



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μακροχρόνιες αλλαγές στον ιππόκαμπο επίμυων μετά από ένα προκλητό
επεισόδιο status epilepticus κατά τον απογαλακτισμό**

Θεοφάνης Πράττος

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Αποστολία Χατζηευθυμίου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας, Επιβλέπουσα
- Άννα Βασιλάκη, Επίκουρος Καθηγήτρια Φαρμακολογίας
- Ματθαίος Σπελέτας, Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας

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

Λάρισα, Μάρτιος 2022



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

**Long-term alterations in the rat hippocampus following a single provoked
status epilepticus episode at weaning**

By

Theofanis Prattos

Advisory Thesis Committee:

- Apostolia Hatziefthimiou, Associate Professor of Medical Physiology, Supervisor
- Anna Vasilaki, Assistant Professor of Pharmacology
- Matthaios Speletas, Professor of Medical Immunology

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

Larissa, March 2022

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	3
ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	5
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
ABSTRACT	9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
1.1. Ανατομία του ιπποκάμπειου σχηματισμού.....	11
1.1.1. Ανατομία οδοντωτής έλικας.....	12
1.1.2. Ανατομία ιδίως ιππόκαμπου.....	13
1.1.3. Ανατομία υποθέματος	13
1.2. Συνδέσεις του ιπποκάμπειου σχηματισμού	14
1.2.1. Δεμάτια.....	14
1.2.2. Διασυνδέσεις οδοντωτής έλικας.....	14
1.2.3. Διασυνδέσεις ιδίως ιππόκαμπου.....	15
1.2.4. Διασυνδέσεις υποθέματος.....	16
1.3. Διανευρώνες του ιπποκάμπειου σχηματισμού	17
1.3.1. Διανευρώνες οδοντωτής έλικας.....	17
1.3.2. Διανευρώνες ιδίως ιππόκαμπου.....	18
1.4. Λειτουργική σημασία του ιπποκάμπειου σχηματισμού	19
1.5. Status epilepticus	20
1.5.1. Ορισμός	20
1.5.2. Παθοφυσιολογία του Status Epilepticus.....	21
1.5.3. Δομικές και λειτουργικές επιπτώσεις του Status Epilepticus.....	23
1.5.4. Επιπτώσεις του SE στη νευροδιαβίβαση.....	24
1.5.5. Επίδραση της ηλικίας στις μεταβολές που προκαλούνται στον εγκέφαλο κατά το SE ..	29
2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ	34
2.1. Ζώα.....	34
2.2. Μοντέλο επιληψίας με πεντυλενετετραζόλη.....	34
2.2.1. Πρόκληση επιληπτικών κρίσεων.....	35
2.3. Λήψη ιστών	35
2.3.1. Μονιμοποίηση ιστού	35
2.3.2. Ζελατινοποίηση αντικειμενοφόρων πλακών.....	37
2.3.3. Δημιουργία τομών	37

2.4. Χρώση Cresyl Violet	37
2.5. Έμμεσος ανοσοφθορισμός	39
2.6. Ανοσοαποτύπωση κηλίδας	40
2.6.1. Λήψη ιστών	40
2.6.2. Ομογενοποίηση των ιστών	41
2.6.3. Μέτρηση συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford.....	41
2.6.4. Προετοιμασία διαλυμάτων των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων.....	42
2.6.5. Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης	42
2.6.6. Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών.....	43
2.7. Ανάλυση εικόνας με ImageJ.....	45
2.8. Στατιστική ανάλυση	47
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	48
3.1. Επίδραση του SE στον αριθμό των κυττάρων και νευρώνων και στη μορφολογία του ιπποκάμπου.....	48
3.2. Επίδραση του SE στην νευροδιαβίβαση	56
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	61
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	66

ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω αρχικά την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κα. Χατζηευθυμίου Αποστολία για την επιστημονική καθοδήγηση και τις καίριες συμβουλές που μου παρείχε καθόλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας στην εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας.

Στη συνέχεια, ευχαριστώ την κα. Βασιλάκη Άννα, επίκουρη καθηγήτρια Φαρμακολογίας, που συνέβαλε καταλυτικά στην πραγματοποίηση τόσο των πειραμάτων όσο και της συγγραφής της διπλωματικής εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης την κα Ψαρροπούλου Αικατερίνη, καθηγήτρια Φυσιολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη συμβολή της στα υλικά και τη μεθοδολογία της εργασίας.

Έπειτα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιστημονικό Υπεύθυνο του ΠΜΣ κ. Σπελέτα Ματθαίο, Καθηγητή Ιατρικής Ανοσολογίας, γιατί χάρη σε εκείνον το πρόγραμμα σπουδών παραμένει ενδιαφέρον και ζωντανό και δίνει ευκαιρία σε νέους ερευνητές να διευρύνουν το πεδίο των γνώσεών τους.

Τέλος θέλω να ευχαριστήσω όλους τους φοιτητές και συναδέλφους μου στο εργαστήριο, την Παναγιώτα, τη Βάσω, τη Δήμητρα, τη Λίλια, τη Βέρα, το Χρήστο και τη Χριστίνα για τη βοήθεια και την υποστήριξή τους.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ACh: acetylcholine, ακετυλοχολίνη

AChE: acetylcholinesterase, ακετυλοχολινεστεράση

AMPA: α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

BDNF: brain derived neurotrophic factor, εγκεφαλικός νευροτροφικός παράγοντας

BSA: bovine serum albumin, αλβουμίνη ορού βοός

CA: cornu ammonis, αμμώνειο κέρασ

ChAT: choline acetyltransferase, ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMSO: dimethyl sulfoxide, διμεθυλοσουλφοξείδιο

DTT: dithiothreitol, διθειοθρεϊτόλη

eNOS: endothelial nitric oxide synthase, ενδοθηλιακή συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου

GABA: gamma-aminobutyric acid, γ-αμινοβουτυρικό οξύ

GABAT: GABA transaminase, τρανσαμινάση του GABA

GPCR: G protein-coupled receptor, υποδοχέας που συνδέεται με G πρωτεΐνη

GrDG: granule cell layer, κοκκώδης στιβάδα

HICAP: hilar commissural-associated pathway, σχετικό με πολύμορφη στιβάδα-συνδετική οδό

HIPP: hilar-perforant pathway-associated, σχετικό με πολύμορφη στιβάδα-διατιτραίνουσα οδό

HRP: horseradish peroxidase, υπεροξειδάση ραπανακίου

iNOS: inducible nitric oxide synthase, επαγόμενη συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου

IS: interneuron specific, ειδικοί για διανευρώνες

KCC2: potassium-chloride co-transporter 2, συμμεταφορέας καλίου-χλωρίου 2

LTD: long-term depression, μακροπρόθεσμη καταστολή

LTP: long term potentiation, μακροπρόθεσμη ενίσχυση

MoDG: stratum moleculare, μοριακή στιβάδα

MOPP: molecular layer-perforant path, σχετικό με μοριακή στιβάδα-διατιτραίνουσα οδό

NF: neurofilament, νευροϊνίδιο

NMDA: N-methyl-D-aspartate

NO: nitric oxide, μονοξείδιο του αζώτου

nNOS: neuronal nitric oxide synthase, νευρωνική συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου

NSE: neuron-specific enolase, ενολάση ειδική για νευρώνες

O-LM: oriens lacunosum-moleculare, βοθριώδης-μοριακή στιβάδα

Or: stratum oriens, πολύμορφη στιβάδα

PB: phosphate buffer, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών

PFA: paraformaldehyde, παραφορμαλδεΰδη

PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride, φαινυλομεθυλοσουλφονυλοφθορίδιο

PND: post-natal day, μεταγεννητική ημέρα

PoDG: polymorphic layer, πολύμορφη στιβάδα οδοντωτής έλικας

PTZ: pentylenetetrazole, πεντυλενετετραζόλη

Pyr: stratum pyramidale, πυραμιδική στιβάδα

Rad: stratum radiatum, ακτινωτή στιβάδα

ROS: reactive oxygen species, δραστικές ρίζες οξυγόνου

SE: status epilepticus

Slu: stratum lucidum, διαυγής στιβάδα

TBS: trizma base saline

ΕΔ: ενδοπλασματικό δίκτυο

ΚΝΣ: κεντρικό νευρικό σύστημα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η επιληψία είναι μια κοινή νευρολογική διαταραχή και φυσιολογικά ο οργανισμός κινητοποιεί μηχανισμούς που τερματίζουν τις κρίσεις πριν αποδειχθούν επικίνδυνες για τη ζωή. Όταν όμως οι μηχανισμοί αυτοί δεν επαρκούν μπορεί να επέλθει status epilepticus (SE) και δομικές ή/και λειτουργικές βλάβες στον εγκέφαλο, ιδιαίτερα στον ιππόκαμπο. Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι οι βλάβες που προκαλεί το SE στον ιππόκαμπο εξαρτώνται από την ηλικία του ζώου και το μοντέλο που χρησιμοποιείται. Σκοπός της εργασίας ήταν η ανάδειξη μακροπρόθεσμων αλλαγών στον ιππόκαμπο επίμυων μετά από SE στην ηλικία του απογαλακτισμού.

Για το λόγο αυτό προκλήθηκε SE σε επίμυες ηλικίας 21 ημερών με χορήγηση πεντυλενετετραζόλης και μελετήθηκαν οι πιθανές αλλαγές στη δομή και τη νευροδιαβίβαση στον ιππόκαμπο τους σε ηλικία 1,5-2 μηνών. Συγκεκριμένα, έγινε χρώση τομών με Cresyl Violet, σήμανση πυρήνων με DAPI, και ανοσοανίχνευση (ανοσοφθορισμός και ανοσοαποτύπωση κηλίδας) του νευρωνικού δείκτη NeuN, των νευροϊνιδίων (NF-L), των NMDA υποδοχέων, του GABA, της νευρωνικής συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (nNOS) και της ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης (ChAT).

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι σε σύγκριση με τα φυσιολογικά ζώα, στα ζώα που προκλήθηκε SE υπήρξε ελάττωση της έντασης του σήματος της Cresyl Violet στις κύριες στιβάδες του ιπποκάμπου (πυραμιδικές στιβάδες των CA1 και CA3 πεδίων και κοκκώδης στιβάδα της οδοντωτής έλικας) καθώς και ελάττωση του αριθμού των GABA ανοσοδραστικών διανευρώνων και της έκφρασης των νευροϊνιδίων και της nNOS. Δεν παρατηρήθηκε μεταβολή του πάχους των στιβάδων και του αριθμού νευρώνων και κυττάρων στις κύριες στιβάδες του ιπποκάμπου, ούτε στην ανοσοδραστικότητα των NMDA υποδοχέων και της ChAT.

Συμπερασματικά, ένα μεμονωμένο επεισόδιο SE με πεντυλενετετραζόλη σε επίμυες στην ηλικία του απογαλακτισμού μπορεί να προκαλέσει ελάττωση της έντασης του σήματος των σωματιδίων Nissl πιθανώς μέσω μηχανισμού stress του ενδοπλασματικού δικτύου, διαταραχή στην κυτταροαρχιτεκτονική των νευρώνων και μπορεί να επηρεάσει μείζονα νευροδιαβιβαστικά συστήματα, αλλαγές που παραμένουν και μετέπειτα στη ζωή.

ABSTRACT

Epilepsy is a common neurological disorder. While seizures are usually terminated before becoming life-threatening via several mechanisms, impairment of these mechanisms can lead to status epilepticus (SE) which can in turn induce structural and/or functional brain deficits, especially in the hippocampus. Animal studies suggest that SE-induced animal brain damage is age- and model- specific. The aim of this study was to delineate the long-term effects of a single SE episode at weaning in the rat hippocampus.

To this end, we induced SE at postnatal day 21 using pentylentetrazole and studied the possible hippocampal structural changes and neurotransmission alterations at 1.5-2 months of age. We performed Cresyl Violet tissue staining, cell nuclei DAPI staining, and immunofluorescence and Dot-Blot immunostaining for the neuronal cell neurodegeneration markers NeuN and neurofilament-light (NF-L), NMDA receptors, GABA, neuronal nitric oxide synthase (nNOS) and choline acetyltransferase (ChAT).

Our results indicate that a single SE episode at weaning leads to a significant decrease of Cresyl Violet signal intensity at the pyramidal layers of CA1 and CA3 hippocampal fields and the dentate gyrus granule cell layer, as well as a decrease of the number of hippocampal GABAergic interneurons and NF-L and nNOS immunoreactivity. No significant change was observed on the layer thickness and number of cells and neurons present at the pyramidal layers of CA1 and CA3 hippocampal fields and dentate gyrus granule cell layer, as well as on the immunoreactivity of NMDA receptors and ChAT.

In conclusion, induction of a single SE episode with pentylentetrazole in rats during weaning evoked a decrease in signal intensity of Nissl bodies, possibly due to endoplasmic reticulum stress, impaired cytoarchitecture of neurons and modified major neurotransmission systems in the rat hippocampus, all of which seem to persist later on in life.

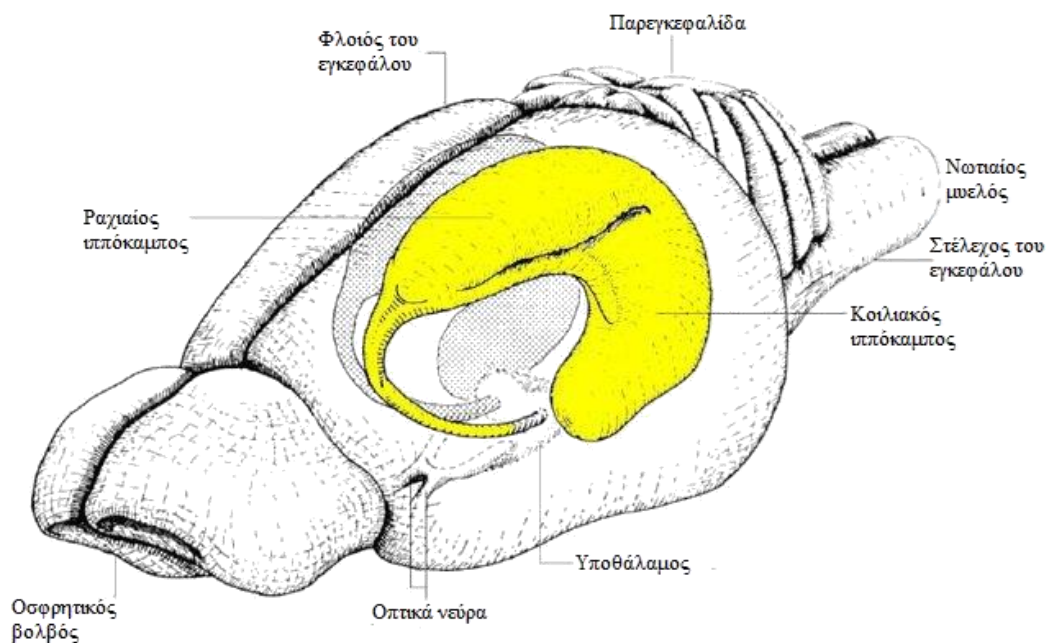
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ανατομία του ιπποκάμπειου σχηματισμού

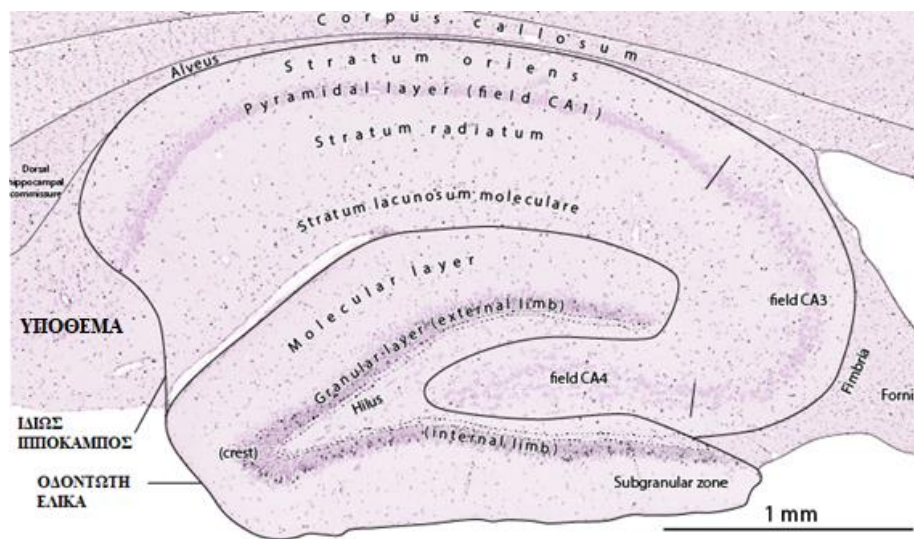
Ο ιπποκάμπειος σχηματισμός είναι μια αρχέγονη δομή του φλοιού και αποτελεί μια αναδίπλωση αυτού στο κάτω τοίχωμα του κροταφικού κέρατος της πλάγιας κοιλίας. Ονομάστηκε έτσι για πρώτη φορά από τον Arantius το 1587 [1] λόγω της ομοιότητάς του σχηματισμού αυτού με το ομώνυμο θαλάσσιο ζώο.

Στους επίμνες, ο ιπποκάμπειος σχηματισμός μοιάζει με το λατινικό γράμμα C. Ο επιμήκης του άξονας εκτείνεται από τους διαφραγματικούς πυρήνες (διαφραγματικός πόλος) του βασικού προσεγκεφάλου ρυγχοραχιαία, πάνω και πίσω από το διεγκέφαλο προς το ουραιοκοιλιακό τμήμα του ημισφαιρίου όπου προσεγγίζει τον αμυγδαλοειδή πυρήνα (κροταφικός πόλος, Εικόνα 1). Στη ραχιαία και έσω επιφάνεια του ιπποκάμπειου σχηματισμού υπάρχει μια πλατιά μνέλινη ταινία, η παρυφή (fimbria) του ιπποκάμπου, η οποία τελικά μεταβαίνει κάτω από το μεσολόβιο στο οπίσθιο σκέλος της ψαλίδας (fornix) [2].



Εικόνα 1: Ιπποκάμπειος σχηματισμός επίμνος. Πηγή: Little, K, 2007 (τροποποιημένο).

Νευροανατομικά ο ιπποκάμπειος σχηματισμός διαιρείται σε 3 δομές: Την **οδοντωτή έλικα** (dentate gyrus), τον **ιδίως υπόκαμπο** ή **αμμώνειο κέρας** (Cornu Ammonis-CA) και το **υπόθεμα** (subiculum, Εικόνα 2). Στη βιβλιογραφία περιλαμβάνονται ενίοτε στον ιπποκάμπειο σχηματισμό ο ενδορινικός φλοιός, το προϋπόθεμα και το παραϋπόθεμα. Άλλοτε, όπως και στην παρούσα διπλωματική εργασία, δεν περιγράφονται ως μέρη του ιπποκάμπειου σχηματισμού αλλά αναφέρονται ξεχωριστά ως παραϊπποκάμπειος σχηματισμός [2,3].



Εικόνα 2: Περιοχές και στιβάδες του ιπποκάμπειου σχηματισμού.

Πηγή: <https://braindevelopmentmaps.org/home/brain-map-sets/postnatal-neurogenesis-in-the-developing-hippocampus> (τροποποιημένο).

1.1.1. Ανατομία οδοντωτής έλικας

Η οδοντωτή έλικα περιλαμβάνει 3 στιβάδες (Εικόνα 2).

1. Την επιπολής, σχετικά ακυτταρική στιβάδα, που καλείται **μοριακή** (molecular layer), βρίσκεται πλησίον της ιπποκάμπειας σχισμής και έχει πάχος περίπου 250 μm. Αποτελείται κυρίως από δενδρίτες των κοκκιωδών, καλαθοφόρων και διαφόρων πολύμορφων κυττάρων καθώς και τους τελικούς άξονες από νευρώνες του ενδορινικού φλοιού και από άλλες πηγές.
2. Την **κοκκώδη** στιβάδα (granular layer), που βρίσκεται εν τω βάθει της μοριακής και αποτελείται από πυκνές στήλες κοκκιωδών κυττάρων με πάχος 4-8 κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά έχουν ελλειψοειδές σχήμα και φέρουν ένα χαρακτηριστικό κωνοειδές δέντρο από ακανθώδεις δενδρίτες οι οποίοι είναι στραμμένοι προς το επιπολής τμήμα της μοριακής στιβάδας. Τα κοκκώδη κύτταρα είναι τα κύρια κύτταρα της οδοντωτής έλικας με την έννοια ότι είναι τα μοναδικά που δίνουν νευράξονες προς άλλες περιοχές του ιπποκάμπειου σχηματισμού (π.χ. CA3). Η κοκκώδης μαζί με τη μοριακή στιβάδα σχηματίζουν ένα V ή U (ανάλογα με το επίπεδο της τομής) που περικλείει την τελευταία στιβάδα που ονομάζεται πολύμορφη.
3. Την **πολύμορφη** στιβάδα (hilus) με μια ποικιλία τύπων νευρώνων, εκ των οποίων οι πιο κοινοί είναι τα **βρυώδη κύτταρα** (mossy cells). Αυτά συνθέτουν γλουταμινικό οξύ και οι νευράξονές τους προβάλλουν στο ομόπλευρο αλλά και στον ετερόπλευρο ιπποκάμπεο [2,3].

1.1.2. Ανατομία ιδίως ιππόκαμπου

Ο **ιδίως ιππόκαμπος** του επίμυος χωρίζεται σε τρεις περιοχές (Εικόνα 2) τη **CA1**, με μικρά πυραμιδικά κύτταρα, τη **CA2**, με ένα συνδυασμό από μεγάλα κύτταρα και κύτταρα με μικρούς δενδρίτες και τη **CA3**, με μεγάλους πυραμιδικούς νευρώνες. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται και η περιοχή **CA4** που συμπίπτει με το τελικό τμήμα της CA3 και τη γειτονική πολύμορφη στιβάδα της οδοντωτής έλικας, αν και αυτός ο όρος τείνει να εγκαταλειφθεί. [2,3,4].

Επιπλέον των παραπάνω περιοχών, στον ιδίως ιππόκαμπο διακρίνουμε τις εξής στιβάδες:

- Την **πυραμιδική** (stratum pyramidale) που είναι η κύρια κυτταρική στιβάδα και φέρει τα σώματα των πυραμιδικών κυττάρων, των κύριων κυττάρων του ιδίως ιππόκαμπου. Η στιβάδα αυτή έχει στενά στοιβαγμένα κύτταρα στη CA1 περιοχή και πιο αραιά στις CA2 και CA3 περιοχές.
- Τη σχετικά ακυτταρική **πολύμορφη** στιβάδα (stratum oriens) που βρίσκεται εν τω βάθει της πυραμιδικής. Περιέχει τους βασικούς δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων και κάποιες κατηγορίες διανευρώνων. Σε αυτή τη στιβάδα βρίσκονται λίγες συνδετικές προβολές της CA3 προς CA3 αλλά και συνδέσεις Schaffer από τη CA3 προς τη CA1.
- Εν τω βάθει της πολύμορφης στιβάδας είναι η **σκάφη** (alveus) αποτελούμενη από νευράξονες.
- Αποκλειστικά στη CA3 περιοχή βρίσκεται μια στενή ακυτταρική ζώνη ακριβώς πάνω από την πυραμιδική, η **διανυγής** στιβάδα (stratum lucidum) που καταλαμβάνεται από τις βρυώδεις ίνες της οδοντωτής έλικας.
- Επιπολής της πυραμιδικής (ή της διανυγούς στη CA3) βρίσκεται η **ακτινωτή** στιβάδα (stratum radiatum) όπου βρίσκεται το μεγαλύτερο τμήμα των συνδέσεων εντός της CA3 και των συνδέσεων του Schaffer από τη CA3 προς τη CA1.
- Η πλέον επιπολής στιβάδα είναι η **βοθριώδης-μοριακή** (stratum lacunosum-moleculare) στην οποία τερματίζουν διατιτραίνουσες ίνες από τον ενδορινικό φλοιό μαζί με προσαγωγές ίνες από άλλες περιοχές [2,3].

