



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Εμβρυικό Αλκοολικό Σύνδρομο και Φλεγμονώδης Αντίδραση στον Εγκέφαλο
Ενήλικων Επίμυων»**

Λέμα Ευαγγελία του Γεωργίου

Λάρισα
Μάρτιος, 2022



UNIVERSITY OF THESSALY
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY & BIOTECHNOLOGY



DIPLOMA PROJECT

«Fetal Alcohol Syndrome and Inflammatory Reaction in Adult Rat Brain»

Lema Evangelia

Larissa

March, 2022

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Άννα Βασιλάκη, Επίκουρος Καθηγήτρια Φαρμακολογίας (*Επιβλέπουσα Καθηγήτρια*),
Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Αιμιλία Ζίφα, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας – Νευροβιολογίας (*Συνεπιβλέπουσα Καθηγήτρια*),
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Αποστολία Χατζηευθυμίου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας
Εργαστήριο Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, στο Τμήμα Ιατρικής και συγκεκριμένα στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας κατά το έτος 2021.

Η ολοκλήρωση της προπτυχιακής αυτής εργασίας θα ήταν αδύνατη χωρίς την πολύτιμη βοήθεια και ουσιαστική επίβλεψη της Επίκουρου Καθηγήτριας Φαρμακολογίας, Δρ. Βασιλάκη Άννας. Για όλη τη στήριξή της, καθώς και το αμέριστο ενδιαφέρον που απλόχερα υπέδειξε, της εκφράζω ένα βαθύ ευχαριστώ. Οι πολύτιμες γνώσεις που κατάφερε να μου μεταδώσει, τόσο σε θεωρητικό, όσο και σε εργαστηριακό επίπεδο, αποτέλεσαν εφαλτήριο για τη διεύρυνση των πνευματικών μου οριζόντων, αλλά και για την επαγγελματική μου ανέλιξη.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στα λοιπά μέλη της τριμελούς επιτροπής, και συγκεκριμένα στην Επίκουρο Καθηγήτρια Βιολογίας – Νευροβιολογίας, Δρ. Αιμιλία Ζίφα, καθώς και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας, Δρ. Αποστολία Χατζηευθυμίου, για τη στήριξή τους στην προσπάθειά μου εκπόνησης της παρούσας εργασίας. Παράλειψη θα αποτελούσε εκ μέρους μου η μη αναφορά της ουσιώδους βοήθειας που επέδειξε στην προσπάθειά μου η Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Δρ. Ροδόπη Σταματίου, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Φαρμακολογίας για την αμέριστη συνεργασία τους.

Τέλος, στήριγμα στην προσπάθειά μου αυτή αποτέλεσε ο σύζυγός μου, Απόστολος Τατσιώνας, ο οποίος με την εν γένει στάση του και τη βαθιά κατανόησή του με έκανε να πιστέψω ότι μπορώ να τα καταφέρω.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ABSTRACT	2
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	3
i] Φυσιολογική ανάπτυξη	3
ii] Τύποι κυττάρων	5
iv] Σύγκριση ανθρώπου με αρουραίο	6
ΜΙΚΡΟΓΛΟΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	7
i] Προέλευση και Ανάπτυξη	7
ii] Λειτουργίες	9
iii] Μορφολογία και στάδια ενεργοποίησης	10
ΑΛΚΟΟΛ ΚΑΙ ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	12
i] Γενικά χαρακτηριστικά	12
ii] Επιδημιολογικά δεδομένα	13
iii] Μηχανισμοί δράσης της αιθανόλης στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα	14
ΕΜΒΡΥΚΟ ΑΛΚΟΟΛΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ	17
i] Γενικά χαρακτηριστικά	17
ii] Παράγοντες κινδύνου	18
iii] Μεταβολισμός αιθανόλης από το έμβρυο	19
iv] Εγκεφαλικές περιοχές ευάλωτες στο αλκοόλ	21
v] Ζωικά μοντέλα	21
Μοτίβα έκθεσης στο αλκοόλ	22
Οδοί χορήγησης	22
Προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη & ανάπτυξη του ΚΝΣ	23
ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΟ ΑΛΚΟΟΛ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΣΤΟ ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	24
i] Φυσιολογικές συνθήκες	24
ii] Υποδοχέας TLR4 και σηματοδοτικά μονοπάτια ενεργοποίησης	25
iii] Επαγόμενη από το αλκοόλ ενεργοποίηση των κυττάρων της γλοίας	27
iv] Δείκτες φλεγμονής	28
TNF-α	28
IL-1β	30
Iba1	31
ΕΣΩ ΠΡΟΜΕΤΩΠΙΑΙΟΣ ΦΛΟΙΟΣ (<i>medial Prefrontal Cortex mPFCx</i>)	33
i] Λειτουργίες	33
ii] Ανατομία	33
iii] Κυτταρικοί τύποι	35
iv] Διασυνδέσεις	35
ΑΠΙΘΕΙΔΗΣ ΦΛΟΙΟΣ (<i>Piriform ή Pyriform Cortex</i>)	36
i] Λειτουργίες	36
ii] Ανατομία	37
iii] Κυτταρικοί τύποι	38
iv] Διασυνδέσεις	39
ΕΝΔΟΡΙΝΙΚΟΣ ΦΛΟΙΟΣ (<i>Entorhinal Cortex</i>)	40
i] Λειτουργίες	40
ii] Ανατομία	40
iii] Κυτταρικοί τύποι	41
iv] Διασυνδέσεις	42
ΔΕΥΤΕΡΕΥΩΝ ΣΩΜΑΤΟΑΙΣΘΗΤΙΚΟΣ ΦΛΟΙΟΣ (<i>Secondary Somatosensory Cortex - S2</i>)	43
i] Λειτουργίες	43

ii] Ανατομία	44
iii] Διασυνδέσεις	44
ΜΕΣΟΛΟΒΙΟ (<i>Corpus Callosum - CC</i>)	45
i] Λειτουργίες	45
ii] Ανατομία	46
iii] Κυτταρικοί τύποι	47
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΚΘΕΣΗΣ ΣΤΗΝ ΑΙΘΑΝΟΛΗ ΣΤΙΣ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΠΕΡΙΟΧΕΣ	47
ΣΚΟΠΟΣ	50
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	51
ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ	51
Συνθήκες διαβίωσης πειραματόζων	51
Πρωτόκολλο έκθεσης στην αιθανόλη	51
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ ΓΙΑ ΔΙΕΝΕΡΓΕΙΑ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ	52
i] Διαδικασία ενδοκαρδιακής μονιμοποίησης (<i>Transcardial Perfusion</i>)	52
ii] Ζελατινοποίηση αντικειμενοφόρων πλακών	54
iii] Χρώση Cresyl Violet, φωτογράφιση τομών και ανάλυση εικόνων	55
Ανοσοφθορισμός και φωτογράφιση τομών	57
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ ΓΙΑ ΔΙΕΝΕΡΓΕΙΑ DOT PLOT	60
i] Διαδικασία απομόνωσης εγκεφαλικού ιστού	60
Ομογενοποίηση ιστών και εκχύλιση κυτταρικών πρωτεϊνών	61
Μέτρηση συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης	61
Διαδικασία ανοσοαποτύπωσης κηλίδας (<i>Dot Plot</i>)	61
Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών	63
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	66
Επίδραση της έκθεσης στην αλκοόλη στον έσω προμετωπιαίο φλοιό επίμυος	66
i] Χρώση σωματιδίων Nissl	66
ii] Ανοσοδραστικότητα του Iba1	67
iii] Ανοσοαποτύπωση κηλίδας (<i>Dot Plot</i>) των Iba1, TNF-α και IL-1b	69
Επίδραση της έκθεσης στην αλκοόλη στον απιοειδή φλοιό επίμυος	71
i] Χρώση σωματιδίων Nissl	71
ii] Ανοσοδραστικότητα του Iba1	72
Επίδραση της έκθεσης στην αλκοόλη στο μεσολόβιο επίμυος	74
i] Χρώση σωματιδίων Nissl	74
ii] Ανοσοδραστικότητα του Iba1	75
Επίδραση της έκθεσης στον ενδορινικό φλοιό επίμυος	77
i] Χρώση σωματιδίων Nissl	77
ii] Ανοσοδραστικότητα του Iba1	78
Επίδραση της έκθεσης στο δευτερεύοντα σωματοαισθητικό φλοιό επίμυος	80
i] Χρώση σωματιδίων Nissl	80
ii] Ανοσοδραστικότητα του Iba1	81
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	84
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	88

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το Εμβρυϊκό Αλκοολικό Σύνδρομο (*Fetal Alcohol Syndrome - FAS*) αποτελεί την πλέον επιβλαβή μορφή ενός ευρύτερου φάσματος εμβρυικών διαταραχών που εκδηλώνεται λόγω της κατανάλωσης αλκοόλ εκ μέρους της μητέρας κατά τη διάρκεια της κύησης με πληθώρα αναπτυξιακών διαταραχών, χαρακτηριστικές κρανιοπροσωπικές δυσμορφίες, καθώς και διαταραχές του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος που αντανακλούν σε κινητικά, νοητικά και συμπεριφορικά προβλήματα. Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας αποτέλεσε η μελέτη της φλεγμονώδους αντίδρασης στον εγκέφαλο ενήλικων Sprague–Dawley επίμυων, οι οποίοι είχαν εκτεθεί σε αιθανόλη κατά την εμβρυική τους ανάπτυξη μέχρι και το μεταγεννητικό χρονικό διάστημα που αντιστοιχεί στο τρίτο τρίμηνο της ανθρώπινης κύησης. Η έκθεση των επίμυων στην αιθανόλη έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η πειραματική διαδικασία περιελάμβανε ιστοχημικές και ανοσοϊστοχημικές χρώσεις σε τομές του έσω προμετωπιαίου φλοιού, του απιοειδή φλοιού, του δευτεροταγή σωματοαισθητικού φλοιού, του ενδορρινικού φλοιού και του μεσολοβίου, καθώς και ανοσοαποτύπωση κηλίδας για τη μελέτη των πρωτεϊνικών επιπέδων δεικτών φλεγμονής στον έσω προμετωπιαίο φλοιό. Τα αποτελέσματά μας, σε όλες τις υπό μελέτη περιοχές του φλοιού, έδειξαν 1] μείωση του συνολικού αριθμού κυττάρων, 2] στατιστικώς σημαντική μείωση της έντασης του σήματος των σωματιδίων Nissl (*δείκτης επιπέδων πρωτεϊνοσύνθεσης και μεταβολισμού κυρίως των νευρικών κυττάρων*) και 3] αύξηση της ανοσοδραστικότητας της πρωτεΐνης προσαρμογής 1 που δεσμεύει ελεύθερο Ca^{++} (*Iba1, δείκτης μικρογλοιακών κυττάρων*) στους FAS επίμυες συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου. Σε ότι αφορά στον έσω προμετωπιαίο φλοιό, μελέτες ανοσοαποτύπωσης κηλίδας έδειξαν μείωση των επιπέδων της προφλεγμονώδους κυττοκίνης IL-1 β (*ιντερλευκίνη 1 β*) στα FAS ζώα έναντι των ζώων ελέγχου και καμία αλλαγή στα επίπεδα της προφλεγμονώδους χημειοκίνης TNF- α (*παράγοντας νέκρωσης όγκων α*). Τα πειράματα αυτά επιβεβαίωσαν την αύξηση των επιπέδων της Iba1 στα FAS έναντι των ζώων ελέγχου, η οποία διαπιστώθηκε από τις ανοσοϊστοχημικές μελέτες. Τέλος, αναφορικά με το μεσολόβιο, δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στο πάχος του μεταξύ των δύο ομάδων ζώων. Συμπερασματικά, ο παρατηρούμενος κυτταρικός θάνατος στις περιοχές του φλοιού που μελετήθηκαν είναι συγκρίσιμος με την εγκεφαλική βλάβη που ανιχνεύεται στα παιδιά με εμβρυϊκό αλκοολικό σύνδρομο. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υποδεικνύουν τη συμμετοχή των μικρογλοιακών κυττάρων στις μακροπρόθεσμες φλεγμονώδεις αποκρίσεις στον εγκέφαλο των FAS επίμυων, πλην όμως αναγκαία χαρακτηρίζεται η διενέργεια περαιτέρω ερευνών για την περισσότερη ενδελεχή διερεύνηση του φαινομένου και την ενίσχυση των εξαχθέντων συμπερασμάτων.

ABSTRACT

Fetal Alcohol Syndrome (**FAS**) is the most harmful form of a wider range of fetal disorders that occurs due to the mother's alcohol consumption during pregnancy with a plethora of developmental disorders, characteristic craniofacial malformations, as well as central nervous system (**CNS**) disorders that reflect motor, mental and behavioral problems. The purpose of this thesis was to examine the inflammatory response in the brains of adult Sprague-Dawley rats, who had been exposed to ethanol during their embryonic development up to and including the postnatal period corresponding to the third trimester of human pregnancy. Exposure of rats to ethanol took place at the Laboratory of Physiology of the Department of Biological Applications and Technology of the University of Ioannina, Greece. The experimental procedure included histochemical and immunohistochemical studies of the medial prefrontal, piriform, secondary somatosensory and entorhinal cortexes and corpus callosum staining, as well as dot blotting analysis of medial prefrontal cortex inflammation markers' protein levels. According to our results, in all cortical areas studied we observed 1] a reduction of total cell number, 2] a statistically significant decrease on Nissl bodies¹ signal intensity and 3] an increase of ionized Ca⁺⁺-binding adaptor molecule 1 (*Iba1, microglia-specific Ca⁺⁺-binding protein*) immunoactivity in FAS rats compared to control animals. On the other hand, no change of corpus callosum thickness was detected between the two animal groups. Regarding medial prefrontal cortex, dot blotting studies showed a statistically significant decrease in the levels of proinflammatory cytokine IL-1 β (*interleukin 1 β*) and no change in the levels of proinflammatory chemokine TNF- α (*Tumor Necrosis Factor α*) in FAS compared to control animals. Furthermore, the increase of Iba1 levels observed immunohistochemically was also confirmed using this experimental approach. In conclusion, cortex cell death observed in our study is comparable to brain damage detected during human Fetal Alcohol Syndrome. Moreover, our results point-towards microglia cell involvement in the long-term brain inflammatory response after rat fetal alcohol exposure. Further studies are necessary for a more thorough investigation of this phenomenon.

¹ Nissl substance/bodies is a basophilic material primarily composed of ribonucleic acid (RNA) and proteins in aggregate with rough endoplasmic reticulum. This substance is involved in protein synthesis and cellular metabolism.

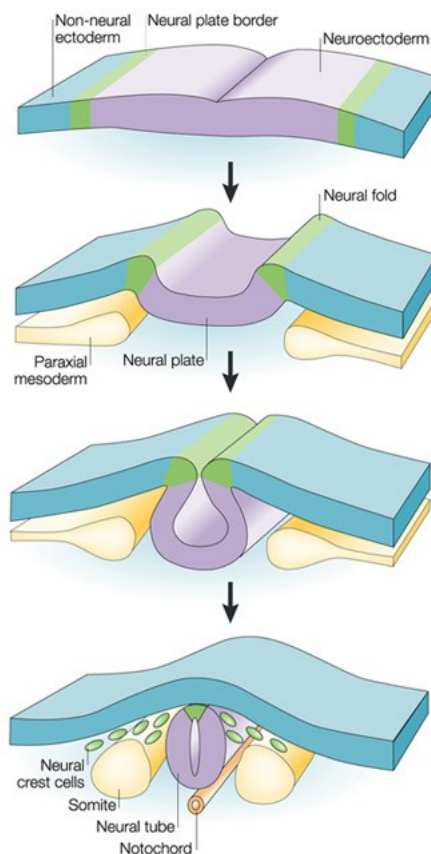
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

ι) Φυσιολογική ανάπτυξη

Η ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, και κατ' επέκταση του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ), λαμβάνει χώρα μέσω της αλληλεπίδρασης αρκετών συγχρονισμένων διαδικασιών, μερικές από τις οποίες ολοκληρώνονται πριν από τη γέννηση, ενώ άλλες συνεχίζονται μέχρι και το στάδιο της ενηλικίωσης [Ζίφα Α. και συν., 2011].

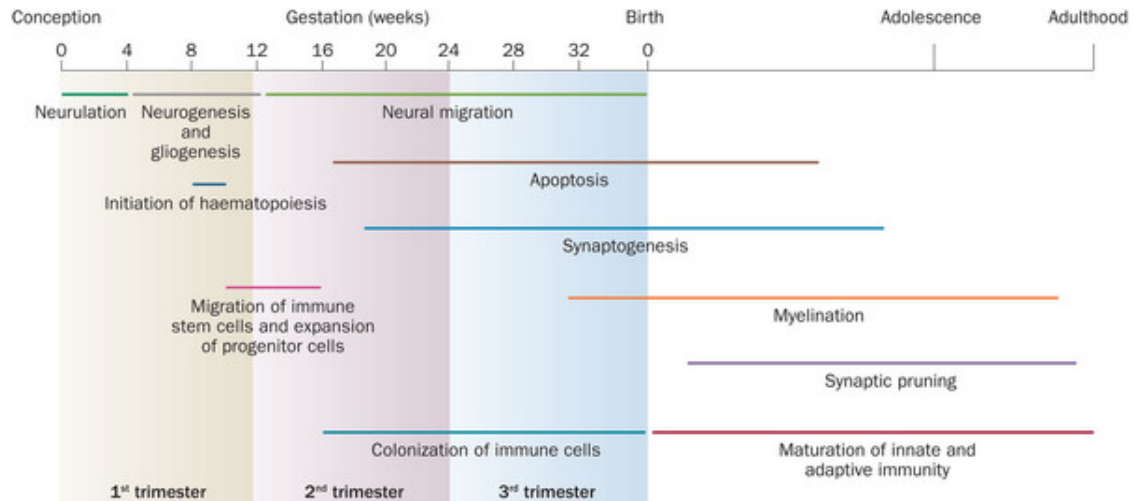
Το πρωταρχικό και σπουδαίας σημασίας συμβάν που σηματοδοτεί την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος στον άνθρωπο εκκινεί περί την 3^η εβδομάδα της κύησης με το στάδιο της νευριδίωσης (*neurulation*), που αποτελεί το στάδιο σχηματισμού και σύγκλεισης του νευρικού σωλήνα (*neural tube*), μίας ιδιαίτερης πτυχής εξωδερμικής προέλευσης [Εικόνα 1, Ζίφα Α. και συν., 2011].



Εικόνα 1: «Νευριδίωση – Σχηματισμός νευρικού σωλήνα» [Gammill L. & Bronner-Fraser M., 2003]

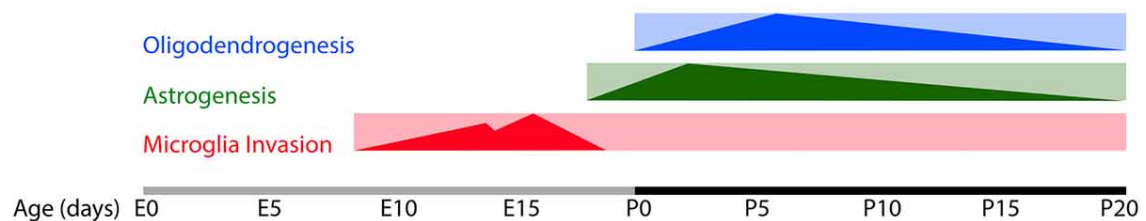
Από την 4^η έως και τη 12^η εβδομάδα της κύησης ο νευρικός σωλήνας διαφοροποιείται στις επιμέρους περιοχές που θα απαρτίσουν τις βασικές δομές του νευρικού συστήματος. Η κοιλότητα του νευρικού σωλήνα είναι αυτή από την οποία τελικά θα σχηματιστούν οι κοιλίες του εγκεφάλου, ενώ οι χαρακτηριζόμενες ως «ζώνες πολλαπλασιασμού» περιοχές διαμορφώνονται κοντά στις κοιλίες και πυροδοτούν την ανάπτυξη νέων νευρώνων, καθώς και κυττάρων της γλοίας (*νευρογένεση και*

γλοιογένεση, αντίστοιχα) [Εικόνες 2 & 3]. Από τη 12^η έως και την 20^η εβδομάδα της κύησης οι νευρώνες πολλαπλασιάζονται και μεταναστεύουν σε περιοχές του φλοιού μέσα σε ένα πλέγμα κυττάρων της γλοίας. Έπειτα, ακολουθεί μία περίοδος ταχείας κυτταρικής απόπτωσης, γεγονός που οδηγεί στη μείωση του ~50% των νευρώνων. Η περίοδος αυτή εκκινεί δυναμικά από την 24^η εβδομάδα της κύησης και βρίσκεται σε εξέλιξη μέχρι και την 4^η εβδομάδα μετά τη γέννηση [Εικόνα 2, Lenroot R. & Giedd J., 2006].



Εικόνα 2: «Χρονική αλληλουχία σταδίων ανάπτυξης Κεντρικού Νευρικού Συστήματος» [Knuesel I., 2014]

Μία τρίτη ιδιαίτερα σημαντική αναπτυξιακή διεργασία αποτελεί ο πολλαπλασιασμός και η οργάνωση των συνάψεων, δηλαδή η συναπτογένεση (*synaptogenesis*), που εκκινεί περίπου την 20^η εβδομάδα της κύησης. Η συναπτική πυκνότητα αυξάνεται ραγδαία μετά τη γέννηση, φαινόμενο που συνοδεύεται από μία ταυτόχρονη απώλεια συνδέσεων μεταξύ των συνάψεων, με τα ποσοστά της να είναι ιδιαίτερα αυξημένα στα πρώτα χρόνια της ζωής του ατόμου συγκριτικά με την ενήλικη ζωή [Lenroot R. & Giedd J., 2006].



Εικόνα 3: «Χρονική αλληλουχία σταδίων ανάπτυξης των κυττάρων της γλοίας στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα» [Reemst K. και συν., 2016]

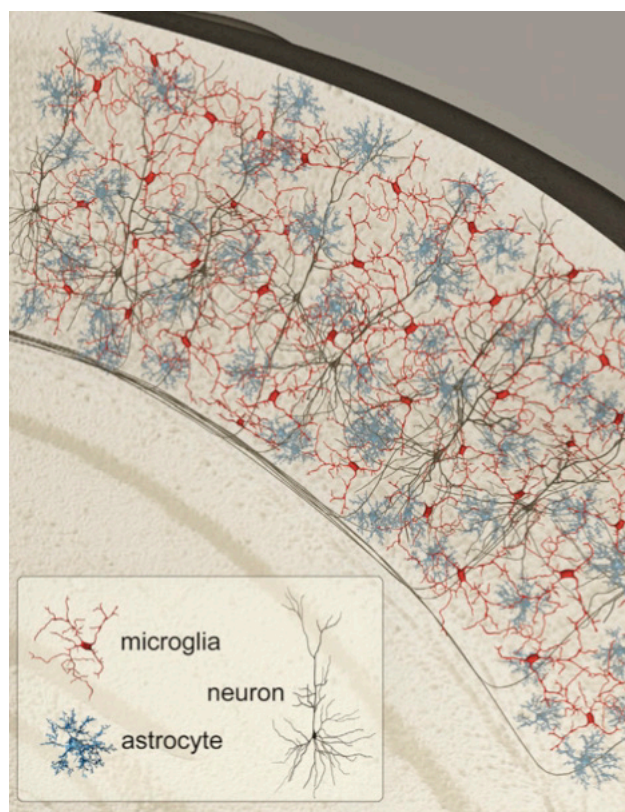
Συντμήσεις: E= εμβρυϊκή ημέρα, P= μεταγεννητική ημέρα

Τέλος, η διαδικασία της μυελίνωσης σηματοδοτείται περιφερειακά από το εγκεφαλικό στέλεχος την 29^η εβδομάδα της κύησης και σε γενικές γραμμές ακολουθεί συγκεκριμένη κατεύθυνση: κοιλιακά προς ραχιαία και πρόσθια προς οπίσθια. Παρόλο

που οι πιο σημαντικές περιοχές υφίστανται στο μεγαλύτερο ποσοστό τη διαδικασία της μυελίνωσης μέχρι και την πρώιμη βρεφική ηλικία, νευρωνικοί άξονες του φλοιού, καθώς και άλλων περιοχών συνεχίζουν να υφίστανται τη διαδικασία αυτή μέχρι και τη 2^η και 3^η δεκαετία της ζωής του ατόμου [Lenroot R. & Giedd J., 2006, **Εικόνα 2**].

ii) Τύποι κυττάρων

Το ΚΝΣ αποτελείται από τρεις λειτουργικά διακριτές κατηγορίες νευρώνων: τους προσαγωγούς, τους απαγωγούς και τους διάμεσους νευρώνες. Μόνο οι απολήξεις των προσαγωγών νευρώνων και τα κυτταρικά σώματα των απαγωγών νευρώνων εντοπίζονται στο ΚΝΣ, ενώ η συντριπτική πλειοψηφία αυτών εντοπίζεται στο Περιφερικό Νευρικό Σύστημα. Περίπου το 99% των νευρώνων του νευρικού συστήματος είναι διάμεσοι νευρώνες που συναντώνται αποκλειστικά στο ΚΝΣ, εντοπίζονται μεταξύ των προσαγωγών και απαγωγών νευρώνων και έχουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην επεξεργασία και την ολοκλήρωση των περιφερικών ερεθισμάτων, καθώς και τη διαμόρφωση των εντολών του ΚΝΣ στα όργανα της περιφέρειας [Sherwood L., 2016].



Εικόνα 4: «Τυπική διασύνδεση νευρώνων και κυττάρων της γλοίας στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα»
[Kettenmann H. και συν., 2013]

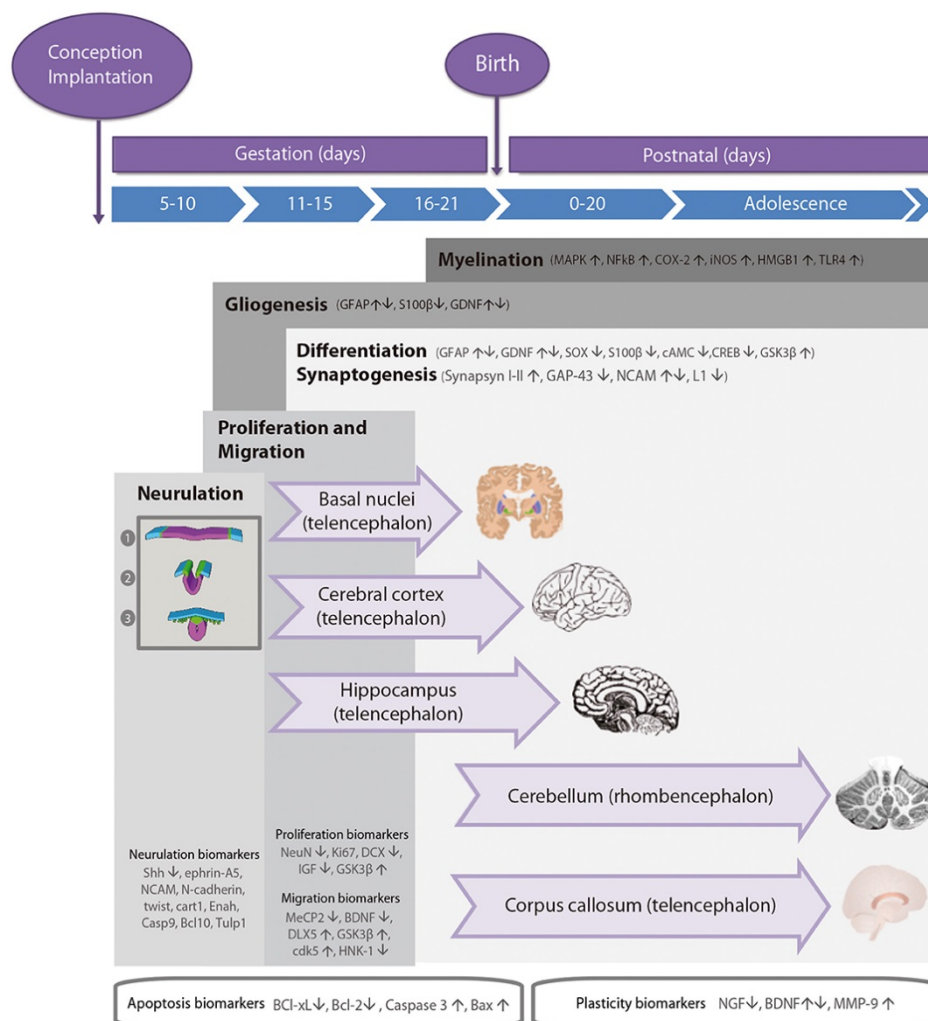
Το 90% των κυττάρων του ΚΝΣ δεν είναι νευρώνες, αλλά νευρογλοιακά κύτταρα (*glial cells* ή *neuroglia*). Παρά το συντριπτικά μεγαλύτερο αριθμό τους, τα νευρογλοιακά κύτταρα καταλαμβάνουν μόνο το 50% του όγκου του εγκεφάλου επειδή έχουν μικρό μέγεθος και δε φέρουν τόσο εκτεταμένες διακλαδώσεις όσο οι νευρώνες. Σε αντίθεση

με τους νευρώνες, τα μικρογλοιακά κύτταρα δεν έχουν τη δυνατότητα να παράγουν και να άγουν νευρικές ώσεις. Έχουν όμως τη δυνατότητα να επικοινωνούν με τους νευρώνες, αλλά και μεταξύ τους μέσω χημικών σημάτων, να παρέχουν στους νευρώνες δομική και μεταβολική στήριξη, να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της χημικής σύστασης του εξωκυτταρικού περιβάλλοντος μέσα σε στενά όρια που διασφαλίζουν τη βέλτιστη λειτουργικότητα των νευρώνων και να τροποποιούν τη συναπτική λειτουργία. Στο ΚΝΣ υπάρχουν τέσσερις τύποι νευρογλοιακών κυττάρων με συγκεκριμένους ρόλους: τα αστροκύτταρα, τα ολιγοδενδροκύτταρα, τα μικρογλοιακά κύτταρα και τα επενδυματικά κύτταρα [Sherwood L., 2016].

Μία τυπική κατανομή και αλληλεπίδραση των νευρώνων και των κυττάρων της γλοίας απεικονίζεται στην **Εικόνα 4**.

iv] Σύγκριση ανθρώπου με αρουραίο

Ο ανθρώπινος εγκέφαλος με αυτόν του αρουραίου εμφανίζει ανατομικές αναλογίες σε πολλές περιοχές, καθώς και ομοιότητες σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια. Δε λείπουν όμως διαφορές, τόσο σε ανατομικό, όσο και σε λειτουργικό επίπεδο [**Εικόνες 5**].



Εικόνα 5: «Συγκριτική απεικόνιση χρονικής αλληλουχίας ανάπτυξης εγκέφαλου σε άνθρωπο και αρουραίο» [Almeida L. και συν., 2020]

Η κύηση στον άνθρωπο διαρκεί περίπου 280 ημέρες (~40 εβδομάδες) και απαρτίζεται από τρία προγεννητικά χρονικά διαστήματα, καθένα απ' τα οποία διαρκεί τρεις μήνες [1^ο τρίμηνο: από 1^η έως 12^η εβδομάδα κύησης, 2^ο τρίμηνο: από 13^η έως 26^η εβδομάδα κύησης και 3^ο τρίμηνο από 27^η έως τέλος κύησης]. Στο χρονικό αυτό διάστημα η ταχεία ανάπτυξη του εγκεφάλου παρατηρείται μεταξύ της 25^{ης} και 38^{ης} εβδομάδας της κύησης. Ποικίλες διαδικασίες διαφοροποίησης και πολλαπλασιασμού λαμβάνουν χώρα στο τρίτο στάδιο, με τη μεγαλύτερη ανάπτυξη του εγκεφάλου να παρατηρείται κατά τη γέννηση, ενώ παρατηρείται σταδιακή μείωση [Almeida L. και συν., 2020].

Η κύηση στον αρουραίο είναι συντομότερη από αυτή του ανθρώπου με το μέσο όρο αυτής να αντιστοιχεί στις 20-22 ημέρες. Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό και σημαντική διαφορά αποτελεί το γεγονός ότι σημαντικά στάδια της ανάπτυξης του εγκεφάλου συμβαίνουν σε μεταγεννητικά στάδια. Το 1^ο τρίμηνο της ανθρώπινης κύησης αντιστοιχεί στην 1^η έως 10/11^η ημέρα της κύησης στον αρουραίο, το 2^ο στην 11^η έως 21/22^η ημέρα της κύησης στον αρουραίο, ενώ το 3^ο αντιστοιχεί στην 1^η έως 10^η ημέρα μετά τη γέννηση [Almeida L. και συν., 2020].

ΜΙΚΡΟΓΛΟΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Τα κύτταρα της μικρογλοίας (*microglia*) είναι τα ανοσολογικά κύτταρα του ΚΝΣ και είναι ευρέως γνωστά ως τα μακροφάγα του εγκεφάλου, που ωστόσο εμφανίζουν μοναδικές ιδιότητες συγκριτικά με τα περιφερικά μακροφάγα. Πρόκειται για κύτταρα συγγενικά των μονοκυττάρων, ενός τύπου λευκών αιμοσφαιρίων που εγκαταλείπει την κυκλοφορία του αίματος και εγκαθίσταται σε διάφορους ιστούς του σώματος αποτελώντας την πρώτη γραμμή άμυνας εναντίον διαφόρων παθογόνων. Πιο συγκεκριμένα πρόκειται για μονοπύρηνα, μη νευρωνικά κύτταρα, ευρέως κατανεμημένα στον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό, που απαρτίζουν το 5-20% του συνόλου του πληθυσμού των κυττάρων της γλοίας στο παρέγχυμα του ΚΝΣ. [Sherwood L., 2016 & Kettenmann H. Και συν., 2013].

ι] Προέλευση και Ανάπτυξη

Αναφορικά με την προέλευση των μικρογλοιακών κυττάρων αξίζει να αναφερθεί ότι το θέμα αυτό αποτέλεσε αντικείμενο ερευνών επί σειρά ετών. Εν αντιθέσει με τους νευρώνες και τα λοιπά κύτταρα της γλοίας που είναι εξωδερμικής προέλευσης, τα μικρογλοιακά κύτταρα, τόσο στα τρωκτικά (*συμπεριλαμβανομένων των ποντικών και των αρουραίων*), όσο και στους ανθρώπους, προέρχονται από εμβρυικά αιμοποιητικά πρόδρομα κύτταρα του λεκιθικού σάκου (*yolk sac - YS*), τα λεγόμενα μακροφάγα που είναι μεσοδερμικής προέλευσης. Ο ισχυρισμός αυτός ενισχύθηκε από *in vivo* πειράματα

σε έμβρυα ποντικών, μέσω της σίγησης (*knockdown*) του μεταγραφικού παράγοντα *c-Myd*, ο οποίος είναι απαραίτητος για το στάδιο αιμοποίησης των ερυθροκυττάρων (*HSC*). Τα εν λόγω έμβρυα δεν παρουσίασαν καμία αλλαγή στην πληθυσμιακή δεξαμενή των μικρογλοιακών κυττάρων [Schulz C. και συν., 2012].

Τα πρώιμα μικρογλοιακά κύτταρα (*microglia progenitors*) αποικίζουν τον εγκεφαλικό ιστό σε πολύ πρώιμα στάδια της εμβρυικής ανάπτυξης, πριν από την έναρξη ακόμα της αιμοποίησης του μυελού των οστών. Συγκεκριμένα, στα τρωκτικά η αιμοποίηση εκκινεί στο λεκιθικό σάκο την 7^η με 8.5^η εμβρυική ημέρα (E7 – E8.5), αμέσως μετά την έναρξη της γαστριδίωσης, οδηγώντας στην παραγωγή ερυθροκυττάρων και μακροφάγων. Τα πρώιμα μακροφάγα εξέρχονται του λεκιθικού σάκου κατά την έναρξη της κυκλοφορίας και αποικίζουν το νευροεπιθήλιο την E9.5 προάγοντας την ανάπτυξη των μικρογλοιακών κυττάρων [Εικόνα 6, Ginhoux F. και συν., 2013 & Wang S., 2017].

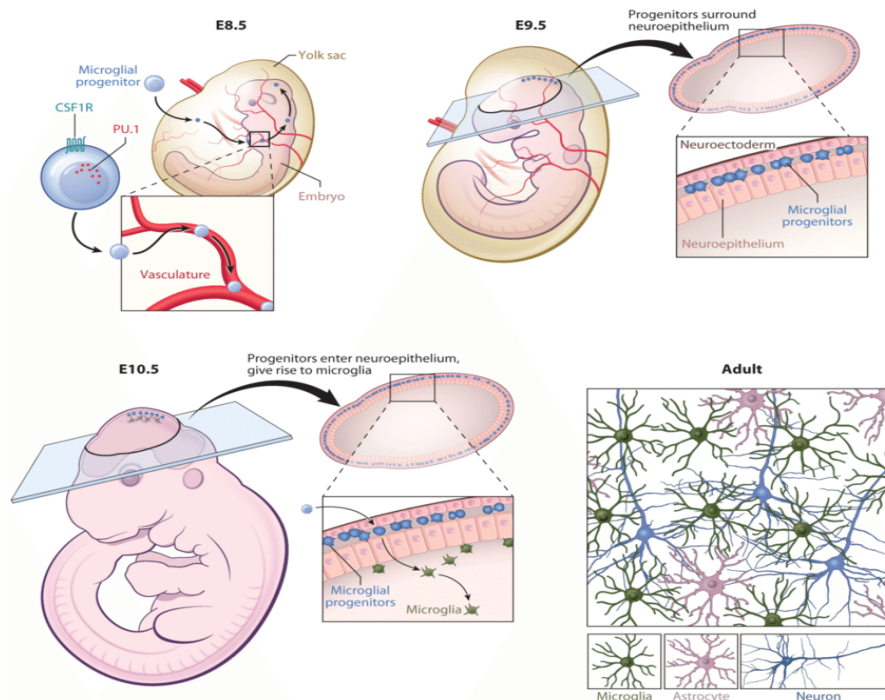
Εν συνεχεία, η ανάπτυξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (*blood brain barrier - BBB*) την E13.5 αποτελεί ένα γεγονός που δύναται να απομονώνει τον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο από τη συνεισφορά του εμβρυικού ήπατος στη διαδικασία της αιματοποίησης, με αποτέλεσμα να καθίσταται δυσχερής η αποίκιση μονοπύρηνων στον εγκεφαλικό ιστό. Με τον τρόπο αυτό ο αριθμός των εμβρυικών μικρογλοιακών κυττάρων σε φυσιολογικές (*μη παθολογικές*) συνθήκες επεκτείνεται, αποικίζοντας το σύνολο του ΚΝΣ μέχρι και το στάδιο της ενηλικίωσης, μέσω συνεχούς και ταχέως πολλαπλασιασμού [Ginhoux F. και συν., 2013].

Σύντομα μετά τη γέννηση των τρωκτικών, ο πληθυσμός των μικρογλοιακών κυττάρων εξαπλώνεται δραματικά. Το γεγονός αυτό οδήγησε στο ασφαλές συμπέρασμα ότι ο πολλαπλασιασμός των εμβρυικών μικρογλοιακών κυττάρων από μόνος του δε μπορεί να αιτιολογήσει την απότομη αυτή αλλαγή, αλλά μία μαζική εισροή κυττάρων διαδραματίζεται. Μελέτες έδειξαν ότι τα κύτταρα αυτά είναι μονοπύρηνια προερχόμενα από το μυελό των οστών, χαρακτηρίζονται από την ικανότητα διείσδυσής τους στο ΚΝΣ, ενώ παράλληλα αναδιαμορφώνουν τη δράση τους τόσο μορφολογικά όσο και λειτουργικά προσομοιάζοντας τα μικρογλοιακά κύτταρα [Ginhoux F. και συν., 2013].

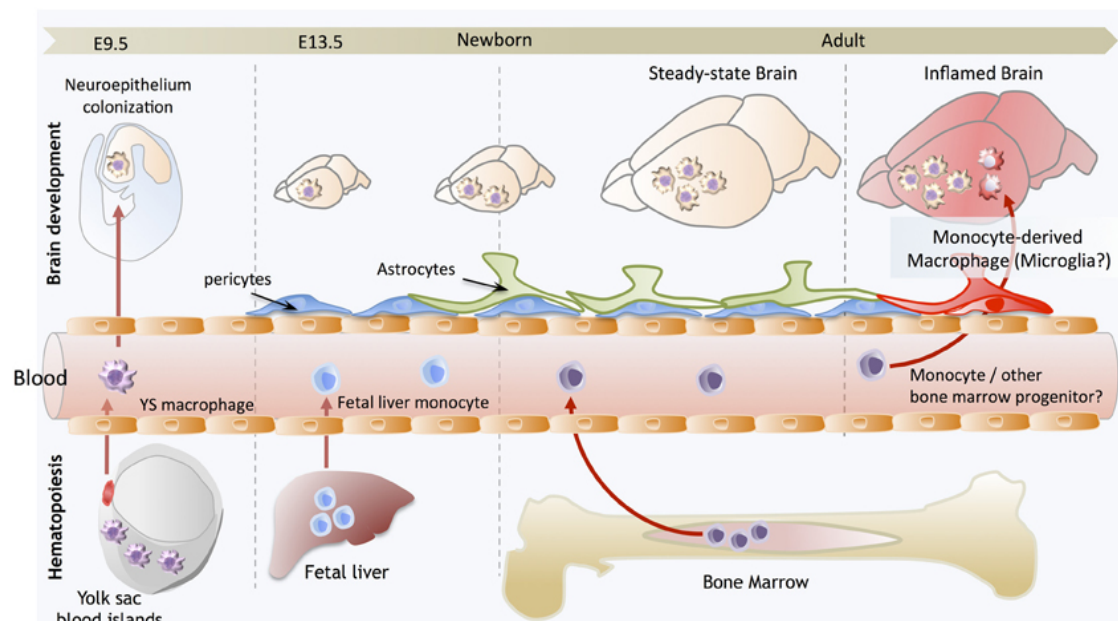
Επιπλέον, μελέτες έχουν αναδείξει την ανάγκη συνεισφοράς πρόδρομων μονοπύρηνων του μυελού των οστών σε φλεγμονώδεις συνθήκες, χωρίς μέχρι και σήμερα να έχει καταστεί σαφές αν λαμβάνει χώρα ενσωμάτωσή τους στο ευρύ δίκτυο των μικρογλοιακών κυττάρων ή αν απλά αποτελεί μία προσωρινή προσθήκη στον ενδογενή πληθυσμό [Εικόνα 7, Ginhoux F. και συν., 2013].

Παρ' όλα αυτά το χαρακτηριστικό των εμβρυικών μικρογλοιακών κυττάρων που τα καθιστά μοναδικά, συγκριτικά με άλλους εμβρυικούς πληθυσμούς μακροφάγων, είναι ότι κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης δεν υφίστανται αντικατάσταση από

εμβρυικά ηπατικά μονοκύτταρα ή κύτταρα προερχόμενα από το μυελό των οστών, αλλά αποτελούν την απόλυτη πηγή, η οποία και διατηρείται μέχρι και την ενηλικίωση [Ginhoux F. και συν., 2013].



Εικόνα 6: «Πρόελευση των μικρογλοιακών κυττάρων» [Wang S., 2017]

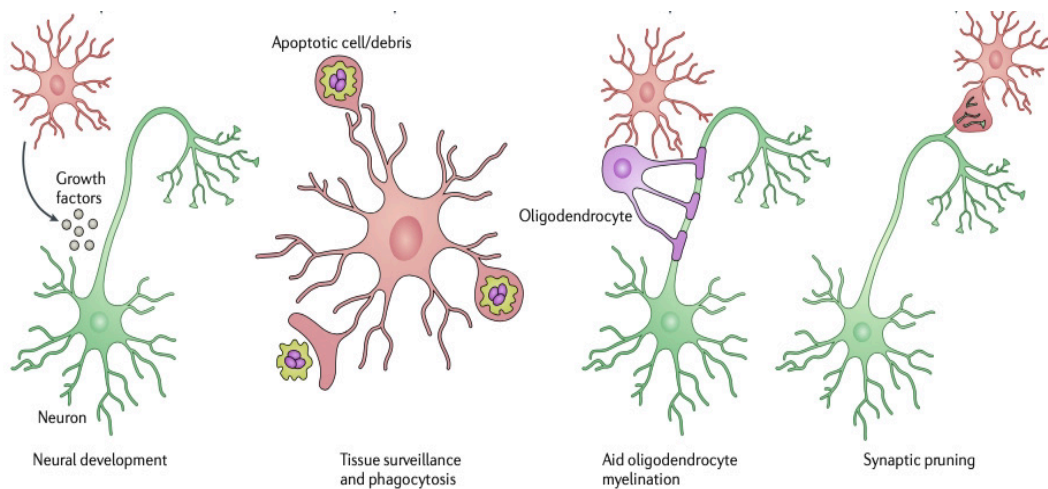


Εικόνα 7: «Ανάπτυξη εγκεφάλου και αιμοποίηση μικρογλοιακών κυττάρων» [Ginhoux F. και συν., 2013]

ii] Λειτουργίες

Τα μικρογλοιακά κύτταρα αποτελούν τον πληθυσμό των μακροφάγων του ΚΝΣ, η φυσιολογική λειτουργία των οποίων σχετίζεται όχι μόνο με τη νευροανοσολογική απάντηση του ΚΝΣ σε εγγενείς και περιβαλλοντικούς παράγοντες, αλλά και στη διατήρηση της ομοιόστασης του εγκεφάλου σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις, στον έλεγχο της διαφοροποίησης και του πολλαπλασιασμού των

νευρώνων, στο σχηματισμό αλλά και τη μείωση του αριθμού των συνάψεων, όταν αυτό απαιτείται (το λεγόμενο *synaptic pruning* ή *synaptic stripping*), στη μυελίνωση των νευρώνων από τα ολιγοδενδροκύτταρα, καθώς και στη φαγοκύττωση δενδριτών και αποπτωτικών κυττάρων [Εικόνα 8, Dong Y. & Yong W., 2019].



Εικόνα 8: «Ο ρόλος των μικρογλοιακών κυττάρων στην ομοίωση του ΚΝΣ» [Dong Y. & Yong W., 2019]

Ενδιαφέρουσα ιδιότητά τους και ξεχωριστό χαρακτηριστικό τους αποτελεί το γεγονός ότι τα μικρογλοιακά κύτταρα δε βρίσκονται σε μόνιμη αλληλεπίδραση και επικοινωνία, τόσο μεταξύ τους, όσο και με άλλα γειτονικά κύτταρα, εν αντιθέσει με τους νευρώνες, οι οποίοι διασυνδέονται εκτεταμένα με ηλεκτροχημικές συνάψεις, και τα αστροκύτταρα τα οποία επιδιώκουν μέσω διαύλων κοννεξινών τη μεταξύ τους επικοινωνία όταν βρίσκονται σε ευρεία ενεργοποίηση. Το ιδιαίτερο αυτό στοιχείο προσφέρει τη βέλτιστη στρατηγική μεγιστοποίησης της αποδοτικότητάς τους στο να «σαρώνουν» ανεμπόδιστα το μικροπεριβάλλον τους [Walker R. και συν., 2014].

iii] Μορφολογία και στάδια ενεργοποίησης

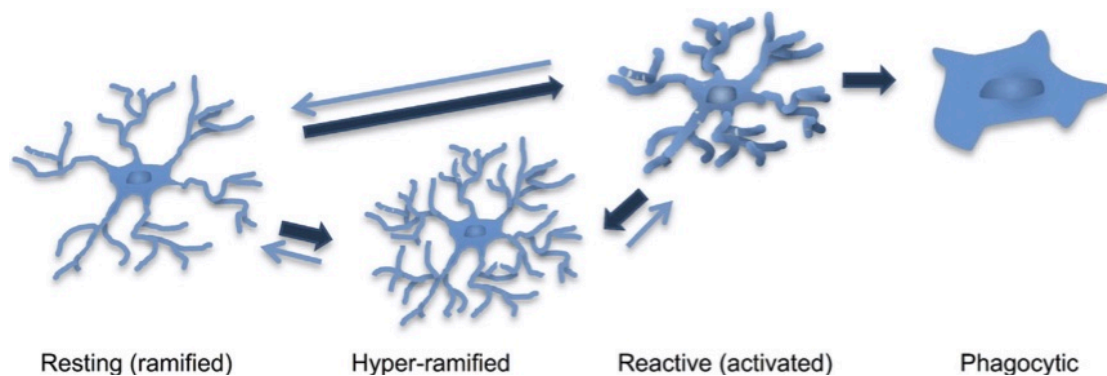
Σε κατάσταση ηρεμίας, τα μικρογλοιακά κύτταρα είναι μικρά κύτταρα με χαρακτηριστικό τους τις πολλαπλές μακριές ακτινωτές αποφυάδες και το μικρού μεγέθους κυτταρικό τους σώμα (ευρέως αποδεκτή κατάσταση «resting» ή «ramified microglia») [Εικόνες 9 & 10]. Τα μη διεγερμένα μικρογλοιακά κύτταρα δεν είναι όμως αδρανή. Στην πραγματικότητα στην κατάσταση αυτή χαρακτηρίζονται από έντονη κινητικότητα, καθώς «σαρώνουν» το εν γένει εξωκυτταρικό τους περιβάλλον. Ωστόσο, η έντονη αυτή δραστηριότητα δεν επηρεάζει αρνητικά το εύθραυστο νευρωνικό δίκτυο του ΚΝΣ, αντίθετα υποστηρίζει τις περιοχές του εγκεφάλου θέτοντας υπό έλεγχο κάθε αλλαγή που επέρχεται [Walker R. και συν., 2014].

Διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως η λοίμωξη, η κατάχρηση ουσιών όπως το αλκοόλ και τα ναρκωτικά, διάφοροι στρεσογόνοι παράγοντες, καθώς και νευροεκφυλιστικές παθήσεις έχουν ως αντίκτυπο τη διατάραξη ή ακόμα και την απώλεια της ομοίωσης του εγκεφάλου, προκαλώντας μία ταχεία και σημαντική

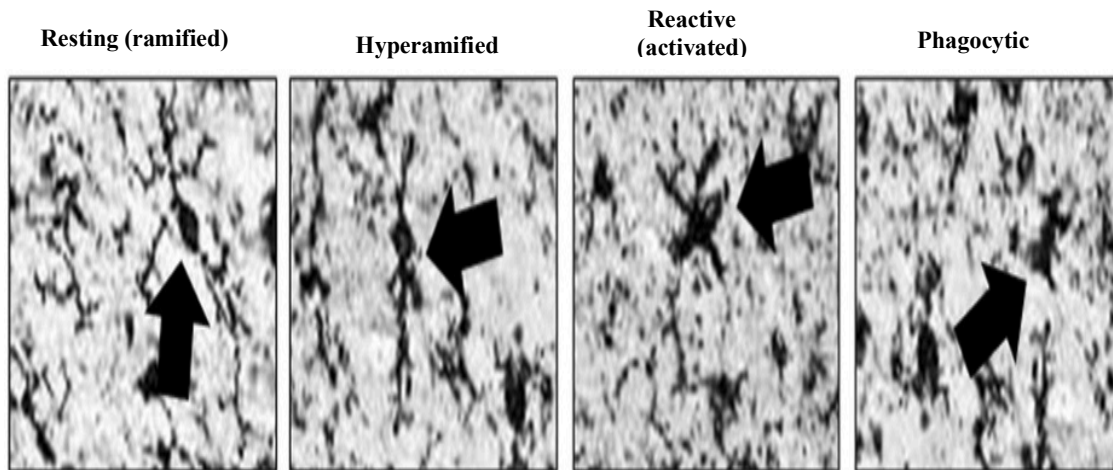
αλλαγή που αντανακλάται στη μορφολογία, στο πρότυπο γονιδιακής έκφρασης, καθώς και στη λειτουργικότητα του πληθυσμού των μικρογλοιακών κυττάρων [Walker R. και συν., 2014].

Στα αρχικά στάδια της ενεργοποίησής τους τα μικρογλοιακά κύτταρα χαρακτηρίζονται ως «*hyper-ramified*» [Εικόνες 9 & 10]. Στο στάδιο αυτό ο αριθμός και το μήκος των αποφύσεων τους αυξάνονται, ενώ κύριο χαρακτηριστικό αποτελεί η έκκριση προ-φλεγμονωδών κυττοκινών (*TNF-α*, *IL-1β*, *IL-6*). Στη συνέχεια, τα μικρογλοιακά κύτταρα υπεισέρχονται σε μία ιδιαιτέρως ενεργή κατάσταση (ευρέως αποδεκτή κατάσταση «*reactive*» ή «*bushy*» *microglia*) [Εικόνες 9 & 10], η οποία αποτελεί το μεταβατικό στάδιο προ της τελικής ενεργοποίησής τους. Στη φάση αυτή τα κυτταρικά σώματα των κυττάρων της μικρογλοίας είναι ιδιαιτέρως διογκωμένα, ενώ παρατηρείται μειωμένη κυτταρική ενεργοποίηση [Walker R. και συν., 2014 & Crews F. & Vetreno R, 2015].

Τελικό στάδιο στην εν λόγω ροή ενεργοποίησης των μικρογλοιακών κυττάρων αποτελεί η τελική μορφολογική διαμόρφωση χαρακτηριστική των φαγοκυττάρων [Εικόνες 9 & 10]. Στο στάδιο αυτό, τα μικρογλοιακά κύτταρα μορφολογικά χαρακτηρίζονται από το στρογγυλεμένο σχήμα τους, καθώς και από την απώλεια των αποφύσεων τους ή την παρουσία μικρού αριθμού διακλαδώσεων. Η έκκριση προ-φλεγμονωδών κυττοκινών, δραστικών ελεύθερων ριζών που επάγονται από την υπέρμετρη έκφραση συνθασών όπως η *iNOS* (*inducible Nitric Oxide Synthase - iNOS*) και η οξειδάση NADPH (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase - NADPH*), αλλά και αυξητικών παραγόντων είναι στα μέγιστα επίπεδα [Walker R. και συν., 2014 & Crews F. & Vetreno R, 2015].



Εικόνα 9: «Μορφολογικές καταστάσεις των μικρογλοιακών κυττάρων» [Walker R. και συν., 2014]



Εικόνα 10: «Μορφολογικές καταστάσεις των μικρογλοιακών κυττάρων σε ανθρώπινο εγκέφαλο- *Iba1* ανοσοϊστοχημεία» [Crews F. & Vetreno R, 2015]

Ένα πιο απλουστευμένο και ευρέως αποδεκτό πλαίσιο διάκρισης των προαναφερόμενων σταδίων ενεργοποίησης των μικρογλοιακών κυττάρων αποτελεί η κατηγοριοποίησή τους σε μικρογλοιακά κύτταρα M1 και M2 φάσης. Στην M1 τα μικρογλοιακά κύτταρα απελευθερώνουν προ-φλεγμονώδεις κυττοκίνες και δραστικές ελεύθερες ρίζες, ενώ χαρακτηριστικό της M2 φάσης αποτελεί η απελευθέρωση αντιφλεγμονωδών κυττοκινών, όπως οι ιντερλευκίνες 10 και 4 (*IL-10* & *IL-4*) [Coleman L. & Crews F., 2018].

Η έντονη αυτή μορφολογική δραστηριότητα των μικρογλοιακών κυττάρων έχει μελετηθεί και από εξελικτική σκοπιά. Διαπιστώθηκε ότι υπάρχει μία εμφανής και ξεκάθαρη διατήρηση της πληθώρας των μορφολογικών αυτών παραλλαγών μεταξύ των ειδών, στοιχείο που αντικατοπτρίζει τον κρίσιμο ρόλο που διαδραματίζουν οι αλλαγές αυτές κατά την ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων [Walker R. και συν., 2014].

ΑΛΚΟΟΛ ΚΑΙ ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

ι] Γενικά χαρακτηριστικά

Η αιθανόλη (ή αιθυλική αλκοόλη ή οινόπνευμα) είναι μία οργανική χημική ένωση [$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$] που αποτελεί το κύριο συστατικό των αλκοολούχων ποτών. Απορροφάται σχεδόν αποκλειστικά από το γαστρεντερικό σωλήνα και πιο συγκεκριμένα από το λεπτό έντερο, ενώ μικρά ποσοστά απορρόφησης παρατηρούνται από το δέρμα και τους πνεύμονες. Το στάδιο της απορρόφησης ακολουθεί αυτό της κατανομής της μέσω διάχυσης προς το αίμα και τους ιστούς, με την ταχύτερη κατανομή να παρατηρείται στους ιστούς με τη μεγαλύτερη αιμάτωση [Klaassen C. & Watkis J., 2010].

Το 90-98% της αιθανόλης που απορροφάται μεταβολίζεται στο ήπαρ με ενζυμική οξείδωση μέσω της δράσης δύο ενζύμων, της αλκοολικής αφυδρογονάσης (*Alcohol Dehydrogenase* - *ADH*) και του κυτοχρώματος P450 2E1. Το υπόλοιπο 1-2%

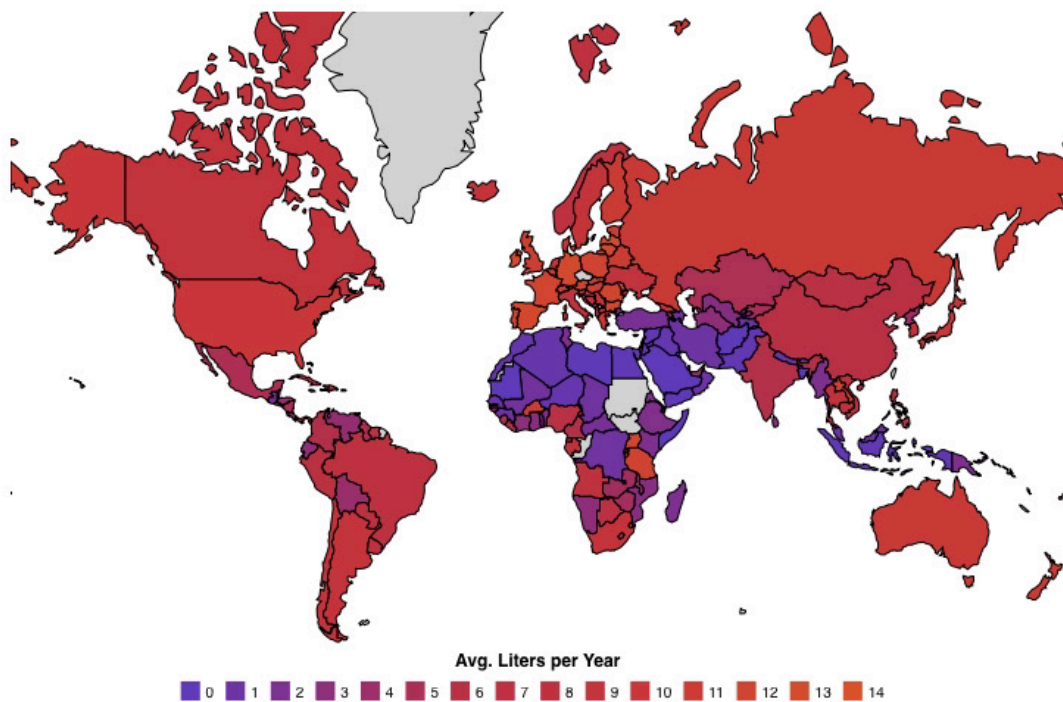
αποβάλλεται αναλλοίωτο από τους νεφρούς, μέσω των ούρων, καθώς και από τους πνεύμονες. Μικρές ποσότητες ανιχνεύονται σε ιδρώτα, σάλιο και δάκρυα [Klaassen C. & Watkis J., 2010].

ii] Επιδημιολογικά δεδομένα

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ έχει σοβαρές συνέπειες στη δημόσια υγεία, επιβαρύνει σημαντικά το επίπεδο νοσηρότητας του πληθυσμού και αποτελεί τον τρίτο κύριο παράγοντα κινδύνου πρόωρου θανάτου και αναπηριών παγκοσμίως.

Εκτός από εξαρτησιογόνος ουσία, το αλκοόλ αποτελεί και βασική αιτία για την εκδήλωση περισσότερων από εξήντα ασθενειών και καταστάσεων, συμπεριλαμβανομένων των τραυματισμών από ατυχήματα υπό την επήρεια μέθης, ψυχικών διαταραχών και διαταραχών συμπεριφοράς, διαφόρων τύπων καρκίνου, καρδιαγγειακών παθήσεων, παθήσεων των πνευμόνων κ.α..

Στατιστικές μελέτες αναδεικνύουν με αριθμούς τη σοβαρή επίδραση της υπερβολικής κατανάλωσης αλκοόλ στην υγεία. Η κατάχρηση αλκοόλ οδηγεί ετησίως σε έως και 3 εκατομμύρια θανάτους παγκοσμίως, θνησιμότητα δηλαδή υψηλότερη από αυτή που προκαλείται από ασθένειες όπως ο διαβήτης, η φυματίωση και το σύνδρομο επίκτητης ανοσοποιητικής ανεπάρκειας (HIV/AIDS).



Εικόνα 11: «Παγκόσμιος χάρτης κατανάλωσης αλκοόλ ανά άτομο για το έτος 2021»
[Πηγή: World Health Organization]

Ο ετήσιος μέσος όρος κατανάλωσης αλκοόλ παγκοσμίως αντιστοιχεί περίπου στα 6,2L καθαρό αλκοόλ ανά άτομο ηλικίας άνω των δεκαπέντε ετών ανά έτος (~1L κρασί εβδομαδιαίως). Η Ευρώπη κατατάσσεται πρώτη διεθνώς στην κατανάλωση αλκοόλ με

μέσο επίπεδο κατανάλωσης σχεδόν διπλάσιο από το μέσο επίπεδο παγκοσμίως, ενώ πάνω από το ένα πέμπτο του πληθυσμού ηλικίας δεκαπέντε ετών και άνω αναφέρει βαριά επεισοδιακή κατανάλωση αλκοόλ (*binge drinking*) τουλάχιστον μια φορά την εβδομάδα. Η βαριά επεισοδιακή κατανάλωση αλκοόλ είναι ευρέως διαδεδομένη σε όλες τις ηλικίες και σε όλη την Ευρώπη [Πηγή: World Health Organization].

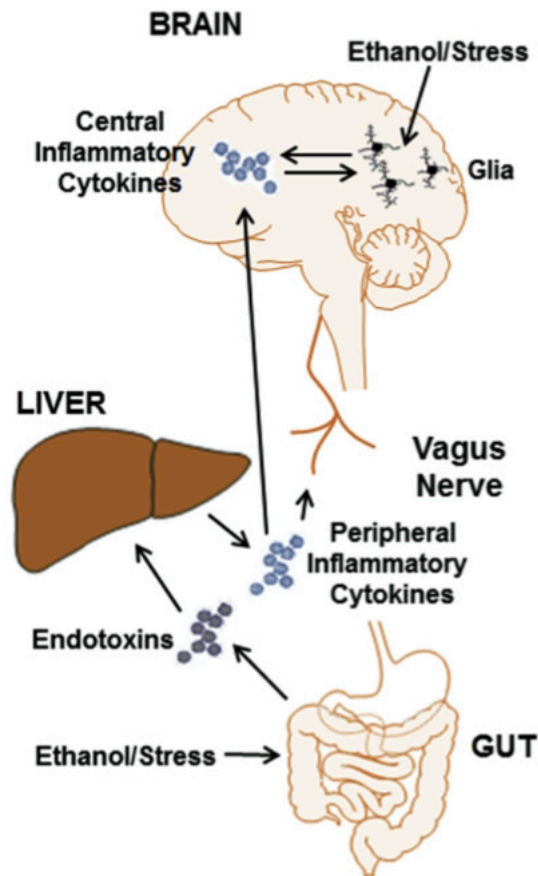
iii] Μηχανισμοί δράσης της αιθανόλης στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

Υπάρχουν δύο διακριτοί μηχανισμοί μέσω των οποίων η χορήγηση αιθανόλης δύναται να επιδράσει στο ΚΝΣ και δη στον εγκέφαλο: συστηματικά και απευθείας [Crews F., 2017].

Συστηματική/Έμμεση δράση: Η κατανάλωση αλκοόλ δύναται να προκαλέσει ένα φαινόμενο γνωστό ως «διαρρέον έντερο» (*leaky gut*) ή «εντερική διαπερατότητα» (*gut permeability*). Η αυξημένη διαπερατότητα του λεπτού εντέρου έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη μεταφορά/μετατόπιση βακτηριακών προϊόντων από την εντερική κοιλότητα στην κυκλοφορία του αίματος. Τα προϊόντα αυτά (π.χ. ενδοτοξίνες) προέρχονται από τα βακτήρια που αποτελούν τη φυσιολογική μικροχλωρίδα του εντέρου και εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος αφού πρώτα μεταβλισθούν στο ήπαρ. Η παρουσία των ενδοτοξινών αυτών στο ήπαρ οδηγεί σε ανοσολογική απόκριση από τα μακροφάγα του ήπατος και κατ' επέκταση στην αυξημένη έκκριση φλεγμονωδών κυττοκινών, όπως ο TNF-α και οι ιντερλευκίνες 1β και 6 (*IL-1β* και *IL-6*). Τα μόρια αυτά είτε:

- i. αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς τους που εντοπίζονται στις απολήξεις του πνευμονογαστρικού νεύρου, γεγονός που έχει σαν αποτέλεσμα το σήμα της επαγόμενης φλεγμονής να μεταφερθεί στις περιοχές του ΚΝΣ που ενέχονται στην ενεργοποίηση μηχανισμών που στοχεύουν στη ρύθμιση της παθολογικής αυτής κατάστασης, είτε
- ii. διασχίζουν μέσω της κυκλοφορίας του αίματος τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό μέσω πρωτεϊνών μεταφορέων ή μέσω απλής διάχυσης από τα λεγόμενα «leaky» - διαρρέοντα σημεία και εισέρχονται στον εγκέφαλο [Εικόνα 12].

Άμεση δράση: Η αιθανόλη αν και είναι σχετικά πολικό μόριο, είναι επίσης λιπόφιλο και κατά συνέπεια περνά αβίαστα τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Έτσι, η ίδια η αιθανόλη ενεργοποιεί απ' ευθείας, δίχως την επαγωγή ενδιάμεσων μονοπατιών και μορίων της περιφέρειας, τα κύτταρα της γλοίας (*μικρογλοιακά και αστροκύτταρα*) [Εικόνα 12, Crews F., 2017].

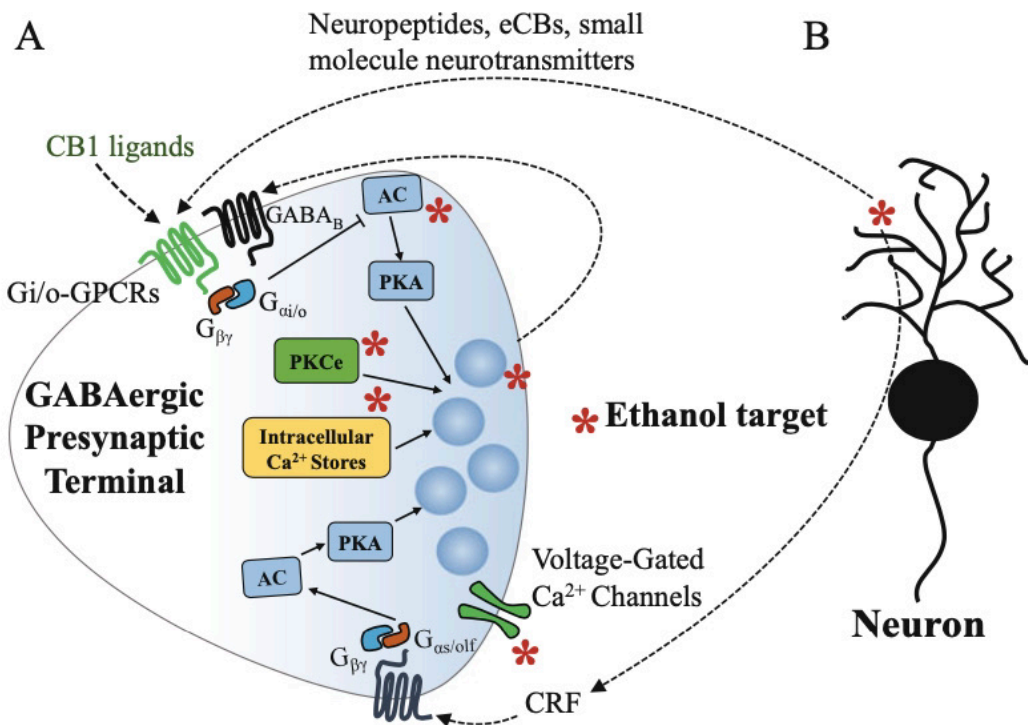


Εικόνα 12: «Μηχανισμοί επαγόμενης ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού από στρες ή πρόσληψη αιθανόλης» [Crews F., 2017]

Η κύρια δράση του αλκοόλ αφορά στο ΚΝΣ. Η δράση του είναι κατασταλτική και όχι διεγερτική. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις το κατασταλτικό αποτέλεσμα είναι εμφανές και μοιάζει με εκείνο των αναισθητικών φαρμάκων.

Τα πρώτα συμπτώματα περιλαμβάνουν εξασθένηση της μνήμης και της προσοχής, ήπιες διαταραχές του λόγου, διαταραχές στην εκτέλεση λεπτών χειρισμών και ελάττωση της αντίδρασης σε αισθητηριακά ερεθίσματα, συμπτώματα που εκδηλώνονται μόλις η συγκέντρωση του αλκοόλ στο αίμα ξεπεράσει τα 40mg/mL. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρατηρείται σταδιακή θόλωση της διάνοιας (μέθη), κεφαλαλγίες κ.λ.π., συμπτώματα που εμφανίζονται όταν η συγκέντρωση του αλκοόλ στο αίμα προσεγγίζει τα 150-200mg/mL, ενώ σε ακόμα υψηλότερες συγκεντρώσεις εμφανίζεται η εικόνα της βαριάς μέθης και της δηλητηρίασης, με σύγχυση, λήθαργο και κώμα [Πηγή: World Health Organization].

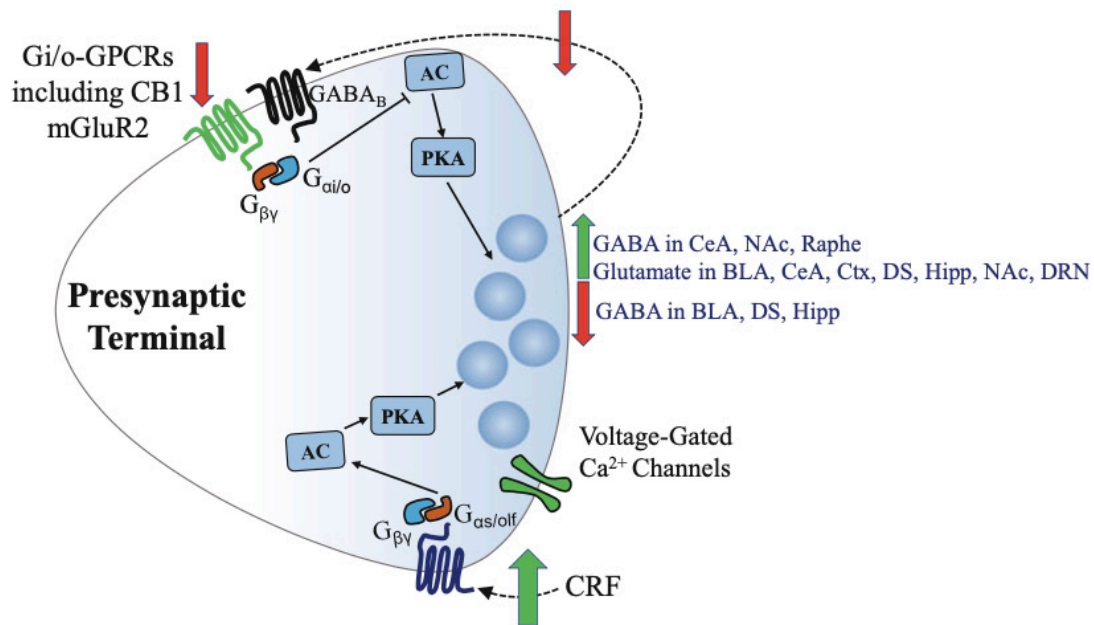
Μια σειρά από μελέτες έχουν αναδείξει τις συνέπειες της έκθεσης στην αιθανόλη στην έκκριση διαφόρων νευροδιαβιβαστών στην πλειοψηφία των εγκεφαλικών περιοχών, με πρωταγωνιστικό ρόλο να κατέχουν οι επιδράσεις της αιθανόλης στις GABAεργικές συνάψεις και σε μικρότερο βαθμό στις γλουταμινεργικές συνάψεις.



Εικόνα 13: «Μοριακοί στόχοι και νευρορυθμιστές που ενέχονται στις επαγόμενες από την έκθεση αιθανόλης προσυναπτικές αλλαγές στις GABAεργικές συνάψεις» [Lovinger D., 2017]

Συντμήσεις: *VGCCs* - *Voltage-gated Calcium Channels* == τασεοεξαρτώμενα κανάλια Ca²⁺, *AC* - *Adenyl Cyclase* = αδενυλική κυκλάση, *PKA* - *Protein Kinase A* = πρωτεϊνική κινάση A, *PKCε* - *Protein Kinase C epsilon* = ισομορφή ε της πρωτεϊνικής κινάσης C, *CRF* - *Corticotrophin - Releasing Factor* = παράγοντας CRF, *eCB* - *endocannabinoid* = ενδοκανναβιδοειδή, *CB1* - *Cannabinoid type 1* = κανναβιδοειδές τύπου 1

Στην **Εικόνα 13** διακρίνονται με αστερίσκο οι στόχοι της αιθανόλης στους GABAεργικούς προσυναπτικούς νευρώνες, η ενεργοποίηση των οποίων οδηγεί στην αύξηση της απελευθέρωσης του GABA. Πιο συγκεκριμένα, πρωτεύον στόχος της αιθανόλης θεωρούνται οι τασεοεξαρτώμενοι διάλυτοι Ca²⁺ (*Voltage-gated Calcium Channels* - *VGCCs*), η ενεργοποίηση των οποίων οδηγεί στην υπέρμετρη εισροή ιόντων Ca²⁺ μέσα στα κύτταρα. Περαιτέρω αύξηση του ενδοκυττάριου Ca²⁺ προκαλείται από την ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης (*Adenyl Cyclase* - *AC*), της ισομορφής ε της πρωτεϊνικής κινάσης C (*Protein Kinase C epsilon* - *PKCε*), καθώς και των ενδοκυτταρικών αποθηκών Ca²⁺. Τέλος, η παρατεταμένη έκθεση στην αιθανόλη οδηγεί στην έκκριση νευροπεπτιδίων -όπως ο *CRF* (*Corticotrophin Releasing Factor*- *CRF*) και τα ενδοκανναβιδοειδή (*endocannabinoid* - *eCB*)- και μικρού μεγέθους νευροδιαβιβαστών (συμπεριλαμβανομένου του GABA) από εγγύς νευρώνες, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα είτε την ενίσχυση είτε τη ρύθμιση/τροποποίηση της προαναφερόμενης δράσης της αιθανόλης (δηλ. την ενδοκυτταρική αύξηση Ca²⁺ και την επερχόμενη απελευθέρωση του GABA) μέσω ρύθμισης της αλληλεπίδρασης των GABA_B υποδοχέων με Gi/o-GPCRs [Lovinger D., 2017].



Εικόνα 14: «Προσυναπτικές νευρο-προσαρμογές στην παρατεταμένη έκθεση στην αιθανόλη»
[Lovinger D., 2017]

Συντμήσεις: **AC** - Adenyl Cyclase = αδενυλική κυκλάση, **BLA** - Basolateral Amygdala = πλαγιοβασική αμυγδαλή, **CB1** - Cannabinoid type 1 receptor = υποδοχέας κανναβιδοειδών τύπου 1, **CeA** - Central Amygdala = κεντρική αμυγδαλή, **CRF** - Corticotrophin-Releasing Factor = παράγοντας απελευθέρωσης κορτικοτροφίνης, **Ctx** - Cortex = φλοιός, **DS** - Dorsal Striatum = ραχιαίο ραβδωτό, **Hipp** - Hippocampus = ιππόκαμπος, **NAc** - Nucleus Accumbens = επικληνής πυρήνας, **DRN** - Dorsal Raphe Nucleus = ραχιαίος πυρήνας της ραφής, **PKA** - Protein Kinase A = πρωτεϊνική κινάση A

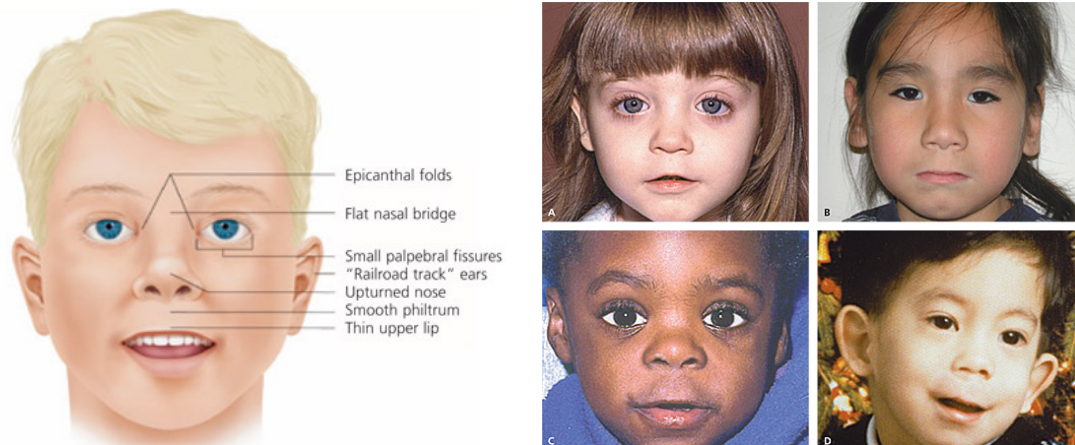
Αναφορικά με τις αλλαγές που επέρχονται στην έκκριση του γλουταμινικού οξέος (Glu) από την έκθεση στην αιθανόλη αξίζει να αναφερθεί ότι οι επιδράσεις της δεν είναι τόσο διακριτές όσο αυτές που έχουν περιγραφεί σχετικά με το GABA. Παρόλα αυτά, η πλειοψηφία των μελετών έχουν αναδείξει ότι οι νευρωνικές γλουταμινεργικές συνάψεις επιδεικνύουν μία σχετική ευαισθησία στην έκθεση στην αιθανόλη, με την αυξημένη απελευθέρωση του Glu να αποτελεί το πλέον χαρακτηριστικό εύρημα. Στην **Εικόνα 14** συνοψίζονται ενδεικτικά οι επιδράσεις της έκθεσης στην αιθανόλη τόσο στα επίπεδα GABA, όσο και Glu σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου [Lovinger M. David, 2017].

ΕΜΒΡΥΙΚΟ ΑΛΚΟΟΛΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ

ι] Γενικά χαρακτηριστικά

Ο εγκέφαλος αποτελεί ένα από τα πλέον σημαντικά όργανα – στόχους του αλκοόλ. Ειδικότερα, ο αναπτυσσόμενος εγκέφαλος είναι ιδιαίτερα ευάλωτος στο αλκοόλ, η κατανάλωση του οποίου κατά τη διάρκεια της κύησης μπορεί να οδηγήσει σε ένα μεγάλο εύρος σωματικών, μαθησιακών και συμπεριφορικών διαταραχών. Οι διαταραχές αυτές δεν ακολουθούν ένα ομοιόμορφο μοτίβο εκδήλωσης σε όλες τις εγκεφαλικές περιοχές, με κάποιες περιοχές να είναι περισσότερο ευάλωτες στην παρουσία αλκοόλ [Alfonso-Loeches S. & Guerri C., 2011].

Το εμβρυικό αλκοολικό σύνδρομο (*Fetal Alcohol Syndrome - FAS*) αποτελεί την πλέον επιβλαβή μορφή ενός ευρύτερου φάσματος εμβρυικών διαταραχών (*Διαταραχή Φάσματος Εμβρυϊκού Αλκοολισμού - Fetal Alcohol Spectrum Disorder - FASD*) που οφείλονται στη χρήση αλκοόλ από τη μητέρα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Ο όρος «*Διαταραχή Φάσματος Εμβρυϊκού Αλκοολισμού*» προτάθηκε για να αναδείξει την πολυπλοκότητα αλλά και την ευρεία γκάμα συνεπειών της προγεννητικής έκθεσης στο αλκοόλ [Mattson S. και συν., 2019].



Εικόνα 15: «Χαρακτηριστικά γνωρίσματα προσώπου σε παιδιά με εμβρυικό αλκοολικό σύνδρομο» [Wattendorf D. και συν., 2005]

Στο φάσμα του εμβρυϊκού αλκοολισμού συγκαταλέγονται διαταραχές όπως: [1] το **μερικό εμβρυικό αλκοολικό σύνδρομο (*partial FAS*)**, ένας ενδιάμεσος φαινότυπος χαρακτηριζόμενος από την απουσία ορισμένων χαρακτηριστικών του εμβρυικού αλκοολικού συνδρόμου, [2] **εκ γενετής ανωμαλίες σχετιζόμενες με το αλκοόλ (*Alcohol-Related Birth Defects - ARBD*)**, ένας φαινότυπος με συγκεκριμένες σωματικές ανωμαλίες, καθώς και [3] **νευρολογικές διαταραχές σχετιζόμενες με το αλκοόλ (*Alcohol-Related Neurological Disorders - ARND*)**, χαρακτηριστικό των οποίων αποτελούν συμπεριφορικές και μαθησιακές διαταραχές με νευροφυσιολογικό υπόβαθρο, οι οποίες δε συνοδεύονται ωστόσο από εξωτερικές δυσμορφίες [Mattson S. και συν., 2019].

Το εμβρυικό αλκοολικό σύνδρομο χαρακτηρίζεται από αναπτυξιακές διαταραχές, κρανιοπροσωπικές δυσμορφίες [Εικόνα 15], καθώς και διαταραχές του ΚΝΣ που αντανακλούν σε κινητικά, νοητικά και συμπεριφορικά προβλήματα.

ii] Παράγοντες κινδύνου

Ένας μεγάλος αριθμός βιολογικών και περιβαλλοντικών παραγόντων δύνανται να επηρεάσουν το βαθμό επίδρασης του αλκοόλ στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο. Στους σημαντικότερους από αυτούς τους παράγοντες συγκαταλέγεται όχι μόνο η ποσότητα, αλλά και το μοτίβο έκθεσης στο αλκοόλ. Μελέτες έχουν δείξει ότι η βαριά επεισοδιακή κατανάλωση αλκοόλ (*binge drinking*) οδηγεί σε υψηλότερα επίπεδα αλκοόλ και έχει

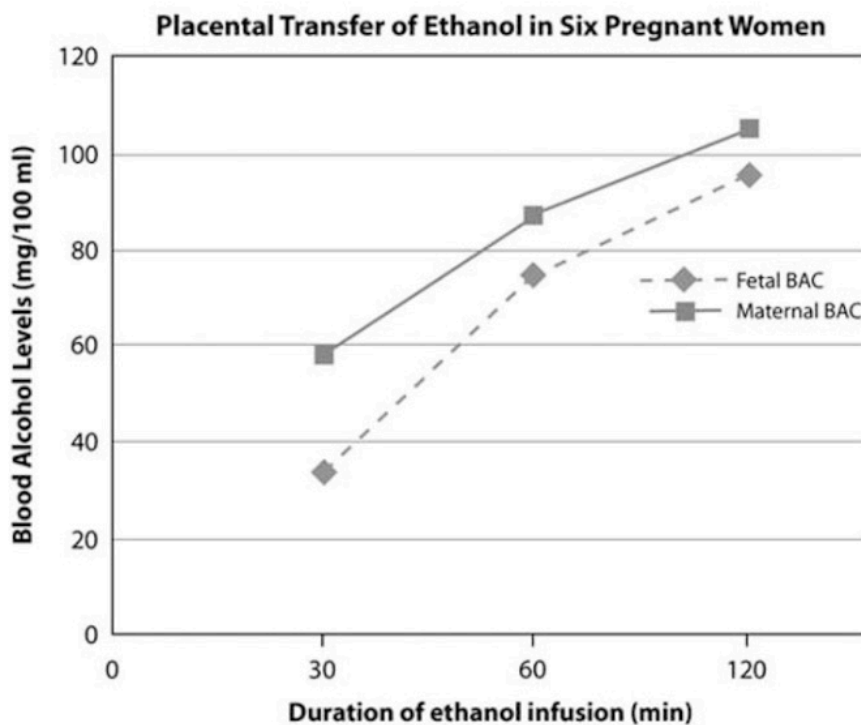
περισσότερο επιβλαβείς συνέπειες στο έμβρυο συγκριτικά με τη χρόνια κατανάλωση αλκοόλ. Άλλοι σημαντικοί παράγοντες είναι το αναπτυξιακό στάδιο έκθεσης στην αλκοόλη, το γενετικό υπόβαθρο τόσο της μητέρας όσο και του εμβρύου -*κυρίως όσο αφορά παραλλαγές στη μεταβολική οδό του αλκοόλ*-, η ηλικία και η διατροφικές συνήθειες της μητέρας και η πιθανή συνεργική δράση της αιθανόλης με άλλα φάρμακα [Alfonso-Loeches S. & Guerri C., 2011].

iii] Μεταβολισμός αιθανόλης από το έμβρυο

Η μεταφορά του αλκοόλ από τη μητέρα στο έμβρυο διαμέσου του πλακούντα αποτελεί το αρχικό βήμα της προγεννητικής έκθεσης του εμβρύου στο αλκοόλ. Η χημική δομή του μορίου της αιθανόλης παρέχει τη δυνατότητα ταχείας διάχυσης μέσω των βιολογικών μεμβρανών του πλακούντα, καθώς επίσης και ταχείας διαλυτοποίησης στα σωματικά υγρά του εμβρύου, στοιχεία που δικαιολογούν το γεγονός ότι τα επίπεδα αιθανόλης στην εμβρυική κυκλοφορία προσεγγίζουν αυτά της μητέρας εντός χρονικού διαστήματος μίας ώρας, ενώ λαμβάνει χώρα εξισορρόπησης τους εντός δύο ωρών [Εικόνα 16]. Παρόλο που ο πλακούντας είναι ένα μεταβολικά ενεργό όργανο, διαθέτει πολύ μικρή ικανότητα μεταβολισμού της αιθανόλης με αποτέλεσμα να μην επιτυγχάνεται μείωση του ποσοστού αιθανόλης που εισέρχεται στο έμβρυο [Burd L. και συν., 2012].

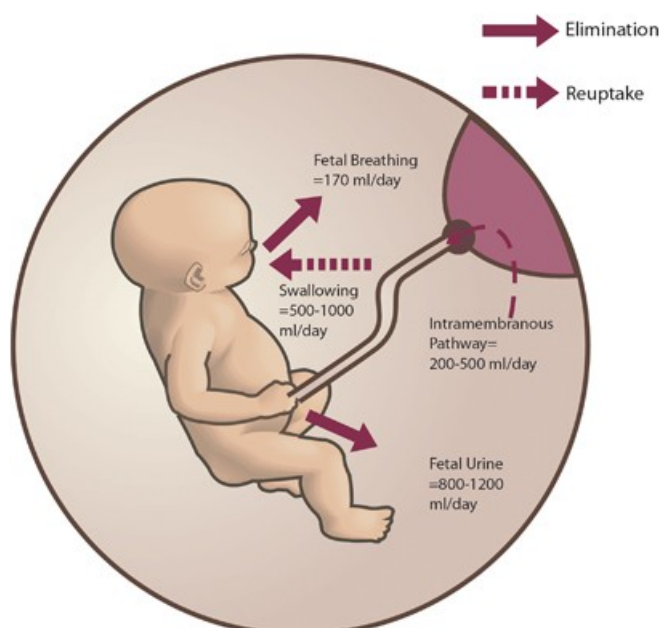
Η μειωμένη ικανότητα μεταβολισμού της αιθανόλης από τον πλακούντα ενισχύεται και από δύο ακόμα δεδομένα. Πρώτον, η ισομορφή της αφυδρογονάσης της αλκοόλης (*alcohol dehydrogenase*) -του βασικού ενζύμου στο μονοπάτι οξειδωσης της αλκοόλης- που είναι κυρίαρχη στον πλακούντα εμφανίζει χαμηλή συγγένεια και μειωμένο μεταβολικό ρυθμό συγκριτικά με τις λοιπές ισομορφές, στοιχείο που καθιστά το ρόλο της μη ουσιώδη στον οξειδωτικό μεταβολισμό της αλκοόλης. Δεύτερον, παρόλο που ο πλακούντας χαρακτηρίζεται από την ικανότητα μεταβολισμού της αλκοόλης σε αιθυλεστέρες λιπαρών οξέων (*Fatty Acid Ethyl Esters*) λόγω της παρουσίας της FAEE συνθάσης, το ένζυμο αυτό διαδραματίζει δευτερεύοντα ρόλο στη διαδικασία του μη οξειδωτικού μεταβολισμού της αιθανόλης [Burd L. και συν., 2012].

Από τη στιγμή που η αιθανόλη εισέλθει στην κυκλοφορία του αίματος του εμβρύου, ο μηχανισμός μεταβολισμού της είναι ο ίδιος με αυτόν που λαμβάνει χώρα στους ενήλικες. Η αλκοολική αφυδρογονάση, το κυρίαρχο ένζυμο του οξειδωτικού μεταβολισμού της αιθανόλης στο ήπαρ, ανιχνεύεται μετά τον 2^ο μήνα της κύησης, ωστόσο η μεταβολική της ισχύς είναι περιορισμένη. Από την άλλη πλευρά, η περιορισμένη έκφραση του ενζύμου CYP2E1 -*ένζυμο της υπεροικογένειας του κυτοχρώματος P450 με μεγάλη μεταβολική ισχύ*- επιτείνει τα αυξημένα ποσοστά αιθανόλης στην κυκλοφορία του εμβρύου [Burd L. και συν., 2012].



Εικόνα 16: «Εύρος μεταφοράς αιθανόλης από τη μητέρα στο έμβryo» [Burd L. και συν., 2012]
Συντμήσεις: BAC: **B**lood **A**lcohol **C**oncentration, συγκέντρωση αλκοόλης στο αίμα

Τέλος, ένας ακόμα περιοριστικός παράγοντας που αυξάνει τη συγκέντρωση και το χρόνο δράσης της αιθανόλης στο έμβryo είναι η επαναρρόφηση της αλκοόλης που απεκκρίνεται από το έμβryo (είτε μέσω της πνευμονικής οδού, είτε μέσω των νεφρικών απεκκρίσεων) στην κυκλοφορία του αίματος. Έχουν αναγνωριστεί δύο μονοπάτια επαναρρόφησης της αλκοόλης: [1] η κατάποσή της από το έμβryo, ικανότητα που ξεκινά περί την 11^η εβδομάδα της κύησης και [2] η εκ νέου διάχυσή της διαμέσου των μεμβρανών [Εικόνα 17].



Εικόνα 17: «Μονοπάτια επαναρρόφησης αλκοόλης μέσω του αμνιακού υγρού» [Burd L. και συν., 2012]

iv] Εγκεφαλικές περιοχές ευάλωτες στο αλκοόλ

Πέρα από τις εξωτερικές μορφολογικές δυσμορφίες που έχουν παρατηρηθεί κατά καιρούς στα παιδιά με εμβρυικό αλκοολικό σύνδρομο, ιδιαίτερη βαρύτητα έχει δοθεί στη μελέτη και καταγραφή των επιπτώσεων του συνδρόμου αυτού στις διάφορες εγκεφαλικές περιοχές, επιπτώσεις που συνδέονται άρρηκτα με τις συμπεριφορικές διαταραχές. Στην προσπάθεια αυτή εργαλείο αποτέλεσε η εφαρμογή μεθόδων οπτικής απεικόνισης εγκεφαλικών περιοχών παιδιών εκτιθέμενων ή όχι προγεννητικά στο αλκοόλ.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μελετών αυτών πέντε βασικές περιοχές του εγκεφάλου φαίνονται να είναι πιο ευάλωτες στην έκθεση στο αλκοόλ. Η **παρεγκεφαλίδα** (*cerebellum*) που ελέγχει το συντονισμό των κινήσεων και την ισορροπία, τα **βασικά γάγγλια** (*basal ganglia*) μια ομάδα υποφλοιωδών πυρήνων που είναι υπεύθυνοι κυρίως για τον έλεγχο των κινήσεων, διάφορων εκτελεστικών λειτουργιών και συμπεριφορών (*εκμάθηση συνήθειων*)², καθώς και συναισθημάτων, το **μεσολόβιο** (*corpus callosum*) υπεύθυνο για τη μεταβίβαση πληροφοριών μεταξύ των εγκεφαλικών ημισφαιρίων, οι **μετωπιαίοι λοβοί** (*frontal lobes*) που ελέγχουν πληθώρα διαδικασιών όπως η κρίση, η συγκέντρωση, ο αυτοέλεγχος, η συνείδηση, η νόηση, η μνήμη και κινητικές δεξιότητες [Nwaigwe Ugochukwu .V., 2017], ο **ιππόκαμπος** (*hippocampus*) υπεύθυνος για τη μάθηση, τη μνήμη, την ανάκτηση πληροφοριών και τη χωρική μνήμη, καθώς και η **αμυγδαλή** (*amygdala*) η οποία ρυθμίζει συναισθήματα, όπως ο φόβος και η επιθετικότητα, ενώ εμπλέκεται επίσης στην απόδοση συναισθηματικού νοήματος στις αναμνήσεις μας, στην επεξεργασία ερεθισμάτων ανταμοιβής/επιβράβευσης και τη λήψη αποφάσεων [Gil-Mohapel J. και συν., 2010].

v] Ζωικά μοντέλα

Οι ερευνητικές μελέτες στον άνθρωπο εμφανίζουν πολλαπλούς περιορισμούς που σχετίζονται με την αδυναμία ελέγχου της διάρκειας, της ποσότητας και του σταδίου απαρχής έκθεσης στο αλκοόλ κατά τη διάρκεια της κύησης. Τέτοιες δυσχέρειες παραμερίζονται με τη χρήση ζωικών μοντέλων [Almeida L. και συν., 2020].

Τα τρωκτικά και κυρίως οι αρουραίοι και τα ποντίκια αποτελούν τα πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενα θηλαστικά για τη μελέτη του εμβρυικού αλκοολικού συνδρόμου. Οι λόγοι που τα κατατάσσουν πρώτα στην επιλογή προτίμησης είναι ο εύκολος χειρισμός τους, η μικρή διάρκεια κύησης και η παραγωγή μεγάλου αριθμού απογόνων. Οι αρουραίοι πλεονεκτούν έναντι των ποντικών λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους τους και

² Σύμφωνα με μια επικρατούσα υπόθεση το ραχιαίο ραβδωτό (κερκοφόρος πυρήνας και κέλυφος) μεσολαβεί σε μια μορφή μάθησης κατά την οποία γίνονται βαθμιαία συσχετίσεις ερεθίσματος-απόκρισης [Stimulus-Response (S-R) association] ή αποκτούνται σταδιακά συνήθειες

των πιο εξελιγμένων συμπεριφορικών χαρακτηριστικών τους [Almeida L. και συν., 2020].

Το κύριο μειονέκτημα, πέρα των ηθικών φραγμών, της χρήσης των αρουραίων στη μελέτη του εν λόγω συνδρόμου έγκειται στο γεγονός ότι το τρίτο τρίμηνο της ανθρώπινης κύησης αντιστοιχεί σε μεταγεννητικό στάδιο ανάπτυξης στους αρουραίους. Αντίκτυπος αυτού είναι να παρατηρούνται διαφορές στις διαδικασίες απορρόφησης, κατανομής, μεταβολισμού και απέκκρισης της αλκοόλης μεταξύ ανθρώπου και αρουραίου [Almeida L. και συν., 2020].

Μοτίβα έκθεσης στο αλκοόλ

Τα μοτίβα έκθεσης στο αλκοόλ χαρακτηρίζονται από την ποσότητα, αλλά και από τη συχνότητα λήψης αιθανόλης, ενώ η επίδρασή τους ποσοτικοποιείται μέσω του προσδιορισμού της υψηλότερης συγκέντρωσης αιθανόλης στο αίμα (στον αρουραίο ανιχνεύεται μεταξύ 50-150min μετά τη χορήγηση) [Almeida L. και συν., 2020].

