αρκετό (Arregui and Bager, 1980). Στη συνέχεια η ηλεκτρική ημιαλδεύδη οξειδώνεται σε ηλεκτρικό οξύ με τη δράση του ενζύμου αφυδρογονάση της ηλεκτρικής ημιαλδεύδης. Έτσι εισέρχεται στον κύκλο του Krebs όπου και μετατρέπεται σε α-κετογλουταρικό οξύ. Αυτή η πορεία πραγματοποιείται στο προσυναπτικό τμήμα νευρώνων του ιππόκαμπου [17].

Υποδοχείς του γλουταμινικού οξέος

Οι υποδοχείς του γλουταμινικού οξέος διακρίνονται σε αυτούς που έχουν άμεσο έλεγχο των διαύλων ιόντων και ονομάζονται ιοντοτροπικοί υποδοχείς (iGluRs) και σε εκείνους που έχουν έμμεσο έλεγχο και ονομάζονται μεταβολοτροπικοί υποδοχείς (mGluRs). Περαιτέρω κατηγοριοποίηση των ιοντοτροπικών υποδοχέων με βάση τις ουσίες που τους ενεργοποιούν και τους αναστολείς της δράσης τους είναι οι NMDA και οι μη-NMDA υποδοχείς [43, 37].

Οι NMDA υποδοχείς ενεργοποιούνται από το αμινοξύ N-μεθυλο-D-ασπαρτικό οξύ (NMDA), ενώ οι μη-NMDA από το α-αμινο-3-υδροξυ-5-μεθυλο-ισοξαλοζολο-προπιονικό οξύ (AMPA), το καϊνικό οξύ (KA) και το κισκαλικό οξύ. Οι μεταβολοτροπικοί υποδοχείς ενεργοποιούνται από το 1-αμινοκυκλοπεντανο-1,3-δικαρβοξυλικό οξύ (ACPD) [43].

GABA υποδοχείς

Υπάρχουν 3 διαφορετικά είδη υποδοχέων GABA: οι ιοντοτροπικοί GABA_A, οι μεταβολοτροπικοί GABA_B και οι ιοντοτροπικοί GABA_C υποδοχείς.

i. GABA_A υποδοχείς

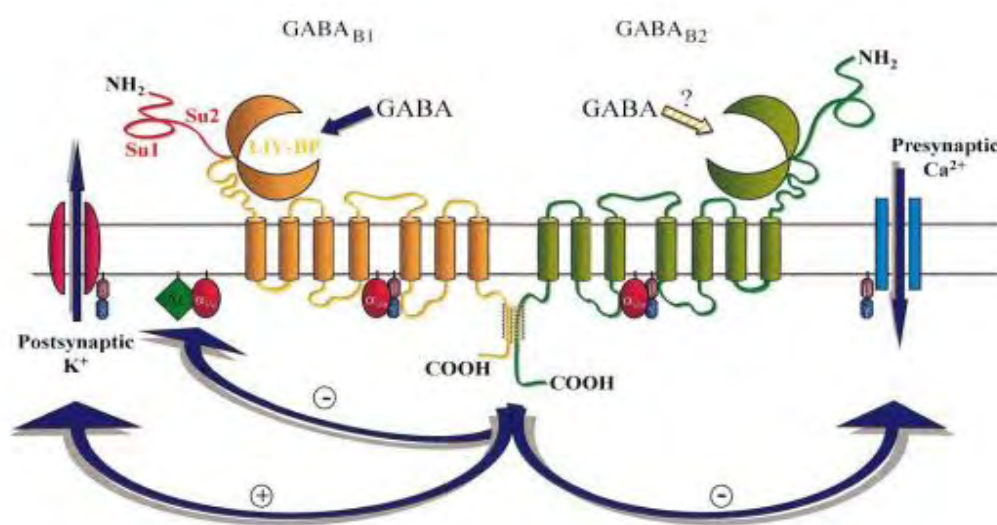
Ο GABA_A υποδοχέας που απαντάται στον εγκέφαλο των θηλαστικών αποτελείται από πολλές υπομονάδες [α (6 υπότυποι), β (4 υπότυποι), γ (3 υπότυποι), δ, ε, θ, π και ρ (3 υπότυποι), όπου η υπομονάδα ξεχωριστά έχει 4 διαμεμβρανικές περιοχές, ένα αμινοτελικό άκρο έξω από το κύτταρο και ενδοκυτταρικά ένα καρβοξυτελικό άκρο και έναν βρόγχο ανάμεσα στον 3^ο και 4^ο διαμεμβρανικό χώρο]. Ωστόσο, στον ιππόκαμπο απαντάται συνηθέστερα ο υποδοχέας GABA_A που απαρτίζεται από δύο υπομονάδες α και δύο β μαζί με μία γ ή μία δ υπομονάδα [7].

Με σύνδεση ενός μορίου GABA στον κατάλληλο υποδοχέα ανοίγει ο διάυλος χλωρίου ενώ σταδιακά ελαττώνεται η συγγένεια των διαθέσιμων θέσεων για το GABA, ώστε ο διάυλος να ανοίγει μόνο σε μεγάλες συγκεντρώσεις του νευροδιαβιβαστή. Με το άνοιγμα του διαύλου εισέρχονται ιόντα Cl⁻ στο κύτταρο κι έτσι αυτό υπερπολώνεται. Όμως, στον ανήλικο εγκέφαλο και ίσως σε περιπτώσεις ενήλικων εγκεφάλων, η συγκέντρωση των ιόντων αυτών είναι τόσο μεγάλη ώστε πραγματοποιείται έξοδός τους με τελική κυτταρική εκπόλωση [10].

Όσον αφορά στο ρόλο των υπομονάδων, στις α υπομονάδες οφείλεται το ρεύμα των ιόντων χλωρίου, το ρεύμα αποκατάστασης και η απευαισθητοποίηση του υποδοχέα GABA_A (Lavoie et al., 1997). Οι β υπομονάδες παίζουν ρόλο στην υποκυτταρική διανομή των υποδοχέων GABA_A και στην εκλεκτικότητα του διαύλου για τα ιόντα Cl⁻ [22], ενώ οι γ υπομονάδες αυξάνουν τη διάρκεια διάνοιξης του διαύλου και εμπλέκονται σημαντικά στη συγκέντρωση των υποδοχέων στη σύναψη [15].

ii. GABA_B υποδοχείς

Το GABA συνδέεται με τον υποδοχέα GABA_B κι όχι με τον GABA_A όταν υπάρχουν δισθενή κατιόντα στον περιβάλλοντα χώρο. Ο συγκεκριμένος υποδοχέας που είναι μεταβοτροπικός, συνδέεται με G πρωτεΐνες και συνίσταται σε δύο υπότυπους GABA_{B1} και GABA_{B2}. Ο υποδοχέας GABA_{B1} εκφράζεται σε περιοχές όπως η CA1 περιοχή του ιππόκαμπου, η οδοντωτή έλικα, ο υποθάλαμος, τα κοκκιώδη και μοριώδη κύτταρα της παρεγκεφαλίδας και του νεοφλοιού, ενώ ο GABA_{B2} παρουσιάζει πιο εκτεταμένη έκφραση (εικόνα 8) [13, 30].



Εικόνα 8. Δομή του GABA_B υποδοχέα [13].

Υπάρχουν οι προσυναπτικοί και οι μετασυναπτικοί GABA_B υποδοχείς. Αυτοί ρυθμίζουν την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών και τη μετασυναπτική αργή φάση της αναστολής, αντίστοιχα. Η προσυναπτική ενεργοποίηση αναστέλλει τους διαύλους ασβεστίου κι έτσι μειώνεται η ασβέστιο-εξαρτώμενη απελευθέρωση νευροδιαβιβαστή. Το ίδιο συμβαίνει κι όταν υφίσταται σύνδεσή τους με προσυναπτικά κανάλια καλίου (αύξηση αγωγιμότητας). Έτσι η προσυναπτική απόληξη τίθεται σε κατάσταση υπερπόλωσης και ένα επόμενο δυναμικό ενέργειας δε θα έχει την ίδια ικανότητα αύξησης του μεμβρανικού δυναμικού, οπότε και διάνοιξης καναλιών ασβεστίου, με αποτέλεσμα μια έμμεση μείωση της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστή. Μετασυναπτικά αυτοί οι υποδοχείς βρίσκονται στους δενδρίτες, όπου αυξάνουν ομοίως την αγωγιμότητα διαύλων καλίου κι άρα οδηγούν σε υπερπόλωση [35].

iii. GABA_C υποδοχείς

Ο υποδοχέας GABA_C αποτελείται από σύνολο ρ υπομονάδων, είναι ιοντοτροπικός και συνδέεται με διάλυο ιόντων Cl⁻. Ο λειτουργικός υποδοχέας και η ρ₁ υπομονάδα βρίσκονται κυρίως στον αμφιβληστροειδή, ενώ η ρ₂ υπομονάδα βρίσκεται στον ιππόκαμπο και το νεοφλοίο [1].

Διαφορές ραχιαίου και κοιλιακού ιππόκαμπου

Ο κοιλιακός ιππόκαμπος είναι κατά 20% πυκνότερος σε νοραδρενεργικές ίνες συγκριτικά με το ραχιαίο και η συγκέντρωση αυτή αυξάνεται από το ραχιαίο προς τον κοιλιακό ιππόκαμπο στις περιοχές CA1 και CA3. Στην οδοντωτή έλικα δεν παρατηρείται διαφοροποίηση στην πυκνότητα των νοραδρενεργικών ινών κατά μήκος του επιμήκους άξονα της δομής. Η MHPG (3-methoxy4hydroxyphenylglycol), που αποτελεί μεταβολίτη της νοραδρεναλίνης, επίσης, διαφοροποιείται στους δυο ιπποκάμπειους πόλους.

Κατά αναλογία με τις νοραδρενεργικές ίνες, τόσο οι χολινεργικές ίνες του διαφραγματικού πυρήνα όσο και οι σεροτονινεργικές ίνες του πυρήνα της ραφή προβάλλουν ισχυρότερα στον κοιλιακό από ότι στο ραχιαίο ιππόκαμπο. Παρόλο που η συγκέντρωση της ντοπαμίνης είναι χαμηλή σε όλη την έκταση του ιππόκαμπου, η κατανομή της παρουσιάζει αύξηση από το ραχιαίο στο κοιλιακό τμήμα. Τα επίπεδα του GABA και η συγκέντρωση της GAD είναι υψηλότερα στον κοιλιακό ιππόκαμπο και στις CA1 και CA3 περιοχές. Τέλος, το γλουταμινικό οξύ εμφανίζεται ελαφρώς αυξημένο στον κοιλιακό πόλο του ιπποκάμπου [20].

Μια άλλη διαφοροποίηση κατά μήκος του επιμήκους άξονα του ιπποκάμπου αφορά στους ενδονευρώνες. Έτσι, οι ενδονευρώνες που είναι ανοσοθετικοί στην καλρετινίνη (CR), την συνθετάση του οξειδίου του αζώτου (NOS) και την σωματοστατίνη (SS) εμφανίζονται πυκνότεροι στον κοιλιακό πόλο, ενώ αυτοί που είναι ανοσοθετικοί στην παρβαλβουμίνη (PV) και την χολεκυστοκινίνη (CCK) δεν εμφανίζουν διαφοροποιήσεις [36].

Από λειτουργικής άποψης, πειράματα με εξωκυττάριας ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές έδειξαν ότι η συναπτική αναστολή της CA1 περιοχής της κοιλιακής μοίρας είναι μικρότερη σε σχέση με της ραχιαίας, ενώ πειράματα με ενδοκυττάριας καταγραφές έδειξαν ότι ο κροταφικός ιππόκαμπος εμφανίζει μικρότερα σε πλάτος και διάρκεια υπερπολωτικά μετασυναπτικά δυναμικά (IPSPs) σε σύγκριση με το διαφραγματικό. [38,40].

Ένα άλλο χαρακτηριστικό της λειτουργικής διαφοροποίησης του ιπποκάμπου είναι η πλαστικότητα των συνάψεων που συνδέεται με το μνημονικό μοντέλο [14]. Συγκεκριμένα, ο κοιλιακός ιππόκαμπος μπορεί να δημιουργήσει δυσκολότερα μακρόχρονη

ενδυνάμωση (Long Term Potentiation, LTP), αλλά και ηπιότερη συναπτική "διευκόλυνση" (Paired Pulse Facilitation, PPF), είτε ως προς το μέγεθος είτε ως προς τη διάρκειά της [39].

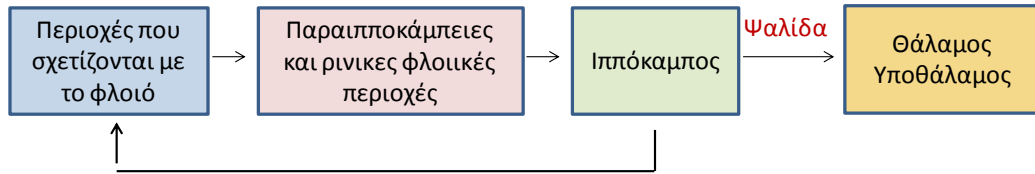
Τέλος, όσον αφορά στις επιδράσεις των φαρμάκων, τα αναισθητικά και τα κατασταλτικά φάρμακα σε μικρές συγκεντρώσεις δεν εμφανίζουν διαφοροποιήσεις μεταξύ των δυο πόλων του ιππόκαμπου, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις δρουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στο ραχιαίο πόλο από ότι στον κοιλιακό. Αυτή η διαφοροποίηση της δράσης των φαρμάκων είναι σημαντική για το φαρμακολογικό έλεγχο των επιληπτικών κρίσεων [48].

Η λειτουργία του ιππόκαμπου

Είναι ευρύτερα γνωστό ότι ο ιππόκαμπος είναι σημαντικός για τη λειτουργία της μνήμης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση του ασθενή H.M, ο οποίος αφότου του αφαιρέθηκε ο ιππόκαμπος, υπέστη αμνησία, χωρίς τη δυνατότητα κωδικοποίησης πληροφοριών σε μακρόχρονη μνήμη [44]. Μελέτες έδειξαν ότι ο παθών εμφάνιζε μνημονικές δυσλειτουργίες όπως η αναγνώριση λέξεων ή σχημάτων και δυσκολία στη μνήμη διάταξης και τοποθεσίας αντικειμένων στο χώρο [33,34].

Επιπλέον, έρευνες σε ασθενείς με βλάβες αποκλειστικά στον ιππόκαμπο έδειξαν ότι ο ιππόκαμπος είναι υπεύθυνος για μνημονικές διαδικασίες του κροταφικού λοβού [42]. Σε πειραματικές μελέτες, καταστροφές στην περιοχή του ιππόκαμπου έχουν ως αποτέλεσμα την αδυναμία των επίμων στην πραγμάτωση πολύπλοκων διαδικασιών, όπως η επίλυση προβλημάτων συμμετρίας [3]. Όλα τα παραπάνω οδηγούν στο συμπέρασμα πως ο ιππόκαμπος συμμετέχει ενεργά σε πολλούς τύπους μνήμης.

Αρχικά οι μνήμες αποθηκεύονται ως βραχύχρονες και έπειτα υφίστανται σταδιακή μετατροπή σε μόνιμες. Ο χώρος αποθήκευσής τους βρίσκεται στον ιππόκαμπο και η πληροφορία από φλοιϊκά συνειρμικά τμήματα καταλήγει σε αυτόν, μέσω του ενδορινικού και περιρινικού φλοιού. Εκεί το ερέθισμα υφίσταται προσωρινή αποθήκευση ως βραχύχρονη μνήμη και μετέπειτα μεταφέρεται στο συνειρμικό φλοιό, όπου και μετατρέπεται σε μακρόχρονη μνήμη μέσω της διαδικασίας της μνημονικής εδραίωσης (memory consolidation). Αυτή η εδραίωση μπορεί να διαρκέσει ακόμα και χρόνια μετά την πρώτη αποθήκευση της πληροφορίας (εικόνα 9) [9].



Εικόνα 9. Ροή πληροφορίας στον κεντρικό κροταφικό λοβό [9 (τροποποιημένη)].

