



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Μελέτη της Φλεγμονώδους Αντίδρασης στον Εγκέφαλο
Ενήλικων Επίμυων κατά την Επιληπτογένεση με
Πεντυλενοτετραζόλη υπό εδάφους Εμβρυϊκού Αλκοολικού
Συνδρόμου»

Δήμητρα Τζίνη του Νικολάου

Λάρισα

Νοέμβριος 2021



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY & BIOTECHNOLOGY

BACHELOR THESIS

"Brain Inflammatory Response during Epileptogenesis with
Pentylentetrazole in Adult Rats with Fetal Alcohol Syndrome"

Dimitra Tzini

Larissa

November 2021

Τριμελής Επιτροπή

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

Υπογραφή

Αιμιλία Ζίφα, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας-Νευροβιολογίας,
Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Υπογραφή

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

Υπογραφή

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	III
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	1
ABSTRACT.....	2
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	3
Εμβρυϊκό Αλκοολικό Σύνδρομο (Fetal Alcohol Syndrome, FAS).....	3
Γενικά.....	3
Κατηγοριοποίηση και χαρακτηριστικά.....	5
Εγκεφαλική ανάπτυξη και επίδραση της αιθανόλης.....	6
Περιοχές του εγκεφάλου που επηρεάζονται στο εμβρυϊκό αλκοολικό σύνδρομο.....	10
Εμβρυϊκό Αλκοολικό Σύνδρομο και Φλεγμονή.....	23
Κατηγοριοποίηση, φυσιολογικός ρόλος και προέλευση των αστροκυττάρων.....	23
Ο ρόλος των αστροκυττάρων στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης.....	24
Εμβρυϊκό Αλκοολικό Σύνδρομο και Επιληψία.....	27
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	29
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	30
Πειραματόζωα.....	30
Πρωτόκολλο έκθεσης στην αιθανόλη και πρόκληση επιληπτικών κρίσεων.....	30
Ενδοκαρδιακή μονιμοποίηση επίμυος.....	33
Ζελατινοποίηση αντικειμενοφόρων πλακών.....	35
Χρώση Nissl.....	35
Πειραματική Διαδικασία.....	37
Ανοσοφθορισμός.....	38
Πειραματική Διαδικασία.....	39
Φωτογράφιση τομών και ανάλυση εικόνων.....	40
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	43
Επίδραση της επιληπτογένεσης με πεντυλενοτετραζόλη υπό εδάφους εμβρυϊκού αλκοολικού συνδρόμου στο μέσο προμετωπιαίο φλοιό επίμυος.....	43
Χρώση σωματιδίων Nissl.....	43
Ανοσοδραστικότητα της GFAP.....	46
Επίδραση της επιληπτογένεσης με πεντυλενοτετραζόλη υπό εδάφους εμβρυϊκού αλκοολικού συνδρόμου στον υπόκαμπο επίμυος.....	49
Χρώση σωματιδίων Nissl.....	49
Ανοσοδραστικότητα της GFAP.....	53

Επίδραση της επιληπτογένεσης με πεντυλενοτετραζόλη υπό εδάφους εμβρυϊκού αλκοολικού συνδρόμου στους βασικούς πυρήνες της αμυγδαλής επίμυος.....	62
Χρώση σωματιδίων Nissl.....	62
Ανοσοδραστικότητα της GFAP.....	64
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	67
Επίδραση της επιληπτογένεσης με πεντυλενοτετραζόλη υπό εδάφους εμβρυϊκού αλκοολικού συνδρόμου στο μέσο προμετωπιαίο φλοιό επίμυος.....	67
Επίδραση της επιληπτογένεσης με πεντυλενοτετραζόλη υπό εδάφους εμβρυϊκού αλκοολικού συνδρόμου στον ιπποκαμπο επίμυος.....	70
CA1 πεδίο.....	71
CA3 πεδίο.....	72
Οδοντωτή έλικα.....	73
Επίδραση της επιληπτογένεσης με πεντυλενοτετραζόλη υπό εδάφους εμβρυϊκού αλκοολικού συνδρόμου στους βασικούς πυρήνες της αμυγδαλής επίμυος.....	75
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	77

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη της Επίκουρου Καθηγήτριας Φαρμακολογίας, Δρ. Βασιλάκη Άννας. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, για τις πολύτιμες γνώσεις, τόσο σε εργαστηριακό όσο και σε θεωρητικό επίπεδο, που μοιράστηκε μαζί μου και με βοήθησε να κάνω κτήμα μου καθώς και για την αμέριστη υποστήριξή της καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας μου.

Φυσικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής και πιο συγκεκριμένα την Επίκουρο Καθηγήτρια Βιολογίας-Νευροβιολογίας, Δρ. Αιμιλία Ζίφα, και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας, Δρ. Αποστολία Χατζηευθυμίου, για την υποστήριξη και τις πολύτιμες συμβουλές τους. Αδιαμφισβήτητα οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Καθηγήτρια Φαρμακολογίας Δρ. Ασπροδίνη Ευτυχία για το αμείωτο ενδιαφέρον που επέδειξε καθ' όλη τη διάρκεια διεκπεραίωσης της παρούσας εργασίας. Δε θα μπορούσα βέβαια να μην ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας για την ουσιαστική συνεργασία, στήριξη και βοήθειά τους.

Κλείνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου την αγαπημένη μου οικογένεια που χωρίς εκείνους τίποτα από όλα αυτά δε θα ήταν εφικτό, τις φίλες μου και το σύντροφό μου για τη συνεχή υποστήριξη, την κατανόηση, την ενθάρρυνση και για το πόσο πολύ πιστεύουν σε εμένα. Την παρούσα πτυχιακή εργασία την αφιερώνω στη γιαγιά μου Δήμητρα Τζίνη η οποία δεν είναι τα τελευταία χρόνια κοντά μας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κατανάλωση αλκοόλ από τη μητέρα κατά τη διάρκεια της κύησης συνεπάγεται δυσμενείς επιδράσεις στο έμβρυο μεταξύ των οποίων και το Εμβρυϊκό Αλκοολικό Σύνδρομο (Fetal Alcohol Syndrome, FAS). Στα χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου συνδρόμου περιλαμβάνονται βλάβες σε εγκεφαλικές περιοχές τόσο σε ανθρώπους όσο και σε μοντέλα επίμυων οι οποίες, σε κυτταρικό επίπεδο, μεταφράζονται, μεταξύ άλλων, σε έντονο κυτταρικό θάνατο, φλεγμονή και διαταραχές στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Παράλληλα, σε ένα ποσοστό της τάξεως του 21% των παιδιών με FAS παρατηρούνται επιληπτικές κρίσεις, φαινόμενο το οποίο δεν παρατηρείται σε επίμυες. Σκοπό της παρούσας πτυχιακής εργασίας αποτέλεσε η μελέτη της φλεγμονώδους αντίδρασης στον εγκέφαλο ενήλικων Sprague-Dawley επίμυων κατά την επιληπτογένεση με τον GABA_A ανταγωνιστή πεντυλενοτετραζόλη (pentylentetrazole, PTZ) υπό εδάφους FAS. Στη συγκεκριμένη μελέτη διενεργήθηκαν ιστοχημικές και ανοσοϊστοχημικές χρώσεις σε τομές μέσου προμετωπιαίου φλοιού, ιππόκαμπου και αμυγδαλής ζώων στα οποία είχε ή όχι προκληθεί επιληπτική κρίση παρουσία/απουσία FAS. Η έκθεση των ζώων στην αιθανόλη και η πρόκληση των επιληπτικών κρίσεων πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, το FAS προκάλεσε μείωση στον αριθμό των κυττάρων στις προαναφερθείσες περιοχές, φαινόμενο το οποίο δεν παρατηρήθηκε στο συνδυασμό των δύο προσβολών. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ύπαρξη αντιδραστικών αστροκυττάρων (ένδειξη φλεγμονής) σε όλες τις περιοχές που εξετάστηκαν τόσο στους επίμυες με FAS όσο και στους επίμυες με το συνδυασμό των δύο προσβολών. Τέλος, παρατηρήθηκε πόλωση των αντιδραστικών αστροκυττάρων στο CA1 πεδίο στους επίμυες με FAS καθώς επίσης και στο CA3 πεδίο και στην οδοντωτή έλικα στους επίμυες με FAS στους οποίους είχε ή όχι προκληθεί επιληπτική κρίση. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υποδεικνύουν την ύπαρξη κυτταρικού θανάτου και φλεγμονής στον εγκέφαλο επίμυων με FAS ενώ η πρόκληση επιληπτικών κρίσεων σε αυτά τα ζώα αυξάνει τον αριθμό των κυττάρων και πιθανώς επιδεινώνει τη φλεγμονή στις υπό μελέτη περιοχές. Περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες για τη διερεύνηση του φαινομένου.

ABSTRACT

Alcohol consumption during pregnancy entails adverse effects on the fetus among which Fetal Alcohol Syndrome (FAS). The characteristics of this syndrome include damage to brain areas in both humans and rat models which, in the cellular level, correspond to pronounced cell death, inflammation and cell proliferation disorders. Alcohol-related seizures have been observed in up to 21% of children with FAS, a phenomenon that has not been detected in animal models. The purpose of this thesis was to study the inflammatory response in the brain of adult Sprague-Dawley rats during epileptogenesis induced by GABA_A antagonist pentylenetetrazole (PTZ) in the presence/absence of FAS. To this end, histochemical and immunofluorescent studies were employed, and the medial prefrontal cortex, hippocampal formation and basal amygdala nuclei studied. Animal FAS induction and epileptic rendering were carried out in the Laboratory of Physiology of the Department of Biological Applications and Technologies of the University of Ioannina. According to our results, FAS led to a decrease in the number of cells in the above-mentioned areas. In addition, reactive astrocytes, which are a sign of inflammation, were found in all areas studied in both FAS and FAS-PTZ animals. Polarization of reactive astrocytes was also observed in: i) the CA1 field of FAS animals, ii) the CA3 field of FAS and FAS-PTZ animals and iii) the dentate gyrus of FAS and FAS-PTZ animals. The results of this thesis point towards cell death and inflammation in the brain of FAS animals while epileptogenesis increases the number of cells and possibly aggravates inflammation in these animals. Additional studies are needed to investigate this phenomenon.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

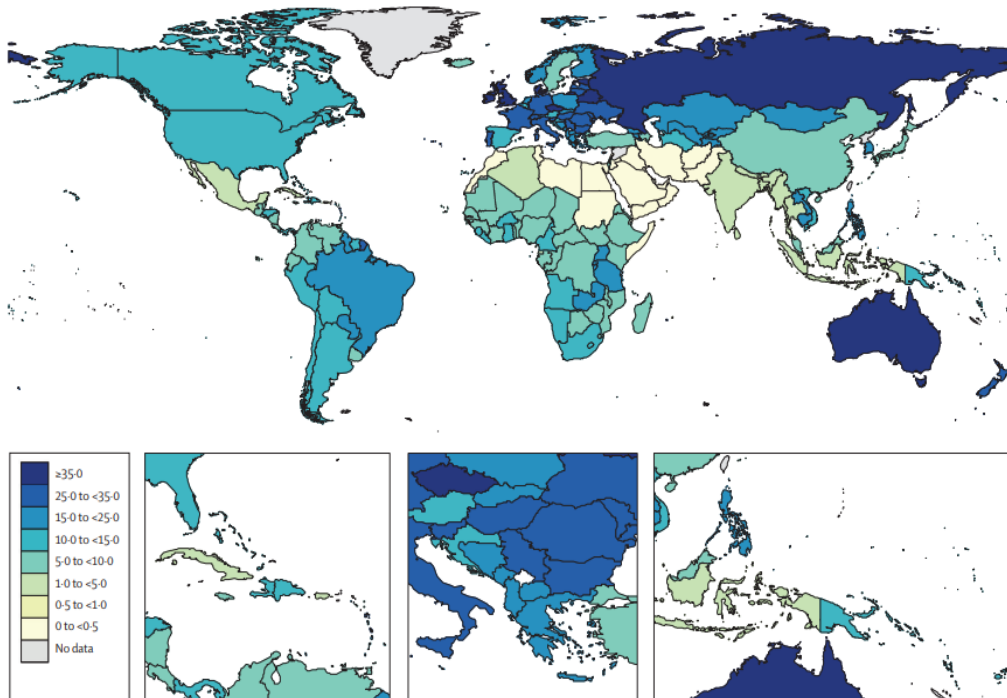
Εμβρυϊκό Αλκοολικό Σύνδρομο (Fetal Alcohol Syndrome, FAS)

Γενικά

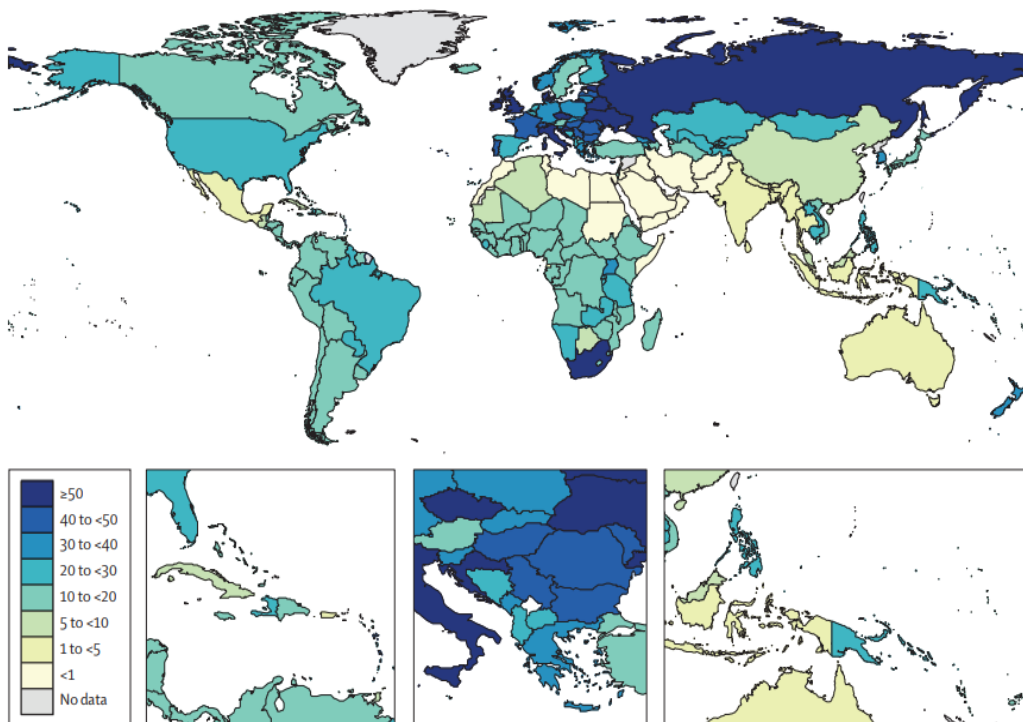
Η κατανάλωση αλκοόλ εγκυμονεί προβλήματα όχι μόνο για το χρήστη, αλλά και για τα άτομα που σχετίζονται με εκείνον. Κλασικό παράδειγμα των επιδράσεων της αιθανόλης σε άτομα που σχετίζονται με το χρήστη, αποτελούν τα προβλήματα που προκαλεί η κατανάλωση αιθανόλης από τη μητέρα, κατά τη διάρκεια της κύησης, στο αναπτυσσόμενο έμβρυο. Η αιθανόλη είναι μια τερατογόνος ουσία που μπορεί εύκολα να διαπεράσει τον πλακούντα και να επηρεάσει αρνητικά την ανάπτυξη του εγκεφάλου και άλλων οργάνων του αναπτυσσόμενου εμβρύου (Ρορονα, S., και συν., 2017). Ειδικότερα, μόλις διαπεράσει τον πλακούντα, η αιθανόλη κατανέμεται ραγδαία στο εμβρυϊκό διαμέρισμα όπου έχει αργό ρυθμό απομάκρυνσης, με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται στο αμνιακό υγρό. Η συσσώρευση αυτή συνεπάγεται μεγαλύτερο χρόνο έκθεσης του εμβρύου στην αιθανόλη και επιδεινώνεται από την εμβρυϊκή κατάποσή της μετά την απέκκρισή της μέσω των νεφρών στο αμνιακό υγρό (Gurta, K., και συν., 2016).

Η κατανάλωση αλκοόλ κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης έχει ταυτοποιηθεί ως ένας παράγοντας κινδύνου για δυσμενείς εκβάσεις της κύησης, συμπεριλαμβανομένης της θνησιγένειας, της αυθόρμητης αποβολής, του πρόωρου τοκετού, της ενδομήτριας καθυστέρησης της ανάπτυξης του εμβρύου και του χαμηλού βάρους γέννησής του. Μία από τις πιο δυσμενείς πιθανές επιδράσεις της κατανάλωσης αλκοόλ κατά τη διάρκεια της κύησης στο έμβρυο είναι ο κίνδυνος ανάπτυξης εμβρυϊκού αλκοολικού συνδρόμου (Fetal Alcohol Syndrome, FAS), την πιο σοβαρή και οπτικά αναγνωρίσιμη μορφή του Φάσματος Διαταραχών Εμβρυϊκού Αλκοολισμού (Fetal Alcohol Spectrum Disorders, FASD). Παγκοσμίως. Σύμφωνα με δεδομένα του 2012, εκτιμάται ότι το 10% των γυναικών καταναλώνουν αλκοόλ κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (Εικόνα 1). Επίσης εκτιμάται ότι μία στις 67 γυναίκες που καταναλώνουν αλκοόλ κατά τη διάρκεια της κύησης γεννούν ένα παιδί με εμβρυϊκό αλκοολικό σύνδρομο. Έτσι, η επίπτωση

του συγκεκριμένου συνδρόμου είναι 15 στις 10.000 άτομα (Εικόνα 2, Ρορονα, S., και συν., 2017).



Εικόνα 1: Παγκόσμια συχνότητα (%) κατανάλωσης αλκοόλ (οποιασδήποτε ποσότητας) κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης ανάμεσα στο γενικό πληθυσμό το 2012 (Ρορονα, S., et al., 2017).



Εικόνα 2: Παγκόσμια συχνότητα του FAS (ανά 10.000 άτομα) στο γενικό πληθυσμό το 2012 (Ρορονα, S., et al., 2017).

Κατηγοριοποίηση και χαρακτηριστικά

Το αναπτυσσόμενο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ, Central Nervous System, CNS) είναι ιδιαίτερα ευάλωτο στις τοξικές επιδράσεις του αλκοόλ (Alfonso-Loeches, S., Guerri, C., 2011). Ειδικότερα, η κατανάλωση αλκοόλ από τη μητέρα κατά τη διάρκεια της κύησης, μπορεί να προκαλέσει ένα ευρύ φάσμα μακροχρόνιων σωματικών, γνωσιακών και συμπεριφορικών ανωμαλιών στους απογόνους οι οποίες συμπεριλαμβάνονται, μαζί με τα σύνδρομα/διαταραχές (βλ. παρακάτω) που χαρακτηρίζουν, στο Φάσμα Διαταραχών της Εμβρυϊκής Ανάπτυξης οφειλόμενη στην κατάχρηση του αλκοόλ (Fetal Alcohol Spectrum Disorders, FASD, Cantacorps, L., και συν., 2017, Moore, K., Persaud, TVN., 2009). Πιο συγκεκριμένα, το Φάσμα Διαταραχών Εμβρυϊκού Αλκοολισμού περιλαμβάνει:

- 1.** το εμβρυϊκό αλκοολικό σύνδρομο (Fetal Alcohol Syndrome, FAS) που, όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί την πιο σοβαρή εκδήλωση των FASD,
- 2.** το μερικό εμβρυϊκό αλκοολικό σύνδρομο (partial Fetal Alcohol Syndrome, pFAS) που ορίζεται από απουσία ορισμένων χαρακτηριστικών του FAS,
- 3.** τις συσχετιζόμενες με το αλκοόλ εκ γενετής ανωμαλίες (alcohol-related birth defects, ARBD) όπου εμφανίζονται ορισμένες σωματικές βλάβες και
- 4.** τις νευρολογικές διαταραχές που σχετίζονται με το αλκοόλ (alcohol-related neurological disorders, ARND) οι οποίες αφορούν συμπεριφορικές και μαθησιακές νευροψυχολογικές αλλαγές χωρίς να συνοδεύονται, συνήθως, από δυσμορφίες του προσώπου (Almeida, L., και συν., 2020).

Το εμβρυϊκό αλκοολικό σύνδρομο το οποίο μας απασχόλησε στην παρούσα πτυχιακή εργασία, χαρακτηρίστηκε, αρχικά, το 1973 από τους Jones, K., και Smith, D., οι οποίοι όρισαν το σύνδρομο αυτό ως την ταυτόχρονη ύπαρξη προγεννητικής και μεταγεννητικής διαταραχής της ανάπτυξης, δυσμορφιών του προσώπου και διαταραχών του ΚΝΣ, χαρακτηριστικά που οδηγούν σε κινητικά, γνωσιακά και συμπεριφορικά ελλείμματα (Almeida, L., και συν., 2020). Η καθυστέρηση στην ανάπτυξη οφείλεται στο ότι το αλκοόλ, ως πηγή ενέργειας, εμποδίζει την απορρόφηση βασικών θρεπτικών συστατικών, αλλά και επειδή επιδρά στην αγγειογένεση του πλακούντα (Almeida, L., και συν., 2020). Όσον

αφορά στις χαρακτηριστικές δυσμορφίες του προσώπου στον άνθρωπο, αυτές περιλαμβάνουν μικροκεφαλία, λεπτό άνω χείλος, επιμηκυμένο μέσο πρόσωπο, βραχείες βλεφαρικές σχισμές και μογγολικού τύπου πτυχές των βλεφάρων και επιμήκη και επίπεδη υπορρινική αύλακα (απουσία κάθετης αύλακας στο μέσο τμήμα του άνω χείλους, Εικόνα 3, Medina, A., 2011, Moore, K., Persaud, TVN., 2009, Clarren, S., 1981). Βιβλιογραφικά στοιχεία αναφέρουν πως κάποιες από τις δυσμορφίες του προσώπου ίσως υποχωρούν σταδιακά.



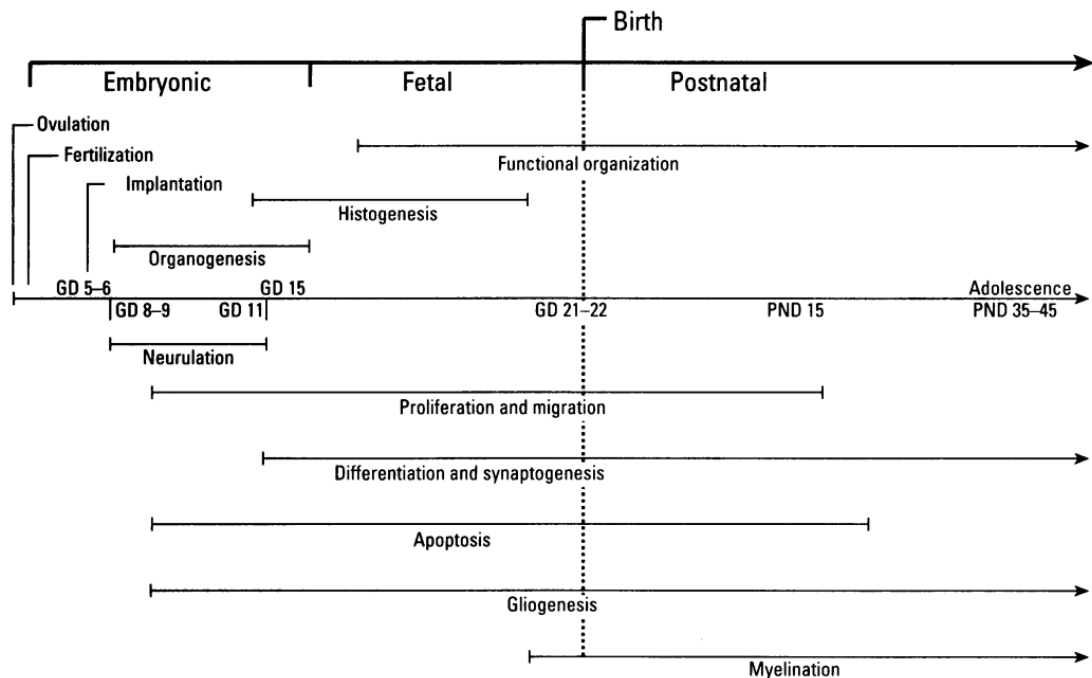
Εικόνα 3: Χαρακτηριστικά του εμβρυϊκού αλκοολικού συνδρόμου σε νεογέννητο, νήπιο και προσχολικής ηλικίας παιδί. Ακόμη και σε διαφορετικές ηλικίες και φυλές, οι αναδιπλώσεις του δέρματος στο επίπεδο των βλεφάρων και οι περιστοματικές δομές παραμένουν μη φυσιολογικές (Clarren, S., 1981).

Εγκεφαλική ανάπτυξη και επίδραση της αιθανόλης

Πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι το αλκοόλ παρεμβαίνει σε πολλά από τα μοριακά, βιοχημικά και κυτταρικά γεγονότα που συμμετέχουν στο σωστό σχηματισμό του αναπτυσσόμενου ΚΝΣ (Alfonso-Loeches, S., Guerri, C., 2011). Κατά την ανάπτυξη του ΚΝΣ που εκτυλίσσεται καθ' όλη τη διάρκεια της κύησης, υφίστανται περίοδοι ευάλωτες σε περιβαλλοντικές επιδράσεις. Έτσι, η προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη επηρεάζει διαφορετικά την ανάπτυξη του εγκεφάλου ανάλογα με τη δόση, τη χρονική διάρκεια έκθεσης και το αναπτυξιακό στάδιο.

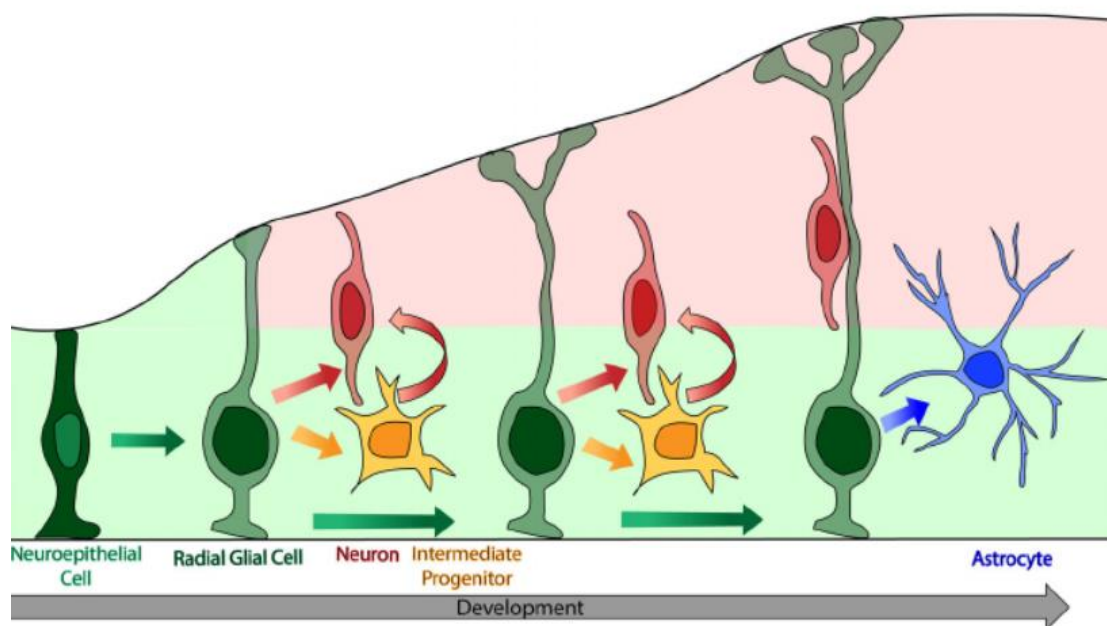
Η ανθρώπινη κύηση αποτελείται από τρία προγεννητικά τρίμηνα ενώ η κύηση στους επίμυες διαρκεί 21–23 ημέρες. Το πρώτο τρίμηνο της ανθρώπινης κύησης

αντιστοιχεί στις ημέρες κύησης 1–10 (Gestational Days, GDs 1–10) στους επίμυες. Το ισοδύναμο του δεύτερου τριμήνου αντιστοιχεί στις ημέρες κύησης 11–22, και το ισοδύναμο του τρίτου τριμήνου σχετίζεται με τις μεταγεννητικές ημέρες 1–10 (Postnatal Days, PNDs 1–10, Almeida, L., και συν., 2020). Ξεκινώντας στις αρχές της δεύτερης εβδομάδας κύησης στους επίμυες (GD 9-10) και στον πρώτο μήνα κύησης στον άνθρωπο, συγκεκριμένες περιοχές του ΚΝΣ αρχίζουν να σχηματίζονται στον πρόσθιο εγκέφαλο, στο μεσεγκέφαλο και στον οπίσθιο εγκέφαλο μέσω των διαδικασιών νευρογένεσης και μετανάστευσης των κυττάρων. Ακολουθεί μια αλληλουχία αναπτυξιακών διαδικασιών που εξακολουθούν να υφίστανται και μεταγεννητικά σε όλες τις εγκεφαλικές περιοχές, συμπεριλαμβανομένων του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της μετανάστευσης, της διαφοροποίησης, της συναπτογένεσης, της απόπτωσης και της μυελίνωσης όπως συνοψίζονται στην Εικόνα 4 (Rice, D., Barone, S., 2000), οι οποίες επηρεάζονται από την κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων αιθανόλης και οδηγούν σε συγγενείς ανωμαλίες και λειτουργικά ελλείμματα στο ΚΝΣ τόσο στους επίμυες όσο και στους ανθρώπους με FAS.



Εικόνα 4: Χρονοδιάγραμμα των αναπτυξιακών διαδικασιών στο ΚΝΣ των επίμυων σε αντιστοιχία με την περίοδο της γονιμοποίησης, της οργανογένεσης και της ιστογένεσης (Rice, D., Barone, S., 2000).

Όσον αφορά στη νευρογένεση, υφίσταται παραγωγή νευρικών προγονικών κυττάρων συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων ακτινωτής γλοίας (Radial Glia, RG, Rubert, G., και συν., 2006). Τα κύτταρα της ακτινωτής γλοίας (Radial Glia, RG) αποτελούν πρόδρομα νευρικά κύτταρα του ΚΝΣ τα οποία προκύπτουν από τη διαφοροποίηση νευροεπιθηλιακών κυττάρων εξωδερμικής προέλευσης (Kane, C., Drew, P., 2021) και υποστηρίζουν τη μετανάστευση των νευρώνων προς το φλοιό του εγκεφάλου. Τα κύτταρα αυτά δίνουν γένεση τόσο σε νευρώνες όσο και σε κύτταρα της γλοίας και ονομάστηκαν έτσι καθώς εκφράζουν διάφορους δείκτες των κυττάρων της γλοίας (Εικόνα 5, Slack, J., 2013).



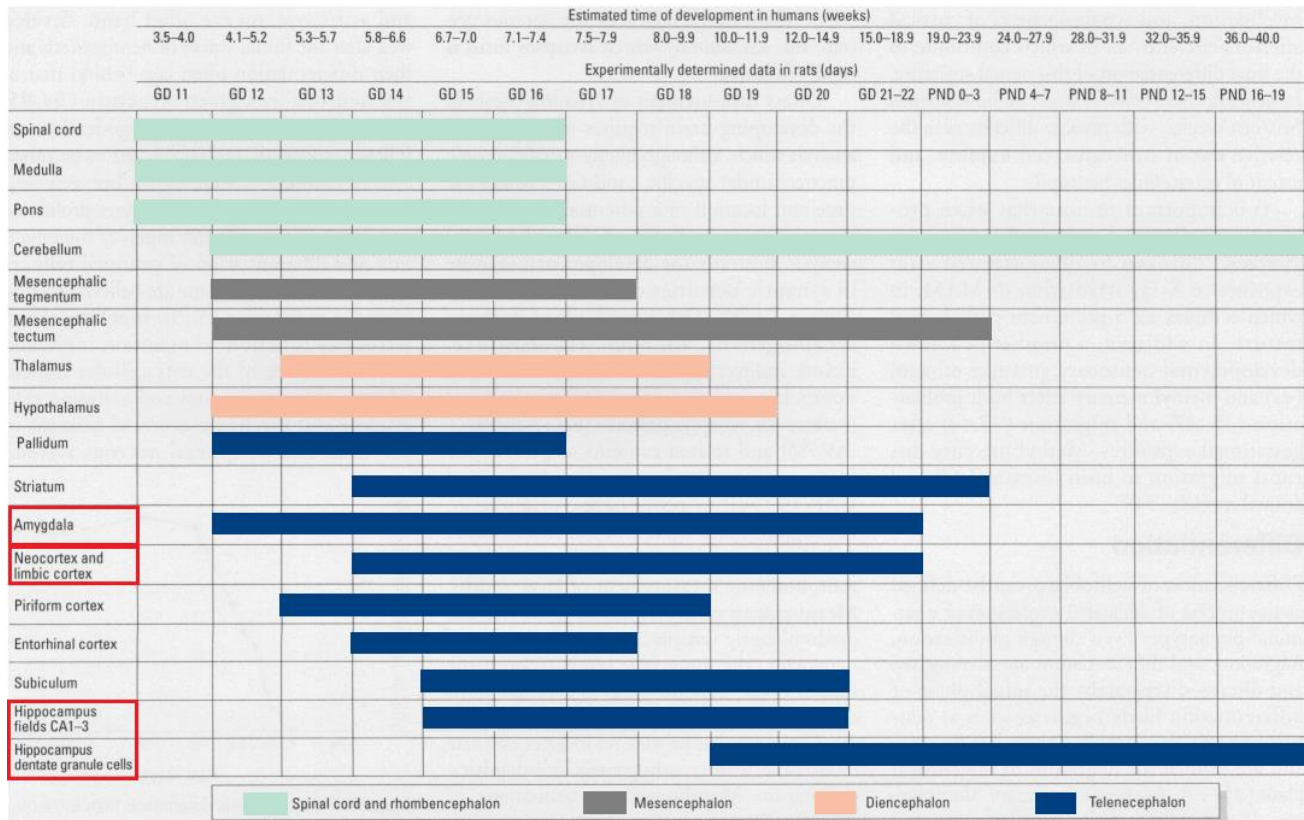
Εικόνα 5: Γένεση νευρώνων και αστροκυττάρων από τα κύτταρα ακτινωτής γλοίας κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης (D'Arcy, B., Silver, D., 2020).