1.1.3. Ανατομία υποθέματος

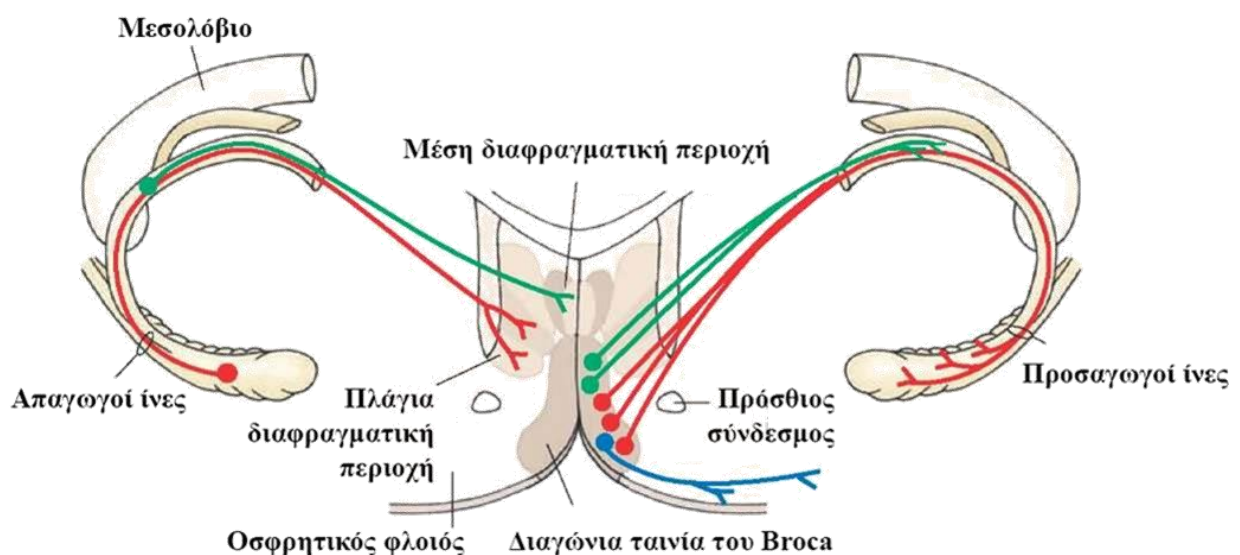
Το **υπόθεμα** αποτελεί την κύρια πηγή των ιών της παρυφής/ψαλίδας. Συντίθεται από δύο στιβάδες, την **πυραμιδική** και τη **μοριακή** (Εικόνα 2). Η τελευταία χωρίζεται σε επιπολής μοριακή, που είναι η συνέχεια της μοριακής στιβάδας της CA1 και εν τω βάθει μοριακή που αποτελεί συνέχεια της ακτινωτής στιβάδας της CA1. Τα κύρια κύτταρα του υποθέματος είναι μεγάλοι ακανθώδεις πυραμιδικοί νευρώνες [2,3].

1.2. Συνδέσεις του ιπποκάμπειου σχηματισμού

1.2.1. Δεμάτια

Τρία κύρια συστήματα δεματίων σχετίζονται με τον ιπποκάμπειο σχηματισμό.

- Το πρώτο είναι το **γωνιώδες δεμάτιο**, που φέρει ίνες μεταξύ του ενδορινικού φλοιού και του ιπποκάμπειου σχηματισμού.
- Το δεύτερο είναι το μονοπάτι **παρυφής-ψαλίδας** μέσα από το οποίο ο ιπποκάμπειος σχηματισμός διασυνδέεται με το βασικό προσεγκέφαλο, τον υποθάλαμο και το στέλεχος.
- Το τρίτο δεμάτιο περιλαμβάνει το **ραχιαίο και κοιλιακό σύνδεσμο** μέσα από τους οποίους ο ιπποκάμπειος σχηματισμός του ενός ημισφαιρίου συνδέεται με εκείνον του αντίστοιχου ημισφαιρίου (Εικόνα 3) [3].

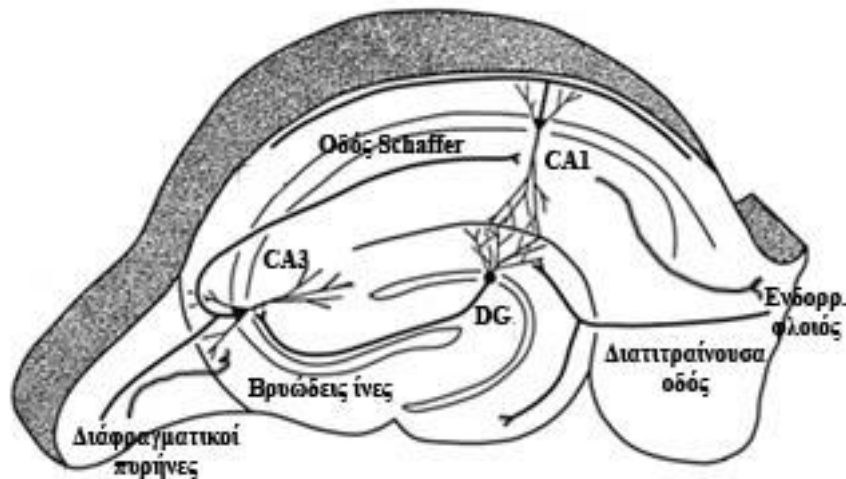


Εικόνα 3: Δεμάτια του ιπποκάμπειου σχηματισμού.

Πηγή: <http://what-when-how.com/neuroscience/the-limbic-system-integrative-systems-part> (τροποποιημένο).

1.2.2. Διασυνδέσεις οδοντωτής έλικας

Η οδοντωτή έλικα είναι η πρώτη δομή που δέχεται απευθείας νεύρωση από τον ενδορινικό φλοιό, εντούτοις η ίδια δεν προβάλλει εκτός του ιπποκάμπειου σχηματισμού. Η νεύρωση από τον ενδορινικό φλοιό γίνεται μέσω της **διατιτραίνουσας οδού** (perforant path) και καταλήγει στους δενδρίτες των κοκκωδών κυττάρων στη μοριακή στιβάδα αλλά και σε GABAεργικούς διανευρώνες (Εικόνα 4), όχι όμως στις βρυώδεις ίνες καθώς αυτές περιορίζονται στην πολύμορφη στιβάδα [3].



Εικόνα 4: Βασικές συνδέσεις του ιπποκάμπειου σχηματισμού. Πηγή: Andersen P et al, 2006 (τροποποιημένο).

Η στιβάδα των κοκκωδών κυττάρων δέχεται ανασταλτική GABAεργική νεύρωση από τα καλαθοφόρα και τα αξονοαξονικά κύτταρα (περιγράφονται παρακάτω) ενώ η ίδια προβάλλει σε GABAεργικά κύτταρα της πολύμορφης στιβάδας μέσω αμμύλων ιών, τις **βρυώδεις ίνες** (mossy fibers) που στη συνέχεια τερματίζουν στη διαυγή στιβάδα της CA3 περιοχής του ιδίως ιππόκαμπου (Εικόνα 4). Η μοριακή στιβάδα δέχεται προβλητικές ίνες από τα βρυώδη κύτταρα της σύστοιχης και αντίστοιχης πολύμορφης στιβάδας καθώς και από GABAεργικά κύτταρα θετικά για σωματοστατίνη [3].

Η οδοντωτή έλικα δέχεται σχετικά λίγες ίνες από υποφλοιώδεις δομές. Η πιο μελετημένη απ' αυτές είναι η προβολή αξόνων από τους πυρήνες του διαφράγματος (Εικόνα 3). Ξεκινά από κύτταρα του μέσου διαφραγματικού πυρήνα και του πυρήνα της διαγώνιας δεσμίδας του Broca και νευρώνει κύτταρα της πολύμορφης στιβάδας της οδοντωτής έλικας. Οι περισσότερες ίνες είναι χολινεργικές αλλά περιέχονται και ίνες που συνθέτουν GABA. Ο υποθάλαμος προβάλλει επίσης στην οδοντωτή έλικα από την υπερμαστική περιοχή αλλά και από άλλους πυρήνες [3].

Η πολύμορφη στιβάδα της οδοντωτής έλικας δέχεται νοραδρενεργική νεύρωση από τον υπομέλανα τόπο, μικρή ντοπαμινεργική νεύρωση από την κοιλιακή περιοχή της καλύπτρας και σεροτονινεργική νεύρωση από τους πυρήνες της ραφής [3].

1.2.3. Διασυνδέσεις ιδίως ιπποκάμπου

Ένα ιδιαίτερο στοιχείο των διασυνδέσεων του ιδίως ιπποκάμπου είναι ότι η πλειοψηφία της συναπτικής του τροφοδοσίας ξεκινάει μέσα από τα όριά του [3].

Τα CA3 και CA2 πεδία νευρώνονται κυρίως από άξονες νευρώνων των ομόπλευρων περιοχών (associational) καθώς και από άξονες νευρώνων των CA2 και CA3 (ετερόπλευρων commissural)

του ετερόπλευρου ιπποκάμπου. Από την άλλη, η CA1 περιοχή τροφοδοτείται κυρίως από ίνες της CA3 (παράπλευρες ίνες του Schaffer) που καταλήγουν στην ακτινωτή και πολύμορφη στιβάδα και αποτελούν τη βασική νεύρωση των πυραμιδικών κυττάρων της CA1 περιοχής (Εικόνα 4). Εντούτοις και στη CA1 υπάρχει περιορισμένος αριθμός ιδίων (associational) ινών. Η CA1 προβάλλει προς το υπόθεμα και τον εν τω βάθει ενδορινικό φλοιό που με τη σειρά του προβάλλει στον ιδίως ιππόκαμπο στους άπω δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων και σε διανευρώνες με δενδρίτες στη βοθριώδη μοριακή στιβάδα όλων των περιοχών. Μόνο τα κύτταρα της CA1 ανταποδίδουν αυτές τις προβολές προς τον ενδορινικό φλοιό [3].

Ο ιδίως ιππόκαμπος αλληλοεπιδρά μέσω αμφίδρομων προβολών με διάφορες περιοχές του εγκεφάλου, κυρίως με τον νεοφλοιό και τον αμυγδαλοειδή πυρήνα. Από τις υποφλοιώδεις δομές το διάφραγμα είναι η κύρια προέλευση ινών προς τη CA3 περιοχή. Οι ίνες αυτές ξεκινούν από το μέσο πυρήνα του διαφράγματος και από τη διαγώνια δεσμίδα του Broca και καταλήγουν στην πολύμορφη και ακτινωτή στιβάδα (Εικόνα 3). Μέρος των ινών καταλήγουν και στη CA1. Με τη σειρά τους, η CA3 και σε κάποιο βαθμό και η CA1 δίνουν προβολές προς τον πλάγιο διαφραγματικό πυρήνα μέσω της παρυφής και της ψαλίδας. Ο υποθάλαμος και συγκεκριμένα ο φυματομαστικός πυρήνας φαίνεται να δίνει εξέχουσα νεύρωση στη CA2 περιοχή, ενώ ο θάλαμος και πιο ειδικά ο συνδετικός πυρήνας του δίνει προβολές κυρίως στη CA1 περιοχή, τόσο σε κύριους όσο και σε GABAεργικούς νευρώνες [3].

Τέλος, ο ιδίως ιππόκαμπος, όπως η οδοντωτή έλικα, δέχεται νοραδρενεργική και σεροτονινεργική νεύρωση από πυρήνες του στελέχους. Η σεροτονινεργική προβολή φαίνεται να έχει έντονη επίδραση στους διανευρώνες ενισχύοντας την ανασταλτική GABAεργική δραστηριότητα. Υπάρχει επιπλέον περιορισμένη ντοπαμινεργική νεύρωση [3].

1.2.4. Διαυνδέσεις υποθέματος

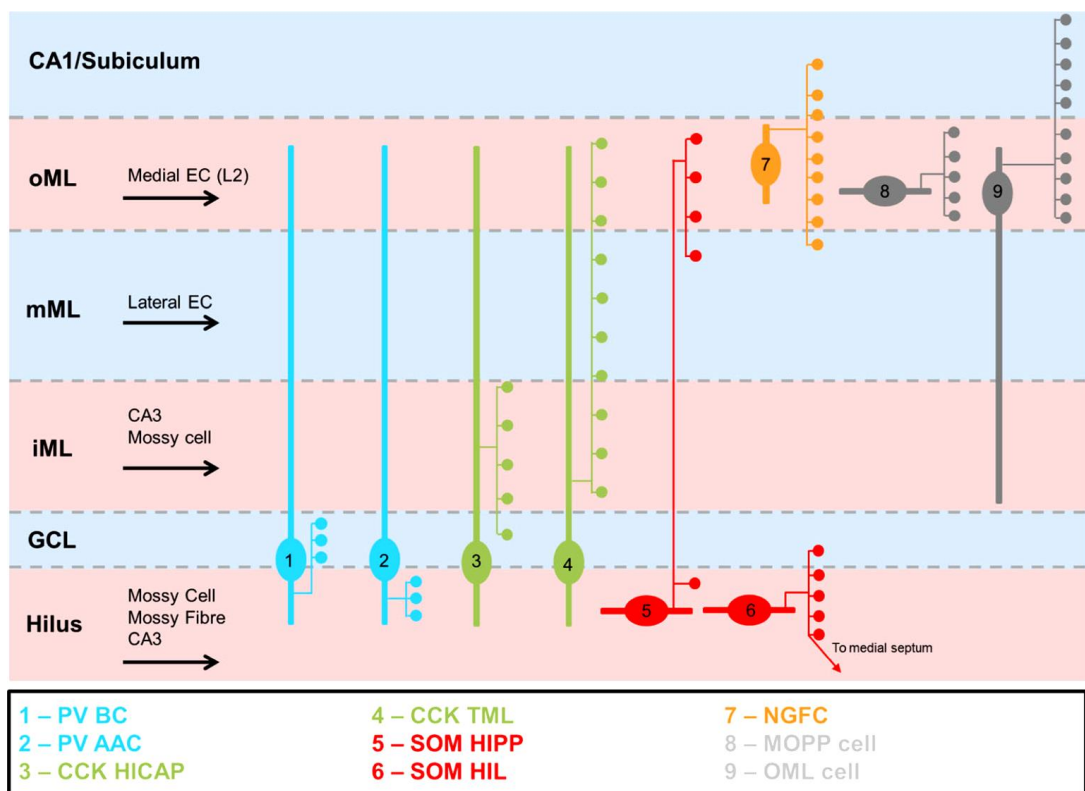
Το υπόθεμα δε δίνει ούτε δέχεται ετερόπλευρες συνδέσεις. Είναι η βασική έξοδος πληροφοριών προς το διεγκέφαλο και το στέλεχος του εγκεφάλου (μέσω της μετασυνδεσμικής ψαλίδας). Έχει αμφίδρομες συνδέσεις με τον ενδορινικό φλοιό και το αμυγδαλοειδές σύμπλεγμα. Προβάλλει προς το διαφραγματικό σύμπλεγμα (που με τη σειρά του δίνει μικρή χολινεργική νεύρωση προς αυτό), τον επικλινή πυρήνα και τα μαστία. Έχει παρόμοιες με τη CA1 περιοχή συνδέσεις με το θάλαμο. Από το στέλεχος δέχεται μικρή νοραδρενεργική (από τον υπομέλανα τόπο), ντοπαμινεργική (από την κοιλιακή καλυπτρική περιοχή) και σεροτονινεργική (από τους μέσους και κοιλιακούς πυρήνες της ραφής) νεύρωση [2].

1.3. Διανευρώνες του υποκάμπειου σχηματισμού

Επιπλέον των κύριων κυττάρων του υποκάμπειου σχηματισμού υπάρχουν πολυάριθμοι διανευρώνες οι οποίοι είναι κυρίως ανασταλτικοί και συνθέτουν GABA [3].

1.3.1. Διανευρώνες οδοντωτής έλικας

Σχηματικά αποτυπώνονται στην Εικόνα 5. Οι πιο καλά μελετημένοι διανευρώνες της οδοντωτής έλικας είναι τα **καλαθοφόρα κύτταρα** (basket cells) των οποίων οι άξονες σχηματίζουν περικυτταρικά πλέγματα γύρω από τα κοκκώδη κύτταρα. Στη μοριακή στιβάδα βρίσκονται τα **κύτταρα MOPP** (molecular layer perforant path-associated cell) και τα **αξονοαξονικά κύτταρα** (ή chandelier) των οποίων οι άξονες καταλήγουν σε νευράξονες άλλων κυττάρων. Επίσης, στη μοριακή στιβάδα βρίσκονται και **νευρώνες ειδικοί για διανευρώνες** (interneuron specific-IS). Στην πολύμορφη στιβάδα βρίσκονται **ατρακτοειδή** (fusiform) κύτταρα όπως τα **HIPP** (hilar perforant path-associated cells) αλλά και τα **HICAP** κύτταρα (hilar commissural-associated pathway-related cells) [3].



Εικόνα 5: Συνοπτική απεικόνιση των διανευρώνων στην οδοντωτή έλικα. Ανατύπωση από: Booker S A et al, 2018.

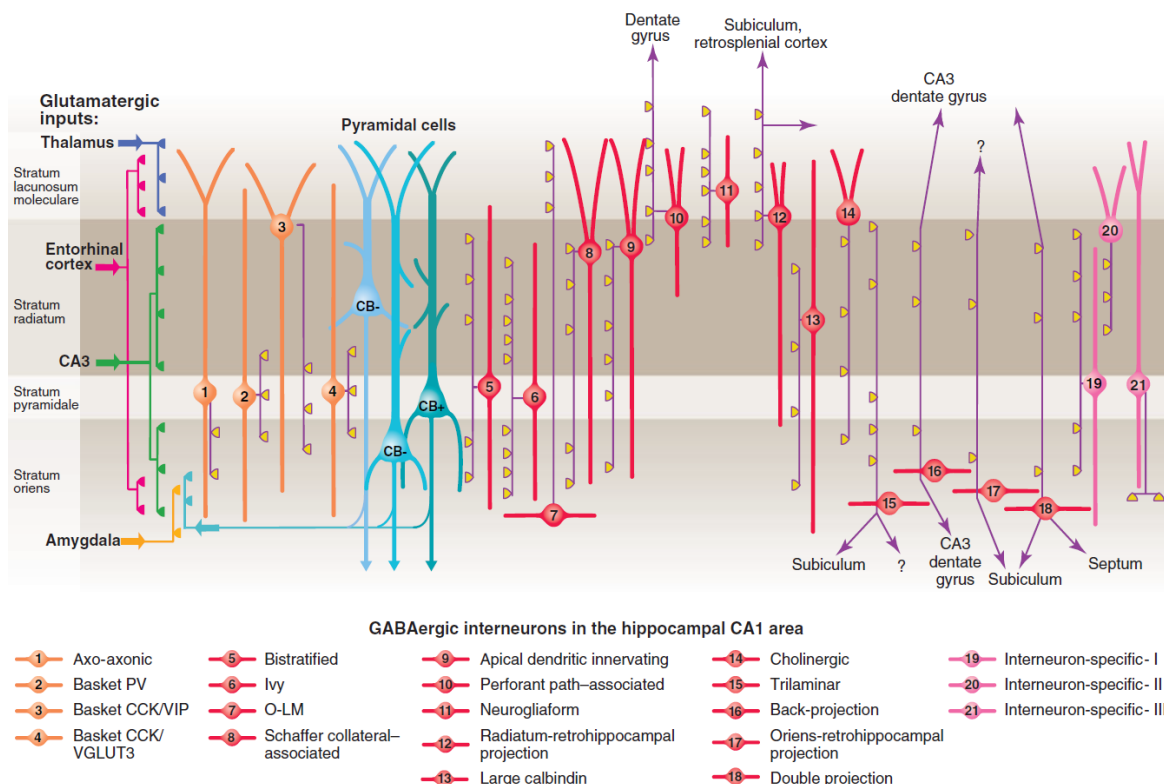
1.3.2. Διανευρώνες ιδίως ιππόκαμπου

Σχηματικά αποτυπώνονται στην Εικόνα 6. Ο κυριότερος τύπος διανευρώνων του ιδίως ιππόκαμπου είναι τα **καλαθοφόρα κύτταρα** τα οποία βρίσκονται μέσα ή κοντά στην πυραμιδική στιβάδα και οι δενδρίτες τους εκτείνονται στην πολύμορφη, ακτινωτή και βοθριώδη-μοριακή στιβάδα. Νευρώνουν το σώμα και τους εγγύς δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων.

Ένας δεύτερος τύπος διανευρώνων είναι τα κύτταρα τύπου **πολυελαίου** (chandelier). Τα κυτταρικά τους σώματα βρίσκονται στην πυραμιδική στιβάδα και οι δενδρίτες τους απλώνονται σε όλες τις στιβάδες. Οι νευράξονες τους τερματίζουν στα αρχικά τμήματα των νευραξόνων των πυραμιδικών κυττάρων είναι δηλαδή αξονοαξονικά κύτταρα.

Τα κύτταρα **O-LM** (oriens lacunosum-moleculare-associated cell) είναι ένας ακόμη τύπος διανευρώνων, η θέση των οποίων ποικίλει ανά περιοχή. Οι νευράξονες τους καταλήγουν στη βοθριώδη-μοριακή στιβάδα όπου συνάπτονται με τους κορυφαίους δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων.

Μια επιπλέον τάξη διανευρώνων είναι τα **διστιβαδωτά** κύτταρα καθώς και οι **διανευρώνες ειδικοί για διανευρώνες** (interneuron specific-IS) οι άξονες των οποίων τερματίζουν πάντα σε άλλους διανευρώνες.