ΣΚΟΠΟΣ

Η δυνατότητα ταυτόχρονης μελέτης των λειτουργικών και ανατομικών χαρακτηριστικών στον ίδιο ιστό αποτελούσε ανέκαθεν πρόκληση στο πεδίο των νευροεπιστημών. Με βάση πρόσφατα ευρήματα του εργαστηρίου μας σχετικά με την ικανοποιητική ιστολογική και ανοσοϊστοχημική χρώση τομών ιπποκάμπου ύστερα από μονιμοποίησή τους με εμβύθιση σε μονιμοποιητικό διάλυμα (*immersion*), χρησιμοποιήσαμε *in vitro* παρασκεύασμα ιπποκάμπου, το οποίο μονιμοποιήσαμε μετά από ηλεκτροφυσιολογική καταγραφή, με σκοπό:

1. την εκτίμηση της δυνατότητας συσχέτισης της νευρωνικής λειτουργίας με συγκεκριμένους ιστολογικούς και ανοσοϊστοχημικούς δείκτες
2. τη διερεύνηση διαφοροποίησης του πληθυσμού των GABAεργικών νευρώνων μεταξύ ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου.
3. τη διερεύνηση της διαφοροποίησης της ανθεκτικότητας των GABA νευρώνων κατά μήκος του επιμήκους άξονα του ιπποκάμπου.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

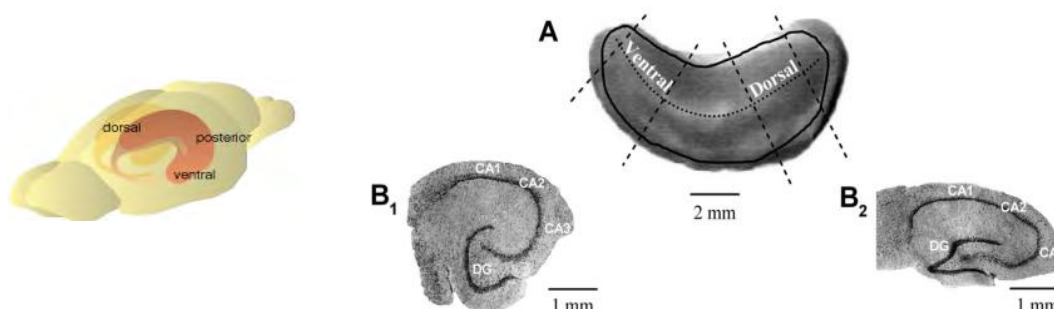
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η συλλογή των πειραματικών δεδομένων συνίσταται στην προετοιμασία τομών για ενδοκυττάρια *in vitro* ηλεκτροφυσιολογική καταγραφή και στην μονιμοποίηση τους ώστε να προκύψουν τομές (μικρότερου πλέον πάχους) για ανοσοϊστοχημική χρώση και χρώση εωσίνης-αιματοξυλίνης (E/H). Συγκεκριμένα, οι μεθοδολογίες που ακολουθήθηκαν έχουν ως εξής:

Πειραματόζωα: για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί ενήλικες αρουραίοι Wistar, βάρους 200-300gr. Τα ζώα στεγάζονταν σε κλουβιά, σε ομάδες των 3-4 ατόμων και είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε νερό και τροφή. Στο θάλαμο που βρίσκονταν τα κλουβιά διατηρούνταν σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας με εναλλαγή σκότους-φωτός κάθε 12 ώρες, σύμφωνα με τον Ελληνικό Νόμο (Π.Δ. 160/91) που σχετίζεται με τις συνθήκες διαβίωσης και τους κανόνες χειρισμού των αρουραίων.

Συνοπτική παρουσίαση της προετοιμασίας του ιστού: τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν με αποκεφαλισμό σε λαιμητόμο, ύστερα από αναισθητοποίηση τους σε στεγανό δοχείο με αιθέρα. Κατόπιν με γρήγορους (η διαδικασία στο σύνολο της είχε μέσο όρο διάρκειας τα 16min) και λεπτούς χειρισμούς αφαιρέθηκε ο εγκέφαλος των ζώων, διαχωρίστηκαν τα δύο ημισφαίρια και αποχωρίστηκε ο ιπποκάμπειος σχηματισμός. Σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας ο ιστός διαποτιζόταν με παγωμένο ($T=0-4^{\circ}\text{C}$), τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό (TENY) σύστασης (σε mM): 124 NaCl; 4 KCl; 2 MgSO₄; 2 CaCl₂; 1.25 NaH₂PO₄; 26 NaHCO₃; 10 γλυκόζη σε pH 7.4, που συνεχώς οξυγονώνονταν με μείγμα αερίου σύστασης 95% O₂-5% CO₂. Αφού παρασκευάστηκε ο ιπποκάμπος από κάθε ημισφαίριο (το δεξί ημισφαίριο με χρονική υστέρηση 3-5min σε σχέση με το αριστερό) τοποθετήθηκε στην έδρα μικροτόμου και ελήφθησαν εγκάρσιες τομές, ως προς τον επιμήκη άξονά του, πάχους 500μm, τόσο από την κοιλιακή όσο και από τη ραχιαία μοίρα (εικόνα 10). Οι τομές διαχωρίστηκαν σε 3 ομάδες και υπέστησαν επεξεργασία ως εξής: οι φέτες της πρώτης ομάδας (0h) εμβαπτίστηκαν απευθείας σε μονιμοποιητικό διάλυμα. Η δεύτερη ομάδα τομών (1h), μεταφέρθηκε και τοποθετήθηκε στο καταγραφικό λουτρό για μία ώρα, όπου και διαποτιζόταν με TENY, κορεσμένο με O₂ και θερμοκρασία 32-33°C, μετά το πέρας της οποίας εμβαπτίστηκε επίσης στο μονιμοποιητικό διάλυμα. Κατά τη διάρκεια παραμονής της τρίτης ομάδας τομών στο λουτρό καταγραφής (xh), για 5-9 ώρες, πραγματοποιήθηκαν ηλεκτροφυσιολογικές ενδοκυττάρειες καταγραφές από πυραμιδικούς νευρώνες της CA1 περιοχής. Μετά το πέρας των καταγραφών, όλες οι φέτες (0h, 1h, xh) διατηρήθηκαν στο ψυγείο όπου και παρέμειναν κατά τη διάρκεια της νύχτας. Το

μονιμοποιητικό μέσο ήταν διάλυμα παραφορμαλδεΐδης (4% PFA) σε 0,1M PB (0,1M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/0,1\text{M K}_2\text{HPO}_4$) pH=7,4. Ακολούθησε αφυδάτωση και σκλήνωση των τομών σε παραφίνη. Από τα μπλοκ παραφίνης λήφθηκαν τομές πάχους 4μm και πραγματοποιήθηκε ιστολογική χρώση εωσίνης-αιματοξυλίνης και ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του νευροδιαβιβαστή GABA.



Εικόνα 10. Σχηματική απεικόνιση της προετοιμασίας τομών του ραχιαίου και του κοιλιακού ιπποκάμπου. Αριστερά της εικόνας: απεικόνιση της θέσης της δομής στον εγκέφαλο επίμυος. Δεξιά της εικόνας: A. μούρες του ραχιαίου και του κοιλιακού ιπποκάμπου από τις οποίες παρασκευάστηκαν οι φέτες καταγραφής. B1, B2: εγκάρσιες τομές του κοιλιακού και του ραχιαίου ιπποκάμπου, αντίστοιχα [63,46 (τροποποιημένη)].

Αφυδάτωση των τομών: Για την αφυδάτωση ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο: οι φέτες μετά το πέρας της 24ώρου παραμονής τους στην PFA, ξεπλύθηκαν καλά για 15' κάτω από τρεχούμενο νερό βρύσης, τοποθετημένες σε κατάλληλες πλαστικές κασέτες. Έπειτα τοποθετήθηκαν διαδοχικά σε διαλύματα αλκοόλης σταδιακά αυξανόμενης πυκνότητας (50°, 70°, 95°, 100°), για 30' σε κάθε διάλυμα, με σκοπό την πλήρη αφυδάτωσή τους. Ακολούθησε παραμονή των τομών σε δύο διαδοχικά καθαρά διαλύματα ξυλόλης, για 60' σε κάθε διάλυμα, ώστε να αντικατασταθεί το μέσο αφυδάτωσης από την ξυλόλη που αποτελεί συμβατό διαλύτη με το μέσο έγκλεισης (παραφίνη). Οι τομές εν συνεχεία, παρέμειναν σε δύο διαδοχικά διαλύματα καθαρής παραφίνης (60' σε κάθε διάλυμα), μέσα σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 60-62°C. Τέλος, οι τομές εγκλείστηκαν σε παραφίνη και διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την τελική τους χρήση (block παραφίνης).

Θάλαμος καταγραφής: ο θάλαμος καταγραφής απαρτίζεται από την έδρα και τον εσωτερικό θάλαμο. Στην έδρα τοποθετούνται οι τομές, οι οποίες σταθεροποιούνται με ένα κομμάτι διηθητικό χαρτί και διαποτίζονται με TENY, κορεσμένο σε O_2 και θερμοκρασία 32-33°C. Το TENY τοποθετείται σε κατάλληλη φιάλη χωρητικότητας 500ml, και διοχετεύεται στις τομές μέσω σωλήνα ο οποίος πρώτα περιελίσσεται μέσα στον εσωτερικό θάλαμο όπου περιέχεται νερό θερμοκρασίας 33°C προκειμένου να το θερμάνει. Επιπλέον

φέρει μικροχειριστές για την τοποθέτηση των ηλεκτροδίων στη CA1 περιοχή του υποκάμπου και πηγή ψυχρού (για την προστασία των τομών από υπερθέρμανση) φωτισμού για την οπτικοποίηση του ιστού. Τέλος το όλο σύστημα είναι τοποθετημένο πάνω σε αντικραδασμική τράπεζα και περιβάλλεται από κλωβό Faraday για να εξουδετερώνεται ο εξωτερικός ηλεκτρικός θόρυβος.

Ενδοκυτταρικές καταγραφές: Τα ηλεκτρόδια καταγραφής κατασκευάστηκαν από κατάλληλους γυάλινους μικροσωλήνες διαμέτρου 1,2mm με τη βοήθεια εξολκέα τύπου Brown-flaming (μοντέλο P-97 Sutter Instruments California) και είχαν αντίσταση $\approx 65-85$ MΩ. Τα ηλεκτρόδια οδηγήθηκαν στο ανατομικό σημείο καταγραφής του ιστού (πυραμιδική στιβάδα της περιοχής CA1) με τη βοήθεια ενός μικροσκοπίου Nikon. Ηλεκτρικοί παλμοί παρήχθησαν με ερεθισματοδότη (master-8 A.M.P.I) και ενισχύθηκαν με ενισχυτή τύπου Axoclamp 2B (Axon Instruments Inc.). Η προβολή του ενισχυμένου σήματος έγινε σε αναλογικό παλμογράφο (HAMEG HM-305) με σκοπό τη συνεχή παρακολούθηση των αποκρίσεων του δυναμικού της μεμβράνης. Το σήμα μετατράπηκε σε αναλογικό με μετατροπέα σήματος (αναλογικού-ψηφιακού και αντίστροφα, Digidata 1200, Axon Instruments). Για την πρόσληψη και ανάλυση δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα pCLAMP 5.03 (Axon Instruments). Τα πειραματικά αποτελέσματα αποτυπώνονταν σε καταγραφικό χαρτί (Astromed, DASH IV, Model XL). Όλα τα δεδομένα λήφθηκαν, καταγράφηκαν, αποθηκεύτηκαν και αναλύθηκαν με τη βοήθεια προσωπικού H/Y. Μετασυναπτικά δυναμικά προκλήθηκαν μετά από διέγερση των παράπλευρων ινών του Schaffer με ηλεκτρόδιο ερεθισμού τοποθετημένου σε απόσταση 500μm από το ηλεκτρόδιο καταγραφής.

Λήψη τομών: από τα blocks παραφίνης ελήφθησαν, με τη βοήθεια μικροτόμου κοπής, τομές πάχους 4μm, σε βάθος 100-200μm περίπου από την επιφάνεια του ιστού. Λαμβάνονταν 3 διαδοχικές τομές από κάθε block. Η πρώτη και η τρίτη τοποθετούνταν σε αντικειμενοφόρους κατάλληλες για σήμανση με ανοσοφθορισμό, ενώ η δεύτερη σε απλές αντικειμενοφόρους για χρώση με Εωσίνη-Αιματοξυλίνη. Η χρώση με Εωσίνη-Αιματοξυλίνη έγινε με σκοπό να διασφαλιστεί, στο μεγαλύτερο δυνατό βαθμό, η δυνατότητα αξιολόγησης της βιωσιμότητας του ιστού, την ώρα της μονιμοποίησης. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε η μεσαία τομή χρωσμένη με E/H ως σημείο αναφοράς της βιωσιμότητας του ιστού συγκριτικά με τις εκατέρωθεν της τομές που είχαν χρωσθεί ανοσοϊστοχημικά.

Χρώση τομών E/H: για τη συγκεκριμένη χρώση, οι αντικειμενοφόρες που προέκυψαν παραπάνω τοποθετούνταν για 1,5 ώρες σε κλίβανο με σταθερή θερμοκρασία

60°C, ώστε να απομακρυνθεί η παραφίνη. Έπειτα τοποθετούνταν σε διάλυμα ξυλόλης για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα της παραφίνης, ακολουθούσε εμβάπτιση σε διαβαθμισμένης πυκνότητας διαλύματα αλκοόλης, διάλυμα αιματοξυλίνης (βάφει τη χρωματίνη των πυρήνων μωβ) και εωσίνης (βάφει το κυτταρόπλασμα των κυττάρων του ιστού ροζ) και ξεπλένονταν με νερό βρύσης. Οι τομές παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο, κατόπιν έγινε λήψη φωτογραφιών από όλες τις περιοχές του ιπποκάμπου, με χρήση κάμερας συνδεδεμένης με το μικροσκόπιο και τέλος έγινε αξιολόγηση της βιωσιμότητας του ιστού.

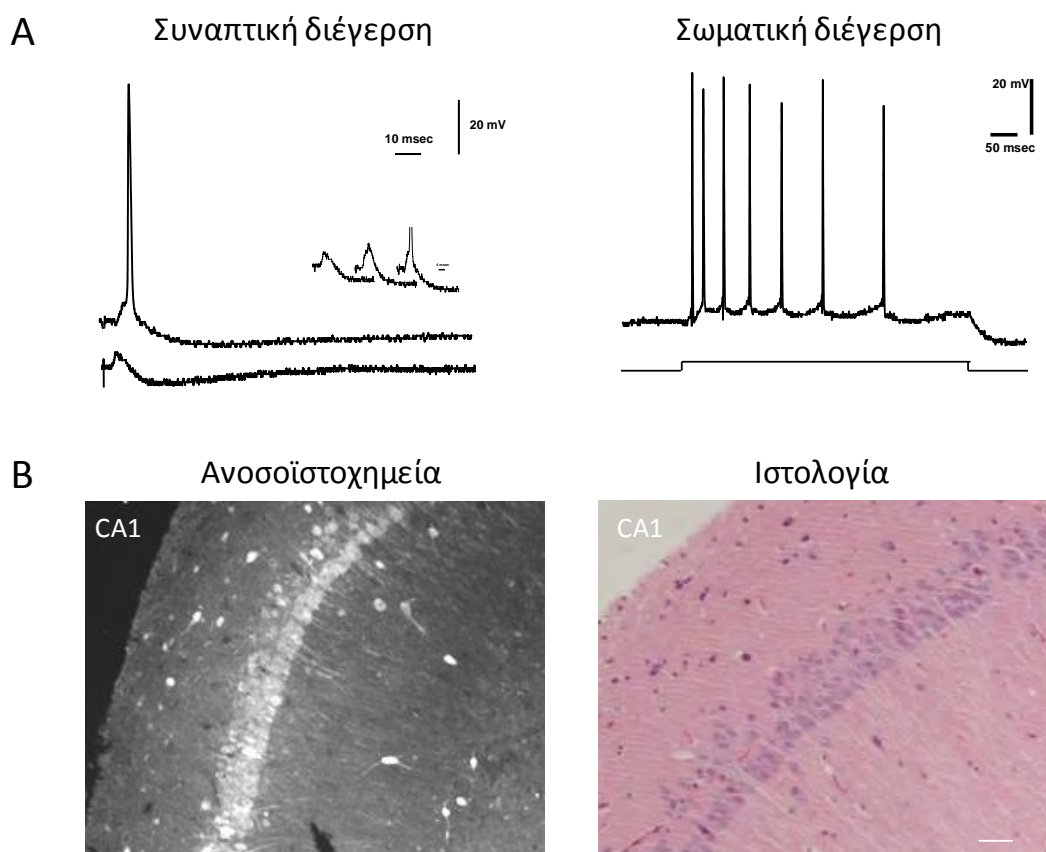
Σήμανση τομών με ανοσοφθορισμό για GABA: ο ιστός παρέμεινε σε κλίβανο για ένα 24ώρο και ακολουθούσε το παρακάτω πρωτόκολλο: την πρώτη μέρα έγινε αποπαραφίνωση των τομών με εμβύθιση σε ξυλένιο (2φορές για 6min) και ενυδάτωση σε διαλύματα αιθανόλης διαβαθμισμένης συγκέντρωσης (100%, 95%, 80%, 70% και 50%) για 5min σε έκαστο. Ακολούθησε επώαση σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος 0,01M, pH=6.0 το οποίο θερμαινόταν με τη χρήση φούρνου μικροκυμάτων για 3min στα 750W και για 7 min στα 350W. Εν συνεχεία, οι τομές επώαστηκαν με 10% Normal Goat Serum σε PBS (0.1M NaH₂PO₄, 0.1M Na₂HPO₄ και 0.9% NaCl, pH 7.4), blocking, και ακολούθησε η επώαση με το διάλυμα του πρώτου αντισώματος (Ab rabbit anti-GABA) σε συγκέντρωση 1:500 (0,5% Triton X σε PBS) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και μετά στους 4° overnight. Τη δεύτερη μέρα, έγινε έκπλυση των τομών με PBS για την απομάκρυνση του πρώτου αντισώματος και έπειτα επώαστηκαν με το διάλυμα του δεύτερου φθορίζοντος αντισώματος (Ab anti-rabbit Alexa 555) σε συγκέντρωση 1:400 σε PBS για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, έγινε έγκλειση σε antifade-mounting medium με την τοποθέτηση καλυπτρίδων και χρήση μανό για σταθεροποίηση.