Κατά τα αρχικά στάδια δημιουργίας του φλοιού, τα κύτταρα της ακτινωτής γλοίας δίνουν γένεση σε νευρώνες και στη συνέχεια καθοδηγούν τους θυγατρικούς νευρώνες προς την αναπτυσσόμενη φλοιϊκή πλάκα. Αφότου ολοκληρωθεί η μετανάστευση των νευρώνων, τα περισσότερα από τα κύτταρα αυτά διαφοροποιούνται σε αστροκύτταρα. Πρόσφατα ευρήματα υποδεικνύουν ότι τα κύτταρα της ακτινωτής γλοίας είναι η κυρίαρχη μορφή νευρικών προγονικών κυττάρων στον εγκέφαλο του εμβρύου, δίνοντας γένεση στην πλειοψηφία των νευρώνων σε όλες τις περιοχές του ΚΝΣ (Rubert, G., και συν., 2006).

Η χρόνια έκθεση στην αιθανόλη κατά τη νευρογένεση στους επίμυες, επηρεάζει τη μορφολογία των κυττάρων της ακτινωτής γλοίας σε κυτταροκαλλιέργειες,

καθυστερεί τη διαφοροποίησή τους σε αστροκύτταρα και έτσι διαταράσσει την αστρογλοιογένεση. Παράλληλα, παρατηρείται μείωση στον αριθμό των νευρώνων και των αστροκυττάρων που προκύπτουν από τα κύτταρα της ακτινωτής γλοίας καθώς η αιθανόλη επιδρά αρνητικά στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών. Ειδικότερα, η προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη διαταράσσει τον κυτταρικό κύκλο και μειώνει τον αριθμό των κυττάρων της ακτινωτής γλοίας που προσκολλώνται στην κοιλιακή ζώνη. Η αιθανόλη μπορεί επίσης, να επηρεάσει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό διαταράσσοντας το σύστημα των κινασών που εξαρτώνται από τις κυκλίνες ή παρεμβαίνοντας σε μιτογόνες οδούς που διαμεσολαβούνται από νευροδιαβιβαστές και αυξητικούς παράγοντες (Rubert, G., και συν., 2006, Alfonso-Loeches, S., Guerri, C., 2011).

Αναφορικά με τις εγκεφαλικές δομές, τόσο στους επίμυες όσο και στους ανθρώπους οι περισσότερες περιοχές του οπίσθιου εγκεφάλου αναπτύσσονται νωρίτερα από τις περιοχές του τελικού και του διάμεσου εγκεφάλου που προκύπτουν από τον πρόσθιο εγκέφαλο. Μεταξύ των δομών του πρόσθιου εγκεφάλου, ο νεοφλοιός και ο ιππόκαμπος αναπτύσσονται κυρίως κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής περιόδου ενώ αξιοσημείωτο είναι ότι τα κοκκώδη κύτταρα της οδοντωτής έλικας του ιππόκαμπου εξακολουθούν να πολλαπλασιάζονται και μεταγεννητικά τόσο στους επίμυες όσο και στους ανθρώπους (Εικόνα 6, Rice, D., Barone, S., 2000). Νευρογένεση εξακολουθεί να υφίσταται κατά τη μεταγεννητική περίοδο και στην παρεγκεφαλίδα με αποτέλεσμα η έκθεση στο αλκοόλ την περίοδο αυτή να προκαλεί σοβαρή νευρωνική απώλεια τόσο στον ιππόκαμπο όσο και σε παρεγκεφαλιδικές περιοχές. Παράλληλα, η έκθεση στο αλκοόλ κατά τη μεταγεννητική περίοδο προκαλεί αντιδραστική αστρογλοίωση και μειωμένη μυελίνωση (Almeida, L., και συν., 2020, Alfonso-Loeches, S., Guerri, C., 2011). Τέλος, κατά την περίοδο αυτή, ο εγκέφαλος περνά από μια περίοδο ταχείας ανάπτυξης που συχνά ονομάζεται «έκρηξη ανάπτυξης του εγκεφάλου» (“brain growth spurt”) όπου οι νευρώνες είναι πιο επιρρεπείς στις αποπτωτικές επιδράσεις της έκθεσης στο αλκοόλ (Oikonomidou, C., και συν, 2000).



Εικόνα 6: Εκτιμώμενα χρονοδιαγράμματα της νευρογένεσης στις περιοχές που αναγράφονται σε επίμυες και ανθρώπους (Προσαρμοσμένη από Rice, D., Barone, S., 2000). Η αμυγδαλή, ο νεοφλοιός και ο ιππόκαμπος τονίζονται καθώς θα μας απασχολήσουν στην παρούσα πτυχιακή εργασία.

Περιοχές του εγκεφάλου που επηρεάζονται στο εμβρυϊκό αλκοολικό σύνδρομο

Αν και τα χαρακτηριστικά του προσώπου που παρατηρούνται σε ασθενείς με εμβρυϊκό αλκοολικό σύνδρομο είναι σίγουρα οι πιο εμφανείς ενδείξεις της έκθεσης στο αλκοόλ κατά την κύηση, οι πιο επιβλαβείς συνέπειες είναι εκείνες που σχετίζονται με βλάβες σε εγκεφαλικές περιοχές και τις επακόλουθες διαταραχές της συμπεριφοράς (Riley, E., McGee, C., 2005). Ερευνητές χρησιμοποιώντας βιοπτικό υλικό και μεθόδους απεικόνισης του εγκεφάλου έχουν ταυτοποιήσει διαφορές μεταξύ προγεννητικά εκτεθειμένων και μη εκτεθειμένων παιδιών στο μέγεθος και το σχήμα του εγκεφάλου, αλλά και σε μεμονωμένες δομές όπως είναι ο μετωπιαίος, ο βρεγματικός και ο κροταφικός λοβός, το μεσολόβιο, το ραβδωτό σώμα (αλλαγές τόσο στον κερκοφόρο πυρήνα όσο και στο κέλυφος), ο ιππόκαμπος, η αμυγδαλή (Gil-Mohapel, J., και συν., 2010) και η παρεγκεφαλίδα (Nuñez, C., και συν., 2011, Astley, S., και συν., 2009, Riley, E., McGee, C., 2005). Ομοίως, οι αντίστοιχες περιοχές των επίμυων παρουσιάζουν

ουσιαστικές διαφορές μεταξύ ζώων ελέγχου και μοντέλων προγεννητικής ή/και μεταγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη.

Μέσος Προμετωπιαίος Φλοιός (medial Prefrontal Cortex, mPFC)

Ανατομία

Ο μέσος προμετωπιαίος φλοιός των επίμων αντιπροσωπεύει την ανάλογη στον άνθρωπο περιοχή του ραχαιοπλάγιου προμετωπιαίου φλοιού (Tang, S., και συν., 2019). Αποτελείται από τέσσερις διακριτές, νευροανατομικά και κυτταροαρχιτεκτονικά, υποπεριοχές κατά μήκος του ραχαιο-κοιλιακού άξονα οι οποίες είναι (Heidbreder, C., Groenewegen, H., 2003):

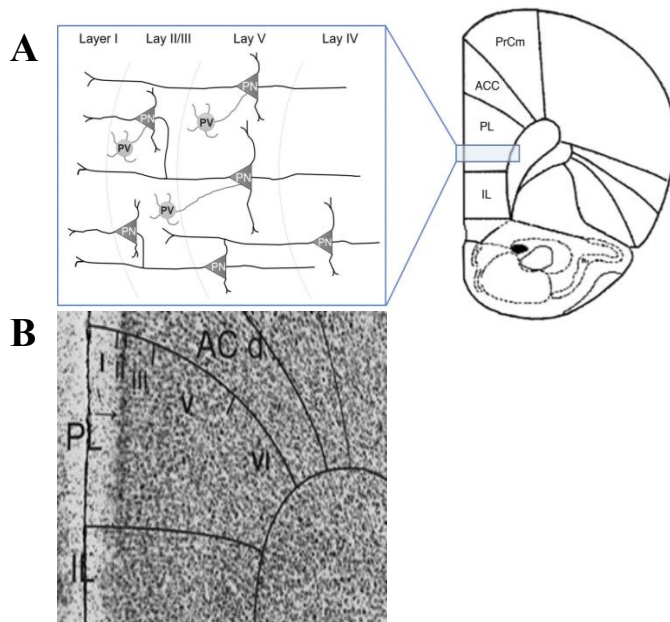
- η μέση προκεντρική περιοχή (medial precentral area, PrCm) ή περιοχή 2 του πρόσθιου φλοιού (frontal cortex area 2, FR2)
- ο πρόσθιος προσαγωγίος φλοιός (anterior cingulate cortex, ACC)
- ο προμεταιχμιακός φλοιός (prelimbic cortex, PL)
- ο κατώτερος μεταιχμιακός φλοιός (infralimbic cortex, IL)

Οργανώνεται, παράλληλα, σε έξι διακριτές στιβάδες (I–VI, Εικόνα 7). Η στιβάδα I του μέσου προμετωπιαίου φλοιού εντοπίζεται ακριβώς κάτω από τη χοριοειδή μήνιγγα και αποτελείται από μικρό αριθμό νευρώνων και κυττάρων της γλοίας, αλλά και από άφθονους κορυφαίους δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων από τις κατώτερες στιβάδες και αξονικές απολήξεις από εγγύς περιοχές του νεοφλοιού και του θαλάμου (Muralidhar, S., και συν., 2014). Στις στιβάδες II/III και οι στιβάδες V/VI εντοπίζονται πυραμιδικοί νευρώνες των οποίων οι κορυφαίοι δενδρίτες καταλήγουν στη στιβάδα I και δέχονται πληροφορίες από πολλές εγκεφαλικές περιοχές. Το συγκεκριμένο πρότυπο οργάνωσης σε στιβάδες του μέσου προμετωπιαίου φλοιού παρουσιάζει διαφορές μεταξύ των υποπεριοχών του οι οποίες αφορούν, κυρίως, στην οργάνωση των κυττάρων και στο εύρος των στιβάδων. Στις διαφορές αυτές οφείλεται και ο καθορισμός των ορίων της κάθε υποπεριοχής (Van De Werd, H.J., και συν., 2010).

Τύποι κυττάρων

Ο μέσος προμετωπιαίος φλοιός αποτελείται κυρίως από διεγερτικούς πυραμιδικούς νευρώνες (~80-90% του συνολικού πληθυσμού) και ανασταλτικούς

ενδονευρώνες (~10-20%) που εκλύουν γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA, Εικόνα 7). Τα πυραμιδικά κύτταρα εντοπίζονται κυρίως στις στιβάδες II έως VI και παρουσιάζουν διαφορές στο μέγεθος του κυτταρικού σώματος, στη δενδριτική μορφολογία και στις ιδιότητες πυροδότησής τους μεταξύ των διάφορων στιβάδων. Όσον αφορά στους ενδονευρώνες του μέσου προμετωπιαίου φλοιού, εκείνοι καταστέλλουν και ρυθμίζουν τη δραστηριότητα των κυττάρων του φλοιού, συμπεριλαμβανομένων των πυραμιδικών νευρώνων (Kawaguchi, Y., Kubota, Y., 1997). Χωρίζονται σε αρκετούς υποπληθυσμούς με βάση τις φυσιολογικές ιδιότητες τους και την έκφραση χαρακτηριστικών -για κάθε είδος ενδονευρώνα- πρωτεϊνών-δεικτών συμπεριλαμβανομένης της παρβαλβουμίνης (parvalbumin, PV), της σωματοστατίνης (somatostatin, SST) και της χολοκυστοκινίνης (cholecystokinin, CCK). Οι ενδονευρώνες που εκφράζουν παρβαλβουμίνη αντιπροσωπεύουν περισσότερο από το 40% του συνολικού πληθυσμού των ενδονευρώνων και έχει βρεθεί ότι ρυθμίζουν τη λειτουργία των πυραμιδικών νευρώνων και τις ταλαντώσεις θήτα. Το σύνολο των παραπάνω κυττάρων συμμετέχουν συνεργατικά για τη διαμόρφωση μιας σειράς συμπεριφορών (Xu, P., και συν., 2019).



Εικόνα 7: **A.** Σχηματική αναπαράσταση της δομής των διαφορετικών περιοχών και στιβάδων του mPFC (Xu, P., et al., 2019). **B.** Χρώση για τα σωματίδια Nissl του mPFC και διάκριση των στιβάδων I-VI στον προμετωπιακό φλοιό (Van De Werd, H.J., και συν., 2010). *Συντμήσεις: PrCm: medial precentral area, ACC: anterior cingulate cortex, PL: prelimbic cortex, IL: infralimbic cortex, PN: pyramidal neurons, PV: parvalbumin interneurons.*

Ρόλος

Ο μέσος προμετωπιαίος φλοιός θεωρείται ότι ασκεί έλεγχο σε ποικίλες εγκεφαλικές λειτουργίες συνδέοντας περιοχές του εγκεφάλου μεταξύ τους, έτσι ώστε να ενεργοποιεί σύνθετες νοητικές διαδικασίες, όπως η εκτελεστική λειτουργία, και να έχει γενικότερα ένα σημαντικό ρόλο στην ανώτερη απαρτίωση. Ο γενικευμένος όρος εκτελεστική λειτουργία έχει πολλούς ορισμούς, αλλά μια κοινή εξήγηση περιλαμβάνει τη συμμετοχή ανώτερης τάξεως νοητικών διαδικασιών ώστε να επιτρέψουν σε ένα άτομο να λειτουργεί ανεξάρτητα, σκόπιμα και στοχευμένα. Έτσι, ένα εύρος νοητικών λειτουργιών δρα συνεργατικά για την εκτέλεση διαδικασιών όπως ο ανασταλτικός έλεγχος¹, η επίλυση προβλημάτων, η ταυτόχρονη διεκπεραίωση πολλών εργασιών (multitasking), η λήψη αποφάσεων, η μνήμη εργασίας, η χωρική μνήμη και η μακροπρόθεσμη μνήμη, η ικανότητα διατήρησης της προσοχής, η διαμόρφωση των συνηθειών, η κοινωνική συμπεριφορά και η νοητική/συμπεριφορική ευελιξία (Jobson, D., και συν., 2021).

Βλάβη του μέσου προμετωπιαίου φλοιού συνεπάγεται δυσλειτουργία των παραπάνω συμπεριφορών και έχει ταυτοποιηθεί σε διάφορες νευρολογικές και ψυχιατρικές διαταραχές, όπως η κατάθλιψη, οι αγχώδεις διαταραχές, η σχιζοφρένεια, το φάσμα διαταραχών του αυτισμού (Autism Spectrum Disorders, ASDs), η νόσος του Alzheimer, η νόσος του Πάρκινσον και ο εθισμός (Xu, P., και συν., 2019).

Επιδράσεις της έκθεσης στην αιθανόλη στο μέσο προμετωπιαίο φλοιό

Ο εθισμός σε ουσίες, τα προβλήματα στον ανασταλτικό έλεγχο, η κακή απόδοση σε δοκιμές αξιολόγησης της νοημοσύνης, τα ελλείμματα στην κοινωνική συμπεριφορά και σε εκτελεστικές λειτουργίες, όπως η νοητική ευελιξία και η μνήμη εργασίας, που παρατηρούνται σε παιδιά με FASD υποδηλώνουν την ύπαρξη αλλαγών σε περιοχές του εγκεφάλου που συμμετέχουν στη ρύθμιση των συμπεριφορών αυτών όπως είναι ο μέσος προμετωπιαίος φλοιός (Tang, S., και συν., 2019, Lawrence, C., και συν., 2011, Mihalick, S., και συν., 2001).

¹ Ο ανασταλτικός έλεγχος επιτρέπει σε ένα άτομο να αναστέλλει φυσικές, συνήθειες ή κυρίαρχες συμπεριφορικές αποκρίσεις σε ερεθίσματα προκειμένου να επιλέξει την καταλληλότερη συμπεριφορά που συνάδει με την ολοκλήρωση των στόχων του (Anderson, M. C., Weaver, C., 2009). Η μνήμη εργασίας αφορά τη βραχυπρόθεσμη αποθήκευση και διαχείριση πληροφοριών που απαιτούνται για τη διεκπεραίωση περίπλοκων νοητικών λειτουργιών και, τέλος, η νοητική/συμπεριφορική ευελιξία αποτελεί μια βασική εκτελεστική λειτουργία που μεσολαβείται από το μέσο προμετωπιαίο φλοιό και μπορεί να οριστεί ως η ικανότητα προσαρμογής της συμπεριφοράς ανάλογα με τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα (Jobson, D., και συν., 2021).

Ειδικότερα, η προγεννητική έκθεση στο αλκοόλ είναι γνωστό πως παρεμβαίνει στην ανάπτυξη του μετωπιαίου λοβού. Σε παιδιά τα οποία εκτέθηκαν προγεννητικά σε αλκοόλ έχει αναφερθεί δυσμορφία του μετωπιαίου λοβού, αλλά και μεταβολές στον όγκο και το πάχος του. Σε ζωικά μοντέλα, η προγεννητική έκθεση σε αιθανόλη οδηγεί σε σημαντική μείωση του αριθμού των νευρώνων στις στιβάδες II και V του μέσου προμετωπιαίου φλοιού με ταυτόχρονη αύξηση του αριθμού των GABAεργικών ενδονευρώνων, υποδηλώνοντας μια αλλαγή στην ισορροπία μεταξύ διέγερσης και αναστολής η οποία πιθανώς επηρεάζει τη λειτουργία του (Tang, S., και συν., 2019). Η μείωση του αριθμού των κυττάρων στις στιβάδες II και V του μέσου προμετωπιαίου φλοιού σχετίζεται με ελλείμματα σε εκτελεστικές λειτουργίες που παρατηρούνται σε επίμυες. Επιπλέον, οι κομπλεξίνες/συναφίνες I και II, ρυθμιστές της Ca^{2+} -εξαρτώμενης νευροδιαβίβασης, μειώνονται σημαντικά στο μέσο προμετωπιαίο φλοιό επίμυων οι οποίοι εκτέθηκαν σε αιθανόλη κατά την προγεννητική περίοδο. Δεδομένου ότι η συναφίνη II εντοπίζεται σε αξοδενδριτικές συνάψεις, τα παραπάνω ευρήματα υποδηλώνουν ότι η έκθεση στην αιθανόλη κατά την ανάπτυξη προκαλεί μείωση στον αριθμό των συνάψεων στο μέσο προμετωπιαίο φλοιό (Lawrence, C., και συν., 2011).

Παράλληλα, μελέτες λειτουργικής μαγνητικής τομογραφίας (functional MRI, fMRI) σε παιδιά αναφέρουν μεταβολές στη λειτουργική συνδεσιμότητα του μετωπιαίου φλοιού με περιοχές των βασικών γαγγλίων όπως το κέλυφος του κερκοφόρου πυρήνα, μια υποπεριοχή του ραβδωτού σώματος κρίσιμη για την οργάνωση της κίνησης, το ραχιαίο κερκοφόρο πυρήνα, μια υποπεριοχή του ραβδωτού σώματος που εμπλέκεται στην εκτελεστική λειτουργία, και το μεσοραχιαίο πυρήνα του θαλάμου που επίσης συμβάλλει στην εκτελεστική λειτουργία. Η μεταβολή στη λειτουργική συνδεσιμότητα του μέσου προμετωπιαίου φλοιού και του θαλάμου έχει ταυτοποιηθεί και σε επίμυες οι οποίοι εκτέθηκαν προγεννητικά σε αλκοόλ. Ειδικότερα, έχουν παρατηρηθεί αλλαγές στη δενδριτική μορφολογία των πυραμιδικών νευρώνων της στιβάδας III οι οποίοι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ενσωμάτωση και οργάνωση των πληροφοριών που εισέρχονται από το θάλαμο. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται μείωση των δενδριτικών ακανθών στους βασικούς και κορυφαίους δενδρίτες των νευρώνων αυτών στο μέσο προμετωπιαίο φλοιό επίμυων οι οποίοι εκτέθηκαν σε

αλκοόλ κατά την ανάπτυξη (Tang, S., και συν., 2019, Lawrence, C., και συν., 2011).

Ιππόκαμπος

Ανατομία και τύποι κυττάρων

Ο ιππόκαμπος βρίσκεται τοποθετημένος στην έσω επιφάνεια του κροταφικού λοβού. Έχει επίμηκες σχήμα το οποίο παρομοιάζεται με το γράμμα C και αποτελείται από 2 βασικές περιοχές: το αμμόνιο κέρασ ή κυρίως ιππόκαμπο και την οδοντωτή έλικα.

Η οδοντωτή έλικα απαρτίζεται από τρεις στιβάδες:

- ❖ εξωτερικά η *μοριακή στιβάδα (molecular layer)* η οποία καταλαμβάνεται κυρίως από τους δενδρίτες των κοκκωδών κυττάρων, από καλαθοειδή και διάφορα πολύμορφα κύτταρα, καθώς και από τερματικές αξονικές απολήξεις διάφορων περιοχών
- ❖ ενδιάμεσα η *στιβάδα των κοκκωδών κυττάρων (granule cell layer)* η οποία αποτελείται από τα σώματα των κοκκωδών κυττάρων, τον κύριο κυτταρικό τύπο της οδοντωτής έλικας και
- ❖ εσωτερικά η *στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων (polymorphic layer ή hilus)* περικλείεται από τη στιβάδα των κοκκωδών κυττάρων που έχει σχήμα όμοιο με το γράμμα V ή U και περιέχει τα βρυώδη και τα ατρακτοειδή κύτταρα.

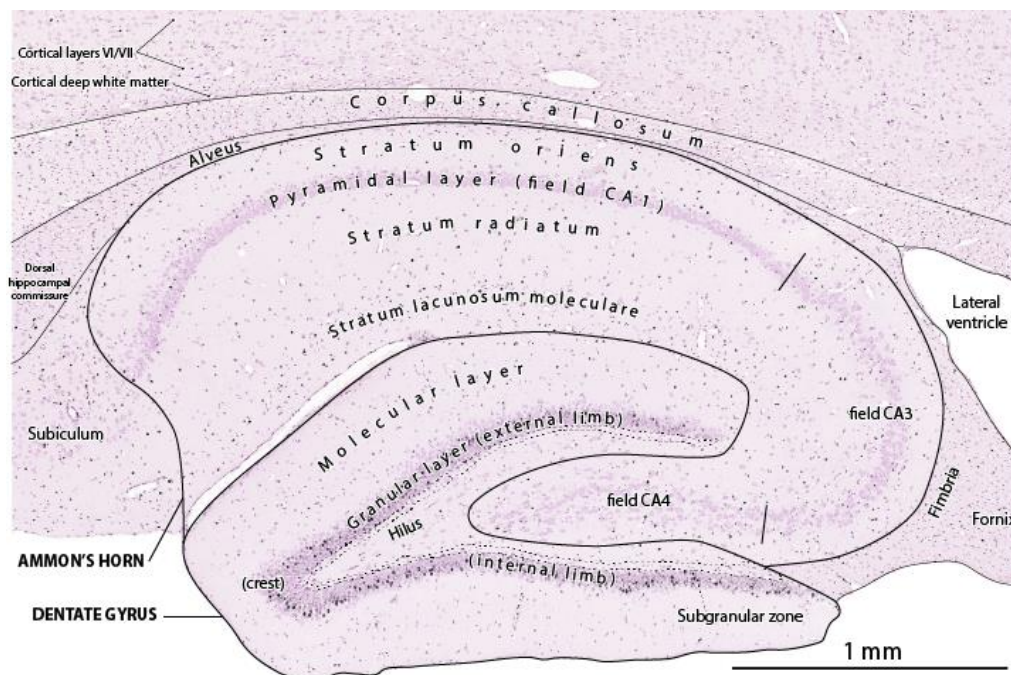
Τα κοκκώδη κύτταρα χαρακτηρίζονται από ελλειπτικού σχήματος κυτταρικό σώμα και αποτελούν διεγερτικά κύτταρα τα οποία χρησιμοποιούν ως κύριο νευροδιαβιβαστή το γλουταμινικό οξύ (Cappaert, N., και συν., 2015). Οι άξονές τους ονομάζονται βρυώδεις ίνες (mossy fibers) και επικοινωνούν με τους εγγύς δενδρίτες των νευρώνων του CA3 πεδίου (Schultz, C., Engelhardt, M., 2014). Κάθε κοκκώδες κύτταρο είναι σε στενή γεινίαση με τα υπόλοιπα κοκκώδη κύτταρα. Ο αριθμός των συγκεκριμένων κυττάρων φαίνεται να εξαρτάται από την ηλικία καθώς ο πολλαπλασιασμός τους συνεχίζεται με αργό ρυθμό και στην ενήλικη ζωή (Cappaert, N., και συν., 2015).

Στις στιβάδες της οδοντωτής έλικας εντοπίζονται ενδονευρώνες, ανασταλτικοί νευρώνες, που εκλύουν γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA). Στην οδοντωτή έλικα, ως κύριο τύπο ενδονευρώνων ορίζονται τα *καλαθοειδή κύτταρα* των οποίων τα κυτταρικά σώματα εντοπίζονται στο όριο μεταξύ της κοκκώδους στιβάδας και της στιβάδας των πολύμορφων κυττάρων και τα *αξο-αξονικά κύτταρα* της μοριακής στιβάδας που καταλήγουν στην ζώνη έκφυσης των αξόνων των κοκκωδών κυττάρων (Freund, T. F., Buzsáki, G. 1998).

Το αμμώνιο κέρασ συνίσταται από τα πεδία CA1-CA4 (Cornu Ammonis, CA). Τα πεδία CA1 και CA3 αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος του ιππόκαμπου. Οι νευρώνες στο CA1 πεδίο είναι συγκριτικά μικρότεροι, όσον αφορά στην επιμήκη διάστασή τους, από τις υπόλοιπες περιοχές, αλλά ο υποπληθυσμός των πυραμιδικών κυττάρων είναι πιο ομοιογενής (Cappaert, N., και συν., 2015). Το CA2 πεδίο, που βρίσκεται ανάμεσα στα CA1 και CA3, περιέχει ένα στενό, συμπαγές στρώμα πυραμιδικών κυττάρων του οποίου τα όρια δύσκολα καθορίζονται, ιδίως στον ανθρώπινο εγκέφαλο. Όσον αφορά στο CA3 πεδίο, είναι χαρακτηριστική η προβολή των αξόνων των πυραμιδικών κυττάρων μέσω των ινών Schaffer στους δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων του CA1 πεδίου (Schultz, C., Engelhardt, M., 2014, Neves, C., και συν., 2008). Ο όρος CA4 πεδίο αναφέρεται μόνο στον άνθρωπο, αφορά στη στοιβάδα των πολύμορφων κυττάρων της οδοντωτής έλικας. Η χρήση του όρου αυτού συχνά αποφεύγεται στον άνθρωπο ενώ δεν χρησιμοποιείται για άλλα θηλαστικά.

Τα πυραμιδικά κύτταρα των πεδίων του ιππόκαμπου συνιστούν προβλητικούς νευρώνες και αποτελούν τη συντριπτική πλειοψηφία των νευρώνων στην πυραμιδική στιβάδα. Τα πυραμιδικά κύτταρα του ιππόκαμπου έχουν ένα βασικό δενδριτικό δέντρο που εκτείνεται στη στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων (*stratum oriens*) και ένα κορυφαίο δενδριτικό δέντρο που εκτείνεται μέχρι τη σχισμή (*fissure*) του ιππόκαμπου. Είναι διεγερτικοί νευρώνες οι οποίοι δέχονται ανασταλτικές (GABA) και διεγερτικές (γλουταμινικό οξύ) συνάψεις (Schultz, C., Engelhardt, M., 2014). Σε αντιστοιχία με την οδοντωτή έλικα, στα πεδία του κυρίως ιππόκαμπου εντοπίζονται ανασταλτικοί ενδονευρώνες όπως είναι τα *καλαθοειδή κύτταρα*, οι *διστιβαδωτοί (bistratified) ενδονευρώνες* που εκφράζουν *παρβαλβουμίνη*, τα *O-LM κύτταρα* και τα *κύτταρα πολυελαίου (chandelier)*, Cappaert, N., και συν., 2015).

Η οργάνωση σε στιβάδες είναι γενικά παρόμοια σε όλα πεδία του ιππόκαμπου (Εικόνα 8). Η κύρια κυτταρική στιβάδα ονομάζεται *στιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων* (*pyramidal cell layer*). Εξωτερικά της στιβάδας των πυραμιδικών κυττάρων σε οβελιαίες τομές βρίσκεται η *στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων* (*stratum oriens*) η οποία είναι σχετικά στενή. Πέρα από την στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων εντοπίζεται μία λεπτή στιβάδα λευκής ουσίας που ονομάζεται *σκάφη* (*alveus*) η οποία συνίσταται από τους νευράξονες των πυραμιδικών και πολύμορφων νευρώνων του υποθέματος (*subiculum*) και του κυρίως ιππόκαμπου. Εσωτερικά της στιβάδας των πυραμιδικών κυττάρων βρίσκεται η *ακτινωτή στιβάδα* (*stratum radiatum*) στην οποία εντοπίζονται οι ίνες του Schaffer. Στο πεδίο CA3, αλλά όχι στα CA2 και CA1 πεδία, μια στενή ακυτταρική ζώνη, που ονομάζεται *διαυγής στιβάδα* (*stratum lucidum*) εντοπίζεται ενδιάμεσα της πυραμιδικής και της ακτινωτής στιβάδας και καταλαμβάνεται από τις βρυώδεις ίνες (*mossy fibers*) οι οποίες όπως προαναφέρθηκε αποτελούν τους νευράξονες των κοκκωδών κυττάρων της οδοντωτής έλικας. Εσωτερικά της ακτινωτής στιβάδας βρίσκεται η *βοθριώδης-μοριακή στιβάδα* (*stratum lacunosum-moleculare*) στην οποία καταλήγουν οι διατιτραίνουσες ίνες (*perforant pathway fibers*) από τον ενδορρινικό φλοιό (Cappaert, N., και συν., 2015, Schultz, C., Engelhardt, M., 2014).



Εικόνα 8: Βασικές περιοχές και στιβάδες του ιππόκαμπου. (<https://braindevelopmentmaps.org/home/brain-map-sets/postnatal-neurogenesis-in-the-developing-hippocampus/>).

Ρόλος

Ο ιππόκαμπος έχει καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία της μνήμης και της μάθησης καθώς εμπλέκεται στην αποθήκευση της μνήμης και στην ανάκληση πληροφοριών. Ο ιππόκαμπος αποθηκεύει προσωρινά και μετατρέπει την βραχυπρόθεσμη μνήμη σε μακροπρόθεσμη μέχρι αυτή να μεταφερθεί σε ειδικές περιοχές του φλοιού για τη μόνιμη αποθήκευση της (Makino, Y., και συν., 2019). Παράλληλα, η ανατομική αλλά και λειτουργική σύνδεσή του με περιοχές του εγκεφάλου που είναι σημαντικές για τη λήψη αποφάσεων, εκτελεστικές λειτουργίες και την κοινωνική συμπεριφορά, δίνει έμφαση στη συμβολή του ιππόκαμπου σε ένα εκτεταμένο δίκτυο εγκεφαλικών δομών που επιτρέπει την ευέλικτη και προσαρμοστική συμπεριφορά (Rubin, R., και συν., 2014).

Επίδραση της προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη στον ιππόκαμπο

Οι διαταραχές στη συμπεριφορά που παρατηρούνται σε παιδιά με εμβρυϊκό αλκοολικό σύνδρομο περιλαμβάνουν προβλήματα στη χωρική μνήμη η οποία συνδέεται συνήθως με δυσλειτουργία του ιππόκαμπου. Ομοίως, μοντέλα τρωκτικών του FASD επισημαίνουν αλλαγές στις συμπεριφορές που εξαρτώνται από τον ιππόκαμπο, συμπεριλαμβανομένης της χωρικής μάθησης και της μνήμης εργασίας. Μελέτες νευροαπεικόνισης υποδεικνύουν τον σημαντικά μειωμένο όγκο του ιππόκαμπου σε παιδιά με FASD ενώ αντίστοιχη μείωση του όγκου του ιππόκαμπου, έχει παρατηρηθεί σε έμβρυα ποντικών έπειτα από μία ημέρα προγεννητικής έκθεσης στο αλκοόλ (O'Leary-Moore, S., και συν., 2010).

Είναι ευρέως γνωστό πως ο ιππόκαμπος αποτελεί μια περιοχή του εγκεφάλου που είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στις επιδράσεις της αιθανόλης κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Ειδικότερα, στους επίμυες η έκθεση στην αιθανόλη κατά τη διάρκεια της ταχείας ανάπτυξης του εγκεφάλου, η οποία εκτυλίσσεται στις ισοδύναμες του τρίτου τριμήνου της ανθρώπινης κύησης μεταγεννητικές ημέρες, προκαλεί σημαντική απώλεια των κυττάρων του ιππόκαμπου (Ikonomidou, C., και συν., 2000, Klintsova, A., και συν., 2007). Η συγκεκριμένη μείωση έχει παρατηρηθεί σε μοντέλα επίμυων τα οποία εκτέθηκαν σε αλκοόλ κατά την ανάπτυξη στα πυραμιδικά κύτταρα των CA1 και CA3 πεδίων του ιππόκαμπου ενώ η έκθεση στην αιθανόλη κατά τις πρώιμες μεταγεννητικές ημέρες έχει δείχθει ότι προκαλεί τη μόνιμη απώλεια των νευρώνων ειδικά στο CA1 πεδίο του ιππόκαμπου.

Παράλληλα, η νευρογένεση στην οδοντωτή έλικα του ιππόκαμπου η οποία εξακολουθεί να υφίσταται κατά την ενήλικη ζωή, επηρεάζεται από την έκθεση στην αιθανόλη και επιβεβαιώνει την παρατήρηση της μείωσης του αριθμού των κυττάρων του ιππόκαμπου (Gil-Mohapel, J., και συν., 2010). Συνολικά, καθίσταται εμφανές ότι η απώλεια των κυττάρων του ιππόκαμπου είναι αποτέλεσμα της έκθεσης στο αλκοόλ κατά τη διάρκεια της πρώιμης μεταγεννητικής περιόδου (PNDs 4-10).