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, μελέτες έχουν δείξει ότι η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ σε σύντομο χρονικό διάστημα (*binge drinking*) είναι περισσότερο επιζήμια στη φυσιολογική ανάπτυξη του εγκεφάλου επίμυων, απ' ότι η έκθεση στην ίδια ποσότητα αλκοόλ για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, στοιχείο που αντανακλάται στη διαφορετική μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης στο αίμα που επιτυγχάνεται με αυτούς τους δύο τρόπους χορήγησης. Για παράδειγμα, η συνεχής χορήγηση (24h/ημέρα) σε νεογνά επίμυων 6.6gr αλκοόλης/kg βάρους/ημέρα οδηγεί σε μέγιστη συγκέντρωση αλκοόλης στο αίμα της τάξεως των 79-97mg/dL, ενώ η οξεία χορήγηση (8h/ημέρα) της ίδιας ημερήσιας δόσης σε μέγιστη συγκέντρωση αλκοόλης της τάξεως των 56-415mg/dL [Almeida L. και συν., 2020]. Επιπλέον, τα ευρήματα της εν λόγω μελέτης έρχονται να επιβεβαιώσουν την υπόθεση ότι η μείωση στη δοσολογία αιθανόλης, με ταυτόχρονη διατήρηση του σύντομου χρονικού διαστήματος χορήγησης, οδηγεί σε μεγαλύτερη μείωση του βάρους του εγκεφάλου, μεγαλύτερη απώλεια κυττάρων σε διάφορες εγκεφαλικές περιοχές, συγκριτικά με μεγαλύτερη δόση χορήγησης για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. [Almeida L. και συν., 2020].

Οδοί χορήγησης

Διάφορα μοντέλα χορήγησης αιθανόλης έχουν περιγραφεί κατά καιρούς, ιδίως κατά τη διάρκεια κύησης των πειραματόζωνων, καθένα ένα απ' τα οποία ανταποκρίνεται καλύτερα στο επιδιωκόμενο τελικό στόχο [Patten A. και συν., 2014].

Οι απ' ευθείας μέθοδοι χορήγησης εμπεριέχουν μεταβλητές, όπως το μοτίβο έκθεσης στο αλκοόλ, η ακριβής ποσότητα λήψης, καθώς και το προκαλούμενο στρες, οι οποίες πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας [Patten A. και συν., 2014].

Η εκούσια πρόσληψη τροφής περιέχουσας αιθανόλη και η ακούσια ενδογαστρική χορήγηση αιθανόλης είναι οι πλέον φυσιολογικές μέθοδοι χορήγησης. Η μεν πρώτη είναι μία πολύ ασφαλής τεχνική που ενδείκνυται στις περιπτώσεις που τα επίπεδα συγκέντρωσης αιθανόλης στο αίμα πρέπει να διατηρηθούν σε χαμηλά επίπεδα, η δε δεύτερη προσφέρει τον ακριβή έλεγχο ως προς την ποσότητα πρόσληψης και οδηγεί σε περισσότερο υψηλά επίπεδα συγκέντρωσης αιθανόλης στο αίμα. Η χορήγηση μέσω εισπνοής ή μέσω ένεσης επιφέρει πιο άμεσα αποτελέσματα συγκριτικά με τις δύο προαναφερθείσες μεθόδους χορήγησης.

Τέλος, δεδομένης της αναγκαιότητας προσομοίωσης των πειραματικών διεργασιών με αυτές της ανθρώπινης εμβρυικής ανάπτυξης, μία ακόμη μέθοδος χορήγησης σε μεταγεννητικό στάδιο αποτελεί η συνέχιση προσομοίωσης των συνθηκών εμβρυικής ανάπτυξης (*artificial rearing* ή *pur in a cup*) των πειραματόζων για εκείνο το χρονικό διάστημα που ισοδυναμεί στο τρίτο τρίμηνο της κύησης στον άνθρωπο. Η μέθοδος αυτή (ενδογαστρική λήψη αιθανόλης όντας σε ένα θερμό και περιορισμένο περιβάλλον) αν και επιτρέπει τον έλεγχο και τη ρύθμιση της ποσότητας λήψης φαγητού και αιθανόλης, χαρακτηρίζεται ως ιδιαιτέρως επεμβατική και δαπανηρή, ενώ αποτρέπει την ανάπτυξη κοινωνικών δεξιοτήτων από τα νεογέννητα ζώα, ικανότητες που αναπτύσσονται ιδιαίτερα κατά τη νεογνική περίοδο [Patten R. Anna και συν., 2014].

Προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη & ανάπτυξη του ΚΝΣ

Το πρώτο κρίσιμο αναπτυξιακό στάδιο στον αρουραίο, στο οποίο ενέχεται η προγεννητική έκθεση στην αλκοόλη, είναι αυτό μεταξύ της 5^{ης} και 11^{ης} ημέρας της κύησης κατά τη διάρκεια του οποίου συνεπάγονται αλλαγές στη διαδικασία της οργανογένεσης, τη διαμόρφωση του νευρικού σωλήνα και τον πολλαπλασιασμό νευρικών πρόδρομων μορίων σε περιοχές γειτονικές του νευρικού σωλήνα [βλ. **Εικόνες 2 & 5**]. Υψηλά ποσοστά αλκοόλης στο στάδιο αυτό, όχι μόνο προκαλούν μείζονα προβλήματα στο σχηματισμό του νευρικού σωλήνα, αλλά επιπλέον οδηγούν σε χαρακτηριστικές δυσμορφίες προσώπου, όμοιες με αυτές που παρατηρούνται στα παιδιά με εμβρυικό αλκοολικό σύνδρομο [Almeida L. και συν., 2020].

Δεύτερο κρίσιμο αναπτυξιακό στάδιο αποτελεί αυτό μεταξύ της 11^{ης} και 21^{ης} ημέρας της κύησης στον αρουραίο. Κατά τη διάρκεια αυτού στις περισσότερες περιοχές του ΚΝΣ πραγματοποιούνται διακριτές διαδικασίες διαφοροποίησης, ενώ αρκετοί τύποι νευρικών κυττάρων αναδύονται και εν συνεχεία μεταναστεύουν σε συγκεκριμένες εγκεφαλικές περιοχές [βλ. **Εικόνες 2 & 5**]. Υψηλά ποσοστά αλκοόλης στο στάδιο αυτό επηρεάζουν τις διαδικασίες πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης των κυττάρων του νεοφλοιού, της παρεγκεφαλίδας, του ιππόκαμπου και των βασικών γαγγλίων [Almeida L. και συν., 2020].

Το τελευταίο καθοριστικής σημασίας αναπτυξιακό στάδιο είναι αυτό μεταξύ της 18^{ης} ημέρας της κύησης μέχρι την 9^η ημέρα μετά τη γέννηση. Το στάδιο αυτό χαρακτηρίζεται από τον ταχύ πολλαπλασιασμό των κυττάρων της γλοίας, τη δημιουργία συνάψεων, τη διαμόρφωση δενδριτών -διαδικασίες που οδηγούν στην αύξηση βάρους του εγκεφάλου- και την ολοκλήρωση της νευρογένεσης στις περιοχές που δεν έχει μέχρι εκείνο το στάδιο ολοκληρωθεί (παρεγκεφαλίδα και οδοντωτή έλικα του ιππόκαμπου) [βλ. Εικόνες 2 & 5]. Η έκθεση στην αλκοόλη στο στάδιο αυτό οδηγεί σε σοβαρές απώλειες νευρώνων, προβλήματα στη μυελίνωση, καθολική γλοίωση, καθώς και καταστροφή του προμετωπιαίου φλοιού, του ιππόκαμπου και περιοχών της παρεγκεφαλίδας [Almeida L. και συν., 2020].

ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΟ ΑΛΚΟΟΛ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΣΤΟ ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

ι] Φυσιολογικές συνθήκες

Μέχρι και το πρόσφατο παρελθόν, ο εγκέφαλος θεωρούνταν ως το πλέον «προνομιούχο» όργανο, καθώς πιστευόταν πως ήταν ανεπηρέαστο από φλεγμονή ή ανοσολογική αντίδραση, αλλά και από πάσης φύσεως συστημική απόκριση που πυροδοτεί τη φλεγμονή και την αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος. Σήμερα η θεωρία αυτή έχει καταρριφθεί, πλην όμως δεν υπάρχει κανενός είδους αμφιβολία ότι ο εγκέφαλος είναι ένα όργανο, οι αποκρίσεις του οποίου σε κάθε είδους προσβολή διαφέρουν ουσιαστικά συγκριτικά με αυτές που επάγονται στα λοιπά όργανα [Lucas S.M. και συν., 2006].

Η φυσιολογική ανάπτυξη και λειτουργία του ΚΝΣ απαιτεί μία ιδιαιτέρως πολύπλοκη, ισορροπημένη και αμφίδρομη επικοινωνία μεταξύ των νευρώνων και των κυττάρων της γλοίας, κυρίως των μικρογλοιακών κυττάρων (*microglia*) και των αστροκυττάρων (*astrocytes*) [Vainchtein I. & Molofsky A., 2020].

Ένας μηχανισμός άμυνας που στοχεύει στη διατήρηση της ομοιόστασης του ΚΝΣ είναι και η φλεγμονώδης αντίδραση. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, η ανοσοαπόκριση του εγκεφάλου σηματοδοτείται από περιβαλλοντικά και φυσιολογικά ερεθίσματα τα οποία στοχεύουν στην προσαρμογή των μονοπατιών επικοινωνίας μεταξύ περιφερικού συστήματος και εγκεφάλου, καθώς και από σήματα που προάγουν τη νευρογλοιακή επικοινωνία και διαμεσολαβούνται από την έκκριση μειωμένων επιπέδων φλεγμονωδών κυττοκινών (*IL-1β*, *IL-6*, *TNF-α*). Οι εν λόγω κυττοκίνες με τη σειρά τους ρυθμίζουν την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών και ορμονών, ενώ προάγουν τη νευρογένεση και τη νευρωνική πλαστικότητα [Jorge Montesinos και συν., 2016]. Επιπλέον, στις ευεργετικές δράσεις της επαγόμενης ανοσοαπόκρισης συγκαταλέγεται η αποκατάσταση/επιδιόρθωση τυχόν βλαβών σε περιοχές του

εγκεφαλικού ιστού, καθώς και η απομάκρυνση κυτταρικών θραυσμάτων [Hyuk Sung Kwon & Seong-Ho Koh, 2020].

Παρατεταμένες φλεγμονώδεις αποκρίσεις, είτε λόγω ενδογενών παραγόντων (π.χ. γενετικές μεταλλάξεις, σχηματισμός πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων) είτε εξαιτίας περιβαλλοντικών αιτιών (π.χ. λοίμωξη, επιβλαβής δράση φαρμάκων), χαρακτηρίζονται ως επιβλαβείς και καθιστούν δυσχερή τη φυσιολογική λειτουργία του εγκεφάλου [Hyuk Sung Kwon & Seong-Ho Koh, 2020].

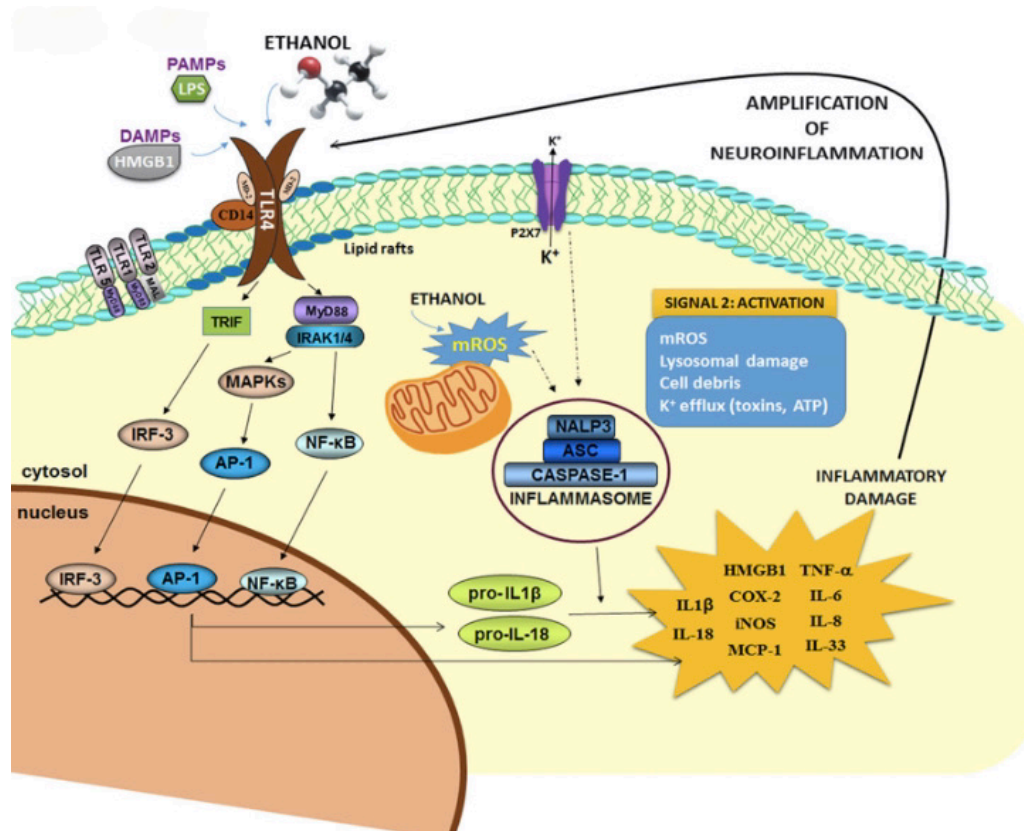
ii] Υποδοχέας TLR4 και σηματοδοτικά μονοπάτια ενεργοποίησης

Οι φλεγμονώδεις αποκρίσεις σε λοιμώδεις παράγοντες απαιτούν την παρουσία υποδοχέων αναγνώρισης μοτίβων PRRs (*Pattern Recognition Receptors - PRRs*) στα κύτταρα που συμμετέχουν στην έμφυτη ανοσολογική απάντηση³. Οι υποδοχείς αυτοί αναγνωρίζουν δύο τύπους μοριακών μοτίβων: [1] μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με τα παθογόνα (*Pathogen-Associated Molecular Patterns - PAMPs*)⁴, τα οποία ουσιαστικά αποτελούν τις μοριακές «υπογραφές» όλων των κλάσεων των μικροοργανισμών και [2] μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με βλάβη (*Damage (Damaged-Associated Molecular Patterns - DAMPs)*) δηλαδή με συστατικά των κυττάρων του ξενιστή που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της κυτταρικής βλάβης ή του κυτταρικού θανάτου [Montesinos J. και συν., 2016].

Οι πρώτοι υποδοχείς της κατηγορίας PRRs που αναγνωρίστηκαν ήταν οι TLRs (*Toll-Like Receptors*), μία οικογένεια υποδοχέων αποτελούμενη από δέκα μέλη στον άνθρωπο (*TLR1-10*), οι οποίοι αναγνωρίζουν μεταξύ άλλων την ενδοτοξίνη LPS (*lipopolysaccharide*) που αποτελεί μέρος της εξωτερικής μεμβράνης των gram-βακτηρίων, καθώς και την πρωτεΐνη της χρωματίνης HMGB1 (*High-Mobility Group Box 1- HMGB1*) η οποία έχει ενδογενή δράση κυττοκίνης, ενώ εκκρίνεται από ενεργοποιημένους νευρώνες ή από νεκρά κύτταρα και δρα ως ρυθμιστής του ανοσοποιητικού μέσω της επαγόμενης αύξησης της έκφρασης των κυττοκινών TNF-α και IL-1β και του υποδοχέα TLR4. Οι υποδοχείς TLR4 είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς, οι εξωκυττάρια επικράτειες των οποίων περιέχουν μεγάλο αριθμό επαναλήψεων λευκίνης, μοτίβα που επιτρέπουν τόσο την αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών, όσο και την αναγνώριση των προσδετών [Zou J. & Crews F., 2014 και Montesinos J. και συν., 2016].

³ Στα κύτταρα του συστήματος της έμφυτης ανοσίας συγκαταλέγονται κύτταρα όπως τα δενδριτικά, τα μακροφάγα, τα μονοκύτταρα, τα ουδετερόφιλα και τα επιθηλιακά.

⁴ Παραδείγματα PAMPs: Τύποι νουκλεϊκών οξέων που σχετίζονται με ιούς όπως δίκλωνο RNA (*dsRNA*), ή μη μεθυλωμένα CpG μοτίβα και βακτηριακοί παράγοντες όπως οι λιποπολυσακχαρίτες, η φλαγελίνη, το λιποτεϊχοϊκό οξύ και οι πεπτιδογλυκάνες.



Εικόνα 18: «Σχηματική απεικόνιση της ενεργοποίησης του υποδοχέα TLR4 και της επαγόμενης από το αλκοόλ φλεγμονώδους αντίδρασης του νευροανοσολογικού συστήματος» [Montesinos], και συν., 2016]

Στο ΚΝΣ, ο υποδοχέας TLR4 εκφράζεται αποκλειστικά στα μικρογλοιακά κύτταρα, στοιχείο που τον έχει καταστήσει τον πλέον μελετημένο PRR με ιδιαίτερη συμβολή στην επαγόμενη από το αλκοόλ ανοσοαπόκριση του εγκεφάλου. Η υπέρμετρη ενεργοποίησή του, μέσω της στρατολόγησής του σε λιπιδιακές σχεδίες των μικρογλοιακών κυττάρων, έχει σαν αποτέλεσμα την ενίσχυση του σήματος, δηλαδή της ανοσολογικής απόκρισης, γεγονός που δύναται να επιφέρει πληθώρα παθολογικών καταστάσεων συμπεριλαμβανομένου και του εκφυλισμού των νευρώνων [Jing-Yu Yang και συν., 2014 & Triantafyllou M. και συν., 2011].

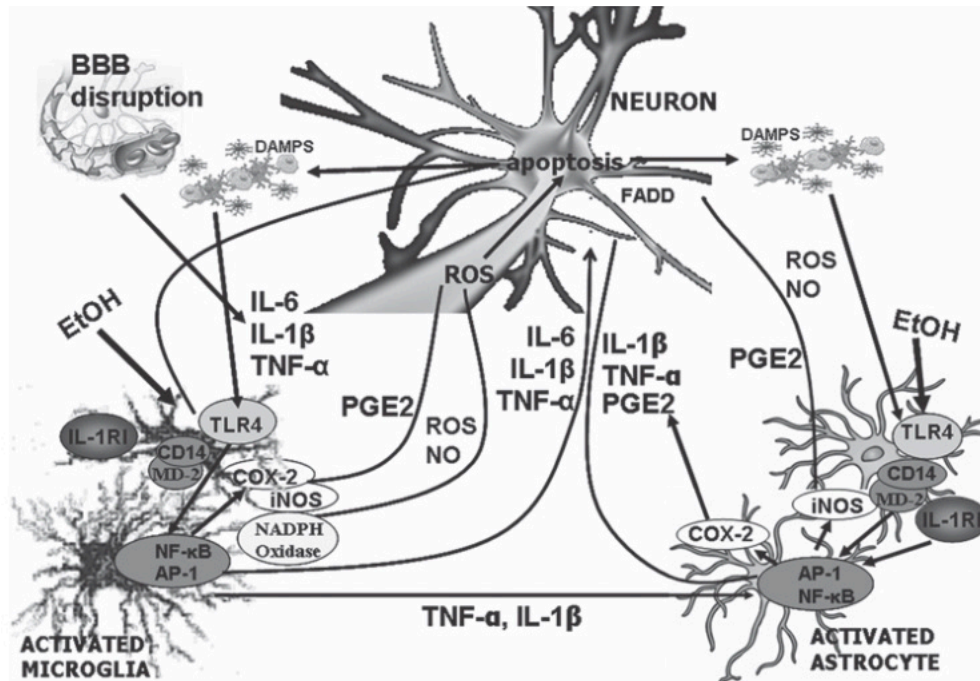
Η διέγερση των υποδοχέων TLR4 στα μικρογλοιακά κύτταρα προκαλεί την εκκίνηση σηματοδοτικών μονοπατιών που ενεργοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο NF-κΒ (*Nuclear Factor-κΒ*), η AP-1 (*Activator Protein-1*) και ο IRF3 (*Interferon Regulatory Factor 3*). Η ενεργοποίηση αυτών των παραγόντων οδηγεί στην παραγωγή κυττοκινών, χημειοκινών και δραστικών ριζών οξυγόνου που στοχεύουν στην καταστροφή των παθογόνων και την απόκριση του νευροανοσοποιητικού συστήματος μέσω της ενεργοποίησης των κυττάρων της γλοίας [Εικόνα 18]. Τονίζεται ότι ο υποδοχέας TLR4 εκφράζεται και στα ενδοθηλιακά κύτταρα που επενδύουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό με αποτέλεσμα η προαναφερόμενη έκκριση μορίων στον εγκέφαλο να λαμβάνει χώρα και ως απάντηση σε περιφερικά σήματα [Montesinos], και συν., 2016].

iii] Επαγόμενη από το αλκοόλ ενεργοποίηση των κυττάρων της γλοίας

Η λήψη αλκοόλ δύναται να ενεργοποιήσει στον εγκέφαλο σηματοδοτικά μονοπάτια που επιφέρουν εκτεταμένη παραγωγή προ-φλεγμονωδών μορίων και θάνατο νευρώνων. Πέρα από το γεγονός ότι η αιθανόλη δρα με τέτοιο τρόπο που να ενεργοποιεί υπέρμετρα μεταγραφικούς παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση προ-φλεγμονωδών γονιδίων στον εγκέφαλο, ουσιαστική είναι και η άμεση ενεργοποίηση που επιφέρει στους υποδοχείς TLR4. Συγκεκριμένα η αιθανόλη δρα ως προσδέτης του υποδοχέα TLR4, στοιχείο που προέκυψε μέσα από πειράματα σε πρωτογενείς καλλιέργειες αστροκυττάρων και μικρογλοιακών κυττάρων [Εικόνα 19]. Οι μελέτες αυτές απέδειξαν ότι η αιθανόλη, απουσία οποιασδήποτε άλλης τοξίνης, δύναται να στρατολογήσει TLR4 και IL-1R υποδοχείς στις λιπιδιακές σχεδίες των κυτταρικών μεμβρανών των κυττάρων αυτών, οδηγώντας στην ενεργοποίηση καθοδικών σηματοδοτικών μονοπατιών και τελικά στην απελευθέρωση κυττοκινών και φλεγμονωδών μεσολαβητών [Montesinos J. και συν., 2016].

Πειράματα σε άγριου ($TLR4^{+/+}$) και knockout ($TLR4^{-/-}$) τύπου ποντίκια ανέδειξαν τη σημασία του υποδοχέα TLR4 στην επαγόμενη από την κατανάλωση αλκοόλης ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων. Με δεδομένο ότι η ενεργοποίηση του υποδοχέα TLR4 έχει σαν αποτέλεσμα ένα χείμαρρο καθοδικών σηματοδοτικών μονοπατιών στα οποία λαμβάνουν χώρα συνεχείς φωσφορυλιώσεις μορίων (χαρακτηριστικές οι αυτοφωσφορυλιώσεις των κινασών *JNK*, *ERK* και *p38* που τις καθιστούν ενεργές), οι επιστήμονες χορήγησαν αιθανόλη σε πειραματόζωα και των δύο τύπων και διαπίστωσαν μία χρονο-εξαρτώμενη σταδιακή αύξηση των επίπεδων φωσφορυλίωσης των καθοδικά ενεργοποιούμενων σηματοδοτικών μορίων στα αγρίου τύπου ποντίκια, σε αντίθεση με τα knockout όπου το εν λόγω φαινόμενο ήταν εμφανώς εξασθενημένο [Jian Z. & Fulton C., 2014].

Επιπλέον *in vivo* πειράματα χρόνιας έκθεσης ποντικών σε αιθανόλη [Crews F. & Vetreno R., 2014, Qin L. και συν., 2008, Qin L. και συν., 2007, Fernandez-Lizarde S. και συν., 2013, Crews F. & Boettiger C.A., 2009] έδειξαν ότι η χρήση αιθανόλης προκαλεί γλοίωση (ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός αστροκυττάρων και μικρογλοιακών κυττάρων και μορφολογική παρατήρηση ενεργών μορφών), επάγει φλεγμονή (ποσοτικός προσδιορισμός φλεγμονωδών παραγόντων) του εγκεφάλου και ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ, προβλήματα στη διαδικασία μυελίνωσης (παρατηρούμενος εκφυλισμός νευρώνων), καθώς και απόπτωση στο φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων σε άγριου τύπου ζώα [Εικόνα 19]. Αντίθετα, $TLR4^{-/-}$ ποντίκια δεν εμφάνισαν αντίστοιχα φαινόμενα φλεγμονής και απόπτωσης.



Εικόνα 19: «Επαγόμενη από το αλκοόλ φλεγμονώδης αντίδραση του εγκεφάλου»
[Alfonso-Loeches S. & Guerri C., 2011]

Τέλος, αξιοσημείωτο αποτελεί το γεγονός ότι οι επιδράσεις του αλκοόλ στο νευροανοσοποιητικό σύστημα διατηρούνται για μεγάλα χρονικά διαστήματα, από επτά έως και δέκα μήνες μετά την έκθεση σε αυτό, στοιχείο που αναδεικνύει ότι η ενεργοποίηση της ανοσοαπόκρισης στον εγκέφαλο είναι περισσότερο ανθεκτική συγκριτικά με αυτή της περιφέρειας [Qin L. και συν., 2007].

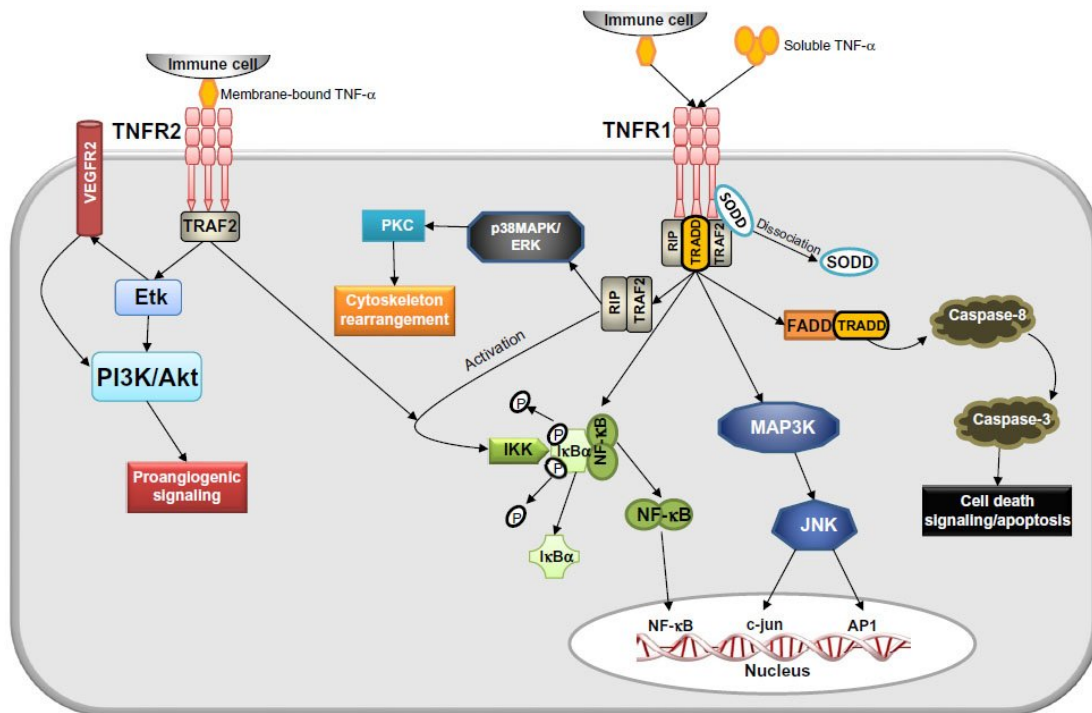
iv] Δείκτες φλεγμονής

TNF-α

Ο παράγοντας νέκρωσης *TNF-α* (*Tumor Necrosis Factor-α - TNF-α*) συγκαταλέγεται στην κατηγορία των χημειοκινών και αποτελεί απ' τα πρώτα μόρια της κατηγορίας αυτής που ανακαλύφθηκαν. Στον εγκέφαλο ο *TNF-α* παράγεται και εκκρίνεται κυρίως από τους νευρώνες και τα κύτταρα της γλοίας, με τα μικρογλοιακά κύτταρα και τα αστροκύτταρα να αποτελούν τους βασικούς τύπους των κυττάρων της γλοίας από τα οποία εκκρίνεται ο παράγοντας αυτός.

Ο *TNF-α* είναι μία κυτοκίνη τύπου I. Εντοπίζεται σε δύο μορφές: [1] ως μόριο 27kDa αποτελούμενο από 233 αμινοξέα προσδεμένο στη μεμβράνη των κυττάρων που το εκφράζουν (*membrane-bound form - mTNF-α*), που επέχει θέση υποδοχέα με δυνατότητα επεξεργασίας εξωκυτταρικών σημάτων και [2] ως διαλυτό μόριο (*soluble form - sTNF-α*) 17kDa αποτελούμενο από 157 αμινοξέα, το οποίο προκύπτει από την πρωτεολυτική δράση του ενζύμου *TACE* (*TNF alpha-converting enzyme - TACE*) στον *mTNF-α* και δύναται να δράσει σε περιοχές αρκετά μακριά από την περιοχή σύνθεσής του. Η μεμβρανική μορφή (*mTNF-α*) δύναται να αλληλεπιδράσει με δύο διακριτούς

μεμβρανικούς υποδοχείς, τους TNFR1 και TNFR2, ενώ η διαλυτή μορφή (*sTNF-α*) μόνο με τον πρώτο εξ αυτών. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από την εν λόγω αλληλεπίδραση είναι ποικίλα και σύνθετα [Εικόνα 20, Yang και συν., 2018 και Urschel K. & Cicha I., 2015].



Εικόνα 20: «Επαγόμενη από τον TNF-α ενεργοποίηση των υποδοχέων TNFR1 & TNFR2 και σηματοδοτικά μονοπάτια» [Urschel K. & Cicha I., 2015]

Στο ΚΝΣ ο TNF-α δρα ως μία προ-φλεγμονώδης χημειοκίνη που διαδραματίζει βασικό ρόλο τόσο στην ομοιόσταση, όσο στην παθοφυσιολογία του συστήματος. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ο TNF-α έχει ένα καθόλα ρυθμιστικό ρόλο σε φυσιολογικές διαδικασίες, όπως η συναπτική πλαστικότητα, η μάθηση και η μνήμη, ο ύπνος, η πρόσληψη νερού και τροφής. Αντίθετα, σε παθολογικές συνθήκες τα αστροκύτταρα, αλλά κυρίως τα μικρογλοιακά κύτταρα απελευθερώνουν εκσεσημασμένες ποσότητες TNF-α, με αποτέλεσμα να λαμβάνει χώρα μία εκτενής φλεγμονώδης απόκριση [Urschel K. & Cicha I., 2015].

Το κύριο σηματοδοτικό μονοπάτι που εκκινεί από τη δράση του TNF-α και επιφέρει την έκκριση προ-φλεγμονωδών μορίων, όπως η IL-1β και του ίδιου του TNF-α, είναι αυτό που οδηγεί και στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NFκB (*Nuclear Factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells - NFκB*) [Εικόνα 20]. Στην αδρανή του μορφή ο NFκB παραμένει στο κυτταρόπλασμα όπου βρίσκεται προσδεμένος με πρωτεΐνες που τον διατηρούν ανενεργό (*inhibitory proteins - IκB*) και δεν του επιτρέπουν να μεταναστεύσει στον πυρήνα. Τα φλεγμονώδη ερεθίσματα οδηγούν στην αποδόμηση των εν λόγω αναστολέων μέσω της φωσφορυλίωσής τους από την κινάση IκB (*IκB kinase - IKK*), γεγονός που επιτρέπει την είσοδο του μεταγραφικού παράγοντα στον πυρήνα, την πρόσδεσή του στο DNA και κατ' επέκταση την ενεργοποίηση της

έκφρασης προ-φλεγμονωδών γονιδίων [Urschel K. & Cicha I., 2015 και Muhammad M., 2019].

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ο TNF-α ενεργοποιεί αλλά και ενεργοποιείται από το μεταγραφικό παράγοντα NFκB, δημιουργώντας με αυτόν τον τρόπο ένα τύπο θετικού ρυθμιστικού βρόχου που ενισχύει και διαιωνίζει τις συνθήκες φλεγμονής [Muhammad M., 2019].

IL-1β

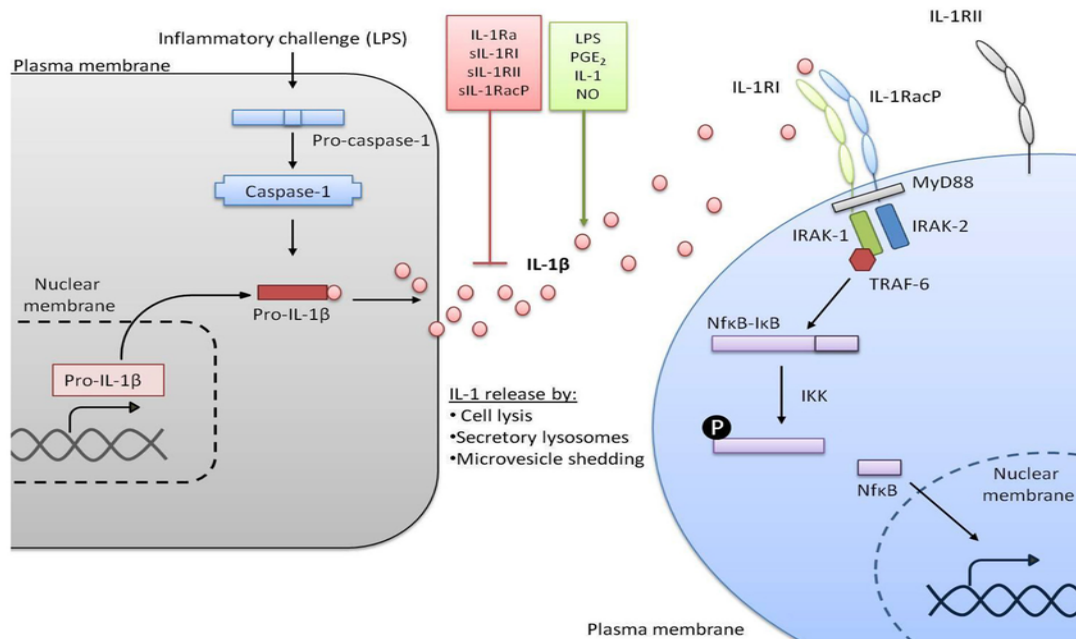
Η οικογένεια των ιντερευκινών 1 (***IL-1, Interleukin 1***) είναι μία ομάδα έντεκα κυτοκινών, κύριος ρόλος των οποίων αποτελεί η έναρξη και εν συνεχεία η ρύθμιση των φλεγμονωδών αποκρίσεων. Στην οικογένεια αυτών των κυτοκινών εξέχουσα θέση κατέχουν οι ιντερευκίνες 1α και 1β (*IL-1α & IL-1β, αντίστοιχα*), οι οποίες εκφράζονται σε όλες τις περιοχές του εγκεφάλου και παράγονται τόσο από νευρώνες, όσο και από κύτταρα της γλοίας (*μικρογλοιακά κύτταρα και αστροκύτταρα*). Οι IL-1α και IL-1β επιφέρουν τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις μέσω της πρόσδεσής τους στους υποδοχείς IL-1R1 τους οποίους ενεργοποιούν, μεγάλος αριθμός των οποίων εντοπίζεται στις φλοιώδεις περιοχές του εγκεφάλου [Murray K. και συν., 2015].

Δεδομένου ότι η IL-1β διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην επαγόμενη από την αιθανόλη ενεργοποίηση του νευροανοσολογικού συστήματος εστιάζουμε την προσοχή μας σε αυτή. Ενώ η παραγωγή της IL-1α είναι άμεση, η σύνθεση της IL-1β απαιτεί την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος (*inflammasome*)⁵. Η επαγόμενη γονιδιακή έκφραση απαιτεί ένα πρωταρχικό ερέθισμα που οδηγεί στη σύνθεση και απελευθέρωση μίας πρόδρομης μη δραστικής πρωτεΐνης, της proIL-1β. Η μετατροπή της σε δραστική μορφή απαιτεί ένα δεύτερο ερέθισμα ενεργοποίησης ικανό να ενεργοποιήσει το φλεγμονόσωμα, το οποίο με τη σειρά του, μέσω της δράσης της κασπάσης 1, θα μετατρέψει την proIL-1β στην ενεργή της μορφή [**Εικόνα 20**, Murray K. και συν., 2015].

Από τη στιγμή που η IL-1β λάβει τη δραστική της μορφή, προσδέεται στους υποδοχείς IL-1R1, παραπλεύρως των οποίων εντοπίζονται η πρωτεΐνη IL-1RacP (***Interleukin-1 Receptor accessory Protein - IL-1RacP***), με αποτέλεσμα να πυροδοτείται η μεταγωγή του σήματος. Η εν λόγω σηματοδότηση επιφέρει την πρόσδεση στην κυτταροπλασματική περιοχή του IL-1R1 υποδοχέα της πρωτεΐνης MyD88 (***Myeloid Differentiation primary response protein 88 - MyD88***) και των κινασών IRAK-1 και IRAK-2 (***IL-1 Receptor Associated Kinase - IRAK-1 & IL-2 Receptor Associated Kinase - IRAK-2, αντίστοιχα***). Το εν λόγω σύμπλεγμα στρατολογεί τον παράγοντα TRAF-6 (***TNF Receptor***

⁵ Το φλεγμονόσωμα είναι ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών που λειτουργεί κυρίως σαν πλατφόρμα για την ενεργοποίηση των φλεγμονωδών κασπασών για την παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών, όπως η IL-1β, αλλά και σαν ένασμα για την απελευθέρωση πρωτεϊνών που ενέχονται στο συντονισμό διεργασιών, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η επιδιόρθωση ιστών

Associated Factor 6 - TRAF-6) και επιφέρει την ενεργοποίηση του παράγοντα νέκρωσης NFκB [Εικόνα 21]. Η ενεργοποίηση του μεταγραφικού αυτού παράγοντα έχει τα ίδια ακριβώς αποτελέσματα με αυτά που περιγράφηκαν για τον TNF-α, δηλαδή την ενεργοποίηση της έκφρασης προ-φλεγμονωδών γονιδίων [Murray K. και συν., 2015].



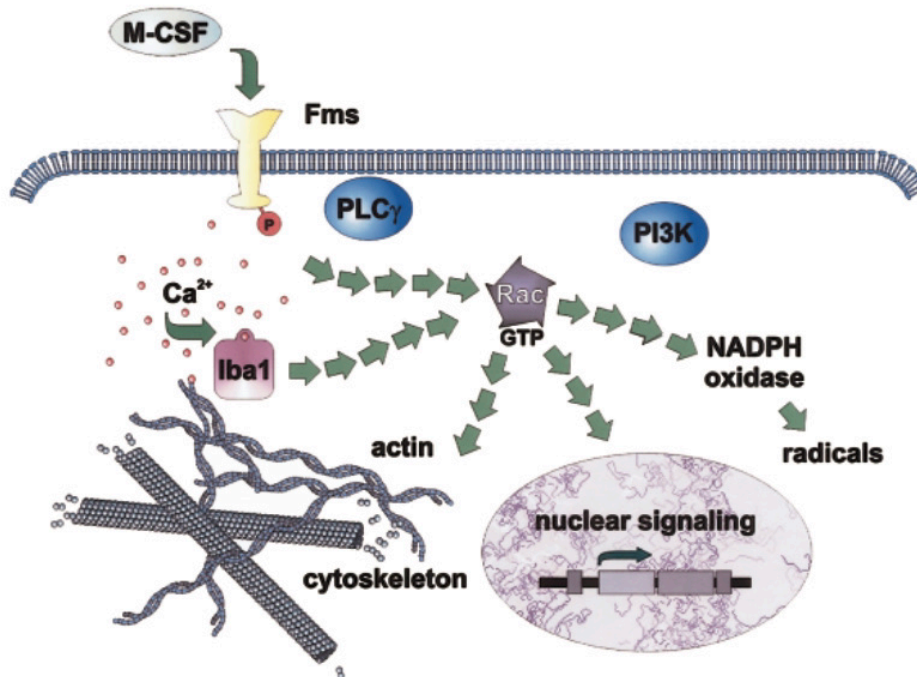
Εικόνα 21: «Διαδικασία ενεργοποίησης της δραστηκής μορφής της ιντερλευκίνης IL-1β και το σηματοδοτικό μονοπάτι που εκκινεί» [Murray K. και συν., 2015]

Iba1

Η πρωτεΐνη προσαρμογής 1 που δεσμεύει ελεύθερο Ca⁺⁺ (**Ionized calcium-binding adapter molecule 1 - Iba1**) γνωστή και ως παράγοντας φλεγμονής αλλομοσχεύματος 1 (**Allograft Inflammatory Factor 1 - AIF-1**) είναι μία πρωτεΐνη μεγέθους 17kDa που διαθέτει επικράτεια EF hand⁶. Η Iba1 εκφράζεται αποκλειστικά στα μακροφάγα, συμπεριλαμβανομένων και των μικρογλοιακών κυττάρων, ενώ η έκφρασή της αυξάνει κατά τη διάρκεια ενεργοποίησης των κυττάρων αυτών. Επιπλέον, ουσιαστικός είναι ο ρόλος της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στη διαμόρφωση της «αρχιτεκτονικής» των μορίων ακτίνης ενδοκυτταρικά δεδομένου ότι συγκαταλέγεται στην κατηγορία των πρωτεϊνών με ενεργότητα πρόσδεσης στην ακτίνη (**actin-binding proteins - ABPs**)⁷. Το ιδιαίτερο αυτό χαρακτηριστικό της διευκολύνει τόσο τη μετανάστευση, όσο και τη φαγοκυττάρωση των κυττάρων, δραστηριότητες που αποτελούν προαπαιτούμενα για τη φυσιολογική δράση των μικρογλοιακών κυττάρων [Ohsawa K. και συν., 2004].

⁶ Το μοτίβο EF-hand περιέχει δομή έλικας-βρόχου-έλικας, που μοιάζει σχηματικά με τον αντίχειρα και το δείκτη του ανοικτού ανθρώπινου χεριού. Στο βρόχο του μοτίβου δεσμεύονται με τη βοήθεια προσδετών ιόντα Ca⁺⁺.

⁷ **ABPs:** Οι πρωτεΐνες αυτές διαθέτουν μία επικράτεια πρόσδεσης στην ακτίνη (actin-binding domain), ενώ κατά κόρον προσδένονται στην ίδια περιοχή πάνω στο μόριο της ακτίνης. Στις δράσεις τους συγκαταλέγονται η δέσμευση των μονομερών ακτίνης προς σχηματισμό ινιδίων (monomer binding), η θραύση ινιδίων ακτίνης (severing), η σύνδεση πολυμερών ακτίνης προς σχηματισμό ινιδίων (annealing), η ενσωμάτωση μορίων ακτίνης σε ινίδια αυτής προς σχηματισμό διακλαδώσεων (branching) κ.α.



Εικόνα 22: «Διαδικασία ενεργοποίησης της πρωτεΐνης Iba1 και περαιτέρω δράση της»
[Imai Y. & Kohsaka S., 2002]

Η πρωτεΐνη Iba1 έχει συνεντοπιστεί με ινίδια ακτίνης (*F-actin*) σε μεμβρανικές πτυχώσεις (*membrane ruffling*)⁸ μικρογλοιακών κυττάρων, οι οποίες επάχθησαν από τον παράγοντα M-CSF (*Macrophage Colony-Stimulating Factor - M-CSF*), καθώς και σε φαγοκυτταρικές εγκοπώσεις που σχηματίστηκαν από έκθεση μικρογλοιακών κυττάρων σε ζυμοσάνη⁹. Επιπλέον, η Iba1 φαίνεται να συμμετέχει σε σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκονται το ασβέστιο και η πρωτεΐνη Rac (*μικρή GTPάση της οικογένειας της Rho*). Το ασβέστιο και η πρωτεΐνη Rac είναι σημαντικά για την οργάνωση της ακτίνης στις μεμβρανικές πτυχώσεις, μέσω των σηματοδοτικών μονοπατιών που εκκινούν από τη δράση της φωσφολιπάσης PLCγ (*Phospholipase C γ - PLCγ*) και της PI3K κινάσης (*Phosphatidylinositol 3-kinase-independent - PI3K*) [Εικόνα 22, Ohsawa K. και συν., 2004].

Σε ότι αφορά το εμβρυικό αλκοολικό σύνδρομο, ζωικά μοντέλα διαταραχών του φάσματος εμβρυϊκού αλκοολισμού που αντιστοιχούν σε έκθεση στο αλκοόλ κατά το τρίτο τρίμηνο της ανθρώπινης κύησης έδειξαν μεταξύ άλλων ότι, η χορήγηση αιθανόλης προκαλεί παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και αύξηση των μικρογλοιακών κυττάρων στον εγκέφαλο νεογνών αρουραίων και ποντικών [Tiwari V. και συν., 2011, Drew P.D., και συν., 2015, Torper LA., και συν 2015]. Συγκεκριμένα, χορήγηση υψηλών δόσεων αιθανόλης (*4g/kg βάρους/ημέρα*) κατά τη διάρκεια των μεταγεννητικών ημερών 4–9 αυξάνει τον αριθμό των μικρογλοιακών κυττάρων και την παραγωγή κυτοκινών/χημειοκινών στον ιππόκαμπο, την παρεγκεφαλίδα και τον εγκεφαλικό

⁸ Η μεμβρανική πτύχωση είναι ο σχηματισμός κινούμενων προεξοχών της κυτταρικής επιφάνειας που περιέχουν πλέγμα πρόσφατα πολυμερισμένων νημάτων ακτίνης.

⁹ Ζυμοσάνη: γλυκάνη που εντοπίζεται στην επιφάνεια μυκήτων όπως η μαγιά

φλοιό ποντικών ενώ παράλληλα προκαλεί νευρωνική βλάβη [Drew P.D., και συν., 2015]. Ομοίως, νεογνά αρουραίων στα οποία χορήγηθηκε αιθανόλη ενδογαστρικά (5g/kg βάρους) τις μεταγεννητικές ημέρες 7-9, παρουσίασαν αυξημένη παραγωγή κυτοκινών (TNF- α , IL-1 β και TGF- β), και κασπάσης-3 τόσο στον εγκεφαλικό φλοιό, όσο και στον ιππόκαμπο, ενώ παράλληλα εμφάνισαν μειωμένη απόδοση σε τεστ μνήμης [Tiwari V. και συν., 2011]. Τέλος, χορήγηση αιθανόλης κατά τη διάρκεια των μεταγεννητικών ημερών 3-5 προκάλεσε την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών τόσο στον ιππόκαμπο, όσο και στον σκώλικα της παρεγκεφαλίδας αρουραίων, με ταυτόχρονη νευρωνική απώλεια μόνο στον ιππόκαμπο [Topper LA., και συν 2015].

ΕΣΩ ΠΡΟΜΕΤΩΠΙΑΙΟΣ ΦΛΟΙΟΣ (*medial Prefrontal Cortex - mPFC*)

i] Λειτουργίες

Η επιτυχής επιβίωσή μας σε ένα μονίμως μεταβαλλόμενο περιβάλλον δε θα ήταν δυνατή χωρίς την ικανότητά μας να αποθηκεύουμε και να ανανεώνουμε καινούρια στοιχεία, να επανεκτιμούμε τις υπάρχουσες επιλογές και να προβαίνουμε στη λήψη αποφάσεων. Αυτή η ιδιαίτερη ικανότητα προσαρμογής σύμφωνα με τις εκάστοτε συνθήκες είναι προϊόν της διανοητικής ευελιξίας του νου και εξαρτάται από βασικού επιπέδου εσωτερικές αισθητηριακές και κινητικές διαδικασίες που είναι υπεύθυνες για το συντονισμό και εμπλουτισμό του εγκεφάλου με την ικανότητα προσαρμογής και ανάλογης δράσης.