Μικροσκοπία: Οι τομές παρατηρήθηκαν υπό μικροσκοπίου φθορισμού και ελήφθησαν φωτογραφίες όλων των περιοχών του ιπποκάμπου με τη χρήση software (CytoVision). Για την λεπτομερή απεικόνιση του ιστού ήταν απαραίτητη η λήψη μεγάλου αριθμού διαδοχικών φωτογραφιών ώστε να μπορέσει να γίνει ανακατασκευή της συνολικής εικόνας της τομής. Η καταμέτρηση των νευρώνων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό ανάλυσης εικόνας ImageJ. Συγκρίσεις μεταξύ των μέσων όρων των τιμών έγιναν με το Student's T-test. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε σε p<0,05.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ενδοκυττάρια καταγραφές πραγματοποιήθηκαν από πυραμιδικούς νευρώνες ($n=5$) της CA1 περιοχής από τομές ($n=4$) της κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου με μικροηλεκτρόδια αντίστασης 65-85 MΩ. Το δυναμικό ηρεμίας των πυραμιδικών νευρώνων ήταν $-65,4 \pm 0,5$ mV. Συναπτική διέγερση των νευρώνων (5-24V), η οποία πραγματοποιήθηκε με ηλεκτρόδιο διέγερσης τοποθετημένο στις παράπλευρες ίνες του Schaffer, προκάλεσε υποουδικά διεγερτικά μετασυναπτικά δυναμικά (excitatory postsynaptic potentials, EPSPs) ακολουθούμενα από ανασταλτικά μετασυναπτικά δυναμικά (inhibitory postsynaptic potentials, IPSPs) (εικόνα 11 A αριστερά και ένθετο). Αύξηση της έντασης διέγερσης των παράπλευρων ινών του Schaffer οδήγησε σε αύξηση του πλάτους τόσο του διεγερτικού όσο και του ανασταλτικού μετασυναπτικού δυναμικού (εικόνα 11 A αριστερά, ένθετο) μέχρι του σημείου πρόκλησης δυναμικού ενέργειας (ουδικό ερέθισμα, 25V). Ενδοκυττάρια εφαρμογή εκπολωτικών τετράγωνων παλμών πλάτους 0,05-1,0 nA και διάρκειας 500 ms οδήγησε στην εκπόλωση των νευρώνων και την πρόκληση δυναμικών ενέργειας (εικόνα 11 A δεξιά 0,3 nA). Η ηλεκτροφυσιολογική καταγραφή της εικόνας 11A πραγματοποιήθηκε μετά από 6,5 ώρες επώασης της τομής σε TENV. Τόσο η συναπτική όσο και σωματική διέγερση των νευρώνων υποδηλώνουν την άρτια βιωσιμότητα του ιστού.

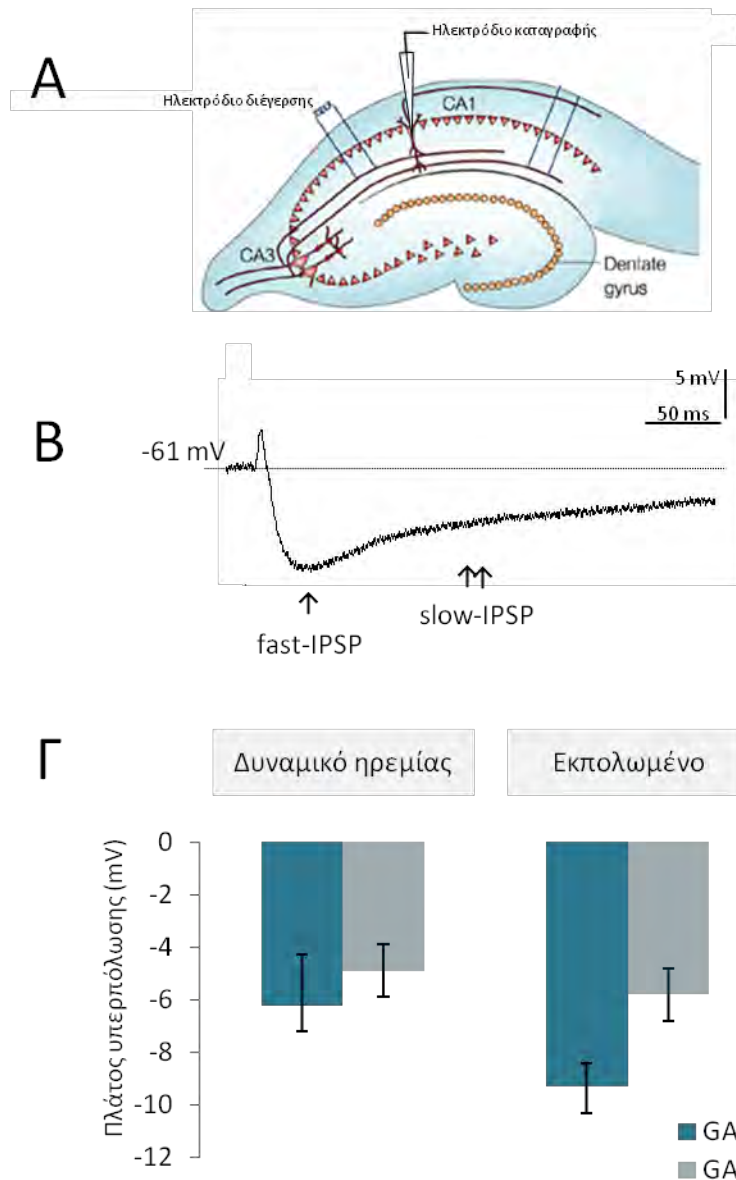
Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφυσιολογικής καταγραφής, η τομή του κοιλιακού ιπποκάμπου μεταφέρθηκε σε μονιμοποιητικό διάλυμα (4% PFA) και μετά το πέρας της διαδικασίας αφυδάτωσης και έγκλεισης σε παραφίνη ακολούθησε η ανοσοϊστοχημική και ιστολογική χρώση της (εικόνα 11B). Η ανοσοϊστοχημική χρώση των τομών, ανέδειξε, υπό μικροσκοπία φθορισμού, άρτια κυτταρο-αρχιτεκτονική δομή του ιστού, κανονική διάταξη των πυραμιδικών νευρώνων κατά μήκος της πυραμιδικής στιβάδας και σεσημασμένα κύτταρα με άρτια μικροσκοπική δομή/μορφολογία και έντονο σήμα χρώσης (εικόνα 11B, αριστερά). Παρομοίως, η ιστολογική χρώση των τομών με εωσίνη/αιματοξυλίνη ανέδειξε, υπό οπτικό μικροσκόπιο, άρτια κυτταρο-αρχιτεκτονική δομή του ιστού και κανονική διάταξη των πυραμιδικών νευρώνων κατά μήκος της πυραμιδικής στιβάδας (εικόνα 11B, δεξιά). Οι νευρώνες χαρακτηρίζονταν από ελαφρά χρωσμένο κυτταρόπλασμα, διακριτούς πυρήνες και εύκολα διακριτές πυρηνικές μεμβράνες.



Εικόνα 11. Λειτουργικοί και μορφολογικοί δείκτες βιωσιμότητας του ιπποκάμπου. Α. Ενδοκυττάρια καταγραφές από πυραμιδικό νευρώνα της CA1 περιοχής φέτας κοιλιακού ιπποκάμπου (500μm) μετά από ≈7ωρη επώαση σε TENY. Οι συναπτικές απαντήσεις του νευρώνα προκλήθηκαν μετά από διέγερση των παράπλευρων ιών του Schaffer (5-24V, αριστερά). Ενδοκυττάρια έγχυση εκπολωτικού ρεύματος προκάλεσε επαναλαμβανόμενη εκφόρτιση του νευρώνα χαρακτηριστική των πυραμιδικών νευρώνων του ιπποκάμπου (δεξιά). (Δυναμικό μεμβράνης: -60 mV). **Β.** Ανοσοϊστοχημική έκφραση του GABA (αριστερά) και ιστολογική χρώση (δεξιά) λεπτής τομής (4μm) του κοιλιακού ιπποκάμπου η οποία προήλθε από την φέτα στην προηγούμενη η ηλεκτροφυσιολογική καταγραφή που φαίνεται στο Α. [41 (τροποποιημένη)]. Κλίμακα: 50 μm.

Τα αποτελέσματα της συνδυασμένης λειτουργικής και μορφολογικής μελέτης του ιπποκάμπου με πειράματα ηλεκτροφυσιολογίας και ανοσοϊστοχημείας/ ιστολογίας που διεξήχθησαν στην ίδια τομή ιστού, υποδηλώνουν ότι η νευρωνική λειτουργία μπορεί να συσχετισθεί με ειδικούς νευρωνικούς δείκτες και τον βαθμό βιωσιμότητας του ιστού (εικόνα 12).

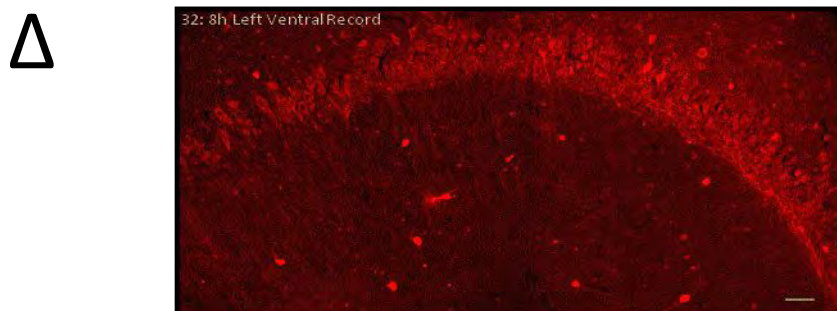
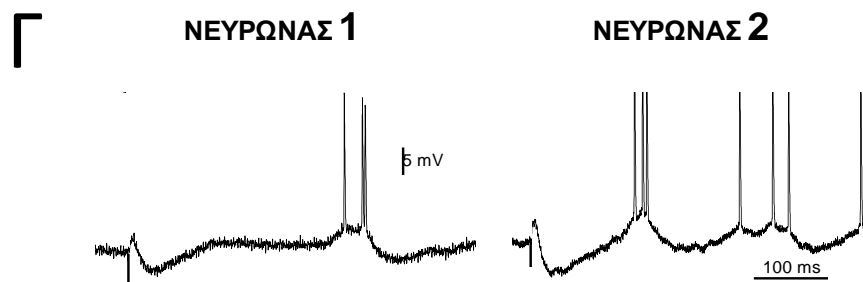
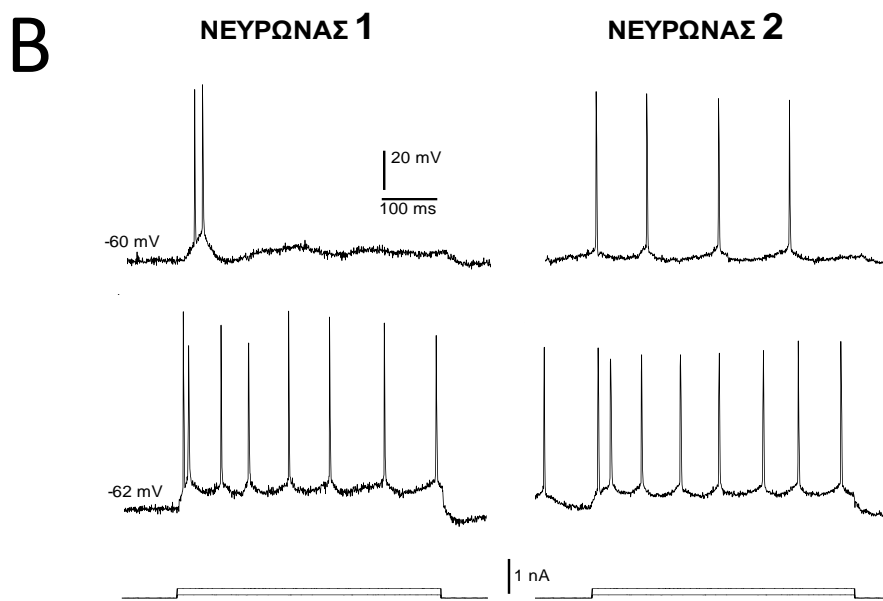
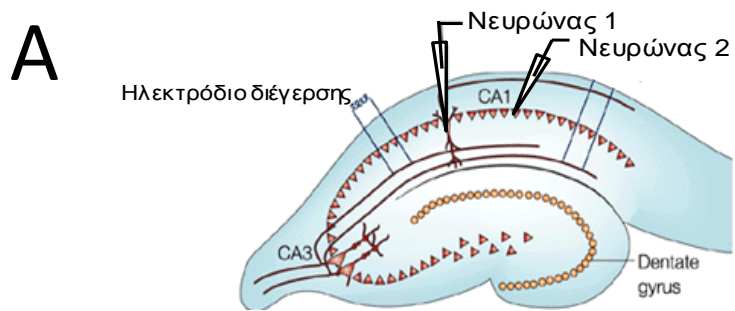
Η λειτουργική μελέτη της GABAεργικής ανασταλτικής νευροδιαβίβασης στον



Εικόνα 12. GABAεργική ανασταλτική διαβίβαση στον ιππόκαμπο, σε τομές κοιλιακού ιπποκάμπου. **A.** Σχηματική απεικόνιση τομής του ιπποκάμπου όπου φαίνεται η ακριβής θέση του ηλεκτροδίου καταγραφής κατά μήκος της πυραμδικής στιβάδας της CA1 περιοχής και του ηλεκτροδίου διέγερσης κατά μήκος των παράπλευρων ιών του Schaffer στην ακτινωτή στιβάδα. **B.** Τα μετασυναπτικά δυναμικά που καταγράφονται μετά από διέγερση των παράπλευρων ιών του Schaffer συνίστανται από διεγερτικό μετασυναπτικό δυναμικό ακολουθούμενο από ταχύ- (fast-, απλό βέλος) και αργό- (slow-, διπλό βέλος) υπερπολωτικό δυναμικό (inhibitory postsynaptic potential, IPSP). **Γ.** Γραφική απεικόνιση του μέσου όρου του πλάτους των fast- και slow-IPSP στο δυναμικό ηρεμίας των νευρώνων και σε εκπολωμένο δυναμικό μεμβράνης. [28 (τροποποιημένη)]. *Κλίμακα: 100 μm.*

ιππόκαμπο πραγματοποιήθηκε με ενδοκυττάρια καταγραφές μετά από διέγερση των παράπλευρων ιών του Schaffer. Μια τυπική καταγραφή μετασυναπτικών δυναμικών συνίσταται από διεγερτικό μετασυναπτικό δυναμικό (excitatory postsynaptic potential, EPSP) ακολουθούμενο από ταχύ- (fast-, απλό βέλος) και αργό- (slow-, διπλό βέλος) υπερπολωτικό δυναμικό (inhibitory postsynaptic potential, IPSP; εικόνα 12B). Το fast-IPSP χαρακτηρίζεται από χρόνο επίτευξης μέγιστου πλάτους $\approx 50\text{ms}$ και διαμεσολαβείται από υποδοχείς τύπου GABA_A , ενώ το slow-IPSP χαρακτηρίζεται από χρόνο επίτευξης μέγιστου πλάτους $\approx 150\text{ms}$ και διαμεσολαβείται από υποδοχείς τύπου GABA_B (εικόνα 12B, απλό και διπλό βέλος, αντίστοιχα). Το πλάτος των ανασταλτικών μετασυναπτικών δυναμικών υπολογίστηκε σε δύο διαφορετικά δυναμικά της κυτταρικής μεμβράνης, δηλαδή στο δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης $\approx -65\text{mV}$ και σε εκπολωμένο μεμβρανικό δυναμικό $\approx -59\text{mV}$. Στόχος της διατήρησης της κυτταρικής μεμβράνης σε εκπολωμένο δυναμικό, η οποία επετεύχθη με ενδοκυττάρια έγχυση συνεχούς ρεύματος (DC current injection), ήταν η αύξηση του πλάτους του IPSP και, επομένως, η ευχερέστερη μελέτη του. Πράγματι, όπως είναι γνωστό η απομάκρυνση του δυναμικού της μεμβράνης από το δυναμικό αντιστροφής του IPSP έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του πλάτους του. Υπό αυτές τις συνθήκες καταγραφής, βρέθηκε ότι το πλάτος του fast-IPSP είναι $-6,2 \pm 1,9 \text{ mV}$ ($n=5$) και $-9,3 \pm 1,0 \text{ mV}$ ($n=5$) σε δυναμικό ηρεμίας και σε εκπολωμένο μεμβρανικό δυναμικό, αντίστοιχα και του slow-IPSP $-4,9 \pm 0,9 \text{ mV}$ ($n=5$) $-5,8 \pm 1,0 \text{ mV}$ ($n=4$) σε δυναμικό ηρεμίας και σε εκπολωμένο μεμβρανικό δυναμικό, αντίστοιχα.