Αμυγδαλή

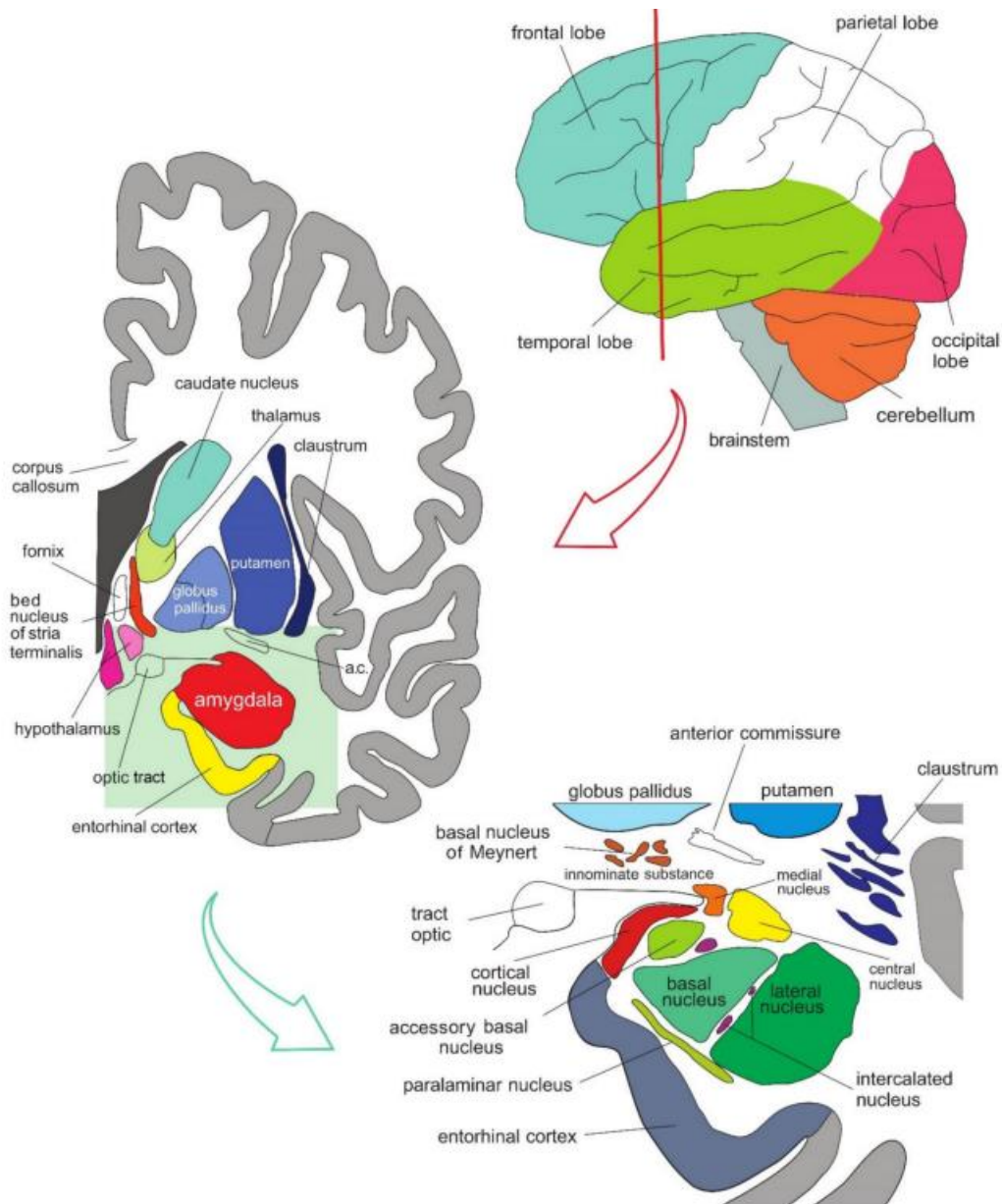
Ανατομία

Η αμυγδαλή, όπως υποδηλώνει και η ονομασία της, αποτελεί μία αμυγδαλοειδούς σχήματος δομή του μέσου κροταφικού λοβού και μέρος του μεταχιακού συστήματος μαζί με τον ιππόκαμπο, τον υποθάλαμο, την παραϊπποκάμπεια έλικα, την ψαλίδα (fornix), την έλικα του προσαγωγίου (cingulate gyrus) και τον επικλινή πυρήνα του διαφράγματος (Rainnie, D., Asprodini, E., Shinnick-Gallagher, P., 1992). Συνίσταται από περίπου 13 πυρήνες οι οποίοι διαχωρίζονται βάση της κυτταροαρχιτεκτονικής και των συνδέσεών τους με άλλες περιοχές του εγκεφάλου (Sah, P., και συν., 2003).

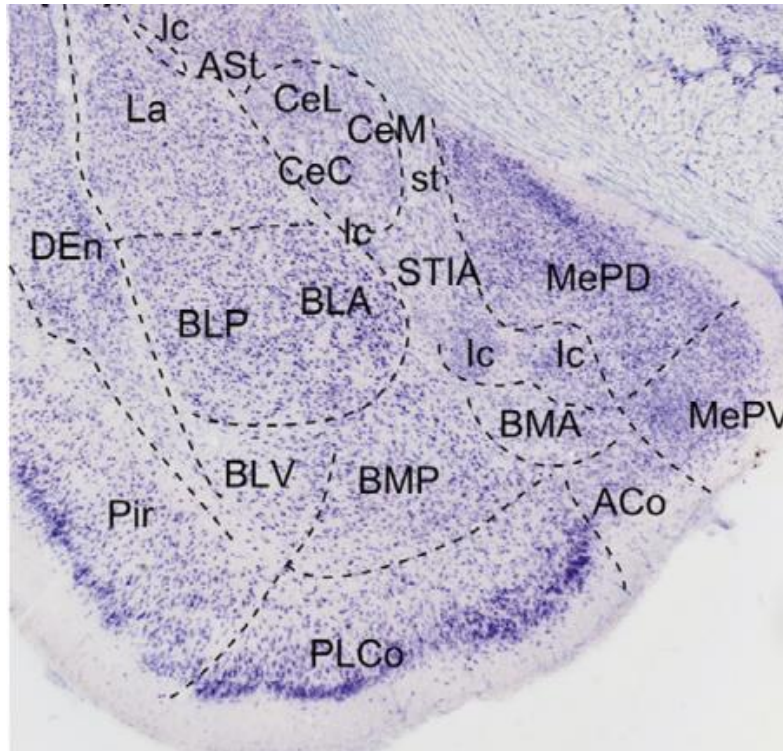
Στην παρούσα πτυχιακή εργασία εστίασαμε την προσοχή μας στον Έξω-Βασικό αμυγδαλοειδή πυρήνα (Basolateral nucleus, BL) και στον Έσω-Βασικό αμυγδαλοειδή πυρήνα (Basomedial nucleus, BM, Εικόνα 10). Ο έξω-βασικός αμυγδαλοειδής πυρήνας διακρίνεται σε πρόσθιο (Basolateral Anterior, BLA), οπίσθιο (Basolateral Posterior, BLP) και κοιλιακό (Basolateral Ventral, BLV) ενώ ο έσω-βασικός αμυγδαλοειδής πυρήνας διακρίνεται σε πρόσθιο (Basomedial Anterior, BMA) και οπίσθιο (Basomedial Posterior, BMP, Olucha-Bordonau, F., και συν., 2015).

Ο πρόσθιος και ο οπίσθιος έξω-βασικός αμυγδαλοειδής πυρήνας αποτελούνται από σφαιρικού σχήματος κυτταρικά σώματα αλλά στον BLA τα κύτταρα είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος από εκείνα του BLP, δικαιολογώντας τις ονομασίες μεγαλοκυτταρικά (magnocellular, BLA) και μικροκυτταρικά (parvocellular, BLP). Αντιθέτως, ο κοιλιακός έξω-βασικός αμυγδαλοειδής πυρήνας απαρτίζεται από ατρακτοειδή κύτταρα. Όσον αφορά στον πρόσθιο έσω-βασικό αμυγδαλοειδή

πυρήνα, αυτός αποτελείται από μικρού μεγέθους, πυκνά τοποθετημένους νευρώνες ενώ ο οπίσθιος περιέχει αραιά τοποθετημένα και μεγάλα σε μέγεθος κύτταρα (Olucha-Bordonau, F., και συν., 2015).



Εικόνα 9: Απλοποιημένη αναπαράσταση του εντοπισμού, της δομής και των πυρήνων της αμυγδαλής στον εγκέφαλο (Šimic, G., και συν., 2021).



Εικόνα 10: Κυτταροαρχιτεκτονική της αμυγδαλής επίμυος (Olucha-Bordonau, F., και συν., 2015).

Τύποι κυττάρων

Στην αμυγδαλή εντοπίζονται δύο κύριοι τύποι νευρώνων. Ο πρώτος τύπος συνιστά περίπου το 70% του συνολικού κυτταρικού πληθυσμού και αποτελεί πυραμιδικούς νευρώνες (Rainnie, D., Asprodini, E., Shinnick-Gallagher, P., 1992). Ο δεύτερος κύριος κυτταρικός τύπος που εντοπίζεται στους έξω και έσω-βασικούς πυρήνες της αμυγδαλής αποτελεί ανασταλτικούς ενδονευρώνες. Σε αντιστοιχία με τους ενδονευρώνες άλλων περιοχών, τα κύτταρα αυτά εκφράζουν πρωτεΐνες οι οποίες συνδέονται με ασβέστιο. Περίπου το 1/2 των ενδονευρώνων εκφράζουν παρβαλβουμίνη ενώ το υπόλοιπο 1/2 εκφράζουν καλμπιντίνη και/ή καλρετινίνη, προτείνοντας ότι υπάρχουν διαφορετικών ειδών ενδονευρώνες στους πυρήνες της αμυγδαλής (Sah, P., και συν., 2003).

Ρόλος

Ο πρωταρχικός ρόλος της αμυγδαλής αφορά στην προσαρμογή του ατόμου στο περιβάλλον όπου αρνητικά συναισθήματα συνεπάγονται αυξημένη δραστηριότητα της αμυγδαλής ενώ θετικά συναισθήματα σχετίζονται με μείωση της δραστηριότητά της. Μη φυσιολογική λειτουργία της αμυγδαλής σχετίζεται με

διαταραγμένη ρύθμιση των συναισθημάτων του φόβου και της επιθετικότητας. Όσον αφορά στο φόβο, η αμυγδαλή θεωρείται μία θεμελιώδης δομή για την προετοιμασία του οργανισμού να αντιδράσει στον κίνδυνο (fight-or-flight response) αλλά και στη μάθηση που σχετίζεται με το φόβο (Kozanian, O., και συν., 2018). Εξαιτίας του ρόλου της στην απόκριση στο φόβο, η αμυγδαλή θεωρείται κρίσιμη στη συναισθηματική μνήμη (emotional memory, Šimic, G., και συν., 2021).

Η δραστηριότητα του πρόσθιου έξω-βασικού αμυγδαλοειδή πυρήνα αυξάνεται στις αγχώδεις διαταραχές. Πιο συγκεκριμένα, η διέγερση των γλουταμινεργικών νευρώνων της συνεπάγεται την εκδήλωση άγχους ενώ η διέγερση των ανασταλτικών GABAεργικών νευρώνων του κεντρικού αμυγδαλοειδή πυρήνα (Central amygdala, CE) μειώνει το άγχος. Επιπλέον, ο πρόσθιος έξω-βασικός αμυγδαλοειδής πυρήνας θεωρείται πως ρυθμίζει κοινωνικές συμπεριφορές (Šimic, G., και συν., 2021). Τέλος, όσον αφορά στο πρόσθιο έσω-βασικός αμυγδαλοειδής πυρήνας η δραστηριότητά του καταστέλλει το επαγόμενο από το φόβο «πάγωμα» (fear-related freezing) και τα υψηλά επίπεδα άγχους (Kozanian, O., και συν., 2018).

Επίδραση της προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη στην αμυγδαλή

Ορισμένες φάσεις της ανάπτυξης της αμυγδαλής είναι ιδιαίτερα ευάλωτες στις νευροτοξικές επιδράσεις της προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη. Συγκεκριμένοι πυρήνες της αμυγδαλής, όπως ο έσω-βασικός αμυγδαλοειδής πυρήνας και ο έξω και βασικός αμυγδαλοειδής πυρήνας, μειώνονται δραματικά σε όγκο έπειτα από προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη, μείωση η οποία σχετίζεται με αύξηση της πυκνότητας των κυττάρων. Αυτές οι αλλαγές αντιστοιχούν σε διαταραχή στη μάθηση που σχετίζεται με το φόβο. Επιπρόσθετα, η μείωση του όγκου της αμυγδαλής έχει συσχετιστεί με συμπτώματα κατάθλιψης, άγχους και αυτισμού, αλλά και με διαταραχές στις κοινωνικές και επικοινωνιακές δεξιότητες που χαρακτηρίζουν πολλούς ανθρώπους με FASD. Έχει βρεθεί πως οι βλάβες στον έξω και βασικό αλλά και στον κεντρικό αμυγδαλοειδή πυρήνα κατά την ανάπτυξη οφείλονται για τις διαταραχές στις κοινωνικές αλληλεπιδράσεις των ατόμων με FASD (Kozanian, O., και συν., 2018). Τέλος, έχει παρατηρηθεί έντονος, αποπτωτικού τύπου, νευροεκφύλιση στον κεντρικό αμυγδαλοειδή πυρήνα

(Central Amygdala, CE) σε ζώα που εκτέθηκαν σε αιθανόλη κατά τη διάρκεια της προγεννητικής ή της μεταγεννητικής περιόδου. Η εκφύλιση αυτή οφείλεται για τη μείωση της συχνότητας ενεργών κοινωνικών αλληλεπιδράσεων σε αρσενικά ζώα, μειωμένη επιθετική συμπεριφορά και αυξημένη συμπεριφορά που μοιάζει με άγχος (Balaszczuk, V., και συν., 2011).

Εμβρυϊκό Αλκοολικό Σύνδρομο και Φλεγμονή

Βιβλιογραφικά στοιχεία αναφέρουν πως σε ζωικά μοντέλα FASD η αιθανόλη επάγει την ενεργοποίηση των αστροκυττάρων και της μικρογλοίας και αυξάνει την παραγωγή φλεγμονωδών μορίων και δραστικών ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) στο αναπτυσσόμενο ΚΝΣ (Kane, C., Drew, P., 2021). Τα εκκρινόμενα αυτά προϊόντα των ενεργοποιημένων αστροκυττάρων και των κυττάρων της μικρογλοίας είναι δυνατό να προκαλέσουν νευροτοξικότητα και επερχόμενο κυτταρικό θάνατο των νευρώνων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης που μπορεί να οδηγήσει σε συμπεριφορικές διαταραχές που εμφανίζονται στις FASD (Alfonso-Loeches, S., Guerri, C., 2011). Το σηματοδοτικό μονοπάτι του Toll-like receptor 4 (TLR4) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επαγόμενη από το αλκοόλ παραγωγή των φλεγμονωδών κυτταροκινών και δραστικών ριζών οξυγόνου από τα ενεργοποιημένα αστροκύτταρα και τα κύτταρα της μικρογλοίας σε διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου. Οι περισσότερες μελέτες προτείνουν ότι η έκταση της φλεγμονής και η νευροεκφύλιση παρουσιάζουν ειδικότητα όσον αφορά τις εγκεφαλικές περιοχές όπου παρατηρούνται, με τις περιοχές του μετωπιαίου και προμετωπιαίου φλοιού, του μεταιχμιακού συστήματος, του ιππόκαμπου και της παρεγκεφαλίδας να επηρεάζονται περισσότερο από την κατανάλωση αλκοόλ συγκριτικά με άλλες εγκεφαλικές περιοχές (Szabo, G., Lippai, D., 2014).

Κατηγοριοποίηση, φυσιολογικός ρόλος και προέλευση των αστροκυττάρων

Τα κύτταρα του ΚΝΣ των ενηλίκων κατηγοριοποιούνται σε δύο κύριες ομάδες: τους νευρώνες και τη γλοία. Τα νευρογλοιακά κύτταρα (ολιγοδενδροκύτταρα, μικρογλοία και αστροκύτταρα) μοιράζονται ένα κοινό χαρακτηριστικό: την αδυναμία παραγωγής νευρικών ώσεων (Giovannoni, F., Quintana, F., 2020).

Φυσιολογικά, τα νευρογλοιακά κύτταρα προστατεύουν τους νευρώνες του ΚΝΣ και διατηρούν την ομοιόσταση. Εκκρίνουν επιλεκτικά νευροτροφικούς παράγοντες, απομακρύνουν τοξικά μόρια και κυτταρικά θραύσματα, προωθούν τη νευροδιαβίβαση και ρυθμίζουν την ισορροπία της ενέργειας και τη συναπτική δραστηριότητα. Κάθε κυτταρικός τύπος της γλοίας έχει εξειδικευμένες λειτουργίες (Kane, C., Drew, P., 2021). Συγκεκριμένα, τα ολιγοδενδροκύτταρα (oligodendrocytes) ειδικεύονται στην παραγωγή της μυελίνης η οποία επενδύει εξωτερικά τους νευράξονες των νευρώνων και προωθεί την αναπηδητική μετάδοση των ηλεκτρικών δυναμικών, ενώ η μικρογλοία (microglia) αποτελεί τα μακροφάγα κύτταρα του ΚΝΣ με βασικό ρόλο στη μεσολάβηση των ανοσολογικών αποκρίσεων. Τέλος, τα αστροκύτταρα (astrocytes) είναι ιδιαίτερα σημαντικά στην ανάπτυξη του εγκεφάλου εκτελώντας ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών στις οποίες περιλαμβάνεται:

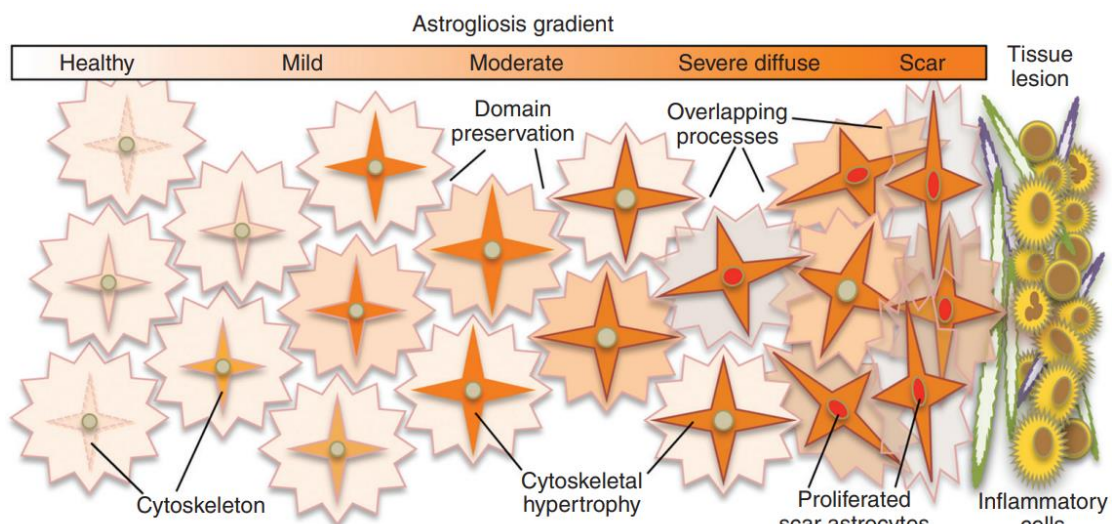
- ο έλεγχος του σχηματισμού και της λειτουργίας των συνάψεων
- η διατήρηση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού
- η διατήρηση της ομοιόστασης των ιόντων, του pH και του νερού
- ο έλεγχος των επιπέδων των νευροδιαβιβαστών, όπως το γλουταμινικό και το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA), μέσω της πρόσληψης και κάθαρσής τους
- η παροχή των νευρώνων και των νευραξόνων με ενεργειακούς μεταβολίτες
- η ρύθμιση της τοπικής ροής του αίματος
- η μεσολάβηση ανοσολογικών αποκρίσεων στο ΚΝΣ

(Kane, C., Drew, P., 2021, Giovannoni, F., Quintana, F., 2020, Sofroniew, M., 2013).

Ο ρόλος των αστροκυττάρων στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης

Τα αστροκύτταρα απαντούν σε όλων των τύπων τις προσβολές του ΚΝΣ, όπως είναι το τραύμα, η ισχαιμία, η μόλυνση, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες και τα ποικίλα φλεγμονώδη ερεθίσματα. Η απόκριση των αστροκυττάρων στις συγκεκριμένες προσβολές αναφέρεται ως «αντιδραστική αστρογλοΐωση» (reactive astrogliosis, Sofroniew, M., 2013) και αφορά σε αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση, στη κυτταρική δομή και στη λειτουργία των αστροκυττάρων (Sofroniew, M.,

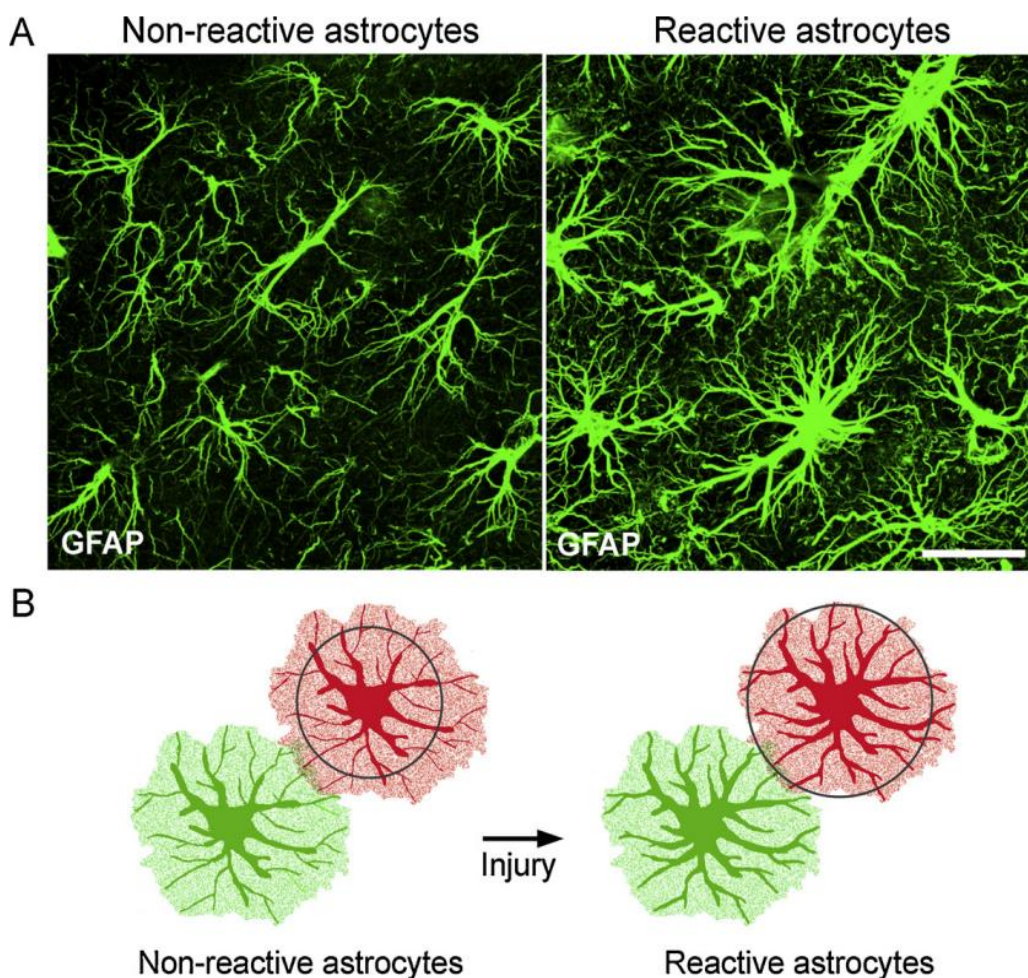
2015). Η διαδικασία της αντιδραστικής αστρογλοΐωσης χαρακτηρίζεται από ετερογένεια, περιλαμβάνοντας διαφορετικές πιθανές δομικές και λειτουργικές αλλαγές που ρυθμίζονται κατά εξαρτώμενους από τις συνθήκες τρόπους από αρκετούς πιθανούς σηματοδοτικούς μηχανισμούς (Sofroniew, M., 2013). Η σοβαρότητα της αντιδραστικής αστρογλοΐωσης παρουσιάζει διακύμανση με την ήπια μορφή να χαρακτηρίζεται από κυτταρική υπερτροφία και αναστρέψιμες μεταβολές στη γονιδιακή έκφραση και με τη σοβαρή μορφή να χαρακτηρίζεται από έντονο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και δημιουργία συμπαγών αστρογλοϊακών ουλών και μόνιμη αναδιαμόρφωση του ιστού (Εικόνα 11, Sofroniew, M., 2015). Ορισμένες αποκρίσεις των αντιδραστικών αστροκυττάρων μπορεί να είναι ωφέλιμες για μία συνθήκη, όπως παραδείγματος χάριν σε μία τοπική βακτηριακή προσβολή, αλλά σε μία διαφορετική κατάσταση, όπως ένα ισχαιμικό επεισόδιο, μπορεί να είναι επιζήμιες (Sofroniew, M., 2013).



Εικόνα 11: Διακύμανση της σοβαρότητας της αντιδραστικής αστρογλοΐωσης (Sofroniew, M., 2015).

Τα αστροκύτταρα επιδεικνύουν μεγάλου εύρους αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση και τη κυτταρική μορφολογία όταν γίνονται αντιδραστικά. Στις περισσότερες μορφές αντιδραστικής αστρογλοΐωσης, τα αντιδραστικά αστροκύτταρα χαρακτηρίζονται από αύξηση των επιπέδων έκφρασης (up-regulation) της όξινης πρωτεΐνης των ενδιάμεσων ινιδίων της γλοΐας (Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP, Εικόνα 12), με αποτέλεσμα η GFAP να χρησιμοποιείται ευρέως ως δείκτης της αντιδραστικότητας των αστροκυττάρων (Anderson, M., Ao, Y., Sofroniew, M., 2014). Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη συμμετέχει σε διαδικασίες που λαμβάνουν

χώρα στα ενδιάμεσα ινίδια των αστροκυττάρων (Pekny, M., Wilhelmsson, U., Pekna, M., 2013, Wilhelmsson, U., et.al., 2006) και, συνεπώς, αντισώματα που την αναγνωρίζουν αποκαλύπτουν τη δομή του κυτταροσκελετού των αστροκυττάρων (Wilhelmsson, U., et.al., 2006). Η έκφραση της GFAP στα αντιδραστικά αστροκύτταρα ποικίλλει σημαντικά και εξαρτάται από την περιοχή του ΚΝΣ στην οποία βρίσκονται, από την εγγύτητά τους στο σημείο της προσβολής και από τον τύπο της προσβολής (Giovannoni, F., Quintana, F., 2020).



Εικόνα 12: Α. Αστροκύτταρα της οδοντωτής έλικας ιπποκάμπου πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) από από βλάβη (lesion) στον ενδορρινικό φλοιό. Μέσω της ανοσοανίχνευσης της GFAP καθίσταται εμφανής η υπερτροφία των αντιδραστικών αστροκυττάρων (δεξιά). Β. Σχηματική αναπαράσταση αστροκυττάρων που αποκρίνονται σε προσβολή όπου παρατηρείται η διατήρηση του μεγέθους των αστροκυττάρων παρά την κυτταρική υπερτροφία (δεξιά, Pekny, M., Wilhelmsson, U., Pekna, M., 2013, Wilhelmsson, U., et.al., 2006).

Μορφολογικά, τα αντιδραστικά αστροκύτταρα χαρακτηρίζονται από υπερτροφία του κυτταρικού σώματος και των αποφύσεων τους. Κατά αντιστοιχία με την έκφραση της GFAP, ο βαθμός της υπερτροφίας των αντιδραστικών αστροκυττάρων είναι ετερογενής και ανάλογος της σοβαρότητας της προσβολής

και της εγγύτητας του αστροκυττάρου στην προσβολή (Anderson, M., Ao, Y., Sofroniew, M., 2014). Η κυτταρική υπερτροφία των αντιδραστικών αστροκυττάρων επιβεβαιώνεται από την αξιοσημείωτη αύξηση της ανοσοδραστικότητας της GFAP και του αριθμού και μήκους των GFAP-θετικών αποφύσεων. Ωστόσο, παρόλο που οι αποφύσεις των αντιδραστικών αστροκυττάρων γίνονται πυκνότερες, το συνολικό μέγεθος των αντιδραστικών αστροκυττάρων είναι παρόμοιο με το μέγεθος των μη αντιδραστικών (Εικόνα 12 B, Wilhelmsson, U., et.al., 2006).

Εμβρυϊκό Αλκοολικό Σύνδρομο και Επιληψία

Η επιληψία αποτελεί μία εξέχουσα νευρολογική διαταραχή που παρατηρείται σε πολλά παιδιά των οποίων οι μητέρες κατανάλωναν αλκοόλ κατά τη διάρκεια της κύησης. Ο εκτιμώμενος επιπολασμός της επιληψίας μεταξύ των παιδιών με εμβρυϊκό αλκοολικό σύνδρομο ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των μελετών, αλλά συνολικά εκτιμάται ότι αγγίζει έως και το 21% (Bonthius, D., και συν., 2001). Ανάμεσα στους πιο σοβαρούς τύπους επιληπτικών κρίσεων που μπορεί να συμβούν κατά τη βρεφική και πρώιμη παιδική ηλικία σε παιδιά με FASD είναι οι γενικευμένες τονικοκλονικές κρίσεις (Cho, S., και συν., 2017).

Σε μοντέλα επίμυων, σημαντική επικάλυψη έχει παρατηρηθεί μεταξύ δομών του εγκεφάλου με υφιστάμενα νευροπαθολογικά και λειτουργικά ελλείμματα εξαιτίας της προγεννητικής ή/και μεταγεννητικής έκθεσης στο αλκοόλ και δομών που σχετίζονται με τη γένεση ή/και την εξάπλωση της επιληπτικής δραστηριότητας στον εγκέφαλο, συμπεριλαμβανομένου του υπόκαμπου (Bell, S., και συν., 2010). Ωστόσο, είναι κοινώς αποδεκτό πως οι επίμυες δεν εμφανίζουν αυθόρμητες επιληπτικές κρίσεις όπως συμβαίνει στα παιδιά με εμβρυϊκό αλκοολικό σύνδρομο (Cho, S., και συν., 2017).

Στις περισσότερες μελέτες της επίδρασης της έκθεσης στο αλκοόλ κατά τη διάρκεια εγκεφαλικής ανάπτυξης στο κατώφλι προκαλούμενων επιληπτικών κρίσεων (seizure threshold), έχουν χρησιμοποιηθεί μοντέλων τρωκτικών στα οποία η έκθεση στο αλκοόλ πραγματοποιούνταν προγεννητικά. Τα συμπεράσματα των συγκεκριμένων μελετών υποστηρίζουν πως η έκθεση των εμβρύων (επίμυων)

στο αλκοόλ δε μεταβάλλει την επιρρέπεια τους σε προκαλούμενες επιληπτικές κρίσεις στην ενήλικη ζωή τους συγκριτικά με μη εκτεθειμένα ζώα. Ωστόσο, οι Bonthius, D., και συν. (2001) παρατήρησαν σε μοντέλο έκθεσης στην αιθανόλη κατά τη μεταγεννητική περίοδο ραγδαίας ανάπτυξης του εγκεφάλου (*'brain growth spurt'*) των επίμων, μείωση στο κατώφλι πρόκλησης των επιληπτικών κρίσεων η οποία συσχετίστηκε με την επαγόμενη από το αλκοόλ απώλεια των πυραμιδικών κυττάρων του CA1 πεδίου του ιππόκαμπου. Η πρόκληση των επιληπτικών κρίσεων είχε πραγματοποιηθεί μέσω χορήγησης του GABA_A ανταγωνιστή πεντυλενοτετραζόλη (pentylenetetrazole, PTZ) όπως συνέβη και στα ζώα που μελετήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή εργασία.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η μελέτη της φλεγμονώδους αντίδρασης στον εγκέφαλο ενήλικων Sprague-Dawley επίμυων κατά την επιληπτογένεση με τον GABA_A ανταγωνιστή πεντυλενοτετραζόλη (pentylenetetrazole, PTZ) υπό εδάφους εμβρυϊκού αλκοολικού συνδρόμου και συγκεκριμένα οι πιθανές αλλαγές που επιφέρει τόσο μεμονωμένα το εμβρυϊκό αλκοολικό σύνδρομο και η χορήγηση της PTZ όσο και ο συνδυασμός των δύο προσβολών στον αριθμό των κυττάρων και στη μορφολογία των αστροκυττάρων, τα οποία μεσολαβούν σε ανοσολογικές αποκρίσεις στο ΚΝΣ, στις περιοχές του μέσου προμετωπιαίου φλοιού, του ιππόκαμπου και των βασικών πυρήνων της αμυγδαλής. Για το λόγο αυτό, διενεργήθηκε ιστολογική χρώση Cresyl Violet για τα σωματίδια Nissl και χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της όξινης πρωτεΐνης των ενδιάμεσων ινιδίων της γλοίας (Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP) η οποία εκφράζεται στα αστροκύτταρα.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Πειραματόζωα

Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 16 αρσενικοί και θηλυκοί επίμυες στελέχους Sprague-Dawley, ηλικίας 52-58 ημερών και βάρους, κατά μέσο όρο, 203 gr. Τα πειραματόζωα μας προμήθευσε το Εργαστήριο Φυσιολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Στο συγκεκριμένο εργαστήριο, όλα τα ζώα διαβιούσαν στο μέγιστο 3 ανά πλαστικό κλωβό και ο διαχωρισμός των απογόνων από τη μητέρα και σε αρσενικά/θηλυκά γινόταν στις 24 ημέρες μετά τη γέννηση. Είχαν ελεύθερη και συνεχή πρόσβαση σε νερό και τροφή ενώ οι συνθήκες διατηρούνταν σταθερές, με θερμοκρασία να κυμαίνεται στους $21 \pm 2^\circ\text{C}$ και ο κύκλος φωτός/σκότους να είναι σταθερός στις 12 ώρες φωτός (από 8π.μ. μέχρι 8μ.μ)/12 ώρες σκότους (από 8μ.μ έως 8π.μ.). Η φροντίδα και όλοι οι πειραματικοί χειρισμοί έγιναν σύμφωνα με τις οδηγίες του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 22ας Σεπτεμβρίου 2010 περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς (2010/63/EE).