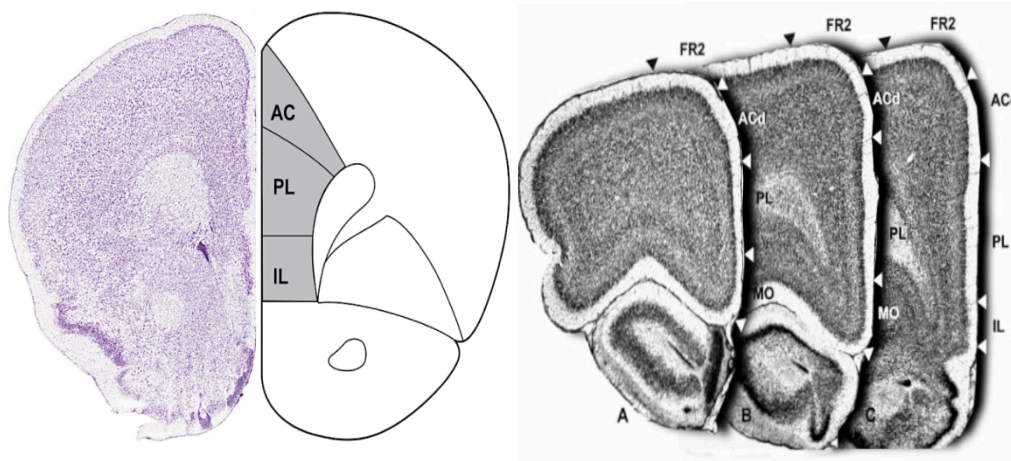
Είναι ευρέως αποδεκτό ότι τέτοιες διαδικασίες εμπεριέχουν ένα νευρωνικό δίκτυο που επεκτείνεται ευρέως στον εγκέφαλο, ωστόσο αποτελεί κοινώς αποδεκτή παραδοχή ότι ο έσω προμετωπιαίος φλοιός, η φλοιώδης περιοχή του πρόσθιου πόλου του εγκεφάλου των θηλαστικών, αποτελεί το κρίσιμο κέντρο ελέγχου των εν λόγω διεργασιών. Ο έσω προμετωπιαίος φλοιός δε σχετίζεται μόνο με συναισθηματικές και κοινωνικές συμπεριφορές, αλλά διαδραματίζει εξέχοντα ρόλο στην εναλλαγή της συμπεριφοράς όταν αυτή κατευθύνεται από εσωτερικές καταστάσεις και στόχους. Συνεπώς, αποτελεί μία εγκεφαλική περιοχή που εμπλέκεται σε μία σειρά γνωστικών και νοητικών διαδικασιών όπως η προσοχή, η συγκέντρωση, η μνήμη εργασίας (*working memory*), καθώς και ο ανασταλτικός έλεγχος που αποτελούν ένα συνονθύλευμα μηχανισμών με τελικό στόχο την ικανότητα προσαρμογής σε ποικίλες συνθήκες και μεταβολής μεταξύ διαφορετικών διεργασιών [Chini Mattia & Hanganu-Opatz Ileana, 2020].

ii] Ανατομία

Στον άνθρωπο ο έσω προμετωπιαίος φλοιός αντιπροσωπεύεται από το ραχαιοπλάγιο προμετωπιαίο φλοιό ο οποίος αποτελείται από τρεις διακριτές δομές: [1] τον πρόσθιο ραχιαίο προσαγωγίο φλοιό (*dorsal anterior cingulate cortex - dACC*),

που ενέχεται στην ανίχνευση και το φιλτράρισμα εμφανών ερεθισμάτων, [2] τον προγονατώδη πρόσθιο προσαγωγίο φλοιό (*pregenual anterior cingulate cortex - pACC*) και [3] τον υπογονατώδη προσαγωγίο φλοιό (*subgenual anterior cingulate cortex - sACC*), υποπεριοχές που σχετίζονται με την επεξεργασία συναισθημάτων και τη ρύθμιση της προσοχής [Thibault P. Bittar & Benoit Labonté, 2021].

Στον αρουραίο ο έσω προμετωπιαίος φλοιός (*mPFCx*) αποτελεί μία από τις τρεις τοπολογικά διακριτές εγκεφαλικές περιοχές που στο σύνολό τους απαρτίζουν τον προμετωπιαίο φλοιό, ενώ υποδιαιρείται σε τέσσερις επιμέρους διακριτές περιοχές βάσει ανατομικών και λειτουργικών χαρακτηριστικών. Συγκεκριμένα, το ραχιαίο τμήμα αυτού (*dorsal mPFCx*) περιλαμβάνει τη μέση προκεντρική περιοχή (*medial Precentral Area - PrCm*) ή περιοχή 2 του πρόσθιου φλοιού (*Frontal Cortex Area 2 - FR2*) και τον πρόσθιο προσαγωγίο φλοιό (*anterior cingulate cortex - ACC*), ενώ το κοιλιακό τμήμα (*ventral mPFCx*) περιλαμβάνει το μεταιχμιακό φλοιό (*prelimbic cortex ή PLC*) και τον κατώτερο μεταιχμιακό φλοιό (*infralimbic cortex - ILC*) [Εικόνα 23, Heidbreder, C. & Groenewegen, H., 2003].



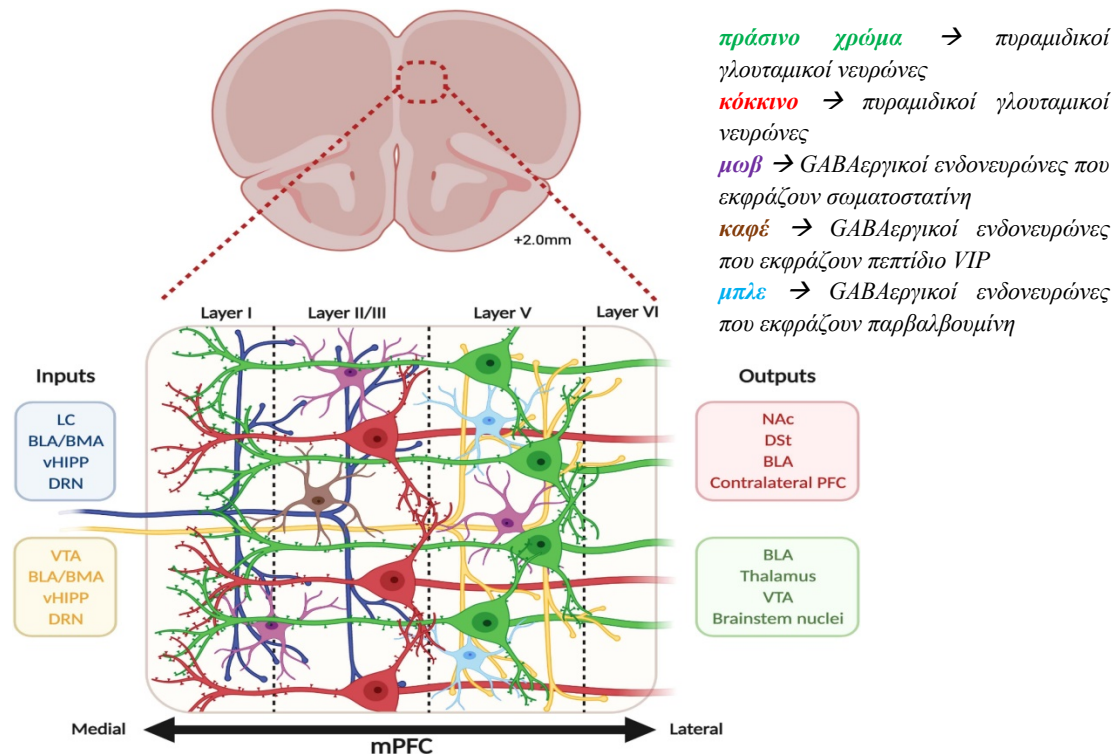
Εικόνα 23: «Έσω προμετωπιαίος φλοιός αρουραίου»
[Heidbreder, C. & Groenewegen, H., 2003 και Thomas Grüter και συν., 2015]

Παρόλο που η εξελικτική πολυπλοκότητα και μορφολογία μεταξύ των ειδών μπορεί να επισημαίνει τη διάκριση μεταξύ ανθρώπου και αρουραίου, καθίσταται εφικτή μία ισοδύναμη αντιστοίχιση τόσο σε λειτουργικό, όσο και σε ανατομικό επίπεδο. Έτσι, η περιοχή PLC αντιστοιχεί στην pACC περιοχή του ανθρώπινου εγκεφάλου και η ILC περιοχή στην sACC και κατ' επέκταση οι περιοχές αυτές εκτελούν τις ίδιες λειτουργίες σε άνθρωπο και αρουραίο, όπως ενδεικτικά αναφέρεται η μακροπρόθεσμη μνήμη, ο συναισθηματικός έλεγχος, ο ανασταλτικός έλεγχος, η προσοχή και η λήψη αποφάσεων [Thibault P. Bittar & Benoit Labonté, 2021].

iii] Κυτταρικοί τύποι

Ο έσω προμετωπιαίος φλοιός διαχωρίζεται σε πέντε στιβάδες I, II, III, V και VI (εν αντιθέσει με τον ανθρώπινο στον οποίο εντοπίζεται επιπλέον η στιβάδα IV) και συνίσταται από δύο διακριτούς νευρωνικούς πληθυσμούς.

Την πρώτη νευρωνική ομάδα απαρτίζουν οι διεγερτικοί πυραμιδικοί νευρώνες, που προέρχονται από τα κύτταρα της ακτινωτής γλοίας (*radial glial cells - RGCs*), συνιστούν το 80-90% του συνόλου των νευρώνων και εδράζονται στις στιβάδες II/III, V και VI. Κύριος νευροδιαβιβαστής τους αποτελεί το γλουταμικό (*glutamate*), ενώ χαρακτηριστικό τους αποτελεί η έκφραση της κινάσης CaMKII (*Ca²⁺/calmodulin kinase II - CaMKII*).



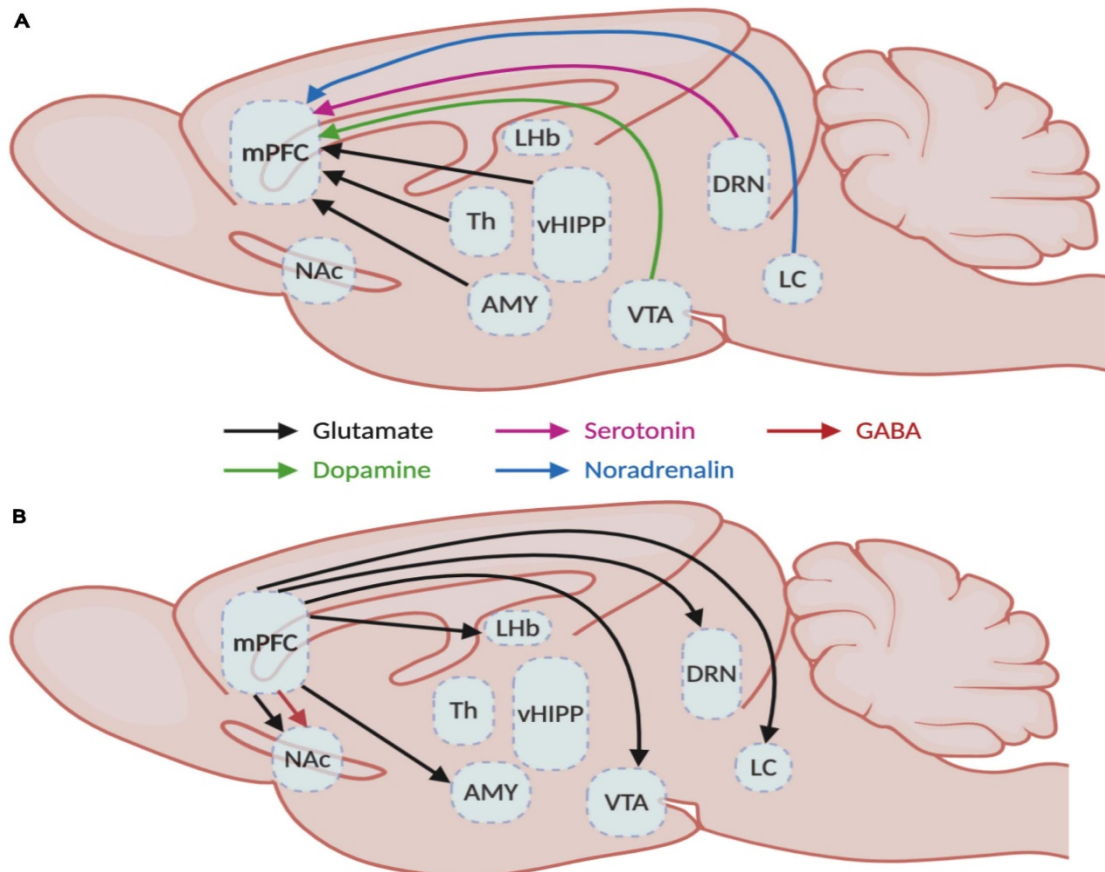
Εικόνα 24: «Κυτταρική οργάνωση του έσω προμετωπιαίου φλοιού στον αρουραίο» [Thibault P. Bittar & Benoit Labonté, 2021]

Από την άλλη πλευρά, τη δεύτερη νευρωνική ομάδα συγκαταλέγουν GABAεργικοί ανασταλτικοί ενδονευρώνες οι οποίοι εντοπίζονται σε ποσοστό 10-20% και εδράζονται στις στιβάδες I, II/III και V. Αυτοί οι ενδονευρώνες μπορούν να διακριθούν σε τρεις μη επικαλυπτόμενες κλάσεις βάσει των μορίων που εκφράζουν: i] έκφραση παραλβουμίνης (*parvalbumin - PV*), ii] έκφραση σωματοστατίνης (*somatostatin - SST*) και iii] έκφραση πεπτιδίου VIP (*vasoactive intestinal peptide - VIP*) [Εικόνα 24, Thibault P. Bittar & Benoit Labonté, 2021].

iv] Διασυνδέσεις

Η κυτταρική ποικιλομορφία που παρατηρείται στον έσω προμετωπιαίο φλοιό, η οποία συνίσταται τόσο σε επίπεδο στιβάδων, όσο και σε ανατομία, εγκαθιδρύει τις

βάσεις για τη δυνατότητα λήψης πληθώρας μηνυμάτων από έτερες εγκεφαλικές περιοχές, τα οποία στη συνέχεια ανακατευθύνει σε άλλες δομές με στόχο τη δέουσα απόκριση σε κάθε περιβαλλοντική πρόκληση. Έτσι, ο έσω προμετωπιαίος φλοιός δέχεται μηνύματα από τον υπομέλα τόπο (*Iocus coeruleus - LC*), την αμυγδαλή, την κοιλιακή περιοχή του ιπποκάμπου (*ventral hippocampus - vHIPP*), τη ραχιαία περιοχή της ραφής (*dorsal raphe - DRN*), το θάλαμο (*thalamus*) και την κοιλιακή καλυπτρική περιοχή (*ventral tegmental area - VTA*), ενώ οι πυραμιδικοί νευρώνες του προβάλλουν στον επικληνή πυρήνα του διαφράγματος (*nucleus accumbens - NAc*), στο ραχιαίο ραβδωτό (*dorsal striatum - DSt*), την αμυγδαλή, την κοιλιακή καλυπτρική περιοχή και τους πυρήνες του εγκεφαλικού στελέχους (*brainstem nuclei*) [Εικόνα 25].



Εικόνα 25: «Προβολές και εκβολές έσω προμετωπιαίου φλοιού» [Thibault P. Bittar & Benoit Labonté, 2021]

ΑΠΙΟΕΙΔΗΣ ΦΛΟΙΟΣ (*Piriform ή Pyriform Cortex*)

ι] Λειτουργίες

Οι βασικές αισθήσεις του ανθρώπου έχουν αποτελέσει τις βασικές πύλες εισόδου για πλήθος εγκεφαλικών διεργασιών, μία στρατηγική που διευκόλυνε στο μέγιστο την κατανόηση του πώς οι πληροφορίες επεξεργάζονται από τα πολλά νευρωνικά δίκτυα με τελικό στόχο τη διαμόρφωση μίας συνεκτικής απεικόνισης του εξωτερικού περιβάλλοντος. Σε όλη αυτή την προσπάθεια ερμηνείας των ερεθισμάτων, το οσφρητικό σύστημα διαδραμάτισε τη λιγότερο εξέχουσα θέση συγκριτικά με τα λοιπά αισθητηριακά συστήματα, ίσως γιατί στον άνθρωπο η αίσθηση της όσφρησης είναι

λιγότερο σημαντική [Bekkers M. John & Suzuki Norimitsu, 2013 και Al Koborssy Dolly και συν., 2018].

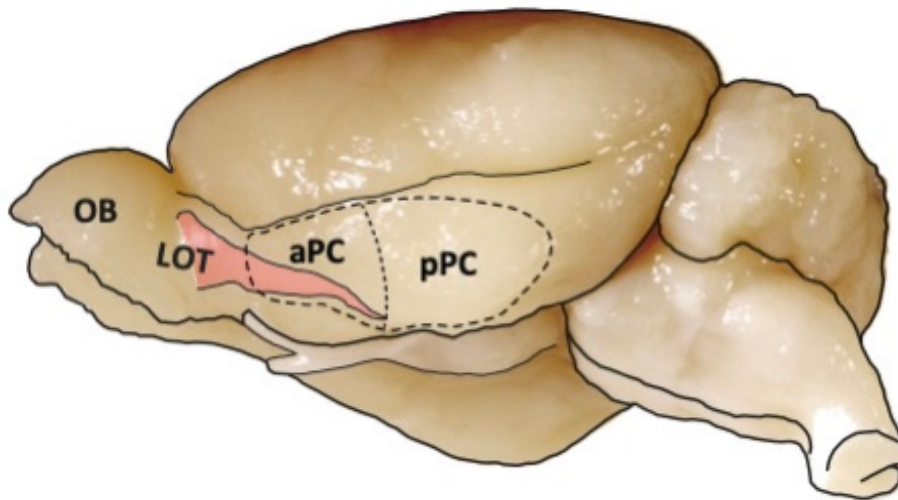
Ο απιοειδής φλοιός αποτελεί έναν από τους πρώτους φλοιώδεις προορισμούς στα θηλαστικά και διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη συνθετική αντίληψη των οσμών. Χαρακτηρίζεται από την ικανότητά του να διακρίνει ένα μίγμα οσμών συμβάλλοντας έτσι στην αναγκαία διάκριση και διαχωρισμό που απαιτεί η σωστή λειτουργία του οσφρητικού συστήματος. Δέχεται απ' ευθείας συναπτικές προβολές από τον οσφρητικό λοβό (*olfactory bulb - OB*), ο οποίος με τη σειρά του δέχεται απ' ευθείας προβολές από το οσφρητικό επιθήλιο (*olfactory epithelium*) που εντοπίζεται στο πίσω μέρος της μύτης. Συνεπώς, ο απιοειδής φλοιός απέχει μόλις δύο συνάψεις από το εξωτερικό περιβάλλον και μοναδικό του χαρακτηριστικό που τον ξεχωρίζει από τις λοιπές αισθητηριακές φλοιώδεις περιοχές είναι ότι δε συμμετέχει στη λήψη των αισθητηριακών μηνυμάτων ο θάλαμος [Bekkers M. John & Suzuki Norimitsu, 2013 και Al Koborssy Dolly και συν., 2018].

ii] Ανατομία

Ο απιοειδής φλοιός αποτελεί μέρος του οσφρητικού παλαιοφλοιού και εντοπίζεται στην πλαγιοκοιλιακή εγκεφαλική επιφάνεια πλησίον της πλάγιας οσφρητικής ζώνης (*Lateral Olfactory Tract - LOT*), μία ινώδης μυελινωμένη περιοχή που μεταφέρει προβολές από τον οσφρητικό λοβό. Ένας αδρής διαχωρισμός της εν λόγω φλοιώδους περιοχής αποτελεί η διάκριση μεταξύ πρόσθιου και οπίσθιου τμήματος. Το πρόσθιο τμήμα δέχεται περισσότερες προβολές από τον οσφρητικό λοβό και λιγότερες συνειρμικές προβολές, ενώ το αντίθετο συμβαίνει με το οπίσθιο τμήμα. Το οπίσθιο τμήμα αυτού ενεργοποιείται κατά ζώνες λόγω της αναγκαιότητας κατηγοριοποίησης του μεγάλου αριθμού οσμών. Αποτελεί μία μεγάλη, κυτταρχιτεκτονικά ομογενή εγκεφαλική περιοχή που εκτείνεται πάνω από την πλαγιοκοιλιακή επιφάνεια του πρόσθιου εγκέφαλου [Εικόνα 26]. Επίσης, το πρόσθιο τμήμα με τις πιο ισχυρές συνδέσεις με το εξωτερικό περιβάλλον κωδικοποιεί την «ταυτότητα» των οσμών, ενώ το οπίσθιο τμήμα κωδικοποιεί την «ποιότητα» αυτών.

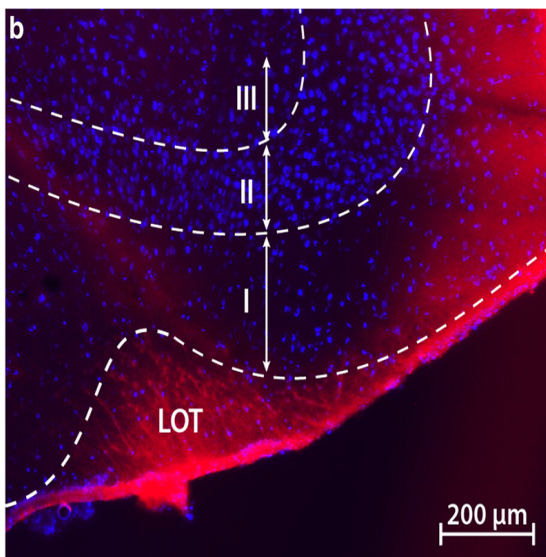
Ο απιοειδής φλοιός απαρτίζεται από τρία διακριτά επίπεδα: [1] την επιφανειακή μοριώδη στιβάδα (*plexiform layer - layer I*), η οποία χαρακτηρίζεται από διάσπαρτη – σποραδική κατανομή των νευρωνικών κυττάρων, [2] τη στιβάδα των κυτταρικών σωμάτων (*layer II*), χαρακτηριστικό της οποίας αποτελεί η έντονη πυκνότητα των κυτταρικών σωμάτων των νευρώνων και [3] τη στιβάδα III (*layer III*) που απαρτίζεται από ίνες και σώματα σε χαμηλή πυκνότητα [Εικόνες 27 & 28]. Οι ινώδεις προβολές της πλάγιας οσφρητικής ζώνης (*LOT*) περιορίζονται στο ανώτερο τμήμα της μοριώδους στιβάδας, ενώ οι πυκνώδεις ίνες των νευρώνων του απιοειδούς φλοιού καταλαμβάνουν

και τις τρεις αναφερόμενες στιβάδες [Εικόνες 27 & 28, Bekkers M. John & Suzuki Norimitsu, 2013].

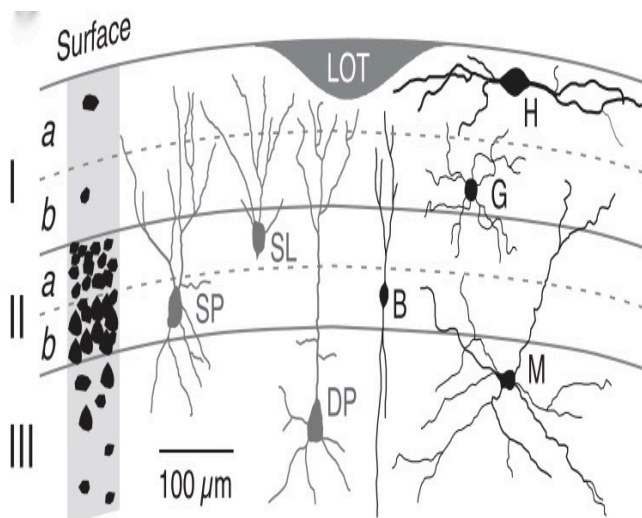


Εικόνα 26: «Απιοειδής φλοιός αρουραίου» [John M. Bekkers and Norimitsu Suzuki, 2013]

Συντιμήσεις: **OB:** Olfactory Bulb – οσφρητικός λοβός, **LOT:** Lateral Olfactory Tract - πλάγια οσφρητική ζώνη, **aPC:** anterior Piriform Cortex – πρόσθιος απιοειδής φλοιός, **pPC:** posterior Piriform Cortex – οπίσθιος απιοειδής φλοιός.



Εικόνα 27: «Οι τρεις διακριτές στιβάδες του οπίσθιου απιοειδή φλοιού» [Al Koborssy Dolly και συν., 2018]



Εικόνα 28: «Σχηματική απεικόνιση της συνοχής των νευρώνων εντός του οπίσθιου απιοειδούς φλοιού» [Bekkers M. John & Suzuki Norimitsu, 2013]

Συντιμήσεις: **LOT:** Lateral Olfactory Tract - πλάγια οσφρητική ζώνη, **HZ:** horizontal cells - οριζόντια κύτταρα, **NG:** neurogliaform cells - νευρογλοιακά σχηματιζόμενα κύτταρα, **SL:** semilunar pyramidal cells - μηνοειδείς πυραμιδικοί νευρώνες, **SP:** superficial pyramidal cells - επιφανειακοί πυραμιδικοί νευρώνες, **DP:** deep pyramidal cells - πυραμιδικοί νευρώνες σε βάθος, **MP:** multipolar spiny cells - πολλαπλής πολικότητας ακανθώδεις νευρώνες

iii] Κυτταρικοί τύποι

Διαφορετικοί τύποι νευρώνων εντοπίζονται διασκορπισμένοι, αλλά ακολουθώντας μία σχετικά ομοιόμορφη κατανομή, και στις τρεις διακριτές στιβάδες του απιοειδούς φλοιού. Στην επιφανειακή μοριώδη στιβάδα εμφανίζονται κατά κόρον GABAεργικοί

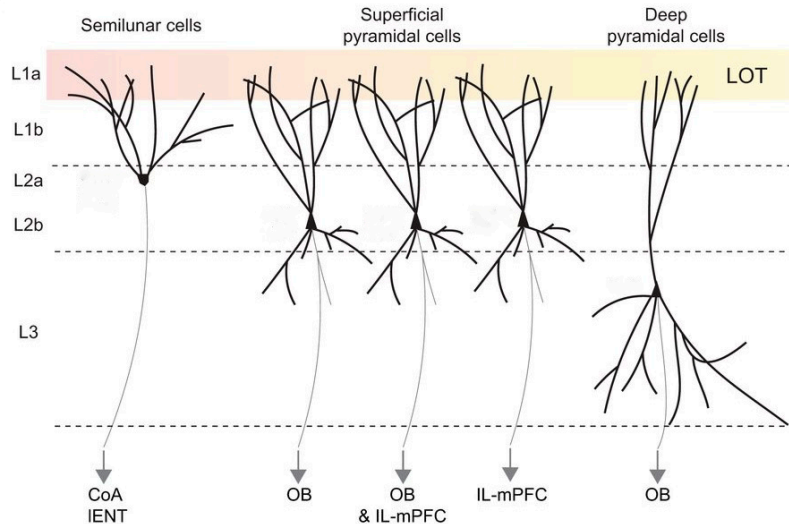
ενδονευρώνες, γνωστοί ως οριζόντια κύτταρα (*horizontal cells - HZ*), οι οποίοι δέχονται διεγερτικές συνάψεις από την πλάγια οσφρητική ζώνη (*LOT*), ενώ παρέχουν ανασταλτική τροφοδότηση σε κύριους δενδρίτες (*principal cell dendrites*). Επιπλέον, στην ίδια στιβάδα έχουν εντοπιστεί και νευρογλοιακά σχηματιζόμενοι (*neurogliaform - NG*) GABAεργικοί ενδονευρώνες με λεπτούς δενδρίτες που εμφανίζουν καθόλα τοπική διακλάδωση.

Στη στιβάδα των κυτταρικών σωμάτων (*layer II*) εντοπίζονται αρκετά μεγάλοι γλουταμινεργικοί πυραμιδικοί νευρώνες, οι οποίοι διακρίνονται σε μηνοειδείς (*semilunar - SL*) και επιφανειακούς (*superficial - SP*) κατ' αντιστοιχία με τον πιο λεπτομερή καταμερισμό της εν λόγω στιβάδας σε υποεπίπεδα a και b, αντίστοιχα. Όσον αφορά τη στιβάδα III (*layer III*) εδώ εντοπίζονται χαμηλότερης πυκνότητας πυραμιδικοί νευρώνες σε βάθος (*deep pyramidal - DP*), καθώς και πολλαπλής πολικότητας ακανθώδεις νευρώνες (*multipolar spiny - MS*). Σημειώνεται ότι ανασταλτική τροφοδότηση παρέχεται και από μία ακόμα ποικιλία ενδονευρώνων που εντοπίζονται σε βαθύτερα στρώματα τελικός στόχος των οποίων αποτελούν είτε κυτταρικά σώματα, είτε δενδρίτες [Bekkers M. John & Suzuki Norimitsu, 2013].

iv] Διασυνδέσεις

Ο απιοειδής φλοιός συνδέεται μέσω συνάψεων με άλλες γειτονικές εγκεφαλικές περιοχές, συμπεριλαμβανομένου του πλάγιου ενδορινικού φλοιού (*lateral entorhinal cortex - IENT*), της φλοιώδους αμυγδαλής (*cortical amygdala - CoA*), του οσφρητικού λοβού (*olfactory bulb - OB*) και του μεταχιακού μέσω προμετωπιαίου φλοιού (*infralimbic medial prefrontal cortex - IL-mPFCx*).

Συγκεκριμένα, οι μηνοειδείς πυραμιδικοί νευρώνες (*SL*) λαμβάνουν κυρίως διέγερση από τους νευράξονες της πλάγιας οσφρητικής ζώνης (*LOT*), ενώ η δραστηριότητά τους σχετίζεται κυρίως και με τη διέγερση του οσφρητικού λοβού (*OB*). Από την άλλη πλευρά οι απολήξεις τους προβάλλουν στη φλοιώδη αμυγδαλή (*CoA*) και στον πλάγιο ενδορινικό φλοιό (*IENT*). Αναφορικά με τους επιφανειακούς πυραμιδικούς νευρώνες (*SP*), αυτοί λαμβάνουν ασθενείς προσαγωγές προβολές από τον οσφρητικό λοβό (*OB*) και ισχυρότερη διέγερση από ενδοφλοιικές ίνες. Ωστόσο, η κύρια δραστηριότητά τους εξαρτάται από τοπικές λούπες επανατροφοδότησης. Όσον αφορά τις απολήξεις τους, αυτές καταλήγουν στον οσφρητικό λοβό (*OB*) και στον πλάγιο ενδορινικό φλοιό (*IENT*). Οι πυραμιδικοί νευρώνες που εντοπίζονται σε βάθος (*DP*) λαμβάνουν ελάχιστες προσαγωγές προβολές από τους νευράξονες της πλάγιας οσφρητικής ζώνης (*LOT*), αλλά ουσιαστική χαρακτηρίζεται γι' αυτούς η ενδοφλοιική διέγερση. Και οι νευρικές απολήξεις αυτού του τύπου νευρώνων προβάλλουν με τη σειρά τους στον οσφρητικό λοβό (*OB*) [Εικόνα 29, Esther Klingler, 2017].



Εικόνα 29: «Εκβολές απιοειδούς φλοιού» [Esther Klingler, 2017]

ΕΝΔΟΡΙΝΙΚΟΣ ΦΛΟΙΟΣ (*Entorhinal Cortex*)

i] Λειτουργίες

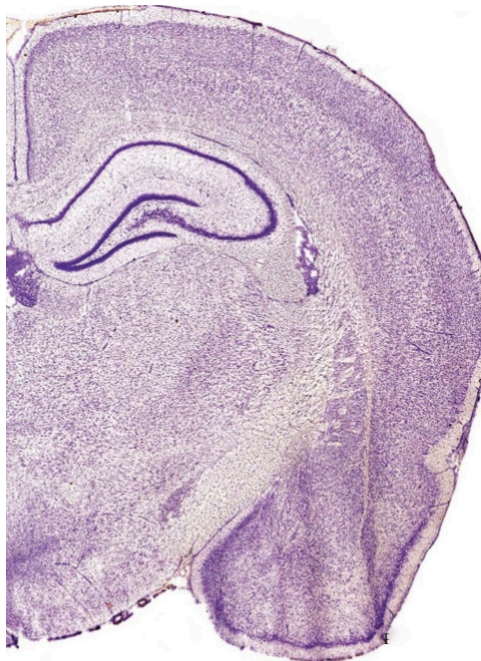
Οι λειτουργίες του ενδορινικού φλοιού σχετίζονται άρρηκτα με την τοποθέτησή του στον εγκέφαλο, θέση που τα τελευταία χρόνια έχει χαρακτηριστεί ως ιδιαίτερα κομβικής σημασίας. Συγκεκριμένα, εντοπίζεται εμπροσθεν της παραϊποκάμπιας έλικας (*parahippocampal gyrus*), θέση η οποία εξυπηρετεί τη σύνδεση – επικοινωνία μεταξύ του ιππόκαμπου και των αισθητηριακών φλοιωδών περιοχών. Η στενή του σύνδεση με φλοιώδεις περιοχές του εγκεφάλου που ενέχονται σε διαδικασίες σχετιζόμενες με την απεικόνιση και τη χωροταξική διάταξη των πραγμάτων, συγκαταλέγει την εν λόγω εγκεφαλική περιοχή ως ένα βασικό υπόστρωμα των οπτικο – χωρικών (*visuo-spatial*) λειτουργιών [Witter P. Menno και συν 2017].

Επιπρόσθετα, η μνήμη που σχετίζεται με τη λειτουργία του ιππόκαμπου εξαρτάται από την ύπαρξη ενός ακέραιου – άθικτου ενδορινικού φλοιού. Το στοιχείο αυτό ενισχύθηκε από πειραματικές μελέτες σε μαϊμούδες, τα αποτελέσματα των οποίων έδειξαν ότι μεμονωμένοι νευρώνες του ενδορινικού φλοιού πυροδοτούνται ως απόκριση σε οπτικά ερεθίσματα προερχόμενα από συγκεκριμένες τοποθεσίες του περιβάλλοντος, συμβάλλοντας έτσι στη χωρική μνήμη [Witter P. Menno και συν 2017].

ii] Ανατομία

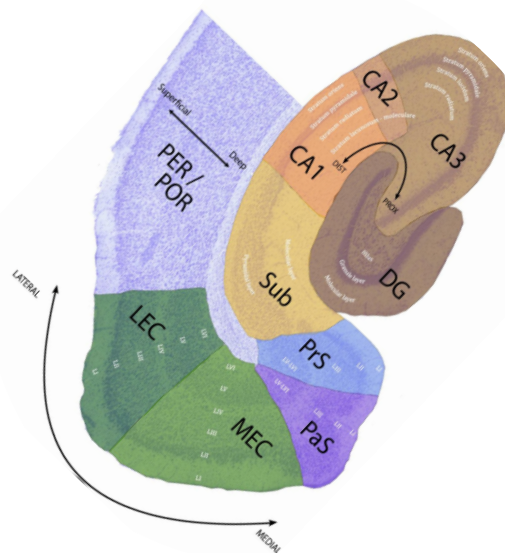
Ο ενδορινικός φλοιός, όπως υποδηλώνει και το όνομά του, περικλείεται από την οσφρητική αύλακα (*rhinal sulcus*). Συνιστά μία ετερότυπη φλοιώδη δομή η οποία δύναται να διαχωριστεί σε δύο επιμέρους περιοχές, τον πλάγιο και έσω ενδορινικό φλοιό (**Lateral Entorhinal Cortex – LEC & Medial Entorhinal Cortex – MEC**, αντίστοιχα), υποπεριοχές οι οποίες διαφέρουν τόσο στη μορφολογία, όσο και στη φυσιολογία τους.

Ωστόσο και οι δύο αποτελούνται από έξι διακριτές στιβάδες I, II, III, IV, V και VI [Εικόνες 30 και 31]. Το επίπεδο IV χαρακτηρίζεται από μία εντυπωσιακή έλλειψη κυττάρων, στοιχείο που διαχωρίζει τις εξωτερικά πλούσιες σε κύτταρα στιβάδες, V και VI, από τις εσωτερικά βαθύτερες στιβάδες, II και III. Από τις εν λόγω διακριτές στιβάδες, ιδιαίτερη βαρύτητα δίδεται στη III, καθότι οι προβολές των πυραμιδικών νευρώνων που την απαρτίζουν είναι υπεύθυνες για την εξάπλωση των σημάτων τόσο στον ιππόκαμπο, όσο και σε άλλες εγκεφαλικές περιοχές [Witter P. Menno και συν., 2017].



Εικόνα 30:

«Τομή εγκεφάλου αρουραίου βρέγμα -3.24mm»
[Paxinos & Watson]



Εικόνα 31:

«LEC και MEC υποπεριοχές ενδορινικού φλοιού»
[Berndtsson H. Christin, 2013]

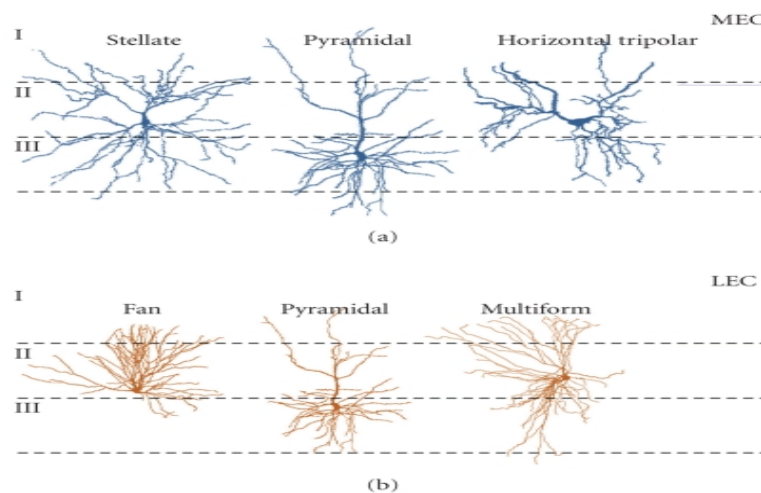
iii] Κυτταρικοί τύποι

Ένα γενικό κριτήριο διάκρισης μεταξύ των νευρώνων που απαρτίζουν τον ενδορινικό φλοιό αποτελεί η έκφραση δύο διακριτών πρωτεϊνών, της ρελίνης (*reelin*) - μίας γλυκοπρωτεΐνης η έκκριση της οποίας εξωκυτταρικά βοηθά στη ρύθμιση της διαδικασίας ρύθμισης της νευρονικής μετανάστευσης, καθώς και στον έλεγχο των αλληλεπιδράσεων μεταξύ κυττάρων στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο- και της καλβινδίνης (*calbindin*) -μίας εξαρτώμενης από τη βιταμίνη D πρωτεΐνης που δεσμεύει ιόντα ασβεστίου ρυθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο τη συγκέντρωσή του.

Στη στιβάδα II του έσω ενδορινικού φλοιού (*MEC*) η βασική υποομάδα κυττάρων συνίσταται από αστεροειδείς νευρώνες (*stellate cells - ST*), χαρακτηριστικό των οποίων αποτελούν οι πολλαπλοί δενδρίτες που αναδύονται από ένα κυκλικό σώμα. Οι εν λόγω νευρώνες εκφράζουν ρελίνη και όχι καλβινδίνη. Ένας άλλος τύπος νευρώνων που εντοπίζεται στην εν λόγω περιοχή είναι οι πυραμιδικοί νευρώνες, οι οποίοι ως επί τω πλείστων εκφράζουν καλβινδίνη και σε μικρότερα ποσοστά ρελίνη. Από την άλλη μεριά,

στη στιβάδα II του πλάγιου ενδορινικού φλοιού (*LEC*) πέρα από τους πυραμιδικούς νευρώνες που ήδη αναφέραμε στον έσω ενδορινικό φλοιό, ένας άλλος ιδιαίτερος τύπος νευρώνων είναι αυτός των φυλλωδών νευρώνων (*fan cells*) οι οποίοι στο μεγαλύτερο ποσοστό τους εκφράζουν ρελίνη και εμφανίζουν παρόμοια μορφολογία με τους αστεροειδείς νευρώνες (*ST*), πλην όμως στερούνται ενός θεμελιώδους διακριτού δενδριτικού θυσάνου. Στο εν λόγω επίπεδο εντοπίζονται και τρεις κύριες υποομάδες GABAεργικών ενδονευρώνων που εκφράζουν: [α] παρβαλβουμίνη (*parvalbumin - PV*), [β] σωματοστατίνη (*somatostatin - SST*) και [γ] σεροτονίνη (*5HT3a*) [Stranahan M. Alexis & Mattson P. Mark, 2010].

Αναφορικά με τη στιβάδα III, αυτή συνίσταται και στις δύο υποπεριοχές από ένα ομογενή πληθυσμό ακανθωδών διεγερτικών πυραμιδικών νευρώνων, οι οποίοι προβάλλουν στην CA1 περιοχή του ιππόκαμπου, καθώς και στο υπόθεμα (*subiculum*) αυτού. Επιπρόσθετα, στο επίπεδο αυτό εντοπίζονται και μη ακανθώδεις νευρώνες οι νευρικοί άξονες των οποίων προβάλλουν προς τη γωνιώδη δεσμίδα (*angular bundle*). Ο τρίτος βασικός τύπος νευρώνων απαρτίζεται από πολλαπλής πολικότητας νευρώνες (*multiform*) οι οποίοι συμβάλλουν στις προβολές του ιππόκαμπου. Όπως και τη στιβάδα II, έτσι και στη στιβάδα III εντοπίζεται μία μεγάλη ποικιλία ενδονευρώνων που εκφράζουν [α] σωματοστατίνη (*somatostatin - SST*), [β] καλβινδίνη (*calbindin*), [γ] πεπτίδιο VIP (*vasoactive intestinal peptide - VIP*) και [δ] στοιχείο P (*substance - P*) [Stranahan M. Alexis & Mattson P. Mark, 2010].

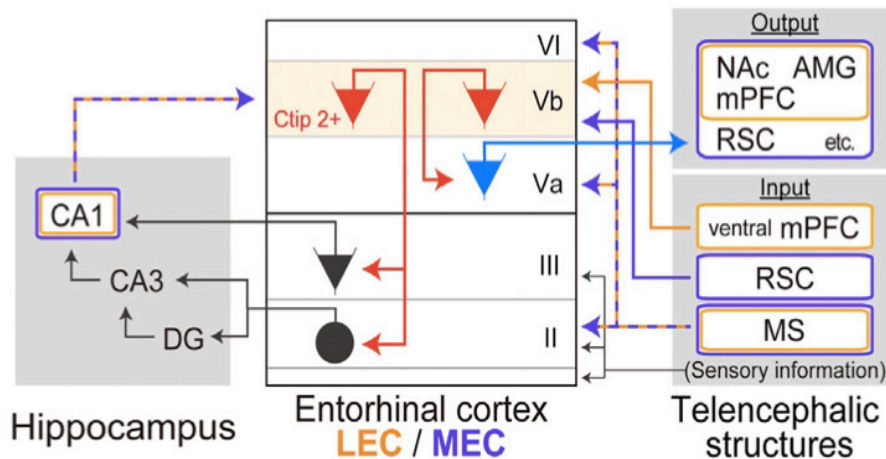


Εικόνα 32: «Τύποι κυττάρων στις υποπεριοχές MEC και LEC του ενδορινικού φλοιού» [Stranahan M. Alexis & Mattson P. Mark, 2010]

iv] Διασυνδέσεις

Σημαντική συστάδα προσαγωγών νευρώνων προερχόμενη από τον απιοειδή φλοιό προβάλλουν στις δύο διακριτές υποπεριοχές του ενδορινικού φλοιού (*LEC & MEC*). Λιγότερο άφθονη πηγή προβολών στον ενδορινικό φλοιό αποτελούν οι προσαγωγοί νευρώνες του νησιωτικού (*insular*), του προσαγωγίου (*cingulate*), του βρεγματικού (*parietal*), οπισθοσπλήνιου (*retrosplenial*) και ινιακού (*occipital*) φλοιού, με τη σχετική αφθονία αυτών να ποικίλει μεταξύ των δύο υποπεριοχών.

Αναφορικά με τις προβολές του ίδιου του ενδορινικού φλοιού πρέπει να επισημανθεί το εξέχουσας σημασίας νευρωνικό δίκτυο που σχηματίζεται με τον ιππόκαμπο. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο αυτών εγκεφαλικών περιοχών, όπως επισημάνθηκε, είναι αναγκαία για την ακέραιη λειτουργία του ιππόκαμπου [Vismer S. Marta και συν., 2015 και Witter P. Menno και συν., 2017].



Εικόνα 33: «Εκβολές και προβολές ενδορινικού φλοιού» [Shinya Ohara και συν., 2018]

ΔΕΥΤΕΡΕΥΩΝ ΣΩΜΑΤΟΑΙΣΘΗΤΙΚΟΣ ΦΛΟΙΟΣ (*Secondary Somatosensory Cortex - S2*)

ι] Λειτουργίες

Ο σωματοαισθητικός φλοιός είναι μία περιοχή του εγκεφάλου η οποία είναι υπεύθυνη για να λαμβάνει, αλλά και για να επεξεργάζεται αισθητηριακές πληροφορίες από όλο το σώμα, όπως η αφή, η θερμοκρασία, η πίεση και ο πόνος. Οι εν λόγω πληροφορίες καταλήγουν στη συγκεκριμένη φλοιική περιοχή μέσα από ένα σύνολο νευρωνικών μονοπατιών, μεταξύ των οποίων υπάρχει συνεχής αλληλεπίδραση νευρώνων του νωτιαίου μυελού (*spinal cord*), του εγκεφαλικού στελέχους (*brainstem*) και του θαλάμου (*thalamus*) και τελικά του σωματοαισθητικού φλοιού. Λαμβάνοντας τον τελικό τους προορισμό, οι πληροφορίες αυτές αποτελούν τη βάση, μέσω της επεξεργασίας τους, για την απαρχή ιδιαίτερα σημαντικών κινήσεων αναγκαίων για το χειρισμό συγκεκριμένων καταστάσεων [Bretas V. Rafael, 2020].

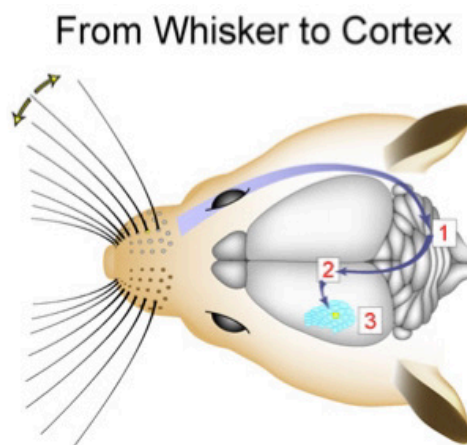
Η εγκεφαλική αυτή περιοχή διαχωρίζεται σε πρωτεύων και δευτερεύων σωματοαισθητικό φλοιό, με την πρώτη να αποτελεί την περισσότερο μελετημένη. Αναφορικά με το δευτερεύοντα σωματοαισθητικό φλοιό -που αποτελεί και αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας- αξίζει να σημειωθεί ότι πλήθος μελετών έχει αναδείξει τη συμβολή του στην αναγνώριση αντικειμένων βάσει της αφής, καθώς και στη μνήμη. Επιπρόσθετα, ενώ ο πρωτεύων σωματοαισθητικός φλοιός αποτελεί το βασικό αποδέκτη των αισθητηριακών πληροφοριών, για την ομαλή λειτουργία του αναγκαία χαρακτηρίζεται η συμβολή του δευτερεύοντος σωματοαισθητικού φλοιού για τις διαδικασίες διατήρησης, αποθήκευσης και επεξεργασίας τους. Τέλος, λαμβάνει απ'

ευθείας προβολές από το θάλαμο, ενώ στην περιοχή αυτή αποδίδεται η ικανότητα εντοπισμού μικροδιαφορών στη διαβάθμιση – κλιμάκωση του πόνου [Harsha Raju & Prasanna Tadi, 2021].

ii] Ανατομία

Ο δευτερεύων σωματοαισθητικός φλοιός εντοπίζεται εντός της περιοχής αυτής που τοποθετείται στη μετακεντρική έλικα (*postcentral gyrus*) του βρεγματικού λοβού (*parietal lobe*) πίσω από τον πρωτεύοντα σωματοαισθητικό φλοιό, στο ανώτερο τμήμα της έξω αύλακας, δηλαδή της σχισμής που διαχωρίζει το μετωπιαίο (*frontal*) και βρεγματικό (*parietal*) λοβό από τους κροταφικούς (*temporal*) λοβούς.

Αντιπροσωπευτική είναι η **Εικόνα 34**, η οποία απεικονίζει απλουστευμένα τη δραστηριότητα που προκαλείται από την εκτροπή που προκαλείται από οποιονδήποτε εξωγενή παράγοντα στις τρίχες του προσώπου ενός τρωκτικού. Συγκεκριμένα μία τέτοια μεταβολή επιφέρει την πρόκληση δυναμικών στους αισθητικούς νευρώνες του τρίδυμου νεύρου (*trigeminal nerve*), που σαν αποτέλεσμα έχει την έκκριση γλουταμικού στην περιοχή του εγκεφαλικού στελέχους. Εν συνεχεία, οι νευρώνες της περιοχής αυτής στέλνουν τις αισθητηριακές πληροφορίες στο θάλαμο, όπου εκεί θαλαμοφλοιικοί νευρώνες προβάλλουν στο σωματοαισθητικό φλοιό [Petersen C.H. Carl, 2018].