Εικόνα 13. (επόμενη σελίδα): Συνδυασμός λειτουργικής και μορφολογικής μελέτης του ιπποκάμπου. Α. Σχηματική απεικόνιση τομής του ιπποκάμπου όπου φαίνεται η ακριβής θέση ηλεκτροδίων καταγραφής κατά μήκος της πυραμιδικής στιβάδας της CA1 περιοχής και του ηλεκτροδίου διέγερσης κατά μήκος των παράπλευρων ιών του Schaffer στην ακτινωτή στιβάδα. Διαδοχική καταγραφή έγινε από δύο νευρώνες με διαφορετικά ηλεκτροφυσιολογικά χαρακτηριστικά. **Β.** Ενδοκυττάρια έγχυση εκπολωτικού ρεύματος ίδιου πλάτους προκάλεσε διαφορετικού μοτίβου επαναλαμβανόμενες εκφορτίσεις σε γειτονικούς νευρώνες του ιπποκάμπου. **Γ.** Μεγάλου πλάτους μετασυναπτικά δυναμικά των νευρώνων που εμφανίζονται στο Β. (Δυναμικό μεμβράνης: -60 mV). **Δ.** Ανακατασκευασμένη μικροφωτογραφία της CA1 περιοχής της τομής ιπποκάμπου στην οποία πραγματοποιήθηκαν οι ενδοκυττάρια καταγραφές των Β και Γ. Παρατηρούνται ανοσοθετικοί στο GABA νευρώνες [28 (τροποποιημένη)].



Στις εικόνες που ακολουθούν παρατίθενται σειρά φωτομικρογραφιών των ανοσοϊστοχημικά επεξεργασμένων τομών της ραχιαίας και της κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου φωτογραφηθέντων σε μικροσκόπιο φθορισμού σε κάθε περιοχή του ιπποκάμπου (CA1, εικόνα 14; CA3, εικόνα 16; οδοντωτή έλικα, DG, εικόνα 17; υπόθεμα, SUB, εικόνα 18). Σε κάθε εικόνα αντιπαραβάλλονται φωτομικρογραφίες των ανοσοϊστοχημικά χρωσθέντων ιστών, οι οποίοι μονιμοποιήθηκαν είτε άμεσα (0h), είτε μετά από επώαση 1h ή 3h σε TENY.

Στην εικόνα 14 παρατίθενται παραδείγματα φωτομικρογραφιών της CA1 περιοχής στις οποίες παρατηρείται μείωση του αριθμού των σημασμένων νευρώνων της ραχιαίας μοίρας από την 0h στη 1h, ενώ 6,5h μετά την επώαση σε TENY εμφανίζεται αύξηση του αριθμού αυτού. Αντίθετα, στην κοιλιακή μοίρα, ο αριθμός των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων παραμένει σχεδόν σταθερός και στις τρεις ομάδες (0h, 1h, 6,5h) με εντονότερα χρωσμένους νευρώνες να παρατηρούνται στις ομάδες των 1h και 6,5h. Το αποτέλεσμα αυτό φαίνεται καλύτερα μετά από αναπαράσταση, με αστερίσκους, του συνολικού αριθμού των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων στη CA1 περιοχή της ραχιαίας και κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου στις τρεις υπό μελέτη ομάδες (0h, 1h, 3h) και για το σύνολο των τομών που μελετήθηκαν (εικόνα 15B). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η ομάδα 3h της ραχιαίας μοίρας και 0h της κοιλιακής μοίρας υπολείπονται κατά δύο τομές και μία τομή, αντίστοιχα, καθώς οι τομές αυτές δεν ανακτήθηκαν κατά τη διαδικασία της μονιμοποίησης (πίνακας 2). Ως εκ τούτου, ο αριθμός των καταμετρηθέντων νευρώνων (αστερίσκοι) που εμφανίζονται στις αντίστοιχες ομάδες της εικόνας 15B είναι, αντιστοίχως, μικρότερος. Γραφική παράσταση των μέσων όρων του αριθμού των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων στη CA1 περιοχή έδειξε ότι η ραχιαία μοίρα χαρακτηρίζεται αρχικά από μείωση και κατόπιν από αύξηση των σημασμένων νευρώνων, χωρίς, ωστόσο, οι μεταβολές αυτές να είναι στατιστικά σημαντικές. Αντίθετα, στην κοιλιακή μοίρα ο μέσος όρος του αριθμού των σημασμένων νευρώνων παρέμεινε σταθερός στις τρεις ομάδες (εικόνα 15Γ; πίνακας 2).

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων, αντίστοιχη με αυτήν της CA1 περιοχής, η οποία εφαρμόστηκε στο σύνολο της επιφάνειας της τομής, δηλαδή στο σύνολο των περιοχών του ιπποκάμπου (CA1, CA3, DG, SUB), έδειξε ότι ο μέσος όρος του αριθμού των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων είναι μεγαλύτερος στον κοιλιακό ιπποκάμπο σε σχέση με τον ραχιαίο σε όλες τις ομάδες τις ομάδες επώασης σε TENY (0h, 1h, 3h; εικόνα 19B, Γ) αν και η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικώς σημαντική (πίνακας 2). Συγκεκριμένα, ο αριθμός των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων βρέθηκε να κατανέμεται στη ραχιαία (P) και στην κοιλιακή (K) μοίρα του ιπποκάμπου, αντίστοιχα, ως εξής: 0h: (P) $19,6 \pm 9,8$, (K)

25±17,7; 1h: (P) 29±7,25; (K) 68±17 και xh: (P) 33±16,5; (K) 74±18,5. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τη βιβλιογραφία [36] αλλά και με πρόσφατη μελέτη του εργαστηρίου κατά την οποία βρέθηκε μεγαλύτερος αριθμός ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων στην κοιλιακή μοίρα του ιπποκάμπου, σε σχέση με τη ραχιαία, στις δύο πρώτες ομάδες (0h και 1h) [50,53]. Επίσης, κατά αναλογία με την CA1 περιοχή της ραχιαίας μοίρας του ιπποκάμπου, παρατηρήθηκε αρχική μείωση (0h έναντι 1h) και κατόπιν αύξηση (1h έναντι xh) του αριθμού των σημασμένων νευρώνων (εικόνα 19Γ; πίνακας 2; $p>0,05$) καθόλη την επιφάνεια των τομών τόσο του ραχιαίου όσο και του κοιλιακού ιπποκάμπου.

Πίνακας 2. Αριθμός καταμετρηθέντων ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων στις δύο μοίρες του ιπποκάμπου.

<i>Πείραμα</i>	0h	1h	xh
	PAXIAIOS		
Nov 13, 2013	2	1	16
Nov 18, 2013	5	4	-
Nov 19, 2013	45	9	17
Dec 4, 2013	16	15	-
Σύνολο	68	29	33
Μέσος όρος	19,6±9,8	29,0±7,3	33,0±16,5
	ΚΟΙΛΙΑΚΟΣ		
Nov 13, 2013	-	21	36
Nov 18, 2013	5	4	8
Nov 19, 2013	31	5	9
Dec 4, 2013	39	38	21
Σύνολο	75	68	74
Μέσος όρος	25,0±17,7	68,0±17,0	74,0±18,5

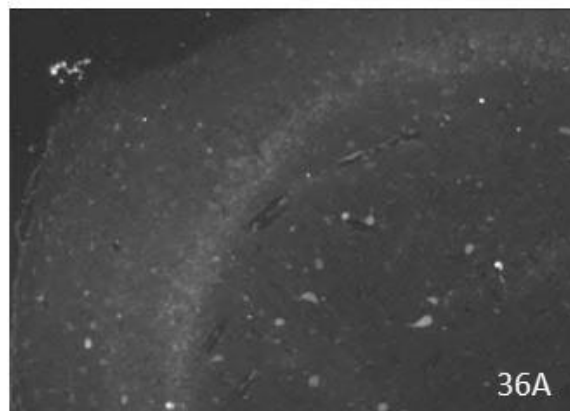
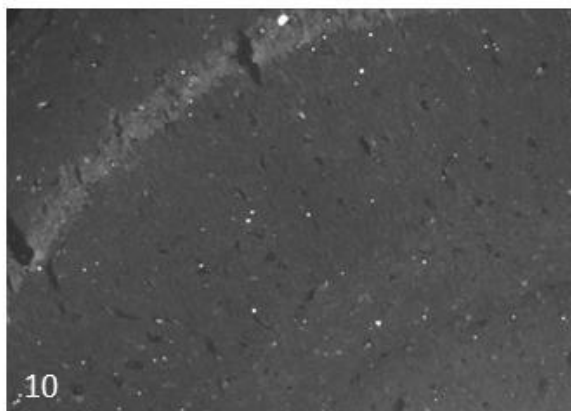
$p>0.05$

CA1

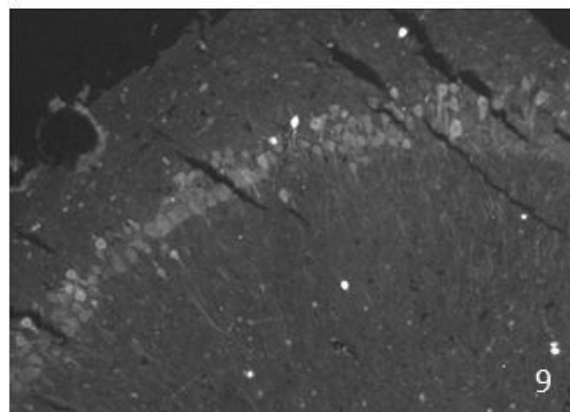
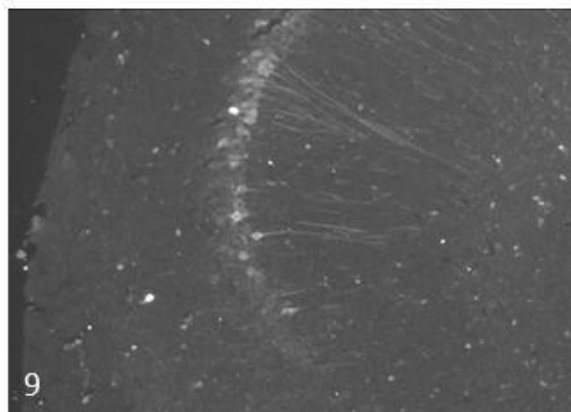
ΡΑΧΙΑΙΑ ΜΟΙΡΑ

ΚΟΙΛΙΑΚΗ ΜΟΙΡΑ

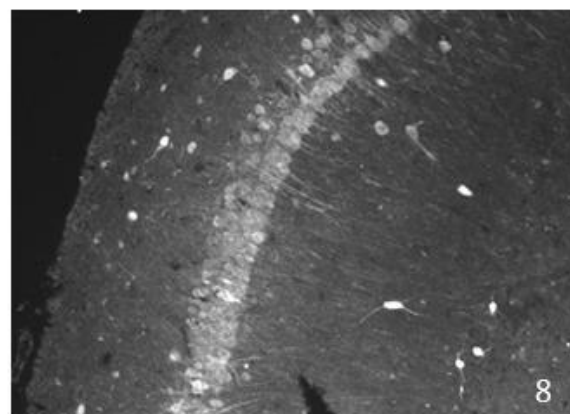
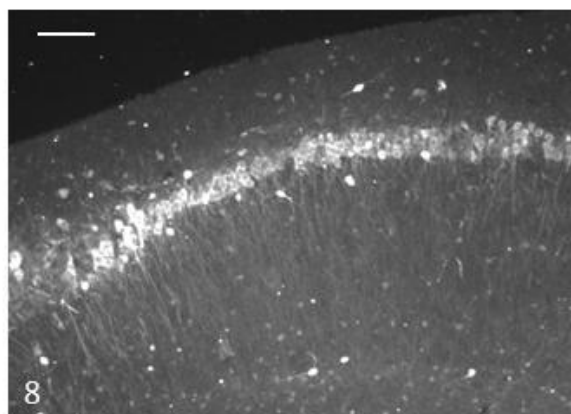
0h



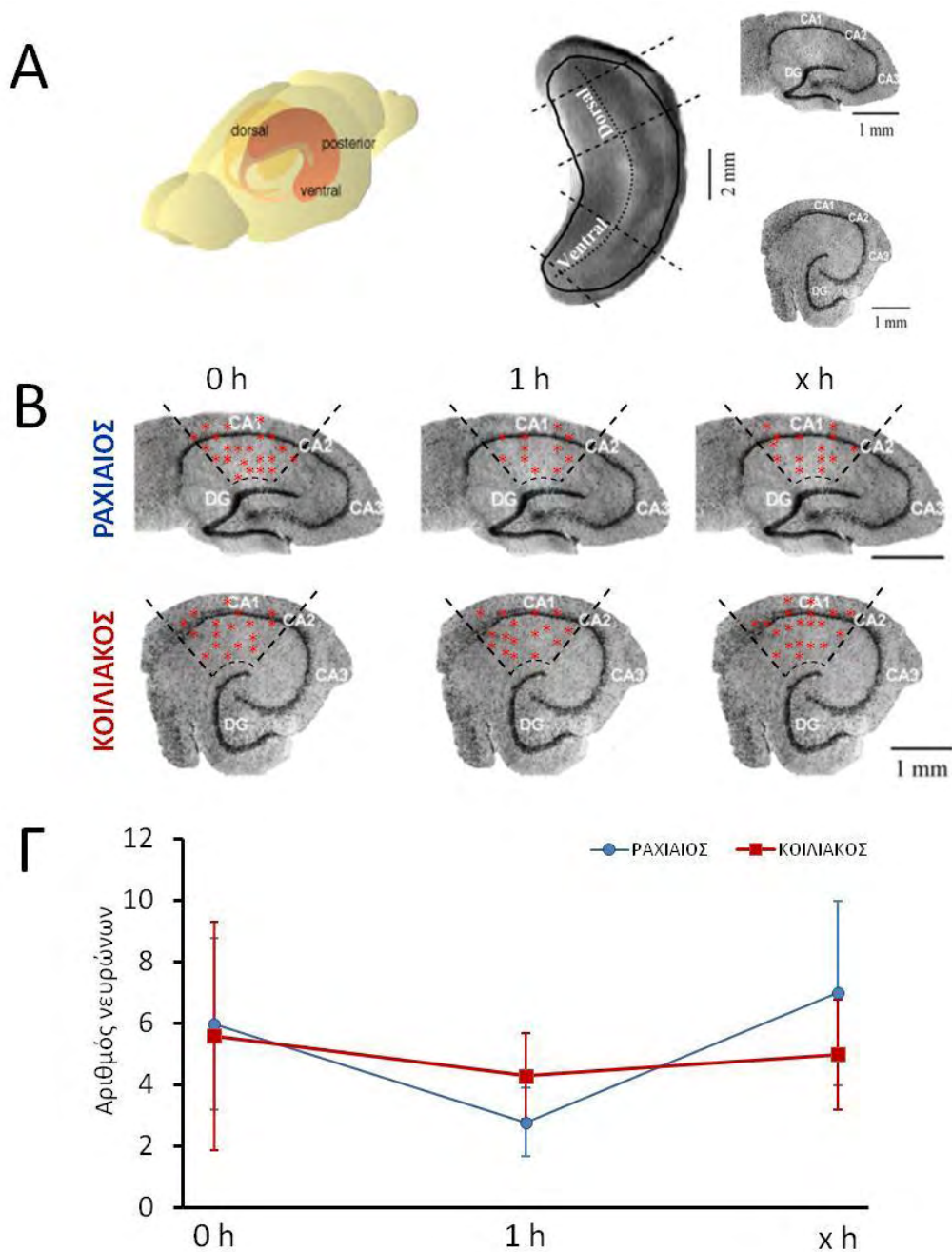
1h



xh



Εικόνα 14. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός του GABA στη CA1 περιοχή σε τομές ιπποκάμπου της ραχιαίας και κοιλιακής μοίρας μετά από 0h, 1h και xh (x=6,5h) παραμονής σε TENY. Παρατηρείται έντονη χρώση ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων μετά από 6,5h παραμονής του ιστού στο TENY. Κλίμακα: 150μm.