Πρωτόκολλο έκθεσης στην αιθανόλη και πρόκληση επιληπτικών κρίσεων

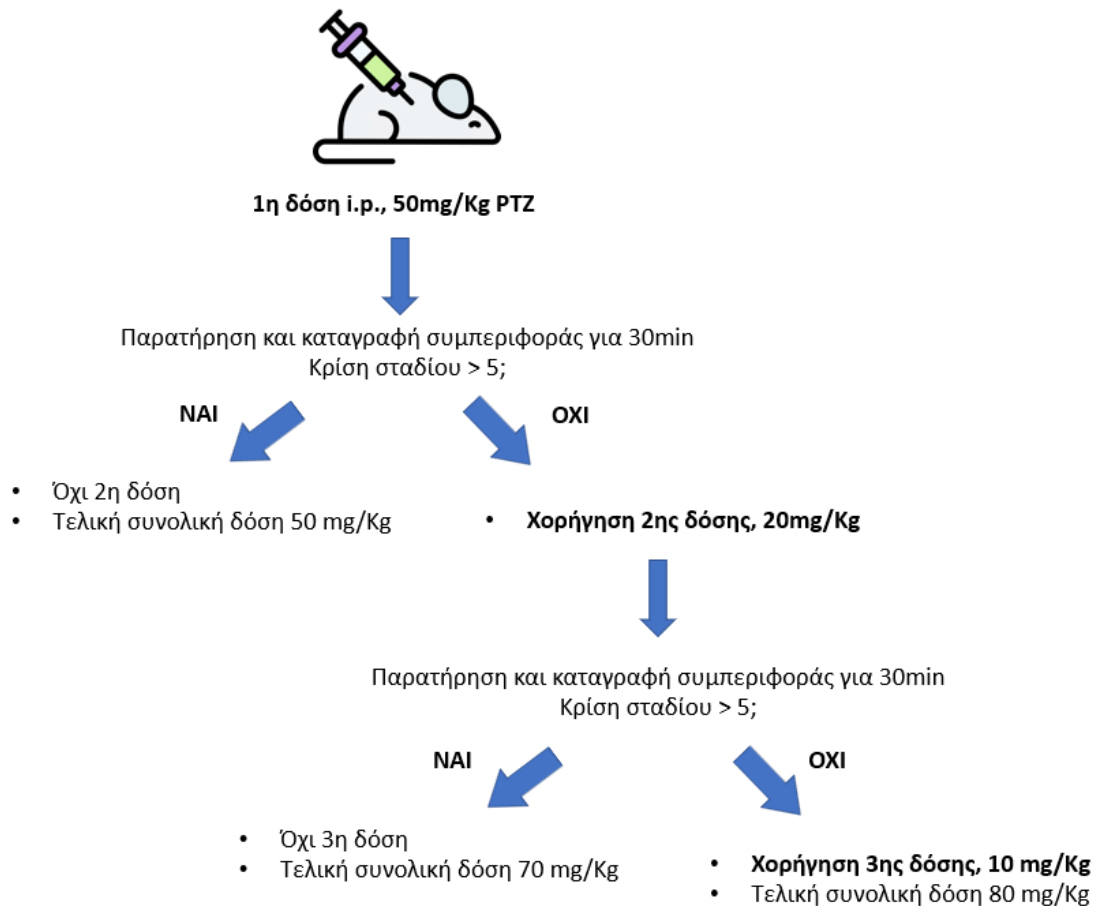
Η έκθεση των ζώων στην αιθανόλη καθώς και η πρόκληση των επιληπτικών κρίσεων δεν αποτελεί τμήμα της συγκεκριμένης εργασίας. Οι διαδικασίες αυτές πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Συγκεκριμένα, νεαροί, άτοκοι ενήλικες θηλυκοί Sprague-Dawley επίμυες έλαβαν διάλυμα αιθανόλης για δύο εβδομάδες ως την μοναδική πηγή νερού. Ειδικότερα, κατά την πρώτη εβδομάδα παρέχονταν σε αυτούς ως μοναδική πηγή νερού διάλυμα Αιθανόλης 10% v/v, ενώ κατά τη δεύτερη εβδομάδα παρέχονταν ως μοναδική πηγή νερού διάλυμα Αιθανόλης 15% v/v.

Η έκθεση σε διάλυμα Αιθανόλης 15% v/v συνεχίστηκε καθ' όλη τη διάρκεια της αναπαραγωγής και της κύησης. Έχει αποδειχτεί από παρελθοντικά πειράματα του εργαστηρίου πως η χορηγούμενη συγκέντρωση 15% v/v αιθανόλης επαρκεί ώστε να προκύψουν FAS απόγονοι, χωρίς τα προβλήματα του υψηλού ποσοστού θνησιμότητας και την αδυναμία σύλληψης που έχουν παρατηρηθεί όταν στα ζώα χορηγείται διάλυμα μεγαλύτερης περιεκτικότητας σε αιθανόλη.

Κατά τη διάρκεια των πρώτων ημερών μετά τη γέννηση (η ημέρα γέννησης σημειώνεται ως PND0- Postnatal Day0), συνεχίστηκε η χορήγηση διαλύματος Αιθανόλης 15% v/v την πρώτη εβδομάδα (PND 0-7), μειώθηκε στο 10% τη δεύτερη εβδομάδα (PND7-14) και μηδενίστηκε στην αρχή της τρίτης εβδομάδας μετά τη γέννηση (0% v/v EtOH, PND14 και ύστερα).

Κατά την 21^η ημέρα μετά τη γέννηση (PND21), σε νεαρούς επίμυες χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά (i.p.) διάλυμα του GABA_A ανταγωνιστή πεντυλενοτετραζόλης (PTZ- pentylenetetrazole, *Sigma Chemical Co*), διαλυμένου σε φυσιολογικό ορό (0,9% w/v NaCl, *Sigma-Aldrich*), με σκοπό την πρόκληση των επιληπτικών κρίσεων, καθώς οι FAS επίμυες δεν εμφανίζουν αυθόρμητες επιληπτικές κρίσεις όπως συμβαίνει στα παιδιά με FAS.

Σε νεαρούς επίμυες ηλικίας 21 ημερών (PND21), η πρώτη χορηγούμενη δόση της PTZ ήταν 70 mg/Kg. Μετά την έγχυση του φαρμάκου, ακολουθούσε διάστημα παρατήρησης μισής ώρας και στην περίπτωση που το ζώο δεν εμφάνιζε συμπεριφορικά χαρακτηριστικά που αντιστοιχούσαν σε κρίση σταδίου > 5 της νέας κλίμακας που κατασκευάστηκε ειδικά για τις απαιτήσεις του συγκεκριμένου πειράματος, χορηγούνταν επιπροσθέτως 10 mg/Kg PTZ (τελική συνολική δόση 80 mg/Kg).



Εικόνα 13: Περιγραφική αναπαράσταση της χορήγησης PTZ σε νεαρούς επίμυες ηλικίας 21 ημερών (Ψαρροπούλου, Α.).

Μετά τη χορήγηση της τελευταίας δόσης, ακολουθούσε παρατήρηση διάρκειας τριών ωρών. Στο τέλος του πειράματος και αφού όλα τα ζώα που είχαν παρουσιάσει συμπεριφορικά χαρακτηριστικά κρίσεων σταδίου >5 είχαν συνέλθει πλήρως, επιστρέφονταν στους κλωβούς τους.

Συνοπτικά, για να προκύψουν FAS-PTZ επίμυες απαιτούνται τα παρακάτω βήματα:



Εικόνα 14: Βήματα για να προκύψουν FAS-PTZ επίμυες.

Όπως γίνεται κατανοητό, η μελέτη των FAS-Ctr και FAS-PTZ επίμυων γίνεται και μετά από μία περίοδο στέρησης αιθανόλης (6 εβδομάδες).

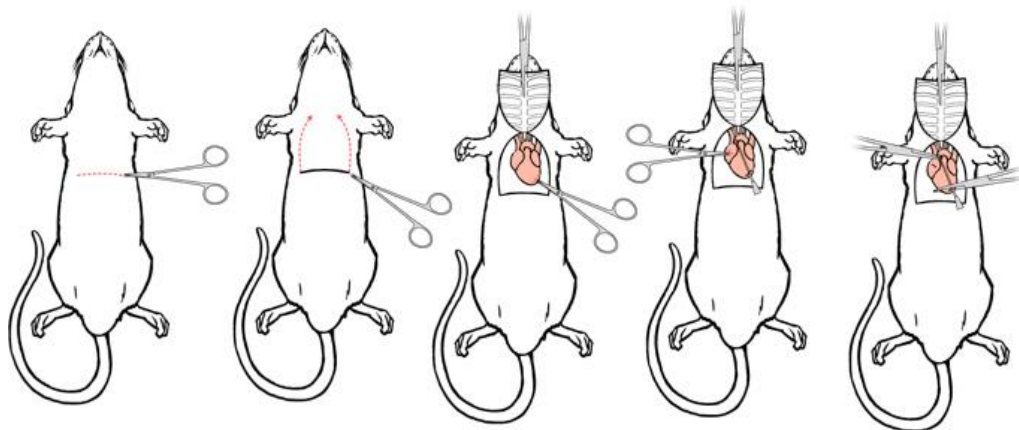
Ενδοκαρδιακή μονιμοποίηση επίμυος

Για την ενδοκαρδιακή μονιμοποίηση (transcardial perfusion) των επίμυων, κάθε πειραματόζωο τοποθετείται σε γυάλινο δοχείο στο οποίο περιέχεται εμποτισμένο με διαιθυλαιθέρα βαμβάκι προκειμένου να προκληθεί ζάλη/αναισθησία στο ζώο και, συνεπώς, να είναι ευκολότερος ο χειρισμός του. Αφού το πειραματόζωο ζαλιστεί πραγματοποιούμε σε αυτό δύο αναισθητικές ενέσεις:

1^η → χορήγηση 200 μl κεταμίνης (*ketamine 100mg/ml, Imalgene 1000*)
ΕΝΔΟΜΥΪΚΑ

2^η → χορήγηση 2 mL προποφόλης (*propofol 20mg/ml, Propofol-[®]Lipuro, B. Braun Melsungen AG, Germany*) ΕΝΔΟΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΑ

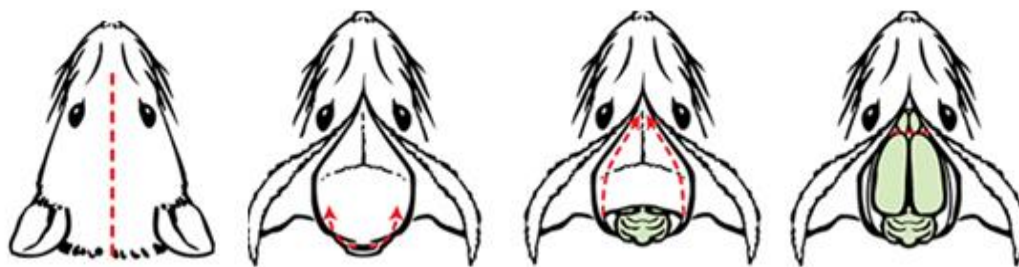
Η επιτυχής αναισθησία του ζώου ελέγχεται με την απόσυρση του πέλματος ως απάντηση σε πίεση αυτού. Το πειραματόζωο ζυγίζεται και μεταφέρεται στον απαγωγό σε ύπτια θέση. Πραγματοποιείται τομή στο ύψος του διαφράγματος και αναδίπλωση του πρόσθιου θωρακικού τοιχώματος μέσω της ξιφοειδούς απόφυσης. Έπειτα, πραγματοποιούνται τομές πλευρικά για την κοπή του διαφράγματος και την έκθεση της καρδιάς. Στην αριστερή κοιλία της καρδιάς τοποθετείται μία βελόνα 19 Gauge, η οποία συνδέεται μέσω σωληνάριου με την περισταλτική αντλία, και γίνεται μία μικρή τομή στο δεξιό κόλπο για την παροχέτευση των διαλυμάτων (Gage, G., και συν., 2012, Kékesi, U., Buskila, Y., 2020).



Εικόνα 15: Βήματα προκειμένου να εκτεθεί η καρδιά του πειραματόζωου και να ξεκινήσει η παροχή των διαλυμάτων (Gage, G., και συν., 2012).

Με τη βοήθεια περισταλτικής αντλίας Gilson MINIPULS 3, με ταχύτητα 48 στροφές ανά λεπτό, χορηγείται, αρχικά, διάλυμα φυσιολογικού ορού (0,9 % NaCl, *Sigma-Aldrich*) για δεκαπέντε λεπτά με σκοπό την απομάκρυνση του αίματος από τα όργανα του ζώου. Αντιλαμβανόμαστε ότι η μεγαλύτερη ποσότητα αίματος έχει απομακρυνθεί παρατηρώντας αποχρωματισμό της μύτης, των πνευμόνων και της ουράς του ζώου. Η απομάκρυνση του αίματος είναι σημαντική διότι η ύπαρξη ερυθροκυττάρων στον εγκέφαλο προκαλεί μη εκλεκτική σύνδεση των αντισωμάτων σε αυτά κατά τη διαδικασία της ανοσοϊστοχημείας.

Τη χορήγηση του διαλύματος του ορού ακολουθεί η χορήγηση, για είκοσι λεπτά, κρύου διαλύματος φωσφορικών 0,1M (Phosphate Buffer, PB) με 4% παραφορμαλεΐδη (Paraformaldehyde, PFA, *Sigma-Aldrich*), η οποία δρα ως μονιμοποιητικό ιστών. Μετά τη διαπύση (perfusion), το ζώο τοποθετείται σε πρηνή θέση και ακολουθεί κρανιοτομή με οδηγό σημείο το λάμδα του κρανίου για τη λήψη ολόκληρου του εγκεφάλου (Εικόνα 16).



Εικόνα 16: Βήματα για τη λήψη του εγκεφάλου μετά τη διαπύση (perfusion, προσαρμοσμένη από τους Gage, G., και συν., 2012).

Ο εγκέφαλος που λαμβάνεται τοποθετείται σε falcon που περιέχει διάλυμα 0,1 M PB με 4% παραφορμαλεΐδη για μία ώρα στους 4°C. Μετά το πέρας της μίας ώρας, ο εγκέφαλος τοποθετείται σε διάλυμα 30% σουκρόζης (Sucrose, *Sigma-Aldrich*) και αφήνεται για 24 - 48 ώρες στους 4°C. Το διάλυμα της σουκρόζης χρησιμοποιείται καθώς είναι ένα υπέρτονο διάλυμα που λόγω ώσμωσης απομακρύνει το νερό από τον ιστό και έτσι λειτουργεί ως κρυοπροστατευτικό. Ο εγκέφαλος απομακρύνεται από το διάλυμα της σουκρόζης μόνο εφόσον έχει καθιζάνει στο falcon και ψύχεται μετά από εμβύθισή του σε ισοπεντάνιο θερμοκρασίας -45°C για ένα λεπτό. Αποθηκεύεται στους -80°C έως τη κοπή του στον κρυοτόμο.

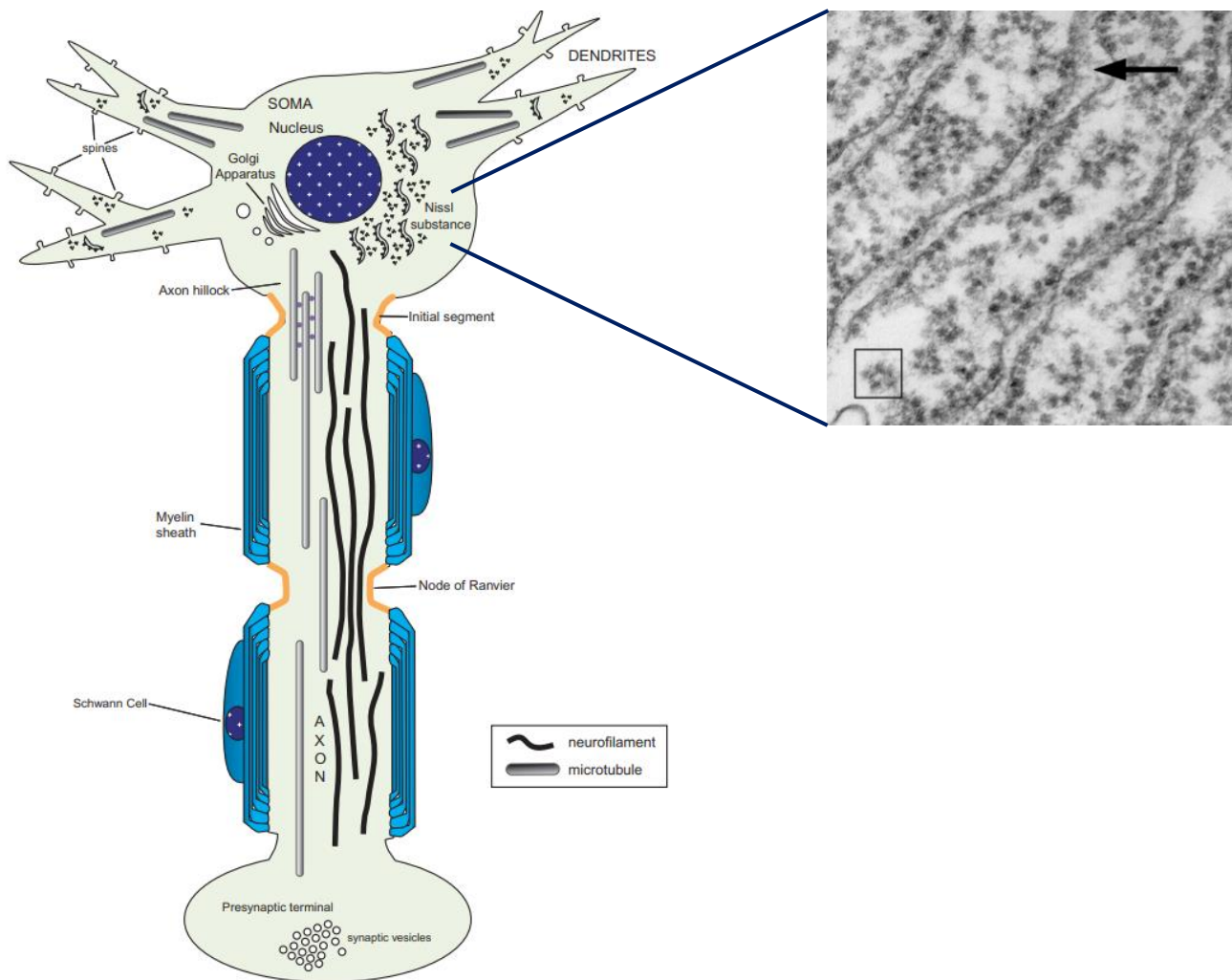
Οι ιστοί κόβονται σε κρυτόμο τύπου Leica CM1850 σε τομές πάχους 10 μm και σε θερμοκρασία περίπου -20°C, αφού πρώτα προσανατολίζονται κατάλληλα σε στερεοποιητικό κρυοστάτη [cryostat embedding medium (Killik)]. Οι τομές ανά περιοχή προσκολλώνται διαδοχικά σε 10 ζελατινοποιημένες αντικειμενοφόρους πλάκες οι οποίες βρίσκονται εκτός του κρυοτόμου και αποθηκεύονται στους -20°C μέχρι τη διεξαγωγή της ιστολογίας και της ανοσοϊστοχημείας (4-7 τομές ανά αντικειμενοφόρο πλάκα).

Ζελατινοποίηση αντικειμενοφόρων πλακών

Η ζελατινοποίηση των αντικειμενοφόρων πλακών πραγματοποιείται με την εμβύθιση τους σε διάλυμα υπερκάθαρου νερού με 5 gr ζελατίνης (300 bloom, *Sigma-Aldrich*) και 0,5 gr δωδεκαϋδρικό θειικό χρωμιούχο κάλιο [$\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$] (*Sigma-Aldrich*) θερμοκρασίας 45°C και στέγνωμα σε θερμοκρασία δωματίου για 48 ώρες.

Χρώση Nissl

Η ιστολογική χρώση Nissl ανακαλύφθηκε το 1884 από τον Γερμανό ψυχίατρο Franz Alexander Nissl (1860-1919, Gomes, M., 2019). Η συγκεκριμένη χρώση σημαίνει τα σωματία ή ουσία Nissl η οποία αποτελεί ένα συνδυασμό στιβάδων αδρού ενδοπλασματικού δικτύου με ενδιάμεσες ροζέτες ελεύθερων πολυσωμάτων (Εικόνα 17), διάταξη που εντοπίζεται μόνο στους νευρώνες και η λειτουργία της είναι άγνωστη. Τα πολυσώματα είναι μακρομοριακά σύμπλοκα αποτελούμενα από πολλά ριβοσώματα τα οποία μεταφράζουν ταυτόχρονα ένα μόριο αγγελιαφόρου RNA (messenger RNA, mRNA, Brielle, R., και συν., 2017). Τα σωματία Nissl εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα των κυτταρικών σωμάτων και στους δενδρίτες των νευρώνων (Εικόνα) και αντιπροσωπεύουν την πρωτεϊνοσυνθετική μηχανή των νευρώνων (Brady, S., Colman, D. R., Brophy, P., 2014).




Εικόνα 17: Βασικά στοιχεία της κυτταρικής οργάνωσης ενός νευρώνα (αριστερά). Σε μεγέθυνση τα σωματία Nissl (δεξιά). Το μαύρο βέλος υποδεικνύει τις στιβάδες αδρού ενδοπλασματικού δικτύου ενώ το τετράγωνο πλαίσιο ένα πολύσωμα (Εικόνα από Brady, S., Colman, D. R., Brophy, P. 2014, προσαρμοσμένη).

Η χρώση Nissl βασίζεται στην αλληλεπίδραση βασικών χρώσεων, όπως είναι η Cresyl Violet, με νουκλεϊκά οξέα (Kádár, A., και συν., 2009). Ειδικότερα, η Cresyl Violet με μοριακό τύπο $C_{19}H_{18}ClN_3O$ είναι μία μπλε βασική κατιονική χρώση η οποία στη μη πρωτονιωμένη μορφή της είναι μεμβρανοδιαπερατή και συσσωρεύεται σε οργανίδια τα οποία περιέχουν νουκλεϊκά οξέα, όπως είναι τα σωματία Nissl (Ostrowski, P., και συν., 2016). Δεδομένου ότι οι νευρώνες είναι κύτταρα με έντονη πρωτεϊνοσυνθετική ικανότητα, το κυτταρόπλασμα τους περιέχει μεγαλύτερο αριθμό σωματιδίων Nissl συγκριτικά με άλλα κύτταρα. Εξαιτίας αυτού του ιδιαίτερου χαρακτηριστικού των νευρώνων, η Cresyl Violet χρωματίζει στον εγκέφαλο εκλεκτικά το κυτταρόπλασμα των νευρώνων και όχι άλλων κυτταρικών τύπων, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιείται ευρέως τόσο για τη

μελέτη της μορφολογίας και της παθολογίας των νευρώνων όσο και για την κατανόηση της αρχιτεκτονικής των κυττάρων διαφορετικών εγκεφαλικών περιοχών (Kádár, A., και συν., 2009).

Πειραματική Διαδικασία

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες αφήνονται για λίγα λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για να ξεπαγώσουν. Τοποθετούνται σε rack και βυθίζονται διαδοχικά σε δοχεία με τα ακόλουθα διαλύματα για τους εξής χρόνους:



1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°
6:4:1, EtOH: CH ₃ COOH: CHCl ₃	H ₂ O	5% Cresyl violet pH=4,5	H ₂ O	EtOH 50%	EtOH 75%	EtOH 95%	EtOH 100%	Xylol
10 min	3 min	5 min	2 min	5 sec	5 sec	5 sec	5 sec	***

*** Οι αντικειμενοφόρες πλάκες παραμένουν στην ξυλόλη έως ότου οι τομές καλυφθούν με καστορέλαιο.

Η χρήση του διαλύματος αιθανόλης, οξικού οξέος και χλωροφορμίου αποσκοπεί στον καθαρισμό των ιστών ενώ η εμβύθιση των αντικειμενοφόρων πλακών σε διάλυμα αιθανόλης αυξανόμενης συγκέντρωσης (50%, 75%, 95% και 100%) συμβάλλει στην αφυδάτωση και μονιμοποίηση των ιστών.

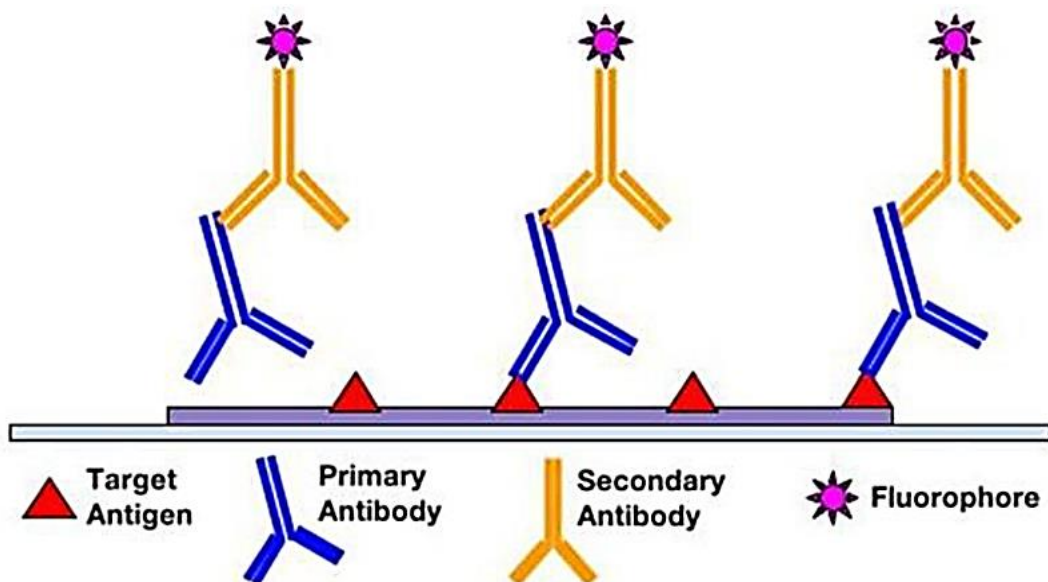
Την ολοκλήρωση των εμβυθίσεων ακολούθησε η κάλυψη των ιστών με καστορέλαιο ως ιστολογικό υλικό κάλυψης. Γενικότερα, ένα ιστολογικό υλικό κάλυψης θα πρέπει να είναι άχρωμο, διάφανο, άνυδρο, να έχει διαθλαστικό δείκτη (Refractive Index, RI) όσο το δυνατόν πλησιέστερο σε αυτόν του γυαλιού, δηλαδή περίπου 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 (οξειδωση και αλλαγές στο pH, Kannan, U., και συν., 2017). Ο διαθλαστικός δείκτης είναι

μία μέτρηση της κάμψης μίας ακτίνας φωτός όταν διέρχεται από το ένα μέσο στο άλλο και βοηθάει στην κατάλληλη οπτικοποίηση των δομικών λεπτομερειών ενός αντικειμένου (Shylaja, S., και συν., 2019).

Το καστορέλαιο επιλέχθηκε καθώς είναι ένα άχρωμο, κολλώδες έλαιο με εξαιρετική ικανότητα διατήρησης των ιστών. Έχει RI 1.477–1.481 που προσεγγίζει αυτόν του γυαλιού και έτσι προσφέρει υψηλής καθαρότητας εικόνες των κυτταρικών χαρακτηριστικών και μπορεί να χρησιμοποιηθεί αντί του ιστολογικού υλικού κάλυψης DPX (Kannan, U., και συν., 2017, Shylaja, S., και συν., 2019).

Ανοσοφθορισμός

Ο ανοσοφθορισμός (immunofluorescence) αποτελεί μία σημαντική τεχνική ανοσοχημείας η οποία επιτρέπει την ανίχνευση και οπτικοποίηση μίας μεγάλης ποικιλίας αντιγόνων σε διαφορετικούς τύπους ιστών και κυττάρων. Ο ανοσοφθορισμός παρέχει τη δυνατότητα οπτικοποίησης πολλαπλών αντιγόνων ταυτόχρονα, γεγονός που οφείλεται σε συνδυασμούς ειδικών αντισωμάτων συζευγμένων με διαφορετικά φθοροφόρα τα οποία δεν αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και εκπέμπουν έπειτα από φωτοδιέγερση (Im και συν., 2018).



Εικόνα 18: Σχηματική αναπαράσταση του έμμεσου ανοσοφθορισμού (Im και συν., 2018).

Κατά την άμεση μέθοδο ανοσοφθορισμού, το φθοροφόρο είναι συζευγμένο με το πρώτο αντίσωμα το οποίο αλληλεπιδρά άμεσα με το αντιγόνο-στόχο ενώ στην έμμεση μέθοδο το φθοροφόρο είναι συζευγμένο με το δεύτερο αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει και αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο του πρώτου αντισώματος με το αντιγόνο-στόχο (Εικόνα 18, Im και συν., 2018).

Πειραματική Διαδικασία

Στα πειράματα της παρούσας πτυχιακής εργασίας εφαρμόστηκε η τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού σε τομές εγκεφάλου 10 μ m. Οι τομές που επιλέχθηκαν βρίσκονται στο επίπεδο του μέσος προμετωπιαίος φλοιός, του Ιππόκαμπου και της Αμυγδαλής. Την πρώτη ημέρα διεξαγωγής της πειραματικής διαδικασίας παρασκευάζεται το ρυθμιστικό διάλυμα TBS (Tris Buffer Saline) 0,1 M (pH=7,4), το οποίο περιέχει Trizma Base (*Sigma-Aldrich*) και 0,9 % NaCl (*Sigma-Aldrich*), με σκοπό τη διατήρηση του pH σε σταθερά επίπεδα. Το συγκεκριμένο διάλυμα διατηρείται στους 4°C. Ακολουθεί η απόψυξη των αντικειμενοφόρων πλακών για περίπου μισή ώρα και δύο διαδοχικές δεκάλεπτες πλύσεις αυτών με διάλυμα 0,1 M TBS. Τις πλύσεις διαδέχεται επώαση μισής ώρας με διάλυμα 0,1M TBS που περιέχει 3,3% φυσιολογικό ορό κατσίκας (NGS, Normal Goat Serum). Ο φυσιολογικός ορός προέρχεται από το ζώο-ξενιστή του δεύτερου αντισώματος προκειμένου να μειωθεί η πιθανότητα ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων λόγω της μη ειδικής δέσμησης του δεύτερου αντισώματος. Εν συνεχεία, πραγματοποιούνται τρεις διαδοχικές πεντάλεπτες πλύσεις των τομών με διάλυμα 0,1 M TBS. Μετά τις πλύσεις έπεται η επώαση των ιστών με το διάλυμα του πρώτου αντισώματος για 16-18 ώρες (overnight) σε θερμοκρασία δωματίου. Το πρώτο αντίσωμα περιέχεται σε διάλυμα 0,1M TBS με 0,5% NGS και 0,3% Triton X-100 (*Sigma-Aldrich*). Το Triton X-100 είναι ένα απορρυπαντικό το οποίο καθιστά τις μεμβράνες των κυττάρων διαπερατές για τη διέλευση των αντισωμάτων και την αναγνώριση των αντιγόνων-στόχων. Προκειμένου να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση του δεύτερου αντισώματος με ενδογενείς ανοσοσφαιρίνες του ιστού, το πρώτο αντίσωμα προέρχεται από διαφορετικό ζώο-ξενιστή από αυτό του δείγματος (Im και συν., 2018). Στην περίπτωση μας, το πρώτο αντίσωμα είναι μονοκλωνικό αντίσωμα ανεπτυγμένο σε ποντίκι ενάντια

στην όξινης πρωτεΐνης των (ενδιάμεσων) ινιδίων της γλοίας (Glial fibrillary acidic protein, GFAP, MAB360 anti-GFAP, *Sigma-Aldrich*) και χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 1:500.

Η επόμενη ημέρα ξεκινά με τρεις διαδοχικές πεντάλεπτες πλύσεις των ιστών με διάλυμα 0,1 M TBS. Στη συνέχεια, οι ιστοί επωάζονται για μιάμιση ώρα με φθορίζον δεύτερο αντίσωμα στο σκοτάδι, εξαιτίας της ευαισθησίας του φθοροφόρου, και σε θερμοκρασία δωματίου. Ειδικότερα, ως δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα κατσίκας έναντι των IgG (H+L) ανοσοσφαιρινών ποντικού συζευγμένο με κόκκινη φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 594 (CELL SIGNALING 8890s) σε συγκέντρωση 1:200. Ακολουθούν τρεις διαδοχικές πεντάλεπτες πλύσεις των ιστών με διάλυμα 0,1 M TBS. Τέλος, οι τομές καλύπτονται με υλικό κάλυψης Vectashield mounting medium που περιέχει τη χρωστική 4',6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλη (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) η οποία βάφει πυρήνες κυττάρων καθώς αναγνωρίζει το δινουκλεοτίδιο Αδερίνη - Θυμίνη (AT) του δίκλωνου DNA. Μετά την κάλυψη τους, οι αντικειμενοφόρες πλάκες αποθηκεύονται στους 4°C μέχρι την παρατήρηση τους στο μικροσκόπιο φθορισμού.

Φωτογράφιση τομών και ανάλυση εικόνων

Η φωτογράφιση των ιστών που υπεβλήθησαν σε χρώση με Cresyl Violet έγινε σε στερεοσκόπιο KERN OZL-463 (KERN & Sohn GmbH) συνδεδεμένο με κάμερα τύπου KERN ODC 832 (KERN & Sohn GmbH) ενώ η φωτογράφιση των ιστών που υπεβλήθησαν σε χρώση με Cresyl Violet σε Μεγέθυνση x10 και η φωτογράφιση των ιστών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία του ανοσοφθορισμού έγινε 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 εικόνες επεξεργάστηκαν με τη χρήση του προγράμματος ImageJ διευκολύνοντας την εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων.