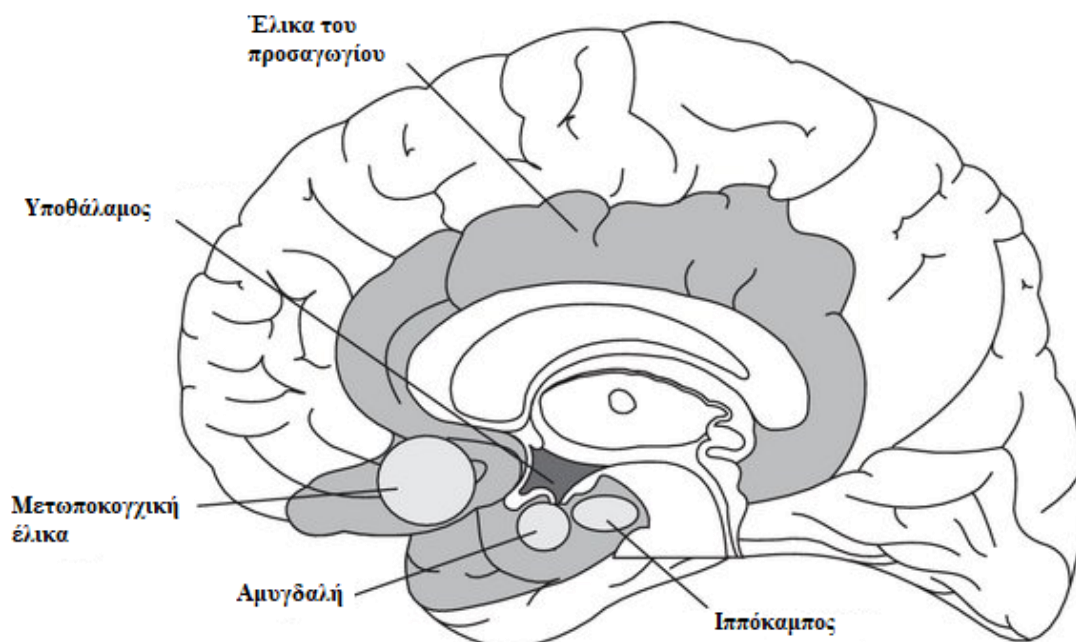


Εικόνα 6: Συνοπτική απεικόνιση των διανευρώνων του ιδίως ιππόκαμπου. Ανατύπωση από: Klausberger T et al, 2008.

Όλοι οι διανευρώνες που περιγράφηκαν είναι GABAεργικοί. Φαίνεται να εκφράζουν επιπλέον και πεπτίδια όπως η σωματοστατίνη, το αγγειοδραστικό εντερικό πεπτίδιο (VIP), η χολοκυστοκινίνη, το νευροπεπτίδιο Υ (NPY) καθώς και ασβεστιοδεσμευτικές πρωτεΐνες όπως η παρβαλβουμίνη και η καλρετινίνη [3].

1.4. Λειτουργική σημασία του ιπποκάμπειου σχηματισμού

Ο ιπποκάμπειος σχηματισμός, που στο εξής θα αναφέρεται ως ιππόκαμπος, αποτελεί μέρος του μεταχιακού συστήματος (limbic system, Εικόνα 7). Το σύστημα αυτό είναι μια ομάδα αλληλοσυνδεόμενων φλοιικών και υποφλοιωδών δομών που ενώνουν τις ενστικτώδεις λειτουργίες (πείνα, δίψα, σεξουαλικότητα) και τα συναισθήματα με τις γνωστικές λειτουργίες και τη συμπεριφορά [5].



Εικόνα 7: Οι κύριες δομές του μεταχιακού συστήματος. Πηγή: Roxo M, 2011 (τροποποιημένο).

Ο ιππόκαμπος ξεχωρίζει ανάμεσα στις δομές αυτές για την ιδιαίτερη ευαισθησία που παρουσιάζει σε νευρωνικές προσβολές όπως ισχαιμία/υποξία, τραύμα και υπογλυκαιμία αλλά και για τη συμβολή του στην παθοφυσιολογία της άνοιας και της επιληψίας και αποτελεί μία από τις πιο καλά μελετημένες περιοχές του εγκεφάλου [2].

Η αφετηρία για την εκτενή μελέτη του ιπποκάμπου ήταν η περίπτωση του ασθενούς H.M. που παρουσίασε αμνησία μετά την αφαίρεση αμφοτέρων των κροταφικών λοβών του, συμπεριλαμβανομένων και των ιπποκάμπων για την αντιμετώπιση ανθεκτικής επιληψίας. Έτσι η λειτουργία του ιπποκάμπου συνδέθηκε από νωρίς με την επεισοδιακή μνήμη. Σε αυτήν την ανακάλυψη προστέθηκε και εκείνη των place cells το 1974 [6] που έριξε φως στη μεγάλη σημασία

του ιπποκάμπου στην αντιπροσώπευση του χώρου και την πλοήγηση [7]. Ο ιπποκάμπος εμπλέκεται επίσης στη συναισθηματική συμπεριφορά μέσω των αμφίδρομων συνδέσεων του με την αμυγδαλή και στη ρύθμιση των λειτουργιών του υποθαλάμου [8]. Τα τελευταία χρόνια έχει επίσης αναδειχθεί η σημασία του ιπποκάμπου στην αντίληψη ολοκληρωμένων σκηνών αλλά και στην κατασκευή φανταστικών και μελλοντικών σκηνών [7].

Πέραν όμως του ρόλου του στη μνήμη και το χωρικό προσανατολισμό, ο ιπποκάμπος έχει ιδιαίτερη σημασία στην επιληπτολογία αφού αποτελεί την προέλευση μιας μεγάλης μερίδας εστιακών κρίσεων καθώς και την πιο κοινή πηγή επιληψίας του κροταφικού λοβού που εκπροσωπεί το 60% των εστιακών επιληψιών [9] ενώ έως και 50-75% των ασθενών με επιληψία παρουσιάζουν ειδικές παθολογοανατομικές αλλοιώσεις στον ιπποκάμπο που καλούνται ιπποκάμπεια σκλήρυνση [8]. Η καλά οργανωμένη δομή του και οι εσωτερικές του συνδέσεις καθιστούν τον ιπποκάμπο ιδανικό για τη μελέτη των βασικών μηχανισμών της συναπτικής μετάδοσης και της επιληπτογένεσης [9]. Ο ιπποκάμπος είναι επίσης εύκολα προσβάσιμος για απεικόνιση και μελέτη μορφολογικών και βιοχημικών αλλαγών, και παρασκευάσματα ιπποκάμπων από επιληπτικούς ασθενείς είναι ευρέως διαθέσιμα [10].

1.5. Status epilepticus

1.5.1. Ορισμός

Ως επιληπτική κρίση ορίζεται το σύνολο των σημείων και συμπτωμάτων που εμφανίζονται έπειτα από μια ανώμαλη και υπερβολική νευρωνική δραστηριότητα στον εγκέφαλο. Τα σημεία και συμπτώματα αυτά είναι κατά κανόνα παροδικά [11]. Η προδιάθεση για εμφάνιση διαλειπόντων μη προκλητών επιληπτικών κρίσεων ονομάζεται επιληψία και το σύνολο των μηχανισμών που οδηγούν στην ανάπτυξη της καλείται επιληπτογένεση [12].

Η πιο επικίνδυνη και ενίοτε θανατηφόρα εκδήλωση των επιληπτικών κρίσεων είναι το status epilepticus (SE). Σύμφωνα με την International League Against Epilepsy (ILAE), το SE προκύπτει είτε από την αποτυχία των μηχανισμών περιορισμού μιας επιληπτικής κρίσης είτε από την πυροδότηση μηχανισμών που οδηγούν σε παρατεταμένες επιληπτικές κρίσεις. Στην κλινική πράξη, ένας ασθενής θεωρείται ότι χρήζει φαρμακευτικής παρέμβασης μετά από 5 min συνεχόμενων γενικευμένων σπασμών, ενώ μετά από 30 min θεωρείται ότι κινδυνεύει από μόνιμη νευρωνική βλάβη ή θάνατο, και τροποποίηση νευρωνικών κυκλωμάτων [11].

Στην Ευρώπη η επίπτωση του SE κυμαίνεται από 8.52 – 36.1 ανά 100.000/έτος και η θνητότητα μπορεί να φτάσει το 30% στους ενήλικες [13]. Κλινικά, ένας ασθενής σε SE εμφανίζει συνήθως έκδηλους σπασμούς όπως τονικές, κλονικές ή τονικο-κλονικές κινήσεις των άκρων. Εντούτοις κάποιοι ασθενείς δεν έχουν εμφανή κινητική δραστηριότητα και η ανίχνευση του SE απαιτεί

ηλεκτροεγκεφαλογραφική καταγραφή [14]. Υπάρχουν διάφοροι τρόποι κατηγοριοποίησης του SE, ανάλογα με τη σημειολογία, την αιτία (Πίνακας 1), τα ευρήματα στο ηλεκτροεγκεφαλογράφημα ή την ηλικία [11].

Πίνακας 1: Αίτια status epilepticus [11]

Γνωστά αίτια	<p>Οξέα (π.χ. εγκεφαλικό επεισόδιο, ελονοσία, εγκεφαλίτιδα κλπ.)</p> <p>Δευτερεύοντα (π.χ. μετατραυματικό, μετεγκεφαλιτιδικό κλπ.)</p> <p>Προοδευτικά (π.χ. όγκοι, άνοιες κλπ.)</p> <p>Στο πλαίσιο καθορισμένων ηλεκτροεγκεφαλικών και κλινικών συνδρόμων</p>
Άγνωστα αίτια	

1.5.2. Παθοφυσιολογία του Status Epilepticus

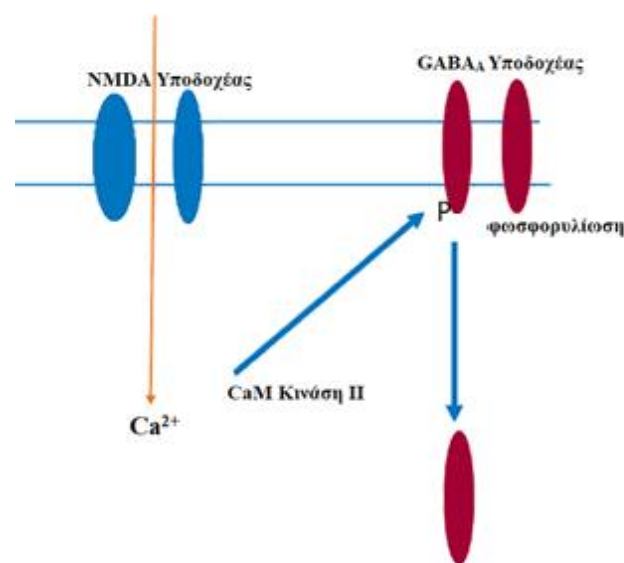
Παρόλο που η επικίνδυνη αυτή κατάσταση είναι γνωστή από την αρχαιότητα η παθοφυσιολογία του SE δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητή [14].

Σε γενικές γραμμές ο ανθρώπινος εγκέφαλος διαθέτει πολύ δραστικά μέσα τερματισμού μιας κρίσης, με κυριότερο την τροποποίηση του μεταβολισμού. Η εξάντληση των αποθεμάτων ενέργειας (γλυκόζης, οξυγόνου) που παρατηρείται κατά τη διάρκεια των σπασμών μειώνει τη διαθεσιμότητα σε συστατικά απαραίτητα για ομαλή νευροδιαβίβαση και η μεταβολική οξέωση που προκαλείται από συγκέντρωση διαφόρων μεταβολιτών (γαλακτικού κ.α.) που παράγονται από τους νευρώνες τερματίζει την ανώμαλη εκφόρτιση τους. Αυτό φαίνεται να συμβαίνει μέσω απενεργοποίησης των NMDA υποδοχέων και ενίσχυσης της τρανσαμινάσης του GABA (GABAT) που καταλύει την αντίδραση παραγωγής γλουταμινικού οξέως από GABA [15].

Έτσι, μετά από μια τονικοκλονική κρίση ακολουθεί συνήθως ένα μικρό διάστημα διαταραχής της συνείδησης (μετακριτικό στάδιο), κατά το οποίο το κατώφλι εμφάνισης νέας κρίσης είναι αρκετά αυξημένο. Η αλλαγή αυτή είναι προσαρμοστική καθώς τείνει να επαναφέρει την ομοιόσταση στον εγκέφαλο και να σταματήσει την ανεξέλεγκτη διέγερση των νευρώνων. Κατά την διάρκεια του SE όμως οι προαναφερθέντες μηχανισμοί αποτυγχάνουν. Οι επαναλαμβανόμενοι σπασμοί προκαλούν πολύπλοκες παθοφυσιολογικές και βιοχημικές αλλαγές στον εγκέφαλο που σαν τελικό αποτέλεσμα έχουν την αποτυχία της αναστολής και την επίταση της διέγερσης των νευρώνων [16].

Ειδικότερα, τα πρώτα δευτερόλεπτα του SE χαρακτηρίζονται από ταχεία απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών και νευροτροποποιητών. Στα επόμενα λεπτά κυριαρχεί η μετατόπιση των

υποδοχέων, κυρίως αυτών του GABA και του γλουταμινικού οξέως. Είναι γνωστό ότι οι υποδοχείς μπορούν να μετακινούνται από τη μετασυναπτική μεμβράνη προς ενδοσωμάτια όπου παραμένουν αδρανείς αλλά έτοιμοι για ανακύκλωση, είτε να κινητοποιηθούν από σημεία αποθήκευσης προς τη μετασυναπτική μεμβράνη όπου είναι λειτουργικοί και μπορούν να ενεργοποιηθούν ξανά [16]. Συγκεκριμένα, κατά το SE οι GABA_A υποδοχείς μετατοπίζονται από τη σύναψη προς το εσωτερικό του κυττάρου μέσω φωσφορυλίωσης της β₃ υπομονάδας τους (Εικόνα 8). Η φωσφορυλίωση οδηγεί στην ενδοκυττάρωση του υποδοχέα με τη μεσολάβηση της κλαθρίνης [17]. Αντίθετα, οι υπομονάδες των NMDA υποδοχέων στρατολογούνται προς τη σύναψη όπου σχηματίζουν επιπρόσθετους υποδοχείς. Αυτό οδηγεί συνολικά σε μείωση των ανασταλτικών υποδοχέων και αύξηση των διεγερτικών [16].



Εικόνα 8: Μετατόπιση των GABA_A κατά το SE. Πηγή: Kairur J, 2018 (τροποποιημένο).

Από λεπτά μέχρι ώρες μετά το SE, η εξάντληση των ενεργειακών αποθεμάτων στον εγκέφαλο και οι αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση των νευροπεπτιδίων, αυξάνουν τη συγκέντρωση διεγερτικών (ταχυκινίνες, ουσία P και νευροκίνη Β) και μειώνουν τη διαθεσιμότητα ανασταλτικών (δυνορφίνη, γαλανίνη, σωματοστατίνη και νευροπεπτίδιο Υ) γεγονός που επιτείνει τη διεγερσιμότητα του εγκεφάλου. Η αυξημένη διεγερσιμότητα οδηγεί τελικά το κύτταρο σε εξάντληση της ενέργειας του και την ανάπτυξη νευρωνικής βλάβης [16].

Αργότερα, σε ώρες, ημέρες, εβδομάδες μετά το επεισόδιο, λαμβάνουν χώρα μακροπρόθεσμες αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση ως ύστερο αποτέλεσμα των επαναλαμβανόμενων σπασμών, του νευρωνικού θανάτου και της αναδιοργάνωσης των νευρωνικών κυκλωμάτων που επάγονται από τους σπασμούς [16].

1.5.3. Δομικές και λειτουργικές επιπτώσεις του Status Epilepticus

Τα ποσοστά νοσηρότητας και θνητότητας από SE είναι από τα μεγαλύτερα μεταξύ των νευρολογικών παθήσεων [18] εντούτοις, η σχέση μεταξύ σπασμών και νέκρωσης των κυττάρων του εγκεφάλου παραμένει αμφιλεγόμενη στη βιβλιογραφία. Είναι εξαιρετικά δύσκολο να αποδειχθεί η ύπαρξη ή όχι νευρωνικού θανάτου κατά το SE [19] και είναι βέβαια εξίσου δύσκολο να διαχωρίσει κανείς το αίτιο από το αποτέλεσμα των σπασμών [10]. Να σημειωθεί όμως ότι για την καθιέρωση επιληψίας δεν απαιτείται απαραίτητα οξύς ή καθυστερημένος νευρωνικός θάνατος [20].

Μελέτες στον άνθρωπο. Από μελέτες σε ανθρώπους υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι το SE μπορεί να προκαλέσει δομικές και λειτουργικές αλλαγές. Γνωρίζουμε ότι 48 ώρες μετά από πυρετικούς σπασμούς, στην μαγνητική τομογραφία του εγκεφάλου παρατηρείται αμφοτερόπλευρο οίδημα του ιπποκάμπου, ο οποίος επιστρέφει στο φυσιολογικό του μέγεθος 6 μήνες αργότερα. Παρόμοια ευρήματα έχουν αναφερθεί και σε περιπτώσεις SE μη πυρετικής αιτιολογίας. Μελέτες περιγράφουν επίσης γνωστικά, γλωσσικά ελλείμματα και διαταραχές στη μνήμη ένα μήνα μετά από επεισόδιο σπασμών [21]. Μια άποψη που μοιράζονται πολλοί ερευνητές είναι ότι η επιληψία στα παιδιά φέρει ένα σημαντικό ρίσκο για μια ποικιλία γνωστικών και συμπεριφορικών διαταραχών. Ο δείκτης νοημοσύνης σε παιδιά με επιληψία είναι προς τα κατώτερα επίπεδα και ο αριθμός των παιδιών με επιληψία που αντιμετωπίζουν μαθησιακές δυσκολίες και προβλήματα στη συμπεριφορά είναι αυξημένος σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό [22].

Μελέτες σε επίμυες. Από μελέτες σε επίμυες γνωρίζουμε ότι το SE μπορεί να προκαλέσει απώλεια νευρώνων στις περιοχές CA1, CA3 του ιπποκάμπου και στην πολύμορφη στιβάδα της οδοντωτής έλικας καθώς και μακροπρόθεσμα ελλείμματα στη μάθηση, μνήμη και συμπεριφορά [22]. Επιπλέον επαναλαμβανόμενοι σπασμοί κατά την περίοδο ωρίμανσης των place cells του ιπποκάμπου συσχετίστηκαν με ανώμαλη χωρική μάθηση στους επίμυες και το SE στην πρώιμη ηλικία μπορεί να επηρεάσει μόνιμα την ικανότητα ενός ζώου να αποκτά νέες μνήμες [23].

Η νευρωνική βλάβη του ιπποκάμπου από το SE μπορεί να οφείλεται σε:

1. *Διεγερτοτοξικότητα.* Κατά το SE υπάρχει υπερβολική απελευθέρωση γλουταμινικού οξέως που διεγείρει τους NMDA υποδοχείς και προκαλεί την ενεργοποίηση των τασεοεξαρτώμενων διαύλων ασβεστίου. Η αθρόα είσοδος ιόντων ασβεστίου στο κύτταρο, που προκύπτει πυροδοτεί έναν καταρράκτη γεγονότων που καταλήγουν στο νευρωνικό θάνατο. Η υψηλή ενδοκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου οδηγεί επιπλέον σε παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species-ROS) μέσω της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (NO synthase-NOS) και ενεργοποιεί μια σειρά ενζύμων που έχουν αρνητικές συνέπειες στην

κυτταρική λειτουργία. Η συμμετοχή της διεγερτοτοξικότητας μέσω των NMDA στην πρόκληση νευρωνικής βλάβης υποστηρίζεται επίσης από το γεγονός ότι η χορήγηση του ανταγωνιστή των NMDA, MK-801 κατά το SE προλαμβάνει τη νευρική βλάβη και την επιληπτογένεση σε νεαρούς επίμυες [21,22].

2. *Φλεγμονή*. Κατά το SE ενεργοποιούνται καταρράκτες φλεγμονής και υπάρχει έκκριση ιντερλευκίνης 1β που προκαλεί μετανάστευση των λευκοκυττάρων στον εγκέφαλο [21]
3. *Ισχαιμία* κατά τη διάρκεια των σπασμών παρατηρείται υποαιμάτωση του ιπποκάμπου συγκριτικά με τον φλοιό [21].

Οι λειτουργικές αλλαγές, που παρατηρούνται μετά από SE έχουν αποδοθεί σε διαταραχή της οργάνωσης των νευρωνικών κυκλωμάτων που προκαλείται από:

1. Εκβλάστηση (sprouting) βρυωδών ιών στην οδοντωτή έλικα που αυξάνει τη διεγερσιμότητα του ιπποκάμπου
2. Ανώμαλη μετανάστευση νευρώνων
3. Διαταραχή στη μακροπρόθεσμη ενίσχυση (long term potentiation-LTP) [21]
4. Αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού, όπως αποτυπώνεται από την αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης νευροϊνιδίων (neurofilaments-NF) που είναι τα κύρια ενδιάμεσα ινίδια των νευρώνων [24,25,26]

Όσον αφορά τη σχέση του SE και της εμφάνισης επιληψίας αργότερα στη ζωή, αναφέρεται ότι μετά από σπασμούς διάρκειας ≥ 30 min επιληψία παρουσιάζεται στο 25-40% των ατόμων. Το ποσοστό αυτό είναι παρόμοιο με το ποσοστό επιληψίας μετά από μία μικρής διάρκειας κρίση (37%). Επομένως ο κίνδυνος εμφάνισης επιληψίας εξαρτάται περισσότερο από την αιτία και όχι από τη διάρκεια της πρώτης κρίσης [27].

1.5.4. Επιπτώσεις του SE στη νευροδιαβίβαση

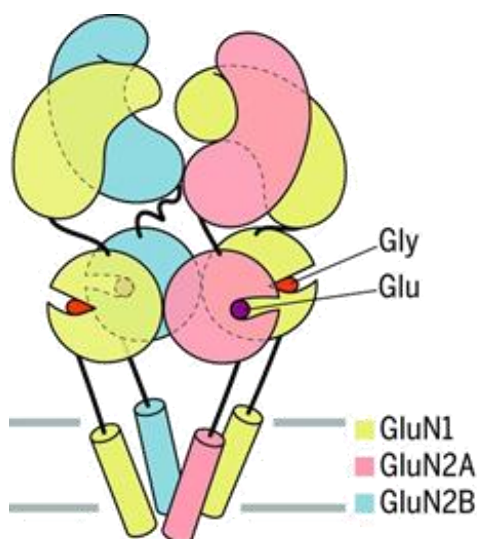
i. Γλουταμινεργική διαβίβαση

Το γλουταμινικό οξύ αποτελεί τον κύριο διεγερτικό νευροδιαβιβαστή του εγκεφάλου (το 80-90% των συνάψεων του να είναι γλουταμινεργικές). Πέρα από το ρόλο του στη δημιουργία και την εξέλιξη των επιληπτικών κρίσεων που αναφέρθηκε πιο πάνω, ο νευροδιαβιβαστής αυτός συμμετέχει στην τροποποιημένη σηματοδότηση και στο σχηματισμό των ανώμαλων συνάψεων που χαρακτηρίζουν τον επιληπτικό εγκέφαλο [28].

Οι υποδοχείς του γλουταμινικού χωρίζονται σε δύο ευρείες κατηγορίες: στους μεταβολοτροπικούς υποδοχείς που είναι υποδοχείς συζευγμένοι με G-πρωτεΐνες και τους ιοντοτροπικούς υποδοχείς, που είναι διάλυτοι εξαρτώμενοι από πρόσδεμα. Η τελευταία ομάδα

περιλαμβάνει τους AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid), τους NMDA (N-methyl-d-aspartic acid) και τους υποδοχείς του καϊνικού οξέος [29].