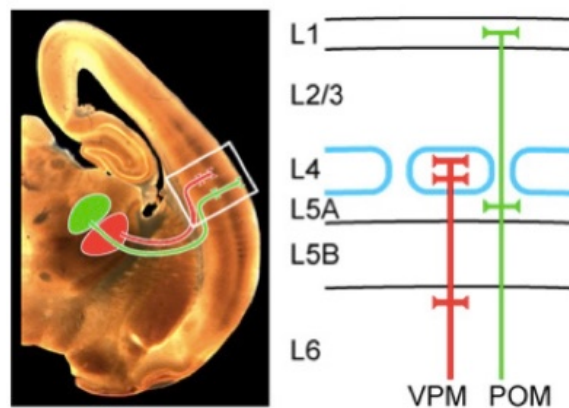
Εικόνα 34: «Απλουστευμένη απεικόνιση της προκαλούμενης δραστηριότητας στις τρίχες του προσώπου ενός τρωκτικού από εξωγενείς παράγοντες» [Petersen C.H. Carl, 2018]

iii] Διασυνδέσεις

Ο δευτερεύων σωματοαισθητικός φλοιός εμφανίζει σημαντικές νευρωνικές συνδέσεις με τον ιππόκαμπο και την αμυγδαλή. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό, καθώς βοηθά στη λήψη πληροφοριών από το περιβάλλον και στη λήψη αποφάσεων σχετικά με τον τρόπο προσέγγισής τους, ενσωματώνοντας ταυτόχρονα τυχόν σχετιζόμενες παρελθούσες εμπειρίες, λαμβάνοντας υπόψιν την τρέχουσα αξιολόγηση του ερεθίσματος και εκδηλώνοντας τελικά τη βέλτιστη απόκριση – αντίδραση. Ενώ ο πρωτεύων σωματοαισθητικός φλοιός σχετίζεται με τον προσδιορισμό των πτυχών της αφής, όπως το μέγεθος και η υφή, ο δευτερεύων σωματοαισθητικός φλοιός συνδέεται

με τη χωρική και απτική μνήμη που σχετίζεται με αισθητηριακές εμπειρίες [Harsha Raju & Prasanna Tadi, 2021].

Επιπρόσθετα, ουσιαστική είναι η επικοινωνία του δευτερεύοντος σωματοαισθητικού φλοιού με το θάλαμο. Υπάρχουν δύο τουλάχιστον παράλληλες θαλαμοφλοιικές οδοί για τη σηματοδότηση αισθητηριακών πληροφοριών: [i] γλουταμινεργικοί νευρώνες στον κοιλιακό οπίσθιο έσω πυρήνα (*Ventral Posterior Medial thalamic nucleus – VPM nucleus*), οι απολήξεις των οποίων προβάλλουν κυρίως στη στιβάδα 4, και εν μέρει στη στιβάδα 6 του δευτερεύοντος σωματοαισθητικού φλοιού και [ii] νευρώνες του οπίσθιου έσω πυρήνα (*Posterior Medial thalamic nucleus – POM nucleus*) που προβάλλουν κυρίως στη στιβάδα 1 [Εικόνα 35, Petersen C.H. Carl, 2018].



Εικόνα 35: «Σχηματική απεικόνιση της επικοινωνίας θαλάμου – δευτερεύοντα σωματοαισθητικού φλοιού αρουραίου» [Petersen C.H. Carl, 2018]

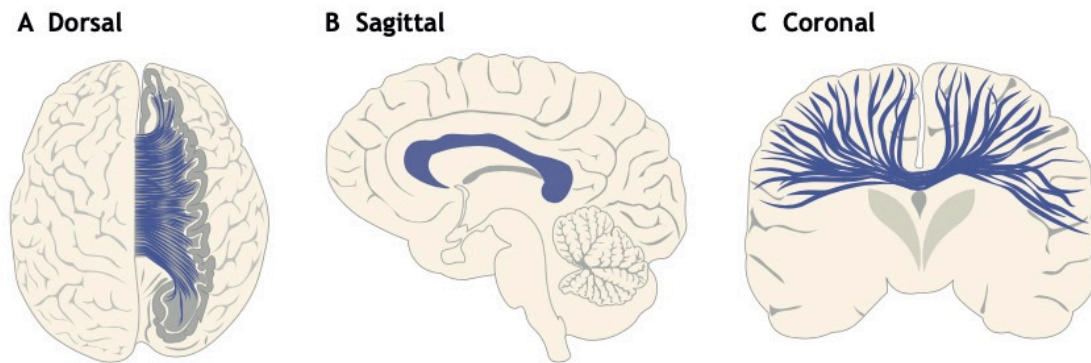
ΜΕΣΟΛΟΒΙΟ (*Corpus Callosum - CC*)

ι] Λειτουργίες

Το μεσολόβιο είναι μια παχιά ζώνη νευρικών ινών που χωρίζει τους λοβούς του εγκεφάλου σε αριστερό και δεξί ημισφαίριο, ενώ αποτελεί την πιο σημαντική εγκεφαλική δομή που συμμετέχει στη μετάδοση των πληροφοριών μεταξύ των δύο εγκεφαλικών ημισφαιρίων [Εικόνα 36]. Αποτελείται από 300 περίπου εκατομμύρια νευράξονες που συνδέουν τα δύο ημισφαίρια, ενώ έχει χαρακτηριστεί ως μία νευρωνική «οδός ταχείας κυκλοφορίας», μέσω της οποίας επιτυγχάνεται η ταχύτατη, συνεχής επικοινωνία των δύο ημισφαιρίων, καθώς και η διαρκής συνεργασία τους [Sherwood L., 2016].

Όπως είναι γνωστό το αριστερό εγκεφαλικό ημισφαίριο ελέγχει τη λήψη αποφάσεων, την εκτίμηση πιθανών συνεπειών, τη δημιουργία υπαρκτών ιδεών, το σχεδιασμό χρήσιμων λεπτομερειών και την αλληλουχία ενεργειών. Από την άλλη μεριά, το δεξί εγκεφαλικό ημισφαίριο ενέχεται στον έλεγχο της αφηρημένης σκέψης, των συναισθημάτων, των αισθήσεων, των ενστίκτων και της δημιουργικότητας. Η πληθώρα αυτή των ετερογενών διαδικασιών ελέγχεται πλήρως από το μεσολόβιο, η λειτουργία

του οποίου συνεισφέρει στην αμέριστη συνεργασία των δύο εγκεφαλικών ημισφαιρίων ώστε να είναι εφικτή η καθημερινή λήψη αποφάσεων. Η ιδιαίτερης σημασίας εγκεφαλική δομή αντικατοπτρίζεται σε λειτουργίες, όπως αυτές της όρασης και της ομιλίας, στις οποίες η επεξεργασία των μηνυμάτων και των πληροφοριών, εν προκειμένω τα οπτικά πεδία και η γλώσσα, επεξεργάζονται ξεχωριστά από κάθε ημισφαίριο, η συνεργατική επικοινωνία των οποίων φέρει το τελικό βέλτιστο αποτέλεσμα [De León Reyes S. Noelia και συν., 2020].



Εικόνα 36: «Το μεσολόβιο στον ανθρώπινο εγκέφαλο σε ραχιαία, πλάγια και πρόσθια απεικόνιση»
[Noelia S. De León Reyes και συν., 2020]

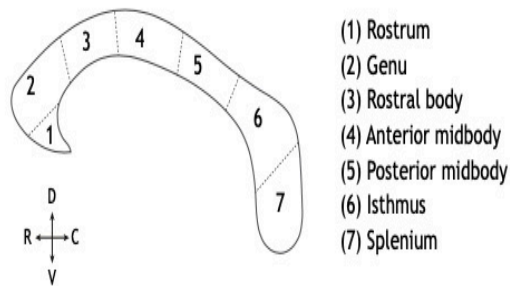
Στα πλαίσια της θεωρίας της εξέλιξης, εκφράζεται η πεποίθηση ότι το μεσολόβιο αναπτύχθηκε ως αποτέλεσμα του διαρκώς αυξανόμενου μεγέθους του εγκεφάλου των ανώτερων οργανισμών, προκειμένου να καταστήσει δυνατή τη λειτουργική σύνδεση απομακρυσμένων περιοχών των δύο ημισφαιρίων. Πράγματι, μεταξύ των διαφόρων ειδών το μέγεθος του εγκεφαλικού φλοιού παρουσιάζει συσχέτιση με τον αριθμό των νευρικών ινών που συγκροτούν το μεσολόβιο. Ωστόσο η σχέση αυτή δεν είναι γραμμική, με αποτέλεσμα οι ανώτεροι οργανισμοί να εμφανίζουν στην πράξη μειωμένη συνδεσιμότητα μεταξύ των δύο ημισφαιρίων σε σχέση με τους κατώτερους, γεγονός που τους καθιστά πιο επιρρεπείς σε διαταραχές αυτής της συνδεσιμότητας [Lynn K. Paul, 2011].

ii] Ανατομία

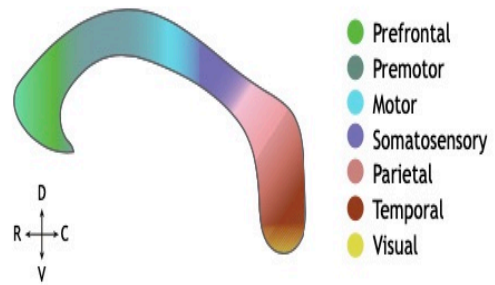
Η διαμόρφωση του μεσολόβιου διεξάγεται στον άνθρωπο κατά το δεύτερο τρίμηνο της κύησης και συγκεκριμένα μεταξύ 8^{ης} και 20^{ης} εβδομάδας της κύησης. Εντοπίζεται κάτω από τον εγκέφαλο και στη μεσαία γραμμή αυτού, εντός της ενδιάμεσης σχισμής, η οποία είναι μια βαθιά αυλάκωση που χωρίζει τα εγκεφαλικά ημισφαίρια. Εμφανίζει προσθιοπίσθια κλίση στην ανάπτυξή του και χωρίζεται σε επιμέρους τμήματα και συγκεκριμένα στα: ρύγχος (*rostrum*), γόνυ (*genu*), σώμα (*body*), ισθμό (*isthmus*) και σπληνίο (*splenium*). Το ρύγχος και το γένος συνδέουν τον αριστερό και το δεξιό μετωπιαίο λοβό, ενώ το σώμα και το σπληνίο συνδέουν τα ημισφαίρια των κροταφικών

λοβών και τα ημισφαίρια των ινιακών λοβών [Εικόνα 37Α, De León Reyes S. Noelia και συν., 2020].

A Structural organization of the CC



B Functional organization of the CC



Εικόνα 37: «Σχηματική και λειτουργική απεικόνιση του μεσολόβιου»
[De León Reyes S. Noelia και συν., 2020]

Τα μέρη του μεσολοβίου που σχηματίζονται πρώτα είναι το γόναυ και το σώμα, δηλαδή το κεντρικό τμήμα του μεσολοβίου, ενώ το ρύγχος και το σπλήνιο σχηματίζονται αργότερα. Ωστόσο, το μεσολόβιο συνεχίζει να αναπτύσσεται και μετά τη γέννηση, μέχρι και τα πρώτα χρόνια της ενηλικίωσης, καθιστώντας έτσι τη λειτουργία του όλο και πιο αποτελεσματική [Lynn K. Paul, 2011].

iii] Κυτταρικοί τύποι

Υπολογίζεται ότι το μεσολόβιο απαρτίζεται από περισσότερες από 200 εκατομμύρια συνδεδεμένες ίνες που μπορεί να είναι είτε ομότοπες είτε ετερότοπες. Επίσης το μεσολόβιο παρουσιάζει τοπογραφική οργάνωση, δηλαδή οι ίνες που συνδέουν αντίστοιχες περιοχές των δύο ημισφαιρίων κατά κανόνα γειτνιάζουν. Επιπρόσθετα, επικρατούσα άποψη μεταξύ της επιστημονικής κοινότητας αποτελεί το γεγονός ότι η συντριπτική πλειοψηφία των συνδεδεμένων ινών του μεσολοβίου είναι διεγερτικές, δηλαδή επιτρέπουν τη μεταφορά νευρικών ώσεων μεταξύ των ημισφαιρίων, παρά ανασταλτικές, στοιχείο που θα προωθούσε την ανεξάρτητη λειτουργία μεταξύ των δύο ημισφαιρίων [Bloom S. Juliana & Hynd W. George, 2005].

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΚΘΕΣΗΣ ΣΤΗΝ ΑΙΘΑΝΟΛΗ ΣΤΙΣ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΠΕΡΙΟΧΕΣ

Η διακρίβωση της τερατογόνου δράσεως της αιθανόλης, κατά το πρόσφατο παρελθόν, έστρεψε το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας στην ανακάλυψη των μηχανισμών εκείνων με τους οποίους το αλκοόλ επιφέρει τα εμβρυοτοξικά του αποτελέσματα. Πρόσφατες νευροανατομικές μελέτες έδειξαν ότι η κατανάλωση αιθανόλης από τη μητέρα κατά τη διάρκεια της κύησης έχει μία επιβλαβή επίδραση στην ανάπτυξη του εγκεφαλικού φλοιού.

Καίριας σημασίας έχει χαρακτηριστεί η επίδραση της αιθανόλης στη φυσιολογική ανάπτυξη των μετωπιαίων λοβών, που αποτελούν το 12% περίπου του συνολικού

όγκου του εγκεφάλου και έχουν χαρακτηριστεί και το «κέντρο ελέγχου» της εκτελεστικής λειτουργίας και μίας σειράς ανώτερων νοητικών λειτουργιών του ανθρώπου. Χαρακτηριστικές δυσμορφίες, καθώς και μεταβολές τόσο στον όγκο, όσο και στο πάχος αυτών έχουν καταγραφεί σε παιδιά, τα οποία κατά τη διάρκεια της εμβρυικής τους ανάπτυξης εκτέθηκαν στην αιθανόλη. Η παρατήρηση των μεταβολών αυτών, επιβεβαιώθηκε και από χειρισμούς σε ζωικά μοντέλα που έχουν εκτεθεί κατάλληλα κατά την εμβρυική τους ανάπτυξη στην αιθανόλη. Συγκεκριμένα, η προγεννητική έκθεση επίμυων στην αιθανόλη οδήγησε σε μία σημαντική μείωση του αριθμού των νευρώνων στον έσω προμετωπιαίο φλοιό τους, αλλά και σε μία σημαντική αύξηση του αριθμού των GABAεργικών ενδονευρώνων που εντοπίζονται στις στιβάδες της εν λόγω εγκεφαλικής περιοχής. Μία τέτοια επερχόμενη ανισορροπία στη σχέση διέγερσης/αναστολής, δύναται να αποτελεί μία εκ των αιτιολογικών βάσεων της μη φυσιολογικής τους απόκρισης σε πληθώρα εκτελεστικών λειτουργιών. Επιπρόσθετα, εμφανείς -μέσα από μελέτες λειτουργικής μαγνητικής τομογραφίας (*functional MRI - fMRI*)- είναι οι επιπτώσεις της προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη στην ακεραιότητα της υφιστάμενης συνδεσιμότητας του έσω προμετωπιαίου φλοιού με έτερες εγκεφαλικές περιοχές, όπως το εγκεφαλικό στέλεχος, ο θάλαμος, τα βασικά γάγγλια και το μεταιχμιακό σύστημα, συνδεσιμότητα μεγάλης σημασίας για τις γνωστικές λειτουργίες, τη μνήμη και το συναίσθημα [Tang S. και συν., 2019]. Επιπλέον, παιδιά τα οποία είχαν εκτεθεί στο αλκοόλ κατά την κύηση εμφανίζουν: [1] μειωμένη λειτουργική διασύνδεση του προμετωπιαίου φλοιού με άλλες περιοχές του φλοιού (*βρεγματικό και κροταφικό λοβό*) και [2] αυξημένη λειτουργική διασύνδεση μεταξύ του δεξιού πρόσθιου προμετωπιαίου φλοιού και του αριστερού κοιλιακού προμετωπιαίου φλοιού. Η αυξημένη ενδο-δικτυακή σε συνδυασμό με τη μειωμένη δια-δικτυακή λειτουργική διασύνδεση του προμετωπιαίου φλοιού πιθανά σχετίζονται με τα ελλείμματα προσοχής και την εκτελεστική δυσλειτουργία των παιδιών που εμφανίζουν διαταραχές του φάσματος εμβρυϊκού αλκοολισμού [Ware A.L., και συν., 2021].

Αναφορικά με το μεσολόβιο πρέπει να επισημανθεί ότι η παρατεταμένη περίοδος ανάπτυξης του το καθιστά θεωρητικά ευάλωτο στη δράση πολλών εξωγενών περιβαλλοντικών παραγόντων. Ωστόσο, η μόνη επιβεβαιωμένη συσχέτιση αφορά το εμβρυικό αλκοολικό σύνδρομο, στο οποίο δύναται να παρατηρηθεί: [α] πλήρης απουσία (*αγενεσία*), [β] αποτυχία σχηματισμού ορισμένων τμημάτων και [γ] υποπλασία, δηλαδή πλήρης σχηματισμός του αλλά μικρότερου μεγέθους ανάλογα με την ηλικία και το φύλο. Σε αυτές τις περιπτώσεις δεν υπάρχουν πολλά «μονοπάτια» - δίοδοι πληροφοριών ανάμεσα στα δύο εγκεφαλικά ημισφαίρια, με αποτέλεσμα οι πληροφορίες να διαπερνούν πολύ αργά ή καθόλα αναποτελεσματικά και τα άτομα που χαρακτηρίζονται από τέτοιους φαινοτύπους προβαίνουν σε ενέργειες, λόγω έντονης παρόρμησης, οι συνέπειες των οποίων γίνονται αντιληπτές μεταγενέστερα αφού οι εν

λόγω πράξεις έχουν λάβει χώρα -τα εν λόγω άτομα γνωρίζουν τους κανόνες και τις συνέπειες των πράξεών τους, πλην όμως δεν είναι ικανά να σκεφτούν πριν ενεργήσουν [Mei Qiang και συν., 2002]. Παιδιά και έφηβοι με διαταραχές της δομής του μεσολοβίου παρουσιάζουν ποικίλα κλινικά ευρήματα, όπως υποτονία, δυσχέρεια στο συντονισμό των κινήσεων, διαταραχές όρασης και ακοής, έλλειψη αυτογνωσίας, δυσκολία χειρισμού διαπροσωπικών σχέσεων, αδυναμία εύκολης αντίληψης συναισθημάτων, δυσκολία εκφοράς του λόγου, χαρακτηριστικά που έχουν καταγραφεί κατά καιρούς σε παιδιά με εμβρυικό αλκοολικό σύνδρομο.

Επιπρόσθετα, όσον αφορά τις επιπτώσεις της επίδρασης της προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη στην ανάπτυξη του δευτερεύοντα σωματοαισθητικού φλοιού, πολλές αποσαφηνίσεις αναμένεται να δοθούν. Ωστόσο, ενδιαφέρουσα χαρακτηρίζεται η μελέτη που εστιάστηκε στην επίδραση της αιθανόλης στους πυραμιδικούς νευρώνες της συγκεκριμένης εγκεφαλικής περιοχής. Η εν λόγω μελέτη μεταχειρίστηκε για τα πειράματά της επίμυες, οι οποίοι εκτέθηκαν σε υπερβολική ποσότητα αιθανόλης (*binge drinking*) κατά το εμβρυικό χρονικό διάστημα E13,5 - E16,5. Τα κυριότερα ευρήματά της έδειξαν: [i] παρεκκλίνουσα ακτινωτή μετανάστευση των νευρώνων, [ii] υπέρμετρη αύξηση της αυθόρμητης δραστηριότητας των πυραμιδικών νευρώνων στις στιβάδες V/VI της συγκεκριμένης φλοιικής περιοχής, μέσω μίας εμφανούς επίδρασης στους μηχανισμούς προσυναπτικής νευροδιαβίβασης και [iii] ανισορροπία στη σχέση διέγερσης/αναστολής, μέσω διαφορετικής επίδρασης που ασκείται στις διεγερτικές και ανασταλτικές συνάψεις που εντοπίζονται στην εν λόγω εγκεφαλική περιοχή [Delatour C. Laurie και συν., 2020]. Οι εν λόγω επιδράσεις ίσως να αποτελούν την αιτιολογική βάση μίας αποκλίνουσας διαβίβασης σωματοαισθητικών πληροφοριών.

Τέλος, η επιστημονική έρευνα επεκτάθηκε και σε έτερες φλοιικές περιοχές, όπως αυτές του απιοειδούς και ενδορινικού φλοιού. Μελέτες εγκεφάλων αλκοολικών ανθρώπων μεταθανάτια κατέδειξαν μία σημαντική μείωση του πάχους των εν λόγω φλοιικών περιοχών. Κατ' αντιστοιχία, εκτεταμένος νευροεκφυλισμός παρατηρήθηκε στις ίδιες φλοιικές περιοχές κατά το χειρισμό ζωικών μοντέλων - επίμυων που εκτέθηκαν σε υπερβολική ποσότητα αιθανόλης εντός σύντομου χρονικού διαστήματος (*binge drinking*) [Crews F. & Vetreno R., 2014]. Η συνδυαστική αξιοποίηση των δύο αυτών παρατηρήσεων, καθώς και η απουσία βιβλιογραφίας σχετικά με την επίδραση της προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη στις δύο αυτές περιοχές, αποτέλεσε τη βάση επιλογής τους για τη μελέτη των ενδεχόμενων επιπτώσεων του εμβρυικού αλκοολικού συνδρόμου σε αυτές.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας αποτέλεσε η μελέτη της φλεγμονώδους αντίδρασης στον εγκέφαλο ενήλικων Sprague – Dawley επίμυων, οι οποίοι είχαν εκτεθεί σε αιθανόλη βάσει συγκεκριμένου πρωτοκόλλου έκθεσης, κατά το χρονικό διάστημα της εμβρυικής τους ανάπτυξης μέχρι και το μεταγεννητικό χρονικό διάστημα που αντιστοιχεί στο τρίτο τρίμηνο της ανθρώπινης κύησης.

Πιο συγκεκριμένα, η μελέτη εστιασθηκε στις τυχόν αλλαγές που επιφέρει μία τέτοια προκαλούμενη συνθήκη, τόσο στο σύνολο του κυτταρικού πληθυσμού, όσο στη μορφολογία των μικρογλοιακών κυττάρων -*ανοσολογικά κύτταρα του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος, τα λεγόμενα μακροφάγα του εγκεφάλου*- αλλά και στα επίπεδα βιομορίων - πρωτεϊνών που αποτελούν αποδεδειγμένα δείκτες φλεγμονής (*συγκεκριμένα στον παράγοντα νέκρωσης TNF- α , στην ιντερλευκίνη IL-1 β και στην πρωτεΐνη Iba1*), σε εγκεφαλικές περιοχές του φλοιού, ήτοι στον έσω προμετωπιαίο φλοιό, στον απιοειδή φλοιό, στον ενδορινικό φλοιό, στο δευτερεύοντα σωματοαισθητικό φλοιό, αλλά και στο μεσολόβιο.

Για την πειραματική διαδικασία και την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων της σύγκρισης των δύο υπό μελέτη συνθηκών (*ζώα ελέγχου – control & ζώα που έχουν εκτεθεί σε αιθανόλη κατά την εμβρυική τους ανάπτυξη – Fetal Alcohol Syndrome*), διενεργήθηκε ιστολογική χρώση Cresyl Violet για τα σωματίδια Nissl, χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης Iba1 – δείκτη ενεργοποίησης των μικρογλοιακών κυττάρων, ενώ τέλος έλαβε χώρα ανοσοαποτύπωση κηλίδας για ποσοτική σύγκριση των δεικτών φλεγμονής.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

Όλες οι πειραματικές διεργασίες της παρούσας πτυχιακής εργασίας πραγματοποιήθηκαν σε αρουραίους - επίμυες στελέχους Sprague - Dawley, ηλικίας 52-58 ημερών και βάρους 203 γραμμαρίων κατά μέσο όρο. Τα εν λόγω ζώα στεγαζόνταν στις εγκαταστάσεις του εκτροφείου του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, ενώ προμηθεύτηκαν από το Εργαστήριο Φυσιολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Γίνεται μνεία ότι, καθ' όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής των πειραμάτων κατεβλήθη η μέγιστη δυνατή προσπάθεια προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί ο αριθμός των επίμυων που τελικά θυσιάστηκαν αλλά και να αποφευχθεί η ταλαιπωρία αυτών. Η φροντίδα και όλοι οι πειραματικοί χειρισμοί έγιναν σύμφωνα με τις Οδηγίες του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Ευρωπαϊκού Συμβουλίου της 22^{ης} Σεπτεμβρίου του 2010 «*Περί Προστασίας Ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς λόγους (2010/63/EE)*».

Συνθήκες διαβίωσης πειραματόζωων

Όλοι οι επίμυες διαβιούσαν σε πλαστικούς κλωβούς, με μέγιστο αριθμό τρία ζώα ανά κλωβό. Ο διαχωρισμός των απογόνων από τη μητέρα τους έγινε είκοσι τέσσερις ημέρες μετά τη γέννησή τους με κριτήριο το φύλο (αρσενικά/θηλυκά). Τα εν λόγω ζώα είχαν ελεύθερη και συνεχή πρόσβαση σε νερό και τροφή, ενώ οι συνθήκες διαβίωσής τους διατηρούνταν σταθερές, με τη θερμοκρασία να κυμαίνεται στους $21 \pm 2^\circ\text{C}$ και τον κύκλο σκότους/φωτός να είναι σταθερός στις δώδεκα ώρες φωτός (από 08:00' ώρα έως 20:00' ώρα) και δώδεκα ώρες σκότους (από 20:00' ώρα έως 08:00' ώρα).

Πρωτόκολλο έκθεσης στην αιθανόλη¹⁰

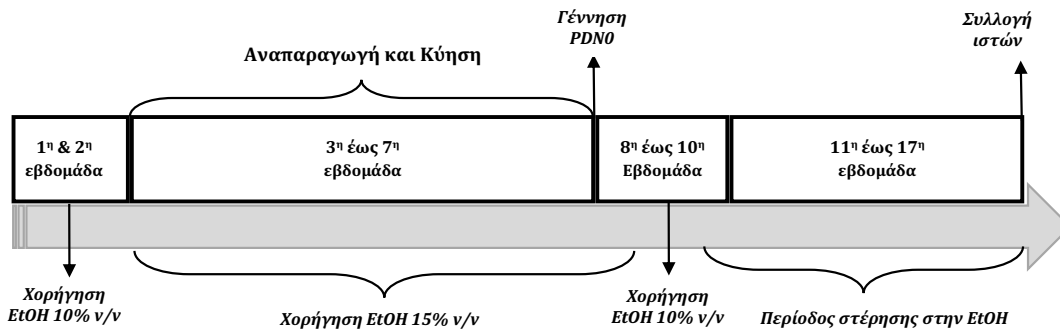
Νεαροί, θηλυκοί άτοκοι ενήλικες Sprague-Dawley επίμυες έλαβαν διάλυμα αιθανόλης για δύο εβδομάδες ως τη μόνη πηγή νερού. Ειδικότερα, για μία εβδομάδα παρέχονταν σε αυτούς διάλυμα αιθανόλης (EtOH) συγκέντρωσης 10%v/v. Μετά το πέρας της πρώτης εβδομάδας και για όμοιο χρονικό διάστημα (μία εβδομάδα), οι θηλυκοί επίμυες έλαβαν διάλυμα αιθανόλης συγκέντρωσης 15%v/v¹¹, έκθεση η οποία συνεχίστηκε καθ' όλη τη διάρκεια της αναπαραγωγής και της κύησης.

Κατά τη διάρκεια των πρώτων ημερών μετά τη γέννηση, συνεχίστηκε η χορήγηση διαλύματος αιθανόλης (EtOH) συγκέντρωσης 15%v/v για χρονικό διάστημα επτά ημερών. Τη δεύτερη εβδομάδα η συγκέντρωση αιθανόλης (EtOH) μειώθηκε στο 10%

¹⁰ Γίνεται μνεία ότι το σύνολο των διαδικασιών που συνιστούν το αναφερόμενο πρωτόκολλο έκθεσης των πειραματόζωων στην αιθανόλη έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

¹¹ Έχει αποδειχθεί από παρελθοντικά πειράματα ότι η χορηγούμενη συγκέντρωση 15% v/v αιθανόλης επαρκεί ώστε να προκύψουν FAS απόγονοι, χωρίς να υφίσταται κίνδυνος υψηλού ποσοστού θνησιμότητας και αδυναμίας σύλληψης - χαρακτηριστικά που έχουν παρατηρηθεί όταν στα ζώα χορηγήθηκε διάλυμα αιθανόλης μεγαλύτερης περιεκτικότητας

v/v, ενώ η χορήγηση διαλύματος αιθανόλης (EtOH) σταμάτησε στην αρχή της τρίτης εβδομάδας μετά τη γέννηση.



Όπου PDN (Postnatal Day) η ημέρα μετά τη γέννηση

Εικόνα 38: «Διαδικασία δημιουργίας FAS επίμυων»

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ ΓΙΑ ΔΙΕΝΕΡΓΕΙΑ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ

ι] Διαδικασία ενδοκαρδιακής μονιμοποίησης (*Transcardial Perfusion*)

Πριν την έναρξη της διαδικασίας τα πειραματόζωα μεταφέρθηκαν σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο όπου παρέμειναν για χρονικό διάστημα ικανό ώστε να επιτευχθεί η προσαρμογή τους στο νέο περιβάλλον προς αποφυγή πρόκλησης στρες προτού λάβει χώρα η αναισθησία τους.

Για τη διευκόλυνση του χειρισμού τους (αποφυγή πιθανής αντίδρασης) τοποθετήθηκαν διαδοχικά σε γυάλινη γυάλα, εντός της οποίας τοποθετήθηκε εμποτισμένο με αιθέρα βαμβάκι, με σκοπό την πρόκληση ζάλης. Στη συνέχεια, ακολούθησαν δύο διαδοχικές ενέσεις: [i] 200μl κεταμίνη¹² ενδομυϊκά, ένα αναισθητικό/καταπραϋντικό ταχείας δράσης με διασχιστικές και ψυχοδηλωτικές επιδράσεις και [ii] 2ml προποφόλη¹³ ενδοπεριτοναϊκά, ένα φάρμακο βραδείας δράσης που οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα συνείδησης και έλλειψη μνήμης. Η επιτυχής αναισθησία του πειραματόζωου ελέγχθηκε με την απόσυρση του πέλματος σε εφαρμογή πίεσης επ' αυτού. Την απουσία αντίδρασης ακολούθησε η ζύγισή του και η μεταφορά του σε απαγωγό.

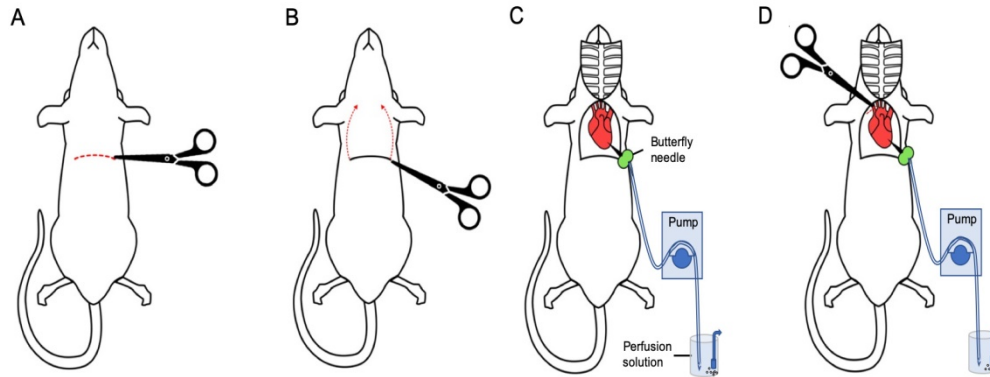
Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε τομή στο ύψος της ξιφοειδούς απόφυσης [Εικόνα 39^A], ενώ ακολούθησαν τομές που βοήθησαν στην απελευθέρωση της καρδιάς του πειραματόζωου (Εικόνα 39^B), η οποία παρέμεινε εκτεθειμένη καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Ακολούθως, τοποθετήθηκε βελόνα 16 Gauge στην αριστερή κοιλία της καρδιάς του πειραματόζωου με οδηγό - σημείο την κορυφή αυτής [Εικόνα 39^C & Εικόνα 40], ενεργοποιήθηκε η περισταλτική αντλία ροής Gilson MINIPULS 3 με ρυθμό 48 στροφές ανά λεπτό, ενώ τέλος πραγματοποιήθηκε τομή στο δεξιό κόλπο της

¹² 100mg/ml Imalgene 1000

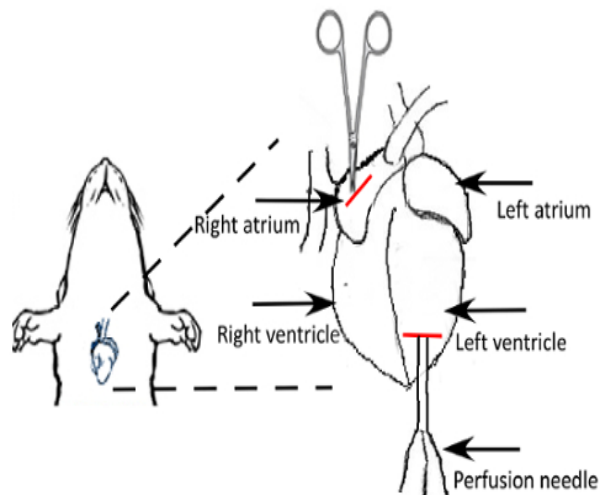
¹³ 20mg/ml Propofol-©Lipuro, B. Braun Melsungen AG, Germany

καρδιάς με σκοπό τη δημιουργία διόδου αιματικής εκροής [Εικόνα 39^α και Εικόνα 40] [Gage J. Gregory και συν., 2012].

Η περισταλτική αντλία ροής ενεργοποιήθηκε διαχέοντας αρχικά για χρονικό 10min διάλυμα 0,9% NaCl σε θερμοκρασία δωματίου, χρονικό διάστημα επαρκές ώστε να παρατηρηθεί εκροή «καθαρού» ορού από το δεξιό κόλπο και αποχρωματισμός των πνευμόνων.



Εικόνα 39: «Στάδια που ακολουθούνται για την έκθεση της καρδιάς και το χειρισμό αυτής για την παροχέτευση των επιθυμητών διαλυμάτων» [Gage J. Gregory και συν., 2012]



Εικόνα 40: «Σχηματική απεικόνιση σε μεγέθυνση των σημείων εισόδου της βελόνας Gauge (αριστερή κοιλία) και τομής για επαγόμενη εκροή (δεξιός κόλπος)» [Ghosh Pallab & Higgins E. Darrren, 2018]

Μετά την παρέλευση του χρονικού διαστήματος των 10min, χορηγήθηκε στο πειραματόζωο μέσω της αντλίας ροής και για χρονικό διάστημα 20min κρύο διάλυμα 4% παραφορμαλδεΰδης (*Paraformaldehyde - PFA*) σε διάλυμα PB (*Phosphate Buffer - PB*) με σύσταση 0,2M Na_2PO_4 και K_2PO_4 . Με την ολοκλήρωση της διαπότησης, το πειραματόζωο τοποθετήθηκε σε πρηνή θέση και ακολούθησε διάνοιξη του οστέινου τμήματος του εγκεφάλου προς απελευθέρωση του εγκεφάλου. Συγκεκριμένα, η διαδικασία ξεκίνησε με την απομάκρυνση του δέρματος και των μυών που καλύπτουν το οστέινο τμήμα [Εικόνα 41^α & 41^β]. Αφού απελευθερώθηκε το οστέινο τμήμα, αυτό αφαιρέθηκε -με οδηγό το «λάμδα» του κρανίου- με τη βοήθεια ενός οστεοκόπτη [Εικόνα 41^γ]. Στο βήμα αυτό, ένεκα του κινδύνου τραυματισμού του εγκεφαλικού ιστού, απαιτήθηκε ιδιαίτερη προσοχή και για το λόγο αυτό οι κρανιοτομές

πραγματοποιήθηκαν οριζόντια και κατά μήκος -προηγέθηκε το σπάσιμο των δύο μεγάλων οστών δεξιά και αριστερά στο κάτω μέρος [Εικόνα 41^c].

Ακολούθησε η αφαίρεση της μήνιγγας της διαφανούς μεμβράνης και από τα δύο εγκεφαλικά ημισφαίρια. Τέλος, έλαβε χώρα η αφαίρεση του εγκεφάλου με τη βοήθεια σπάτουλας με πολύ μεγάλη προσοχή [Εικόνα 41^d].



Εικόνα 41: «Στάδια που ακολουθούνται για την απελευθέρωση του εγκεφαλικού ιστού από το οστέινο τμήμα που το καλύπτει» [Gage J. Gregory και συν., 2012]

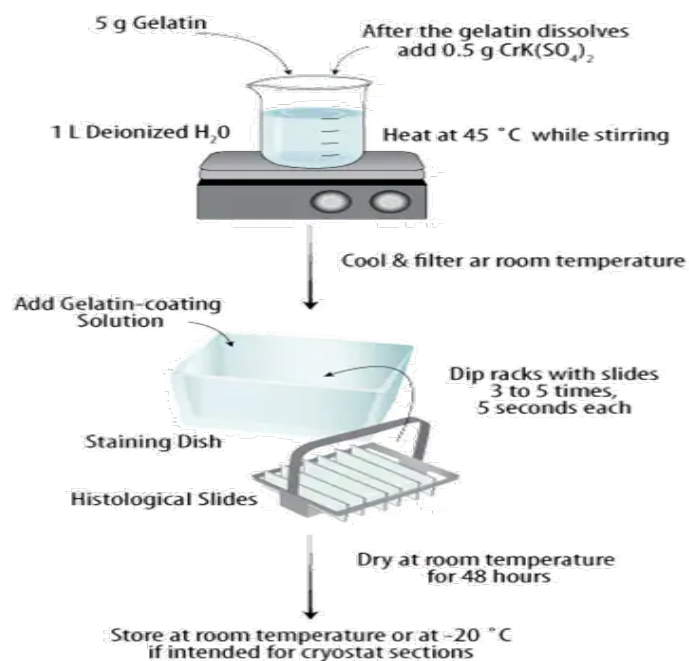
Ο εγκέφαλος στη συνέχεια τοποθετήθηκε για χρονικό διάστημα μίας ώρας στους 4°C (ψυχρός θάλαμος) εντός falcon που περιείχε ποσότητα από το ήδη παρασκευασθέν διάλυμα 0,4% PFA, ενώ ακολούθησε η μεταφορά του σε υπέρτονο διάλυμα σουκρόζης περιεκτικότητας 30% για την επίτευξη κρυοπροστασίας και η αποθήκευσή του στους 4°C (ψυχρός θάλαμος) για 24 έως 48 ώρες.

Μετά την παρέλευση του χρονικού διαστήματος των 24-48 ωρών και αφού πραγματοποιήθηκε έλεγχος ως προς την καταβύθιση των εγκεφαλικών ιστών, ακολούθησε η διαδικασία ταχείας ψύξης τους με τη χρήση διαλύματος ισοπεντανίου εντός ξηρού πάγου. Όταν η ένδειξη του θερμομέτρου, που τοποθετήθηκε στο διάλυμα ισοπεντανίου, έφθασε τους -45°C, οι εγκεφαλικοί ιστοί εισήχθησαν διαδοχικά στο εν λόγω διάλυμα -επιθυμητής πλέον θερμοκρασίας- για χρονικό διάστημα 1min. Τέλος, η διατήρηση των ιστών μέχρι και τη λήψη τομών σε κρυοτόμο, επετεύχθη στους -80°C.

Οι ιστοί κόπηκαν σε κρυοτόμο τύπου Leica CM1850 σε τομές πάχους 10μm και στους -20°C. Οι τομές προσκολλήθηκαν διαδοχικά σε ζελατινοποιημένες αντικειμενοφόρους πλάκες, οι οποίες βρίσκονταν εκτός του κρυοτόμου και αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι τη διαδικασία της ανοσοϊστοχημείας ή της χρώση Nissl.

ii] Ζελατινοποίηση αντικειμενοφόρων πλακών

Για τη συλλογή των εγκεφαλικών τομών στον κρυοτόμο αρχικά απαιτήθηκε η ζελατινοποίηση των αντικειμενοφόρων πλακών [Εικόνα 42]. Η ζελατινοποίηση πραγματοποιήθηκε με εμπύθισή τους σε μείγμα 0,5w/v ζελατίνης (300 bloom) και 0,5gr δωδεκαυδρικού θειικού χρωμιούχου καλίου [CrK(SO₄)₂ - 12H₂O] σε θερμοκρασία 45°C και στέγνωμα σε θερμοκρασία δωματίου για 48 ώρες.



Εικόνα 42: «Σχηματική απεικόνιση διαδικασίας ζελατινοποίησης»

iii] Χρώση Cresyl Violet, φωτογράφιση τομών και ανάλυση εικόνων

Η Cresyl Violet αποτελεί μία φθορίζουσα χρωστική με έντονο σκούρο μωβ χρώμα, εξειδικευμένη για τα νευρικά κύτταρα που έχουν πυκνό αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο. Συγκεκριμένα χρησιμοποιείται για τη σήμανση των σωματιδίων Nissl (αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο) των νευρώνων και χρησιμοποιείται με σκοπό την εκτίμηση του αριθμού και της μορφολογίας τους [Snyder και συν., 2018].

Η ένταση του χρώματος της χρωστικής υποδηλώνει ουσιαστικά την ύπαρξη των σωματιδίων Nissl. Τα σωματίδια Nissl αποτελούνται από αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και ελεύθερα ριβοσώματα και αντιπροσωπεύουν τη «μηχανή» παραγωγής πρωτεϊνών του κυττάρου. Δεδομένου ότι οι νευρώνες είναι κύτταρα με έντονη πρωτεϊνοσυνθετική ικανότητα, το κυτταρόπλασμά τους περιέχει μεγαλύτερο αριθμό σωματιδίων Nissl σε σχέση με άλλα κύτταρα. Εξαιτίας αυτής της έντονης πρωτεϊνοσυνθετικής δραστηριότητας των νευρώνων, η Cresyl Violet χρωματίζει στον εγκέφαλο εκλεκτικά το κυτταρόπλασμα των νευρώνων και όχι άλλων κυτταρικών τύπων. Το γεγονός αυτό καθιστά τη συγκεκριμένη χρώση σημαντική στη μελέτη της παθολογίας των νευρώνων και την κατανόηση της αρχιτεκτονικής των κυττάρων στις διάφορες περιοχές του εγκεφάλου. Η ορατότητα, η μορφολογία και το μέγεθος των σωματιδίων Nissl ποικίλει σημαντικά μεταξύ των νευρώνων, ανάλογα με την παθολογική κατάσταση που βρίσκεται ο νευρώνας [Brady και συν., 2004]

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες αφού αφέθηκαν λίγα λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για να ξεπαγώσουν, βυθίστηκαν αρχικά για δέκα λεπτά σε διάλυμα EtOH:CHCl₃:CH₃COOH (54,54% v/v : 36,36% v/v : 9,09% v/v) βήμα που συμβάλλει στον

καθαρισμό των ιστών. Εν συνεχεία, βυθίστηκαν σε dH₂O για τρία λεπτά, ενώ ακολούθως πραγματοποιήθηκε βύθιση για χρονικό διάστημα πέντε λεπτών σε διάλυμα Cresyl Violet (pH = 4,5) το οποίο περιείχε 0,2M οξικό νάτριο [CH₃COONa], Cresyl Violet 0,5%v/v και CH₃COOH. Έπειτα, για την ενυδάτωση των ιστών έλαβαν χώρα διαδοχικές βυθίσεις σε διάλυμα αιθανόλης (EtOH) μειούμενης συγκέντρωσης (50%, 75%, 90% & και 100%, αντίστοιχα), η διάρκεια των οποίων ήταν πέντε δευτερόλεπτα έκαστη. Ακολούθως, οι αντικειμενοφόρες πλάκες βυθίστηκαν σε διάλυμα ξυλόλης, όπου και παρέμειναν μέχρι τον επόμενο χειρισμό τους ως προς την προετοιμασία τους για παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο. Τέλος, εναποτέθηκε επαρκής ποσότητα καστορέλαιου (ιστολογικό υλικό κάλυψης¹⁴, Kannan, U., και συν., 2017, Shylaja, S., και συν., 2019), καλύφθηκαν με καλυπτρίδα, σφραγίστηκαν με βερνίκι και διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την παρατήρησή τους.

Η φωτογράφιση των τομών που υπεβλήθηκαν σε χρώση με Cresyl Violet πραγματοποιήθηκε σε στερεοσκόπιο KERN OZL - 463 (KERN & Sohn GmbH) συνδεδεμένο με κάμερα τύπου KERN ODC 832 (KERN & Sohn GmbH), ενώ η φωτογράφιση σε μεγέθυνση x10 των ίδιων τομών πραγματοποιήθηκε σε μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss Axioskop 40 (Carl Zeiss Inc, New York, USA), το οποίο ήταν συνδεδεμένο με κάμερα Leica DFC 480 (Leica Cameras, Solms, Germany).

Οι ληφθείσες φωτογραφίες επεξεργάστηκαν με τη χρήση του προγράμματος ImageJ, η χρήση του οποίου επιφέρει την αξιολόγηση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων. Συγκεκριμένα, το εν λόγω πρόγραμμα ανάλυσης παρείχε τη δυνατότητα μέτρησης της έντασης του σήματος, καθώς και το πάχος των υπό μελέτη περιοχών του εγκεφάλου στις επιλεχθείσες τομές (κάθε πειραματικής συνθήκης) σύμφωνα με την κάτωθι αναφερόμενη διαδικασία:

- ❖ Για την ανάλυση της έντασης σήματος: **[α]** ορισμός επιθυμητής μέτρησης στο παράθυρο Set Measurements (Analyze → Set Measurements) και ενεργοποίηση των επιλογών Area, Mean grey value, Standard deviation, Mean & Max grey value, Display Label και Add to overlay, **[β]** ενεργοποίηση του διαχειριστή ενδιαφέροντος ROI Manager (Analyze → Tools → ROI Manager), **[γ]** επιλογή της επιθυμητής προς μέτρηση περιοχής με το εργαλείο πολυγωνικής επιλογής (Polygonal selection), **[δ]** ονομασία της περιοχής ενδιαφέροντος (Ctrl+y ή Edit → Selection → Properties), **[ε]** προσθήκη της περιοχής ενδιαφέροντος στο ROI Manager (Ctrl+t ή Add [t] στο

¹⁴ Γενικά, ένα ιστολογικό υλικό κάλυψης πρέπει να είναι άχρωμο, διάφανο, άνυδρο, να έχει διαθλαστικό δείκτη όσο το δυνατόν πλησιέστερο σε αυτόν του γυαλιού -δηλαδή περίπου 1,5-, να διεισδύει και να καλύπτει τα διάκενα του ιστού, να μην επιτρέπει στη χρωστική να διαχέεται ή να συρρικνώνεται, να μην επιδρά αρνητικά στα κυτταρικά συστατικά του ιστού, να μην επιτρέπει την ανάπτυξη μικροοργανισμών, να προστατεύει την τομή από φυσική φθορά και χημικές αντιδράσεις. Το καστορέλαιο επιλέχτηκε γιατί είναι άχρωμο, κολλώδες έλαιο με εξαιρετική ικανότητα διατήρησης των ιστών, έχει δείκτη διάθλασης 1.477-1.481 που προσεγγίζει αυτόν του γυαλιού, με αποτέλεσμα να προσφέρει υψηλής καθαρότητας εικόνες.

παράθυρο του ROI Manager), [στ] αποθήκευση εικόνας υπό μορφή tiff (File → Save as tiff), [ζ] μεταφορά πίνακα αποτελεσμάτων σε άλλο στατιστικό πρόγραμμα με την επιλογή όλων των μετρήσεων που υπάρχουν στο ROI Manager (Ctrl+a → Ctrl+m), η] αποθήκευση του πρόσθετου επίπεδου (Image → Overlay → From ROI Manager). Με τον τρόπο αυτό υφίσταται η δυνατότητα ανοίγματος της φωτογραφίας με πρόσθετο επίπεδο το περιεχόμενο του ROI Manager πατώντας Image → Overlay → To ROI Manager.