Με τη βοήθεια του προγράμματος ImageJ μετρήθηκε η ένταση του σήματος στις υπό μελέτη περιοχές του εγκεφάλου στις τομές που υπεβλήθησαν σε χρώση με Cresyl Violet για κάθε πειραματική συνθήκη ξεχωριστά ως εξής:

Αρχικά, ορίζεται το είδος της επιθυμητής μέτρησης που θα γίνει στο παράθυρο Set Measurements (Analyze>Set Measurements) ενεργοποιώντας τις επιλογές Area, Mean grey value, Standard deviation, Min & max grey value, Display Label και Add to overlay. Ακολουθεί η ενεργοποίηση του Διαχειριστή των Περιοχών Ενδιαφέροντος (ROI Manager : Analyze>Tools>ROI Manager) και η επιλογή της επιθυμητής προς μέτρηση περιοχής με το Εργαλείο Πολυγωνικής Επιλογής (Polygonal selection). Η περιοχή ενδιαφέροντος ονομάζεται πατώντας Ctrl + y (ή Edit>Selection>Properties) και προστίθεται στο ROI Manager πατώντας Ctrl + t (ή Add [t] στο παράθυρο του ROI Manager). Επιλέγοντας όλες τις μετρήσεις που έγιναν στο ROI Manager (Ctrl + a) και πατώντας Ctrl + m εμφανίζονται οι τιμές Area, Mean grey value, Standard deviation, Min & max grey value στον πίνακα των αποτελεσμάτων (Results: Window>Results) ο οποίος μπορεί να μεταφερθεί στο Excel ή σε άλλο στατιστικό πρόγραμμα μέσω αντιγραφής των μετρήσεων με Ctrl + c. Προκειμένου την επόμενη φορά που θα ανοίξει η φωτογραφία να φαίνονται οριοθετημένες οι περιοχές στις οποίες μετρήθηκε η ένταση του σήματος, το περιεχόμενο του ROI Manager προστίθεται στην εικόνα πατώντας: Image>Overlay>From ROI Manager. Εάν επιθυμούμε να φαίνεται πάνω στην εικόνα και η ονομασία που δόθηκε στην περιοχή πατάμε: Image>Overlay>Labels>Use names as labels. Εφόσον γίνουν όλες οι επιθυμητές μετρήσεις σε μια φωτογραφία (π. χ. για τον ιππόκαμπο μέτρηση της έντασης του σήματος στην πυραμιδική στιβάδα των CA1 και CA3 πεδίων και στη στιβάδα των κοκκωδών κυττάρων της οδοντωτής έλικας) τότε αποθηκεύεται ως tiff με άλλο όνομα (File>Save As π.χ. Ιππόκαμπος_Intensity.tiff).

Σε κάθε φωτογραφία ορίζεται και προστίθεται η κλίμακα από το μικροσκόπιο και το φακό με τα οποία έχουν τραβηχτεί οι προς ανάλυση φωτογραφίες. Αρχικά, φωτογραφίζεται η κλίμακα στο χρησιμοποιούμενο μικροσκόπιο και φακό. Η φωτογραφία της κλίμακας ανοίγεται στο ImageJ και τοποθετείται μια ευθεία γραμμή με το Εργαλείο Ευθείας γραμμής (Straight) πάνω στην κλίμακα. Το αποτέλεσμα της μέτρησης εισάγεται αυτόματα στο παράθυρο Ορισμού Κλίμακας (Set Scale) πατώντας Analyze>Set Scale. Στο ίδιο παράθυρο συμπληρώνονται και τα στοιχεία της απόστασης που μετρήθηκε (Known distance, π.χ. φωτογραφήθηκε κλίμακα 0,01 mm ή 1000 μm άρα στην απόσταση που μετρήθηκε βάζουμε 1000) και η μονάδα μέτρησης μήκους (Unit of length, π.χ. μm) και επιλέγεται το Global.

Η κλίμακα σε μια φωτογραφία μπορεί να τοποθετηθεί πατώντας: Analyze>Tools>Scale bar όπου μπορεί να καθοριστεί το μέγεθος, η θέση που θα εμφανιστεί στη φωτογραφία και το χρώμα της.

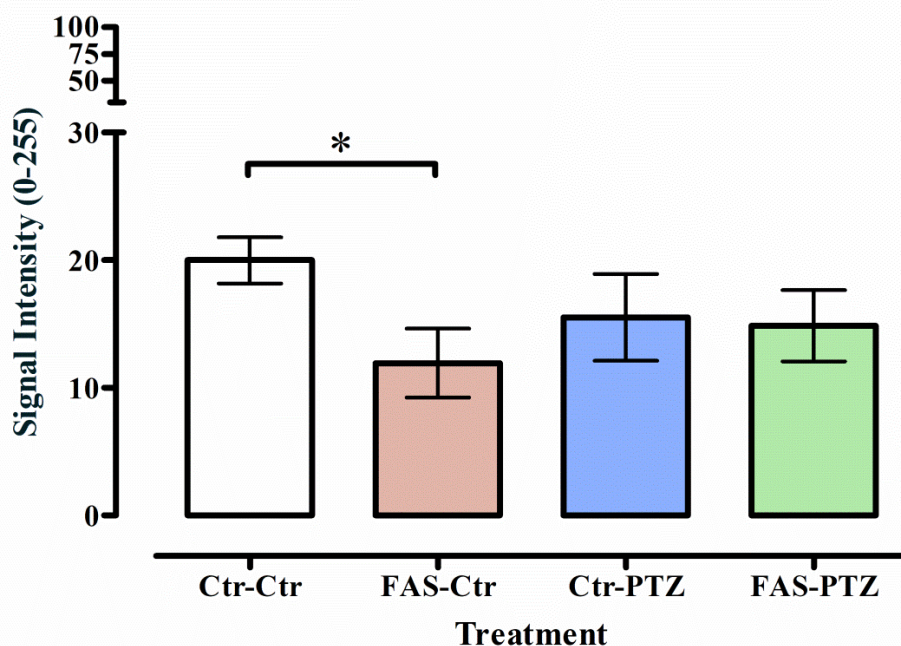
Τέλος, η συγχώνευση του φθορισμού της 4',6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλης (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) και της Όξινης ινώδους πρωτεΐνης της Γλοίας (Glial fibrillary acidic protein, GFAP) στις φωτογραφίες του ανοσοφθορισμού πραγματοποιήθηκε ανοίγοντας τις δύο φωτογραφίες στο ImageJ. Σε κάθε φωτογραφία έγινε διαχωρισμός των καναλιών του χρώματος πατώντας: Image>Color>Split Channels. Ανοίγουν τρία παράθυρα τα οποία αντιπροσωπεύουν το κόκκινο κανάλι, το μπλε κανάλι και το πράσινο κανάλι χρώματος. Στις φωτογραφίες της DAPI το κανάλι που χρησιμοποιείται είναι το μπλε ενώ στις φωτογραφίες της GFAP το κανάλι που χρησιμοποιείται είναι το κόκκινο. Η συγχώνευση του μπλε καναλιού της DAPI και του κόκκινου καναλιού της GFAP γίνεται πατώντας: Image>Color>Merge Channels. Στο παράθυρο που εμφανίζεται, στο C1 (red) επιλέγουμε το κόκκινο κανάλι της GFAP ενώ στο C3 (blue) επιλέγουμε το μπλε κανάλι της DAPI.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

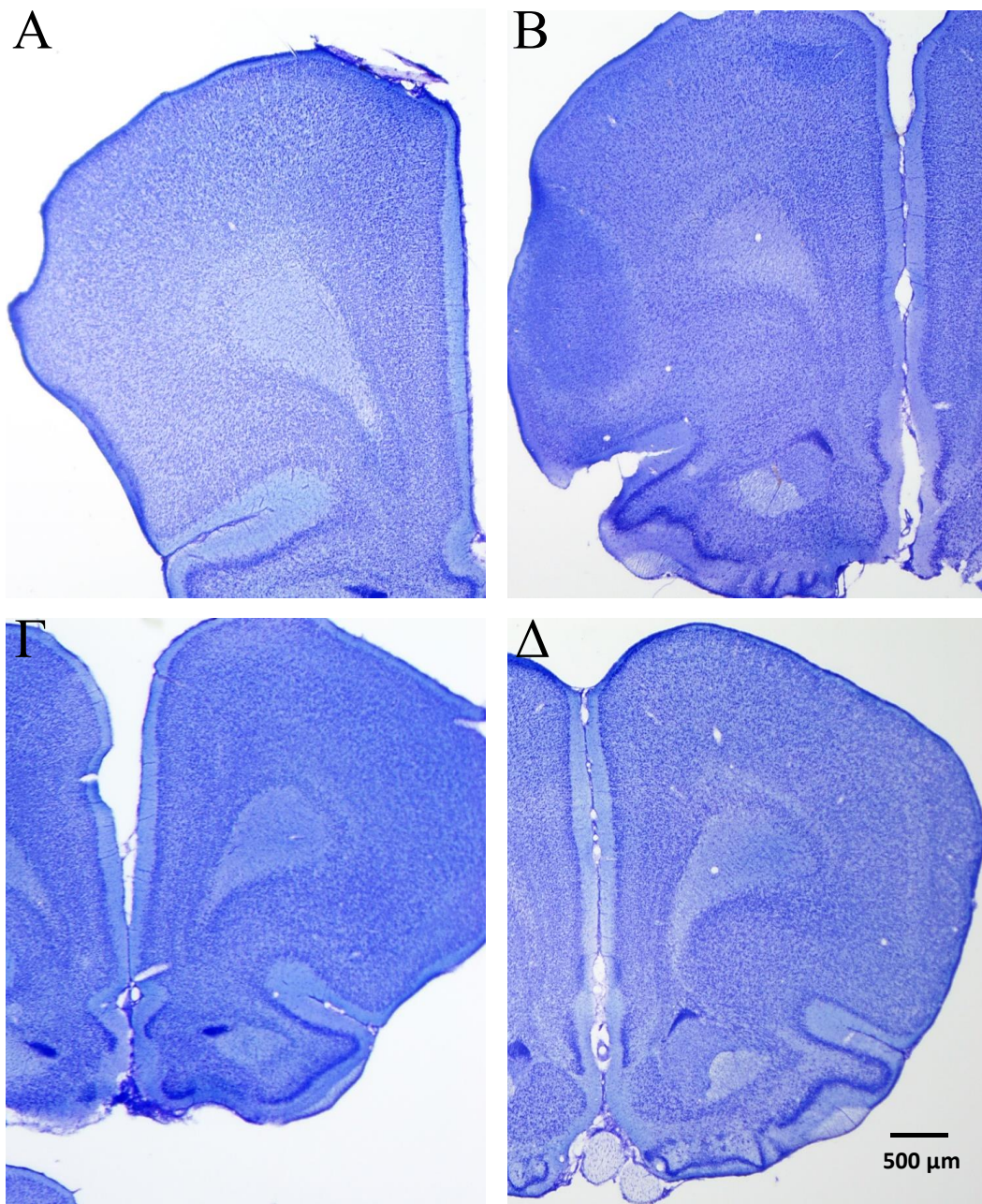
Επίδραση της επιληπτογένεσης με πεντυλενοτετραζόλη υπό εδάφους εμβρυϊκού αλκοολικού συνδρόμου στο μέσο προμετωπιαίο φλοιό επίμυος

Χρώση σωματιδίων Nissl

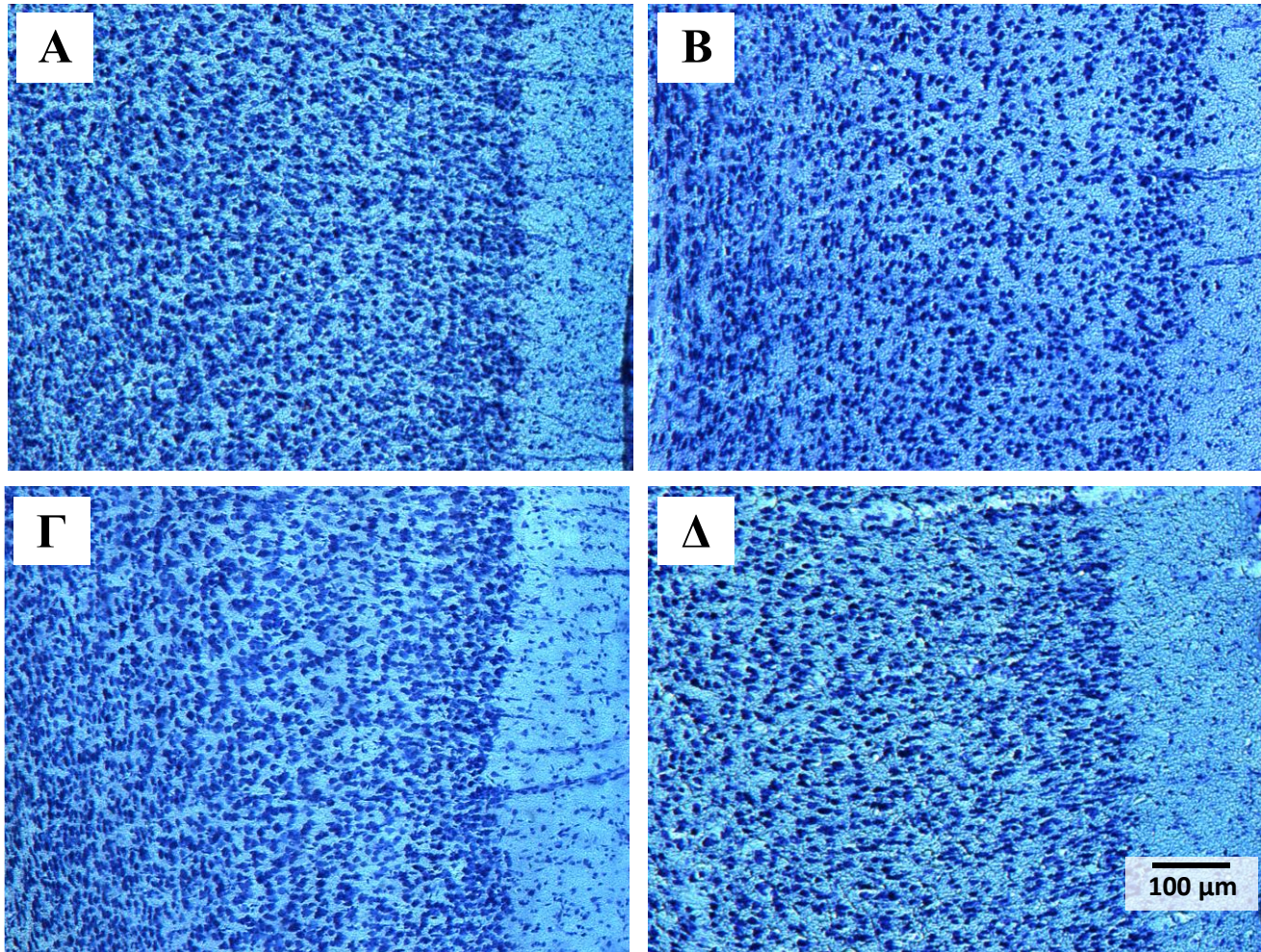
Στα ζώα ελέγχου η ένταση του σήματος των σωματιδίων Nissl μετά από χρώση τους με τη χρωστική Cresyl Violet ήταν κατά μέσο όρο $20 \pm 1,8$ ενώ στα FAS-Ctr, Ctr-PTZ και FAS-PTZ ζώα ήταν $11,94 \pm 2,7$, $15,54 \pm 3,4$ και $14,87 \pm 2,8$, αντίστοιχα [κλίμακα έντασης σήματος 256 σημείων (0-255), n=4 ζώα σε κάθε ομάδα, 3-15 τομές/ζώο]. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια του προγράμματος Prism και της στατιστικής δοκιμής t-test έδειξε στατιστικώς σημαντική μείωση ($p_{\text{value}} < 0,05$) της έντασης του σήματος των σωματιδίων Nissl στο Μέσο Προμετωπιαίο Φλοιό των FAS-Ctr ζώων συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου (Εικόνα 19). Παραδείγματα της χρώσης των σωματιδίων Nissl στις διάφορες ομάδες ζώων παρουσιάζονται στις Εικόνες 20 και 21.



Εικόνα 19: Ένταση σήματος των σωματιδίων Nissl του μέσος προμετωπιαίος φλοιός έπειτα από χρώση με Cresyl Violet, * $p < 0,05$ (N=4).



Εικόνα 20: Χρώση Cresyl Violet για τη σήμανση των σωματιδίων Nissl στο Μέσο Προμετωπιαίο Φλοιό σε (Α) ζώα ελέγχου (N=4), (Β) FAS-Ctr επίμυες (N=4), (Γ) Ctr-PTZ επίμυες (N=4) και σε (Δ) FAS-PTZ επίμυες (N=4). Κλίμακα: 500 μm .

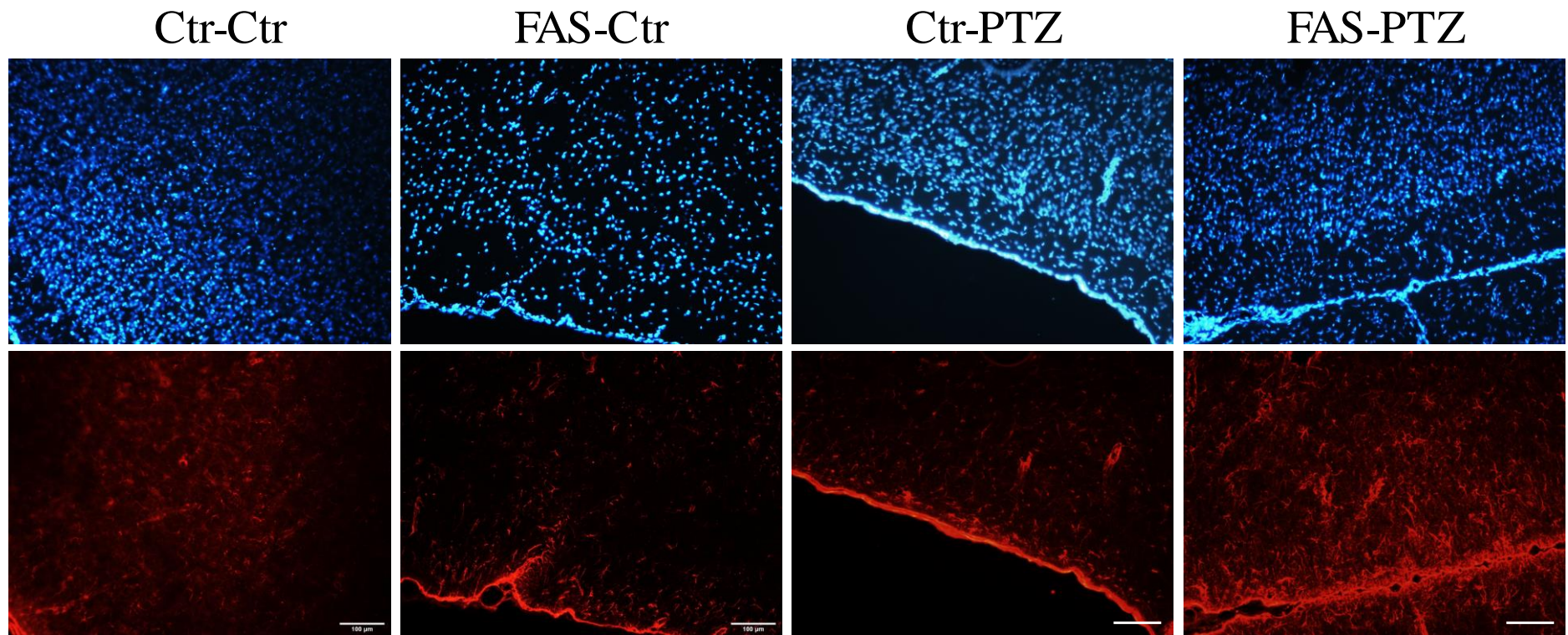


Εικόνα 21: Χρώση Cresyl Violet για τα σωμάτια Nissl στον Προμεταιχμιακό Φλοιό του μέσος προμετωπιαίος φλοιός σε (Α) ζώα ελέγχου (N=4), (Β) FAS-Ctr επίμνες (N=4), (Γ) Ctr-PTZ επίμνες (N=4) και σε (Δ) FAS-PTZ επίμνες (N=4). Κλίμακα: 100 μm, Μεγέθυνση: x10.

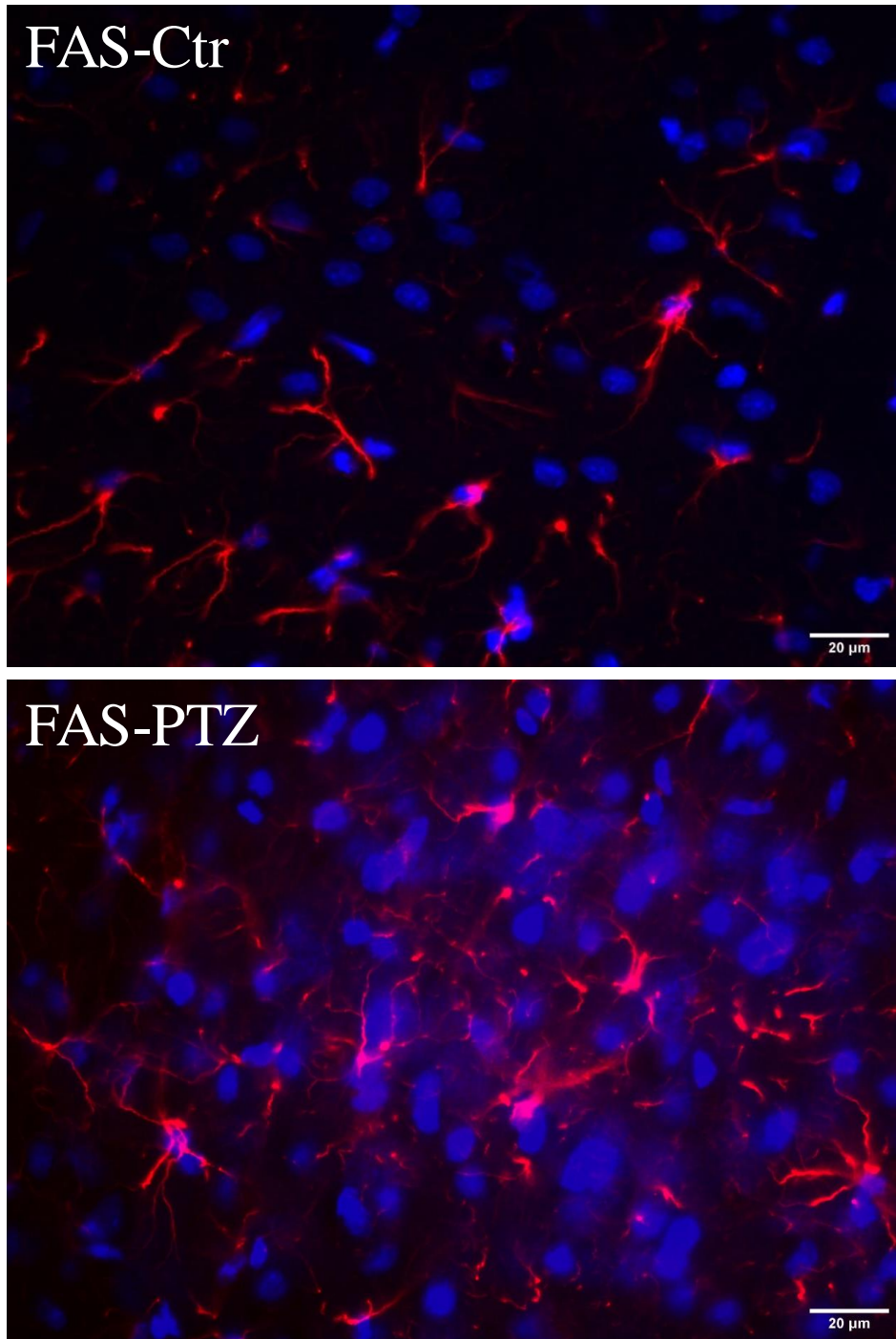
Ανοσοδραστικότητα της GFAP

Με σκοπό την εκτίμηση του αριθμού των κυττάρων στο μέσο προμετωπιαίο φλοιό στις συνθήκες που εξετάστηκαν διενεργήθηκε ιστοχημική χρώση του με τη χρωστική 4',6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλη (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) η οποία βάφει πυρήνες κυττάρων καθώς αναγνωρίζει το δινουκλεοτίδιο Αδενίνη – Θυμίνη (AT) του dsDNA. Επιπλέον, με σκοπό τον εντοπισμό των αστροκυττάρων στο ιστό και την ανίχνευση πιθανών μορφολογικών αλλαγών τους έγινε ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός της όξινης πρωτεΐνης των (ενδιάμεσων) ινιδίων της γλοίας (Glial fibrillary acidic protein, GFAP). Η εκτίμηση της έκφρασης της GFAP συμβάλλει στον έλεγχο της ύπαρξης αντιδραστικών αστροκυττάρων τα οποία αποτελούν ένδειξη φλεγμονής.

Η χρώση του ιστού με τη χρωστική DAPI κατέδειξε, στην περίπτωση των FAS-Ctr επίμυων, έντονη μείωση στον αριθμό των κυττάρων στο μέσο προμετωπιαίο φλοιό συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου, κάτι το οποίο δεν παρατηρήθηκε στα FAS-PTZ ζώα στα οποία ο αριθμός των κυττάρων ήταν εμφανώς μεγαλύτερος (Εικόνες 22 και 23). Επιπλέον, συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου, παρατηρήθηκε αυξημένη ανοσοδραστικότητα της GFAP, τόσο στα FAS-Ctr όσο και στα Ctr-PTZ ζώα ενώ ο συνδυασμός των δύο αυτών προσβολών (FAS-PTZ ζώα) οδήγησε σε ακόμα εντονότερη αύξηση της ανοσοδραστικότητας της GFAP στον ιστό (Εικόνες 22 και 23, ενδεικτικά εστιασμένες στον προμεταιχμιακό φλοιό ο οποίος είναι μια από τις υποπεριοχές του μέσου προμετωπιαίου φλοιού).



Εικόνα 22: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της GFAP στον προμεταιχμακό φλοιό του μέσου προμετωπιαίου φλοιού στις 4 ομάδες επίμυων (N=4 για κάθε ομάδα). Πάνω: χρώση DAPI, κάτω: GFAP-IR. Παρατηρείται έντονη μείωση στον αριθμό των κυττάρων (χρώση DAPI) σε FAS-Ctr επίμυες. Επίσης, παρατηρείται αύξηση της ανοσοδραστικότητας της GFAP σε FAS-PTZ επίμυες και ύπαρξη αντιδραστικών αστροκυττάρων. Κλίμακα: 100 μ m, Μεγέθυνση: x10.

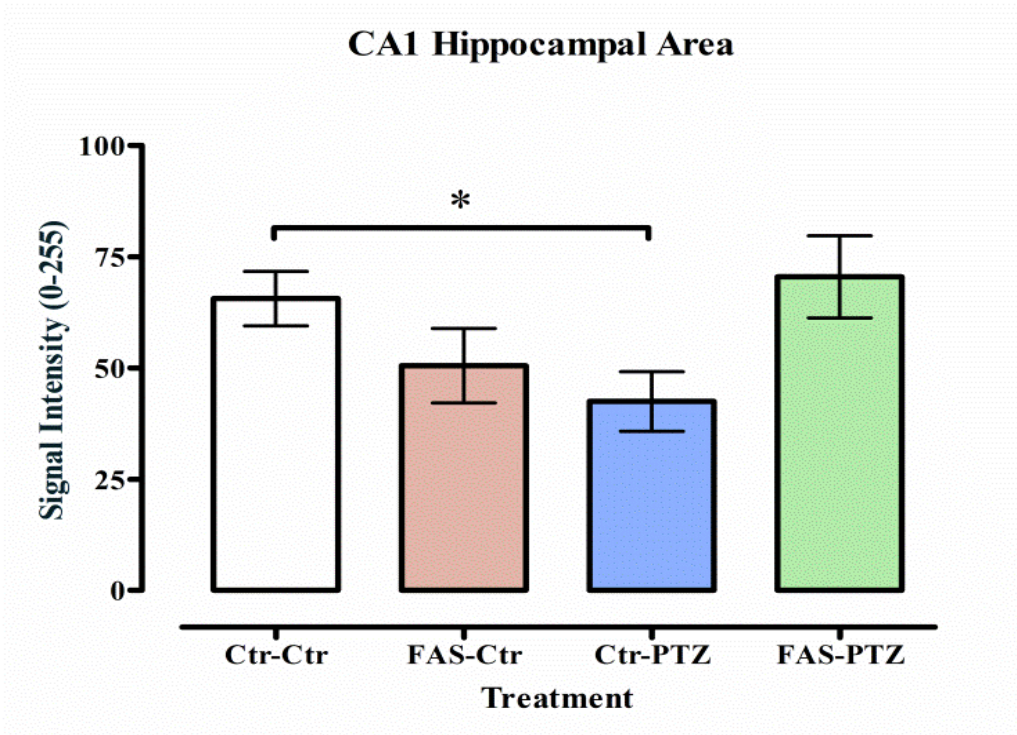


Εικόνα 23: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της GFAP στον προμεταστατικό φλοιό του μέσου προμετωπιαίου φλοιού σε FAS-Ctr (N=4) και FAS-PTZ (N=4) επίμυες. Παρατηρείται αύξηση στον αριθμό των κυττάρων (χρώση DAPI, μπλε) και στην ανοσοδραστικότητα της GFAP (κόκκινο) στους FAS-PTZ επίμυες σε σχέση με τους FAS-Ctr επίμυες καθώς και ύπαρξη αντιδραστικών αστροκυττάρων. Κλίμακα: 20 μm, Μεγέθυνση: x40.

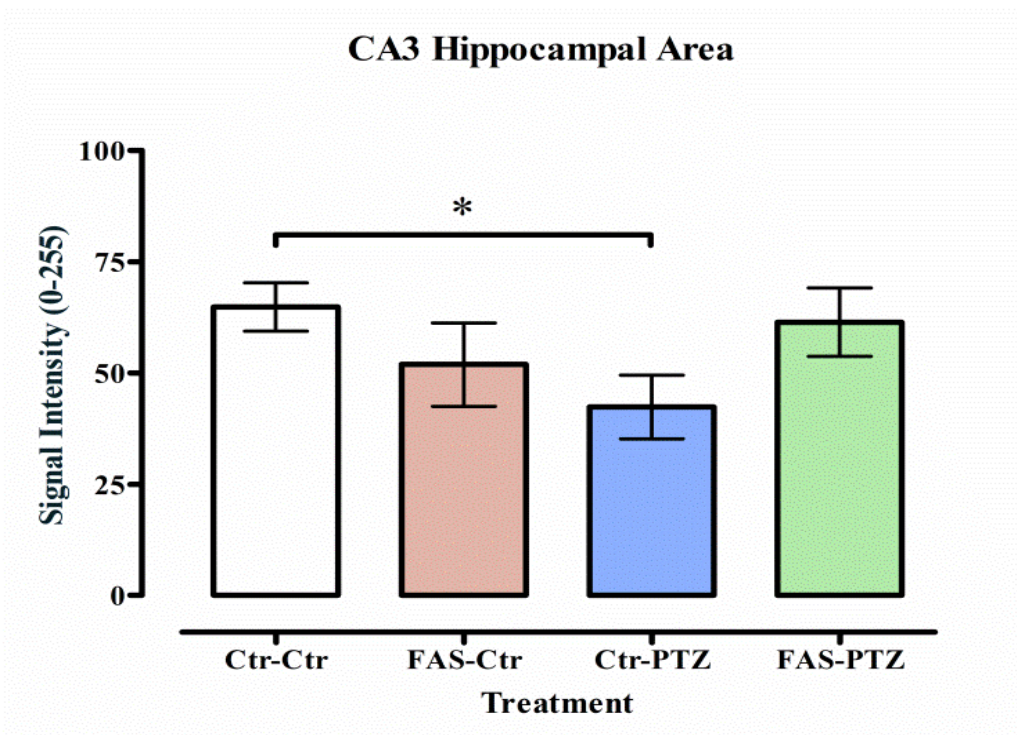
Επίδραση της επιληπτογένεσης με πεντυλενοτετραζόλη υπό εδάφους εμβρυϊκού αλκοολικού συνδρόμου στον ιππόκαμπο επίμυος

Χρώση σωματιδίων Nissl

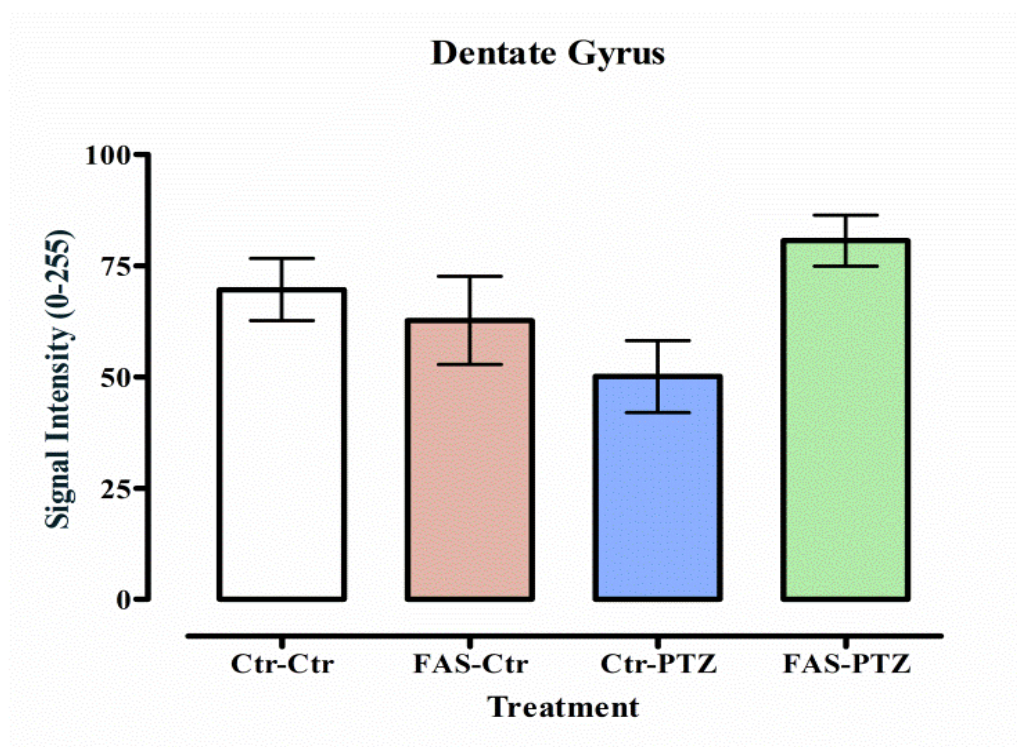
Η ανάλυση του ιστού που υπεβλήθη σε χρώση με Cresyl Violet για τη σήμανση των σωματιδίων Nissl των CA1, CA3 πεδίων και της οδοντωτής έλικας του ιππόκαμπου επίμυος, κατέδειξε διαφοροποίηση στην ένταση του σήματος των σωματιδίων Nissl στις διάφορες συνθήκες που εξετάστηκαν. Στα ζώα ελέγχου η ένταση του σήματος των σωματιδίων Nissl της στιβάδας των πυραμιδικών κυττάρων του CA1 πεδίου κατά μέσο όρο είναι $65,60 \pm 6,12$ [κλίμακα έντασης σήματος 256 σημείων (0-255), n=4 ζώα σε κάθε ομάδα, 5-10 τομές/ζώο], ενώ στα FAS-Ctr, Ctr-PTZ και FAS-PTZ ζώα είναι $50,53 \pm 8,35$, $42,49 \pm 6,71$, $70,50 \pm 9,21$, αντίστοιχα. Για τη στιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων του CA3 πεδίου, η ένταση του σήματος των σωματιδίων Nissl στα ζώα ελέγχου είναι κατά μέσο όρο $64,84 \pm 5,41$ ενώ στα FAS-Ctr, Ctr-PTZ και FAS-PTZ ζώα είναι $51,90 \pm 9,38$, $42,35 \pm 7,15$, $61,41 \pm 7,72$, αντίστοιχα. Για τη στιβάδα των κοκκωδών κυττάρων της οδοντωτής έλικας, η ένταση του σήματος των σωματιδίων Nissl στα ζώα ελέγχου είναι κατά μέσο όρο $69,66 \pm 7,00$ ενώ στα FAS-Ctr, Ctr-PTZ και FAS-PTZ ζώα είναι $62,71 \pm 9,92$, $50,11 \pm 8,08$, $80,65 \pm 5,70$, αντίστοιχα. Στην περίπτωση των Ctr-PTZ επίμυων, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση ($p_{\text{value}} < 0,05$) της έντασης του σήματος των σωματιδίων Nissl στην πυραμιδική στιβάδα τόσο του CA1 όσο και του CA3 πεδίου συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου. Η διαφορά αναδείχθηκε μέσω της χρήσης του προγράμματος Prism και της διενέργειας στατιστικής δοκιμής t-test.