Οι NMDA υποδοχείς παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη συναπτική διαβίβαση, τη μνήμη και τη μάθηση μέσω του μηχανισμού της μακροπρόθεσμης ενίσχυσης (long-term potentiation-LTP), στη διεγερτοτοξικότητα και στις επιληπτικές κρίσεις. Οι υποδοχείς αυτοί είναι ετεροτετραμερή σύμπλοκα αποτελούμενα από δύο υποχρεωτικές υπομονάδες GluN1 που δεσμεύουν γλυκίνη και δύο υπομονάδες GluN2 (A, B, C, D) ή GluN3 (Εικόνα 9). Οι λειτουργικές ιδιότητες ενός NMDA υποδοχέα εξαρτώνται από τις υπομονάδες του: οι υποδοχές με GluN2A υπομονάδες περιορίζονται στη συναπτική σχισμή και συμμετέχουν κυρίως στη μακροπρόθεσμη ενίσχυση ενώ οι υποδοχείς NMDA που περιέχουν GluN2B φαίνεται να ανευρίσκονται και εξωσυναπτικά και λαμβάνουν μέρος στη μακροπρόθεσμη καταστολή (long-term depression-LTD) [30].



Εικόνα 9: Ο NMDA υποδοχέας και οι υπομονάδες του. Ανατύπωση από Lu W et al, 2017.

Είναι γνωστό ότι το SE μπορεί να επηρεάσει τόσο τον συνολικό αριθμό των NMDA υποδοχέων όσο και την αναλογία υποδοχέων NMDA με διαφορετική σύνθεση υπομονάδων [30,31,32] και η αλλαγή αυτή στην αναλογία GluN2A/GluN2B φαίνεται να είναι καθοριστικός παράγοντας τροποποίησης της συναπτικής πλαστικότητας [33].

Από τις μέχρι τώρα μελέτες σε ζωικά μοντέλα, μεμονωμένων ή επαναλαμβανόμενων σπασμών έχει παρατηρηθεί:

- ελάττωση στο LTP [33]
- αύξηση των επιπέδων NMDAR1 και κυρίως NMDAR2B [30,34,35,36] που μπορεί να επιμείνει και ημέρες μετά [37,38]
- αύξηση της δέσμευσης του γλουταμινικού στους NMDA [39]
- ελάττωση των φωσφορυλιωμένων NR2B υπομονάδων μετασυναπτικά και αύξηση της έκτοπης παραγωγής τους (παραγωγή NR2B εξωσυναπτικά και σε αστροκύτταρα) [31]

Επίσης έχει αναφερθεί ότι χορήγηση αναστολέα των NR2B προλαμβάνει το οξειδωτικό stress και την νευρωνική απώλεια που προκαλούν οι επαναλαμβανόμενες κρίσεις (kindling) με PTZ σε επίμυες [37].

ii. GABAεργική διαβίβαση

Το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) είναι ο κύριος ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής του εγκεφάλου και είναι καλά εδραιωμένη η άποψη ότι η ανισορροπία στη συγκέντρωση του είναι από τους βασικούς μηχανισμούς επιληπτογένεσης στον εγκέφαλο. Έχει δύο τύπους υποδοχέα, τους GABA_A που είναι διάλυτοι ιόντων Cl⁻ και τους GABA_B που είναι υποδοχείς GPCR συζευγμένοι με διαύλους K⁺ [29].

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω κατά τη διάρκεια του επιληπτικού επεισοδίου λαμβάνει χώρα μετατόπιση των υποδοχέων του GABA. Πέραν όμως των προσωρινών αλλαγών που προκαλεί το SE στη GABAεργική διαβίβαση, φαίνεται να υπάρχουν και μακροπρόθεσμες επιδράσεις στον ιππόκαμπο. Από διάφορα ζωικά μοντέλα γνωρίζουμε ότι σε επαναλαμβανόμενους σπασμούς υπάρχει ελάττωση της συνολικής ποσότητας GABA, ελαττωμένη συγκέντρωση αποκαρβοξυλάσης του γλουταμινικού οξέος (glutamic acid decarboxylase-GAD) που διαμεσολαβεί στην παραγωγή του GABA [40], και αύξηση στην πυκνότητα των θέσεων δέσμευσης των βενζοδιαζεπινών δηλαδή αλλαγή στη σύσταση των υπομονάδων του GABA_A υποδοχέα. Τα παραπάνω είναι βασικοί παράγοντες συνολικής ελάττωσης της αναστολής που χαρακτηρίζουν την επιληψία [39].

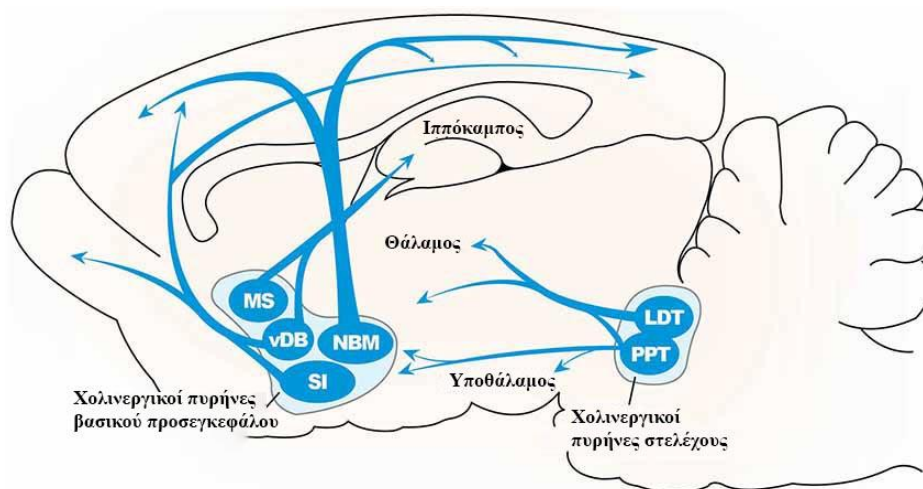
iii. Χολινεργική διαβίβαση

Το χολινεργικό σύστημα παίζει πολύ σημαντικό ρόλο σε ποικιλία φυσιολογικών λειτουργιών στο κεντρικό νευρικό σύστημα: ρυθμίζει τη νευρωνική διεγερσιμότητα και τη συναπτική μεταβίβαση και εμπλέκεται στην πλαστικότητα των συνάψεων του εγκεφάλου. Η ακετυλοχολίνη είναι ένας νευροδιαβιβαστής που είναι κυρίως γνωστός για τη συμμετοχή του στη σύζευξη διέγερσης-συστολής στη νευρομυική σύναψη. Στον εγκέφαλο όμως εμπλέκεται σε ανώτερες γνωστικές διαδικασίες καθώς και στον κύκλο ύπνου-εγρήγορσης, γι' αυτό και εκλεκτική εκφύλιση χολινεργικών νευρώνων συνδέεται με παθολογικές καταστάσεις όπως άνοιες και συμπεριφορικές διαταραχές [32,41].

Η ακετυλοχολίνη συντίθεται στο κυτταρόπλασμα χολινεργικών απολήξεων από τη χολίνη και το ακέτυλο-συνένζυμο Α με τη δράση του ενζύμου ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης (Choline acetyltransferase-ChAT). Οι κύριες πηγές χολινεργικής νεύρωσης του ιπποκάμπου είναι οι πυρήνες του βασικού προσεγκεφάλου (Εικόνα 10) [41]. Οι υποδοχείς ακετυλοχολίνης είναι: οι

μουσκαρινικοί, που είναι GPCR και οι νικοτινικοί, που είναι ιοντοτροπικοί δίαυλοι και ανευρίσκονται παντού στον εγκέφαλο. Η κύρια ομάδα υποδοχέων του ιπποκάμπου είναι οι M₁ μουσκαρινικοί υποδοχείς [42].

Σχετικά με την εμπλοκή της ακετυλοχολίνης στην επιληψία, είναι καλά εδραιωμένη γνώση ότι συστηματική χορήγηση χολινεργικών αγωνιστών καρβαχόλης ή πιλοκαρπίνης προκαλεί σπασμούς και από πολλές μελέτες προκύπτουν ενδείξεις δυσλειτουργικής χολινεργικής διαβίβασης στην επιληψία [41]. Βέβαια, ενώ η ενεργοποίηση των M₁ στους επίμυες προκαλεί σπασμούς, αντίθετα η ενεργοποίηση των νικοτινικών υποδοχέων ενισχύει την GABAεργική νευροδιαβίβαση και έχει αντιεπιληπτική δράση [43]. Επιπλέον, άλλες μελέτες δείχνουν σε επιληπτικές κρίσεις σε πειραματόζωα μακροπρόθεσμη αυξημένη σύνθεση της ChAT στον ιππόκαμπο [44] που αποδίδεται σε πιθανή εκβλάστηση (sprouting) χολινεργικών ινών [45] και άλλες ελάττωση της ChAT, αν και όχι πάντα μακροπρόθεσμα [40,46]. Μεμονωμένοι σπασμοί κατά την περίοδο του απογαλακτισμού (20^η ημέρα μετά τη γέννηση) σε επίμυες φαίνεται να οδηγούν σε μακροπρόθεσμη αύξηση της απαντητικότητας σε χολινεργικά ερεθίσματα [32]. Τέλος, ο Biagoni και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι το SE σε επίμυες οδηγεί σε απώλεια χολινεργικών νευρώνων στους πυρήνες του διαφράγματος, που προβάλλουν στον ιππόκαμπο (Εικόνα 10) [47].



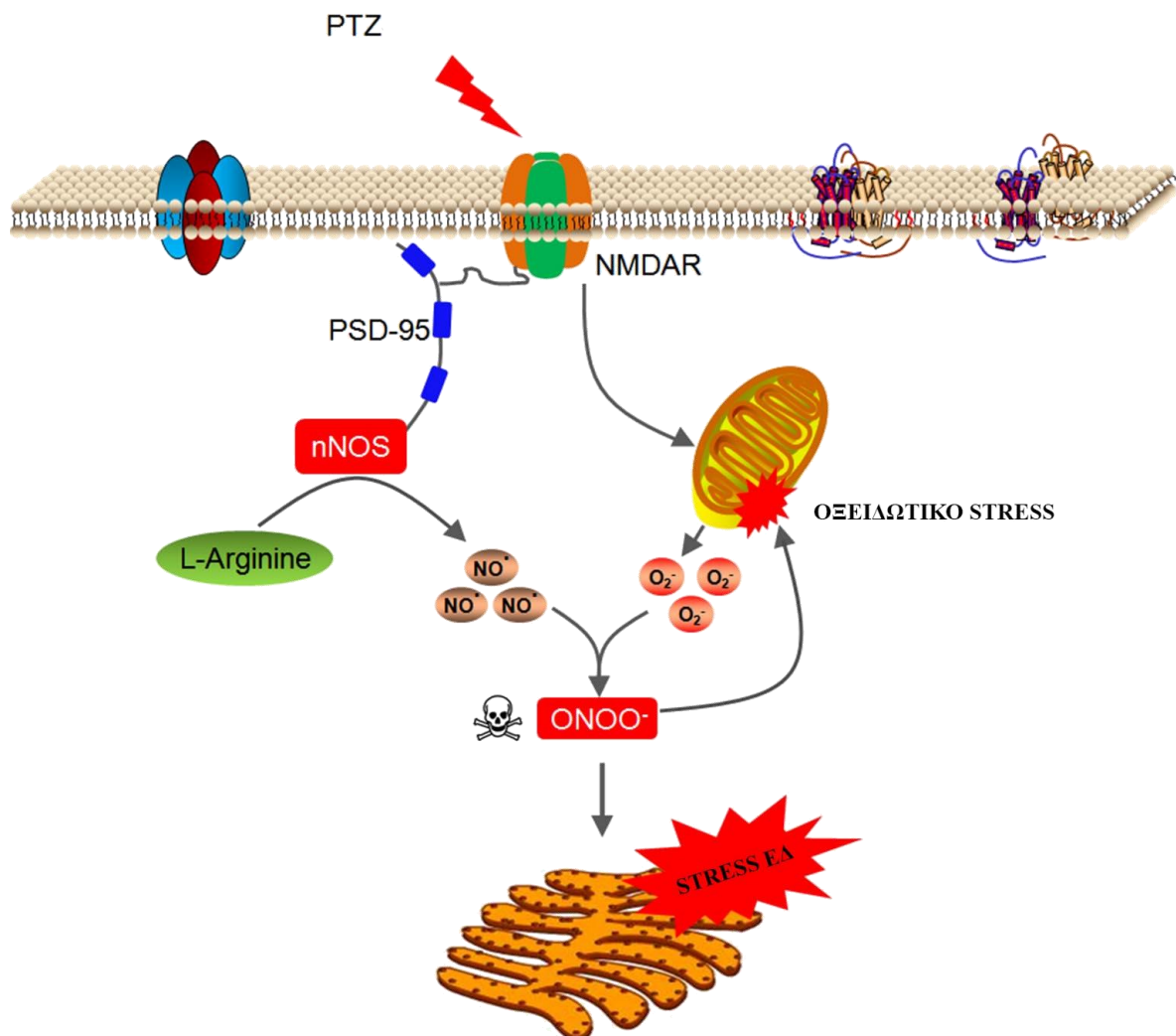
Εικόνα 10: Χολινεργικό σύστημα επίμυος. Πηγή: Saswati P et al, 2015 (τροποποιημένο).

iv. Διαβίβαση του Μονοξειδίου του αζώτου

Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) είναι ένα αέριο που στον οργανισμό δρα ως δεύτερος αγγελιαφόρος αλλά και ως νευροδιαβιβαστής/νευροτροποποιητής. Επηρεάζει διάφορες φυσιολογικές διεργασίες όπως: διανευρωνική επικοινωνία, συναπτική πλαστικότητα, μνήμη, ενδοκυττάρια μετάδοση σήματος και απελευθέρωση διαμεσολαβητών. Επιπλέον φαίνεται να

συμμετέχει άλλοτε νευροπροστατευτικά και άλλοτε νευροτοξικά σε παθολογικές καταστάσεις όπως ισχαιμία, εγκεφαλικό επεισόδιο κ.α. [48,49].

Στο ΚΝΣ, το NO, ανάλογα με τον κυτταρικό πληθυσμό παράγεται από τουλάχιστον 3 ισομορφές της συνθάσης του NO. Την ενδοθηλιακή (endothelial nitric oxide synthase-eNOS) στα ενδοθηλιακή κύτταρα που ρυθμίζει την αιματική ροή, την νευρωνική (neuronal nitric oxide synthase-nNOS) στους νευρώνες όπου παίζει τόσο φυσιολογικό όσο και παθοφυσιολογικό ρόλο με την παραγωγή NO ως διαλυτού δευτερεύοντος αγγελιαφόρου, και την επαγόμενη (inducible nitric oxide synthase-iNOS) που βρίσκεται στα μακροφάγα [50]. Η nNOS εκφράζεται κυρίως σε GABAεργικούς διανευρώνες [51] και παράγει, όπως και οι υπόλοιπες ισομορφές του ενζύμου, NO από τη μετατροπή της L-αργινίνης σε κιτρουλλίνη με τη συμμετοχή του NADPH. Η nNOS είναι συζευγμένη με υποδοχείς NMDA μέσω πρωτεΐνης αγκυροβόλησης (postsynaptic density protein 95-PSD-95) και η ενεργοποίηση της εξαρτάται από την είσοδο ασβεστίου μέσω του υποδοχέα αυτού (Εικόνα 11) [52].



Εικόνα 11: Μηχανισμός κυτταρικού stress μεσολαβούμενος από την nNOS. Πηγή: Zhu X. et al, 2017 (τροποποιημένο). PSD-95: postsynaptic density protein 95

Η λειτουργία του NO έχει συνδεθεί με το οξειδωτικό stress καθώς σε συνδυασμό με δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS) δημιουργεί υπεροξυνιτρικές ρίζες [53]. Καθώς λοιπόν όλο και περισσότερα δεδομένα υποδεικνύουν το σημαντικό ρόλο του οξειδωτικού στρες και βλάβης στην παθοφυσιολογία των επιληπτικών κρίσεων, η αλληλεπίδραση του NO με τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται κατά τους σπασμούς μπορεί να έχει επιπτώσεις στην έκβαση τους και να προκαλέσει νευρωνική βλάβη σε συνεργασία με άλλα ROS (Εικόνα 11). Πράγματι μελέτες δείχνουν ότι η διεγερτοτοξικότητα και η νευροεκφύλιση στις επιληπτικές κρίσεις φαίνεται να διαμεσολαβείται από οξειδωτικό stress και stress ενδοπλασματικού δικτύου όπως φαίνεται και από το γεγονός ότι αναστολή της nNOS έχει αντιοξειδωτική δράση και προλαμβάνει τη νευροτοξικότητα [52,54].

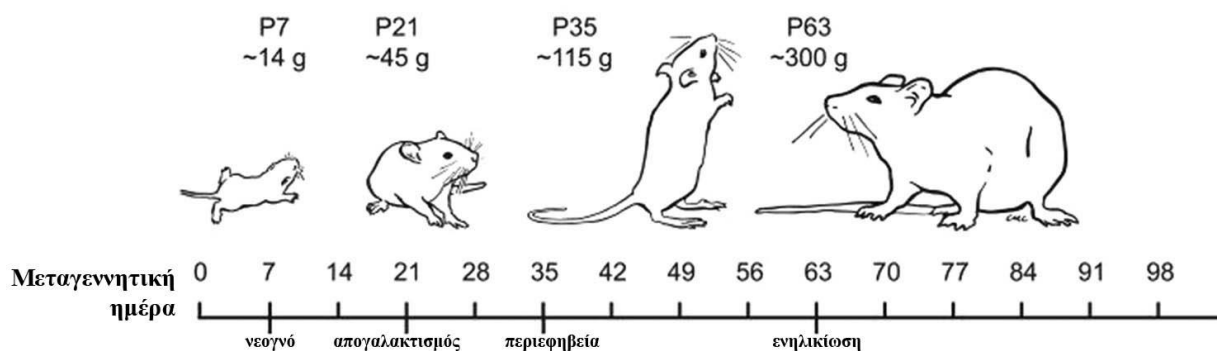
Ο ρόλος του NO στην επιληψία είναι αμφιλεγόμενος καθώς μελέτες δείχνουν ότι το αέριο αυτό μπορεί άλλοτε να προκαλεί και άλλοτε να αναστέλλει τους σπασμούς [50]. Αναφορικά με το ρόλο της nNOS είναι γνωστό ότι επαναλαμβανόμενοι σπασμοί σε νεαρή ηλικία οδηγούν σε αυξημένα επίπεδα nNOS στον ιππόκαμπο μέσω διαμεσολάβησης των υποδοχέων NMDA, καθώς όπως ειπώθηκε η ενεργοποίηση του ενζύμου απαιτεί τη μεσολάβηση των υποδοχέων αυτών [52,55].

1.5.5. Επίδραση της ηλικίας στις μεταβολές που προκαλούνται στον εγκέφαλο κατά το SE

Κατά την ανάπτυξη του εγκεφάλου στους επίμυες η πρώτη μεταγεννητική εβδομάδα συνήθως συγκρίνεται με εκείνη ενός τελειόμηνου ανθρώπινου εμβρύου, η δεύτερη εβδομάδα αντιστοιχεί στους πρώτους 6 μήνες της ζωής του ανθρώπου ενώ η τρίτη εβδομάδα αντιστοιχεί στις ηλικίες 6 μηνών έως 6 ετών (Πίνακας 2, Εικόνα 12) [23]

Πίνακας 2: Αντιστοιχία σταδίων ανάπτυξης επίμυος και ανθρώπου [10].

Στάδια ανάπτυξης ανθρώπου	Στάδια ανάπτυξης επίμυος
Τελειόμηνο νεογνό	P8-10
Βρέφος/νήπιο	P12-18
Προεφηβεία	P25-32
Έναρξη εφηβείας	P32-38
Ενήλικας	>P60



Εικόνα 12: Ορόσημα ανάπτυξης του επίμοις. Πηγή: Sengurta P, 2013 (τροποποιημένο).
P=μεταγεννητική ημέρα (postnatal day)

Υπάρχει μεγάλη διαφορά στη συχνότητα και την επίπτωση των σπασμών στον εγκέφαλο και τη συμπεριφορά σε σχέση με την ηλικία εμφάνισης τους. Είναι γνωστό ότι τους πρώτους μήνες της ζωής τα παιδιά παρουσιάζουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης σπασμών σε σύγκριση με τους ενήλικες, λόγω ιδιαιτεροτήτων του ανώριμου εγκεφάλου όπως:

1. Οι ανώριμοι νευρώνες έχουν την τάση ταλάντωσης λόγω της μεγάλης τους αντίστασης (input resistance) που βοηθάει τη δημιουργία δυναμικών ενεργείας και αυξάνει τη διεγερσιμότητα τους
2. Υπάρχει παράδοση διεγερτική λειτουργία των GABA_A υποδοχέων μέχρι την PND 14 στους επίμοις αλλά και σε αντίστοιχες ηλικίες στους ανθρώπους, λόγω της καθυστερημένης έκφρασης του συμμεταφορέα K⁺/Cl⁻ (KCC2) που οδηγεί σε υπερσυσσώρευση Cl⁻ ενδοκυττάρια
3. Υπάρχει καθυστερημένη ωρίμανση της διαδικασίας αναστολής μέσω των GABA_B υποδοχέων
4. Οι νευρώνες στην ανώριμη ηλικία παρουσιάζουν χαμηλότερο κατώφλι εμφάνισης σπασμών γενικότερα [56].

Όμως, ενώ η θνητότητα του SE στους ενήλικες φτάνει το 30% [13], στα παιδιά κυμαίνεται μεταξύ 2.7% και 5.2% [27]. Έτσι, από τη μία το κατώφλι εμφάνισης σπασμών είναι χαμηλότερο στον ανώριμο εγκέφαλο σε σχέση με τον ενήλικο από την άλλη όμως τα νεαρά ζώα είναι πιο ανθεκτικά στην τοξική επίδραση του γλουταμινικού οξέως, στην κυτταρική απώλεια και στην εκβλάστηση των νευρώνων στον ιππόκαμπο μετά από παρατεταμένους σπασμούς συγκριτικά με τα ώριμα ζώα [22].