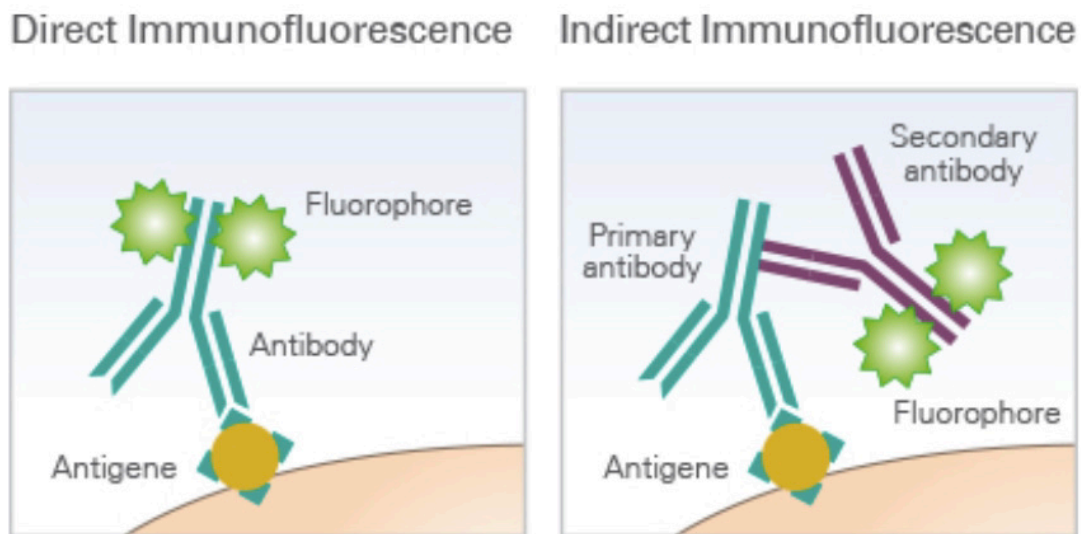
- ❖ Για τη μέτρηση απόστασης: [α] ορισμός επιθυμητής μέτρησης στο παράθυρο Set Measurements (Analyze → Set Measurements) κρατώντας ως επιλεγμένες μόνο τις ρυθμίσεις Display Label και Add to overlay, [β] ενεργοποίηση του διαχειριστή ενδιαφέροντος ROI Manager (Analyze → Tools → ROI Manager), [γ] επιλογή της επιθυμητής προς μέτρηση περιοχής με το εργαλείο ευθείας γραμμής (Straight), [δ] ονομασία της περιοχής ενδιαφέροντος (Ctrl+y ή Edit → Selection → Properties), [ε] προσθήκη της περιοχής ενδιαφέροντος στο ROI Manager (Ctrl+t ή Add [t] στο παράθυρο του ROI Manager), [στ] αποθήκευση εικόνας υπό μορφή tiff (File → Save as tiff), [ζ] μεταφορά πίνακα αποτελεσμάτων σε άλλο στατιστικό πρόγραμμα με την επιλογή όλων των μετρήσεων που υπάρχουν στο ROI Manager (Ctrl+a → Ctrl+m), η] αποθήκευση του πρόσθετου επίπεδου (Image → Overlay → From ROI Manager). Με τον τρόπο αυτό υφίσταται η δυνατότητα ανοίγματος της φωτογραφίας με πρόσθετο επίπεδο το περιεχόμενο του ROI Manager πατώντας Image → Overlay → To ROI Manager

Σε κάθε φωτογραφία ορίζεται και προστίθεται η κλίμακα από το μικροσκόπιο και το φακό με τα οποία έχουν τραβηχτεί οι προς ανάλυση φωτογραφίες, με την κάτωθι διαδικασία: [α] φωτογράφιση κλίμακας στο χρησιμοποιούμενο μικροσκόπιο και φακό, [β] άνοιγμα της φωτογραφίας στο πρόγραμμα, [γ] τοποθέτηση μίας ευθείας γραμμής με το εργαλείο ευθείας γραμμής (Straight) πάνω στην κλίμακα, [δ] εισαγωγή αποτελέσματος στο παράθυρο ορισμού κλίμακας - Set Scale (Analyze → Set Scale) και συμπλήρωση στοιχείων μετρηθείσας απόστασης (Known Distance) και μονάδας μέτρησης (Unit of Length) στο ίδιο παράθυρο, [ε] προαιρετική τοποθέτηση κλίμακας στη φωτογραφία (Analyze → Tools → Scale bar).

Ανοσοφθορισμός και φωτογράφιση τομών

Ο ανοσοφθορισμός αποτελεί μία σημαντική τεχνική ανοσοχημείας, η οποία επιτρέπει την ανίχνευση και οπτικοποίηση μίας μεγάλης ποικιλίας αντιγόνων σε διαφορετικούς τύπους ιστών και κυττάρων. Είναι μία τεχνική που παρέχει τη δυνατότητα οπτικοποίησης πολλαπλών αντιγόνων ταυτόχρονα, γεγονός που οφείλεται σε συνδυασμούς ειδικών αντισωμάτων συζευγμένων με διαφορετικά χρωμοφόρα, τα οποία δεν αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους και εκπέμπουν έπειτα από φωτοδιέγερση.

Η διαδικασία του ανοσοφθορισμού δύναται να λάβει χώρα με δύο τρόπους: [**α**] τον άμεσο και [**β**] τον έμμεσο τρόπο. Η άμεση μέθοδος επιτυγχάνεται με τη χρήση μόνο του πρώτου αντισώματος, ενώ η έμμεση μέθοδος απαιτεί τη χρήση και δεύτερου αντισώματος. Πιο συγκεκριμένα, στην άμεση μέθοδο το πρώτο αντίσωμα, στο οποίο είναι συνδεδεμένο σημασμένο με χρωμοφόρο - φθορίζουσα ουσία, αλληλεπιδρά άμεσα με το αντιγόνο - στόχο, ενώ αντίθετα στην έμμεση μέθοδο το δεύτερο αντίσωμα, στο οποίο είναι συνδεδεμένο σημασμένο με χρωμοφόρο - φθορίζουσα ουσία, αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο πρώτου αντισώματος αντιγόνου - στόχου [**Εικόνα 43**]. Επισημαίνεται ότι το πρώτο αντίσωμα ορίζεται ως το πλέον κατάλληλο όταν προέρχεται από διαφορετικό ζώο - ξενιστή από αυτό του δείγματος, έτσι ώστε το δεύτερο αντίσωμα να μην αλληλεπιδρά με ενδογενείς ανοσοσφαιρίνες του δείγματος.



Εικόνα 43: «Άμεσος και έμμεσος ανοσοφθορισμός» [The Principle of Immunofluorescence Assays]

Η πειραματική διαδικασία της παρούσας εργασίας περιλάμβανε την έμμεση μέθοδο ανοσοφθορισμού σε τομές εγκεφάλου 10μm και πιο συγκεκριμένα σε τομές που αντιστοιχούν στο επίπεδο του έσω προμετωπιαίου φλοιού (*medial Prefrontal Cortex*), του απιοειδούς φλοιού (*Piriform Cortex*), του δευτερεύοντος σωματοαισθητικού φλοιού (*Secondary Somatosensory Cortex*), του ενδορινικού φλοιού (*Entorhinal Cortex*) και του μεσολοβίου (*Corpus Callosum*).

Η διαδικασία εκκίνησε με την παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος 0,1M TBS (*Tris Buffer Saline*), το οποίο αποτελείται από 0.1M Trisma Base και 0,9% NaCl και το οποίο τιτλοποιείται με HCl ώστε να έχει pH=7,4. Αφού επιλέχθηκε ο επιθυμητός αριθμός αντικειμενοφόρων πλακών, αυτές τοποθετήθηκαν με κατάλληλη φορά -ο ιστός με φορά προς τα πάνω-, σημάνθηκε περιμετρικά με μαρκαδόρο η περιοχή πέριξ των τομών στο κάτω μέρος, ενώ με οδηγό το περίγραμμα περάστηκε στο επάνω μέρος ένα ικανοποιητικό στρώμα βερνικιού, ώστε να δημιουργηθεί ένας «φραγμός». Αφότου το βερνίκι στέγνωσε και έγινε έλεγχος ως προς απουσία υγρασίας στο κάτω μέρος της αντικειμενοφόρου πλάκας -φαινόμενο το οποίο προκαλείται λόγω της διαφοράς

θερμοκρασίας κατά τη μεταφορά από την ψύξη στη θερμοκρασία δωματίου-ακολούθησαν δύο διαδοχικές πλύσεις με διάλυμα 0,1M TBS για χρονικό διάστημα 10min έκαστη.

Προκειμένου να επιτευχθεί η σήμανση της πρωτεΐνης - στόχου και η αποφυγή μη ειδικής χρώσης, είναι απαραίτητη η επώαση με διάλυμα 3,3% Normal Serum - NS (εν προκειμένου χρησιμοποιήθηκε φυσιολογικός ορός γαϊδουριού - *Normal Serum Donkey*) που αποτελεί τον ορό του ζώου από το οποίο προέρχονται τα δεύτερα αντισώματα -με τον τρόπο αυτό καλύπτονται όλες οι περιοχές του ιστού, κάλυψη η οποία εξασθενεί με την προσθήκη αντισώματος μόνο στις περιοχές που το αντίσωμα συναντήσει το υπόστρωμά του λόγω ισχυρής σύνδεσης. Για το σκοπό αυτό, αφού ελέγχθηκε ότι απομακρύνθηκε όλη η ποσότητα TBS από τη δεύτερη πλύση, προστέθηκαν 150μl NS (διαλυμένα σε 0.1M TBS) σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα και ακολούθησε επώαση για χρονικό διάστημα 30min. Στη συνέχεια και με το πέρας των 30min ακολούθησαν τρεις διαδοχικές πλύσεις των αντικειμενοφόρων πλακών με το ρυθμιστικό διάλυμα TBS, όπου η διάρκεια της κάθε μίας ήταν 5min.

Αφού ολοκληρώθηκαν οι πλύσεις, παρασκευάστηκε το διάλυμα του 1^{ου} αντισώματος, ήτοι το Antibody 1 Solution (*Ab-1 S*), διάλυμα 0,1M TBS το οποίο περιέχει 0,5% NDS και 0,3% Triton X-100. Το Triton X-100 είναι ένα απορρυπαντικό το οποίο καθιστά τις μεμβράνες των κυττάρων διαπερατές και κατ' επέκταση εύκολα προσβάσιμο το εσωτερικό αυτών σε μικρά μόρια -η χρήση του σε υψηλές συγκεντρώσεις αλλοιώνει τη μορφολογία του ιστού. Ακολούθως οι τομές επώαστηκαν με το 1^ο αντίσωμα για χρονικό διάστημα 16-18h (*overnight*) σε θερμοκρασία δωματίου.

Η δεύτερη ημέρα διεξαγωγής της πειραματικής διαδικασίας εκκίνησε με τρεις διαδοχικές πλύσεις των τομών με το ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M TBS, όπου η διάρκεια της κάθε μίας ήταν 5min. Έπειτα για χρονικό διάστημα 1,5h και σε θερμοκρασία δωματίου πραγματοποιήθηκε επώαση των τομών με φθορίζον δεύτερο αντίσωμα σε συνθήκες σκότους. Με το πέρας της εν λόγω επώασης ακολούθησαν τρεις διαδοχικές πλύσεις των τομών με 0,1M TBS, η κάθε μία από τις οποίες διήρκεσε 5min. Τέλος, οι τομές καλύφθηκαν με υλικό κάλυψης Vectashield mounting medium που περιέχει τη χρωστική 4',6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόνη (*4',6-diamidino-2-phenylindole - DAPI*), η οποία βάφει τους πυρήνες των κυττάρων, καθώς αναγνωρίζει το δινοκλεοτίδιο αδερίνη - θυμίνη (AT) του δίκλωνου DNA. Μετά την κάλυψή τους οι αντικειμενοφόρες πλάκες αποθηκεύτηκαν στους 4°C (*ψυχρός θάλαμος*) μέχρι την παρατήρησή τους στο μικροσκόπιο φθορισμού.

Πίνακας 1: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν

1^ο Αντίσωμα	Μονοκλωνικό αντίσωμα ανεπτυγμένο σε ποντίκι ενάντια στην πρωτεΐνη Iba1 (<i>Ionized calcium-binding adapter molecule 1</i>) – MABN923 anti-Iba1, Sigma-Aldrich σε συγκέντρωση 1:250.
2^ο Αντίσωμα	Πολυκλωνικό αντίσωμα κασίικας έναντι των IgG (H+L) ανοσοσφαιρινών ποντικού συζευγμένο με κόκκινη φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 594 (<i>Cell Signaling 8890s</i>) σε συγκέντρωση 1:200.

Η φωτογράφιση των τομών που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαδικασία του ανοσοφθορισμού πραγματοποιήθηκε σε μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss Axiokor 40 (*Carl Zeiss Inc, New York, USA*), το οποίο ήταν συνδεδεμένο με κάμερα Leica DFC 480 (*Leica Cameras, Solms, Germany*).

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ ΓΙΑ ΔΙΕΝΕΡΓΕΙΑ DOT PLOT

ι] Διαδικασία απομόνωσης εγκεφαλικού ιστού

Πριν την έναρξη της διαδικασίας τα πειραματόζωα μεταφέρθηκαν σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο όπου παρέμειναν για χρονικό διάστημα ικανό ώστε να επιτευχθεί η προσαρμογή τους στο νέο περιβάλλον προς αποφυγή πρόκλησης στρες προτού λάβει χώρα η αναισθησία τους. Για τη διευκόλυνση του χειρισμού τους (*αποφυγή πιθανής αντίδρασης*) τοποθετήθηκαν διαδοχικά σε γυάλινη γυάλα, εντός της οποίας τοποθετήθηκε εμποτισμένο με αιθέρα βαμβάκι, το οποίο βοήθησε στην πρόκληση ζάλης/αναισθησίας. Αφού το πειραματόζωο αναισθητοποιήθηκε, τοποθετήθηκε το κεφάλι του στη λαιμητόμο [Εικόνα 44] και με μία απότομη κίνηση η λαβή ωθήθηκε προς τα κάτω.



Εικόνα 44: «Διαδικασία θυσίας πειραματόζωου με τη βοήθεια λαιμητόμου»

Αφού επήλθε ο ακαριαίος θάνατος του πειραματόζωου, με τη βοήθεια ενός ψαλιδιού αποκόπηκε το δέρμα του στην περιοχή της τομής και απομονώθηκε το κεφάλι. Όλες οι διαδικασίες που ακολουθήθηκαν για την αφαίρεση του εγκεφαλικού ιστού έγιναν σε πάγο (η διαδικασία αφαίρεσης του εγκεφαλικού ιστού είναι η ίδια με αυτή που περιγράφηκε ανωτέρω). Αφού εξήχθη ο εγκέφαλος, απομονώθηκαν οι υπό μελέτη εγκεφαλικές περιοχές, οι οποίες τοποθετήθηκαν σε κατάλληλα eppendorfs που φυλάχθηκαν στους -85°C.

Ομογενοποίηση ιστών και εκχύλιση κυτταρικών πρωτεϊνών

Οι ιστοί τοποθετήθηκαν σε eppendorf με 500μl διαλύματος λύσης κυττάρων (*lysis buffer*) [20mM Tris-Cl pH=8, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 100μg/ml PMSF, 1mM DTT, 1mM Na₃VO₄, 10mM β-glycerolphosphate] και ομογενοποιήθηκαν με μηχανικό ομογενοποιητή Reidorph Silent Crusher S. . Κατόπιν ακολούθησε επώαση για 10min σε πάγο, και φυγοκέντρηση στις 10.000g στροφές σε φυγόκεντρο Heraeus Biofuge Fresco για 5min στους 4°C. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης το υπερκείμενο φυλάχθηκε στους -20 °C μέχρι τη διεξαγωγή του πειράματος. Από το εν λόγω υπερκείμενο 5μl χρησιμοποιήθηκαν για μέτρηση ολικής πρωτεΐνης στα δείγματα, ενώ 150μl αυτού χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση για τη διεξαγωγή της διαδικασίας ανοσοαποτύπωσης κηλίδας (*dot plot*).

Μέτρηση συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης

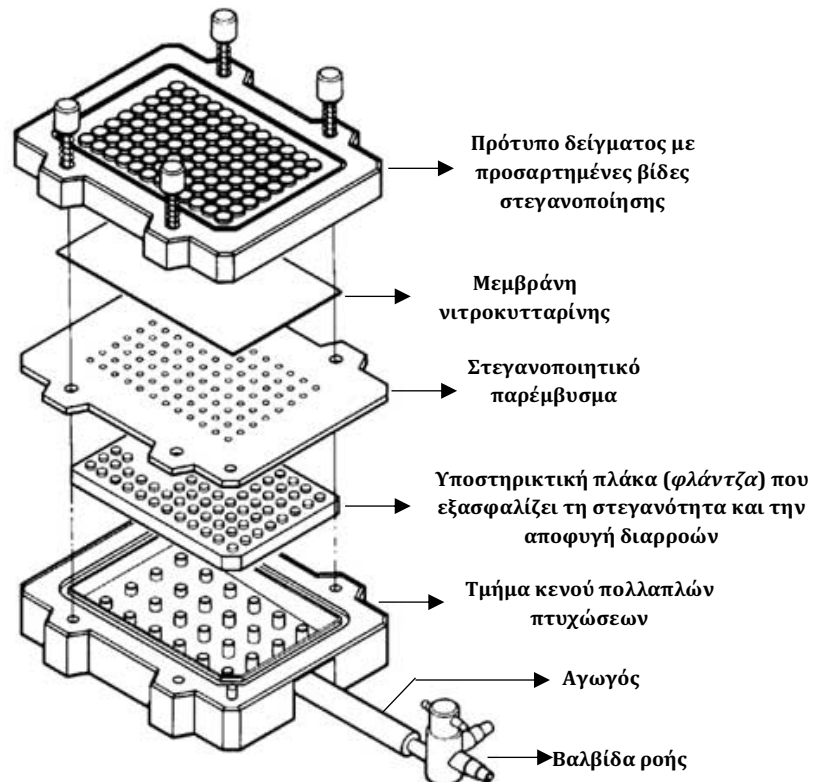
Η μέτρηση της ποσότητας της ολικής πρωτεΐνης ενός δείγματος έγινε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Bradford. Το αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε στη μέθοδο αυτή περιείχε τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G250 σε διάλυμα φωσφορικού οξέος και μεθανόλης (*BioRad*). Η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G250 δημιουργεί σύμπλοκα με πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον. Αυτή η δημιουργία συμπλόκων μεταβάλλει το μέγιστο απορρόφησης της χρωστικής από τα 465nm στα 595nm. Τα 5μl από το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης του πρωτεϊνικού λύματος αναμίχθηκαν με 795μl νερό και 200μl από το αντιδραστήριο και η απορρόφηση του σχηματιζόμενου συμπλόκου μετρήθηκε σε φωτόμετρο στα 630nm. Οι τιμές απορρόφησης από το φωτόμετρο μετατράπηκαν σε συγκέντρωση πρωτεΐνης του δείγματος με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης αναφοράς με αλβουμίνη (BSA). Η ολική πρωτεΐνη που υπήρχε σε κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της ποσότητας κυτταρικού εκχυλίσματος που έπρεπε να χρησιμοποιηθεί για τη διαδικασία dot plot προκειμένου να υπάρχει αρκετή πρωτεΐνη.

Διαδικασία ανοσοαποτύπωσης κηλίδας (*Dot Plot*)

Το ανοσοαποτύπωμα κηλίδας είναι μία τεχνική που αντικαθιστά, εν προκειμένου, το Western Blot. Στο ανοσοαποτύπωμα κηλίδας τα προς ανίχνευση βιομόρια (*πρωτεΐνες*) δε διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση αλλά αντίθετα, ποσότητα ενός μείγματος βιομορίων (*που πιθανόν περιέχει το επιθυμητό προς ανίχνευση μόριο*) εφαρμόζεται απευθείας πάνω στη μεμβράνη και προσροφάται σε αυτή σχηματίζοντας μία κηλίδα. Ακολούθως, εφαρμόζεται το πρωτόκολλο ανίχνευσης με αντισώματα, όπως στο κλασσικό Western Blot. Η εν λόγω τεχνική προσφέρει σημαντική οικονομία χρόνου, καθώς δεν απαιτούνται τα στάδια της ηλεκτροφόρησης και της μεταφοράς. Χρησιμοποιείται για να επιβεβαιωθεί ή όχι η παρουσία μίας πρωτεΐνης σε ένα μείγμα

πρωτεϊνών, ενώ δε δίνει καμία πληροφορία για τα μεγέθη των μορίων και τις διαφορετικές ισομορφές, καθώς όλα βρίσκονται στην ίδια κηλίδα.

Η πειραματική διαδικασία ξεκίνησε με την προετοιμασία της συσκευής. Για το σκοπό αυτό η συσκευή διαβράχθηκε με απιονισμένο νερό, με απώτερο σκοπό την απόκτηση της επιθυμητής υγρασίας. Ακολούθως, κόπηκε η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης στις απαιτούμενες διαστάσεις (εν προκειμένω 11,5*8 εκατοστά) και εμβαπτίστηκε για χρονικό διάστημα 20-30min σε διάλυμα 0,1M TBS (pH=7,4). Σημειώνεται ότι ο πάγκος εργασίας, καθώς και όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την κοπή της εν λόγω μεμβράνης απολυμάνθηκαν με αιθανόλη προς αποφυγή επιμολύνσεων. Κοντά στη λήξη του προαναφερόμενου χρονικού διαστήματος συναρμολογήσαμε τη συσκευή, τοποθετώντας τα τμήματα αυτής όπως αναλυτικά απεικονίζονται στην **Εικόνα 45**.



Εικόνα 45: «Σχηματική απεικόνιση τοποθέτησης της συσκευής για την τεχνική Dot Plot»
[από το εγχειρίδιο Bio-Dot Microinfiltration Apparatus της Bio-Rad]

Μετά την τοποθέτηση της μεμβράνης, πραγματοποιήθηκε έλεγχος σωστής εφαρμογής της (αποφυγή ύπαρξης φυσαλίδων), τοποθέτηση των λοιπών τμημάτων της συσκευής, ένωσή της με μία γυάλινη φιάλη παγίδευσης (waste trap set up) και κατ' επέκταση με την αντλία κενού. Αφού επιτεύχθηκε η εν λόγω σύνδεση, η βαλβίδα ροής τοποθετήθηκε στην ένδειξη που αντιστοιχεί στην έκθεσή της με το κενό προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια του διαλύματος 0,1M TBS και για να επιτευχθεί όσο το δυνατόν μεγαλύτερη στεγανοποίηση εφαρμόζοντας μεγαλύτερη πίεση στις βαλβίδες της συσκευής. Κατόπιν, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης εκτέθηκε στον αέρα με την αντλία να τοποθετείται στην αντίστοιχη ένδειξη, ενυδατώθηκε δύο φορές εκ νέου με την προσθήκη ικανής ποσότητας (100μl) διαλύματος 0,1M TBS, η περίσσεια του οποίου

απομακρυνόταν διαδοχικά με την τοποθέτηση της αντλίας στην κατάλληλη ένδειξη (έκθεση στο κενό) και το άνοιγμα της αντλίας κενού.

Εν συνεχεία, ακολούθησε η προσθήκη των δειγμάτων στις προκαθορισμένες θέσεις (εν προκειμένω η διάταξη τοποθέτησης φαίνεται στην **Εικόνα 46**). Με το πέρας της εν λόγω προσθήκης η μεμβράνη αφέθηκε προκειμένου να επιτευχθεί η προσρόφηση των πρωτεϊνών σε αυτή. Όλοι οι προαναφερόμενοι χειρισμοί τελέστηκαν καθόσον η βαλβίδα ροής ήταν εκτεθειμένη στον αέρα και όχι στο κενό. Αφού πραγματοποιήθηκε η επιθυμητή προσρόφηση, ακολούθησαν τρεις διαδοχικές πλύσεις της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με διάλυμα 0,1M TBS και εν συνεχεία η απομάκρυνσή της από τη συσκευή και η τοποθέτησή της σε χρωστική roseau για χρονικό διάστημα περίπου 5min υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου, για έναν πρώτο οπτικό έλεγχο της διαδικασίας προσρόφησης. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν πλύσεις υπό ανάδευση με διάλυμα 0,1M TBS μέχρι την πλήρη απομάκρυνση της χρωστικής.

Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες καθηλωμένες στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης δρουν ως αντιγόνα και μπορούν να συνδεθούν ειδικά με κατάλληλα αντισώματα, τα οποία είναι ειδικά για τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες. Η σύνδεση αντιγόνου – αντισώματος μπορεί να ανιχνευτεί με την προσθήκη ενός δεύτερου αντισώματος, το οποίο αναγνωρίζει και συνδέεται με της ανοσοσφαιρίνης IgG του πρώτου και παράλληλα είναι συζευγμένο με ένα ένζυμο δείκτη. Το ένζυμο αυτό αντιδρά με υπόστρωμα που προστίθεται εξωγενώς και ελκύει φωταύγεια ή δίνει χαρακτηριστική αντίδραση χρώματος.

Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με τις καθηλωμένες πρωτεΐνες αρχικά επώαστηκε με διάλυμα blocking (5% BSA σε TBS-Tween) για χρονικό διάστημα 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Η εν λόγω επώαση στοχεύει στον κορεσμό των θέσεων δέσμησης των πρωτεϊνών της μεμβράνης από τις πρωτεΐνες του γάλακτος. Με τη δέσμηση αυτή αποφεύγεται οποιαδήποτε μη ειδική σύνδεση του αντισώματος που προστίθεται μετέπειτα στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Με το πέρας της εν λόγω επώασης πραγματοποιήθηκαν δύο διαδοχικές πλύσεις με διάλυμα 0,1M TBS – 0,05% Tween 20 για χρονικό διάστημα 10min, έκαστη, υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Οι εν λόγω πλύσεις στοχεύουν στην απομάκρυνση της περίσσειας του διαλύματος κορεσμού.

Αφού ολοκληρώθηκαν οι πλύσεις, παρασκευάστηκε το διάλυμα του 1^{ου} αντισώματος, ήτοι το Antibody 1 Solution (Ab-1 S), διάλυμα 0,1% BSA σε TBS-Tween, το οποίο προστέθηκε στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης για να ακολουθήσει επώαση για χρονικό διάστημα 16-18h (*overnight*) υπό ανάδευση στους 4°C (*ψυχρός θάλαμος*).

Η δεύτερη ημέρα διεξαγωγής της πειραματικής διαδικασίας εκκίνησε με τρεις διαδοχικές πλύσεις της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης υπό ανάδευση με διάλυμα 0,1M TBS – 0,05% Tween 20, όπου η διάρκεια της κάθε μίας ήταν 5min. Έπειτα για χρονικό

διάστημα 1h και σε θερμοκρασία δωματίου πραγματοποιήθηκε επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με το δεύτερο αντίσωμα. Με το πέρας της εν λόγω επώασης ακολούθησαν τρεις διαδοχικές πλύσεις της μεμβράνης υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου ως εξής: [α] η πρώτη με διάλυμα 0,1M TBS – 0,05% Tween 20 για χρονικό διάστημα 15min, [β] η δεύτερη με διάλυμα 0,1M TBS – 0,05% Tween 20 για χρονικό διάστημα 5min και [γ] η πρώτη με διάλυμα 0,1M TBS για χρονικό διάστημα 5min.

Το τελικό στάδιο της ανοσοαποτύπωσης των πρωτεϊνών είναι ο εντοπισμός των πρωτεϊνών πάνω στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με χημειοφωταύγεια. Για το σκοπό αυτό η μεμβράνη επώαστηκε με διάλυμα 10ml λουμινόλης, που περιείχε 10μl 3% H₂O₂ και 100μl κουμαρικού οξέος (6,8mM σε DMSO) για 1min σε θερμοκρασία δωματίου και σε συνθήκες σκότους. Τέλος, ακολούθησε έκθεση της μεμβράνης σε μηχανήμα Unitec Cambridge.

	TNFα		IL-1β		Iba-1		BSA					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ctrl_38	Ctrl_38	Ctrl_38	Ctrl_38	Ctrl_38	Ctrl_38	1,25	1,25	TBS	TBS	TBS	TBS
B	Ctrl_39	Ctrl_39	Ctrl_39	Ctrl_39	Ctrl_39	Ctrl_39	2,50	2,50	TBS	TBS	TBS	TBS
C	Ctrl_40	Ctrl_40	Ctrl_40	Ctrl_40	Ctrl_40	Ctrl_40	5,00	5,00	TBS	TBS	TBS	TBS
D	Ctrl_41	Ctrl_41	Ctrl_41	Ctrl_41	Ctrl_41	Ctrl_41	10,00	10,00	TBS	TBS	TBS	TBS
E	FAS_1	FAS_1	FAS_1	FAS_1	FAS_1	FAS_1	20,00	20,00	TBS	TBS	TBS	TBS
F	FAS_2R	FAS_2R	FAS_2R	FAS_2R	FAS_2R	FAS_2R	30,00	30,00	TBS	TBS	TBS	TBS
G	FAS_4R	FAS_4R	FAS_4R	FAS_4R	FAS_4R	FAS_4R	TBS	TBS	TBS	TBS	TBS	TBS
H	FAS_34	FAS_34	FAS_34	FAS_34	FAS_34	FAS_34	TBS	TBS	TBS	TBS	TBS	TBS

Εικόνα 46¹⁵: «Σχηματική απεικόνιση τοποθέτησης των δειγμάτων στη συσκευή για το Dot Plot»
όπου **Ctrl**: Control – ζώα ελέγχου, **FAS**: Fetal Alcohol Syndrome – ζώα που εκτέθηκαν στην αιθανόλη

Πίνακας 2: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν

1^ο Αντίσωμα	Μονοκλωνικό αντίσωμα ανεπτυγμένο σε ποντίκι ενάντια στην πρωτεΐνη Iba1 (<i>Ionized calcium-binding adapter molecule 1</i>) – MABN923 anti-Iba1, Sigma-Aldrich σε συγκέντρωση 1:250. Μονοκλωνικό αντίσωμα ανεπτυγμένο σε ποντίκι ενάντια στην πρωτεΐνη TNF-α (<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>) – (52B83): sc-52746 anti-TNF-α, Santa Cruz Biotechnology σε συγκέντρωση 1:1000. Μονοκλωνικό αντίσωμα ανεπτυγμένο σε ποντίκι ενάντια στην πρωτεΐνη IL-1β (<i>Interleukin 1β</i>) – (11E5): sc-52012 anti-IL-1β, Santa Cruz Biotechnology σε συγκέντρωση 1:1000.
2^ο Αντίσωμα	Πολυκλωνικό αντίσωμα κατσίκας έναντι των IgG (H+L) ανοσοσφαιρινών ποντικού συζευγμένο με κόκκινη φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 594 (<i>Cell Signaling 8890s</i>) σε συγκέντρωση 1:200.

Οι ληφθείσες φωτογραφίες επεξεργάστηκαν με τη χρήση του προγράμματος ImageJ, η χρήση του οποίου αποσκοπεί στη σύγκριση των πρωτεϊνικών επιπέδων των αποτελεσμάτων. Συγκεκριμένα, στη φάση αυτή έλαβε χώρα ποσοτικοποίηση των επιθυμητών πρωτεϊνών στις δύο υπό μελέτη συνθήκες (*Control* και *FAS*) σύμφωνα με

¹⁵ Γίνεται μνεία ότι οι χειρισμοί επί της μεμβράνης έγιναν τμηματικά, ήτοι κόπηκε σε τρία τμήματα που αντιστοιχούν στην κάθε πρωτεΐνη με το τρίτο τμήμα να περιλαμβάνει και την BSA, για το οποίο εφαρμόστηκαν τα ίδια βήματα που αναλυτικά περιγράφονται.

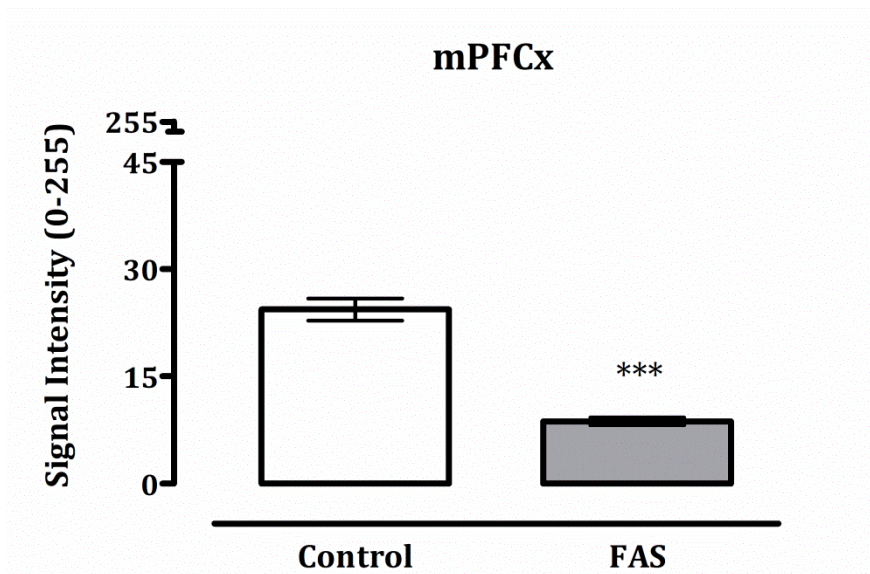
την ακόλουθη αναφερόμενη διαδικασία: **[α]** ευθυγράμμιση της ληφθείσας εικόνας στο παράθυρο Transform (*Image* → *Transform* → *Rotate* → *Preview*) και προσαρμογή έτσι ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή ευθυγράμμιση, **[β]** εισαγωγή ίσου μεγέθους ορθογώνιων πλαισίων, καθένα από τα οποία εμπεριέχει το σύνολο των κατακόρυφων κηλίδων ανά στήλη, μέσω της επιλογής του εργαλείου ορθογώνιου πλαισίου (*Rectangle* και *Ctrl+1* για οριστικοποίηση σχήματος, *Ctrl+2* για προσθήκη πλαισίων στο σύνολο των κάθετων στηλών), **[γ]** εμφάνιση του σχήματος που αντιστοιχεί στην πραγματοποιηθείσα μέτρηση (*Ctrl+3*), **[δ]** επιλογή του εργαλείου ευθείας γραμμής (*Straight*) για «κλείσιμο» των κορυφών που απεικονίζονται στο σχήμα, **[ε]** επιλογή του εργαλείου της ράβδου (*Wand*) προκειμένου να γίνει η διαδοχική επιλογή των κλειστών πλέον κορυφών, **[ζ]** προσθήκη μετρήσεων σε υπολογιστικό φύλλο (*excel*), επεξεργασία των αποτελεσμάτων και δημιουργία διαγράμματος [αν οι κορυφές που εμφανίζονται στο σχήμα εμφανιστούν με φορά προς τα κάτω, η αλλαγή της φοράς είναι αναγκαία (*Analyze* → *Gels* → *Gel Analyzer Options* → *Invert Peaks*)].

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Επίδραση της έκθεσης στην αλκοόλη στον έσω προμετωπιαίο φλοιό επίμυος

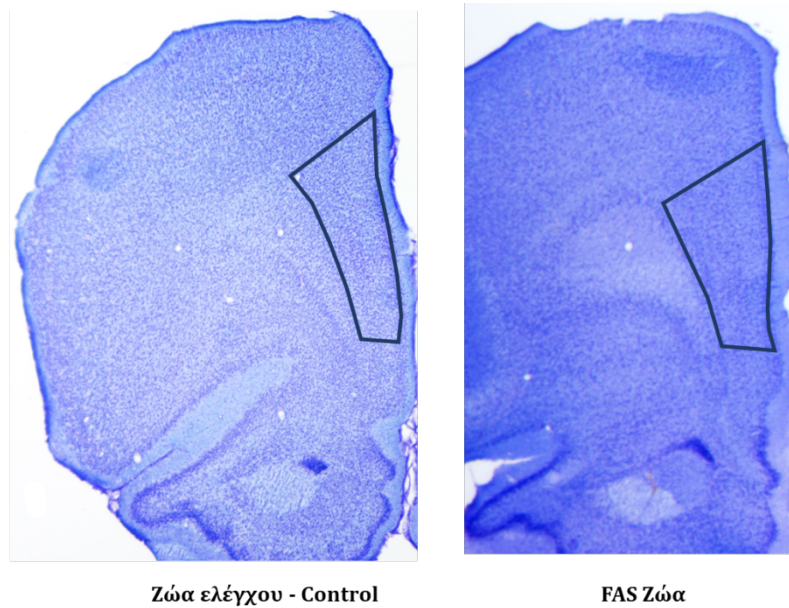
ι] Χρώση σωματιδίων Nissl

Στα ζώα ελέγχου (*Control - Ctr*) η ένταση σήματος των σωματιδίων Nissl μετά από χρώση τους με τη χρωστική Cressyl Violet στον έσω προμετωπιαίο φλοιό επίμυος (*mPFCx, medial Prefrontal Cortex*) ήταν κατά μέσο όρο $24,35 \pm 1,5$ ενώ στα ζώα που εκτέθηκαν στην αιθανόλη (*FAS*), τόσο κατά την εμβρυική ανάπτυξή τους, όσο και για χρονικό δύο εβδομάδων μετά τη γέννησή τους ήταν κατά μέσο όρο $2,07 \pm 0,53$ [κλίμακα έντασης σήματος 256 σημείων (0-255), $n=4$ ζώα σε κάθε συνθήκη, 5-12 τομές/ζώο]. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια του προγράμματος Prism και της στατιστικής δοκιμής t-test έδειξε στατιστικώς σημαντική μείωση ($p_{value} < 0,001$) της έντασης του σήματος των σωματιδίων Nissl στον έσω προμετωπιαίο φλοιό των *FAS* ζώων συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου [Εικόνα 47].



Εικόνα 47: «Ένταση σήματος των σωματιδίων Nissl του έσω προμετωπιαίου φλοιού έπειτα από χρώση Cressyl Violet [*** $p < 0,001$, $N=4$]»

Ενδεικτικό παράδειγμα χρώσης των ιστών με Cresyl Violet παρουσιάζεται στην **Εικόνα 48**.



Εικόνα 48: «Χρώση Cresyl Violet για τη σήμανση των σωματιδίων Nissl στον έσω προμετωπιαίο φλοιό σε ζώα ελέγχου (N=4) και σε FAS ζώα (N=4)»

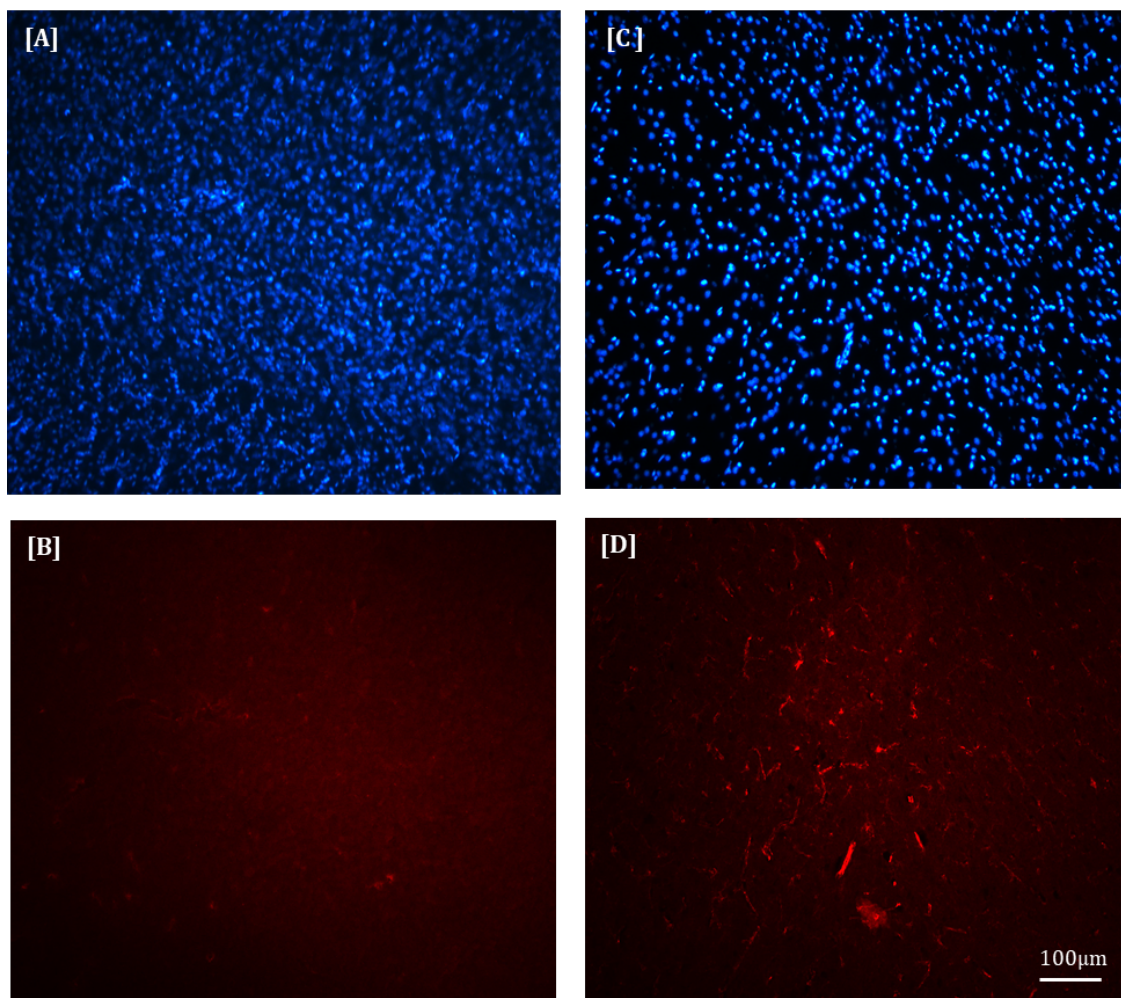
ii] Ανοσοδραστικότητα του Iba1

Προκειμένου να διακριβωθεί η παρουσία των μικρογλοιακών κυττάρων, καθώς και η μορφολογία αυτών στους υπό μελέτη ιστούς των δύο συνθηκών (*Control* και *FAS*), πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός του Iba1. Τόσο η εμφανής παρουσία αυτού του τύπου κυττάρων, όσο και η παρατήρηση της δραστηρικής τους μορφής καταδεικνύει την εκδήλωση φλεγμονώδους απόκρισης. Παράλληλα, διενεργήθηκε ιστοχημική χρώση των υπό μελέτη ιστών με τη χρωστική 4',6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόνη (4',6-diamidino-2-phenylindole - DAPI) με σκοπό να υπάρξει σχετική σύγκριση του αριθμού των κυττάρων στον έσω προμετωπιαίο φλοιό στις δύο υπό μελέτη συνθήκες.

Από την προσεκτική παρατήρηση των φωτογραφιών που ελήφθησαν από τις υπό μελέτη τομές στο πλαίσιο χρώσης αυτών με DAPI, προκύπτει μία σημαντική μείωση του αριθμού των κυττάρων στα ζώα που εκτέθηκαν στην αιθανόλη (συνθήκη *FAS* - **Εικόνα 49c**) συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου (συνθήκη *Control* - **Εικόνα 49a**). Αναφορικά με την ανοσοδραστικότητα του Iba1 αξίζει να σημειωθεί ότι αυτή είναι ιδιαίτερα αυξημένη στα ζώα *FAS* πάντα συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου, στοιχείο που υποδηλώνει φλεγμονώδη απόκριση.

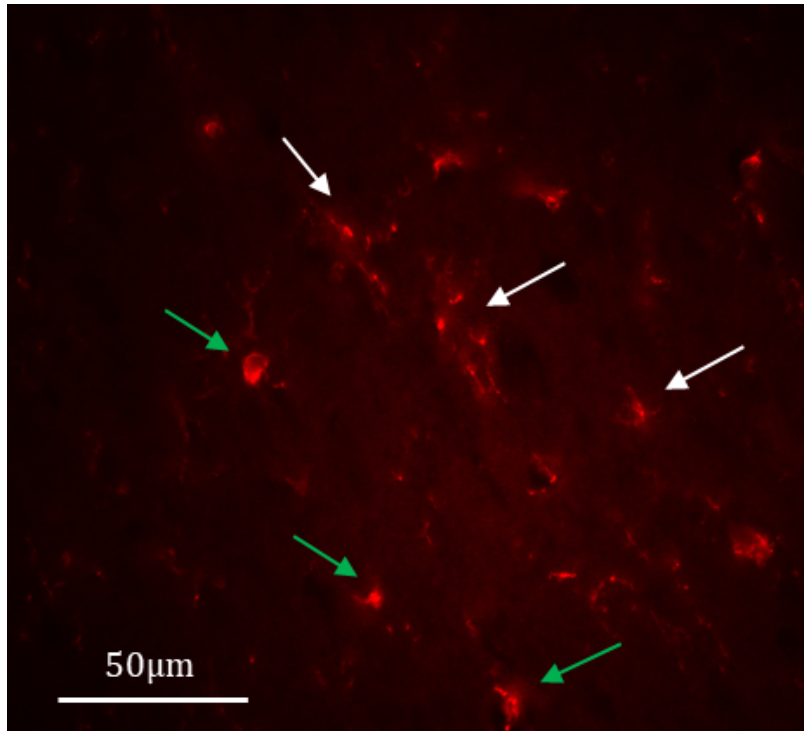
Ζώα ελέγχου - Control

FAS Ζώα



Εικόνα 49: «Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός του *Iba1* στον έσω προμετωπιαίο φλοιό στις δύο υπό μελέτη συνθήκες (Control & FAS, N=4 για κάθε ομάδα)» [A] – [C]: χρώση DAPI/μεγέθυνση x10/κλίμακα 100µm, [B] – [D]: ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός *Iba1*/μεγέθυνση x10/κλίμακα 100µm»

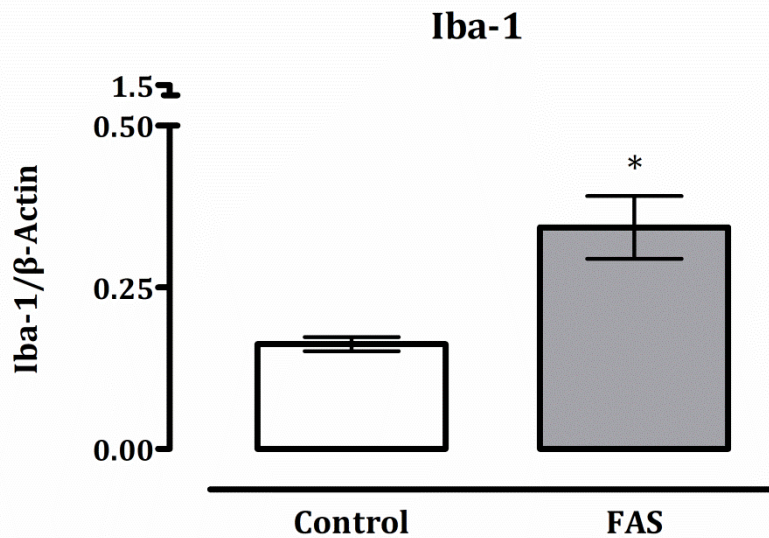
Επιπρόσθετα, σημαντικό στοιχείο που αξίζει να επισημανθεί είναι η ιδιαίτερη μορφολογία που εμφανίζουν τα εν λόγω κύτταρα. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 50** (λευκά βέλη) η μορφολογία μέρους των μικρογλοιακών παραπέμπει είτε στη μορφή «*hyper-ramified*» είτε στη μορφή «*reactive*», χαρακτηριστικό μορφολογικό στοιχείο των οποίων αποτελεί ο αυξημένος αριθμός δενδριτικών απολήξεων και η χαρακτηριστική διόγκωση των κυτταρικών τους σωμάτων. Επιπρόσθετα, ο εναπομείναν αριθμός μικρογλοιακών κυττάρων που εμφανίζονται στην ίδια εικόνα (πράσινα βέλη) αντιστοιχεί στη χαρακτηριστική μορφολογική διαμόρφωση των φαγοκυττάρων, η οποία χαρακτηρίζεται από το στρογγυλεμένο σχήμα και την απώλεια ή την παρουσία μικρού αριθμού διακλαδώσεων.