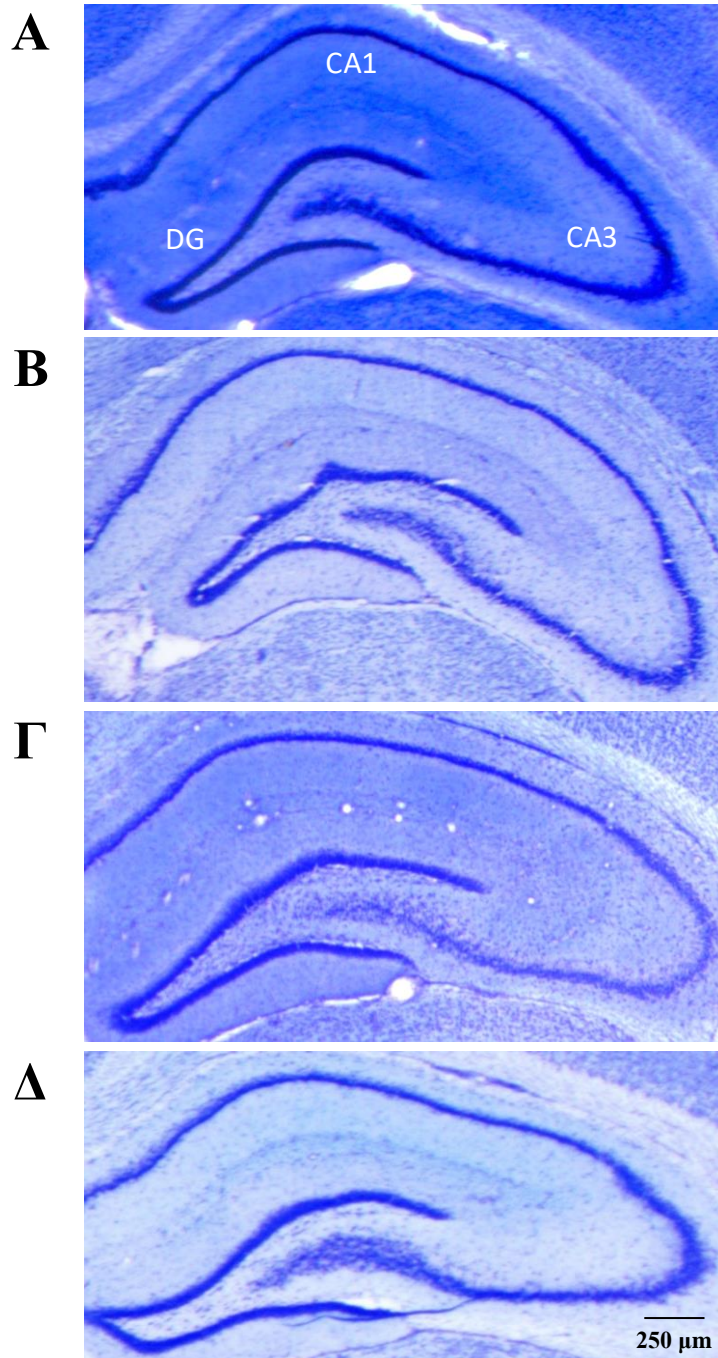
Εικόνα 24: Ένταση σήματος των σωματιδίων Nissl της πυραμδικής στιβάδας του CA1 πεδίου του ιππόκαμπου έπειτα από χρώση με Cresyl Violet, * $p < 0,05$ (N=4).



Εικόνα 25: Ένταση σήματος των σωματιδίων Nissl της πυραμδικής στιβάδας του CA3 πεδίου του ιππόκαμπου έπειτα από χρώση με Cresyl Violet, * $p < 0,05$ (N=4).



Εικόνα 26: Ένταση σήματος των σωματιδίων Nissl της στιβάδας των κοκκωδών κυττάρων της οδοντωτής έλικας του υπόκαμπου έπειτα από χρώση με Cresyl Violet (N=4).

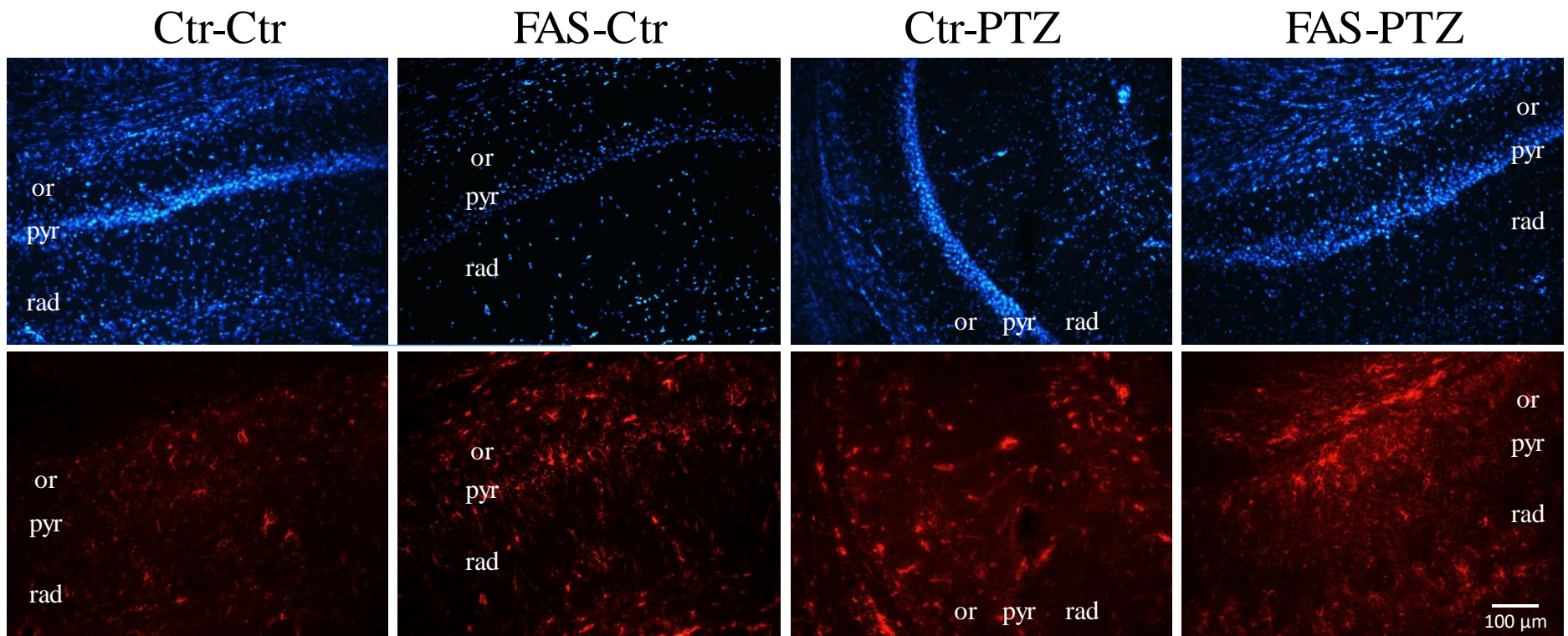


Εικόνα 27: Χρώση Cresyl Violet για τα σωμάτια Nissl στον ιππόκαμπο σε (Α) ζώα ελέγχου (N=4), (Β) FAS-Ctr επίμνες (N=4), (Γ) Ctr-PTZ επίμνες (N=4) και σε (Δ) FAS-PTZ επίμνες (N=4). Παρατηρείται εντονότερα η μείωση της έντασης του σήματος των σωματιδίων Nissl στην πυραμδική στιβάδα του CA3 πεδίου στους Ctr-PTZ επίμνες (Γ). Κλίμακα: 250 μm .

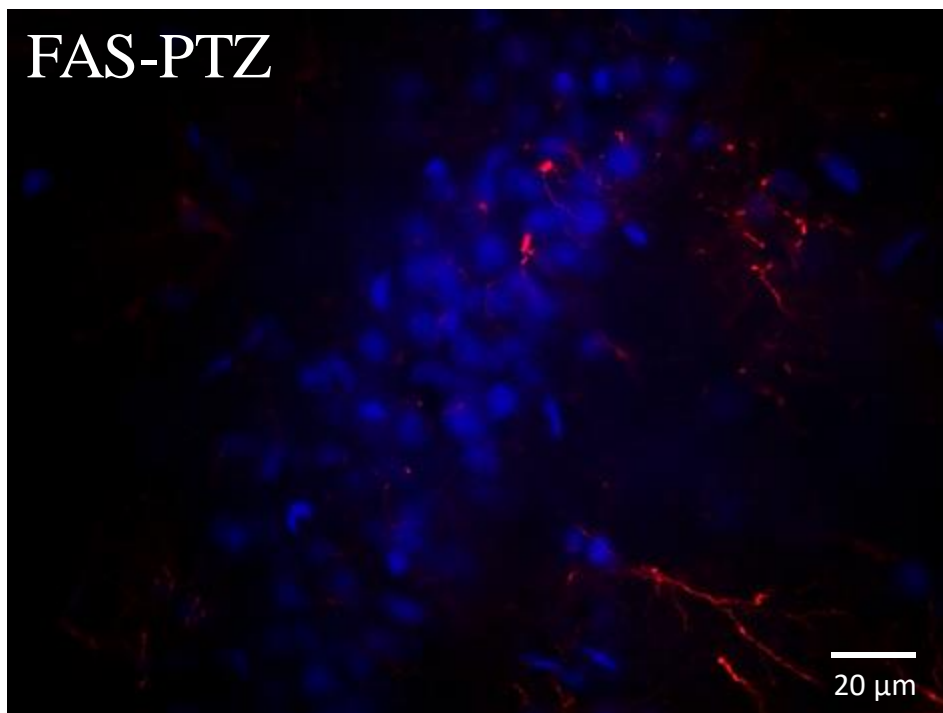
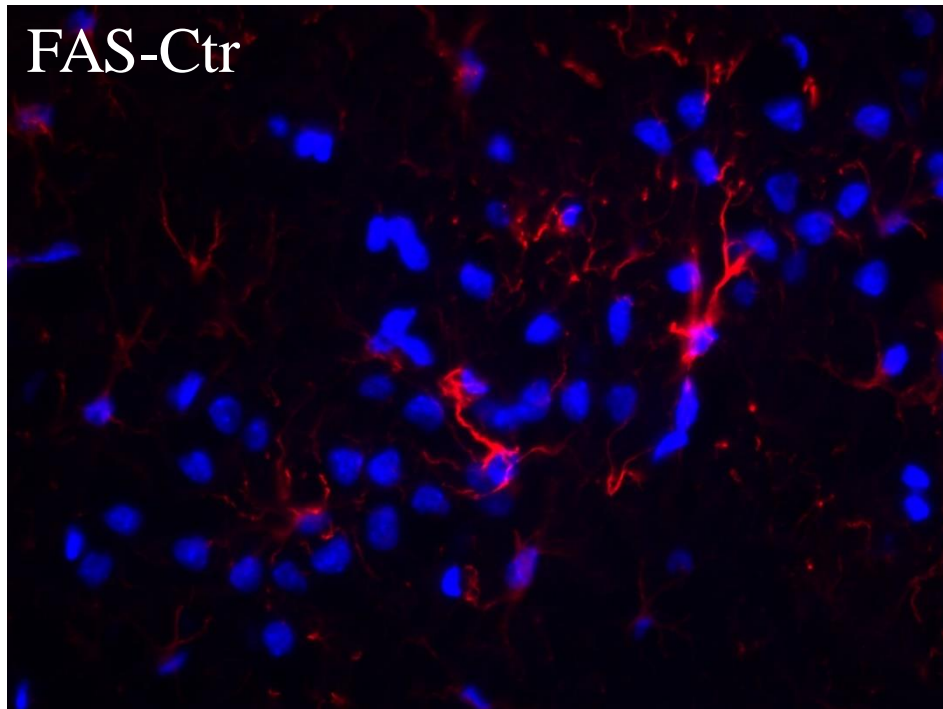
Ανοσοδραστικότητα της GFAP

CA1 πεδίο

Η χρώση των κυττάρων με DAPI κατέδειξε, στην περίπτωση των FAS-Ctr επίμυων, έντονη μείωση στον αριθμό των κυττάρων στη στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων (oriens layer, or), στη στιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων (pyramidal layer, pyr) αλλά και στην ακτινωτή στιβάδα (radiatum layer, rad) συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου κάτι το οποίο δεν παρατηρήθηκε στα FAS-PTZ ζώα. Επιπρόσθετα, στην περίπτωση των FAS-Ctr επίμυων, παρατηρήθηκε αυξημένη ανοσοδραστικότητα της GFAP, συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου, και πόλωση των αντιδραστικών αστροκυττάρων στη στιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων του CA1 πεδίου. Παρόμοιο φαινόμενο πόλωσης των αντιδραστικών αστροκυττάρων δεν παρατηρήθηκε σε άλλη στιβάδα του CA1 πεδίου του ιππόκαμπου παρά την γενικότερη αύξηση της έκφρασης της GFAP.



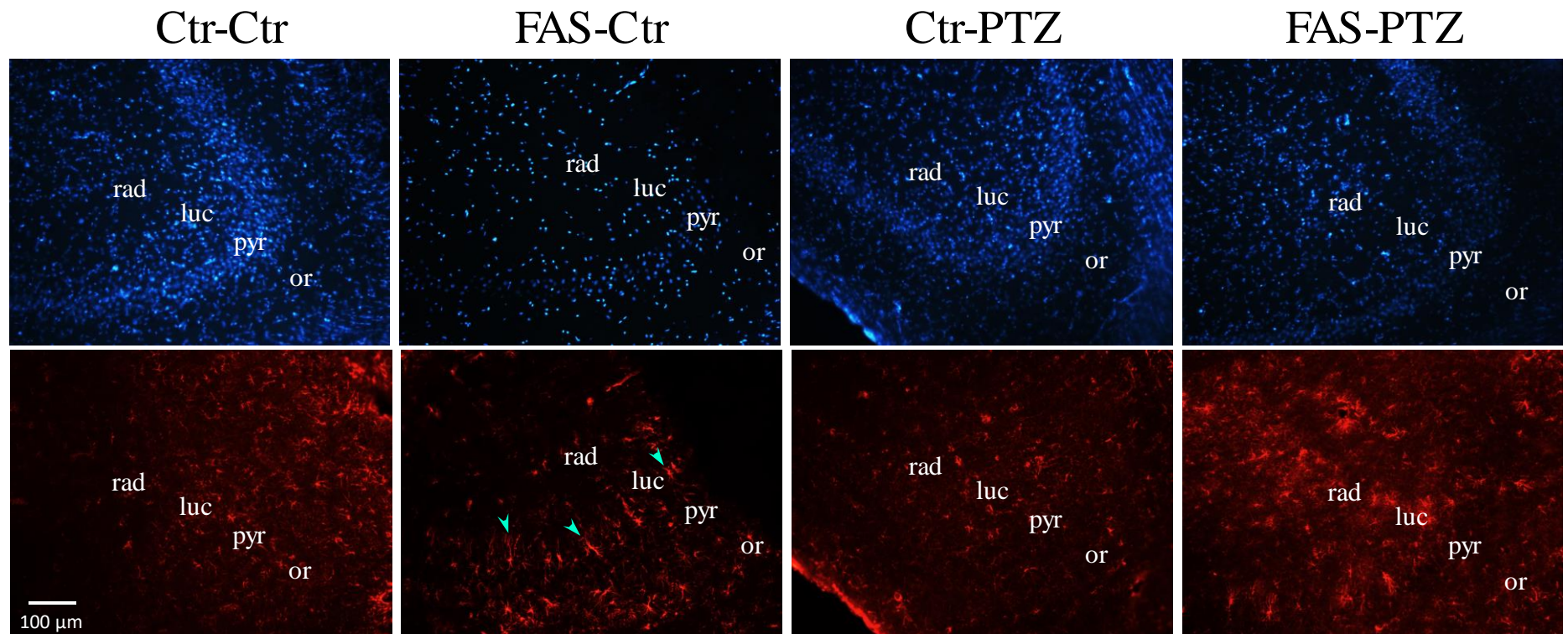
Εικόνα 28: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της GFAP στο CA1 πεδίο του ιππόκαμπου σε όλες τις ομάδες πειραματόζωων (N=4 για κάθε ομάδα). Πάνω: Χρώση DAPI, κάτω: GFAP-IR. Παρατηρείται μείωση των κυττάρων σε όλες τις στιβάδες στα FAS-Ctr ζώα συγκριτικά με τα ζώα Ctr-Ctr και πόλωση των αντιδραστικών αστροκυττάρων στη στιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων. *Συντμήσεις: or:* oriens layer (στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων), *pyr:* pyramidal layer (πυραμιδική στιβάδα), *rad:* radiatum layer (ακτινωτή στιβάδα). *Κλίμακα: 100 μm, Μεγέθυνση: x10.*



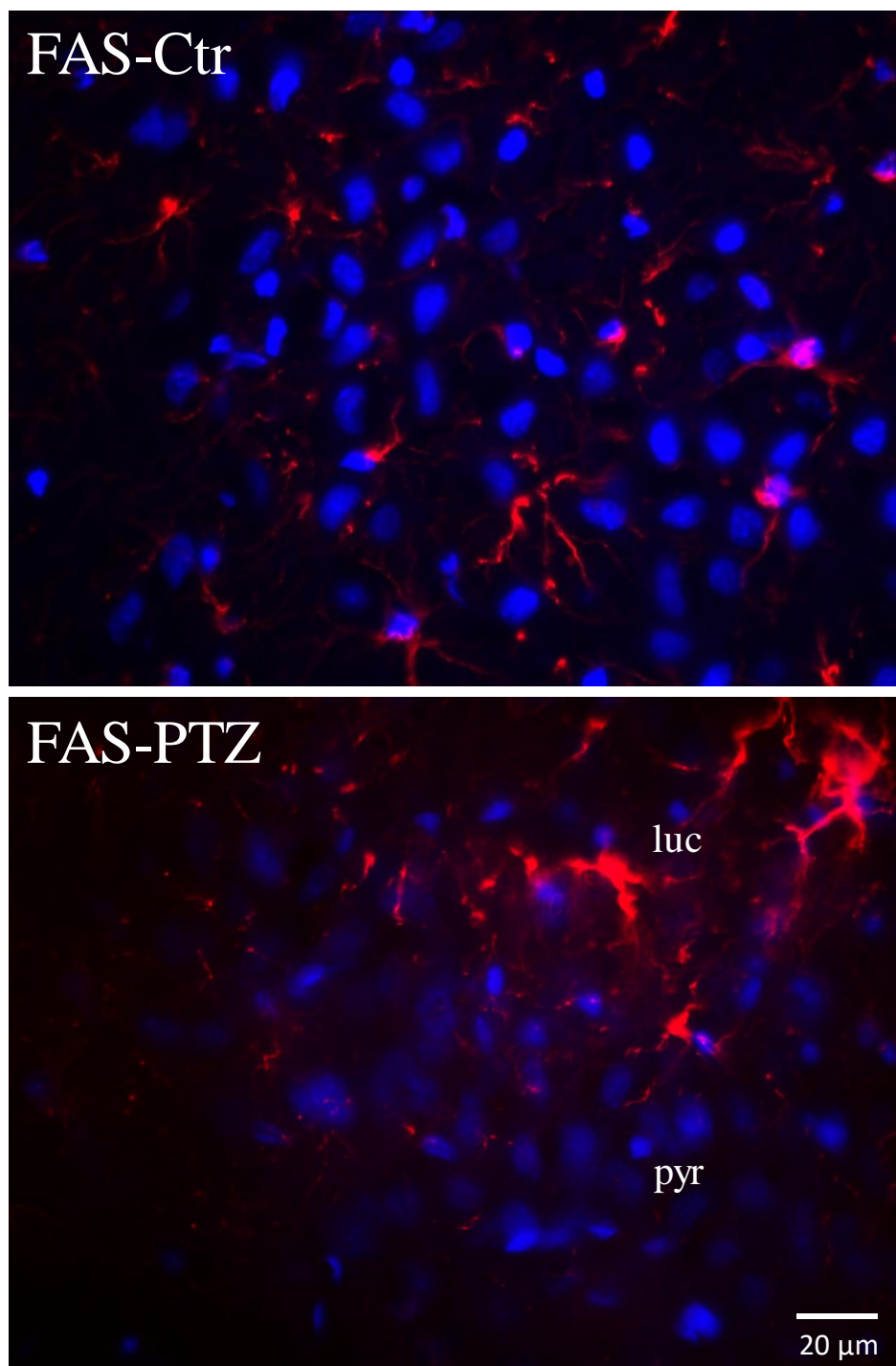
Εικόνα 29: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της GFAP στην πυραμιδική στιβάδα του CA1 πεδίου του ιππόκαμπου σε FAS-Ctr (N=4) και FAS-PTZ (N=4) επίμυες. Παρατηρείται αύξηση στον αριθμό των κυττάρων (χρώση DAPI, μπλε) στους FAS-PTZ επίμυες σε σχέση με τους FAS-Ctr επίμυες. Κλίμακα: 20 μm, Μεγέθυνση: x40.

CA3 πεδίο

Στην περίπτωση των FAS-Ctr επίμυων, η χρώση των κυττάρων με DAPI κατέδειξε έντονη μείωση στον αριθμό των κυττάρων στη στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων (oriens layer, or), στη διαυγή στιβάδα (stratum lucidum, luc), στη στιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων (pyramidal layer, pyr) αλλά και στην ακτινωτή στιβάδα (radiatum layer, rad) συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου, κάτι το οποίο δεν παρατηρήθηκε στα FAS-PTZ ζώα. Επιπλέον, στην περίπτωση των FAS-Ctr επίμυων, μέσω του ανοσοϊστοχημικού εντοπισμού της GFAP παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση της GFAP, συγκριτικά με τα ζώα αναφοράς, και πόλωση των αντιδραστικών αστροκυττάρων στη διαυγή στιβάδα και προσανατολισμός των αποφύσεων τους προς την πυραμιδική και την ακτινωτή στιβάδα του CA3 πεδίου. Στην περίπτωση των FAS-PTZ επίμυων παρατηρείται αυξημένη έκφραση της GFAP, συγκριτικά με τα ζώα αναφοράς, και πόλωση των αντιδραστικών αστροκυττάρων στη διαυγή στιβάδα του CA3 πεδίου.



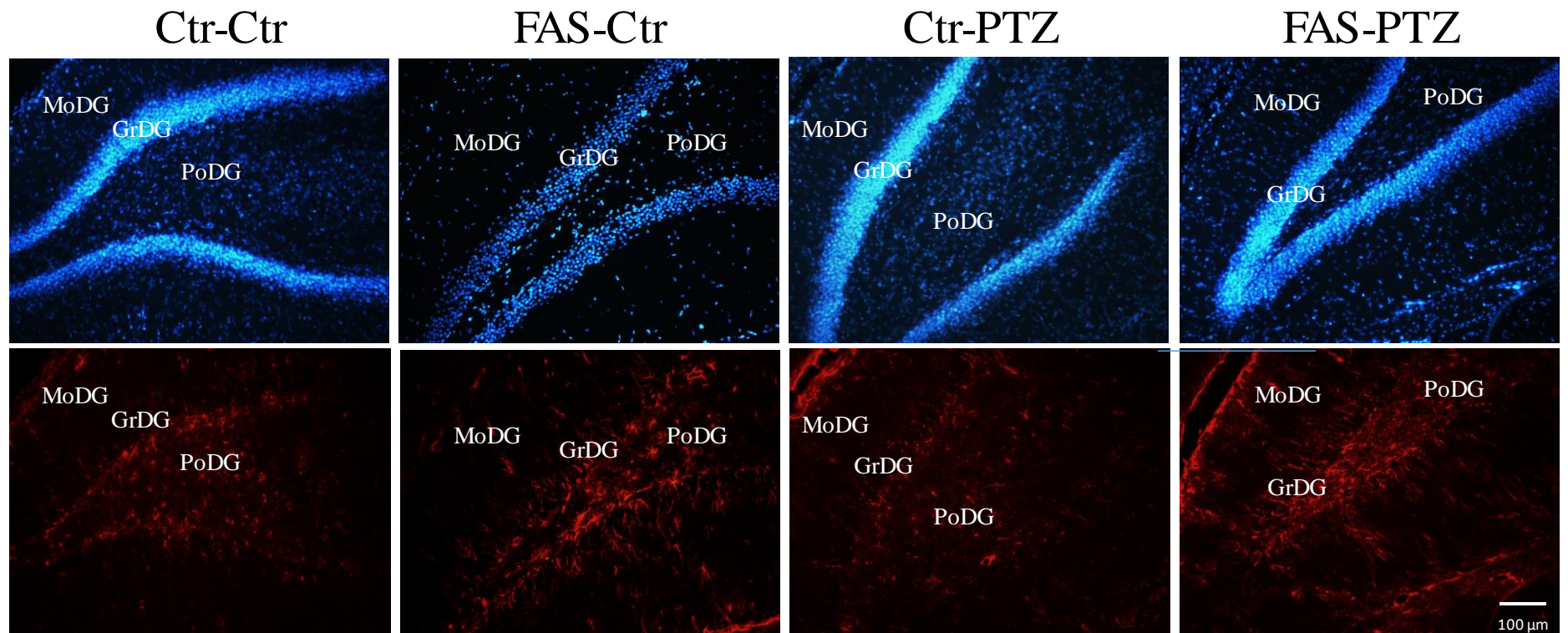
Εικόνα 30: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της GFAP στο CA3 πεδίο του ιππόκαμπου σε όλες τις ομάδες πειραματοζώων (N=4 για κάθε ομάδα). Πάνω: Χρώση DAPI, κάτω: GFAP-IR. Παρατηρείται μείωση των κυττάρων σε όλες τις στιβάδες στα FAS-Ctr ζώα συγκριτικά με τα ζώα Ctr-Ctr, πόλωση των αντιδραστικών αστροκυττάρων στη διαυγή στιβάδα και προσανατολισμός των αποφύσεων τους προς την πυραμιδική και την ακτινωτή στιβάδα (βέλη) του CA3 πεδίου. Επιπλέον, στους FAS-PTZ επίμους παρατηρείται πόλωση των αντιδραστικών αστροκυττάρων στη διαυγή στιβάδα. Συντμήσεις: **or:** oriens layer (στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων), **pyr:** pyramidal layer (πυραμιδική στιβάδα), **luc:** stratum lucidum (διαυγή στιβάδα), **rad:** radiatum layer (ακτινωτή στιβάδα). Κλίμακα: 100 μm, Μεγέθυνση: x10.



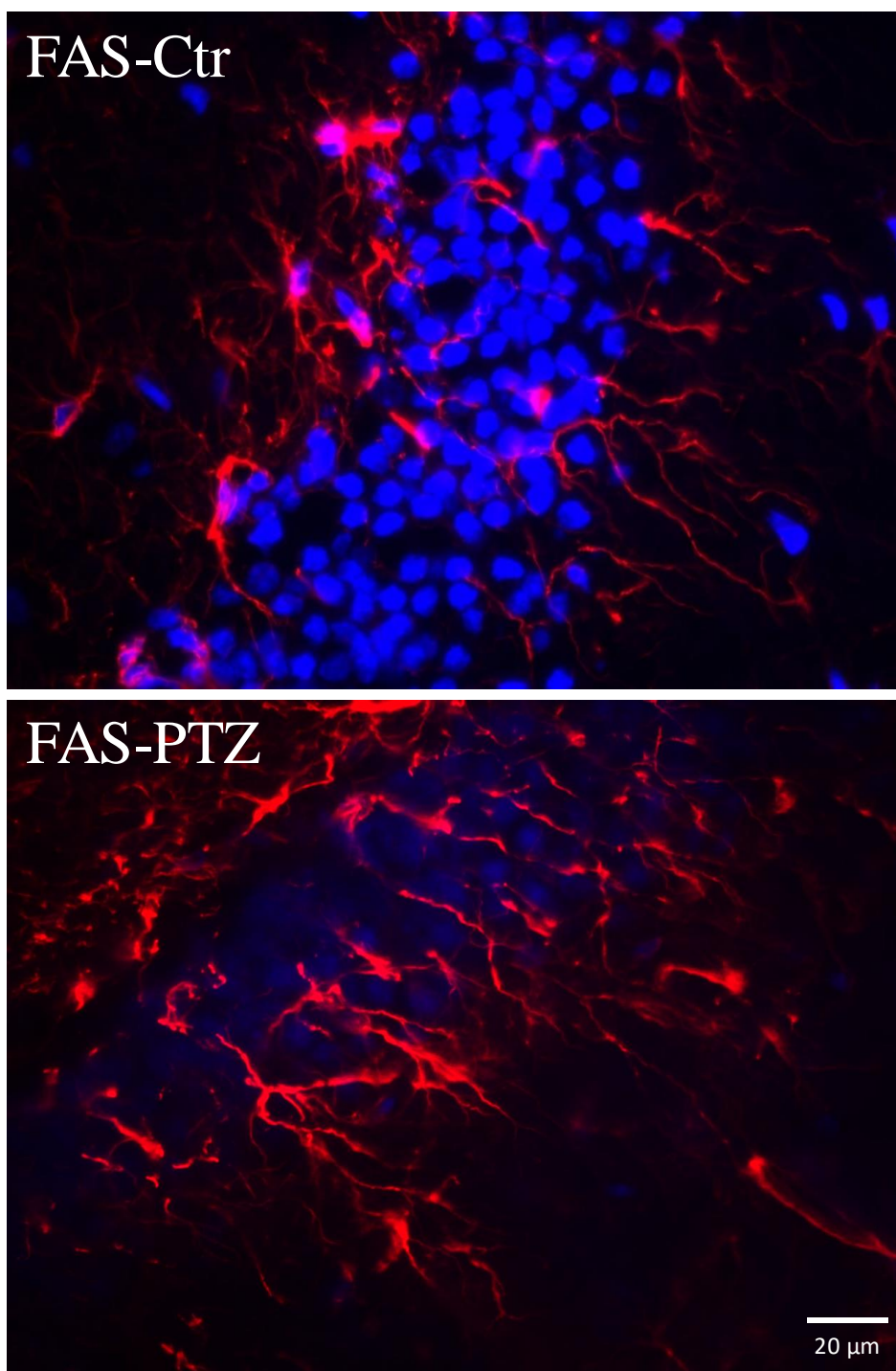
Εικόνα 31: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της GFAP στην πυραμιδική στιβάδα του CA3 πεδίου του ιππόκαμπου σε FAS-Ctr (N=4) και FAS-PTZ (N=4) επίμυες. Παρατηρείται αύξηση στον αριθμό των κυττάρων (χρώση DAPI, μπλε) στους FAS-PTZ επίμυες σε σχέση με τους FAS-Ctr επίμυες και πόλωση των αντιδραστικών αστροκυττάρων και στις δύο ομάδες πειραματοζώων. Σνυτμήσεις: *pyr*: pyramidal layer (πυραμιδική στιβάδα), *luc*: stratum lucidum (διανογή στιβάδα). Κλίμακα: 20 μm, Μεγέθυνση: x40.