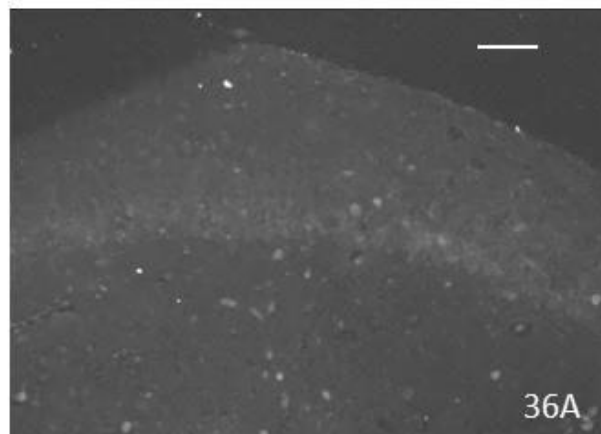
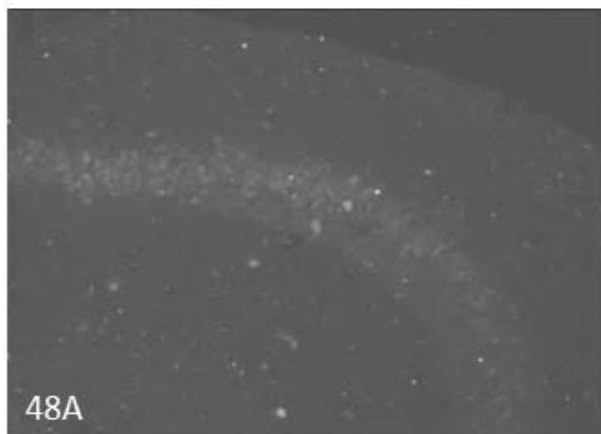
Εικόνα 15. Σχηματική απεικόνιση των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων στη CA1 περιοχή της ραχιαίας και κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου. Α. Η θέση του ιπποκάμπου στον εγκέφαλο αρουραίου (αριστερά) και ο προσανατολισμός του άξονα ως προς τον οποίο κόπηκαν και ελήφθησαν οι τομές της ραχιαίας και της κοιλιακής μοίρας (δεξιά). **Β.** Σχηματική απεικόνιση των εντοπισμένων ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων στη CA1 περιοχή της ραχιαίας και κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου στις τρεις υπό μελέτη ομάδες (0h, 1h, xh). Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τις θέσεις των νευρώνων όπως καταμετρήθηκαν στη CA1 περιοχή (στικτές γραμμές). **Γ.** Γραφική παράσταση των μέσων όρων του αριθμού των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων της ραχιαίας και της κοιλιακής μοίρας των τριών ομάδων που εμφανίζονται στο Β.

CA3

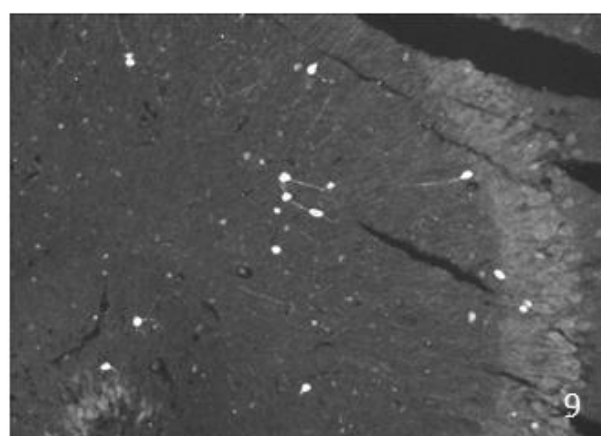
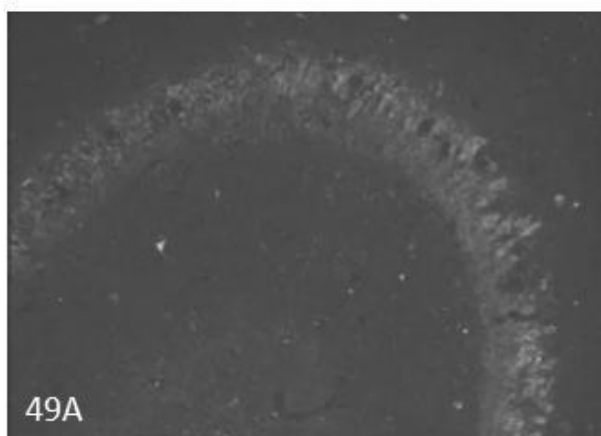
ΡΑΧΙΑΙΑ ΜΟΙΡΑ

ΚΟΙΛΙΑΚΗ ΜΟΙΡΑ

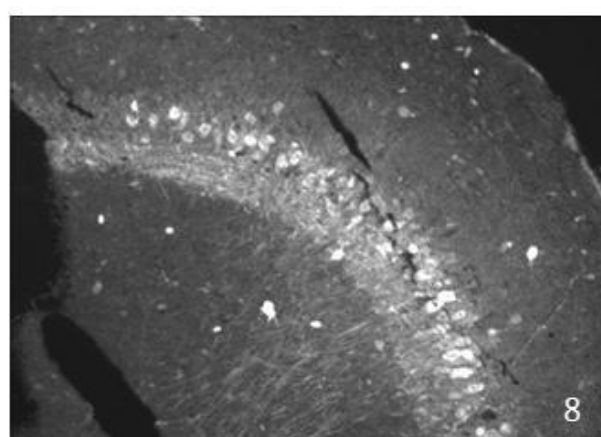
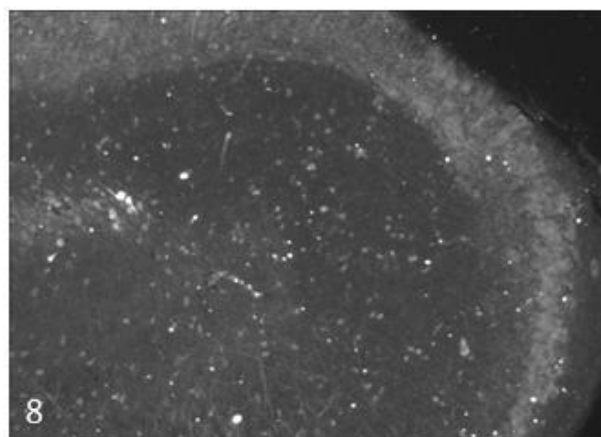
0h



1h



xh



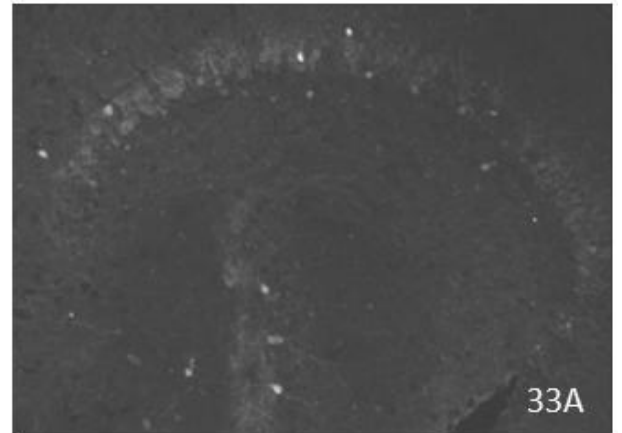
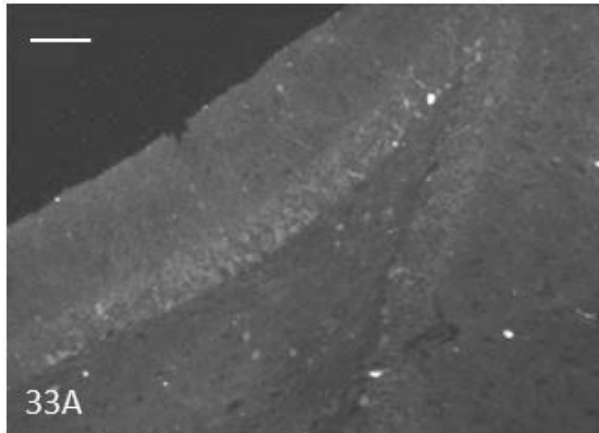
Εικόνα 16. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός του GABA στη CA3 περιοχή σε τομές ιπποκάμπου της ραχιαίας και κοιλιακής μοίρας μετά από 0h, 1h και xh παραμονής σε TENY. Παρατηρείται εντοπισμός περισσότερων ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων στην κοιλιακή μοίρα του ιπποκάμπου και στις τρεις συγκρινόμενες ομάδες. Κλίμακα: 150μm.

DG

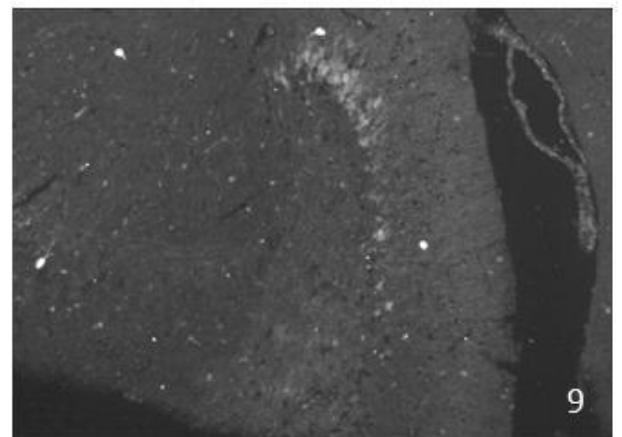
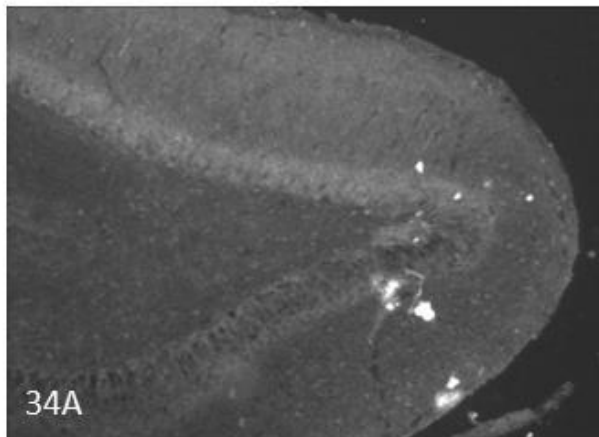
ΡΑΧΙΑΙΑ ΜΟΙΡΑ

ΚΟΙΛΙΑΚΗ ΜΟΙΡΑ

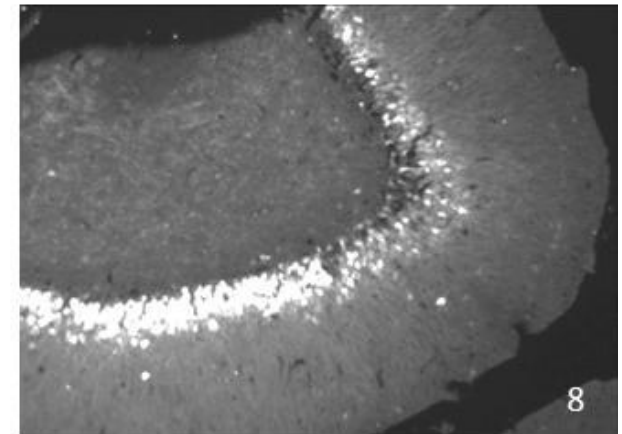
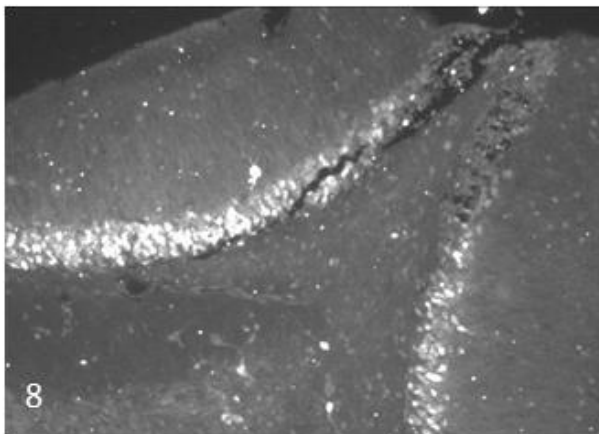
0h



1h



xh



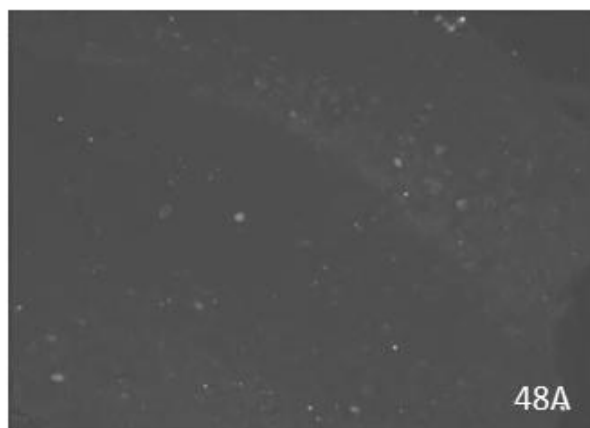
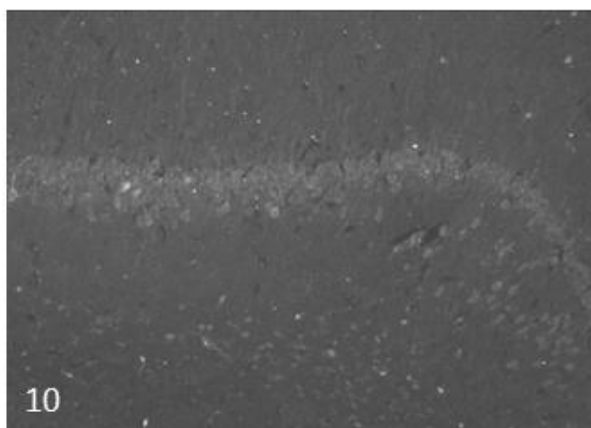
Εικόνα 17. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός του GABA στην οδοντωτή έλικα (DG) σε τομές ιπποκάμπου της ραχιαίας και κοιλιακής μοίρας μετά από 0h, 1h και xh παραμονής σε TENY. Παρατηρείται εντοπισμός περισσότερων ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων στην κοιλιακή μοίρα και στις τρεις συγκρινόμενες ομάδες. Κλίμακα: 150μm.