Εικόνα 50: «Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός του Iba1 στον έσω προμετωπιαίο φλοιό σε FAS επίμνες. Κλίμακα: 50μm. Μεγέθυνση: x40»
 λευκά βέλη → μορφολογία μικρογλοιακών κυττάρων που παραπέμπει είτε στη μορφή «hyper-ramified» είτε στη μορφή «reactive»
 πράσινα βέλη → μορφολογία μικρογλοιακών κυττάρων που παραπέμπει στη μορφή των φαγοκυττάρων

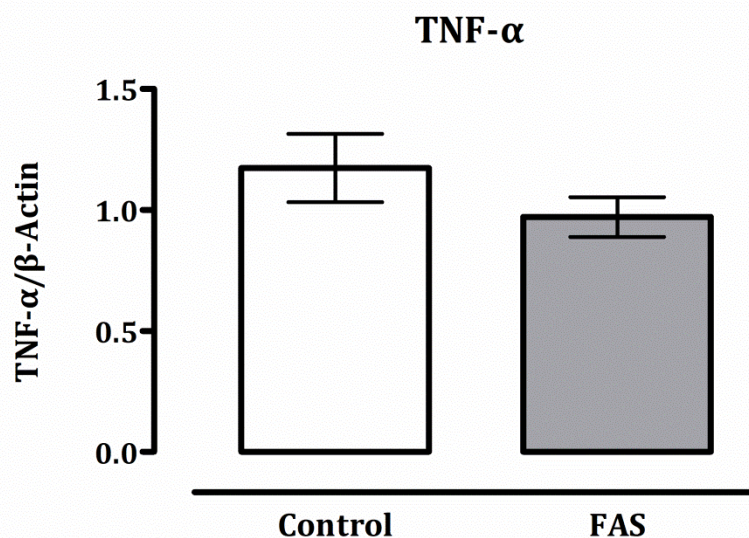
iii] Ανοσοαποτύπωση κηλίδας (*Dot Plot*) των Iba1, TNF-α και IL-1b

Πέρα από το ότι διακριβώθηκε η παρουσία και κατ' επέκταση η μορφολογία των μικρογλοιακών κυττάρων στις δύο υπό μελέτη συνθήκες (*Control* και *FAS*), μέσω του ανοσοϊστοχημικού προσδιορισμού του Iba1, θεωρήθηκε σκόπιμο να λάβει χώρα και μία σύγκριση σε πρωτεϊνικό επίπεδο του πρωτεϊνικού αυτού δείκτη φλεγμονής. Η επεξεργασία της ληφθείσας εικόνας -που αντιστοιχεί σε εκείνο το τμήμα της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης που αφορά τη μελέτη του Iba1- μέσω του προγράμματος ImageJ έδειξε ότι στα ζώα ελέγχου (*Control - Ctr*) η ένταση σήματος των κηλίδων ήταν κατά μέσο όρο $0,16 \pm 0,01$, ενώ στα ζώα που εκτέθηκαν στην αιθανόλη (*FAS*), τόσο κατά την εμβρυική ανάπτυξή τους, όσο και για χρονικό δύο εβδομάδων μετά τη γέννησή τους ήταν κατά μέσο όρο $0,34 \pm 0,04$. Ακολούθως, η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια του προγράμματος Prism και της στατιστικής δοκιμής t-test, έδειξε στατιστικώς σημαντική αύξηση ($p_{value} < 0,05$) του πρωτεϊνικού επιπέδου του Iba1 στον έσω προμετωπιαίο φλοιό των FAS ζώων συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου [Εικόνα 51].



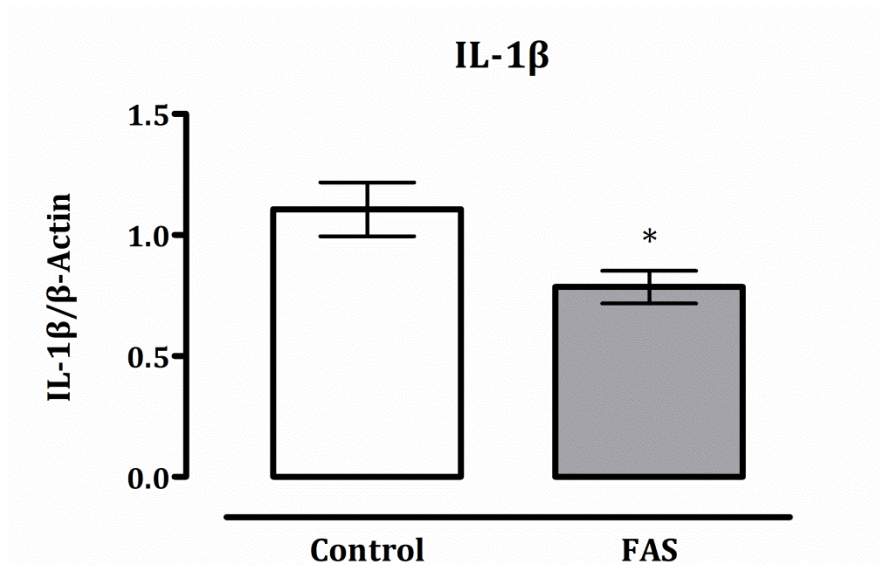
Εικόνα 51: «Ανοσοαποτύπωση κηλίδας για τον πρωτεϊνικό δείκτη Iba1 στον mPFCx [$*p < 0,05$, $N=4$]»

Στην ίδια εγκεφαλική περιοχή πραγματοποιήθηκε μελέτη των πρωτεϊνικών επιπέδων και δύο ακόμη παραγόντων φλεγμονής, ήτοι του παράγοντα νέκρωσης TNF- α και της ιντερλευκίνης IL-1 β . Πιο συγκεκριμένα, η επεξεργασία της ληφθείσας εικόνας - που αντιστοιχεί σε εκείνο το τμήμα της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης που αφορά τη μελέτη του παράγοντα TNF- α - μέσω του προγράμματος ImageJ έδειξε ότι στα ζώα ελέγχου (Control - Ctr) η ένταση σήματος των κηλίδων ήταν κατά μέσο όρο $1,17 \pm 0,14$, ενώ στα ζώα που εκτέθηκαν στην αιθανόλη (FAS), τόσο κατά την εμβρυική ανάπτυξή τους, όσο και για χρονικό δύο εβδομάδων μετά τη γέννησή τους ήταν κατά μέσο όρο $0,97 \pm 0,08$. Ακολούθως, η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια του προγράμματος Prism και της στατιστικής δοκιμής t-test, δεν έδειξε καμία στατιστικώς σημαντική αλλαγή ανάμεσα στις δύο υπό μελέτη συνθήκες, με αποτέλεσμα η μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων που παρατηρείται στην **Εικόνα 52** στα ζώα FAS να μην είναι αντιπροσωπευτική.



Εικόνα 52: «Ανοσοαποτύπωση κηλίδας για τον παράγοντα νέκρωσης TNF- α στον mPFCx [$N=4$]»

Όσον αφορά την ιντερλευκίνη 1-β (*IL-1β*) αναφέρεται ότι η επεξεργασία της ληφθείσας εικόνας -που αντιστοιχεί σε εκείνο το τμήμα της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης που αφορά τη μελέτη της *IL-1β*- μέσω του προγράμματος ImageJ έδειξε ότι στα ζώα ελέγχου (*Control - Ctr*) η ένταση σήματος των κηλίδων ήταν κατά μέσο όρο $1,10 \pm 0,11$, ενώ στα ζώα που εκτέθηκαν στην αιθανόλη (*FAS*), τόσο κατά την εμβρυική ανάπτυξή τους, όσο και για χρονικό δύο εβδομάδων μετά τη γέννησή τους ήταν κατά μέσο όρο $0,78 \pm 0,06$. Ακολούθως, η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια του προγράμματος Prism και της στατιστικής δοκιμής t-test, έδειξε μία στατιστικώς σημαντική μείωση στα ζώα *FAS*, όπως εμφανίζεται στην **Εικόνα 53**.

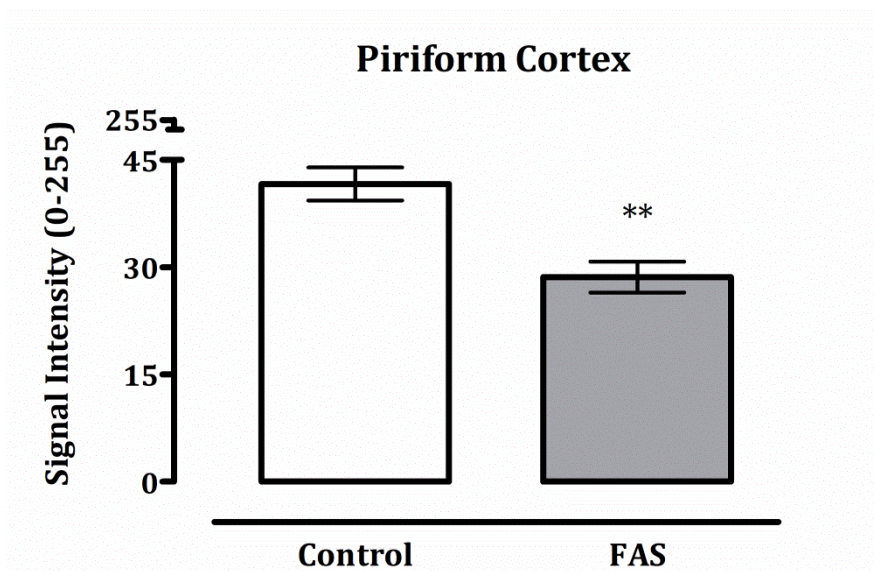


Εικόνα 53: «Ανοσοαποτύπωση κηλίδας για την *IL-1β* στον *mPFCx* [$*p < 0,05$, $N=4$]»

Επίδραση της έκθεσης στην αλκοόλη στον απιοειδή φλοιό επίμυος

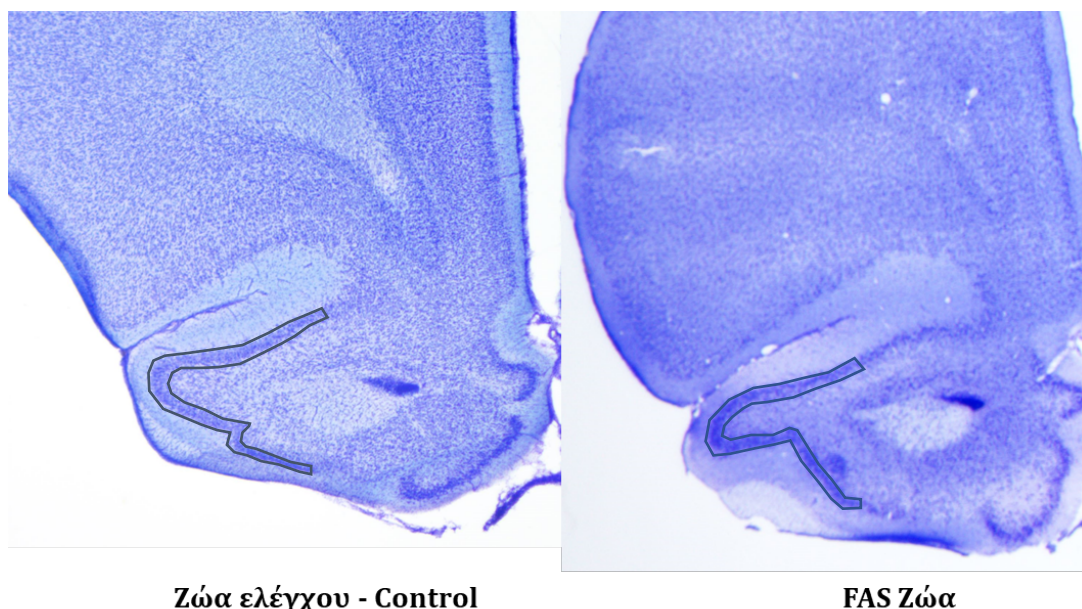
ι] Χρώση σωματιδίων Nissl

Στα ζώα ελέγχου (*Control - Ctr*) η ένταση σήματος των σωματιδίων Nissl μετά από χρώση τους με τη χρωστική Cressyl Violet στον απιοειδή φλοιό (*Piriform Cortex*) ήταν κατά μέσο όρο $41,63 \pm 2,3$, ενώ στα ζώα που εκτέθηκαν στην αιθανόλη (*FAS*), τόσο κατά την εμβρυική ανάπτυξή τους, όσο και για χρονικό δύο εβδομάδων μετά τη γέννησή τους ήταν κατά μέσο όρο $28,63 \pm 2,2$ [κλίμακα έντασης σήματος 256 σημείων (0-255), $n=4$ ζώα σε κάθε συνθήκη, 5-11 τομές/ζώο]. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια του προγράμματος Prism και της στατιστικής δοκιμής t-test έδειξε στατιστικώς σημαντική μείωση ($p_{value} < 0,01$) της έντασης του σήματος των σωματιδίων Nissl στον απιοειδή φλοιό των *FAS* ζώων συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου [**Εικόνα 54**].



Εικόνα 54: «Ένταση σήματος των σωματιδίων Nissl του απιοειδούς φλοιού έπειτα από χρώση Cressyl Violet [** $p < 0,01$, $N=4$]»

Ενδεικτικό παράδειγμα χρώσης των ιστών με Cresyl Violet παρουσιάζεται στην **Εικόνα 55**.



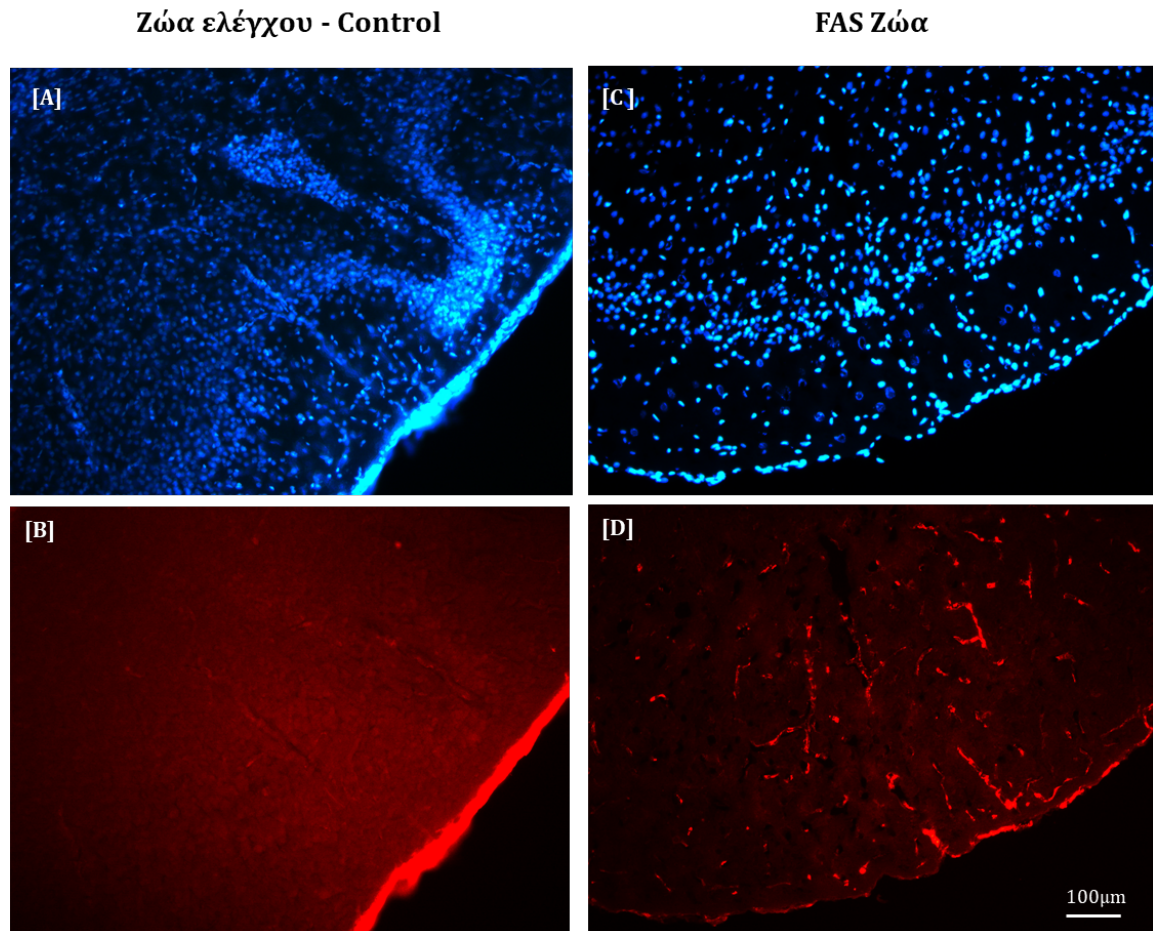
Εικόνα 55: «Χρώση Cresyl Violet για τη σήμανση των σωματιδίων Nissl στον Απιοειδή Φλοιό σε ζώα ελέγχου ($N=4$) και σε FAS ζώα ($N=4$)»

ii] Ανοσοδραστικότητα του Iba1

Προκειμένου να διακριβωθεί η παρουσία των μικρογλοιακών κυττάρων, καθώς και η μορφολογία αυτών στους υπό μελέτη ιστούς των δύο συνθηκών (*Control* και *FAS*), πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός του Iba1. Τόσο η εμφανής παρουσία αυτού του τύπου κυττάρων, όσο και η παρατήρηση της δραστηρικής τους μορφής καταδεικνύει την εκδήλωση φλεγμονώδους απόκρισης. Παράλληλα, διενεργήθηκε ιστοχημική χρώση των υπό μελέτη ιστών με τη χρωστική 4',6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόνη (4',6-diamidino-2-phenylindole - DAPI) με σκοπό να υπάρξει σχετική

σύγκριση του αριθμού των κυττάρων στο μέσο προμετωπιαίο φλοιό στις δύο υπό μελέτη συνθήκες.

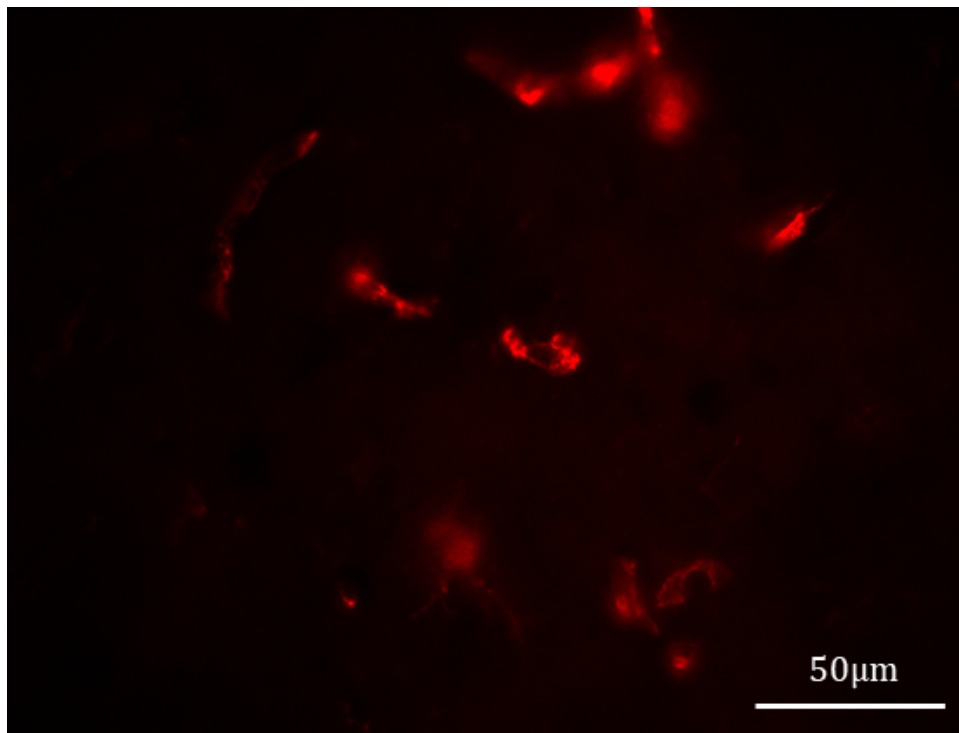
Από την προσεκτική παρατήρηση των φωτογραφιών που ελήφθησαν από τις υπό μελέτη τομές στο πλαίσιο χρώσης αυτών με DAPI, προκύπτει μία σημαντική μείωση του αριθμού των κυττάρων στα ζώα που εκτέθηκαν στην αιθανόλη (συνθήκη *FAS* – **Εικόνα 56^c**) συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου (συνθήκη *Control* – **Εικόνα 56^a**). Αναφορικά με την ανοσοδραστικότητα του *Iba1* αξίζει να σημειωθεί ότι αυτή είναι ιδιαίτερα αυξημένη στα ζώα *FAS* πάντα συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου, στοιχείο που υποδηλώνει φλεγμονώδη απόκριση.



Εικόνα 56: «Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός του *Iba1* στον απιοειδή φλοιό στις δύο υπό μελέτη συνθήκες (*Control* & *FAS*, $N=4$ για κάθε ομάδα)» [A] – [C]: χρώση DAPI/μεγέθυνση $\times 10$ /κλίμακα $100\mu\text{m}$, [B] – [D]: ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός *Iba1*/μεγέθυνση $\times 10$ /κλίμακα $100\mu\text{m}$ »

Επιπρόσθετα, σημαντικό στοιχείο που αξίζει να επισημανθεί είναι η ιδιαίτερη μορφολογία που εμφανίζουν τα εν λόγω κύτταρα. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 57** (λευκά βέλη) η μορφολογία μέρους των μικρογλοιακών παραπέμπει είτε στη μορφή «*hyper-ramified*» είτε στη μορφή «*reactive*», χαρακτηριστικό μορφολογικό στοιχείο των οποίων αποτελεί ο αυξημένος αριθμός δενδριτικών απολήξεων και η χαρακτηριστική διόγκωση των κυτταρικών τους σωμάτων. Επιπρόσθετα, ο εναπομείναν αριθμός μικρογλοιακών κυττάρων που εμφανίζονται στην ίδια εικόνα (πράσινα βέλη) αντιστοιχεί στη χαρακτηριστική μορφολογική διαμόρφωση των φαγοκυττάρων, η οποία

χαρακτηρίζεται από το στρογγυλεμένο σχήμα και την απώλεια ή την παρουσία μικρού αριθμού διακλαδώσεων.

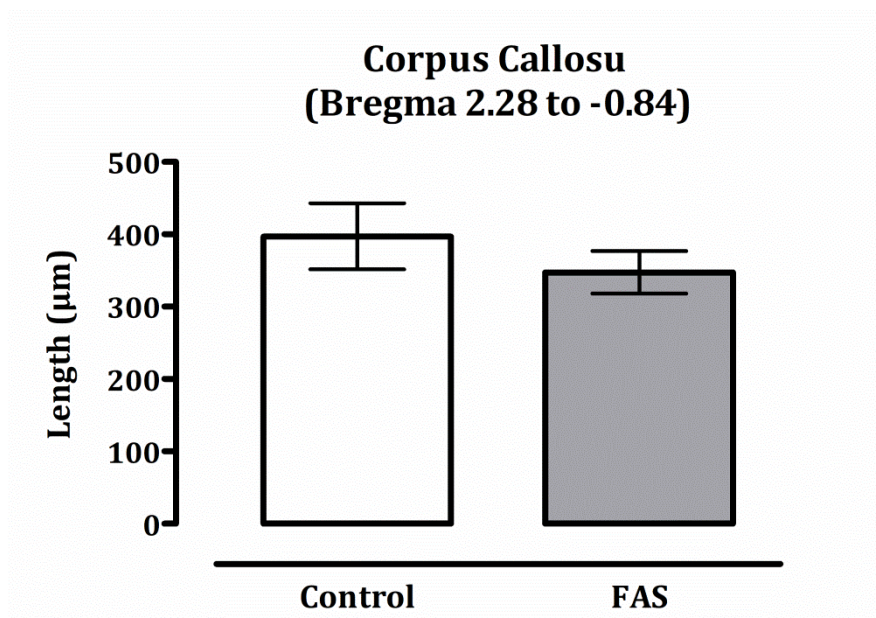


Εικόνα 57: «Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός του *Iba1* στον απιοειδή φλοιό σε FAS επίμυες. Κλίμακα: 50μm. Μεγέθυνση: x40»

Επίδραση της έκθεσης στην αλκοόλη στο μεσολόβιο επίμυος

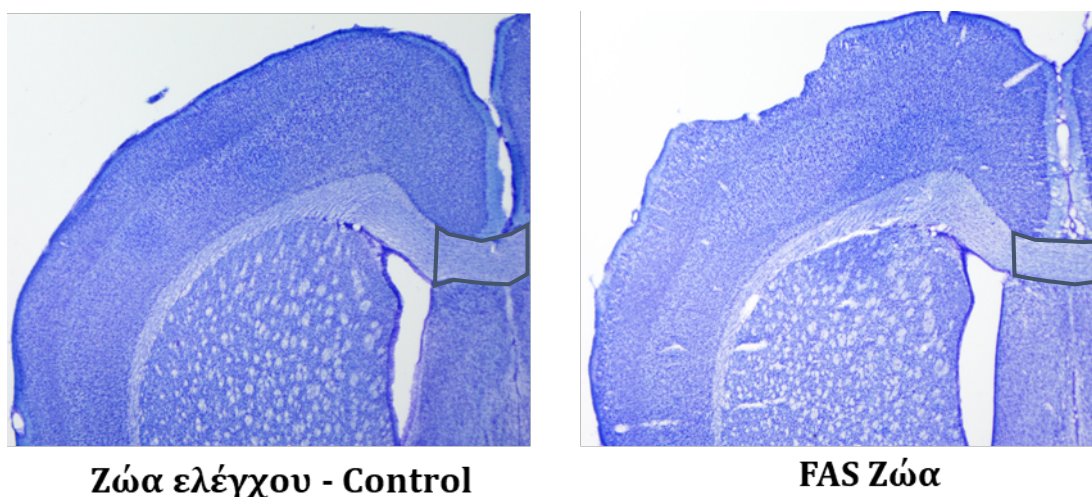
ι] Χρώση σωματιδίων Nissl

Στα ζώα ελέγχου (*Control - Ctr*) το πάχος του μεσολοβίου (*Corpus Callosum*), η μέτρηση του οποίου κατέστη εφικτή μετά τη χρώση των τομών με τη χρωστική Cresyl Violet ήταν κατά μέσο όρο $397,2 \pm 45,64$, ενώ στα ζώα που εκτέθηκαν στην αιθανόλη (*FAS*), τόσο κατά την εμβρυική ανάπτυξή τους, όσο και για χρονικό δύο εβδομάδων μετά τη γέννησή τους ήταν κατά μέσο όρο $347,6 \pm 29,31$ [κλίμακα έντασης σήματος 256 σημείων (0-255), $n=4$ ζώα σε κάθε συνθήκη, 4-7 τομές/ζώο]. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια του προγράμματος Prism και της στατιστικής δοκιμής *t-test* δεν έδειξε καμία στατιστικώς σημαντική αλλαγή στο το πάχος του μεσολοβίου στις δύο υπό μελέτη συνθήκες, δηλαδή στο μεσολόβιο των FAS ζώων και στο μεσολόβιο των ζώων ελέγχου [Εικόνα 58].



Εικόνα 58: «Μέτρηση πάχους μεσολοβίου έπειτα από χρώση *Cressyl Violet* [N=4]»

Ενδεικτικό παράδειγμα χρώσης των ιστών με *Cresyl Violet* παρουσιάζεται στην **Εικόνα 59**.

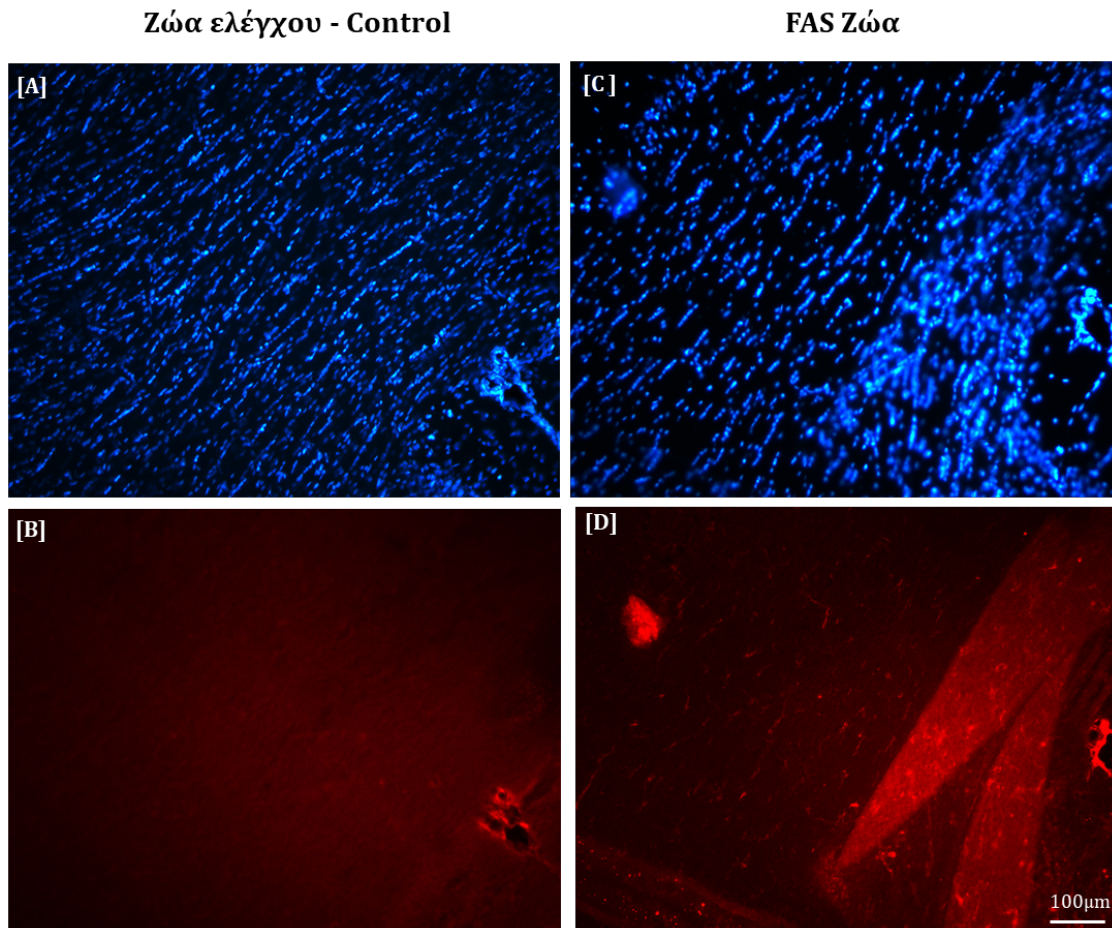


Εικόνα 59: «Χρώση *Cresyl Violet* για τη σήμανση των σωματιδίων *Nissl* στο μεσολόβιο σε ζώα ελέγχου (N=4) και σε FAS ζώα (N=4)»

ii] Ανοσοδραστικότητα του *Iba1*

Προκειμένου να διακριβωθεί η παρουσία των μικρογλοιακών κυττάρων, καθώς και η μορφολογία αυτών στους υπό μελέτη ιστούς των δύο συνθηκών (*Control* και *FAS*), πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός του *Iba1*. Τόσο η εμφανής παρουσία αυτού του τύπου κυττάρων, όσο και η παρατήρηση της δραστηρικής τους μορφής καταδεικνύει την εκδήλωση φλεγμονώδους απόκρισης. Παράλληλα, διενεργήθηκε ιστοχημική χρώση των υπό μελέτη ιστών με τη χρωστική 4',6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόνη (4',6-diamidino-2-phenylindole - *DAPI*) με σκοπό να υπάρξει σχετική σύγκριση του αριθμού των κυττάρων στο μέσο προμετωπιαίο φλοιό στις δύο υπό μελέτη συνθήκες.

Από την προσεκτική παρατήρηση των φωτογραφιών που ελήφθησαν από τις υπό μελέτη τομές στο πλαίσιο χρώσης αυτών με DAPI, προκύπτει μία μείωση του αριθμού των κυττάρων στα ζώα που εκτέθηκαν στην αιθανόλη (συνθήκη *FAS* – **Εικόνα 60^C**) συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου (συνθήκη *Control* – **Εικόνα 60^A**). Αναφορικά με την ανοσοδραστικότητα του Iba1 αξίζει να σημειωθεί ότι αυτή είναι θα λέγαμε απύσχα στα ζώα ελέγχου [**Εικόνα 60^B**], εν αντιθέσει με τα ζώα που εκτέθηκαν στην αιθανόλη, στα οποία είναι ιδιαίτερα εμφανής και έντονη [**Εικόνα 60^D**], στοιχείο που υποδηλώνει φλεγμονώδη απόκριση.

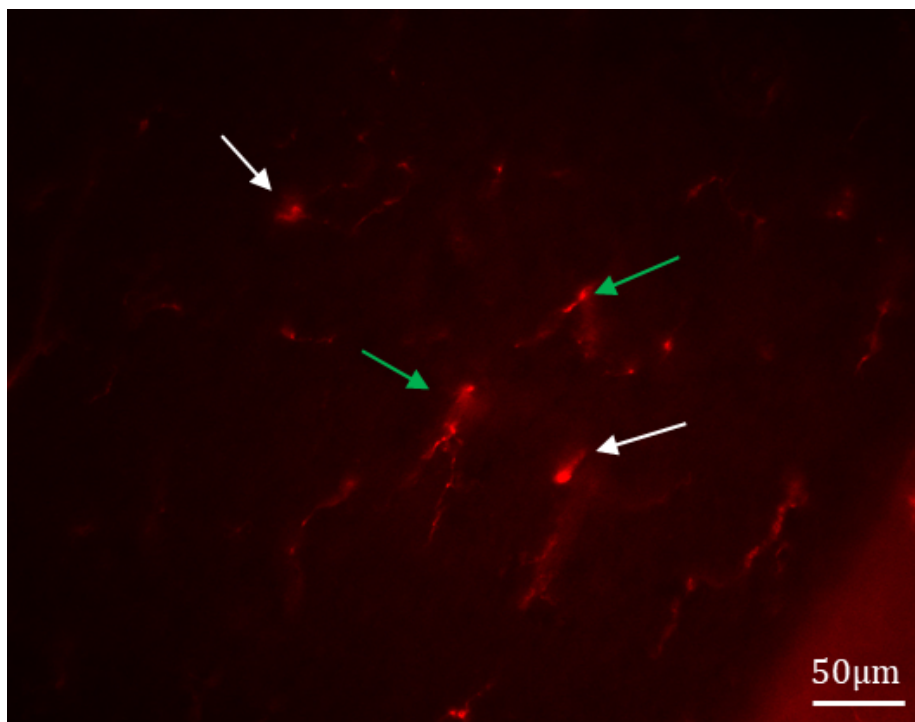


Εικόνα 60¹⁶: «Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός του Iba1 στο μεσολόβιο στις δύο υπό μελέτη συνθήκες (*Control* & *FAS*, *N*=4 για κάθε ομάδα)» [A] – [C]: χρώση DAPI/μεγέθυνση $\times 10$ /κλίμακα 100 μm , [B] – [D]: ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός Iba1/μεγέθυνση $\times 10$ /κλίμακα 100 μm »

Επιπρόσθετα, σημαντικό στοιχείο που αξίζει να επισημανθεί είναι η ιδιαίτερη μορφολογία που εμφανίζουν τα εν λόγω κύτταρα. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 61** (λευκά βέλη) η μορφολογία μέρους των μικρογλοιακών παραπέμπει είτε στη μορφή «*hyper-ramified*» είτε στη μορφή «*reactive*», χαρακτηριστικό μορφολογικό στοιχείο των οποίων αποτελεί ο αυξημένος αριθμός δενδριτικών απολήξεων και η χαρακτηριστική διόγκωση των κυτταρικών τους σωμάτων. Επιπρόσθετα, ο εναπομείναν αριθμός μικρογλοιακών κυττάρων που εμφανίζονται στην ίδια εικόνα (πράσινα βέλη) αντιστοιχεί

¹⁶ Γίνεται μνεία ότι στην εικόνα 52^D το έντονο κόκκινο σχήμα που παρατηρείται αποτελεί αναδίπλωση του ιστού, η οποία προέκυψε κατά τη διαδικασία κοπής του εγκεφαλικού ιστού σε τομές στην κρουστόμο.

στη χαρακτηριστική μορφολογική διαμόρφωση των φαγοκυττάρων, η οποία χαρακτηρίζεται από το στρογγυλεμένο σχήμα και την απώλεια ή την παρουσία μικρού αριθμού διακλαδώσεων.

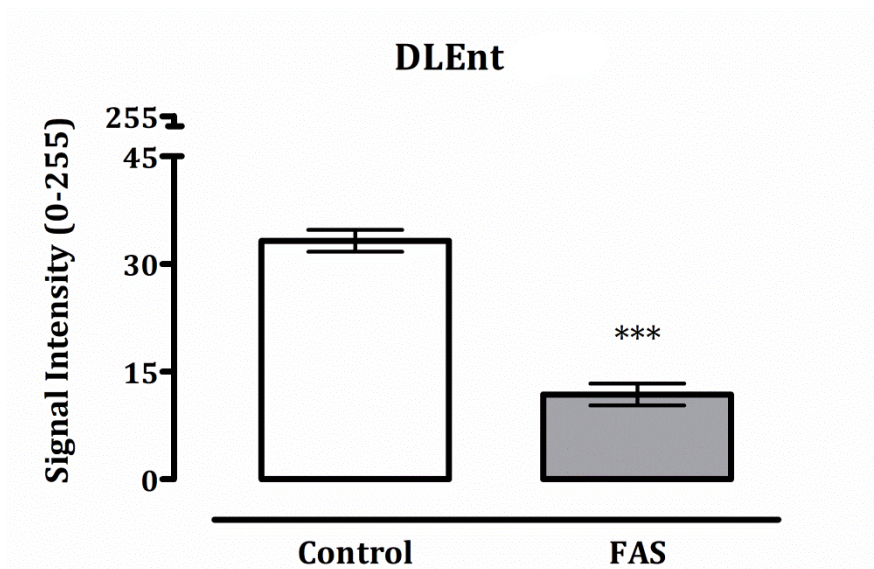


Εικόνα 61: «Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός του *Iba1* στο μεσολόβιο σε FAS επίμυες. Κλίμακα: 50μm. Μεγέθυνση: x40»

Επίδραση της έκθεσης στον ενδορινικό φλοιό επίμυος

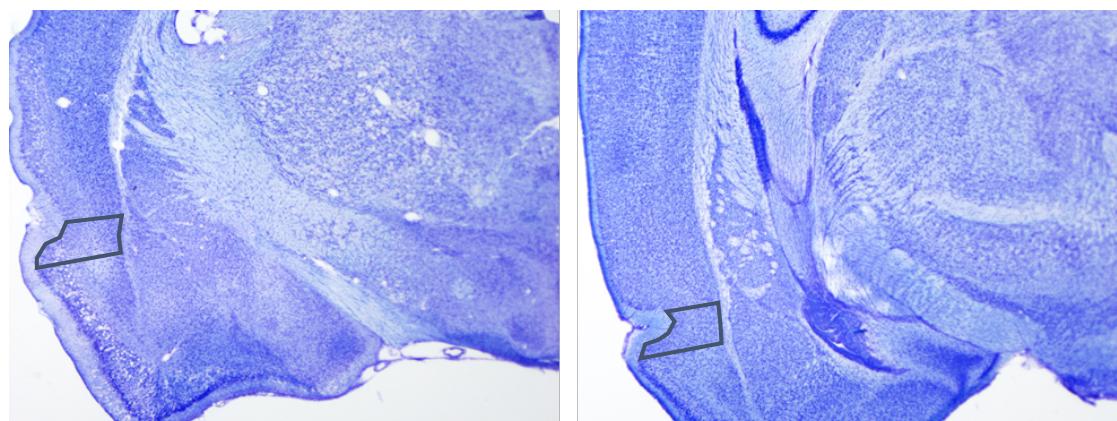
ι] Χρώση σωματιδίων Nissl

Στα ζώα ελέγχου (*Control - Ctr*) η ένταση σήματος των σωματιδίων Nissl μετά από χρώση τους με τη χρωστική Cressyl Violet στον ενδορινικό φλοιό (*Entorhinal Cortex*) ήταν κατά μέσο όρο $32,26 \pm 1,5$, ενώ στα ζώα που εκτέθηκαν στην αιθανόλη (*FAS*), τόσο κατά την εμβρυική ανάπτυξή τους, όσο και για χρονικό δύο εβδομάδων μετά τη γέννησή τους ήταν κατά μέσο όρο $11,83 \pm 1,5$ [κλίμακα έντασης σήματος 256 σημείων (0-255), $n=4$ ζώα σε κάθε συνθήκη, 4-9 τομές/ζώο]. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια του προγράμματος Prism και της στατιστικής δοκιμής t-test έδειξε στατιστικώς σημαντική μείωση ($p_{value} < 0,01$) της έντασης του σήματος των σωματιδίων Nissl στον ενδορινικό φλοιό των FAS ζώων συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου [Εικόνα 62].



Εικόνα 62: «Ένταση σήματος των σωματιδίων Nissl του ενδορινικού φλοιού έπειτα από χρώση Cressyl Violet [*** $p < 0,01$, $N=4$]»

Ενδεικτικό παράδειγμα χρώσης των ιστών με Cressyl Violet παρουσιάζεται στην **Εικόνα 63**.



Ζώα ελέγχου - Control

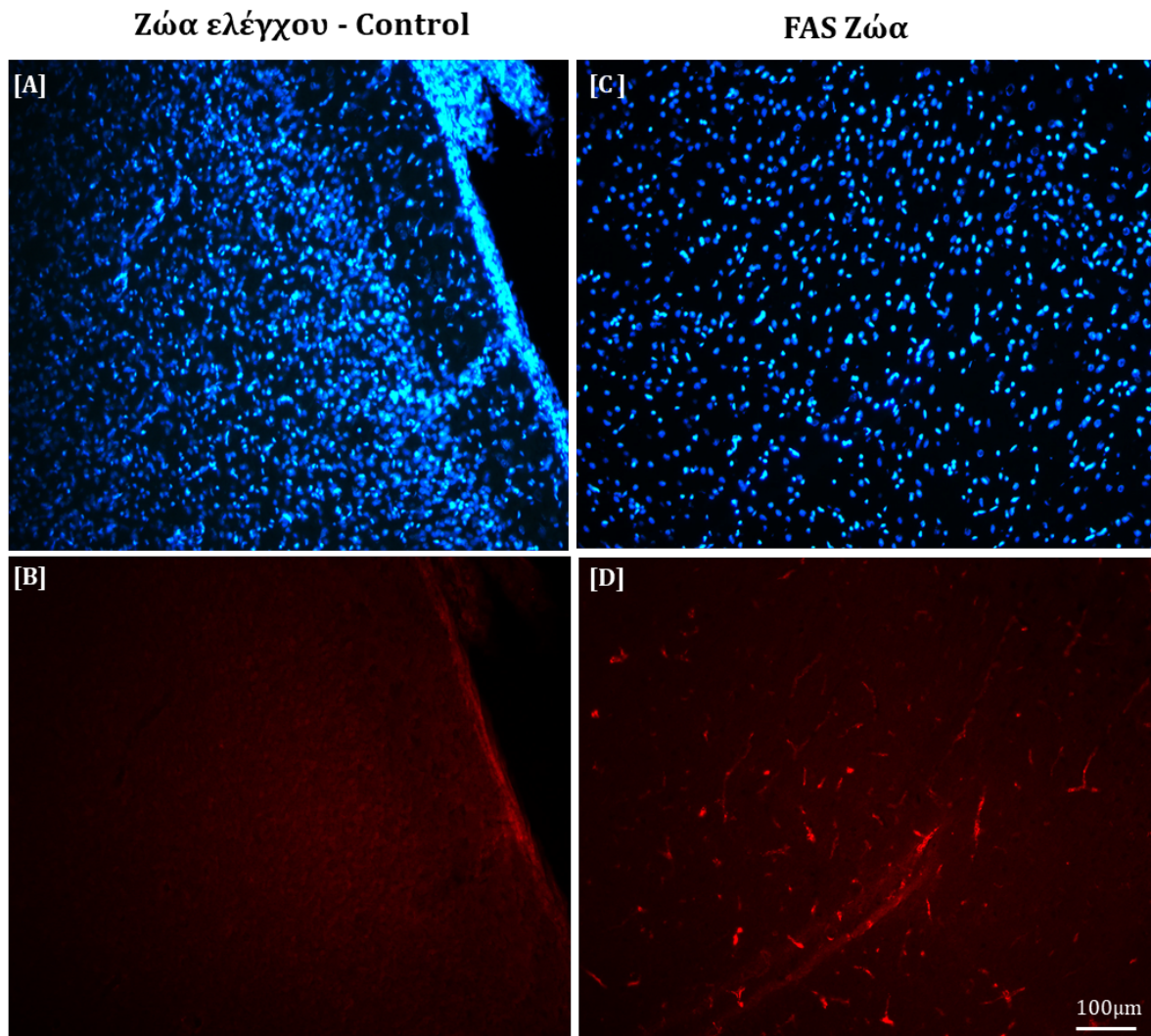
FAS Ζώα

Εικόνα 63: «Χρώση Cressyl Violet για τη σήμανση των σωματιδίων Nissl στον ενδορινικό φλοιό σε ζώα ελέγχου ($N=4$) και σε FAS ζώα ($N=4$)»

ii) Ανοσοδραστικότητα του Iba1

Προκειμένου να διακριβωθεί η παρουσία των μικρογλοιακών κυττάρων, καθώς και η μορφολογία αυτών στους υπό μελέτη ιστούς των δύο συνθηκών (*Control* και *FAS*), πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός του Iba1. Τόσο η εμφανής παρουσία αυτού του τύπου κυττάρων, όσο και η παρατήρηση της δραστηρικής τους μορφής καταδεικνύει την εκδήλωση φλεγμονώδους απόκρισης. Παράλληλα, διενεργήθηκε ιστοχημική χρώση των υπό μελέτη ιστών με τη χρωστική 4',6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόνη (4',6-diamidino-2-phenylindole - DAPI) με σκοπό να υπάρξει σχετική σύγκριση του αριθμού των κυττάρων στο μέσο προμετωπιαίο φλοιό στις δύο υπό μελέτη συνθήκες.

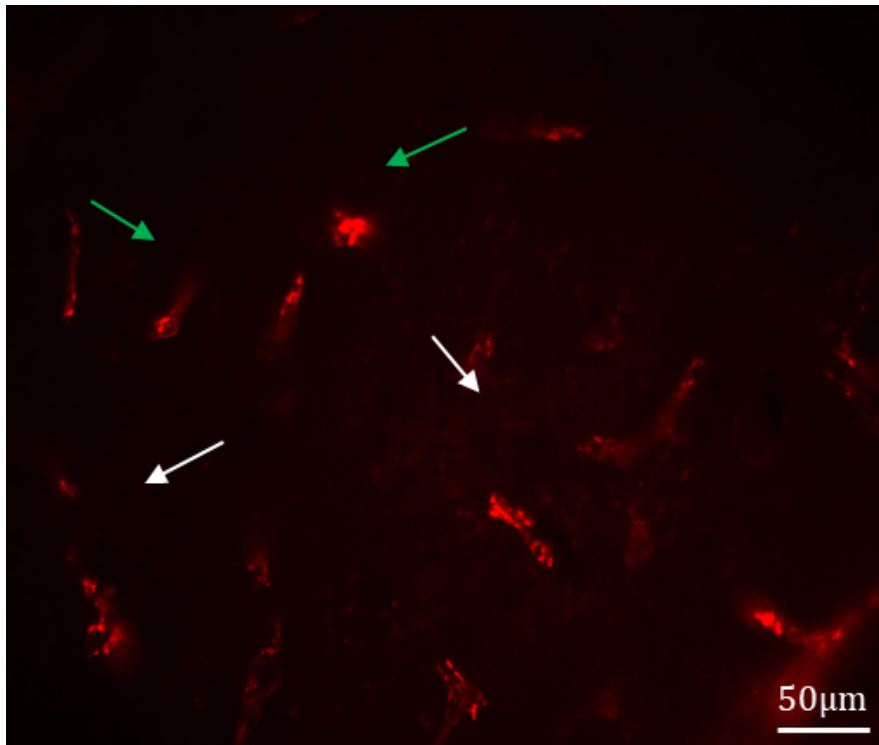
Από την προσεκτική παρατήρηση των φωτογραφιών που ελήφθησαν από τις υπό μελέτη τομές στο πλαίσιο χρώσης αυτών με DAPI, προκύπτει μία μείωση του αριθμού των κυττάρων στα ζώα που εκτέθηκαν στην αιθανόλη (συνθήκη *FAS* – **Εικόνα 64^C**) συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου (συνθήκη *Control* – **Εικόνα 64^A**). Αναφορικά με την ανοσοδραστικότητα του *Iba1* αξίζει να σημειωθεί ότι αυτή είναι θα λέγαμε απύσχα στα ζώα ελέγχου [**Εικόνα 64^B**], εν αντιθέσει με τα ζώα που εκτέθηκαν στην αιθανόλη, στα οποία είναι ιδιαίτερα εμφανής και έντονη [**Εικόνα 64^D**], στοιχείο που υποδηλώνει φλεγμονώδη απόκριση. Επιπρόσθετα, σημαντικό στοιχείο που αξίζει να επισημανθεί είναι η ιδιαίτερη μορφολογία που εμφανίζουν τα εν λόγω κύτταρα.