Οδοντωτή έλικα

Χρώση των κυττάρων με DAPI κατέδειξε μείωση στον αριθμό των κυττάρων στη στιβάδα των κοκκωδών κυττάρων (Granule cell layer Dentate Gyrus, GrDG), στη μοριακή στιβάδα (Molecular layer Dentate Gyrus, MoDG) και στη στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων (Polymorph layer Dentate Gyrus, PoDG) στους FAS-Ctr επίμυες συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου, κάτι το οποίο δεν παρατηρήθηκε στα FAS-PTZ ζώα. Επιπλέον, στην περίπτωση των FAS-Ctr και FAS-PTZ επίμυων, μέσω του ανοσοϊστοχημικού εντοπισμού της GFAP παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση της GFAP, συγκριτικά με τα ζώα αναφοράς, και πόλωση των αντιδραστικών αστροκυττάρων στη στιβάδα των κοκκωδών κυττάρων της οδοντωτής έλικας.



Εικόνα 32: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της GFAP στο CA3 πεδίο του ιππόκαμπου σε όλες τις ομάδες πειραματοζώων (N=4 για κάθε ομάδα). Πάνω: Χρώση DAPI, κάτω: GFAP-IR. Παρατηρείται μείωση των κυττάρων σε όλες τις στιβάδες στα FAS-Ctr ζώα συγκριτικά με τα ζώα Ctr-Ctr και πόλωση των αντιδραστικών αστροκυττάρων στη κοκκώδη στιβάδα τόσο στους FAS-Ctr όσο και στους FAS-PTZ επίμυες. *Συντμήσεις: GrDG: Granule cell layer Dentate Gyrus (στιβάδα των κοκκωδών κυττάρων), MoDG: Molecular layer Dentate Gyrus (μοριακή στιβάδα), PoDG: Polymorph layer Dentate Gyrus (στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων).* Κλίμακα: 100 μm, Μεγέθυνση: x10.

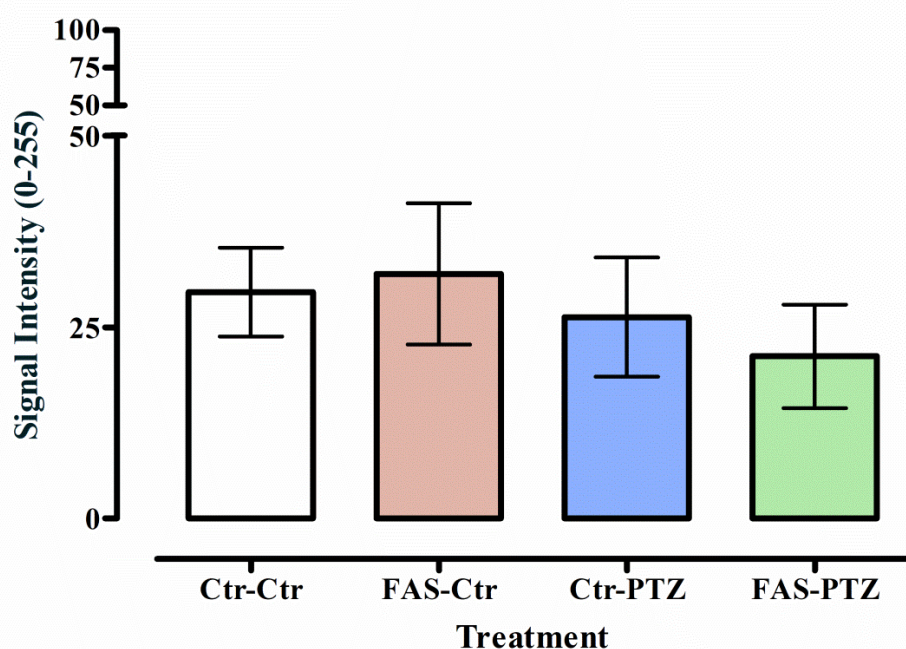


Εικόνα 33: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της GFAP στην κοκκώδη στιβάδα της οδοντωτής έλικας του ιππόκαμπου σε FAS-Ctr (N=4) και FAS-PTZ (N=4) επίμυες. Παρατηρείται πόλωση των αντιδραστικών αστροκυττάρων στη στιβάδα των κοκκωδών κυττάρων της οδοντωτής έλικας και στις δύο ομάδες πειραματοζώων. Κλίμακα: 20 μm , Μεγέθυνση: $\times 40$.

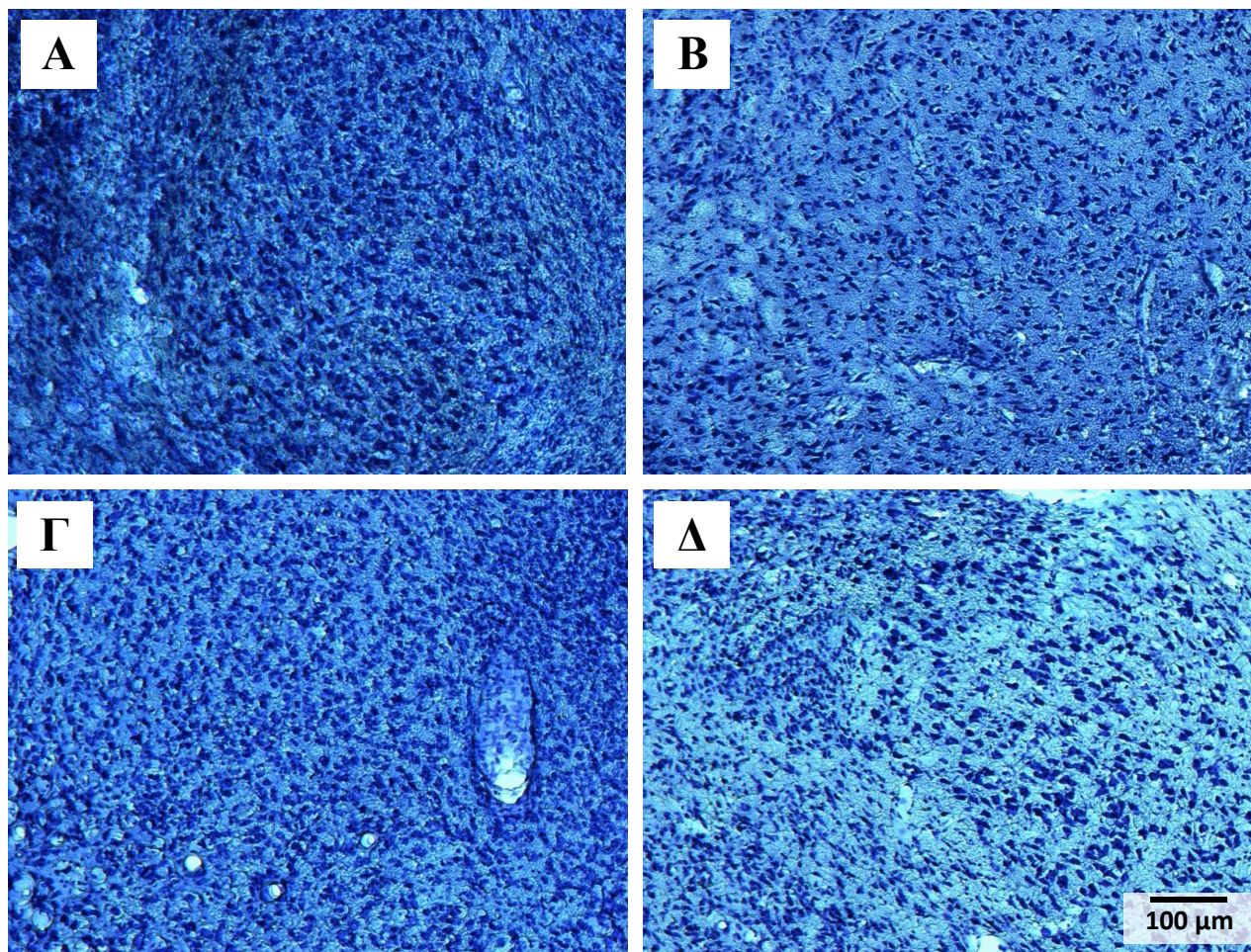
Επίδραση της επιληπτογένεσης με πεντυλενοτετραζόλη υπό εδάφους εμβρυϊκού αλκοολικού συνδρόμου στους βασικούς πυρήνες της αμυγδαλής επίμυος

Χρώση σωματιδίων Nissl

Η ανάλυση του ιστού που υπεβλήθη σε χρώση με Cresyl Violet για τα σωματίδια Nissl των βασικών πυρήνων της αμυγδαλής επίμυος δεν κατέδειξε καμία στατιστικώς σημαντική αλλαγή στην ένταση του σήματος των σωματιδίων Nissl στις διάφορες συνθήκες. Ωστόσο, στη μεγέθυνση x10 (Εικόνα 35) φαίνεται να υπάρχει μείωση στον αριθμό των κυττάρων στους FAS-Ctr και FAS-PTZ επίμυες συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου. Στα ζώα ελέγχου η ένταση του σήματος των σωματιδίων Nissl κατά μέσο όρο είναι $29,58 \pm 5,78$ [κλίμακα έντασης σήματος 256 σημείων (0-255), n=4 ζώα σε κάθε ομάδα, 3-7 τομές/ζώο], ενώ στα FAS-Ctr, Ctr-PTZ και FAS-PTZ ζώα είναι $31,94 \pm 9,21$, $26,31 \pm 7,77$, $21,19 \pm 6,77$, αντίστοιχα.



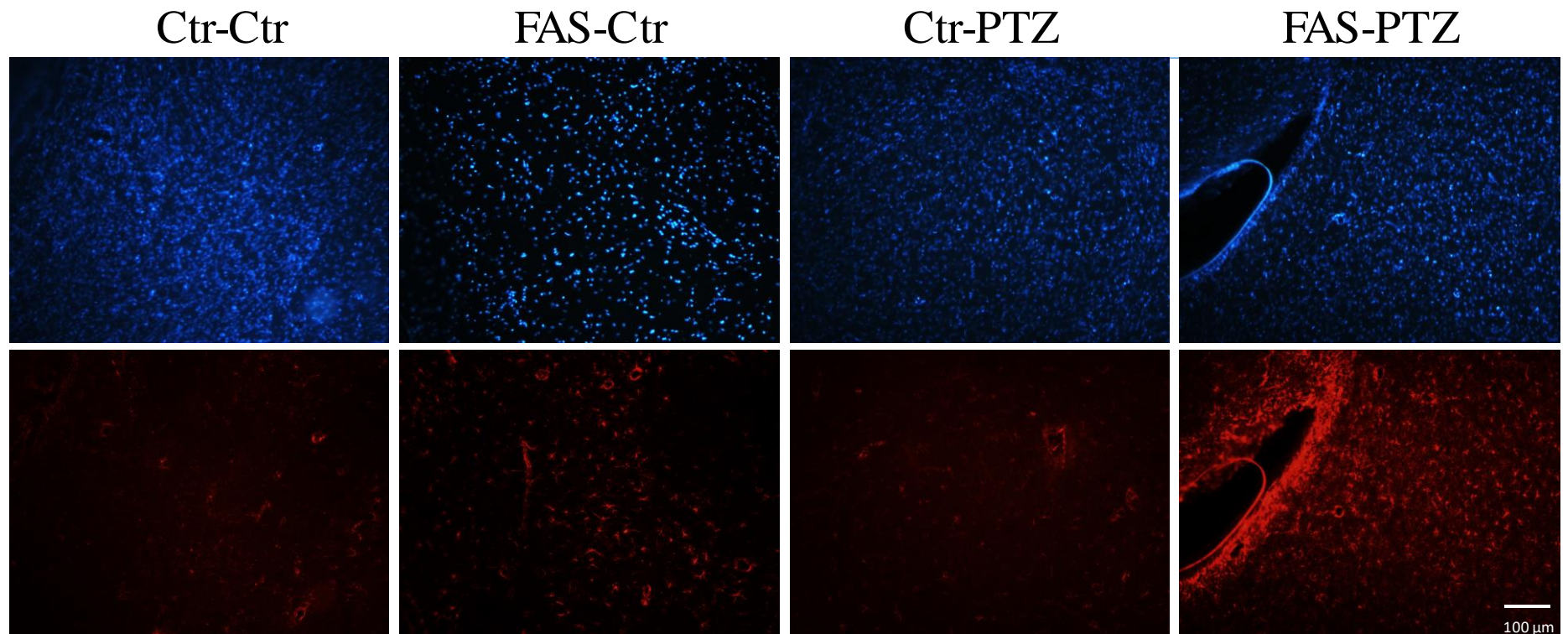
Εικόνα 34: Ένταση σήματος των σωματιδίων Nissl των Βασικών πυρήνων της αμυγδαλής έπειτα από χρώση με Cresyl Violet (N=4).



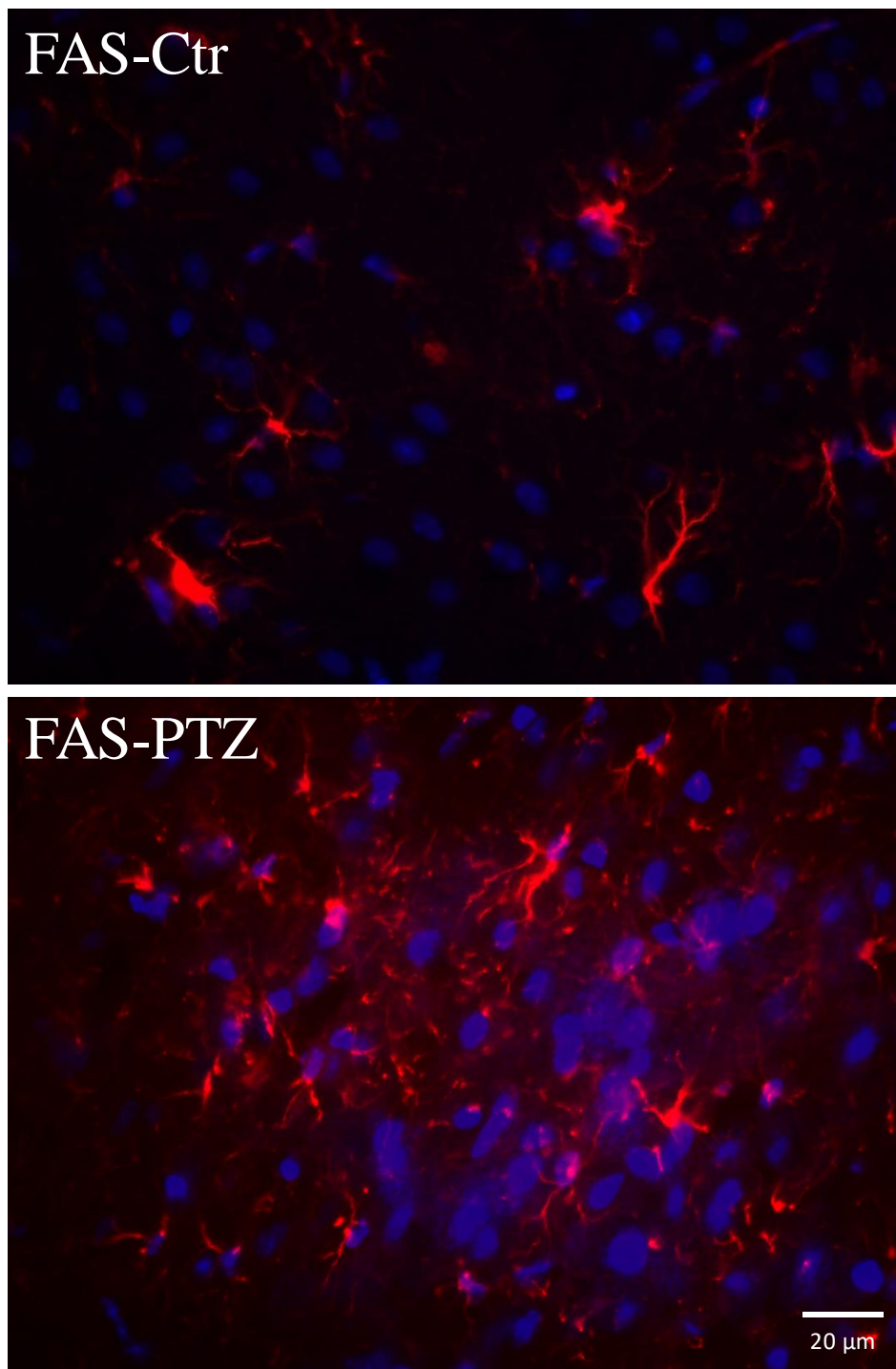
Εικόνα 35: Χρώση Cresyl Violet για τα σωμάτια Nissl στους Βασικούς πυρήνες της αμυγδαλής σε (Α) ζώα ελέγχου (N=4), (Β) FAS-Ctr επίμυες (N=4), (Γ) Ctr-PTZ επίμυες (N=4) και σε (Δ) FAS-PTZ επίμυες (N=4). Παρατηρείται μείωση στον αριθμό των κυττάρων στους FAS-Ctr (Β) και FAS-PTZ (Δ) επίμυες. Κλίμακα 100 μm, Μεγέθυνση: x10.

Ανοσοδραστικότητα της GFAP

Χρώση των κυττάρων με DAPI κατέδειξε μείωση στον αριθμό των κυττάρων στους βασικούς πυρήνες της αμυγδαλής των FAS-Ctr ζώων συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου, κάτι το οποίο δεν παρατηρήθηκε στα FAS-PTZ ζώα. Επιπλέον, στην περίπτωση των FAS-Ctr και FAS-PTZ επίμυων, μέσω του ανοσοϊστοχημικού εντοπισμού της GFAP παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση της GFAP στους βασικούς πυρήνες της αμυγδαλής, συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου, γεγονός που σημαίνει την ύπαρξη αντιδραστικών αστροκυττάρων τα οποία σηματοδοτούν την ύπαρξη φλεγμονής στους πυρήνες αυτούς.



Εικόνα 36: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της GFAP στους βασικούς πυρήνες της αμυγδαλής σε όλες τις ομάδες πειραματόζώων (N=4 για κάθε ομάδα). Πάνω: Χρώση DAPI, κάτω: GFAP-IR. Παρατηρείται μείωση των κυττάρων στα FAS-Ctr ζώα συγκριτικά με τα ζώα Ctr-Ctr και αύξηση της GFAP-IR στους FAS-PTZ επίμνες. *Κλίμακα: 100 μm, Μεγέθυνση: x10*



Εικόνα 37: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της GFAP στους βασικούς πυρήνες της αμυγδαλής σε FAS-Ctr (N=4) και FAS-PTZ (N=4) επίμυες. Παρατηρείται αύξηση της ανοσοδραστικότητας της GFAP στους FAS-PTZ επίμυες. Κλίμακα: 20 μm , Μεγέθυνση: x40.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το συγκεκριμένο μοντέλο εμβρυϊκού αλκοολικού συνδρόμου αναπτύχθηκε σε Sprague-Dawley επίμυες με σκοπό να ισοδυναμεί με τα τρία τρίμηνα της κύησης και ανάπτυξης του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος του ανθρώπου και έτσι να προσεγγίζει όσο το δυνατόν καλύτερα τα χαρακτηριστικά του ανθρώπινου εμβρυϊκού αλκοολικού συνδρόμου. Καθώς τα παιδιά με εμβρυϊκό αλκοολικό σύνδρομο χαρακτηρίζονται από αυθόρμητες επιληπτικές κρίσεις, κάτι το οποίο δεν ισχύει στους επίμυες με το συγκεκριμένο σύνδρομο (Bonthius, D.J., και συν., 2001), πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, χορήγηση του GABA_A ανταγωνιστή πεντυλενοετραζόλης ο οποίος αποτρέπει την υπερπόλωση των νευρώνων 'κλείνοντας' το κανάλι χλωρίου και έτσι οι νευρώνες παραμένουν στη φάση της εκπόλωσης με συνέπεια να υφίστανται συνεχή διέγερση και τα πειραματόζωα να εμφανίζουν επιληπτικές κρίσεις (Viswanatha, G., και συν., 2020). Μεμονωμένα το εμβρυϊκό αλκοολικό σύνδρομο και η χορήγηση της πεντυλενοετραζόλης αλλά και ο συνδυασμός τους, επιδρούν ποικιλοτρόπως στις περιοχές του μέσου προμετωπιαίου φλοιού, του ιππόκαμπου και της αμυγδαλής που μελετήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή εργασία. Οι συγκεκριμένες περιοχές επιλέχθηκαν βιβλιογραφικά καθώς συνδέονται νευροανατομικά και λειτουργικά μεταξύ τους ενώ παράλληλα, έχει αναδειχθεί η επιρροειά τους στην αιθανόλη (Tang, S., και συν., 2019, Gil-Mohapel, J., και συν., 2010, Balaszczuk, V., και συν., 2011). Επιπλέον, συμπεριφορές που παρατηρούνται σε παιδιά με εμβρυϊκό αλκοολικό σύνδρομο, σχετίζονται με τις λειτουργίες για τις οποίες είναι υπεύθυνες ή ρυθμίζουν οι συγκεκριμένες περιοχές (Kozanian, O., και συν., 2018, O'Leary-Moore, S., και συν., 2010, Tang, S., και συν., 2019).

Επίδραση της επιληπτογένεσης με πεντυλενοετραζόλη υπό εδάφους εμβρυϊκού αλκοολικού συνδρόμου στο μέσο προμετωπιαίο φλοιό επίμυος

Η μελέτη του μέσου προμετωπιαίου φλοιού, κατέδειξε στατιστικώς σημαντική μείωση της έντασης του σήματος των σωματιδίων Nissl στο μέσο προμετωπιαίο

φλοιό στους FAS-Ctr επίμυες συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου. Όπως προαναφέρθηκε, τα σωματία Nissl συνίστανται από στιβάδες αδρού ενδοπλασματικού δικτύου με ενδιάμεσες ροζέτες ελεύθερων πολυσωμάτων, διάταξη που εντοπίζεται μόνο στους νευρώνες. Επομένως, η συγκεκριμένη μείωση της έντασης του σήματος των σωματιδίων Nissl στους FAS-Ctr επίμυες πιθανώς οφείλεται σε στρες του Ενδοπλασματικού Δικτύου (Endoplasmic reticulum, ER) στους νευρώνες του μέσου προμετωπιαίου φλοιού που προκαλείται από την έκθεση στην αιθανόλη κατά την ανάπτυξη του εγκεφάλου (Ke, Z., και συν., 2011, Yang F. & Luo J., 2015). Έχουν ταυτοποιηθεί τέσσερις φάσεις αναφορικά με την απόκριση στο στρες του Ενδοπλασματικού Δικτύου. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η τελευταία φάση κατά την οποία ενεργοποιούνται μονοπάτια κυτταρικού θανάτου καθώς το επίπεδο του στρες του ενδοπλασματικού δικτύου δεν επιτρέπει την επαναφορά της λειτουργίας του. Ειδικότερα, η παρατεταμένη ύπαρξη στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο επάγει την ενεργοποίηση δύο διαφορετικών μονοπατιών κυτταρικού θανάτου, της απόπτωσης και της αυτοφαγίας (Ko, A.R., και συν., 2015).

Η ενεργοποίηση μονοπατιών κυτταρικού θανάτου ως απόκριση στο στρες που προκαλείται από την αιθανόλη στο ενδοπλασματικό δίκτυο νευρώνων, θα μπορούσε να εξηγήσει την έντονη μείωση στον αριθμό των κυττάρων, που παρατηρήθηκε στη χρώση των κυττάρων με DAPI, στο μέσο προμετωπιαίο φλοιό στους FAS-Ctr επίμυες συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου. Μία ακόμη εξήγηση θα μπορούσε να είναι η νευροτοξικότητα και ο επερχόμενος κυτταρικός θάνατος των νευρώνων που προκαλούν τα εκκρινόμενα προϊόντα (δραστικές ρίζες οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και κυτταροκίνες) των αντιδραστικών αστροκυττάρων και των ενεργοποιημένων κυττάρων της μικρογλοίας ως απόκριση στην ενεργοποίηση του Toll-like Receptor 4 (TLR-4) από την αιθανόλη (Alfonso-Loeches, S., Guerri, C., 2011). Ειδικότερα, όσον αφορά τις παραγόμενες δραστικές ρίζες οξυγόνου να τονιστεί ότι ο εγκέφαλος είναι μία έντονα επιρρεπής δομή στις επιδράσεις τους καθώς είναι ένα όργανο με υψηλό μεταβολικό ρυθμό που εκτίθεται σε μεγάλες ποσότητες οξυγόνου και τα αντιοξειδωτικά ένζυμα που περιέχει χαρακτηρίζονται από χαμηλά επίπεδα κατάλυσης (Chen, G., και συν., 2008).

Η έντονη μείωση στον αριθμό των κυττάρων στο μέσο προμετωπιαίο φλοιό στους FAS-Ctr επίμυες θα μπορούσε να οφείλεται σε μείωση των θετικών για την παρβαλβουμίνη GABAεργικών ενδονευρώνων όπως παρατήρησαν οι Shirasaka, T., και συν. (2012) σε Wistar επίμυες των οποίων οι μητέρες εκτέθηκαν σε αιθανόλη από τη 10^η έως τη 13^η μέρα της κύησης. Η μείωση του αριθμού των συγκεκριμένων κυττάρων μπορεί να εξηγήσει αδυναμίες που χαρακτηρίζουν τα παιδιά με FASD και τους FAS επίμυες όπως η μνήμη εργασίας (Mihalick, S., και συν. 2001, Jobson, D., και συν., 2021), καθώς οι θετικοί για την παρβαλβουμίνη GABAεργικοί ενδονευρώνες έχουν την ικανότητα να καθοδηγούν συγχρονισμένη ταλαντευόμενη δραστηριότητα στη γάμμα-συχνότητα η οποία έχει αναγνωριστεί ως η κυτταρική βάση γνωσιακών και εκτελεστικών λειτουργιών (Shirasaka, T., και συν., 2012).

Ωστόσο, στους FAS-PTZ επίμυες δεν παρατηρείται παρόμοια μείωση στον αριθμό των κυττάρων στη χρώση των κυττάρων με DAPI στο μέσο προμετωπιαίο φλοιό. Η συγκεκριμένη παρατήρηση θα μπορούσε να εξηγηθεί με δύο τρόπους. Ο πρώτος τρόπος είναι ο πολλαπλασιασμός των αντιδραστικών αστροκυττάρων σε συγκεκριμένα σημεία έπειτα από μακροχρόνια και σοβαρή βλάβη στον εγκέφαλο (Schiweck, J., και συν., 2018) που, στην περίπτωση των FAS-PTZ επίμυων, προκαλείται τόσο από την έκθεση των επίμυων στην αιθανόλη όσο και από τη χορήγηση της πεντυλενοτετραζόλης για την πρόκληση επιληπτικών κρίσεων. Μία δεύτερη εξήγηση θα μπορούσε να είναι η νευρογένεση που παρατηρείται σε επιληπτικά μοντέλα επίμυων (Madsen, T. M., και συν., 2005). Ενδεικτικά να αναφέρουμε ότι οι επιληπτικές κρίσεις επάγουν την έκφραση αυξητικών παραγόντων όπως είναι ο παραγόμενος από τον εγκέφαλο νευροτροφικός παράγοντας (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), ο οποίος έχει βρεθεί ότι προκαλεί πολλαπλασιασμό και νευρογένεση στο νεοφλοιό (Madsen, T. M., και συν., 2005). Δηλαδή, στη δεύτερη αυτή περίπτωση, θα μπορούσαμε να πούμε ότι η χορήγηση της πεντυλενοτετραζόλης για την πρόκληση επιληπτικών κρίσεων στους FAS επίμυες και η πιθανή νευρογένεση που αυτές προκαλούν, συμβάλλει στην αύξηση του αριθμού των κυττάρων στα FAS-PTZ συγκριτικά με τα FAS-Ctr ζώα. Φυσικά, όλες οι παραπάνω υποθέσεις μένει να επιβεβαιωθούν με περαιτέρω πειράματα.

Τέλος, σε όλες τις ομάδες επίμυων παρατηρήθηκε αυξημένη ανοσοδραστικότητα της GFAP στο μέσο προμετωπιαίο φλοιό συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου με εντονότερη αύξηση να παρατηρείται στους FAS-PTZ επίμυες. Η αύξηση της έκφρασης της GFAP συνοδευόμενη από υπερτροφία του κυτταρικού σώματος και των αποφύσεων των αστροκυττάρων χαρακτηρίζει τα αντιδραστικά αστροκύτταρα τα οποία προκύπτουν ως απόκριση σε προσβολές του ΚΝΣ και παράγουν προφλεγμονώδη μόρια και δραστικές ρίζες οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και έτσι σηματοδοτούν την ύπαρξη φλεγμονής στην περιοχή που εξετάζεται (Pekny, M., και συν., 2014, Vainchtein, I., Molofsky, A., 2020, Szabo, G., Lippai, D., 2014). Συνεπώς, γίνεται κατανοητό ότι υφίσταται φλεγμονή στο μέσο προμετωπιαίο φλοιό τόσο στους FAS-Ctr όσο και στους Ctr-PTZ και FAS-PTZ επίμυες.

Επίδραση της επιληπτογένεσης με πεντυλενοτετραζόλη υπό εδάφους εμβρυϊκού αλκοολικού συνδρόμου στον ιπποκαμπο επίμυος

Κατά τη μελέτη του CA1 και CA3 πεδίου του ιππόκαμπου, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση της έντασης του σήματος των σωματιδίων Nissl στη στιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων του CA1 και CA3 πεδίου στους Ctr-PTZ επίμυες συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου. Το γεγονός αυτό πιθανώς οφείλεται σε στρες του ενδοπλασματικού δικτύου στους νευρώνες της πυραμιδικής στιβάδας των πεδίων αυτών που προκαλείται από τη δραστηριότητα των επιληπτικών κρίσεων μετά τη χορήγηση της PTZ (Chen, J., και συν., 2013, Zhu, X., και συν., 2017). Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε, όπως στην περίπτωση του μέσου προμετωπιαίου φλοιού, μείωση στον αριθμό των κυττάρων της πυραμιδικής στιβάδας του CA1 και CA3 πεδίου στη χρώση με DAPI στους Ctr-PTZ επίμυες. Όπως προαναφέρθηκε, έχουν ταυτοποιηθεί τέσσερις φάσεις απόκρισης στο στρες του ενδοπλασματικού δικτύου με την τελευταία και μόνο φάση να χαρακτηρίζεται από ενεργοποίηση μονοπατιών κυτταρικού θανάτου (Ko, A.R., και συν., 2015). Επομένως, είναι εύλογο να συμπεράνουμε ότι οι νευρώνες της πυραμιδικής στιβάδας του CA1 και CA3 πεδίου του ιππόκαμπου χαρακτηρίζονται από στρες του ενδοπλασματικού δικτύου το οποίο, όμως, δεν είναι τόσο έντονο ώστε να

προκαλέσει την ενεργοποίηση μονοπατιών κυτταρικού θανάτου και να επέλθει ο νευροεκφύλιση. Τέλος, η χρώση των σωματιδίων Nissl για τη μελέτη της οδοντωτής έλικας του ιππόκαμπου δεν κατέδειξε κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά στην ένταση του σήματος των σωματιδίων Nissl στη στιβάδα των κοκκωδών κυττάρων της οδοντωτής έλικας.

CA1 πεδίο

Η χρώση των κυττάρων με DAPI κατέδειξε, στην περίπτωση των FAS-Ctr επίμυων, έντονη μείωση στον αριθμό των κυττάρων στη στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων (oriens layer, or), στη στιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων (pyramidal layer, pyr) αλλά και στην ακτινωτή στιβάδα (radiatum layer, rad) συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου. Μείωση στον αριθμό των κυττάρων στη στιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων έχει παρατηρηθεί από τους Livy, D., και συν. (2003) έπειτα από έκθεση σε αιθανόλη Sprague-Dawley επίμυων σε διάστημα ισοδύναμο με το τρίτο τρίμηνο κύησης του ανθρώπου. Η συγκεκριμένη μείωση παρατηρήθηκε κατά την εφαρμογή τόσο μεμονωμένα του διαστήματος αυτού αλλά και στο συνδυασμό του με διαστήματα ισοδύναμα με τα υπόλοιπα δύο τρίμηνα κύησης του ανθρώπου. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε μείωση στον αριθμό των κυττάρων στη στιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων όταν έγινε έκθεση των επίμυων στην αιθανόλη σε διάστημα ισοδύναμο με τα δύο πρώτα τρίμηνα κύησης του ανθρώπου. Η συγκεκριμένη μείωση πιθανώς οφείλεται σε αποπτωτικό θάνατο των νευρώνων του CA1 πεδίου (Ikonomidou, C., και συν., 2000, Pawlak, R., και συν., 2002) εξαιτίας της έκθεσης στην αιθανόλη σε διαστήματα, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, όπου εκτυλίσσεται η νευρογένεση (Klintonova, A., και συν., 2007, Tran, T., Kelly, S., 2003). Στους FAS-PTZ επίμυες δεν παρατηρείται παρόμοια μείωση στον αριθμό των κυττάρων πιθανώς λόγω πολλαπλασιασμού των αντιδραστικών αστροκυττάρων σε συγκεκριμένα σημεία έπειτα από μακροχρόνια και σοβαρή βλάβη στον εγκέφαλο (Schlieweck, J., και συν., 2018) που, στην περίπτωση των FAS-PTZ επίμυων, προκαλείται τόσο από την έκθεση των επίμυων στην αιθανόλη όσο και από τη χορήγηση της πεντυλενοτετραζόλης για την πρόκληση επιληπτικών κρίσεων (Peng, J., και συν., 2019, Park, J., και συν., 2006).