Τα χαρακτηριστικά του ανώριμου εγκεφάλου που τον καθιστούν λιγότερο ευπαθή στους σπασμούς είναι:

1. Μικρότερη πυκνότητα συνάψεων
2. Μικρότερη κατανάλωση ενέργειας
3. Ανωριμότητα βιοχημικών και σηματοδοτικών μονοπατιών

4. Υψηλή συγκέντρωση εγκεφαλικού νευροτροφικού παράγοντα (brain derived neurotrophic factor-BDNF)
5. Μειωμένη έκκριση φλεγμονωδών κυτταροκινών
6. Καλύτερη διατήρηση της σύνθεσης του GABA κατά το SE
7. Μιτοχονδριακή αποσύνδεση. Στους ενήλικες οι μεταβολικές απαιτήσεις των νευρώνων οδηγούν τα μιτοχόνδρια σε υπερβολικό φόρτο εργασίας και παραγωγή ROS. Ο ανώριμος οργανισμός από την άλλη καταναλώνει δίαιτα πλούσια σε λιπαρά που επάγει την έκφραση της uncoupling protein 2 (UCP2) που προφυλάσσει το κύτταρο από τη συσσώρευση ROS και τον νευρωνικό θάνατο [56]

Οι λειτουργικές επιπτώσεις του SE εξαρτώνται επίσης από την ηλικία. Μελέτες έχουν δείξει ότι μετά από σπασμούς τα ανώριμα ζώα έχουν λιγότερα ελλείμματα στη μνήμη, μάθηση και συμπεριφορά σε σχέση με τα ενήλικα [22]. Επιπλέον η επαγόμενη από τους σπασμούς τροποποίηση των νευρωνικών κυκλωμάτων, όπως εκφράζεται μέσα από ελάττωση στα συνολικά επίπεδα των νευροϊνιδίων και την εκβλάστηση βρυωδών ινών, φαίνεται να είναι εμφανώς μικρότερη στον ανώριμο εγκέφαλο [57]. Αξίζει να σημειωθεί ότι η νευρωνική απώλεια δεν είναι αναγκαία συνθήκη επιληπτογένεσης στον ανώριμο εγκέφαλο και αυθόρμητη εμφάνιση σπασμών μπορεί να συμβεί μετά από νεογνικούς σπασμούς απουσία αξιολογού νευρωνικού θανάτου. Συνεπώς επιληπτογόνες προσβολές νωρίς στη ζωή ενώ δεν προκαλούν απαραίτητα απώλεια νευρικών κυττάρων μπορεί να αλλάζουν το ρεπερτόριο έκφρασης γονιδίων και το λειτουργικό φαινότυπο των νευρώνων και να οδηγήσουν έτσι σε μακροπρόθεσμες μεταβολές και επιληπτογένεση [20].

Παρόλαυτα, η ανθεκτικότητα του ανώριμου εγκεφάλου του επίμυος στη βλαπτική επίδραση των σπασμών, ιδιαίτερα σε δομές του μεταιχμιακού συστήματος, φαίνεται να υποχωρεί μετά την 21^η ημέρα μετά τη γέννα (PND21) που συμπίπτει με την περίοδο του απογαλακτισμού (Εικόνα 12) [17,58]. Σε μοντέλο σπασμών με λίθιο-πυλοκαρπίνη η απώλεια νευρώνων στην πολύμορφη στιβάδα της οδοντωτής έλικας (hilus) είναι ελάχιστη την P15, κορυφώθηκε την P21 και παρέμεινε ψηλά την P28 και στα ενήλικα ζώα όπως φάνηκε ιστολογικά αλλά και με την αύξηση των επιπέδων της ειδικής νευρωνικής ενολάσης (neuron-specific enolase-NSE) [59].

Σημαντικό ρόλο στη σταδιακή υποχώρηση της ανθεκτικότητας στους σπασμούς από την βρεφική προς την παιδική ηλικία παίζει η διαφορά στο μεταβολικό ρυθμό μεταξύ νεογνών-βρεφών και παιδιών. Τα νεογνά και τα βρέφη σε αρκετά θηλαστικά μεταξύ των οποίων και ο άνθρωπος έχουν χαμηλότερο βασικό μεταβολικό ρυθμό από τον ενήλικα, ενώ αντίθετα τα παιδιά έχουν υψηλότερο από εκείνον του ενήλικα. Δεν είναι όμως ο βασικός μεταβολισμός που καθορίζει τη βλάβη του εγκεφάλου αλλά ο επαγόμενος από τις κρίσεις αυξημένος μεταβολικός ρυθμός στους νευρώνες. Στην περίπτωση των νεογνών η ποσοστιαία αύξηση του μεταβολικού ρυθμού κατά την

επιληπτική κρίση είναι χαμηλότερη από των ενηλίκων ενώ στα παιδιά είναι ίδια ή και μεγαλύτερη. Τα ζώα παιδικής ηλικίας έχουν επιπλέον μεγαλύτερο αριθμό συνάψεων και εμφανίζουν υπερέκφραση υποδοχέων που συμμετέχουν στη διεγερτοτοξικότητα σε σχέση με τα ενήλικα [59].

Συνεπώς, με κριτήριο την ευαισθησία στο SE, φαίνεται ότι υπάρχουν 3 διακριτές περιόδους ανάπτυξης του επίμυος (P1-20 ή νεογνική/βρεφική, P20-30 ή παιδική, P31-90 ή εφηβική/ενήλικη). Η P20-P30 συγκεκριμένα, η περίοδος δηλαδή μετά τον απογαλακτισμό, είναι κρίσιμη στην ανάπτυξη του ιπποκάμπου του επίμυος, με τους σπασμούς σε αυτήν την ηλικία να επηρεάζουν αναπτυξιακές διαδικασίες που σχετίζονται με την δραστηριότητα των νευρώνων και συμβάλουν στις μακροπρόθεσμες δομικές και λειτουργικές αλλαγές του ιπποκάμπου όπως είναι η απώλεια της ικανότητάς του για πλαστικότητα [60]. Είναι σημαντικό λοιπόν για την μελέτη των επιπτώσεων του SE στον εγκέφαλο ή τη συμπεριφορά να διαχωριστούν μεταξύ τους οι περιόδους αυτές [59].

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

2.1. Ζώα

Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 16 επίμυες Sprague-Dawley (9 αρσενικοί και 7 θηλυκοί) βάρους 81-202 g. Τα ζώα στεγάζονταν στις εγκαταστάσεις του εκτροφείου του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Όλα τα ζώα διαβιούσαν στο μέγιστο 3 ανά πλαστικό κλωβό και ο διαχωρισμός των απογόνων από τη μητέρα και σε αρσενικά/θηλυκά γινόταν την 24^η ημέρα μετά τη γέννηση. Είχαν ελεύθερη και συνεχή πρόσβαση σε νερό και τροφή ενώ οι συνθήκες διατηρούνταν σταθερές, με θερμοκρασία να κυμαίνεται στους 21 ± 2 °C και ο κύκλος φωτός/σκότους να είναι σταθερός στις 12 ώρες φωτός (από 8π.μ. μέχρι 8μ.μ)/12 ώρες σκότους (από 8 μ.μ έως 8 π.μ.). Η φροντίδα και όλοι οι πειραματικοί χειρισμοί έγιναν σύμφωνα με τις οδηγίες του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου 22ας Σεπτεμβρίου 2010 περί προστασίας ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς (2010/63/EE).

Σε όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής των πειραμάτων καταβλήθηκε η μέγιστη δυνατή προσπάθεια προς ελαχιστοποίηση της ταλαιπωρίας και του αριθμού των ζώων που χρησιμοποιήθηκαν.

2.2. Μοντέλο επιληψίας με πεντυλενετετραζόλη

Τα ζωικά μοντέλα σπασμών αποτελούν το θεμέλιο της έρευνας για την κατανόηση της επιληψίας και η αξία τους έγκειται στην ομοιότητά των μοντέλων αυτών με τους σπασμούς στον άνθρωπο, αντίθετα με ζωικά μοντέλα για άλλες παθήσεις του κεντρικού νευρικού συστήματος που έχουν χαμηλή προγνωστική αξία. Ένα από τα πιο διάσημα φαρμακευτικά μοντέλα σπασμών είναι το μοντέλο με πεντυλενετετραζόλη (pentylenetetrazole-PTZ). Η PTZ συντέθηκε για πρώτη φορά το 1924 και χρησιμοποιήθηκε πειραματικά σε μελέτες της αντιεπιληπτικής δραστηριότητας διαφόρων φαρμάκων [61]. Από φαρμακολογικής άποψης, είναι ανταγωνιστής του GABA_A υποδοχέα τον οποίο αποκλείει με συναγωνιστικό ανταγωνισμό στη θέση σύνδεσης της πικροτοξίνης [62]. Τα πλεονεκτήματα του μοντέλου σπασμών με PTZ είναι ότι ασκεί τη δράση του σχετικά γρήγορα και ότι η νευροεκφύλιση, αν υπάρχει, εμφανίζεται με καθυστέρηση συγκριτικά με άλλα μοντέλα [63].

Από τα 16 ζώα στα 8 εφαρμόστηκε το μοντέλο επιληψίας που περιγράφεται παρακάτω και τα υπόλοιπα 8 χρησιμοποιήθηκαν ως υγιείς μάρτυρες (control). Η διαδικασία που περιγράφεται έγινε στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

2.2.1. Πρόκληση επιληπτικών κρίσεων

Η πρόκληση των επιληπτικών κρίσεων έγινε με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση διαλύματος PTZ (Sigma Chemical Co) σε 0.9% NaCl σε νεαρούς επίμους ηλικίας 21 ημερών (PND21). Η πρώτη χορηγούμενη δόση ήταν 70 mg/kg. Μετά την έγχυση του φαρμάκου, ακολουθούσε διάστημα παρατήρησης μισής ώρας (30 min) και στην περίπτωση που το ζώο δεν εμφάνιζε συμπεριφορικά χαρακτηριστικά που αντιστοιχούσαν σε κρίση σταδίου > 5 (Πίνακας 1), ακολούθησε επιπλέον χορήγηση 10 mg/Kg PTZ (συνολική δόση PTZ 80 mg/Kg) και παρατήρηση της συμπεριφοράς του ζώου για διάστημα τουλάχιστον 4 ωρών. Όλα τα ζώα που μελετήθηκαν παρουσίασαν συμπεριφορικά χαρακτηριστικά κρίσεων σταδίου > 5 και όταν είχαν συνέρχονταν πλήρως, επιστρέφονταν στο κλουβί τους μέχρι την ημέρα θυσίας τους σε ηλικία 42-55 ημερών (PND 42-55)

Πίνακας 3: Νέα κλίμακα αξιολόγησης επιληπτικών κρίσεων

Στάδιο	Συμπεριφορικά Χαρακτηριστικά Επιληπτικής Κρίσης
0	Ελαφρύ τρέμουλο σε όλο το σώμα.
1	Ξαφνική απώλεια οποιασδήποτε συμπεριφοράς και/ή επίμονο βλέμμα.
2	Συσπάσεις προσώπου, συμπεριλαμβανομένης της μουσούδας ή της μουσούδας και των ματιών.
3	Ρυθμικό κούνημα κεφαλιού.
4	Ανύψωση και εμφάνιση σπασμών στα πρόσθια άκρα που μπορεί να εκτείνονται στο ένα (unilateral) ή και στα δύο άκρα (bilateral). Σε ορισμένες περιπτώσεις, παρατηρείται εναλλαγή αυτών των δύο συμπεριφορών.
5	Κλονική κρίση σε καθιστή θέση.
6	Κλονική και/ή τονικοκλονική κρίση ενώ το ζώο είναι ξαπλωμένο στην κοιλιά του ή στο πλάι.
7	Τονικοκλονικές κρίσεις συνοδευόμενες από απότομο άλμα και/ή ξαφνική ορμή και/ή κραυγές.
8	Έντονες, επαναλαμβανόμενες τονικές κρίσεις οι οποίες συχνά οδηγούν σε θάνατο.

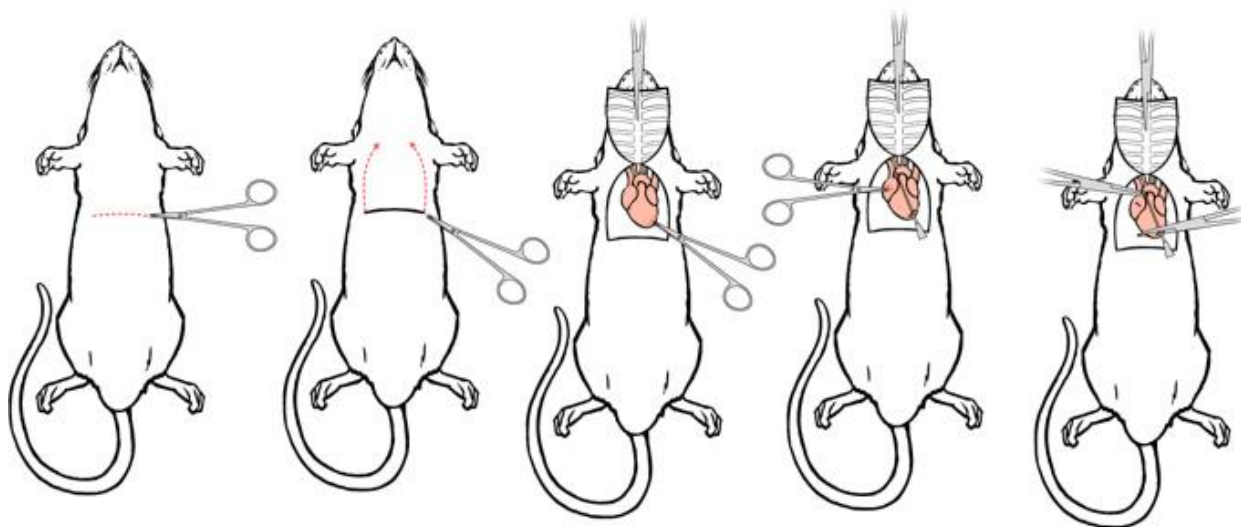
2.3. Λήψη ιστών

2.3.1. Μονιμοποίηση ιστού

Για τη διατήρηση και σταθεροποίηση των περιεχομένων του κυττάρου, την αποφυγή της αυτόλυσης και τη διευκόλυνση των χρώσεων και του ανοσοφθορισμού ήταν απαραίτητη η μονιμοποίηση (fixation) των ιστών με ενδοκαρδιακή χορήγηση παραφορμαλδεΐδης (Paraformaldehyde-PFA).

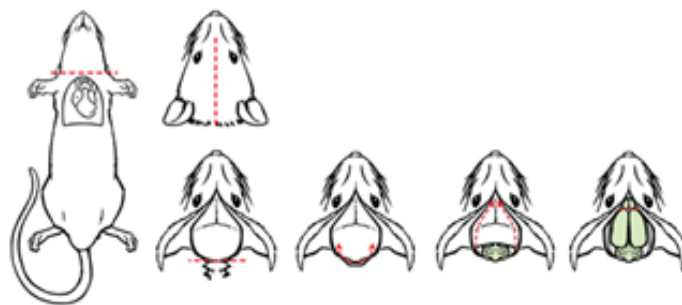
Τέσσερα ζώα που είχαν εμφανίσει κρίσεις σταδίου >5 μετά τη χορήγηση PTZ κατά την PND21 (όπως περιγράφεται στην Ενότητα 2.2), όπως και τέσσερα ζώα που δεν είχαν εκτεθεί σε PTZ (ομάδα ελέγχου-control) θυσιάστηκαν σε ηλικία PND52–PND55. Το κάθε ζώο αναισθητοποιήθηκε αρχικά με αιθέρα και στη συνέχεια με 20mg κεταμίνης ενδομυϊκά και 40mg προποφόλης ενδοπεριτοναϊκά. Η επιτυχής αναισθησία του ζώου ελέγχθηκε με την απόσυρση του πέλματος ως απάντηση σε πίεση αυτού. Έπειτα το ζώο ζυγίστηκε και μεταφέρθηκε σε απαγωγό.

Για την παρασκευή της καρδιάς έγινε τομή στο ύψος του διαφράγματος και αναδίπλωση του πρόσθιου θωρακικού τοιχώματος μέσω της ξιφοειδούς απόφυσης (Εικόνα 13). Στη συνέχεια τοποθετήθηκε στην αριστερή κοιλία βελόνα 19 Gauge, με οδηγό σημείο την κορυφή της καρδιάς και σταθεροποιήθηκε στη θέση αυτή με τη βοήθεια μιας λαβίδας Kocher. Τέλος έγινε μια μικρή τομή στο δεξιό κόλπο για παροχέτευση των διαλυμάτων. Η παροχή και απομάκρυνση των υγρών έγινε με τη βοήθεια περισταλτικής αντλίας (Gilson MINIPLUS 3), με ρυθμό 48 στροφές ανά λεπτό.



Εικόνα 13: Παρασκευή της καρδιάς και τοποθέτηση βελόνας. Ανατύπωση από: Gage GJ et al, 2012

Κάθε ζώο διαποτίστηκε αρχικά με διάλυμα 0.9 % NaCl για 10 min (μέχρι να παρατηρηθεί έξοδος καθαρού ορού από τη δεξιά κοιλία και αποχρωματισμός των πνευμόνων) και στη συνέχεια για 15-20 min με 4% PFA w/v σε Phosphate Buffer (PB) σύστασης 0.2 M NaH_2PO_4 και 0.2 M K_2PO_4 . Μετά τη διαπότιση με PFA ακολούθησε αποκεφαλισμός του ζώου, κρανιοτομή με οδηγό σημείο το λάμδα του κρανίου (Εικόνα 14) και λήψη ολόκληρου του εγκεφάλου.



Εικόνα 14: Κρανιοτομή και λήψη του εγκεφάλου. Ανατύπωση από: Gage GJ et al 2012

Ο κάθε εγκέφαλος τοποθετήθηκε σε διάλυμα σουκρόζης 30% w/v σε πλάγια θέση στους 4 °C μέχρι τη εμβύθυνση του ιστού (24-48 ώρες). Έπειτα πραγματοποιήθηκε ταχεία ψύξη του ιστού με διάλυμα ισοπεντανίου θερμοκρασίας -45 °C για 1 min και φύλαξη στους -80 °C μέχρι τη λήψη των τομών.

2.3.2. Ζελατινοποίηση αντικειμενοφόρων πλακών

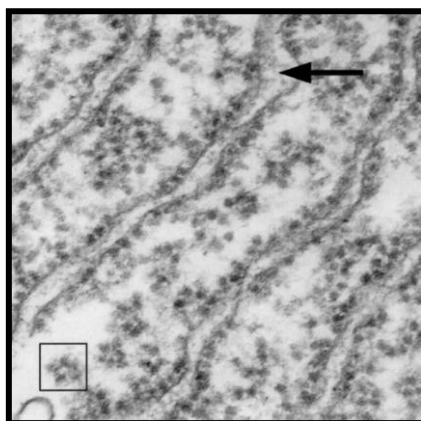
Για τη συλλογή των τομών ήταν απαραίτητη η ζελατινοποίηση των αντικειμενοφόρων πλακών. Παρασκευάστηκε υδατικό διάλυμα με 0.5% w/v ζελατίνης (300 Bloom) σε θερμοκρασία 45 °C. Σε αυτό προστέθηκε $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2$ σε τελική συγκέντρωση 0.05% w/v που φορτίζει θετικά τις πλάκες ώστε να έλκουν αρνητικά φορτισμένα σωματίδια και στη συνέχεια το διάλυμα φίλτραρίστηκε και φυλάχτηκε στους 4 °C. Οι αντικειμενοφόροι πλάκες τοποθετήθηκαν σε μεταλλικά rack, καθαρίστηκαν με νερό και σαπούνι και ξεπλύθηκαν αρκετές φορές. Στη συνέχεια κάθε rack βυθίστηκε από 3 φορές στο διάλυμα ζελατίνης για ~5 sec. Τα υπολείμματα διαλύματος σκουπίστηκαν από τα rack και αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για 48 ώρες. Αφότου στέγνωσαν οι αντικειμενοφόροι τοποθετήθηκαν εκ νέου στο κουτί τους και παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την τελική χρήση τους.

2.3.3. Δημιουργία τομών

Ο ιστός καλύφθηκε περιμετρικά με Cryostat Matrix για την υποστήριξη και προστασία αυτού και ελήφθησαν τομές πάχους 10 μm στους -20 °C σε κρυτόμο (Leica CM1850).

2.4. Χρώση Cresyl Violet

Για την παρατήρηση νευροπαθολογοανατομικών αλλαγών έγινε χρώση των τομών με Cresyl Violet. Η χρωστική αυτή ανήκει στην ευρύτερη κατηγορία των χρώσεων που στοχεύουν την ουσία Nissl η οποία είναι ένας συνδυασμός στιβάδων αδρού ενδοπλασματικού δικτύου με ενδιάμεσες ροζέτες ελεύθερων ριβοσωμάτων (Εικόνα 15). Η διάταξη αυτή είναι μόνο στους νευρώνες [64].



Εικόνα 15: Ουσία Nissl στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. (Ανατύπωση από Byrne J et al, 2014)

Η Cresyl Violet χρησιμοποιεί βασική ανιλίνη που χρωματίζει μπλε τα νουκλεϊκά οξέα με αποτέλεσμα η ουσία Nissl να αποκτά βαθύ μπλε χρώμα, γεγονός που δίνει μια διάστικτη εμφάνιση στο κυτταρόπλασμα. Το DNA του πυρήνα σημαίνεται με παρόμοιο χρώμα [65].

Αρχικά παρασκευάστηκε υδατικό διάλυμα χρωστικής Cresyl Violet 0.5% (w/v) και οξικού νατρίου (CH_3COONa) 0.2 M που τιτλοποιήθηκε σε pH 3.5-4.5 με προσθήκη οξικού οξέος (CH_3COOH). Το διάλυμα της Cresyl Violet στη συνέχεια διηθήθηκε. Οι αντικειμενοφόροι τοποθετήθηκαν σε rack και βυθίστηκαν σε διάλυμα αλκοόλης (EtOH)/οξικού οξέος (CH_3COOH)/χλωροφορμίου (CHCl_3) σε αναλογία 6:4:1 για 10 min προκειμένου να καθαρίσουν οι τομές, στη συνέχεια ξεπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό για 3 min και ακολούθησε η χρώση τους με το διάλυμα Cresyl Violet για 5 min. Οι τομές ξεπλύθηκαν από τη χρωστική για 2 min με απεσταγμένο νερό και ακολούθησε η αφυδάτωση και μονιμοποίηση των τομών με διαδοχικά αυξανόμενες συγκέντρωσης αλκοόλης και η εμφάνισή τους σε ξυλόλη (Xylol, Πίνακας 4).

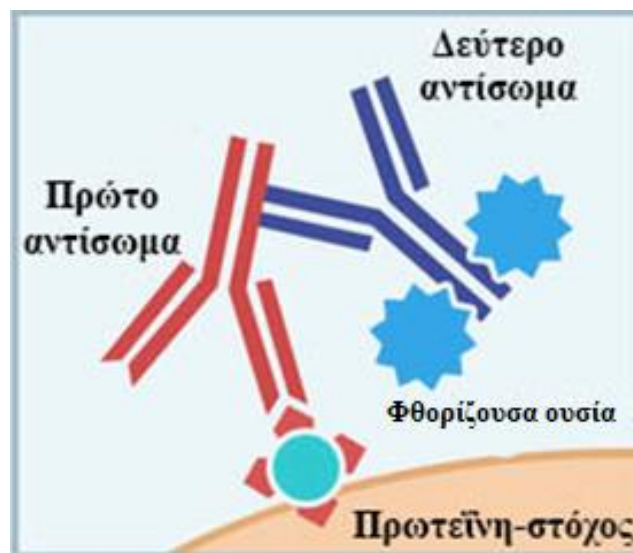
Πίνακας 4: Διαδικασία χρώσης με Cresyl Violet.