Εικόνα 64: «Ανοσοϊστοχημικός ετοπισμός του *Iba1* στον ενδορινικό φλοιό στις δύο υπό μελέτη συνθήκες (*Control* & *FAS*, $N=4$ για κάθε ομάδα)» **[A]** – **[C]**: χρώση *DAPI*/μεγέθυνση $\times 10$, **[B]** – **[D]**: ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός *Iba1*/μεγέθυνση $\times 10$ /κλίμακα: $100\mu\text{m}$ ».

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 65** (λευκά βέλη) η μορφολογία μέρους των μικρογλοιακών κυττάρων παραπέμπει είτε στη μορφή «*hyper-ramified*» είτε στη μορφή «*reactive*», χαρακτηριστικό μορφολογικό στοιχείο των οποίων αποτελεί ο αυξημένος αριθμός δενδριτικών απολήξεων και η χαρακτηριστική διόγκωση των κυτταρικών τους σωμάτων. Επιπρόσθετα, ο εναπομείναν αριθμός μικρογλοιακών κυττάρων που

εμφαίνονται στην ίδια εικόνα (πράσινα βέλη) αντιστοιχεί στη χαρακτηριστική μορφολογική διαμόρφωση των φαγοκυττάρων, η οποία χαρακτηρίζεται από το στρογγυλεμένο σχήμα και την απώλεια ή την παρουσία μικρού αριθμού διακλαδώσεων.

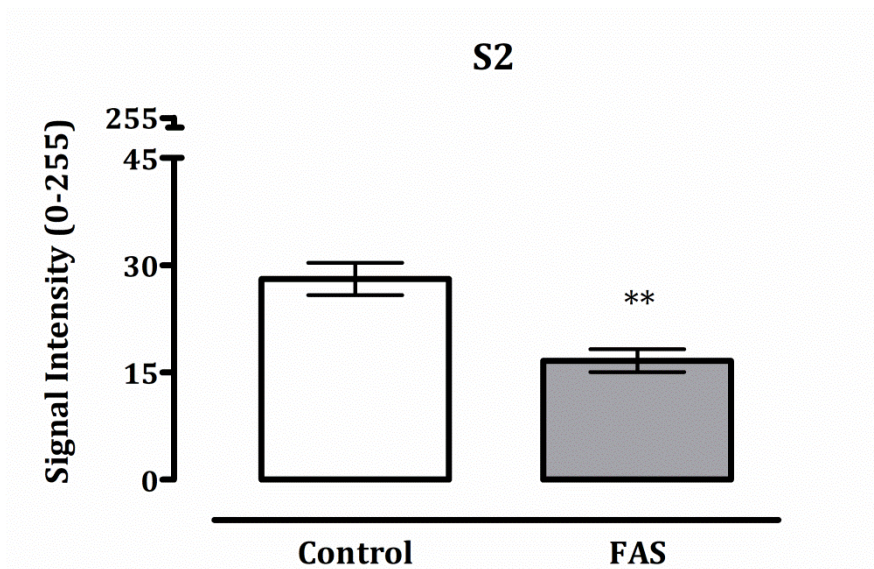


Εικόνα 65: «Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός του *Iba1* στον ενδορινικό φλοιό σε FAS επίμους. Κλίμακα: 50μm. Μμεγέθυνση: x40»

Επίδραση της έκθεσης στο δευτερεύοντα σωματοαισθητικό φλοιό επίμους

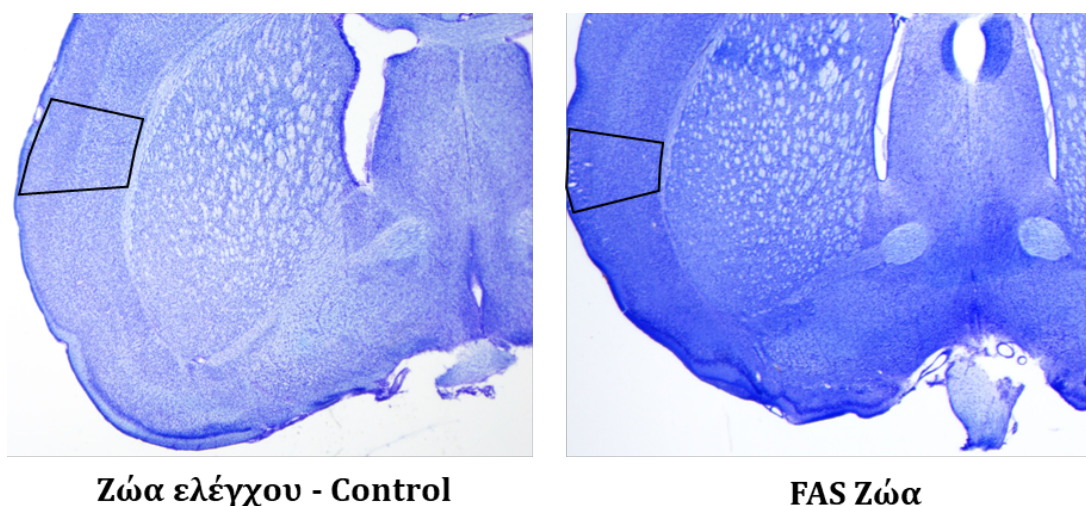
ι] Χρώση σωματιδίων Nissl

Στα ζώα ελέγχου (*Control - Ctr*) η ένταση σήματος των σωματιδίων Nissl μετά από χρώση τους με τη χρωστική Cressyl Violet στο δευτερεύοντα σωματοαισθητικό φλοιό (*S2, Secondary Somatosensory Cortex*) ήταν κατά μέσο όρο $28,09 \pm 2,2$, ενώ στα ζώα που εκτέθηκαν στην αιθανόλη (*FAS*), τόσο κατά την εμβρυική ανάπτυξή τους, όσο και για χρονικό δύο εβδομάδων μετά τη γέννησή τους ήταν κατά μέσο όρο $16,67 \pm 1,6$ [κλίμακα έντασης σήματος 256 σημείων (0-255), $n=4$ ζώα σε κάθε συνθήκη, 4-9 τομές/ζώο]. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια του προγράμματος Prism και της στατιστικής δοκιμής t-test έδειξε στατιστικώς σημαντική μείωση ($p_{value} < 0,05$) της έντασης του σήματος των σωματιδίων Nissl στο δευτερεύοντα σωματοαισθητικό φλοιό των FAS ζώων συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου [Εικόνα 66].



Εικόνα 66: «Ένταση σήματος των σωματιδίων Nissl του δευτερεύοντα σωματοαισθητικού φλοιού έπειτα από χρώση Cresyl Violet [$**p < 0,01, N=4$]»

Ενδεικτικό παράδειγμα χρώσης των ιστών με Cresyl Violet παρουσιάζεται στην **Εικόνα 67**.

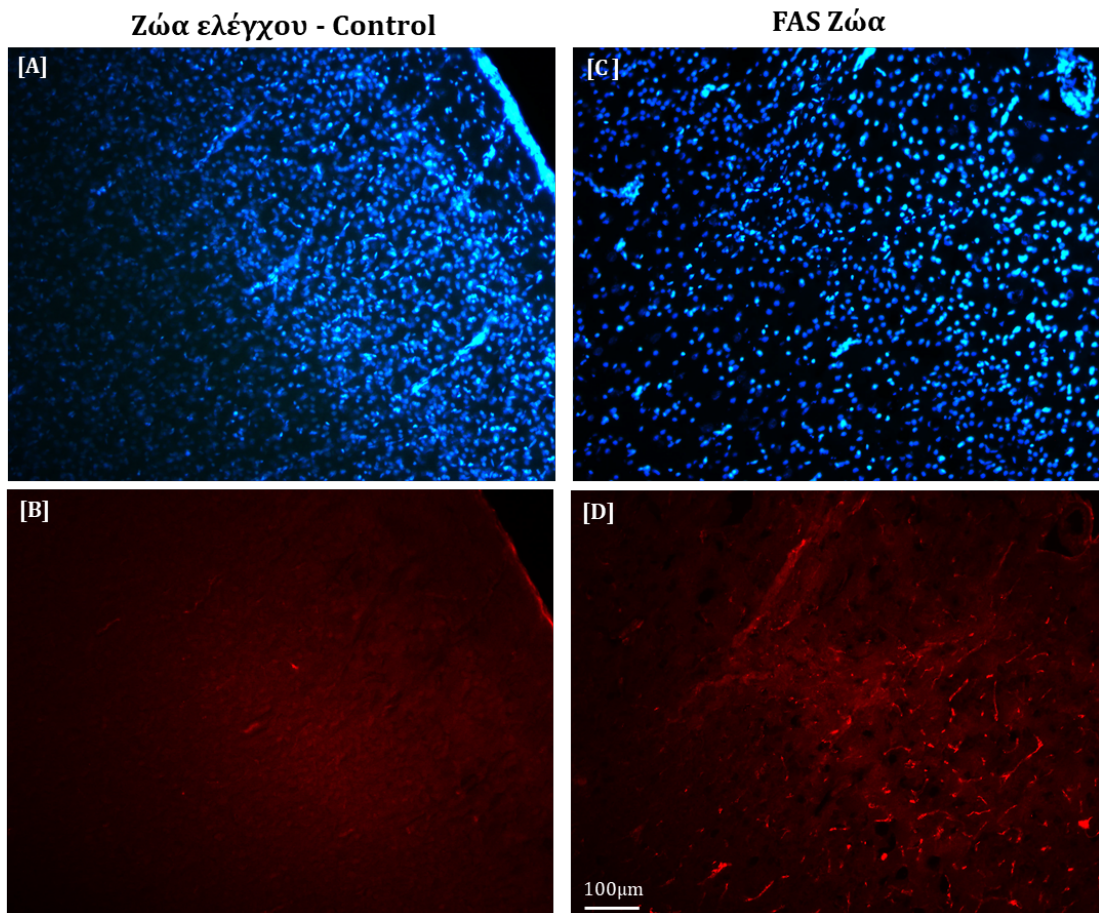


Εικόνα 67: «Χρώση Cresyl Violet για τη σήμανση των σωματιδίων Nissl στο μεσολόβιο σε ζώα ελέγχου ($N=4$) και σε FAS ζώα ($N=4$)»

ii] Ανοσοδραστικότητα του Iba1

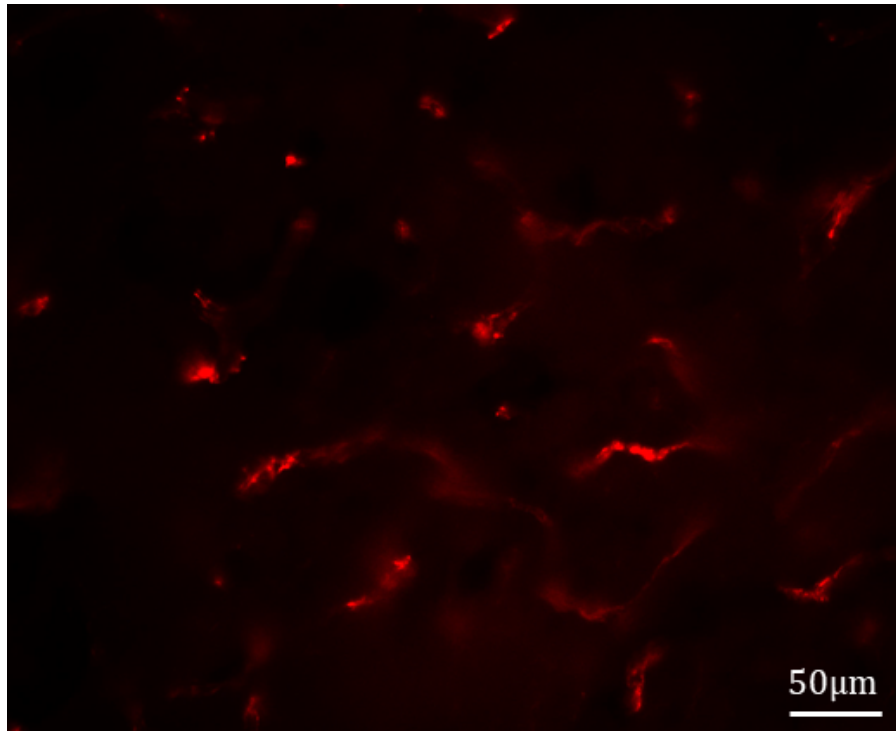
Προκειμένου να διακριβωθεί η παρουσία των μικρογλοιακών κυττάρων, καθώς και η μορφολογία αυτών στους υπό μελέτη ιστούς των δύο συνθηκών (*Control* και *FAS*), πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός του Iba1. Τόσο η εμφανής παρουσία αυτού του τύπου κυττάρων, όσο και η παρατήρηση της δραστηρικής τους μορφής καταδεικνύει την εκδήλωση φλεγμονώδους απόκρισης. Παράλληλα, διενεργήθηκε ιστοχημική χρώση των υπό μελέτη ιστών με τη χρωστική 4',6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόνη (4',6-diamidino-2-phenylindole - *DAPI*) με σκοπό να υπάρξει σχετική σύγκριση του αριθμού των κυττάρων στο μέσο προμετωπιαίο φλοιό στις δύο υπό μελέτη συνθήκες.

Από την προσεκτική παρατήρηση των φωτογραφιών που ελήφθησαν από τις υπό μελέτη τομές στο πλαίσιο χρώσης αυτών με DAPI, προκύπτει μία μείωση του αριθμού των κυττάρων στα ζώα που εκτέθηκαν στην αιθανόλη (συνθήκη *FAS* – **Εικόνα 68^ε**) συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου (συνθήκη *Control* – **Εικόνα 68^α**). Αναφορικά με την ανοσοδραστικότητα του *Iba1* αξίζει να σημειωθεί ότι αυτή είναι θα λέγαμε απύουσα στα ζώα ελέγχου [**Εικόνα 68^β**], εν αντιθέσει με τα ζώα που εκτέθηκαν στην αιθανόλη, στα οποία είναι ιδιαίτερα εμφανής και έντονη [**Εικόνα 68^δ**], στοιχείο που υποδηλώνει φλεγμονώδη απόκριση.



Εικόνα 68: «Ανοσοϊστοχημικός ετοπισμός του *Iba1* στο δευτερεύοντα σωματοαισθητικό φλοιό στις δύο υπό μελέτη συνθήκες (*Control* & *FAS*, $N=4$ για κάθε ομάδα)» [A] – [C]: χρώση DAPI/μεγέθυνση $\times 10$ /κλίμακα $100\mu\text{m}$, [B] – [D]: ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός *Iba1*/μεγέθυνση $\times 10$ /κλίμακα $100\mu\text{m}$ »

Επιπρόσθετα, σημαντικό στοιχείο που αξίζει να επισημανθεί είναι η ιδιαίτερη μορφολογία που εμφανίζουν τα εν λόγω κύτταρα. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 69** (λευκά βέλη) η μορφολογία μέρους των μικρογλοιακών παραπέμπει στη χαρακτηριστική μορφολογική διαμόρφωση των φαγοκυττάρων, η οποία χαρακτηρίζεται από το στρογγυλεμένο σχήμα και την απώλεια ή την παρουσία μικρού αριθμού διακλαδώσεων.



Εικόνα 69: «Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός του Iba1 στον έσω προμετωπιαίο φλοιό σε FAS επίμνες. Κλίμακα: 50μm. Μμεγέθυνση: x40»

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως αναλυτικά παρατέθηκε στο πρώτο μέρος της παρούσας εργασίας, το εμβρυικό αλκοολικό σύνδρομο αποτελεί πολυδιάστατο και ιδιαίτερα σύνθετο σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από αναπτυξιακές διαταραχές, κρανιοπροσωπικές δυσμορφίες, καθώς και διαταραχές του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος που αντανακλούν σε κινητικά, νοητικά και συμπεριφορικά προβλήματα. Η μελέτη των παρεκκλίσεων αυτών συμπεριφορών σε άτομα που έχουν εκτεθεί κατά τη διάρκεια της εμβρυικής τους ανάπτυξης στην αιθανόλη δύναται να επιτευχθεί με τη χρήση πειραματόζων τα οποία εκτίθενται για το αναγκαίο χρονικό διάστημα που αντιστοιχεί στην εμβρυική ανάπτυξη του ανθρώπου. Εν προκειμένω, το μοντέλο εμβρυικού αλκοολικού συνδρόμου αναπτύχθηκε σε Sprague - Dawley επίμυες στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Στην παρούσα εργασία οι υπό μελέτη εγκεφαλικές περιοχές επιλέχθηκαν με γνώμονα τη συσχέτιση που επιδεικνύουν με τις παρατηρούμενες συμπεριφορικές διαταραχές που κατά καιρούς έχουν καταγραφεί σε άτομα με το προορηθέν σύνδρομο. Συγκεκριμένα, [i] ο έσω προμετωπιαίος φλοιός που σχετίζεται με την αποθήκευση καινούριων στοιχείων, τη δυνατότητα επανεκτίμησης επιλογών και τη λήψη αποφάσεων, [ii] ο απιοειδής φλοιός που διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη συνθετική αντίληψη των οσμών, [iii] ο ενδορινικός φλοιός που ενέχεται με την ακεραιότητα της λειτουργίας της μνήμης, καθώς και σε διαδικασίες σχετιζόμενες με την απεικόνιση και τη χωροταξική διάταξη των πραγμάτων, [iv] ο δευτερεύων σωματοαισθητικός φλοιός που συμβάλει στη λήψη και επεξεργασία ποικίλων αισθητηριακών πληροφοριών και [v] το μεσολόβιο, η θέση και η ύπαρξη του οποίου χαρακτηρίζονται καίριας σημασίας για ουσιώδεις λειτουργίες, όπως η όραση και η ομιλία.

Οι παρατηρήσεις που επισημάνθηκαν στην παρούσα εργασία και σχετίζονται με τον έσω προμετωπιαίο φλοιό - mPFCx έρχονται να συμβαδίσουν με πολλές επιστημονικές μελέτες, οι οποίες εδώ και πολλά χρόνια, διεξαχθείσες σε έτερα ή ίδια στελέχη επίμυων, ανέδειξαν τις επιπτώσεις της έκθεσης στην αιθανόλη στη συγκεκριμένη εγκεφαλική περιοχή [Tang S. και συν., 2019 & Ware A.L., και συν., 2021]. Εντούτοις, από όσο γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη μελέτη στην οποία έχει εξεταστεί η μακροχρόνια επίδραση της αλκοόλης στη συγκεκριμένη περιοχή. Πιο συγκεκριμένα, η χρώση των σωματιδίων Nissl κατέδειξε μία στατιστικώς σημαντική μείωση της έντασης του σήματος στην υπό μελέτη περιοχή στα FAS ζώα συγκριτικά πάντα με τα ζώα της συνθήκης ελέγχου. Δεδομένου ότι, τα σωματίδια Nissl -τα οποία εντοπίζονται σε αφθονία στους νευρώνες συγκριτικά με έτερους κυτταρικούς τύπους- αποτελούνται από αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και ελεύθερα ριβοσώματα, αντιπροσωπεύοντας τη «μηχανή» παραγωγής πρωτεϊνών του κυττάρου, μία έντονη μείωση της έντασης του σήματός

τους υποδηλώνει μείωση της πυκνότητας των ριβοσωμάτων και του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου. Μία τέτοια σημαντική μείωση στα FAS ζώα πιθανώς να αποδίδεται στο λεγόμενο στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (*endoplasmic reticulum stress - ER Stress*)¹⁷. Μία τέτοια παθολογική κατάσταση δύναται να αποδοθεί στην έκθεση στην αιθανόλη κατά το χρονικό διάστημα της εμβρυικής ανάπτυξης, ενώ δεν αποκλείεται να σχετίζεται με τη μείωση της έντασης σήματος που παρατηρήθηκε. Αντίστοιχη στατιστικώς σημαντική μείωση της έντασης του σήματος που προέρχεται από τη χρώση των σωματιδίων Nissl παρατηρήθηκε και στις υπόλοιπες υπό μελέτη φλοιικές περιοχές, ήτοι στον απιοειδή φλοιό, στον ενδορινικό φλοιό και στο δευτερεύοντα σωματοαισθητικό φλοιό.

Στην ίδια αιτιολογική βάση *-επαγόμενο από την έκθεση στην αιθανόλη στρες ενδοπλασματικού δικτύου-* δύναται να δικαιολογηθεί και η παρατηρούμενη εμφανής μείωση του αριθμού των κυττάρων που παρατηρήθηκε στη χρώση των τομών με 4',6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόνη (*4',6-diamidino-2-phenylindole - DAPI*) που αντιστοιχούν στα FAS ζώα, συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου σε όλες τις περιοχές που μελετήθηκαν, συμπεριλαμβανομένου και του μεσολόβιου. Από την άλλη πλευρά, ως μία επιπλέον εξήγηση της μείωσης του αριθμού των κυττάρων στα FAS ζώα θα αποτελούσε και η αυξημένη παρουσία και δράση των δραστικών ριζών οξυγόνου (*Reactive Oxygen Species - ROS*), αν ληφθεί υπόψιν ότι η απρόσκοπτη λειτουργία του εγκεφάλου απαιτεί σημαντικά αυξημένα επίπεδα οξυγόνου. Η έντονη παρουσία των εν λόγω δραστικών μορφών οξυγόνου, ως απόρροια της υπέρμετρης λειτουργίας των κυττάρων της γλοίας (*αστροκυττάρων και μικρογλοιακών κυττάρων*) σε συνθήκες φλεγμονής, περιορίζουν σε μεγάλο βαθμό τα επίπεδα οξυγόνου στον εγκέφαλο που είναι απαραίτητα για την ομαλή του λειτουργία.

Επιπρόσθετα, για το σύνολο των υπό μελέτη περιοχών τονίζεται ότι παρατηρήθηκε αυξημένη ανοσοδραστικότητα της Iba1 στα FAS ζώα συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου, η οποία πιθανά σχετίζεται και με αύξηση του αριθμού των μικρογλοιακών κυττάρων σε όλες τις υπό μελέτη περιοχές. Τα παρατηρούμενα χαρακτηριστικά μορφολογικά στοιχεία των μικρογλοιακών κυττάρων στα FAS ζώα, όπως ο αυξημένος αριθμός δενδριτικών απολήξεων, η διόγκωση των κυτταρικών σωμάτων, το στρογγυλεμένο σχήμα και η απώλεια ή η παρουσία μικρού αριθμού διακλαδώσεων *-χαρακτηριστικά που διακρίνουν τις δραστικές κυτταρικές μορφές-* παραπέμπουν ανεπιφύλακτα στην επαγόμενη από την έκθεση στην αιθανόλη εκδήλωση φλεγμονής στις υπό μελέτη περιοχές των ζώων αυτών, κάτι που επ' ουδενί δε διαπιστώθηκε στα ζώα ελέγχου (*Control*) [Walker R. και συν., 2014 & Crews F. & Vetreno R, 2015].

¹⁷ Μία κατάσταση κατά την οποία μη αναδιπλωμένες ή λανθασμένα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες συσσωρεύονται στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου *-κατά κόρον ως αποτέλεσμα παθολογικών καταστάσεων-* με τελικό στάδιο αυτής να αποτελεί η ενεργοποίηση μηχανισμών επαγωγής κυτταρικού θανάτου.

Σε ό,τι αφορά στην αύξηση του αριθμού των μικρογλοιακών κυττάρων, αν και είναι απαραίτητη η πραγματοποίηση πειραμάτων με τη χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου για την πλέον αξιόπιστη καταγραφή του αριθμού τους, εντούτοις, εξαιτίας της μακροχρόνιας έκθεσης των ζώων στο αλκοόλ κατά την εμβρυική ανάπτυξη και έως τον απογαλακτισμό τους, έχουμε ενδεχομένως αύξηση του αριθμού των μικρογλοιακών κυττάρων, η οποία πιθανά οφείλεται είτε σε αύξηση της μεταναστευτικής ροής μονοπύρηνων κυττάρων στον εγκέφαλο, είτε στον πολλαπλασιασμό των μικρογλοιακών κυττάρων τοπικά [Ginhoux F. και συν., 2013]. Αξίζει να σημειωθεί ότι, ενώ μια σειρά από μελέτες έχουν αποδείξει ότι κατά τη διάρκεια της νευροφλεγμονής, τα μακροφάγα που προέρχονται από μονοκύτταρα διεισδύουν στον εγκέφαλο [Getts και συν., 2008, Ajami και συν., 2011, Menasria και συν., 2015], εντούτοις, οι πιθανοί διακριτοί ρόλοι των εγκεφαλικά διηθημένων περιφερικών μονοκυττάρων κυττάρων¹⁸ έναντι των ήδη υπαρχόντων μικρογλοιακών κυττάρων παραμένουν άγνωστοι. Επιπλέον, ο ρόλος κάθε υποσυνόλου μακροφάγων στη μακροπρόθεσμη ανάρρωση (ανάκτηση φυσιολογικής λειτουργίας) μετά την άρση της προσβολής δεν είναι επαρκώς κατανοητός.

Τέλος, η πιθανή μακροχρόνια επίδραση της έκθεσης στο αλκοόλ κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ηλικίας και έως τον απογαλακτισμό επεκτάθηκε και στη μελέτη των πρωτεϊνικών επιπέδων τριών παραγόντων, η παρουσία των οποίων υποδηλώνει παρουσία φλεγμονής σε ιστολογικά παρασκευάσματα προμετωπιαίου φλοιού. Η επιβεβαιωμένη ανοσοδραστικότητα της Iba1 ενισχύθηκε και από την παρατηρούμενη αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων αυτού στους FAS επίμυες συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου. Μία ανάλογη στατιστικώς σημαντική αύξηση δεν παρατηρήθηκε στη μελέτη των πρωτεϊνικών επιπέδων του παράγοντα νέκρωσης TNF- α . Το γεγονός ότι τα επίπεδα του TNF- α δε διατηρούνται σε υψηλά επίπεδα δύο μήνες μετά τη λήξη της μακροχρόνιας έκθεσης των πειραματόζωων στο αλκοόλ, ενώ ο αριθμός των Iba1+ μικρογλοιακών κυττάρων αυξάνει, συνάδει με αντίστοιχες παρατηρήσεις σε ποντίκια τα οποία είχαν εκτεθεί σε LPS [Trzeciak A. και συν., 2019]. Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη μελέτη, η επαγόμενη από το LPS οξεία συστηματική φλεγμονή οδηγεί 50 μέρες μετά την έκθεση των ζώων σε μακροχρόνια μικρογλοίωση η οποία δε συνοδεύεται από αντίστοιχη αύξηση των επιπέδων του TNF- α .

Ιδιαίτερος ενδιαφέρουσα παρατήρηση ήταν αυτή των πρωτεϊνικών επιπέδων της IL-1 β , τα επίπεδα της οποίας απέκλιναν από τα αναμενόμενα. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μία στατιστικώς σημαντική μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της στους FAS επίμυες συγκριτικά με τους επίμυες της συνθήκης ελέγχου. Μία πιθανή εξήγηση ενός τέτοιου γεγονότος δύναται να στηριχτεί στο μηχανισμό μετατροπής του

¹⁸ Η τύχη των περιφερικών μονοκυττάρων τα οποία διηθούν στον εγκέφαλο μετά από φλεγμονή ποικίλει ανάλογα με το είδος της προσβολής. Σε άλλες περιπτώσεις αποτελούν πρόδρομα κύτταρα των μικρογλοιακών κυττάρων σε άλλα πάλι όχι [Getts και συν., 2008, Ajami και συν., 2011, Menasria και συν., 2015].

πρόδρομου μορίου της IL-1β (*pro-IL*) στη δραστική της μορφή. Σύμφωνα με μελέτες η αιθανόλη ανακόπτει την έκκριση της δραστικής μορφής της IL-1β μέσω της ανασταλτικής της δράσης στην ομαλή λειτουργία του φλεγμονοσώματος που λειτουργεί κυρίως σαν πλατφόρμα για την ενεργοποίηση της προ-φλεγμονώδους κυτοκίνης IL-1β [Hoyt R. Laura και συν., 2015].

Αναφορικά με το μεσολόβιο επισημαίνεται ότι δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά στο πάχος αυτού ανάμεσα στα FAS ζώα και στα ζώα ελέγχου. Ακόμα από την παρατήρηση του σχήματος της εγκεφαλικής αυτής δομής - όπως παρατηρήθηκε από τις τομές με χρώση *Cresyl Violet*- δεν προέκυψε καμία σημαντική αλλαγή που να παραπέμπει σε παρεκκλίνουσα από τη φυσιολογική μορφή της. Να σημειωθεί για μία ακόμη φορά πως η παρατεταμένη περίοδος ανάπτυξης του μεσολοβίου το καθιστά θεωρητικά ευάλωτο στη δράση πολλών εξωγενών παραγόντων, με το εμβρυικό αλκοολικό σύνδρομο να αποτελεί τη μόνη επιβεβαιωμένη συσχέτιση σε πρακτικό επίπεδο. Η απουσία κάποιας στατιστικώς σημαντικής διαφοράς στο πάχος του μεσολοβίου στην παρούσα εργασία δύναται να αποδοθεί στην εφαρμογή του επιλεχθέντος πρωτοκόλλου έκθεσης, στο οποίο η μέγιστη περιεκτικότητα αιθανόλης ήταν 15%v/v. Εντούτοις, αξίζει να σημειωθεί ότι, μικροσκοπική παρατήρηση του αριθμού των κυττάρων (*πυρήνες, κυρίως ολιγοδενδροκυττάρων*) υποδηλώνει την πιθανή μείωση του αριθμού αξόνων που διέρχονται μέσω της δομής αυτής. Περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες προκειμένου να επιβεβαιωθεί η συγκεκριμένη παρατήρηση.

Η παρούσα εργασία έρχεται να επιβεβαιώσει τα αποτελέσματα πολλών προκλινικών και κλινικών μελετών σχετικά με τις μακροχρόνιες συνέπειες της έκθεσης στην αλκοόλη κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης ενώ ταυτόχρονα επικυρώνει την αξία του συγκεκριμένου ζωικού μοντέλου για τη μελέτη του εμβρυικού αλκοολικού συνδρόμου. Επιπλέον, αποτελεί έναυσμα ώστε να στραφεί το ενδιαφέρον των ερευνών που σχετίζονται με τη μελέτη του εμβρυικού αλκοολικού συνδρόμου σε εγκεφαλικές περιοχές που μέχρι σήμερα δεν είχαν τεθεί στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος των μελετών που αφορούν το συγκεκριμένο σύνδρομο. Τέλος, από όσο γνωρίζουμε, η μελέτη αυτή αποτελεί την πρώτη στην οποία διαπιστώθηκε μακροχρόνια ενεργοποίηση μικρογλοιακών κυττάρων δύο μήνες μετά τη λήξη της περιόδου έκθεσης πειραματοζώων στο αλκοόλ γεγονός το οποίο μπορεί τελικά να υπαγορεύσει την δυσμενή έκβαση μελλοντικών λοιμώξεων και νευροπαθολογικών ασθενειών σε παιδιά με τα οποία εμφανίζουν Διαταραχές του Φάσματος Εμβρυϊκού Αλκοολισμού.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Δημοσιεύσεις

- Ajami B, και συν. (2011) «*Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool*», Nat. Neurosci. 14: 1142–1149.
- Al Koborssy Dolly και συν. (2018), «*Modulation of olfactory-driven behavior by metabolic signals: role of the piriform cortex*». Springer, doi.org/10.1007/s00429-018-1776-0.
- Almeida Laura και συν. (2020). «*Murine Models for the Study of Fetal Alcohol Spectrum Disorders: An Overview*», Frontiers, [doi: 10.3389/fped.2020.00359](https://doi.org/10.3389/fped.2020.00359).
- Bekkers M. John and Suzuki Norimitsu (2013). «*Neurons and circuits for odor processing in the piriform cortex*». Trends in Neurosciences, doi.org/10.1016/j.tins.2013.04.005.
- Berndtsson H. Christin (2013). «*The Specificity of Output from Medial Entorhinal Cortex*». Faculty of Medicine, Department of Neuroscience.
- Bloom S. Juliana & Hynd W. George (2005). «*The role of the corpus callosum in interhemispheric transfer of information: excitation or inhibition?*». Neuropsychol, [doi: 10.1007/s11065-005-6252-y](https://doi.org/10.1007/s11065-005-6252-y).
- Brady S. και συν., (2004). «*Subcellular Organization of the Nervous System: Organelles and Their Functions*», From Molecules to Networks
- Burd L, Blair J & Dropps K (2012). «*Prenatal alcohol exposure, blood alcohol concentrations and alcohol elimination rates for the mother, fetus and newborn*», Journal of Perinatology.
- Chini Mattia & Hanganu-Opatz L. Ileana (2021). «*Prefrontal Cortex Development in Health and Disease: Lessons from Rodents and Humans*». Trends in Neuroscience, doi.org/10.1016/j.tins.2020.10.017.
- Coleman G. Leon & Crews T Fulton (2018). «*Innate Immune Signaling and Alcohol Use Disorders*». HHS Public Access, [doi:10.1007/164_2018_92](https://doi.org/10.1007/164_2018_92).
- Crews F. & Boettiger C.A. (2009). «*Impulsivity, frontal lobes and risk for addiction*». Elsevier, [doi:10.1016/j.pbb.2009.04.018](https://doi.org/10.1016/j.pbb.2009.04.018).
- Crews T. Fulton & Vetreno P. Ryan (2015). «*Mechanisms of neuroimmune gene induction in alcoholism*». Springer, [doi. 10.1007/s00213-015-3906-1](https://doi.org/10.1007/s00213-015-3906-1).
- Crews T. Fulton, (2017). «*The role of neuroimmune signaling in alcoholism*». Elsevier, doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.01.031.
- De León Reyes S. Noelia και συν. (2020). «*Development and plasticity of the corpus callosum*». The Company of Biologists, [doi:10.1242/dev.189738](https://doi.org/10.1242/dev.189738).
- Delatour C. Laurie και συν. (2019). «*Ethanol Exposure In Utero Disrupts Radial Migration and Pyramidal Cell Development in the Somatosensory Cortex*», Cerebral Cortex, [doi: 10.1093/cercor/bhy094](https://doi.org/10.1093/cercor/bhy094).
- Drew PD, Johnson JW, Douglas JC, Phelan KD, Kane CJ. «*Pioglitazone blocks ethanol induction of microglial activation and immune responses in the hippocampus, cerebellum, and cerebral cortex in a mouse model of fetal alcohol spectrum disorders*». Alcohol Clin Exp Res. 2015;39:445–54. doi: 10.1111/acer.12639

- Fernandez-Lizarde S. και συν. (2013). «*Ethanol induces TLR4/TLR2 association, triggering an inflammatory response in microglial cells*». International Society for Neurochemistry, [doi: 10.1111/jnc.12276](https://doi.org/10.1111/jnc.12276).
- Gage J. Gregory και συν. (2012). «*Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents*». Journal of Visualized Experiments, [doi: 10.3791/3564](https://doi.org/10.3791/3564).
- Gammill S. Laura & Bronner-Fraser Marianne (2003). «*Neural crest specification: migrating into genomics*». Nature, [doi:10.1038/nrn1219](https://doi.org/10.1038/nrn1219).
- Getts, D. R., και συν., (2008). «*Ly6c+ "inflammatory monocytes" are microglial precursors recruited in a pathogenic manner in West Nile virus encephalitis*». J. Exp. Med. 205: 2319–2337.
- Ghosh Pallab & Higgins E. Darrren (2018). «*Listeria monocytogenes Infection of the Brain*». Journal of Visualized Experiments, [doi:10.3791/58723](https://doi.org/10.3791/58723).
- Gil-Mohapel Joana και συν. (2010) «*Hippocampal cell loss and neurogenesis after fetal alcohol exposure, p. Insights from different rodent models*». Elsevier, [doi: 10.1016/j.brainresrev.2010.04.011](https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2010.04.011).
- Ginhoux Florent και συν. (2013). «*Origin and differentiation of microglia*». Frontiers in Cellular Neuroscience, [doi: 10.3389/fncel.2013.00045](https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00045).
- Glass K. Christopher και συν. (2010). «*Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration*». NIH Public Access, [doi:10.1016/j.cell.2010.02.016](https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.016).
- Harsha Raju & Prasanna Tadi (2021). «*Neuroanatomy, Somatosensory Cortex*», NCBI.
- Heidbreder, C. & Groenewegen, H. (2003). «*The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics*». Elsevier, [doi:10.1016/j.neubiorev.2003.09.003](https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2003.09.003).
- Helmut Kettenmann και συν. (2013). «*Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper*». Elsevier, doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.023.
- Hoyt R. Laura και συν. (2016). «*Ethanol and Other Short-Chain Alcohols Inhibit NLRP3 Inflammasome Activation through Protein Tyrosine Phosphatase Stimulation*», HHS Public Access, [doi:10.4049/jimmunol.1600406](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600406).
- Hyuk Sung Kwon & Seong-Ho Koh (2020). «*Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes*». BMC Translational Neurodegeneration, doi.org/10.1186/s40035-020-00221-2.
- Jing-Yu Yang και συν (2014). «*Role of microglia in ethanol-induced neurodegenerative disease: Pathological and behavioral dysfunction at different developmental stages*». Elsevier, doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.07.002.
- John Kealy & Sean Commins (2011). «*The rat perirhinal cortex: A review of anatomy, physiology, plasticity, and function*». Elsevier, [doi:10.1016/j.pneurobio.2011.03.002](https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.03.002).
- Kannan, U., Ramani, P., Natesan, A., Sherlin, H., Gheena, S., Abilasha, R., Gifrina Jayaraj, K R Don., Santhanam, A. (2017) Comparing the Quality of Castor Oil with DPX as a Mounting Medium, International Journal of Orofacial Biology, 1 (1), p. 21- 23.
- Klingler Esther (2017). «*Development and Organization of the Evolutionarily Conserved Three-Layered Olfactory Cortex*». Society of Neuroscience, doi.org/10.1523/ENEURO.0193-16.2016.
- Knuesel Irene και συν. (2014). «*Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders*», Nature, [doi:10.1038/nrneuro.2014.187](https://doi.org/10.1038/nrneuro.2014.187).

- Leng Fangda & Paul Edison (2021). «*Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here?*», Nature, doi.org/10.1038/s41582-020-00435-y.
- Lovinger M. David (2017). «*Presynaptic Ethanol Actions: Potential Roles in Ethanol Seeking*». Springer International Publishing, doi.org/10.1007/164_2017_76.
- Lynn K. Paul (2011). «*Developmental malformation of the corpus callosum: a review of typical callosal development and examples of developmental disorders with callosal involvement*». J Neurodevelop Disord, [doi: 10.1007/s11689-010-9059-y](https://doi.org/10.1007/s11689-010-9059-y).
- Mattson N. Sarah και συν. (2019). «*Fetal Alcohol Spectrum Disorders: A review of the neurobehavioral deficits associated with prenatal alcohol exposure*». HHS Public Access, [doi:10.1111/acer.14040](https://doi.org/10.1111/acer.14040).
- Menasria, R., και συν. (2015). «*Infiltration pattern of blood monocytes into the central nervous system during experimental herpes simplex virus encephalitis*». PLoS One 10: e0145773
- Montesinos Jorge και συν (2016). «*Impact of the Innate Immune Response in the Actions of Ethanol on the Central Nervous System*». Alcoholism: Clinical and experimental research, [doi: 10.1111/acer.13208](https://doi.org/10.1111/acer.13208).
- Mubarak Muhammad (2019). «*Tumor Necrosis Factor Alpha: A Major Cytokine of Brain Neuroinflammation*». IntechOpen, [doi:10.5772/intechopen.85476](https://doi.org/10.5772/intechopen.85476).
- Murray N. Katie et al. (2015). «*Interleukin-1 and acute brain injury*». Frontiers in Cellular Neuroscience, [doi:10.3389/fncel.2015.00018](https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00018).
- Nwaigwe Ugochukwu V. (2017). «*Fetal Alcohol syndrome*». American Journal of Clinical Nutrition.
- Ohsawa Keiko και συν. (2004). «*Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity*». Journal of Neurochemistry, [doi:10.1046/j.1471-4159.2003.02213.x](https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02213.x).
- Patten R. Anna και συν. (2014). «*A comparison of the different animal models of fetal alcohol spectrum disorders and their use in studying complex behaviors*». Frontiers, [doi: 10.3389/fped.2014.00093](https://doi.org/10.3389/fped.2014.00093).
- Petersen C.H. Carl (2007). «*The Functional Organization of the Barrel Cortex*». Elsevier, [doi:10.1016/j.neuron.2007.09.017](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.09.017).
- Qiang Mei και συν., (2002). «*Second trimester prenatal alcohol exposure alters development of rat corpus callosum*». Elsevier.
- Qin Liya και συν. (2007), «*Systemic LPS Causes Chronic Neuroinflammation and Progressive Neurodegeneration*», NIH Public Access, [doi:10.1002/glia.20467](https://doi.org/10.1002/glia.20467).
- Reemst Kitty και συν. (2016). «*The Indispensable Roles of Microglia and Astrocytes during Brain Development*», Frontiers, [doi: 10.3389/fnhum.2016.00566](https://doi.org/10.3389/fnhum.2016.00566).
- Rhoshel K. Lenroot & Jay N. Giedd (2006). «*Brain development in children and adolescents: Insights from anatomical magnetic resonance imaging*», Elsevier, [doi:10.1016/j.neubiorev.2006.06.001](https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2006.06.001).
- Schulz Christian και συν. (2012). «*A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells*». Science, [doi: 10.1126/science.1219179](https://doi.org/10.1126/science.1219179).
- Shinya Ohara και συν. (2018). «*Intrinsic Projections of Layer Vb Neurons to Layers Va, III, and II in the Lateral and Medial Entorhinal Cortex of the Rat*». Cell Press, doi.org/10.1016/j.celrep.2018.06.014.

- Shoutang Wang (2017). «*Functions of the transcription factor Lyl-1 in the development of the macrophage lineage*». Embryology and Organogenesis. Université Paris-Saclay.
- Sian-Marie Lucas και συν. (2006). «*The role of inflammation in CNS injury and disease*», British Journal of Pharmacology, doi: [10.1038/sj.bjp.0706400](https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706400).
- Silvia Alfonso-Loeches and Consuelo Guerri (2011). «*Molecular and behavioral aspects of the actions of alcohol on the adult and developing brain*», Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, doi: [10.3109/10408363.2011.580567](https://doi.org/10.3109/10408363.2011.580567).
- Snyder J. και συν. (2018), «*Nervous System*», Anatomy and Histology.
- Stranahan M. Alexis & Mattson P. Mark (2010). «*Selective Vulnerability of Neurons in Layer II of the Entorhinal Cortex during Aging and Alzheimer's Disease*». Neural Plasticity, doi:[10.1155/2010/108190](https://doi.org/10.1155/2010/108190).
- Tang Shiyu και συν. (2019). «*Functional connectivity and metabolic alterations in medial prefrontal cortex in a rat model of Fetal Alcohol Spectrum Disorder: a resting state functional MRI and in vivo proton MR spectroscopy study*», HHS Public Access, doi:[10.1159/000499183](https://doi.org/10.1159/000499183).
- Thibault P. Bittar & Benoit Labonté, 2021. «*Functional Contribution of the Medial Prefrontal Circuitry in Major Depressive Disorder and Stress-Induced Depressive-Like Behaviors*», Frontiers, doi.org/[10.3389/fnbeh.2021.699592](https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.699592).
- Thomas Grüter και συν., 2015. «*Altered neuronal excitability underlies impaired hippocampal function in an animal model of psychosis*», Frontiers, doi:[10.3389/fnbeh.2015.00117](https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00117).
- Tiwari V, Chopra K. «*Resveratrol prevents alcohol-induced cognitive deficits and brain damage by blocking inflammatory signaling and cell death cascade in neonatal rat brain*». J Neurochem. 2011;117:678–90. doi: [10.1111/j.1471-4159.2011.07236.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07236.x).
- Topper LA και συν. «*Exposure of neonatal rats to alcohol has differential effects on neuroinflammation and neuronal survival in the cerebellum and hippocampus*». J Neuroinflammation. 2015;12:160. doi: [10.1186/s12974-015-0382-9](https://doi.org/10.1186/s12974-015-0382-9)
- Triantafyllou Martha και συν. (2011). «*Location, Location, Location: Is Membrane Partitioning Everything When It Comes to Innate Immune Activation?*», Mediators of Inflammation,, doi:[10.1155/2011/186093](https://doi.org/10.1155/2011/186093).
- Trzeciak A. και συν. (2019). «*Long-Term Microgliosis Driven by Acute Systemic Inflammation*», J Immunol, doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900317>
- Urschel Katharina & Cicha Iwona (2015). «*TNF-α in the cardiovascular system: from physiology to therapy*». International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research, doi.org/[10.2147/IJICMR.S64894](https://doi.org/10.2147/IJICMR.S64894).
- Vismer S. Marta και συν. (2015). «*The piriform, perirhinal, and entorhinal cortex in seizure generation*». Frontiers, doi: [10.3389/fncir.2015.00027](https://doi.org/10.3389/fncir.2015.00027).
- Walker F. Rohan και συν. (2014). «*Dynamic structural remodelling of microglia in health and disease: A review of the models, the signals and the mechanisms*». Elsevier, doi.org/[10.1016/j.bbri.2013.12.010](https://doi.org/10.1016/j.bbri.2013.12.010).
- Ware A.L., Long X., Lebel C. (2021). «*Functional connectivity of the attention networks is altered and relates to neuropsychological outcomes in children with prenatal alcohol exposure*» Dev Cogn Neurosci, 48:100951. doi: [10.1016/j.dcn.2021.100951](https://doi.org/10.1016/j.dcn.2021.100951)

- Wattendorf J. Daniel και συν. (2005). «*Fetal Alcohol Spectrum Disorders*». American Academy of Family Physicians.
- Witter P. Menno και συν. (2017). «*Architecture of the Entorhinal Cortex A Review of Entorhinal Anatomy in Rodents with Some Comparative Notes*». Frontiers, doi.org/10.3389/fnsys.2017.00046.
- Yang Sujuan και συν. (2018). «*Role of TNF-TNF Receptor 2 Signal in Regulatory T Cells and Its Therapeutic Implications*». Frontiers, doi.org/10.3389/fimmu.2018.00784.
- Yifei Dong & V. Wee Yong, 2019. «*When encephalitogenic T cells collaborate with microglia in multiple sclerosis*». Nature Reviews Neurology, doi.org/10.1038/s41582-019-0253-6.
- Yoshinori Imai & Shinichi Kohsaka (2002). «*Intracellular Signaling in M-CSF-Induced Microglia Activation: Role of Iba1*». Department of Neurochemistry, National Institute of Neuroscience, Tokyo, Japan, [doi: 10.1002/glia.10149](https://doi.org/10.1002/glia.10149).
- Zou Y. Jian, Fulton T. Crews (2014). «*Release of Neuronal HMGB1 by Ethanol through Decreased HDAC Activity Activates Brain Neuroimmune Signaling*». PLOS ONE, [doi:10.1371/journal.pone.0087915](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087915).

Βιβλία

- Klaassen C. & Watkis J. (2010). «*Casarett & Doull - Βασική Τοξικολογία*», Δεύτερη έκδοση, Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιανού.
- Sherwood L. (2016). «*Εισαγωγή στη Φυσιολογία του Ανθρώπου - Από τα κύτταρα στα συστήματα*», Όγδοη έκδοση, Ακαδημαϊκές εκδόσεις Ι. Μπάσδρα.
- Ζίφα Α. και συν. (2011). «*Βιολογία*», Πρώτη έκδοση, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Θεσσαλίας.