SUB

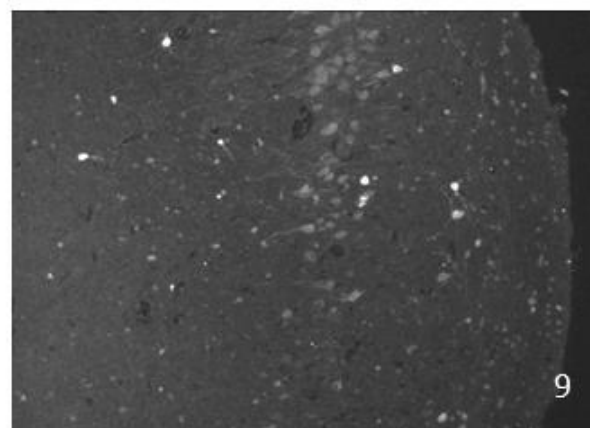
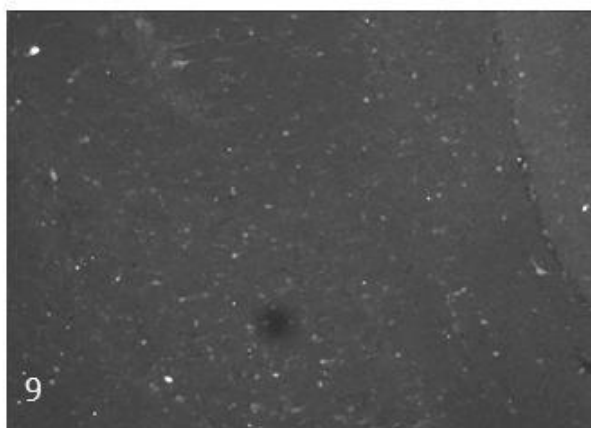
ΡΑΧΙΑΙΑ ΜΟΙΡΑ

ΚΟΙΛΙΑΚΗ ΜΟΙΡΑ

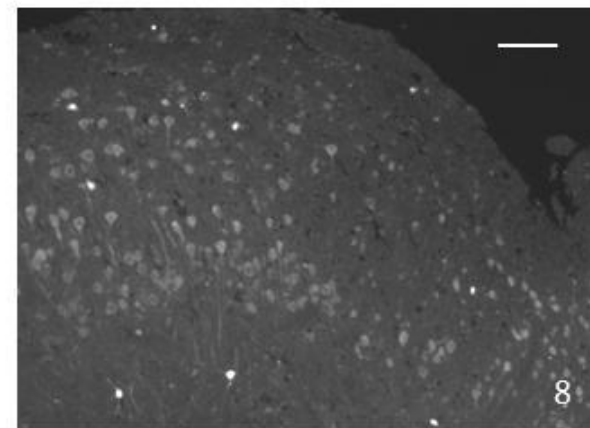
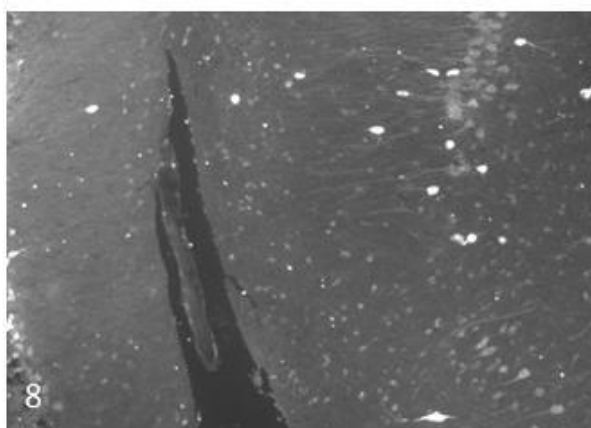
0h



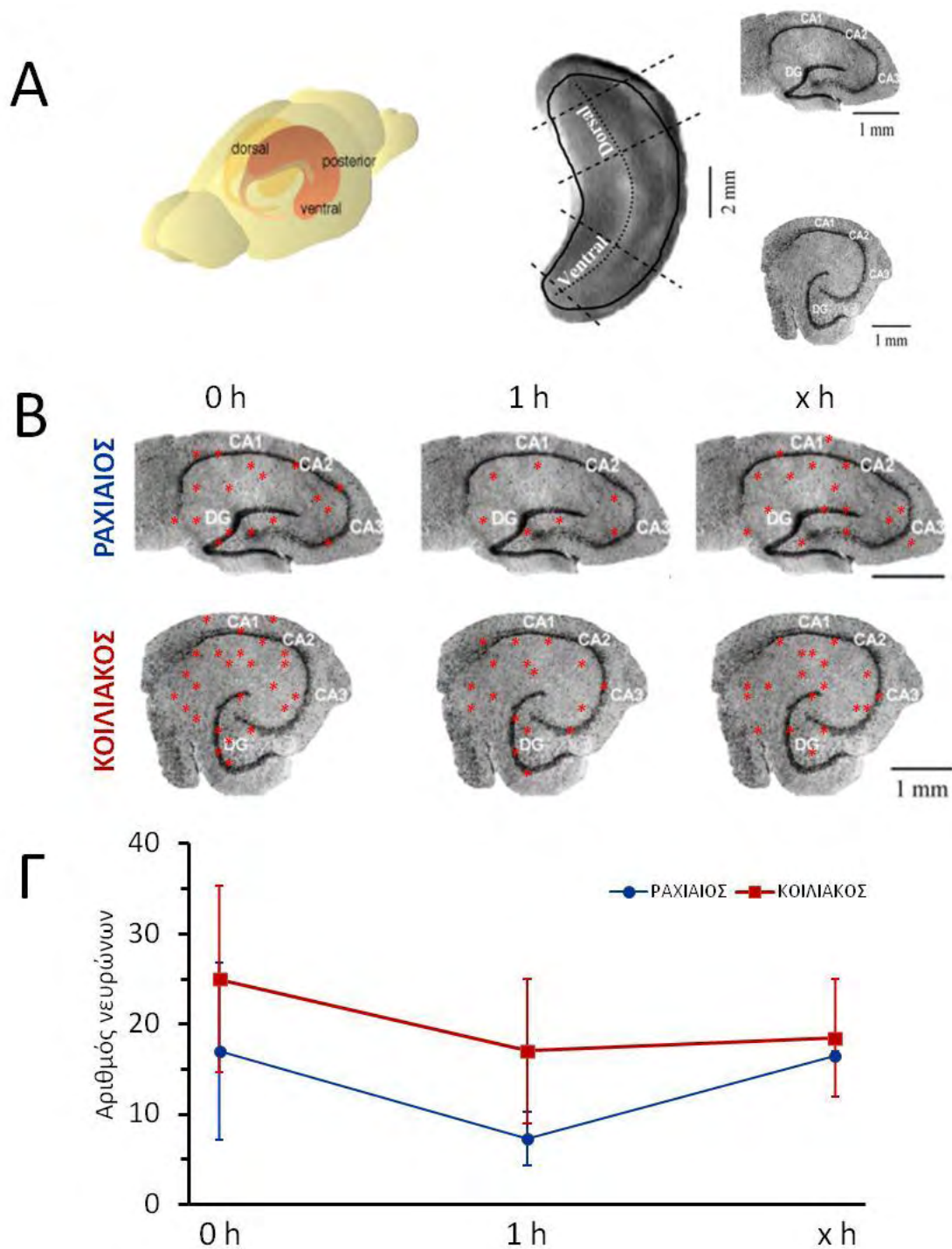
1h



xh



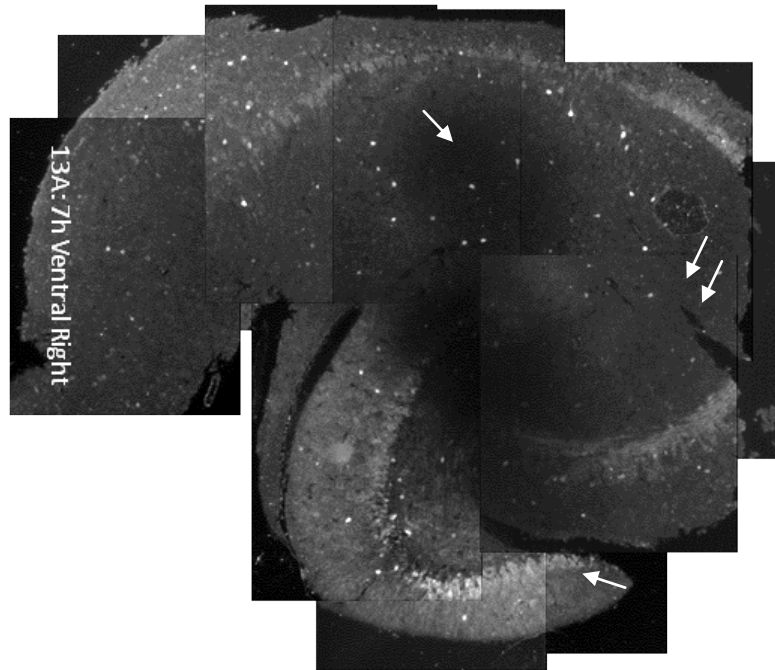
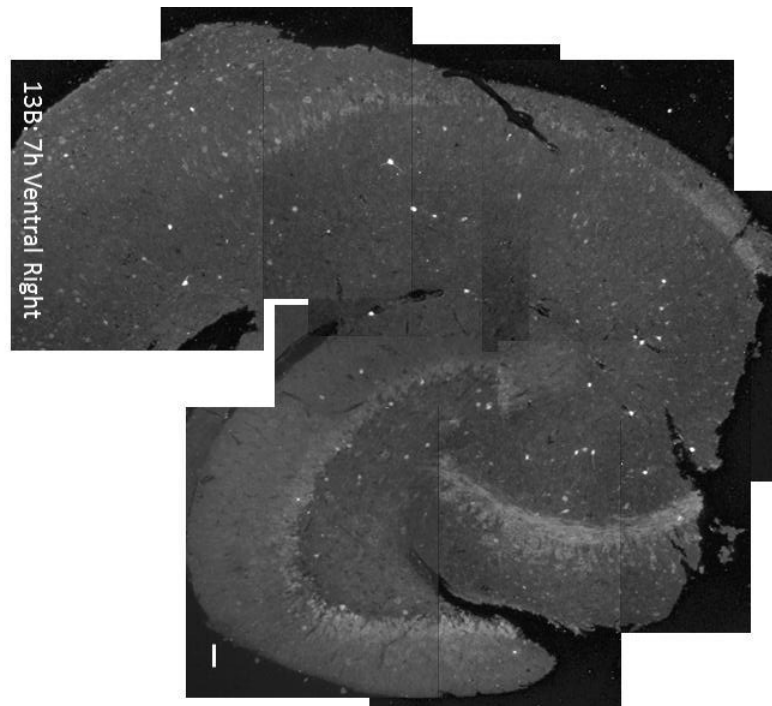
Εικόνα 18. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός του GABA στο υπόθεμα (Sub) σε τομές ιπποκάμπου της ραχιαίας και κοιλιακής μοίρας μετά από 0h, 1h και xh παραμονής σε TENY. Παρατηρείται εντοπισμός περισσότερων ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων στην κοιλιακή μοίρα στις 0h και 1h αλλά στις xh ώρες το αποτέλεσμα αντιστρέφεται. *Κλίμακα: 150μm.*



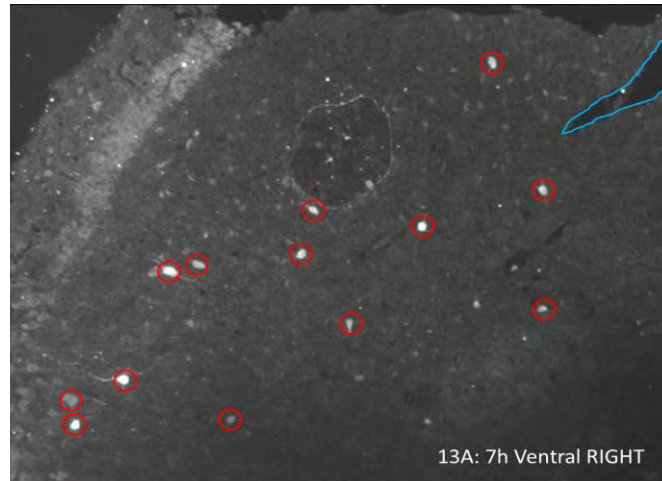
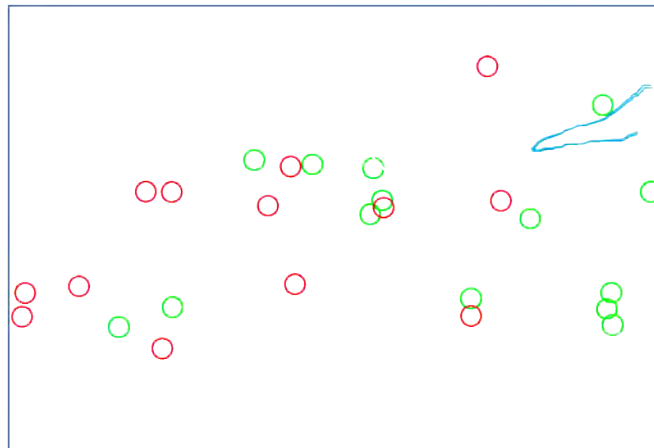
Εικόνα 19. Σχηματική απεικόνιση του συνόλου των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων σε τομές της ραχιαίας και κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου. **A.** Η θέση του ιπποκάμπου στον εγκέφαλο αρουραίου (αριστερά) και ο προσανατολισμός του άξονα ως προς τον οποίο κόπηκαν και ελήφθησαν οι τομές της ραχιαίας και της κοιλιακής μοίρας (δεξιά). **B.** Σχηματική απεικόνιση των εντοπισμένων ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων στη ραχιαία και κοιλιακή μοίρα στις τρεις υπό μελέτη ομάδες (0h, 1h, xh). Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν αντιπροσωπευτικές θέσεις των τιμών των μέσων όρων του αριθμού των νευρώνων της κάθε ομάδας. **Γ.** Γραφική παράσταση των μέσων όρων του αριθμού των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων της ραχιαίας και της κοιλιακής μοίρας των τριών ομάδων που εμφανίζονται στο B.

Προκειμένου να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου (ανοσοϊστοχημεία τομών ιπποκάμπου μετά από μακρά επώαση, 5-9h, σε TENY) πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική χρώση σε διαδοχικές λεπτές τομές ιπποκάμπου (που απείχαν μεταξύ τους 4 μm, βλ. ΜΕΘΟΔΟΙ). Η επεξεργασία των ιστών έγινε ταυτόχρονα ώστε να εξασφαλισθούν πανομοιότυπες πειραματικές συνθήκες. Όπως φαίνεται στην εικόνα 20, παρά την ταυτόχρονη επεξεργασία των τομών σε όλα τα βήματα της πειραματικής διαδικασίας (κοπή τομών, χρόνος επώασης σε TENY, μονιμοποίηση, έγκλειση σε παραφίνη, κοπή λεπτών τομών, ανοσοϊστοχημική χρώση και φωτογράφιση) το ποιοτικό αποτέλεσμα διέφερε μεταξύ των χρωσμένων ιστών. Συγκεκριμένα, η ποιότητα της εικόνας δεν ήταν ομοιόμορφη σε όλα της τα σημεία, με μέρη του ιστού να εμφανίζονται σκιασμένα (εικόνα 20Α, βέλος) και άλλα με ατελή κάλυψη της τομής με το μέσο στερέωσης (mounting medium; εικόνα 20Α, διπλό βέλος). Προκειμένου να διαπιστώσουμε αν αυτό επηρεάζει το ποσοτικό αποτέλεσμα προβήκαμε σε καταμέτρηση των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων στην CA1-CA3 περιοχή των τομών Α και Β της εικόνας 21 Ποσοτική ανάλυση των εικόνων, μετά από καταμέτρηση των νευρώνων σε ίσων διαστάσεων πεδία (εικόνα 21Α και 21Β, έγχρωμοι κύκλοι), έδωσε συγκρίσιμα αποτελέσματα υποδηλώνοντας την αξιοπιστία της μεθόδου. Αξίζει να σημειωθεί ότι η συγχώνευση των σημείων, στα οποία παρατηρούνται νευρώνες στις εικόνες 21Α και Β σε μια νέα εικόνα (εικόνα 21Γ), ανέδειξε διαφορετικές θέσεις των σημασμένων νευρώνων στις δύο τομές υποδηλώνοντας ότι στις τομές αυτές, μολονότι διαδοχικές, δεν απεικονίζονται οι ίδιοι νευρώνες.