EtOH/ CHCl_3 / CH_3COOH (6:4:1)	10 min
H_2O	3 min
Cresyl Violet	5 min
H_2O	2 min
EtOH 50%	5 sec
EtOH 70%	5 sec
EtOH 95%	5 sec
EtOH 100%	5 sec
Xylol	Μέχρι την επικάλυψη

Μετά το τέλος της διαδικασίας έγινε επικάλυψη των τομών με καστορέλαιο και καλυπτρίδα η οποία σφραγίστηκε με διάφανο βερνίκι. Οι αντικειμενοφόροι τοποθετήθηκαν σε κασετίνα και φυλάχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Η παρατήρησή τους έγινε σε στερεοσκόπιο (Olympus SZ30) σε μεγέθυνση 4x και ελήφθησαν φωτογραφίες του ιπποκάμπου με ψηφιακή κάμερα (Xiaomi Inc, Beijing, China). Για την πιο λεπτομερή παρατήρηση των ιστών ελήφθησαν και φωτογραφίες των τομών με ψηφιακή κάμερα (Basler acA 1920-40uc, Basler AG, Ahrensburg, Germany) σε οπτικό μικροσκόπιο (Nikon eclipse 50i, Nikon Corporation, Tokyo, Japan) με μεγέθυνση 10x.

2.5. Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Στη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού γίνεται σήμανση των υπό διερεύνηση αντιγόνων σε τομές του ιστού με τη χρήση ειδικών για τα αντιγόνα αυτά αντισωμάτων. Εφόσον υπάρξει σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος αυτή σημαίνεται με ένα δεύτερο αντίσωμα (ειδικό για το πρώτο αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε) που φέρει φθορόχρωμα (Εικόνα 16).



Εικόνα 16: Αρχή λειτουργίας της μεθόδου του ανοσοφθορισμού.

Πηγή: <https://theory.labster.com/immunofluorescence-microscopy> (τροποποιημένο)

Αρχικά οι ιστοί πλύθηκαν δύο φορές για 10 min την κάθε φορά με διάλυμα 0.1 M Trizma Base Saline (TBS) σύστασης 0.1 M Trizma σε 0.9% NaCl, pH 7.4. Ακολούθησε επώαση των ιστών για 30 min με διάλυμα ορού 3.3 % v/v σε 0.1 M TBS. Ο ορός που επιλέχθηκε προέρχονταν από το ζώο στο οποίο έχουν παραχθεί τα δεύτερα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν, ώστε να περιοριστεί η μη ειδική δέσμευση. Ακολούθησε ξέπλυμα των τομών με 0.1 M TBS 3 φορές για 5 min την κάθε φορά.

Για το διάλυμα του πρώτου αντισώματος χρησιμοποιήθηκε ορός ζώου σε συγκέντρωση 0.5%, απορρυπαντικό Triton X-100 0.3% v/v που καθιστά διαπερατή την κυτταρική μεμβράνη του

κυττάρου διαλυμένα σε 0.1 M TBS. Οι τομές επώαστηκαν με το διάλυμα του αντισώματος για 16 ώρες (overnight) σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια ξεπλύθηκαν με διάλυμα 0.1 M TBS 3 φορές από 5 min την κάθε φορά.

Ακολούθησε η επώαση των τομών με το διάλυμα του δεύτερου αντισώματος για 1.5 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα έγιναν ξανά πλύσεις με διάλυμα 0.1M TBS 3 φορές από 5 min την κάθε φορά. Σε κάθε αντικειμενοφόρο προστέθηκε Vectashield mounting medium με DAPI που λειτουργεί ως υλικό επικάλυψης και παράλληλα σημαίνει τους πυρήνες των κυττάρων. Οι ιστοί καλύφθηκαν τέλος με καλυπτρίδα που σφραγίστηκε με διάφανο βερνίκι. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό πρωτεϊνών με ανοσοφθορισμό και οι συγκεντρώσεις τους φαίνονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στον έμμεσο ανοσοφθορισμό

1 ^ο Αντίσωμα	Αραίωση	2 ^ο Αντίσωμα	Αραίωση
Rabbit anti-GABA (Sigma AB131)	1:500	Goat anti-Rabbit (Cell Signaling 8889s)	1:1000
Rabbit anti-NeuN (Sigma MABN140)	1:400	Goat anti-Rabbit (Cell Signaling 8889s)	1:1000
Mouse anti-NF-L (Sigma MAB1615)	1:500	Donkey anti-Mouse (BIOTIUM 20115)	1:200
Mouse anti-nNOs (BD Biosciences 610308)	1:200	Goat anti-Mouse (Cell Signaling 8890s)	1:1000

Οι ιστοί παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού (Zeiss Axioskop 40, Carl Zeiss Inc, New York, USA) με μεγέθυνση 10x και φωτογραφήθηκαν με ψηφιακή κάμερα (Leica DFC 480, Leica Cameras, Solms, Germany). Σε κάθε τομή λήφθηκαν φωτογραφίες από τις περιοχές του υποκάμπου CA1, CA3 και οδοντωτή έλικα, με εξαίρεση τις φωτογραφίες από τον ανοσοφθορισμό με anti-nNOS όπου λήφθηκαν φωτογραφίες μόνον από την οδοντωτή έλικα, καθώς εκείνη περιέχει τη μεγαλύτερη πυκνότητα διανευρώνων που εκφράζουν nNOS ανάμεσα στις περιοχές του υποκάμπου [66].

2.6. Ανοσοαποτύπωση κηλίδας

2.6.1. Λήψη ιστών

Τέσσερα ζώα στα οποία είχε χορηγηθεί PTZ και ισάριθμοι υγιείς μάρτυρες ηλικίας 42-47 ημερών αναισθητοποιήθηκαν με αιθέρα και θυσιάστηκαν με αποκεφαλισμό σε λαιμητόμο. Έπειτα αφαιρέθηκε ο εγκέφαλος, έγινε οβελιαία τομή και παρασκευάστηκαν ο αριστερός και δεξιός υπόκαμπος που φυλάχθηκαν στους -80 °C.

2.6.2. Ομογενοποίηση των ιστών

Οι ιστοί τοποθετήθηκαν αρχικά σε erendorff με 500 µl διαλύματος λύσης κυττάρων (lysis buffer, Πίνακας 6).

Πίνακας 6: Διάλυμα λύσης κυττάρων (lysis buffer)

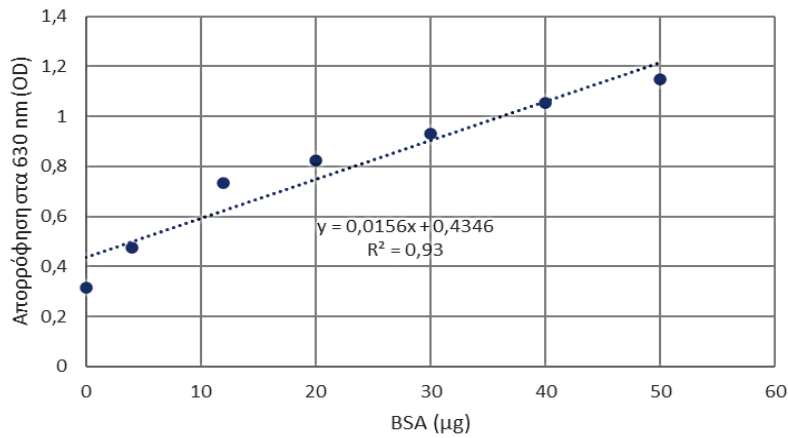
Ουσία	Τελική συγκέντρωση
Tris-Cl, pH 8.0	20 mM
NaCl	150 mM
Triton X-100	1%
PMSF	100 µg/ml
Dithiothreitol (DTT)	1 mM
Na ₃ VO ₄	1 mM
β-glycerolphosphate	10 mM

Στη συνέχεια ομογενοποιήθηκαν με μηχανικό ομογενοποιητή Reidolph Silent Crusher S. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 10000 στροφές (Heraeus Biofuge Fresco) για 5 min σε θερμοκρασία 4 °C και το υπερκείμενο φυλάχθηκε στους -20 °C μέχρι τη διεξαγωγή του πειράματος.

2.6.3. Μέτρηση συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Η μέθοδος Bradford είναι μία τεχνική που βασίζεται στις διαφορετικές αποχρώσεις της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue ανάλογα με τις συγκεντρώσεις πρωτεΐνης ενός δείγματος [67].

Αρχικά αναμίχθηκαν 5 µl από το υπερκείμενο του ομογενοποιηµατος (Ενότητα 2.6.2) με 50 µl χρωστικής Coomassie (BioRad) και 195 µl Tris 0.1 M. Ακολούθως τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε 96-well plate και φωτομετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο BIO-TEK στα 630 nm. Για τη μετατροπή των τιμών της φωτομέτρησης σε τιμές συγκέντρωσης πρωτεΐνης έγινε χάραξη πρότυπης καμπύλης με διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης λευκωματίνης ορού βώδης-Bovine Serum Albumin (BSA) διαλυµένης σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris 0.1 M και σχεδιάστηκε η πρότυπη καμπύλη (Διάγραμμα 1). Με βάση αυτήν υπολογίστηκε η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε ολική πρωτεΐνη.

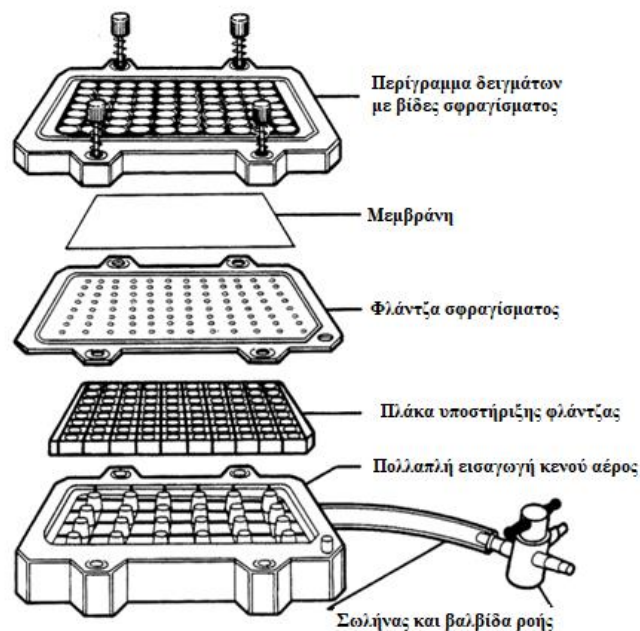


Διάγραμμα 1: Ενδεικτική πρότυπη καμπύλη για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών κατά Bradford στα δείγματα.

2.6.4. Προετοιμασία διαλυμάτων των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων

Για τη φόρτωση των δειγμάτων στη συσκευή ετοιμάστηκαν με βάση την πρότυπη καμπύλη από τη μέθοδο Bradford διαλύματα πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κάθε δείγμα σε συγκεντρώσεις 5 μg/100 μl και 10 μg/100 μl διαλυμένα σε TBS 0.1 M.

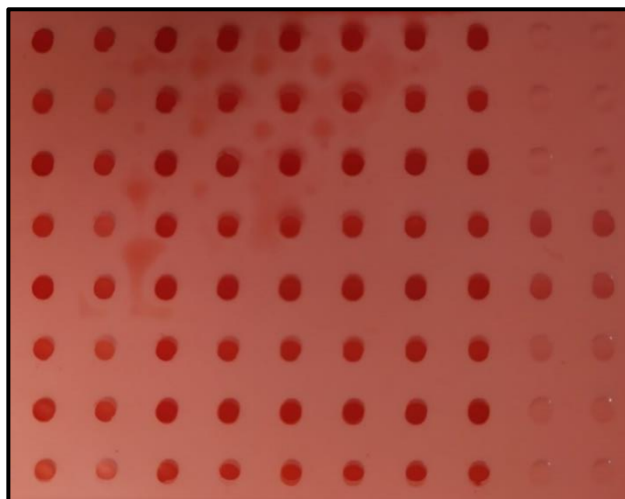
2.6.5. Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης



Εικόνα 17: Συναρμολόγηση συσκευής Bio-Dot.

Πηγή: <https://www.bio-rad.com/en-gr/product/bio-dot-bio-dot-sf-microfiltration-apparatus?ID=d986e28f-4a82-4c13-8ce1-3eae9bb4fdbb> (τροποποιημένο).

Αρχικά έγινε συναρμολόγηση της συσκευής Bio-Dot όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 17 και αυτή συνδέθηκε με πηγή κενού αέρα και με συσκευή παγίδευσης (waste trap set up). Η βαλβίδα της συσκευής επιτρέπει την έκθεση της μεμβράνης είτε στον αέρα είτε στο κενό. Ακολούθησε μια πρώτη ενυδάτωση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με την προσθήκη 100 μl TBS 0.1 M σε κάθε πηγαδάκι, το οποίο απομακρύνθηκε γυρίζοντας τη βαλβίδα στο κενό. Έπειτα, προστέθηκαν 100 μl από κάθε διάλυμα δείγματος (5 μg/100 μl και 10 μg/100 μl) τα οποία στη συνέχεια αφέθηκαν να προσροφηθούν στη μεμβράνη με την αντλία γυρισμένη στον αέρα. Μετά το πέρας της μεταφοράς των δειγμάτων η συσκευή αποσυναρμολογήθηκε και η μεμβράνη χρωματίστηκε προσωρινά με χρωστική Ponceau S 0.2%, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι η μεταφορά ήταν επιτυχής καθώς η συγκεκριμένη χρωστική χρωματίζει το σύνολο των πρωτεϊνών που έχουν μεταφερθεί στη μεμβράνη και επιτρέπει τον εντοπισμό των πρωτεϊνών πάνω σε αυτή (Εικόνα 18).



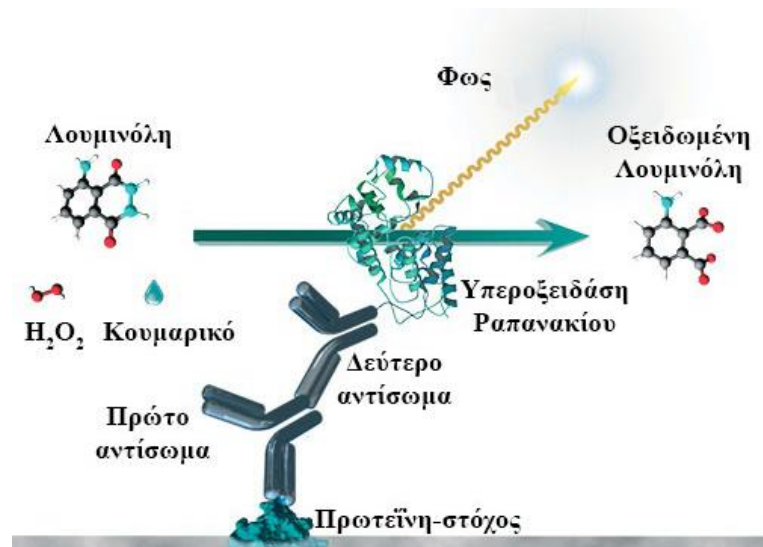
Εικόνα 18: Χρώση μεμβράνης με χρωστική Ponceau S 0.2%.

2.6.6. Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες που βρίσκονται καθηλωμένες στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης δρουν ως αντιγόνα και μπορούν να συνδεθούν με κατάλληλα αντισώματα, τα οποία είναι ειδικά για τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες. Η σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος μπορεί να ανιχνευτεί με την προσθήκη ενός δεύτερου αντισώματος, το οποίο είναι συζευγμένο με ένα ένζυμο δείκτη, την υπεροξειδάση ραπανακίου (horseradish peroxidase-HRP). Το ένζυμο αυτό αντιδρά με υποστρώματα (λουμινόλη και H_2O_2) που προστίθενται εξωγενώς παρουσία καταλύτη (κουμαρικό), και εκλύει φωταύγεια (Εικόνα 19).

Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με τις καθηλωμένες πρωτεΐνες, επώαστηκε για 1 ώρα σε διάλυμα 0.1 M TBS-0.05% Tween 20 που περιείχε 5% BSA για 1 ώρα και στη συνέχεια επώαστηκε για 20 λεπτά σε διάλυμα 0.1 M TBS-0.05% Tween 20, που περιείχε 5% γάλα σε σκόνη, προκειμένου να

κορεσθούν οι θέσεις δέσμευσης των πρωτεϊνών της μεμβράνης από τις πρωτεΐνες του ορού και του γάλακτος. Με την δέσμευση αυτή αποφεύγεται οποιαδήποτε μη ειδική σύνδεση του αντισώματος που προστίθεται στη μεμβράνη. Στη συνέχεια, έγιναν 2 πλύσεις της μεμβράνης με διάλυμα TBS-0.05% Tween 20, από 10 min, για να απομακρυνθεί η περίσσεια του διαλύματος κορεσμού.



Εικόνα 19: Μηχανισμός χημειοφωταύγειας. Πηγή: <https://www.covalab.com/products-covalight> (τροποποιημένο).

Η μεμβράνη επώαστηκε για 16 ώρες (overnight) στους 4°C με το πρώτο αντίσωμα (Πίνακας 9) και κατόπιν ακολούθησαν 3 διαδοχικές πλύσεις των 5 min η καθεμία με διάλυμα 0.1 M TBS-0.05% Tween 20, σε θερμοκρασία δωματίου, με συνεχή ανάδευση της μεμβράνης σε τραμπάλα. Οι πλύσεις έγιναν προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια του αντισώματος που δεν δεσμεύτηκε στη μεμβράνη. Στη συνέχεια, η μεμβράνη επώαστηκε με το δεύτερο αντίσωμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Το δεύτερο αντίσωμα όπως προαναφέρθηκε συνδέεται ειδικά με το πρώτο. Για να απομακρυνθεί η περίσσεια του δεύτερου αντισώματος ακολούθησε η πλύση της μεμβράνης με 0.1 M TBS-0.05% Tween 20 για 15 min έπειτα για 5 min και ακολούθως έγινε πλύση της με 0.1 M TBS για 5 min.

Το τελικό στάδιο της ανοσοαποτύπωσης των πρωτεϊνών είναι ο εντοπισμός των πρωτεϊνών πάνω στη μεμβράνη με χημειοφωταύγεια. Για το σκοπό αυτό η μεμβράνη επώαστηκε με διάλυμα 10 ml λουμινόλης (1.25 mM σε 0.1M Tris-HCl pH 8,5), που περιείχε 10 μl 3% H₂O₂ και 100 μl κουμαρικού οξέος (6.8 mM σε DMSO), για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.

Ακολούθησε εμφάνιση της μεμβράνης σε UV Imager (Uvitec Cambridge) όπου αποτυπώθηκε το φως που εκλύθηκε από την αντίδραση φωταύγειας που πραγματοποιήθηκε.

Για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων είναι απαραίτητη η σύγκριση τους με μια γνωστή (housekeeping) πρωτεΐνη όπως είναι η β-ακτίνη ή η τουμπουλίνη. Για το σκοπό αυτό μετά την

εμφάνιση της η μεμβράνη επώαστηκε αρχικά σε διάλυμα Stripping Buffer (1.5% w/v glycine-1% w/v-SDS-1% w/v Tween 20-HCl pH 2.2) για 1 ώρα ώστε να απομακρυνθούν τα συνδεδεμένα αντισώματα. Ακολούθως έγιναν 2 πλύσεις των 10 min με 0.1 M TBS-0.05% Tween 20 και στη συνέχεια ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με την προηγούμενη ημέρα αλλά αυτή τη φορά με επώαση της μεμβράνης με αντίσωμα έναντι της β-ακτίνης. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση και οι συγκεντρώσεις τους φαίνονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανοσοαποτύπωση κηλίδας.

1 ^ο Αντίσωμα	Αραίωση	2 ^ο Αντίσωμα	Αραίωση
Mouse anti-β-actin (Sigma A5316)	1:1000	Anti-mouse IgG, HRP-linked (Cell Signaling 7076)	1:2000
Rabbit anti-NeuN (Sigma MABN140)	1:1000	Anti-rabbit IgG, HRP-linked (Cell Signaling 7074)	1:2000
Mouse anti-NF-L (Sigma MAB1615)	1:1000	Anti-mouse IgG, HRP-linked (Cell Signaling 7076)	1:2000
Mouse anti-nNOs (BD Biosciences 610308)	1:2500	Anti-mouse IgG, HRP-linked (Cell Signaling 7076)	1:2000

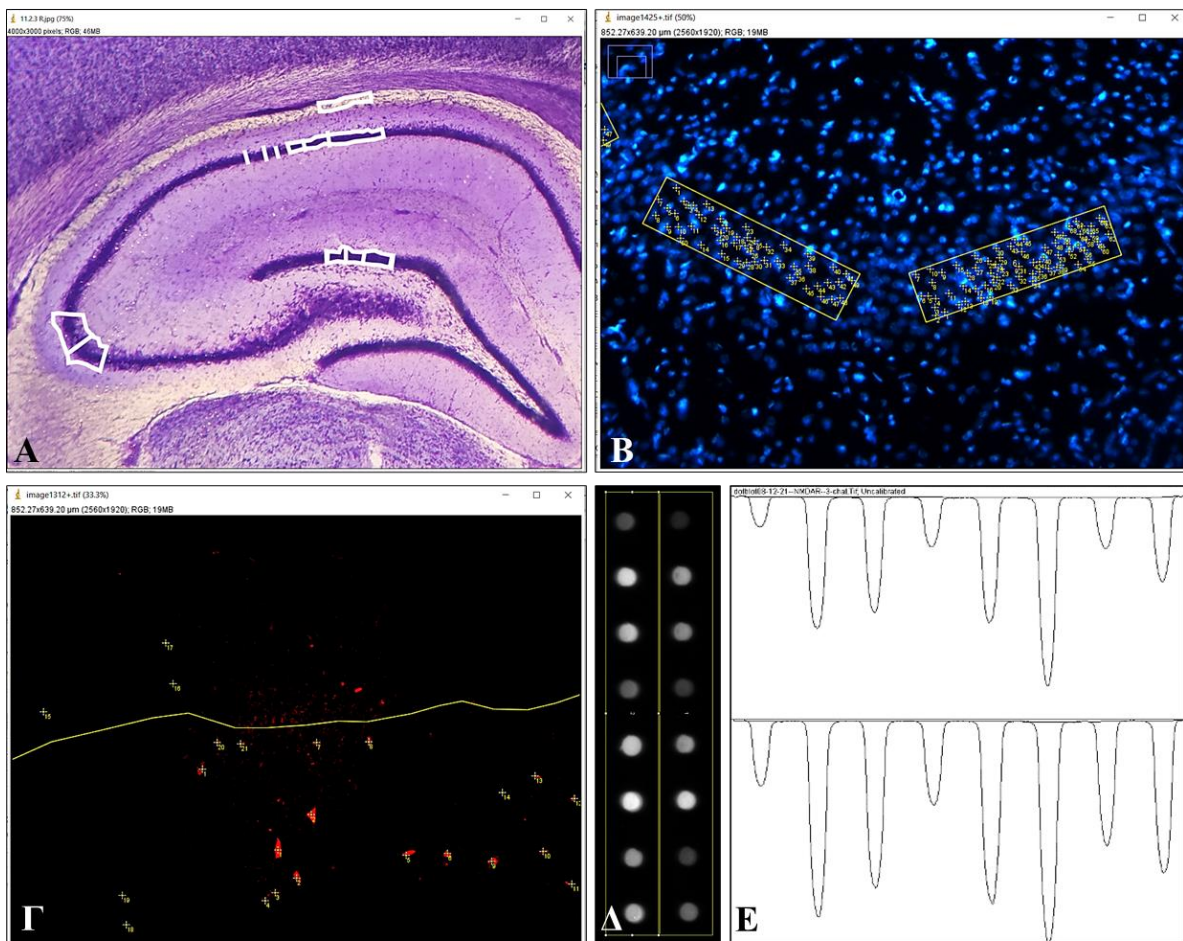
2.7. Ανάλυση εικόνας με ImageJ

Οι εικόνες που προέκυψαν από τη χρώση Cresyl Violet, τον ανοσοφθορισμό και την ανοσοαποτύπωση κηλίδας αναλύθηκαν με το πρόγραμμα ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) Αρχικά, στις φωτογραφίες από τη χρώση Cresyl Violet υπολογίστηκε το πάχος και η ένταση του σήματος των πυραμιδικών στιβάδων των CA1, CA3 περιοχών του ιπποκάμπου και της στιβάδας των κοκκιωδών κυττάρων της οδοντωτής έλικας.