Επιπλέον, στην περίπτωση των FAS-Ctr επίμυων, μέσω του ανοσοϊστοχημικού εντοπισμού της GFAP, παρατηρήθηκε αυξημένη ανοσοδραστικότητα της GFAP στις στιβάδες των πολύμορφων, των πυραμιδικών και την ακτινωτή στιβάδα, συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου, όπως παρατήρησαν και οι Torpper, L., και συν. (2015) σε μοντέλο έκθεσης στην αιθανόλη από την PND3 έως την PND5. Οι Gómez, G., και συν. (2018) παρατήρησαν επίσης αύξηση της έκφρασης της GFAP στις στιβάδες αυτές έπειτα από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση αιθανόλης σε Sprague-Dawley επίμυες κατά την PND25. Η αύξηση της έκφρασης της GFAP συνοδευόμενη από υπερτροφία του κυτταρικού σώματος και των αποφύσεων των αστροκυττάρων χαρακτηρίζει τα αντιδραστικά αστροκύτταρα τα οποία προκύπτουν ως απόκριση σε προσβολές του ΚΝΣ και παράγουν προφλεγμονώδη μόρια και δραστικές ρίζες οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και έτσι σηματοδοτούν την ύπαρξη φλεγμονής στην περιοχή που εξετάζεται (Pekny, M., και συν., 2014, Vainchtein, I., Molofsky, A., 2020, Szabo, G., Lippai, D., 2014). Τέλος, πόλωση των αντιδραστικών αστροκυττάρων στη στιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων του CA1 πεδίου παρατηρήθηκε στους FAS-Ctr επίμυες, γεγονός το οποίο βιβλιογραφικά αποτελεί μία απόκριση των αντιδραστικών αστροκυττάρων στη βλάβη. Η πόλωση ξεκινά με τον επαναπροσανατολισμό του κέντρου οργάνωσης των μικροσωληνίσκων και της συσκευής Golgi, διαδικασία που εξαρτάται από τους μικροσωληνίσκους (Schiweck, J., και συν., 2018).

CA3 πεδίο

Στη χρώση των κυττάρων με DAPI, παρατηρήθηκε έντονη μείωση στον αριθμό των κυττάρων σε όλες τις στιβάδες του CA3 πεδίου στους FAS-Ctr επίμυες συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου. Η συγκεκριμένη μείωση πιθανώς οφείλεται σε αποπτωτικό θάνατο των νευρώνων του CA3 πεδίου (Ikonomidou, C., και συν., 2000, Pawlak, R., και συν., 2002) εξαιτίας της έκθεσης στην αιθανόλη σε διαστήματα, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, όπου εκτυλίσσεται η νευρογένεση (Klintsova, A., και συν., 2007, Tran, T., Kelly, S., 2003, Gil-Mohapel, J., και συν., 2010). Τη μείωση στον αριθμό των κυττάρων στη στιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων του CA3 πεδίου παρατήρησαν οι Livy, D., και συν. (2003) έπειτα από έκθεση σε αιθανόλη Sprague-Dawley επίμυων σε διάστημα ισοδύναμο με το τρίτο

τρίμηνο κύησης του ανθρώπου. Η συγκεκριμένη μείωση παρατηρήθηκε κατά την εφαρμογή τόσο μεμονωμένα του διαστήματος αυτού αλλά και στο συνδυασμό του με διαστήματα ισοδύναμα με τα υπόλοιπα δύο τρίμηνα κύησης του ανθρώπου. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε μείωση στον αριθμό των κυττάρων στη στιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων όταν έγινε έκθεση των επίμυων στην αιθανόλη σε διάστημα ισοδύναμο με τα δύο πρώτα τρίμηνα κύησης του ανθρώπου.

Στους FAS-PTZ επίμυες δεν παρατηρείται παρόμοια μείωση στον αριθμό των κυττάρων πιθανώς λόγω πολλαπλασιασμού των αντιδραστικών αστροκυττάρων σε συγκεκριμένα σημεία έπειτα από μακροχρόνια και σοβαρή βλάβη στον εγκέφαλο (Schiweck, J., και συν., 2018) που, στην περίπτωση των FAS-PTZ επίμυων, προκαλείται τόσο από την έκθεση των επίμυων στην αιθανόλη όσο και από τη χορήγηση της πεντυλενοτετραζόλης για την πρόκληση επιληπτικών κρίσεων (Peng, J., και συν., 2019, Park, J., και συν., 2006).

Επιπλέον, στην περίπτωση των FAS-Ctr επίμυων, μέσω του ανοσοϊστοχημικού εντοπισμού της GFAP παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση της GFAP, συγκριτικά με τα ζώα αναφοράς (Torper, L., και συν., 2015), και πόλωση των αντιδραστικών αστροκυττάρων στη διαυγή στιβάδα με προσανατολισμό των αποφύσεων τους προς την πυραμιδική και την ακτινωτή στιβάδα του CA3 πεδίου. Τέλος, στην περίπτωση των FAS-PTZ επίμυων παρατηρείται αυξημένη έκφραση της GFAP, συγκριτικά με τα ζώα αναφοράς και πόλωση των αντιδραστικών αστροκυττάρων στη διαυγή στιβάδα του CA3 πεδίου.

Οδοντωτή έλικα

Κατά τη χρώση των κυττάρων με DAPI, στην περίπτωση των FAS-Ctr επίμυων, παρατηρήθηκε μείωση στον αριθμό των κυττάρων στη στιβάδα των κοκκωδών κυττάρων, στη μοριακή στιβάδα και στη στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου. Μείωση στον αριθμό των κυττάρων στη στιβάδα των κοκκωδών κυττάρων έχει παρατηρηθεί από τους Livy, D., και συν. (2003) έπειτα από έκθεση σε αιθανόλη Sprague-Dawley επίμυων σε διάστημα ισοδύναμο με το τρίτο τρίμηνο κύησης του ανθρώπου. Η συγκεκριμένη μείωση παρατηρήθηκε κατά την εφαρμογή τόσο μεμονωμένα του διαστήματος αυτού αλλά και στο συνδυασμό του με διαστήματα ισοδύναμα με τα υπόλοιπα δύο

τρίμηνα κύησης του ανθρώπου. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε μείωση στον αριθμό των κυττάρων στη στιβάδα των κοκκωδών κυττάρων όταν έγινε έκθεση των επίμυων στην αιθανόλη σε διάστημα ισοδύναμο με τα δύο πρώτα τρίμηνα κύησης του ανθρώπου. Επιπρόσθετα, στη βιβλιογραφία αναφέρεται η επιρρέπεια της στιβάδας των πολύμορφων κυττάρων της οδοντωτής έλικας επίμυων στην έκθεση στην αιθανόλη. Ειδικότερα, οι West, J., και συν. (1986) παρατήρησαν εκλεκτική μείωση της τάξεως του 16% στον αριθμό των κυττάρων στη στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων έπειτα από έκθεση σε αιθανόλη κατά την PND4-10 (περίοδος ισοδύναμη με το τρίτο τρίμηνο της κύησης στον άνθρωπο) σε Sprague-Dawley επίμυες ηλικίας 10 ημερών. Επιπλέον, οι Miki, T., και συν. (2000) παρατήρησαν μία σημαντική μείωση στον αριθμό των νευρώνων στη στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων έπειτα από έκθεση σε υψηλές δόσεις αιθανόλης κατά την PND10-15 σε Wistar επίμυες ηλικίας 16 ημερών.

Παρόμοια μείωση στον αριθμό των κυττάρων στις στιβάδες της οδοντωτής έλικας του ιππόκαμπου δεν παρατηρήθηκε, για ακόμη μία φορά, στους FAS-PTZ επίμυες. Η συγκεκριμένη παρατήρηση μπορεί να εξηγηθεί από τα πειράματα των Jiang, W., και συν. (2003) οι οποίοι παρατήρησαν, σε Sprague-Dawley επίμυες στους οποίους χορηγήθηκε μία και μόνο δόση 60mg/kg πεντυλενοτετραζόλης ενδοπεριτοναϊκά, πολλαπλασιασμό των κυττάρων στη στιβάδα των κοκκωδών κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά μέσω κατάλληλων δεικτών επιβεβαιώθηκε ότι ήταν νευρικά, ενώ ελάχιστα από αυτά ήταν αστροκύτταρα. Συμπεράναν, έτσι, την ύπαρξη νευρογένεσης στη στιβάδα των κοκκωδών κυττάρων της οδοντωτής έλικας του ιππόκαμπου σε PTZ επίμυες. Οπότε θα μπορούσαμε να πούμε πως ο μεγαλύτερος αριθμός κυττάρων στη στιβάδα των κοκκωδών κυττάρων της οδοντωτής έλικας στους FAS-PTZ συγκριτικά με τους FAS-Ctr επίμυες θα μπορούσε να οφείλεται στη νευρογένεση που προκαλεί η χορήγηση της PTZ χωρίς, φυσικά, να μπορούμε να αποκλείσουμε και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων της γλοίας. Αναφορικά με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων της γλοίας, οι Sierra, A., και συν. (2015) παρατήρησαν ότι υψηλά επίπεδα χορήγησης καϊνικού σε ποντίκια, με σκοπό την προσομοίωση της επιληψίας του μέσου κροταφικού λοβού (medial Temporal Lobe Epilepsy, MTLE), έχουν σαν αποτέλεσμα τη μετατροπή των ακτινωτών νευρικών βλαστοκυττάρων (radial Neural Stem Cells, rNSCs) της υποκοκκώδους ζώνης (Subgranular zone, SGZ) της

οδοντωτής έλικας σε αντιδραστικά αστροκύτταρα. Συνεπώς, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι στα FAS-PTZ ζώα υπάρχει πιθανόν μετατροπή των ακτινωτών νευρικών βλαστοκυττάρων της υποκοκκώδους ζώνης της οδοντωτής έλικας σε αντιδραστικά αστροκύτταρα και, επομένως, γλοιογένεση, γι' αυτό και παρατηρείται και αύξηση στην ανοσοδραστικότητα της GFAP συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου, όπως αναλύεται στη συνέχεια, αλλά και αυξημένος αριθμός κυττάρων στη χρώση με DAPI συγκριτικά με τα FAS-Ctr ζώα.

Τέλος, στην περίπτωση των FAS-Ctr και FAS-PTZ επίμυων, μέσω του ανοσοϊστοχημικού εντοπισμού της GFAP στην οδοντωτή έλικα του ιππόκαμπου, παρατηρήθηκε αυξημένη ανοσοδραστικότητα της GFAP και υπερτροφία του κυτταρικού σώματος και των αποφύσεων των αστροκυττάρων, συγκριτικά με τα ζώα αναφοράς. Τα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, όπως προαναφέρθηκε, συνεπάγονται την ύπαρξη αντιδραστικών αστροκυττάρων και φλεγμονής. Παρατηρήθηκε, παράλληλα, πόλωση των αντιδραστικών αστροκυττάρων στη στιβάδα των κοκκωδών κυττάρων της οδοντωτής έλικας και προσανατολισμός των αποφύσεων τους προς τη μοριακή στιβάδα.

Συμπερασματικά, είναι εύλογο να υποθέσουμε, αναλογιζόμενοι το ρόλο του ιππόκαμπου στη μνήμη και τη μάθηση, ότι οι επιδράσεις της έκθεσης στην αιθανόλη κατά την περίοδο ανάπτυξης του ιππόκαμπου ευθύνονται για τις αδυναμίες στη μνήμη και τη μάθηση που χαρακτηρίζουν τα παιδιά με FASD και τους FAS επίμυες (Gil-Mohapel, J., και συν., 2010, Almeida, L., και συν., 2020).

Επίδραση της επιληπτογένεσης με πεντυλενοτετραζόλη υπό εδάφους εμβρυϊκού αλκοολικού συνδρόμου στους βασικούς πυρήνες της αμυγδαλής επίμυος

Δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικώς σημαντική αλλαγή στην ένταση του σήματος των σωματιδίων Nissl στους βασικούς πυρήνες της αμυγδαλής, στις διάφορες συνθήκες που εξετάστηκαν.

Η χρώση των κυττάρων με DAPI, στην περίπτωση των FAS-Ctr επίμυων, κατέδειξε μείωση στον αριθμό των κυττάρων στους βασικούς πυρήνες της αμυγδαλής συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου. Η συγκεκριμένη παρατήρηση θα

μπορούσε να οφείλεται σε μείωση των θετικών για την παρβαλβουμίνη GABAεργικών ενδονευρώνων όπως παρατήρησαν οι Shirasaka, T., και συν. (2012) σε Wistar επίμυες των οποίων οι μητέρες εκτέθηκαν σε αιθανόλη από τη 10^η έως τη 13^η μέρα της κύησης. Η μείωση του αριθμού των συγκεκριμένων κυττάρων της αμυγδαλής μπορεί να εξηγήσει τα προβλήματα συμπεριφοράς που χαρακτηρίζουν τα παιδιά με FASD και τους FAS επίμυες καθώς η ικανότητά τους να καθοδηγούν συγχρονισμένη ταλαντευόμενη δραστηριότητα στη γάμμα-συχρότητα, έχει αναγνωριστεί ως η κυτταρική βάση γνωσιακών και εκτελεστικών λειτουργιών (Shirasaka, T., και συν., 2012, Kozanian, O., και συν., 2018).

Στους FAS-PTZ επίμυες δεν παρατηρήθηκε παρόμοια μείωση στον αριθμό των κυττάρων, γεγονός το οποίο πιθανώς οφείλεται σε νευρογένεση. Ειδικότερα, οι Park, J., και συν. (2006) παρατήρησαν νευρογένεση στην αμυγδαλή σε PTZ-kindling μοντέλο επιληψίας. Συνεπώς, υπάρχει πιθανότητα, στο μοντέλο που εξετάστηκε στην παρούσα πτυχιακή εργασία, η χορήγηση της PTZ να επάγει τη νευρογένεση στην αμυγδαλή και έτσι να παρατηρείται μεγαλύτερος αριθμός κυττάρων στους βασικούς πυρήνες της αμυγδαλής στους FAS-PTZ επίμυες συγκριτικά με τους FAS-Ctr επίμυες.

Τέλος, στην περίπτωση των FAS-Ctr και FAS-PTZ επίμυων, μέσω του ανοσοϊστοχημικού εντοπισμού της GFAP, παρατηρήθηκε αυξημένη ανοσοδραστικότητα της GFAP στους βασικούς πυρήνες της αμυγδαλής συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου, γεγονός που σημαίνει την ύπαρξη αντιδραστικών αστροκυττάρων τα οποία συνεπάγονται τη φλεγμονή στους πυρήνες αυτούς και στις δύο ομάδες επίμυων (Pekny, M., και συν., 2014, Vainchtein, I., Molofsky, A., 2020, Szabo, G., Lippai, D., 2014).

Περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητο να διεξαχθούν προκειμένου να διευκρινιστούν τόσο οι τύποι των κυττάρων (νευρικά ή/και κύτταρα γλοίας) που πιθανώς αυξάνονται μετά από επιληπτογένεση με πεντυλενοτετραζόλη υπό εδάφους εμβρυϊκού αλκοολικού συνδρόμου όσο και οι μηχανισμοί φλεγμονής και κυτταρικού θανάτου που ευθύνονται για την ενεργοποίηση των αστροκυττάρων και τη μείωση του αριθμού των κυττάρων κατά το εμβρυϊκό αλκοολικό σύνδρομο, αντίστοιχα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alfonso-Loeches, S., Guerri, C. (2011) *Molecular and behavioral aspects of the actions of alcohol on the adult and developing brain*, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 48 (1), p. 19–47.
- Almeida, L., Andreu-Fernández, V., Navarro-Tapia, E., Aras-López, R., Serra-Delgado, M., Martínez, L., García-Algar, O. Gómez-Roig, M.D. (2020) *Murine Models for the Study of Fetal Alcohol Spectrum Disorders, p. An Overview*, *Front. Pediatr.*, 8, p. 359.
- Anderson, M. C., Weaver, C. (2009) *Inhibitory Control over Action and Memory* *Encyclopedia of neuroscience*, 5, p. 153-163.
- Anderson, M., Ao, Y., Sofroniew, M. (2014) *Heterogeneity of reactive astrocytes*, *Neurosci Lett*, 565, p. 23–29.
- Astley, S., Aylward, E., Olson, H.C., Kerns, K., Brooks, A., Coggins, T., Davies, J., Dorn, S., Gendler, B., Jirikowic, T., Kraegel, P., Maravilla, K., Richards, T., *Magnetic resonance imaging outcomes from a comprehensive magnetic resonance study of children with fetal alcohol spectrum disorders*, *Alcohol Clin Exp Res*, 33 (10), p. 1671–1689.
- Balaszczuk, V., Bender, C., Pereno, G., Beltramino, C. (2011) *Alcohol-induced neuronal death in central extended amygdala and pyriform cortex during the postnatal period of the rat*, *Int. J. Devl Neuroscience*, 29, p. 733–742.
- Bell, S., Stade, B., Reynolds, J., Rasmussen, C., Andrew, G., Hwang, P., Carlen, P. (2010). *The Remarkably High Prevalence of Epilepsy and Seizure History in Fetal Alcohol Spectrum Disorders*, *Alcohol Clin Exp Res*, 34 (6), p. 1084–1089.
- Bonthius, D., Woodhouse, J., Bonthius, N., Taggard, D., Lothman, E. (2001) *Reduced Seizure Threshold and Hippocampal Cell Loss in Rats Exposed to Alcohol During the Brain Growth Spurt*, *Alcohol Clin Exp Res*, 25 (1), p. 70–82.
- Brady, S., Colman, D., Brophy, P. (2014) *Subcellular Organization of the Nervous System, Organelles and Their Functions*, *From Molecules to Networks*, Third edition, Chapter two, p. 23-52.
- Brielle, R., Pinel-Marie, M., Chat, S., Gillet, R., Felden, B. (2017) *Purification, identification, and functional analysis of polysomes from the human pathogen Staphylococcus aureus*, *Methods*, 117, p. 59-66.

- Burda, J., Bernstein, A., Sofroniew, M. (2015) *Astrocyte roles in traumatic brain injury*, Exp. Neurol.
- Cantacorps, L., Alfonso-Loeches, S., Moscoso-Castro¹, M., Cuitavi, J., Gracia-Rubio, I., López-Arnau, R., Escubedo, E., Guerri, C., Valverde, O. (2017) *Maternal alcohol binge drinking induces persistent neuroinflammation associated with myelin damage and behavioral dysfunctions in offspring mice*, Neuropharmacology, 123, p. 368-384.
- Cappaert, N., Van Strien, N., Witter, M. (2015) *Hippocampal Formation*, The Rat Nervous System (Edited by George Paxinos), Fourth Edition, Chapter 20, p. 512-560.
- Chen, G., Ma, C., Bower, K., Shi, X., Ke, Z., Luo, J. (2008) *Ethanol Promotes Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Neuronal Death: Involvement of Oxidative Stress*, Journal of Neuroscience Research, 86, p. 937–946.
- Cho, S., Lovinger, D., N’Gouemo, P. (2017) *Prenatal alcohol exposure enhances the susceptibility to NMDA-induced generalized tonic-clonic seizures in developing rats*, CNS Neurosci Ther, 23, p. 808–817.
- Clarren, S. (1981) *Recognition of Fetal Alcohol Syndrome*, JAMA, 245 (23), p. 2436-2439.
- D’Arcy, B., Silver, D., (2020) *Local gene regulation in radial glia, p. Lessons from across the nervous system*, Traffic, 21, p. 737–748.
- Freund, T. F., Buzsáki, G. (1996) *Interneurons of the hippocampus*, Hippocampus, 6 (4), p. 347–470.
- Gage, G., Kipke, D., Shain, W. (2012) *Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents*, J. Vis. Exp, 65, p. e3564.
- Gil-Mohapel, J., Boehme, F., Kainer, L., Christie, B. (2010) *Hippocampal cell loss and neurogenesis after fetal alcohol exposure, p. Insights from different rodent models*, Brain Res Rev, 64, p. 283 – 303.
- Giovannoni, F., Quintana, F. (2020) *The Role of Astrocytes in CNS Inflammation*, Trends in Immunology, 41 (9), p. 805-819.
- Gomes, M., (2019) *Franz Nissl (1860-1919), noted neuropsychiatrist and neuropathologist, staining the neuron, but not limiting it*, Dement Neuropsychol, 3, p. 352-355.
- Gómez, G., Falcon, R., Maturana, C., Labra, V., Salgado, N., Rojas, C., Oyarzun, J., Cerpa, W., Quintanilla, R., Orellana, J. (2018) *Heavy Alcohol Exposure Activates*

- Astroglial Hemichannels and Pannexons in the Hippocampus of Adolescent Rats: Effects on Neuroinflammation and Astrocyte Arborization*, *Front. Cell. Neurosci*, 12 (472).
- Gupta, K., Gupta, V., Shirasaka, T. (2016) *An Update on Fetal Alcohol Syndrome—Pathogenesis, Risks, and Treatment*, *Alcohol Clin Exp Res*, 40 (8), p. 1594–1602.
- Heidbreder, C., Groenewegen, H. (2003) *The medial prefrontal cortex in the rat, p. evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics*, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27, p. 555–579.
- Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M., Wozniak, D., Koch, C., Genz, K., Price, M., Stefovská, V., Horster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J. (2000) *Ethanol-Induced Apoptotic Neurodegeneration and Fetal Alcohol Syndrome*, *Science*, 287 (5455), p.1056-60.
- Im, K., Mareninov, S., Diaz, M.F.P., Yong, W.H. (2018) *An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining*, *Biobanking*, 299–311.
- Jiang, W., Wan, Q., Zhang, Z-J., Wang, W-D., Huang, Y-G., Rao, Z-R., Zhang, X. (2003) *Dentate granule cell neurogenesis after seizures induced by pentylentetrazol in rats*, *Brain Research*, 977, p. 141–148.
- Jobson, D., Hase, Y., Clarkson, A., Kalaria, R. (2021) *The role of the medial prefrontal cortex in cognition, ageing and dementia*, *Brain Comms*, p. 1-25.
- Jones, K., Smith, D. (1973) *Recognition of the Fetal Alcohol Syndrome in early infancy*, *Lancet*, 302 (7836), p. 999-1001.
- Kádár, A., Wittmann, G., Liposits, Z., Fekete, C. (2009) *Improved method for combination of immunocytochemistry and Nissl staining*, *J Neurosci Methods*, 184 (1), p. 115–118.
- Kane, C., Drew, P. (2021) *Neuroinflammatory contribution of microglia and astrocytes in fetal alcohol spectrum disorders*, *J Neurosci Res*, 99 (8), p. 1973–1985.
- 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.
- Kawaguchi, Y., Kubota, Y. (1997) *GABAergic Cell Subtypes and their Synaptic Connections in Rat Frontal Cortex*, *Cerebral Cortex*, 7 (6), p. 476–486.

- Ke, Z., Wang, X., Liu, Y., Fan, Z., Chen, G., Xu, M., Bower, K., Frank, J., Li, M., Fang, J., Shi, X., Luo, J. (2011) *Ethanol Induces Endoplasmic Reticulum Stress in the Developing Brain*, *Alcohol Clin Exp Res*, 35 (9), p. 1574–1583.
- Klintsova, A., Helfer, J., Calizo, L., Dong, W., Goodlett, C., Greenough, W. (2007) *Persistent Impairment of Hippocampal Neurogenesis in Young Adult Rats Following Early Postnatal Alcohol Exposure*, *Alcohol Clin Exp Res*, 31 (12), p. 2073–2082.
- Ko, A-R., Kim, J. Y., Hyun, H.-W., Kim, J.-E. (2015) *Endoplasmic reticulum (ER) stress protein responses in relation to spatio-temporal dynamics of astroglial responses to status epilepticus in rats*, *Neuroscience*.
- Kozanian, O., Rohac, D., Bavadian, N., Corches, A., Korzus, E., Huffman K. (2018) *Long-Lasting Effects of Prenatal Ethanol Exposure on Fear Learning and Development of the Amygdala*, *Front. Behav. Neurosci*, 12 (200).
- Lawrence, C., Otero, N., Kelly, S. (2012) *Selective effects of perinatal ethanol exposure in medial prefrontal cortex and nucleus accumbens*, *Neurotoxicology and Teratology*, 34, p. 128–135.
- Livy, D., Miller, K., Maier, S., West, J. (2003) *Fetal alcohol exposure and temporal vulnerability: effects of binge-like alcohol exposure on the developing rat hippocampus*, *Neurotoxicology and Teratology*, 25, p. 447–458.
- Madsen, T. M., Yeh, D. D., Valentine, G. W., and Duman, R. S. (2005) *Electroconvulsive seizure treatment increases cell proliferation in rat frontal cortex*, *Neuropsychopharmacology*, 30, p. 27–34.
- Makino, Y., Polygalov, D., Bolanos, F., Benucci, A., McHugh, T. (2019) *Physiological Signature of Memory Age in the Prefrontal-Hippocampal Circuit*, *Cell Reports*, 29, p. 3835–3846.
- Medina, A., (2011) *Fetal Alcohol Spectrum Disorders and Abnormal Neuronal Plasticity*, *Neuroscientist*, 17 (3), p. 274–287.
- Mihalick, S., Crandall, J., Langlois, J., Krienke, J., Dube, W. (2001) *Prenatal ethanol exposure, generalized learning impairment, and medial prefrontal cortical deficits in rats*, *Neurotoxicology and Teratology*, 23, p. 453 – 462.
- Miki, T., Harris, S., Wilce, P., Takeuchi, Y., Bedi, K. (2000) *A stereological analysis of the effect of early postnatal ethanol exposure on neuronal numbers in rat dentate gyrus*, *Image Anal Stereol*, 19, p. 99-104.

- Moore, K. Persaud, TVN. (2009) Η Ανθρώπινη Διάπλαση-Εμβρυολογία Κλινικού Προσανατολισμού, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, σελ. 545-547.
- Muralidhar, S., Wang, Y., Markram, H. (2014) *Synaptic and cellular organization of layer 1 of the developing rat somatosensory cortex*, Front Neuroanat, 7 (52).
- Neves, G., Cooke, S., Bliss, T. (2008) *Synaptic plasticity, memory and the hippocampus, p. a neural network approach to causality*, Nature, 9, p. 65-75.
- Nuñez, C., Roussotte, F., Sowell, E. (2011) *Focus on, p. Structural and Functional Brain Abnormalities in Fetal Alcohol Spectrum Disorders*, Alcohol Res Health, 34 (1), p. 121–132.
- O’Leary-Moore, S., Parnell, S., Godin, E., Dehart, D., Ament, J., Khan, A., Johnson, A., Styner, M., Sulik, K. (2010) *Magnetic resonance microscopy-based analyses of the brains of normal and ethanol-exposed fetal mice*, Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 88 (11), p. 953–964.
- Olucha-Bordonau, F., Fortes-Marco, L., Otero-García, M., Lanuza, E., Martínez-García, F. (2015) *Amygdala, p. Structure and Function*, The Rat Nervous System (Edited by George Paxinos), Fourth Edition, Chapter 18, p. 441-480.
- Ostrowski, P., Fairn, G., Grinstein, S., Johnson, D. (2016) *Cresyl violet, p. a superior fluorescent lysosomal marker*, Traffic, 17 (12), p. 1313–1321.
- Park, J., Cho, H., Kim, H., Kim, K. (2006) *Repeated brief epileptic seizures by Pentylentetrazole cause Neurodegeneration and promote Neurogenesis in discrete brain regions of freely moving adult rats*, Neuroscience, 140, p. 673– 684.
- Pawlak, R., Skrzypiec, A., Sulkowski, S., Buczko, W. (2002) *Ethanol-induced neurotoxicity is counterbalanced by increased cell proliferation in mouse dentate gyrus*, Neuroscience Letters, 327, p. 83–86.
- Pekny, M., Wilhelmsson, U., Pekna, M. (2014) *The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis*, Neuroscience Letters, 565, p. 30–38.
- Peng, J., Wu, S., Guo, C., Guo, K., Zhang, W., Liu, R., Li, J., Hu, Z. (2019) *Effect of Ibuprofen on Autophagy of Astrocytes During Pentylentetrazol-Induced Epilepsy and its Significance: An Experimental Study*, Neurochemical Research, 44, p. 2566–2576.

- Popova, S., Lange, S., Probst, C., Gmel, G., Rehm, J. (2017) *Estimation of national, regional, and global prevalence of alcohol use during pregnancy and fetal alcohol syndrome: a systematic review and meta-analysis*, *Lancet Glob Health*, 5, p. 290–99.
- Rainnie, D., Asprodini, E., Shinnick-Gallagher, P. (1993) *Intracellular recordings from morphologically identified neurons of the basolateral amygdala*, *Journal of Neurophysiology*, 69 (4), p. 1350-1362.
- Rice, D., Barone, S. (2000) *Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System, p. Evidence from Humans and Animal Models*, *Environ Health Perspect.*, 108 (3), p. 511–533.
- Riley, E., McGee, C. (2005) *Fetal Alcohol Spectrum Disorders, p. An Overview with Emphasis on Changes in Brain and Behavior*, *Exp Biol Med (Maywood)*, 230 (6), p. 357-65.
- Rubert, G., Minana, R., Pascual, M., Guerri, C. (2006) *Ethanol Exposure During Embryogenesis Decreases the Radial Glial Progenitor Pool and Affects the Generation of Neurons and Astrocytes*, *Journal of Neuroscience Research*, 84, p. 483–496.
- Rubin, R., Watson, P., Duff, M., Cohen, N. (2014) *The role of the hippocampus in flexible cognition and social behavior*, *Frontiers in Human Neuroscience*, 8 (742).
- Sah, P., Faber, E.S.L., Lopez de Armentia, M., Power, J. (2003) *The Amygdaloid Complex, p. Anatomy and Physiology*, *Physiol Rev*, 83, p. 803–834.
- Schiweck, J., Eickholt, B.J., Murk, K. (2018) *Important Shapeshifter: Mechanisms Allowing Astrocytes to Respond to the Changing Nervous System During Development*, *Injury and Disease, Front. Cell. Neurosci*, 12 (261).
- Schultz, C., Engelhardt, M. (2014) *Anatomy of the Hippocampal Formation*, *Front Neurol Neurosci. Basel, Karger*, 34, p. 6–17.
- Shirasaka, T., Hashimoto, E., Ukai, W., Yoshinaga, T., Ishii, T., Tateno, M., Saito, T. (2012) *Stem cell therapy: social recognition recovery in a FASD model*, *Transl Psychiatry*, 2: e188.
- Shylaja, S., Suvarna, M., Tumpuri Srilatha, Ramanand, O., Sharath Reddy, Raghu Vamshi. (2019) *Natural Alternative to D.P.X (Mounting Medium) - Comparison between Honey and Castor Oil*, *International Journal of Contemporary Medical Research*, 6 (1).

- Sierra, A., Martín-Suárez, S., Valcárcel-Martín, R., Pascual-Brazo, J., Aelvoet, S-A., Abiega, O., Deudero, J., Brewster, A., Bernales, I., Anderson, A., Baekelandt, V., Maletić-Savatić, M., Encinas, J. (2015) *Neuronal Hyperactivity Accelerates Depletion of Neural Stem Cells and Impairs Hippocampal Neurogenesis*, *Cell Stem Cell*, 16 (5), p. 488–503.
- Šimic, G., Tkalcic, M., Vukic, V., Mulc, D., Španic, E., Šagud, M., Olucha-Bordonau, F., Vukšić, M., Hof, P. (2021) *Understanding Emotions: Origins and Roles of the Amygdala*, *Biomolecules*, 11 (823).
- Slack, J. (2013) *Βασικές Αρχές Βιολογίας Ανάπτυξης*, Τρίτη Έκδοση, Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάρδα και ΣΙΑ Ο.Ε., Σελ. 384-386.
- Sofroniew, M. (2013) *Multiple Roles for Astrocytes as Effectors of Cytokines and Inflammatory Mediators*, *Neuroscientist*.
- Sofroniew, M. (2015) *Astroglialosis*, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7: a020420
- Szabo, G., Lippai, D. (2014) *Converging Actions of Alcohol on Liver and Brain Immune Signaling*, *International Review of Neurobiology*, 118, Chapter 11, p. 359-380.
- Tang, S., Xu, S., Waddell, J., Zhu, W., Gullapalli, R., Mooney, S. (2019) *Functional Connectivity and Metabolic Alterations in Medial Prefrontal Cortex in a Rat Model of Fetal Alcohol Spectrum Disorder, p. A Resting-State Functional Magnetic Resonance Imaging and in vivo Proton Magnetic Resonance Spectroscopy Study*, *Dev Neurosci*, 41, p. 67–78.
- Topper, L., Baculis, B., Valenzuela, F. (2015) *Exposure of neonatal rats to alcohol has differential effects on neuroinflammation and neuronal survival in the cerebellum and hippocampus*, *Journal of Neuroinflammation*, 12 (160).
- Tran, T., Kelly, S. (2003) *Critical periods for ethanol-induced cell loss in the hippocampal formation*, *Neurotoxicology and Teratology*, 25, p. 519–528.
- Vainchtein, I., Molofsky, A. (2020) *Astrocytes and Microglia: In Sickness and in Health*, *Trends in Neurosciences*, 43 (3), p. 144-154.
- Van De Werd, H. J. J. M., Rajkowska, G., Evers, P., Uylings, H. (2010) *Cytoarchitectonic and chemoarchitectonic characterization of the prefrontal cortical areas in the mouse*, *Brain Struct Funct*, 214, p. 339–353.

- Viswanatha, G., Shylaja, H., Kishore, D.V., Venkataranganna, M., Bheema, N., Prasad, L. (2020) *Acteoside Isolated from Colebrookea oppositifolia Smith Attenuates Epilepsy in Mice Via Modulation of Gamma-Aminobutyric Acid Pathways*, Neurotoxicity Research.
- West, J., Hamre, K., Cassell, M. (1986) *Effects of Ethanol Exposure during the Third Trimester Equivalent on Neuron Number in Rat Hippocampus and Dentate Gyrus*, Alcohol Clin Exp Res, 10 (2), p. 190-197.
- Wilhelmsson, U., Bushong, E., Price, D., Smarr, B., Phung, V., Terada, M., Ellisman, M., Pekny, M. (2006) *Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury*, PNAS, 103 (46), p. 17513–17518.
- Xu, P., Chen, A., Li, Y., Xing, X., Lu, H. (2019) *Medial prefrontal cortex in neurological diseases*, Physiol Genomics, 51, p. 432–442.
- Yang, F., Luo, J. (2015) *Endoplasmic Reticulum Stress and Ethanol Neurotoxicity*, Biomolecules, 5 (4), p. 2538–2553.
- Zhu, X., Dong, J., Han, B., Huang, R., Zhang, A., Xia, Z., Chang, H., Chao, J., Yao, H. (2017) *Neuronal Nitric Oxide Synthase Contributes to PTZ Kindling Epilepsy-Induced Hippocampal Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Damage*, Front. Cell. Neurosci, 11 (377).