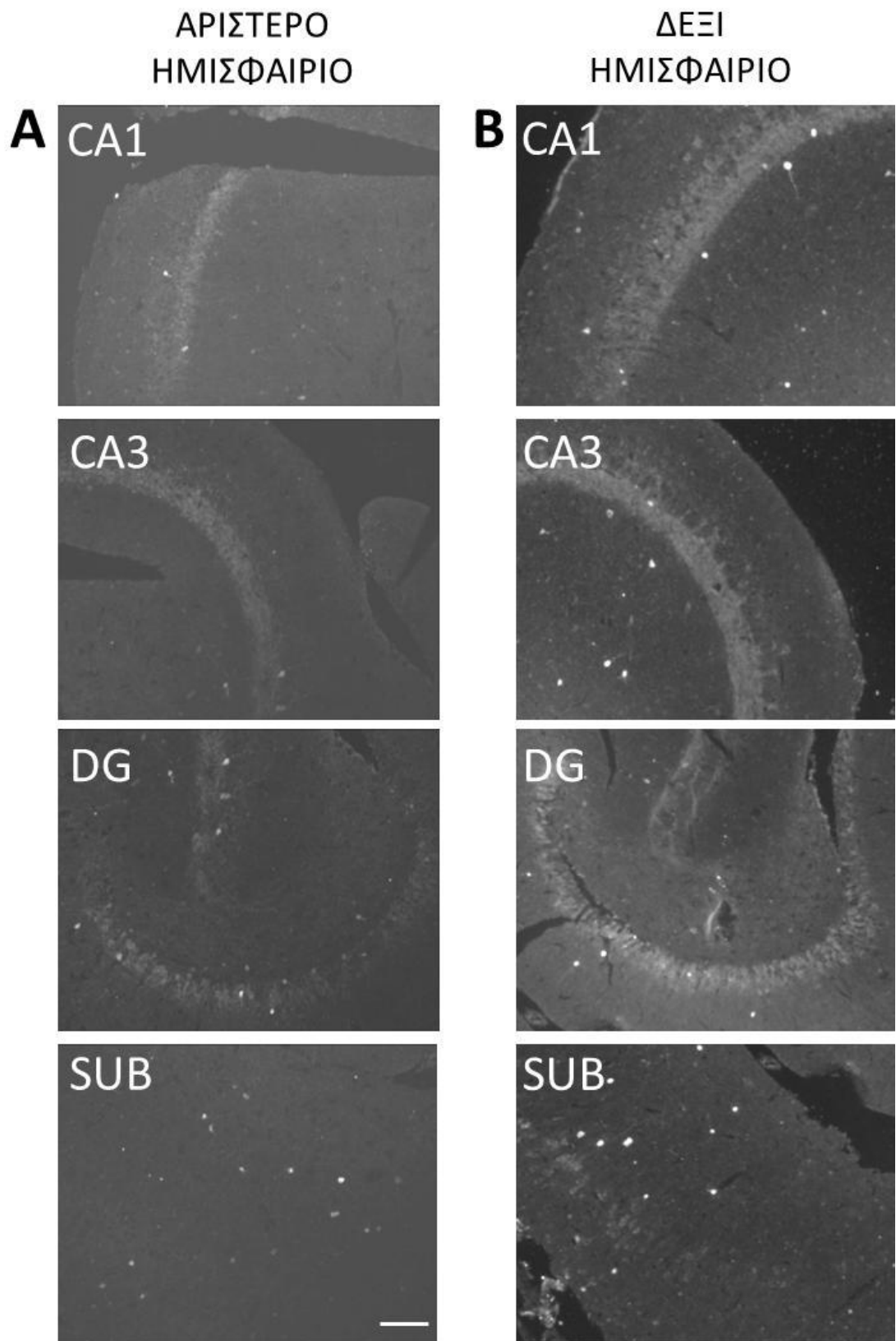
Στην εικόνα 22 παρουσιάζεται η σύγκριση μεταξύ τομών ιπποκάμπου οι οποίες προέρχονται από το αριστερό και το δεξί ημισφαίριο αντίστοιχα. Παρατηρούμε πως παρά το γεγονός ότι η επεξεργασία του ιπποκάμπου του δεξιού ημισφαιρίου (και κατ' επέκταση οι τομές που προέκυψαν από αυτόν) ακολουθούσαν χρονικά την επεξεργασία του ιπποκάμπου του αριστερού ημισφαιρίου με διαφορά, κατά μέσο όρο, 5 λεπτών το ποσοτικό και ποιοτικό του αποτέλεσμα της ανοσοϊστοχημικής χρώσης του ιστού εμφανίζεται άριστο και ίσως καλύτερο από αυτό του αριστερού ημισφαιρίου. Ανακατασκευασμένες εικόνες του ιπποκάμπου ετερόπλευρων ημισφαιρίων φαίνονται στην εικόνα 23.

A**B**

Εικόνα 20. Απόκλιση του ποιοτικού αποτελέσματος σε διαδοχικές τομές του κοιλιακού ιπποκάμπου μετά από ταυτόχρονη ανοσοϊστοχημική χρώση του ιστού. Α. Ανακατασκευασμένη τομή του κοιλιακού ιπποκάμπου με σκοτεινές (απλά βέλη) και ατελώς επεξεργασθέντες (διπλά βέλη) περιοχές η οποία εμφανίζει κατώτερο ποιοτικό, αλλά όχι ποσοτικό (βλ. επόμενη εικόνα) αποτέλεσμα σε σύγκριση με τη διαδοχική της τομή **Β**. (Η ανοσοϊστοχημική έκφραση του GABA πραγματοποιήθηκε μετά από 7ωρη επώαση σε TENY). *Κλίμακα: 100 μm.*

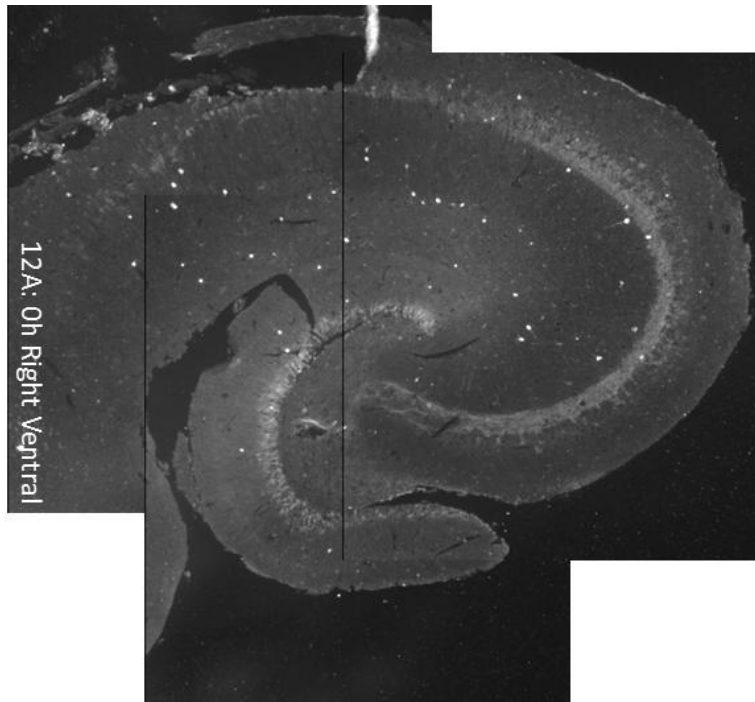
A**B****Γ**

Εικόνα 21. Διατήρηση του ποσοτικού αποτελέσματος σε διαδοχικές τομές του κοιλιακού υποκάμπου μετά από ταυτόχρονη ανοσοϊστοχημική χρώση του ιστού. Α. και Β. Καταμέτρηση των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων στην CA1-CA3 περιοχή των τομών Α και Β της εικόνας 23. Οι έγχρωμοι κύκλοι και το μπλε σκαρίφημα ορίζουν τους ανοσοθετικούς στο GABA νευρώνες και το ταυτόσημο σημείο αναφοράς στις δύο τομές, αντίστοιχα. Γ. Ο αριθμός, αλλά όχι η θέση, των καταμετρηθέντων νευρώνων (ποσοτικό αποτέλεσμα) είναι παρόμοιος στις εικόνες Α και Β παρά το διαφορετικό ποιοτικό αποτέλεσμα της ανοσοϊστοχημικής χρώσης του ιστού.



Εικόνα 22. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός του GABA σε διαφορετικές περιοχές του κοιλιακού ιπποκάμπου ετερόπλευρων ημισφαιρίων. Παρατηρείται έντονος ανοσοφθορισμός σε όλες τις περιοχές που απαρτίζουν τη δομή του ιπποκάμπου. Κλίμακα: 150 μ m.

Α ΔΕΞΙ ΗΜΙΣΦΑΙΡΙΟ



Β ΑΡΙΣΤΕΡΟ ΗΜΙΣΦΑΙΡΙΟ



Εικόνα 23 Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός του GABA σε τομές ιπποκάμπου προερχόμενες από ετερόπλευρα ημισφαίρια. Ανακατασκευασμένες τομές του κοιλιακού ιπποκάμπου μετά από άμεση μονιμοποίηση το ιστού.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία ένα από τα βασικά στοιχεία που μελετάται είναι πώς δύναται να συνδυαστούν λειτουργικοί με μορφολογικούς δείκτες για να διεξαχθεί ένα συμπέρασμα σχετικά με το βαθμό της βιωσιμότητας τομών κοιλιακού ιπποκάμπου. Αυτό επιτεύχθηκε μέσω συνδυασμού ηλεκτροφυσιολογικών καταγραφών (από τη CA1 περιοχή του ιπποκάμπου), και της ανοσοϊστοχημικής και ιστολογικής χρώσης της τομής από την οποία προέκυψαν οι καταγραφές. Για τον σκοπό αυτό, ο ιστός αφαιρέθηκε από το κρανίο του ζώου και στη συνέχεια επώασθηκε σε TENY όπου και παρέμεινε για 5-9 ώρες, έως ότου ολοκληρώθηκαν οι ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές. Κατόπιν ακολούθησε χρώση εωσίνης-αιματοξυλίνης και ελέγχθηκε το ποσοστό των βιώσιμων κυττάρων στην εκάστοτε τομή, και ανοσοϊστοχημική χρώση για GABA όπου εντοπίστηκαν και καταμετρήθηκαν οι ενδονευρώνες οι οποίοι συνεισέφεραν στα ανασταλτικά συναπτικά δυναμικά που είχαν καταγραφεί προηγουμένως ηλεκτροφυσιολογικά (εικόνα 14) [41]. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι υπήρξαν πειραματικές συνθήκες κατά τις οποίες τα ηλεκτροφυσιολογικά δεδομένα δε συμφωνούσαν με τα ανοσοϊστοχημικά, υπό την έννοια ότι παρόλο που καταγράφηκαν μεγάλου πλάτους συναπτικές ανασταλτικές απαντήσεις διαμεσολαβούμενες από $GABA_A$ και $GABA_B$ υποδοχείς [2] δεν παρατηρήθηκε, αντίστοιχα, ο αναμενόμενος αξιόλογος αριθμός ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων στις αντίστοιχες τομές. Αυτό ίσως δικαιολογείται από το γεγονός ότι οι ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές πραγματοποιήθηκαν σε φέτες πάχους 500 μ m, ενώ η καταμέτρηση των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων έγινε σε τομές πάχους μόνον 4 μ m. Πράγματι, σε ανοσοϊστοχημική χρώση διαδοχικών λεπτών τομών παρατηρήθηκε ότι οι ανοσοθετικοί στο GABA νευρώνες που εντοπίστηκαν στις δύο τομές, παρότι διαδοχικές, ήταν διαφορετικοί (εικόνα 21). Εάν λάβουμε υπόψη μας ότι η μέση διάμετρος ενός ενδονευρώνα ανέρχεται περίπου σε 10-25 μ m [45] είναι φυσικό να υποθέσουμε ότι σε διαδοχικές τομές θα μπορούσαν να εντοπισθούν ορισμένοι, τουλάχιστον, ταυτόσημοι νευρώνες. Προκειμένου να υπάρχει πληρέστερη εικόνα των αποτελεσμάτων και να διαλευκανθούν τα αίτια της απόκλισης μεταξύ των λειτουργικών και των μορφολογικών δεδομένων, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί ανοσοϊστοχημική χρώση σε όλο το πάχος της φέτας των 500 μ m, πράγμα το οποίο αποτελεί στόχο των μελλοντικών πειραμάτων του εργαστηρίου.

Μέχρι στιγμής η τεχνική που χρησιμοποιείται από την πλειοψηφία των εργαστηρίων για τη μονιμοποίηση ιστών είναι το perfusion [18]. Μια τέτοια μέθοδος θα απέκλειε, όμως, τη δυνατότητα ηλεκτροφυσιολογικής καταγραφής και κατόπιν χρώσης της ίδιας τομής από την οποία έγινε η καταγραφή [27]. Η παρούσα μελέτη έδειξε, πως παρά την πολύωρη

επώαση του ιστού σε TENY κατά τη διάρκεια των ηλεκτροφυσιολογικών πειραμάτων, η μορφολογία των νευρώνων του ιστού μετά την μονιμοποίησή του ήταν άρτια. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με τη διεθνή βιβλιογραφία όπου αναφέρεται ότι μονιμοποίηση με εμβύθιση σε μονιμοποιητικό διάλυμα (immersion fixation) μπορεί να έχει ομοιογενές και υψηλής ποιότητας αποτέλεσμα, αντίστοιχο του perfusion, σε τομές πάχους 1-2 mm [8, 26, 16]. Επειδή το πάχος των τομών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα δεν ξεπερνούσε τα 0,5 mm, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι η ποιότητα του αποτελέσματος της διαδικασίας που ακολουθήθηκε ήταν ικανοποιητική. Στην παρούσα εργασία ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στην ανάλυση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του GABA στην CA1 περιοχή, αντίθετα με τις υπόλοιπες περιοχές οι οποίες αναλύθηκαν συνολικά και όχι για κάθε περιοχή ξεχωριστά, καθώς εκεί υπήρχε η δυνατότητα συσχέτισης λειτουργικών και μορφολογικών χαρακτηριστικών

Ένα άλλο σημαντικό εύρημα της παρούσας μελέτης ήταν ο μεγαλύτερος αριθμός ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων που ανιχνεύθηκε στην κοιλιακή μοίρα του ιπποκάμπου στο σύνολο του ιστού και σε όλες τις ομάδες επώασης σε TENY (0h, 1h, xh), αν και οι διαφορές μεταξύ του ραχιαίου και του κοιλιακού ιπποκάμπου δεν έφθασαν σε στατιστική σημαντικότητα. Στην παρούσα μελέτη δεν διερευνήθηκαν οι λόγοι για τους οποίους ο κοιλιακός ιπποκάμπος επέδειξε μεγαλύτερο αριθμό ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων, ωστόσο στοιχεία από τη διεθνή βιβλιογραφία υποστηρίζουν αυτό το εύρημα. Καταρχάς, είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι η κοιλιακή μοίρα του ιπποκάμπου παρουσιάζει μεγαλύτερο αριθμό GABA νευρώνων σε σχέση με τη ραχιαία [23, 36]. Παρομοίως, σε πρόσφατη μελέτη του εργαστηρίου βρέθηκε μεγαλύτερος αριθμός ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων στην κοιλιακή μοίρα του ιπποκάμπου, σε σχέση με τη ραχιαία, σε δύο ομάδες που μελετήθηκαν (0h και 1h) [50, 53]. Είναι λοιπόν πιθανό, ο μεγαλύτερος αριθμός ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων που παρατηρήθηκε xh μετά την επώαση σε TENY στην κοιλιακή μοίρα του ιπποκάμπου να οφείλεται στο γεγονός ότι αυτή η μοίρα του ιπποκάμπου διαθέτει, εξ αρχής, μεγαλύτερο αριθμό νευρώνων. Ένα δεύτερο σημαντικό στοιχείο το οποίο στηρίζει την αριθμητική υπεροχή της κοιλιακής μοίρας σε ανοσοθετικούς στο GABA νευρώνες xh μετά την επώασή της σε TENY, αποτελεί η γνωστή από τη βιβλιογραφία μεγαλύτερη ανθεκτικότητα της μοίρας αυτής, σε σχέση με τη ραχιαία, στην ισχαιμία. Συγκεκριμένα, η αγγείωση που παρατηρείται στην κοιλιακή μοίρα του ιπποκάμπου, μετά από perfusion με Indian ink σε επίμυς, είναι σημαντικά υψηλότερη σε σύγκριση με τη ραχιαία [19]. Είναι λοιπόν πιθανόν, ως εκ της μεγαλύτερης αγγειακής άρδυσής της, η κοιλιακή μοίρα του ιπποκάμπου να παρουσιάζει μεγαλύτερη

ανθεκτικότητα στην ισχαιμία που επέρχεται κατά την εκτομή του ιπποκάμπου και την παρασκευή των τομών. Τα αποτελέσματα αυτά στηρίζονται και από παλαιότερη μελέτη η οποία έδειξε ότι πρόκληση ισχαιμίας σε επίμυς μετά από παροδικό αποκλεισμό των καρωτιδικών αρτηριών επέφερε νέκρωση του 90% των νευρώνων της ραχιαίας έναντι 10% της κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου με ανάλογη επίπτωση στην λειτουργική συναπτική διαβίβαση της CA1 περιοχής [6]. Παρομοίως, πρόκληση ισχαιμίας σε επίμυς, μετά από 20λεπτο αποκλεισμό της εγκεφαλικής αιμάτωσης, επέφερε, 48 ώρες αργότερα, εξαφάνιση της προκλητής συναπτικής δραστηριότητας στη CA1 περιοχή της ραχιαίας μοίρας, αλλά καμία αντίστοιχη λειτουργική αλλαγή στην ίδια περιοχή της κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου [21]. Τα δεδομένα αυτά στηρίζουν τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα της κοιλιακής μοίρας που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη αν και δεν έγινε προσπάθεια διερεύνησης της λειτουργικής διαφοροποίησης της κοιλιακής μοίρας σε σχέση με τη ραχιαία.