- Για το μεν πάχος υπολογίστηκε ο μέσος όρος κάθετων μετρήσεων κατά μήκος των εν λόγω στιβάδων σε εικονοστοιχεία (pixel) μέσω αναγωγής τους με γνωστή κλίμακα σε μm (Εικόνα 20A).
- Για τον υπολογισμό της έντασης του σήματος υπολογίστηκε ο μέσος όρος των τιμών (mean gray value 0-255) μέσα σε ένα πλαίσιο στις ίδιες στιβάδες, μετά από αφαίρεση της αντίστοιχης τιμής από την σκάφη του ιπποκάμπου ως σήμα υποβάθρου (background, Εικόνα 20A).
- Στις φωτογραφίες από τη χρώση DAPI και τον ανοσοφθορισμό με anti-NeuN υπολογίστηκε ο αριθμός των κυττάρων μέσω του εργαλείου πολλαπλών σημείων, μέσα σε πλαίσιο σταθερού πλάτους που τοποθετούνταν στις προαναφερθείσες στιβάδες και το αποτέλεσμα εκφράστηκε ως αριθμός κυττάρων προς το εμβαδό του πλαισίου (Εικόνα 20B).
- Στις φωτογραφίες από τον ανοσοφθορισμό με anti-GABA έγινε χρήση του εργαλείου πολλαπλών σημείων σε όλες τις στιβάδες των CA1, CA3 και οδοντωτής έλικας και το

αποτέλεσμα εκφράστηκε ως λόγος του αριθμού προς το μήκος της πυραμιδικής στιβάδας των CA1, CA3 και της κοκκώδους στιβάδας της οδοντωτής έλικας (Εικόνα 20Γ).

- Τέλος, για την *ανάλυση των φωτογραφιών από την ανοσοαποτύπωση κηλίδας* έγινε πρώτα αφαίρεση του σήματος υπόβαθρου (background), στη συνέχεια έγινε ορθογώνια επιλογή κάθε σειράς της μεμβράνης και ακολούθησε γραφική απεικόνιση των προφίλ κάθε κηλίδας (Εικόνα 20Δ, Ε). Στη γραφική απεικόνιση σχεδιάστηκαν γραμμές ώστε να οριστεί μια κλειστή περιοχή σε κάθε κορυφή ενδιαφέροντος (area under the curve) της οποίας το εμβαδόν μετρήθηκε με το εργαλείο ραβδιού. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο λόγος αυτού του μεγέθους για το εκάστοτε αντίσωμα προς το αντίστοιχο μέγεθος για τη β-ακτίνη.



Εικόνα 20: Ανάλυση εικόνων στο πρόγραμμα ImageJ. Α. Ανάλυση εικόνας από τη χρώση Cresyl Violet. Οι κατακόρυφες γραμμές αντιπροσωπεύουν τις μετρήσεις του πάχους στιβάδας και τα πλαίσια της περιοχές μέτρησης της έντασης του σήματος. Β. Ανάλυση εικόνας από τη χρώση DAPI. Γ. Ανάλυση εικόνας από τον ανοσοφθορισμό με anti-GABA. Δ. Ορθογώνια επιλογή των σειρών στη μεμβράνη της ανοσοαποτύπωσης κηλίδας. Ε. Γραφική απεικόνιση των κηλίδων της μεμβράνης. Κάθε κορυφή αντιστοιχεί σε μία κηλίδα.

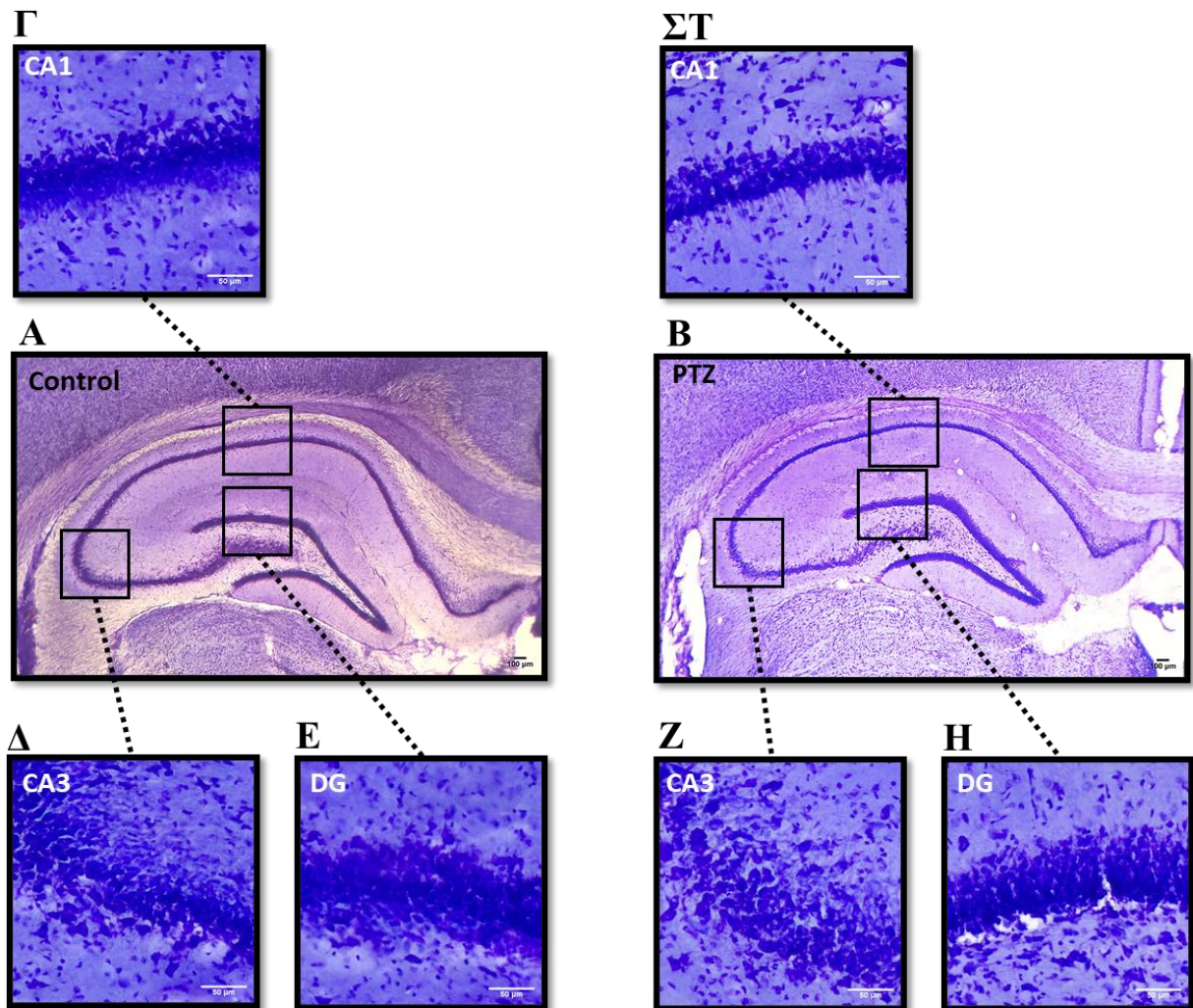
2.8. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm SEM και το N αναφέρεται στον αριθμό των ζώων. Οι διαφορές μεταξύ των μέσων αναλύθηκαν με unpaired t-test. Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές για τιμές του $p < 0.05$.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

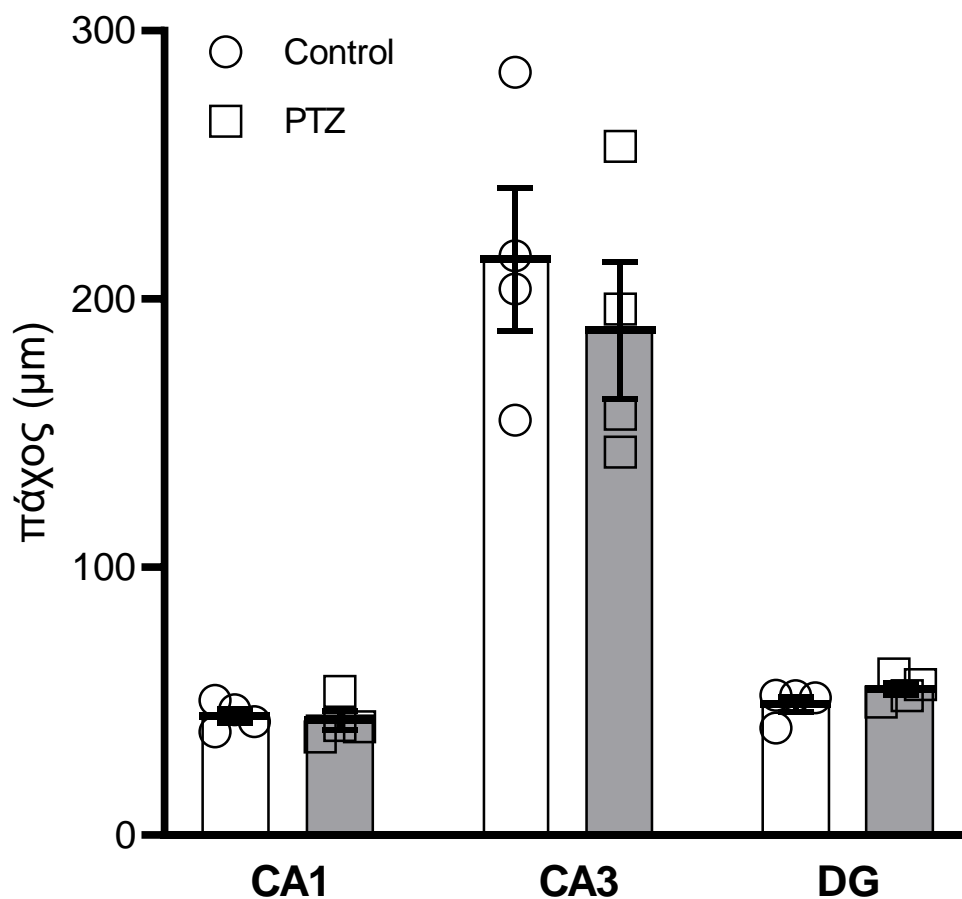
3.1. Επίδραση του SE στον αριθμό των κυττάρων και νευρώνων και στη μορφολογία του ιπποκάμπου

Αρχικά έγινε παρατήρηση των τομών μετά από χρώση με Cresyl Violet σε στερεοσκόπιο σε μεγέθυνση 4x (Εικόνα 21) και στις φωτογραφίες που λήφθηκαν έγινε ανάλυση του πάχους των πυραμιδικών στιβάδων των περιοχών CA1, CA3 και της κοκκώδους στιβάδας της οδοντωτής έλικας.



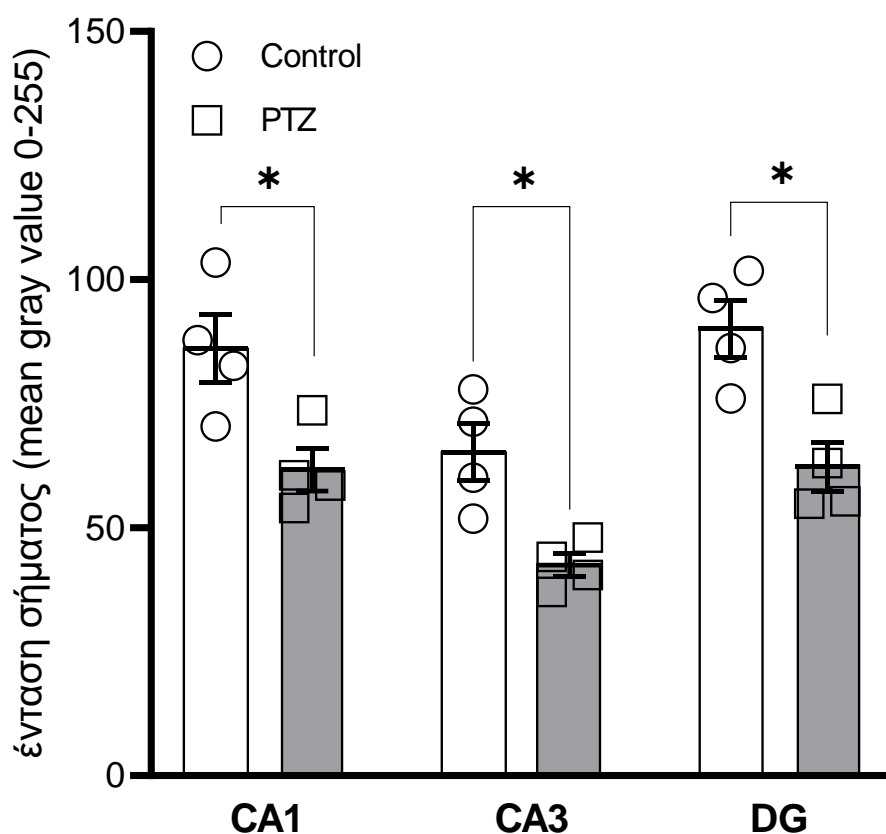
Εικόνα 21: Φωτογραφίες τομών ιπποκάμπου μετά από χρώση με Cresyl Violet σε (A) ζώα της ομάδας ελέγχου (control) και (B) σε ζώα με status epilepticus την 21^η μέρα μετά τη γέννηση που προκλήθηκε με πεντυλενετετραζόλη (PTZ). Τα control και τα PTZ ζώα θυσιάστηκαν την 52^η-55^η μέρα. Σε μεγαλύτερη μεγέθυνση απεικονίζονται οι περιοχές CA1, CA3 και οδοντωτή έλικα (DG) στις τομές από control (Γ, Δ, E) και PTZ (ΣΤ, Z, Η). Οι φωτογραφίες A, B λήφθηκαν σε στερεοσκόπιο (Olympus SZ30 σε μεγέθυνση 4x) και οι φωτογραφίες Γ,Δ, E, ΣΤ, Z, Η σε οπτικό μικροσκόπιο (Nikon eclipse 50i σε μεγέθυνση 10x). Κλίμακα=100 μm στις A, B και κλίμακα=50 μm στις Γ, Δ, E, ΣΤ, Z, Η

Από την ανάλυση αυτή δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ζώων της ομάδας ελέγχου και των ζώων στα οποία προκλήθηκε SE με PTZ (Διάγραμμα 2). Το πάχος των στιβάδων σε μm ήταν 44.48 ± 2.58 στα control και 42.81 ± 3.69 στα PTZ ζώα στη CA1, 214 ± 26.77 στα control και 188 ± 25.52 στα PTZ ζώα στη CA3 και 48.79 ± 2.96 στα control και 54.49 ± 2.3 στα PTZ ζώα στην οδοντωτή έλικα.



Διάγραμμα 2: Πάχος της πυραμιδικής στιβάδας στις CA1, CA3 και της κοκκώδους στιβάδας στην οδοντωτή έλικα (DG) σε ζώα της ομάδας ελέγχου (control) και σε ζώα με status epilepticus την 21^η μέρα μετά τη γέννηση που προκλήθηκε με πεντυλενετετραζόλη (PTZ). Τα control και PTZ ζώα θυσιάστηκαν την 52^η-55^η μέρα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm SEM από μετρήσεις σε 4 ζώα.

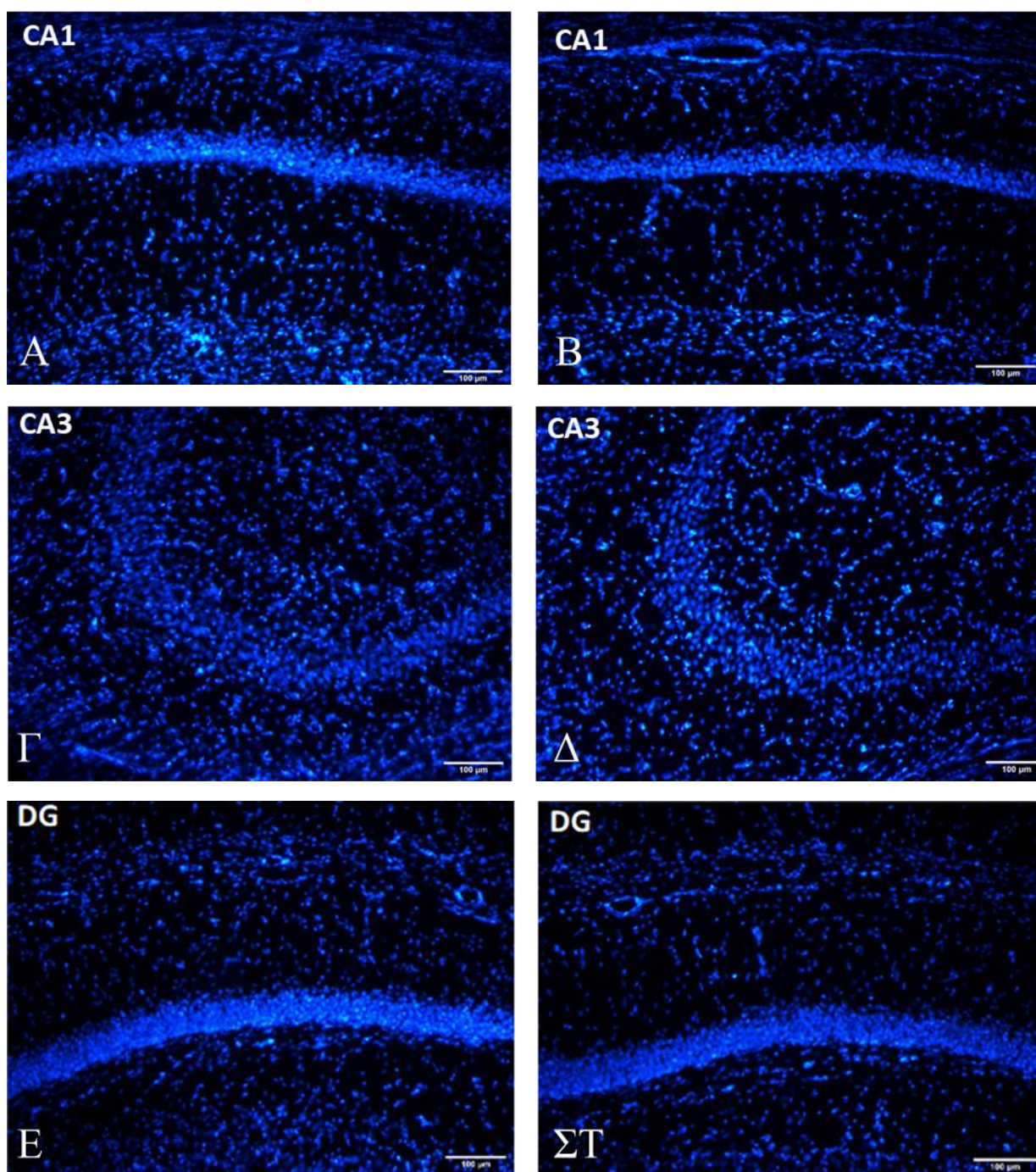
Στη συνέχεια έγινε ανάλυση της έντασης του σήματος στις ίδιες στιβάδες και βρέθηκε στατιστικά σημαντική ελάττωση της έντασης του σήματος ($p < 0.05$) στα PTZ ζώα σε σύγκριση με τις τιμές στα ζώα της ομάδας ελέγχου (control) και στις 3 περιοχές που εξετάστηκαν (Διάγραμμα 3). Η ένταση του σήματος ήταν 86.08 ± 6.85 στα control και 61.64 ± 4.23 στα PTZ ζώα στη CA1, 65.26 ± 5.81 στα control και 42.42 ± 2.35 στα PTZ ζώα στη CA3 και 90.08 ± 5.68 στα control και 62.27 ± 4.92 στα PTZ ζώα στην οδοντωτή έλικα.



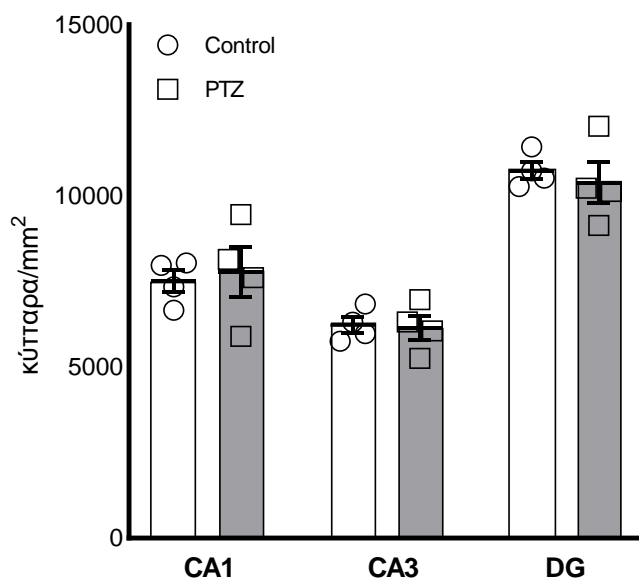
Διάγραμμα 3: Ένταση σήματος της πυραμιδικής στιβάδας στις CA1, CA3 περιοχές και της κοκκώδους στιβάδας στην οδοντωτή έλικα (DG) σε ζώα της ομάδας ελέγχου (control) και σε ζώα με status epilepticus την 21^η μέρα μετά τη γέννηση που προκλήθηκε με πεντυλενετετραζόλη (PTZ). Τα control και τα PTZ ζώα θυσιάστηκαν την 52^η-55^η μέρα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm SEM από μετρήσεις σε 4 ζώα. * $p < 0.05$ (unpaired t-test)

Ακολούθως, για τη λεπτομερέστερη παρατήρηση των τομών του ιπποκάμπου των PTZ και των control ζώων έγινε λήψη φωτογραφιών σε οπτικό μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 10x (Εικόνα 21). Από την παρατήρηση τους δε διαπιστώθηκε η ύπαρξη ειδικών ιστολογικών αλλοιώσεων και μεταβολών στη μορφολογία των κυττάρων στις περιοχές CA1, CA3 και οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου μεταξύ των δύο ομάδων.

Για την περαιτέρω διερεύνηση της ελάττωσης της έντασης του σήματος που παρατηρήθηκε μεταξύ των control και PTZ ζώων μετά από χρώση Cresyl Violet, υπολογίστηκε ο αριθμός των κυττάρων στις περιοχές του ιπποκάμπου μετά από χρώση των πυρήνων τους με DAPI (εικόνα 22). Από τη μέτρηση του συνολικού αριθμού των κυττάρων δε βρέθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ζώων της ομάδας ελέγχου και των ζώων που έλαβαν PTZ (Διάγραμμα 4). Ο αριθμός των κυττάρων ήταν 7502 ± 323 στα control και 7774 ± 736 στα PTZ ζώα στη CA1, 6219 ± 238 στα control και 6146 ± 355 στα PTZ ζώα στη CA3 και 10737 ± 251 στα control και 10382 ± 605 στα PTZ ζώα στην οδοντωτή έλικα.