Τέλος, από τα αποτελέσματά μας προέκυψε πως, τόσο στη ραχιαία όσο και στην κοιλιακή μοίρα του ιπποκάμπου, ο μέσος όρος του αριθμού των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων παρουσιάζει ένα κοινό, για τις δύο μοίρες, χαρακτηριστικό μοτίβο κατά το οποίο παρατηρείται αρχική μείωση από τη 0h στη 1h και έπειτα μικρή αύξηση από τη 1h στις 3h. Τα αίτια αυτού του φαινομένου δεν είναι επακριβώς γνωστά καθώς είναι η πρώτη φορά που μελετάται η βιωσιμότητα των τομών παράλληλα με τη λειτουργικότητά τους για τόσο μεγάλο χρονικό διάστημα μετά την παρασκευή τους. Ενδείξεις ανάκαμψης του ιπποκάμπου, όπως αναδιάταξη της δομής του κυτταροσκελετού (μικροσωλινίσκοι), εμφάνιση νέων συναπτικών στοιχείων (άκανθες, spines) και αποκατάσταση της συναπτικής δραστηριότητας, έχουν παρατηρηθεί κατά την πρώτη ώρα μετά την εκτομή του ιπποκάμπου και την παρασκευή των τομών [26, 16]. Επιπλέον, θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι η "παροδική" μείωση του αριθμού των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων, η οποία εμφανίζεται κατά την 1h μετά την εκτομή του ιπποκάμπου, αντικατοπτρίζει μεταβολές παρόμοιες με αυτές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία κατά την πρόκληση ισχαιμίας. Συγκεκριμένα, μετά από 30λεπτη ισχαιμία έχει παρατηρηθεί παροδική και βραχύχρονη αύξηση της απελευθέρωσης του GABA στο φλοιό του εγκεφάλου [32]. Στην παρούσα μελέτη, ανάλογη αύξηση της απελευθέρωσης του GABA κατά τη διάρκεια της εκτομής του ιστού, και της συνεπαγόμενης πιθανής παροδικής ισχαιμίας, θα μπορούσε να οδηγήσει σε μείωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του νευροδιαβιβαστή και, ως εκ τούτου, τη μείωση των αντιγονικών, προς ανοσοϊστοχημική χρώση, θέσεων με αποτέλεσμα την μείωση του αριθμού των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων που θα ήταν καταμετρήσιμοι στον

ιστό. Τα στοιχεία από τη βιβλιογραφία είναι, ωστόσο, αντικρουόμενα καθώς υπάρχουν μελέτες οι οποίες υποστηρίζουν ότι οι GABA νευρώνες επιβιώνουν μετά από ισχαιμία [24].

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δείχνουν ότι φέτες μονιμοποιημένες με immersion μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ιστολογική και ανοσοϊστοχημική εξέταση μετά από την ηλεκτροφυσιολογική καταγραφή τους *in vitro*. Τα οφέλη αυτής της μεθοδολογικής προσέγγισης είναι ιδιαίτερα σημαντικά καθώς η νευρωνική λειτουργικότητα μπορεί να σχετιστεί άμεσα με διάφορους κυτταρικούς δείκτες και μηχανισμούς που σχετίζονται με τους δείκτες αυτούς.

ΠΗΓΕΣ-ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη

- [1] Alakuijala A, Alakuijala J and Pasternack M. "Evidence for a functional role of GABAC receptors in the rat mature hippocampus". *European Journal of Neuroscience*, 2006;23 (2): 514-20.
- [2] Alger B.E. and Nicoll R. A "Pharmacological evidence for two kinds of GABA receptors on rat hippocampal pyramidal cells studied in vitro". *The Journal of Physiology*, 1982: 328: 125–141.
- [3] Alvarado MC and Rudy JW. "A comparison of kainic acid plus colchicine and ibotenic acid-induced hippocampal formation damage on four configural tasks in rats". *Behavioral neuroscience*, 1995;109: 1052-1062.
- [4] Amaral DG and Witter MP. "The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data". *Neuroscience*, 1989;31(3): 571-591.
- [5] Amaral DG and Witter MP. "Hippocampal formation". In: Paxinos G (ed) *The Rat Nervous System*. Academic Press, 1995: 443-493
- [6] Ashton D., Van Reempts J., Haseldonckx M. et al. "Dorsal-ventral gradient in vulnerability of CA1 hippocampus to ischemia: a combined histological and electrophysiological study". *Brain Research*, 1989: 487(2): 368–372
- [7] Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW et al. "International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function". *Pharmacol Rev*, 1998: 50(2): 291-313.
- [8] Beach T. G., Tago H., Nagai T. et al. "Perfusion-fixation of the human brain for immunohistochemistry: comparison with immersion-fixation". *Journal of Neuroscience Methods*. 1987: 19: 183-192.
- [9] Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. "Neuroscience: Exploring the Brain". Lippincott Williams & Wilkins, 2nd edition (2001).
- [10] Bormann J. "Electrophysiology of GABAA and GABAB receptor subtypes". *Trends in neurosciences*, 1988: 11(3): 112-6.
- [11] Buzsaki G. "The hippocampo-neocortical dialogue". *Cereb Cortex*, 1996: 6: 81-92.
- [12] Clemens JA, Stephenson DT, Smalstig EB et al. "Global ischemia activates nuclear factor-κB in forebrain neurons of rats". *Stroke*, 1997: 28: 1073-1081
- [13] Couve A, Moss SJ and Pangalos MN. "GABAB receptors: a new paradigm in G protein signaling". *Molecular and cellular neurosciences*, 2000: 16(4): 296-312.
- [14] Dobrunz LE and Stevens CF. "Response of hippocampal synapses to natural stimulation patterns". *Neuron*, 1999: 22.: 57-166.
- [15] Essrich C, Lorez M, Benson JA et al. "Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin". *Nature Neuroscience*, 1998: 1(7): 563-571.
- [16] Fiala J., Kirov S., Feinberg M. et al. "Timing of Neuronal and Glial Ultrastructure Disruption during Brain Slice Preparation and Recovery In Vitro". *The Journal of Comparative Neurology*, 2003: 465:90–103.
- [17] Francis A and Pulsinelli W. "Increased binding of [3H]GABA to striatal membranes following ischemia". *Journal of Neurochemistry*, 1983: 40(5): 1497-1499.
- [18] Gregory J.G., Daryl R.K., William S. "Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents". *J. Vis. Exp*, 2012: 65, e3564.
- [19] Grivas I., Michaloudi H., Batzios Ch. et al. "V ascular network of the rat hippocampus is not homogeneous along the septotemporal axis". *Brain Research*, 2003: 971 245–249.

- [20] Hortnagl H, Berger ML, Sperk G et al. "Regional heterogeneity in the distribution of neurotransmitter markers in the rat hippocampus". *Neuroscience*, 1991: 45: 261-272.
- [21] Jensen M. S., Lambert J.D.C, Johansen F. F."Electrophysiological recordings from rat hippocampus slices following in vivo brain ischemia". *Brain Research*, 1991: 554(1-2): 166-175.
- [22] Jensen ML, Timmermann DB, Johansen TH et al. "The beta subunit determines the ion selectivity of the GABAA receptor". *Journal of Biological Chemistry*, 2002: 277(44): 41438-41447.
- [23] Jino S. and Kosaka T. "Cellular architecture of the mouse hippocampus: A quantitative aspect of chemically defined GABAergic neurons with stereology." *Neuroscience Research*, 2006: 56(3): 229-245.
- [24] Johansen FF. "Interneurons in rat hippocampus after cerebral ischemia. Morphometric, functional, and therapeutic investigations". *Acta Neurol Scand Suppl*. 1993: 150: 1-32.
- [25] Johnston D and Amaral DG. Hippocampus. In: Shepherd GM (ed) *The synaptic organization of the brain*, 1998: 417-458.
- [26] Kirov S., Sorra K. and Harris K. "Slices Have More Synapses than Perfusion-Fixed Hippocampus from both Young and Mature Rats". *The Journal of Neuroscience*, 1999 : 19(8):2876–2886
- [27] Kouvaras E, Asproдини E., Asouchidou I. et al." Fentanyl treatment reduces GABAergic inhibition in the CA1 area of the hippocampus 24 h after acute exposure to the drug". *Neuropharmacology*, 2008: 55: 1172–1182.
- [28] Kouvaras E., Pipidou N., Kantikou A., Asproдини E. "A single *in vivo* exposure to fentanyl induces long-lasting reduction of GABAergic inhibition in the CA1 area of the ventral hippocampus". *Abstracts of the 8th Biannual Meeting of the Hellenic Greek Society for Basic and Clinical Pharmacology*, 2014: pp-01.
- [29] Kouvaras E., Pipidou N., Kantikou A. et al. "*In vitro* slice preparation- Relating function to labeling". *Abstracts of the 8th Biannual Meeting of the Hellenic Greek Society for Basic and Clinical Pharmacology*, 2014: pp-11.
- [30] Kulik A, Vida I, et al. "Subcellular localization of metabotropic GABA(B) receptor subunits GABA(B1a/b) and GABA(B2) in the rat hippocampus". *Journal of Neuroscience*, 2003: 23(35): 11026-11035.
- [31] Lavoie AM, Tingey JJ, Harrison NL et al. "Activation and deactivation rates of recombinant GABA(A) receptor channels are dependent on alpha-subunit isoform". *Biophysical journal*, 1997:73(5): 2518-2526.
- [32] Matsumoto K, Lo Eng H., Allen R. P. et al. "Secondary Elevation of Extracellular Neurotransmitter Amino Acids in the Reperfusion Phase Following Focal Cerebral Ischemia". *J Cereb Blood Flow Metab*, 1996: 16(1): 114-124.
- [33] Milner B. "Memory disturbance after bilateral hippocampal lesions. Cognitive processes and the brain". Princeton, NJ: Van Nostrand, 1965.
- [34] Milner B. "Disorders of memory after brain lesions in man". *Neuropsychologia*, 1968: 6: 175-179.
- [35] Misgeld U, Bijak M and Jarolimek W. "A physiological role for GABAB receptors and the effects of baclofen in the mammalian central nervous system". *Progress in neurobiology*, 1995: 46: 423-462.
- [36] Nomura T, Fukuda T, Aika Yet al. "Distribution of nonprincipal neurons in the rat hippocampus, with special reference to their dorsoventral difference". *Brain Res*, 1997: 751. 64-80.

- [37] Palmer CL, Cotton L and Henley JM. "The Molecular Pharmacology and Cell Biology of α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid Receptors". *Pharmacological Rev.*, 2005: 57: 253-277.
- [38] Papatheodoropoulos C, Asproдини E, Nikita I et al. "Weaker synaptic inhibition in CA1 region of ventral compared to dorsal rat hippocampal slices". *Brain Res*, 2002: 948: 117-121.
- [39] Papatheodoropoulos C and Kostopoulos G. "Decreased ability of rat temporal hippocampal CA1 region to produce long-term potentiation". *Neuroscience Letters*, 2000: 279: 177-180.
- [40] Petrides T, Georgopoulos P, Kostopoulos G et al. "The GABA(A) receptor-mediated recurrent inhibition in ventral compared with dorsal CA1 hippocampal region is weaker, decays faster and lasts less". *Experimental Brain Research*, 2007: 177: 370-383.
- [41] Pipidou N., Kouvaras E., Sinani O. et al. "GABA immunohistochemistry in the rat hippocampus- comparison between perfusion and immersion fixation". Abstracts of the 26th Annual Meeting of the Hellenic Society for Neuroscience, 2013: p.88
- [42] Rempel-Clower NL, Zola SM, Squire LR et al. "Three Cases of Enduring Memory Impairment after Bilateral Damage Limited to the Hippocampal Formation". *Journal of Neuroscience*, 1996: 16: 5233-5255.
- [43] Scatton B. "The NMDA receptor complex". *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 1993: 7: 389-400.
- [44] Scoville WB and Milner B. "Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions". *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, 1957: 20: 11-21.
- [45] Somogyi P, Hodgson AJ., Smith AD. Et al., "Different populations of GABAergic neurons in the visual cortex and hippocampus of cat contain somatostatin- or cholecystokinin- immunoreactive material". *The Journal of Neuroscience*, 1984: 4(10): 2590-2603
- [46] Sotiriou E., Papatheodoropoulos C., and Angelatou F. "Differential Expression of γ -Aminobutyric acid-A receptor Subunits in Rat dorsal and Ventral Hippocampus". *Journal of Neuroscience Research*, 2005: 82:690-700.
- [47] Torp R., Arvin B., Le Peillet E. et al. "Effect of ischemia and reperfusion on extra- and intracellular distribution of glutamate, glutamine, aspartate and GABA in the rat hippocampus, with a note on the effect of the sodium channel blocker BW1003C87". *Brain Research*, 1993: 96: 365-376

Ελληνική

- [48] Γεωργόπουλος, Π. "Συναπτική αναστολή στον ιππόκαμπο: Επίδραση φαρμάκων που δρουν στους GABA υποδοχείς κατά μήκος της δομής". Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών. (2008)
- [49] Κουβαράς Ε. "Σύγκριση της διεγερσιμότητας των νευρώνων του ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου που έχουν αναγνωρισθεί μορφολογικά". Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. (2006)
- [50] Παπαγεωργίου Δ.Ι. "Η ανοσοδραστικότητα του GABA σε τομές ιπποκάμπου *in vitro*". Διπλωματική εργασία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. (2013)
- [51] Παπαθεοδωρόπουλος Κ. "In vitro ηλεκτροφυσιολογική μελέτη της νευρωνικής διεγερσιμότητας και των αλλαγών της με την ηλικία". Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών. (1996)
- [52] Πετρίδης Θ. "In vivo και in vitro μελέτες τη φυσιολογίας και της φαρμακολογίας της GABA-εργικής συναπτικής αναστολής στον εγκέφαλο μυών και επίμυων". Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών. (2008)

- [53] Σινάνη Ό. "Κατανομή GABA νευρώνων στη ραχιαία και κοιλιακή μοίρα του υποκάμπου". Διπλωματική εργασία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. (2013)
- [54] Τσιαμάκη Ε. "Αλληλεπίδραση νευροδιαβιβαστικών συστημάτων αδενosίνης και γλουταμινικού οξέος σε διαδικασίες νευρωνικής πλαστικότητας στον ιππόκαμπο επίμυος". Διπλωματική εργασία, Πανεπιστήμιο Πάτρας. (2012)

Ηλεκτρονική

- [55] <http://www.benbest.com/science/anatmind/anatmd10.html#glutamate>. Best B. "Brain neurotransmitters". (1990).
- [56] www.cellsignallingbiology.org Cell Signalling Biology - Michael J. Berridge. (2012)
- [57] <http://thebrain.mcgill.ca/flash>
- [58] <http://hargreaves.swog.webfactional.com>
- [59] <http://zadorlab.cshl.edu/PDF/zador-thesis1993.pdf>
- [60] <http://www.cs.cmu.edu/afs/cs/academic/class/15883-f13/slides/hc-anatomy.pdf>. Touretzky DS. Anatomy of the Hippocampus. Neuroscience: Lecture for the Computational models of the Neural Systems. (2013)
- [61] [http://www.eng.ucy.ac.cy/cpitris/courses/ECE471/presentations/Lecture% 207. pdf](http://www.eng.ucy.ac.cy/cpitris/courses/ECE471/presentations/Lecture%207.pdf). University of Cyprus
- [62] http://www.neurocare.gr/gr/03_subpages/neurogenesis.pdf. Τέγος Σ. "Η νευρογένεση στον ιππόκαμπο του ενήλικα εγκεφάλου και ο ρόλος της στις διαδικασίες μνήμης-μάθησης".
- [63] <http://csonline.dayoo.com>