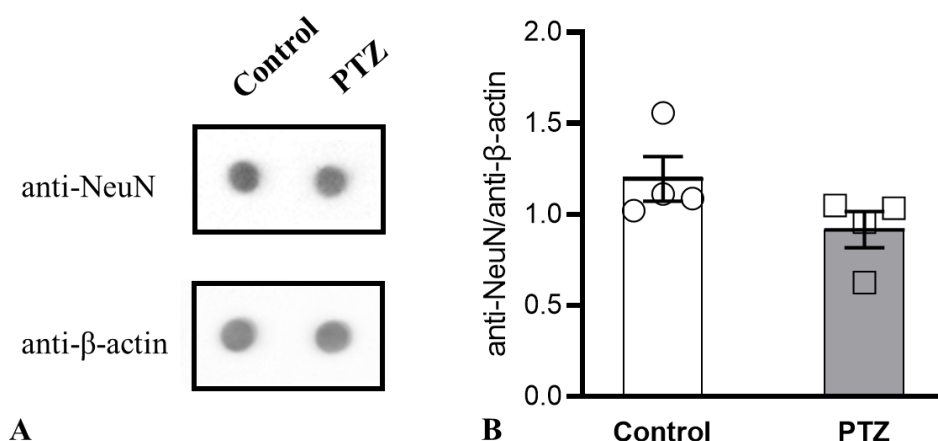


Εικόνα 22: Χρώση πυρήνων των κυττάρων με DAPI στις περιοχές CA1, CA3 και οδοντωτή έλικα (DG) σε ζώα της ομάδας ελέγχου (αριστερή στήλη A, Γ, E) και σε ζώα με status epilepticus την 21η μέρα μετά τη γέννηση που προκλήθηκε με πεντυλενετετραζόλη (PTZ, δεξιά στήλη B, Δ, ΣΤ). Τα PTZ ζώα και ζώα ομάδας ελέγχου (control) θυσιάστηκαν την 52^η-55^η μέρα. Οι φωτογραφίες ελήφθησαν με μικροσκόπιο φθορισμού (Zeiss Axioskop 40, σε μεγέθυνση 10x). Κλίμακα=100μm



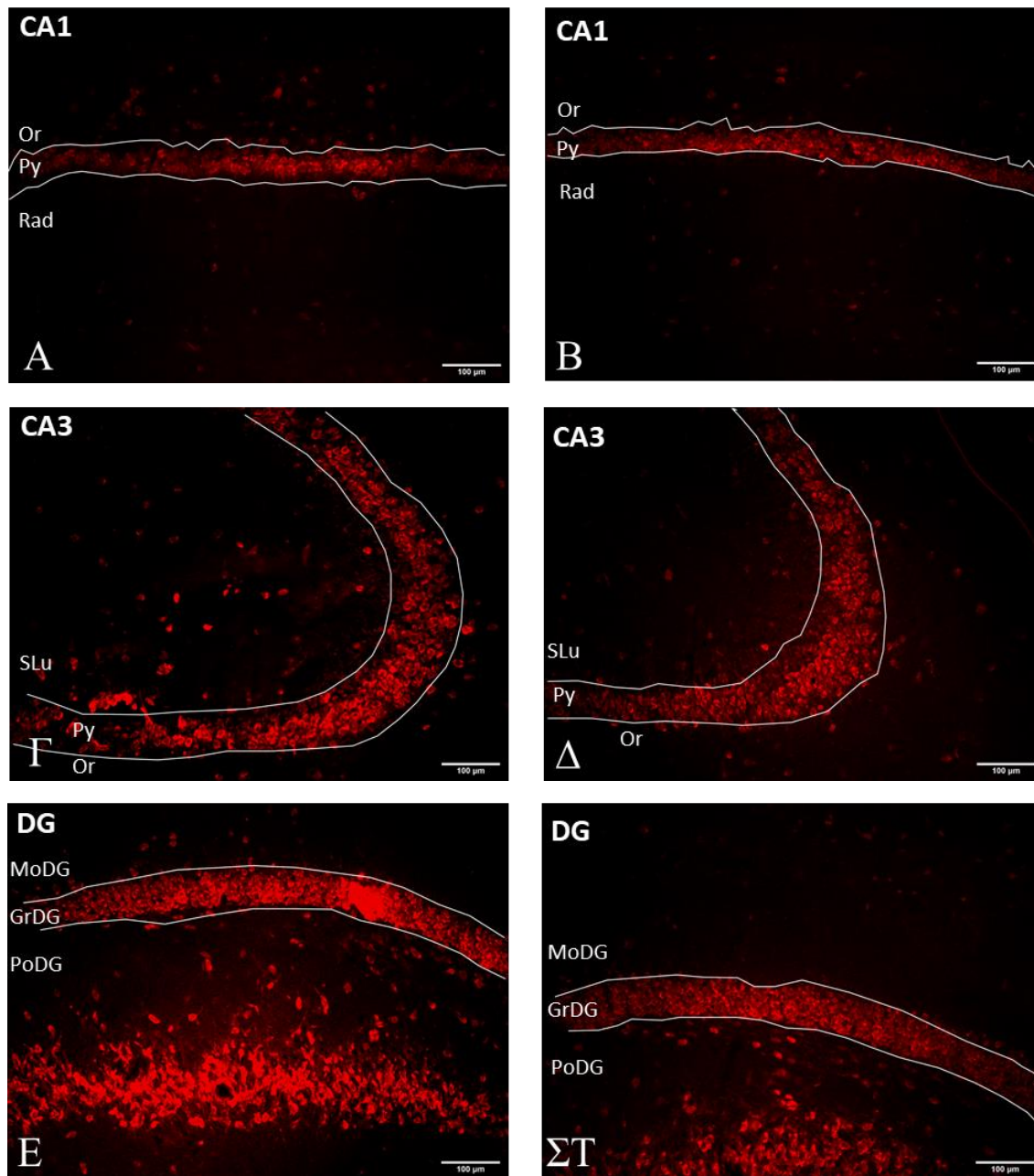
Διάγραμμα 4: Αριθμός κυττάρων ανά mm^2 μετά από χρώση DAPI στις περιοχές CA1, CA3 και οδοντωτή έλικα (DG) στα ζώα της ομάδας ελέγχου (control) ή με status epilepticus την 21^η μέρα μετά τη γέννηση που προκλήθηκε με πεντυλενετετραζόλη (PTZ). Τα control και PTZ ζώα θυσιάστηκαν την 52^η-55^η μέρα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm SEM από μετρήσεις σε 4 ζώα.

Η πιθανή απώλεια νευρικών κυττάρων στον ιππόκαμπο των PTZ ζώων σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου διερευνήθηκε με ανοσοαποτύπωση κηλίδας με τη χρήση αντισώματος anti-NeuN που στοχεύει ειδικά τους νευρώνες (Εικόνα 23A).



Εικόνα 23: A. Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κηλίδας με αντίσωμα για NeuN ή β -actin σε ομογενοποίημα ιπποκάμπου ζώων ομάδας ελέγχου (control) και ζώων που προκλήθηκε status epilepticus με πεντυλενετετραζόλη (PTZ) την 21^η μέρα μετά τη γέννηση. Τα control και PTZ θυσιάστηκαν την 42^η-47^η μέρα της ζωής τους. B. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης του NeuN ως προς β -actin στα control και PTZ ζώα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm SEM από μετρήσεις σε 4 ζώα.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων αυτών δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση του NeuN ανάμεσα στα control και στα PTZ ζώα όπως φαίνεται στο διάγραμμα της Εικόνας 23B.



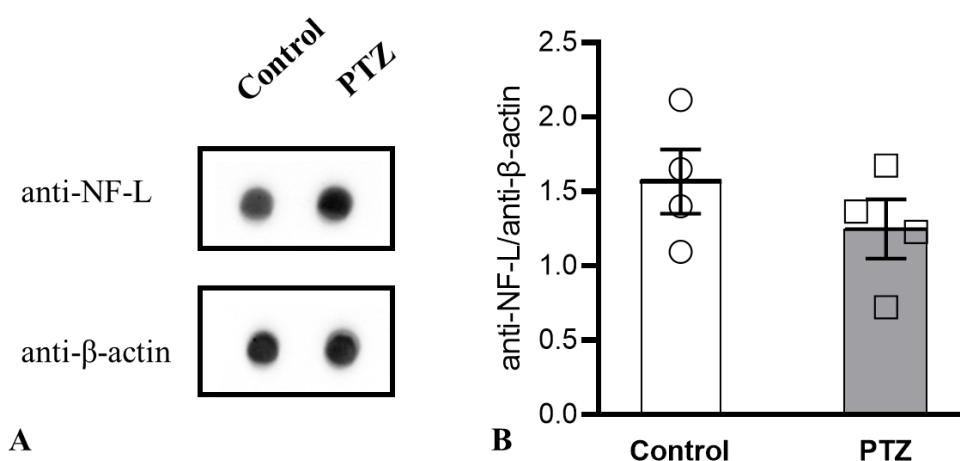
Εικόνα 24: Αποτύπωση των νευρώνων με έμμεσο ανοσοφθορισμό με τη χρήση αντισώματος για NeuN στις περιοχές CA1, CA3 και οδοντωτή έλικα (DG) σε ζώα της ομάδας ελέγχου (αριστερή στήλη A, Γ, E) και σε ζώα με status epilepticus την 21^η μέρα μετά τη γέννηση που προκλήθηκε με πεντυλενετετραζόλη (PTZ, δεξιά στήλη B, Δ, ΣΤ). Τα ζώα θυσιάστηκαν την 52^η-55^η μέρα της ζωής τους. Οι φωτογραφίες ελήφθησαν με μικροσκόπιο φθορισμού (Zeiss Axioskop 40, σε μεγέθυνση 10x), Or=πολύμορφη στιβάδα, Pyr=πυραμιδική στιβάδα, Slu=διαυγής στιβάδα, Rad=ακτινωτή στιβάδα, MoDG=μοριακή στιβάδα, GrDG=κοκκώδης στιβάδα, PoDG=πολύμορφη στιβάδα οδοντωτής έλικας. Κλίμακα=100μm

Για την περαιτέρω διερεύνηση πιθανής απώλειας νευρώνων στις επιμέρους περιοχές του ιπποκάμπου των PTZ ζώων ακολούθησε ανοσοφθορισμός με χρήση του αντισώματος anti-NeuN στα PTZ ζώα και στην ομάδα ελέγχου (Εικόνα 24). Από την καταμέτρηση του αριθμού των νευρώνων στις περιοχές CA1, CA3 και στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου δε βρέθηκε κάποια σημαντική διαφορά (Πίνακας 8) μεταξύ των PTZ ζώων και των ζώων της ομάδας ελέγχου.

Πίνακας 8: Αριθμός ανοσοδραστικών κυττάρων για NeuN ανά mm^2 . Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm SD από μετρήσεις σε 2 ζώα.

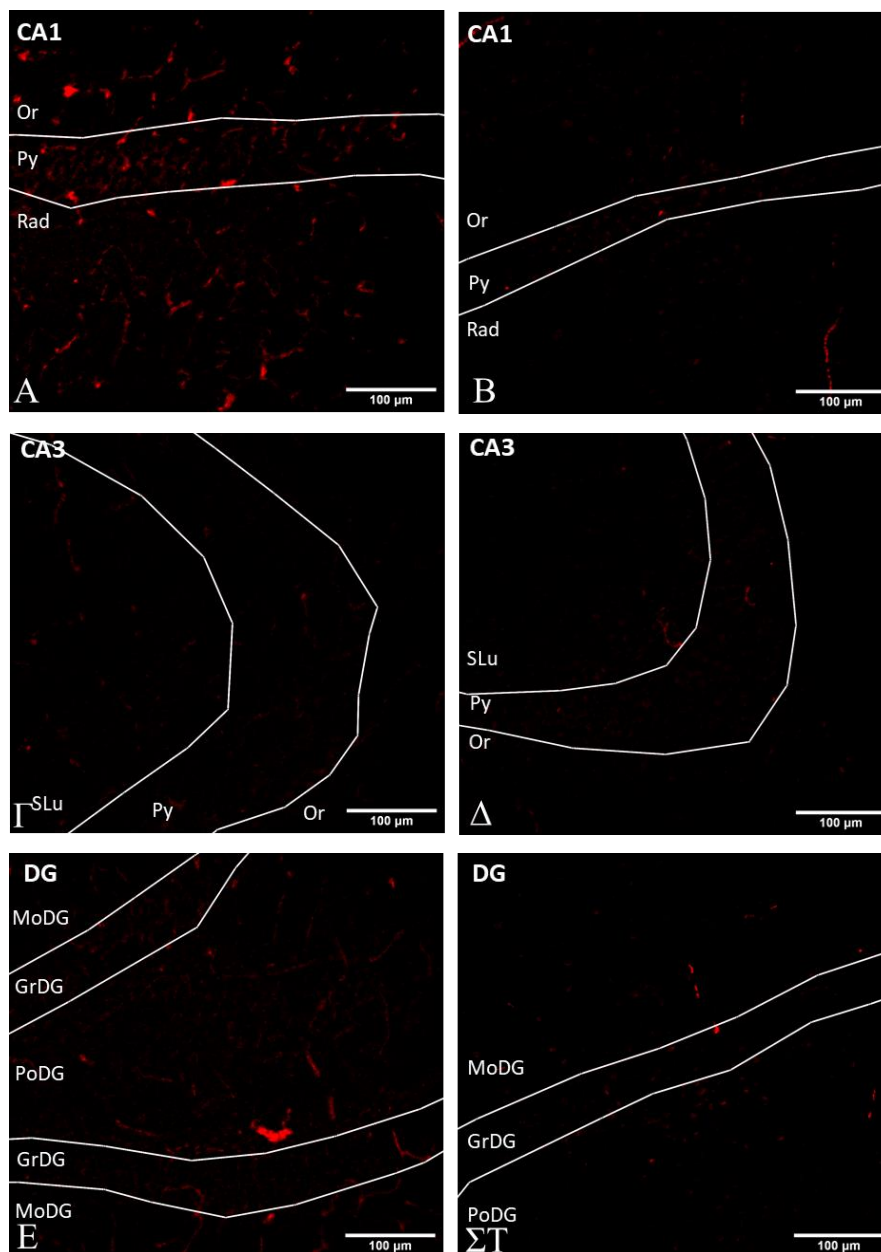
	CA1	CA3	DG
	<i>κύτταρα/$mm^2 \pm SD$</i>		
Control	2190 \pm 489	2151 \pm 425	2611 \pm 630
PTZ	2119 \pm 251	2286 \pm 510	2310 \pm 376

Για τη διερεύνηση πιθανών αλλαγών στην κυτταροαρχιτεκτονική των νευρώνων έγινε ανοσοαποτύπωση κηλίδας με χρήση αντισωμάτων έναντι των ελαφρών νευροϊνιδίων (NF-L). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων αυτών έδειξε ελάττωση της έκφρασης του NF-L στα PTZ ζώα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου η οποία όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική (Εικόνα 25).



Εικόνα 25: Α. Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κηλίδας με αντίσωμα για NF-L ή β-actin σε ομογενοποίηση ιπποκάμπου ζώων ομάδας ελέγχου (control) και ζώων προκλήθηκε status epilepticus με πεντυλενετετραζόλη (PTZ) την 21^η μέρα μετά τη γέννηση τους. Τα control και PTZ ζώα θυσιάστηκαν την 42^η-47^η μέρα της ζωής τους. Β. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης του NF-L ως προς β-actin στα control και στα PTZ ζώα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm SEM από μετρήσεις σε 4 ζώα..

Στη συνέχεια έγινε αποτύπωση των νευροϊνιδίων με το αντίσωμα anti-NF-L με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Η παρατήρηση των εικόνων από τον ανοσοφθορισμό έδειξε ελάττωση στην έκφραση των νευροϊνιδίων και στις 3 στιβάδες των PTZ που μελετήθηκαν σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Εικόνα 26).

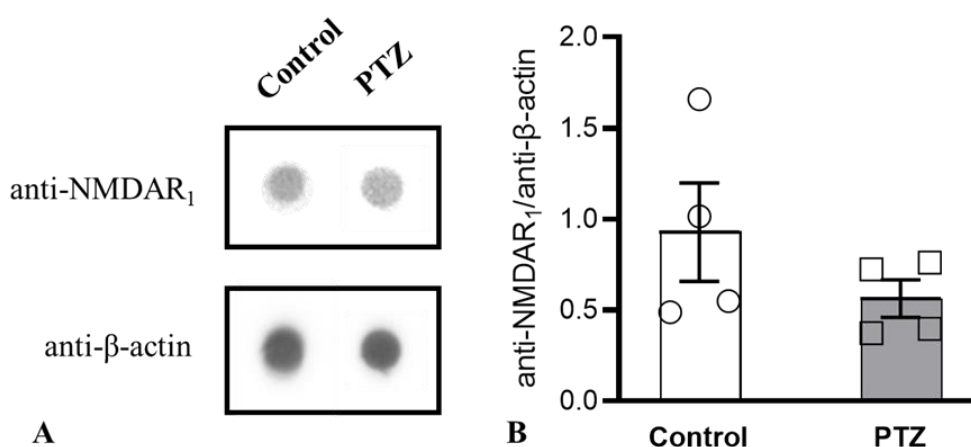


Εικόνα 26: Αποτύπωση των ελαφρών νευροϊνιδίων με έμμεσο ανοσοφθορισμό με τη χρήση αντισώματος για NF-L στις περιοχές CA1, CA3 και οδοντωτή έλικα (DG) σε ζώα της ομάδας ελέγχου (αριστερή στήλη A, Γ, E) και σε ζώα με status epilepticus την 21^η μέρα μετά τη γέννηση που προκλήθηκε με πεντυλενετετραζόλη (PTZ, δεξιά στήλη B, Δ, ΣΤ). Τα ζώα θυσιάστηκαν την 52^η-55^η μέρα της ζωής τους. Οι φωτογραφίες ελήφθησαν με μικροσκόπιο φθορισμού (Zeiss Axioskop 40, σε μεγέθυνση 10x), Or=πολύμορφη στιβάδα, Pyr=πυραμιδική στιβάδα, Slu=διαυγής στιβάδα, Rad=ακτινωτή στιβάδα, MoDG=μοριακή στιβάδα, GrDG=κοκκώδης στιβάδα, PoDG=πολύμορφη στιβάδα οδοντωτής έλικας. Κλίμακα=100μm

3.2. Επίδραση του SE στην νευροδιαβίβαση

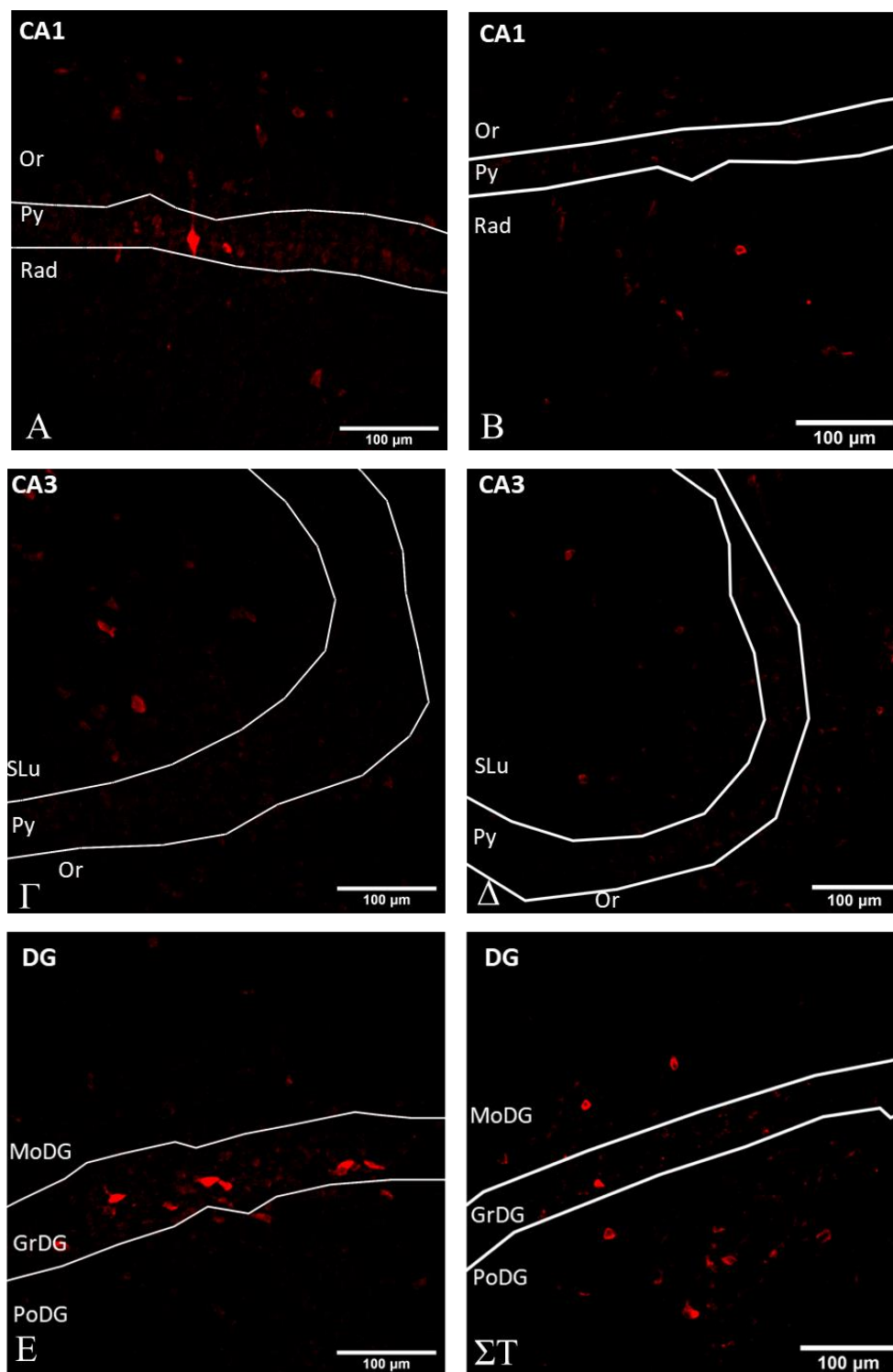
Μετά τη διερεύνηση της επίδρασης που έχει το SE κατά τον απογαλακτισμό στον αριθμό και τη μορφολογία των κυττάρων του ιπποκάμπου μετέπειτα στη ζωή, εξετάστηκε η επίδρασή του στη νευροδιαβίβαση.

Αρχικά εξετάστηκε η επίδραση του SE στην έκφραση των NMDA υποδοχέων με τη χρήση αντισώματος έναντι της NR1 υπομονάδας του NMDA υποδοχέα με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κηλίδας (Εικόνα 27A). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων αυτών έδειξε ελάττωση της έκφρασης του NMDAR₁ στα PTZ ζώα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου η οποία όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική (Εικόνα 27B).

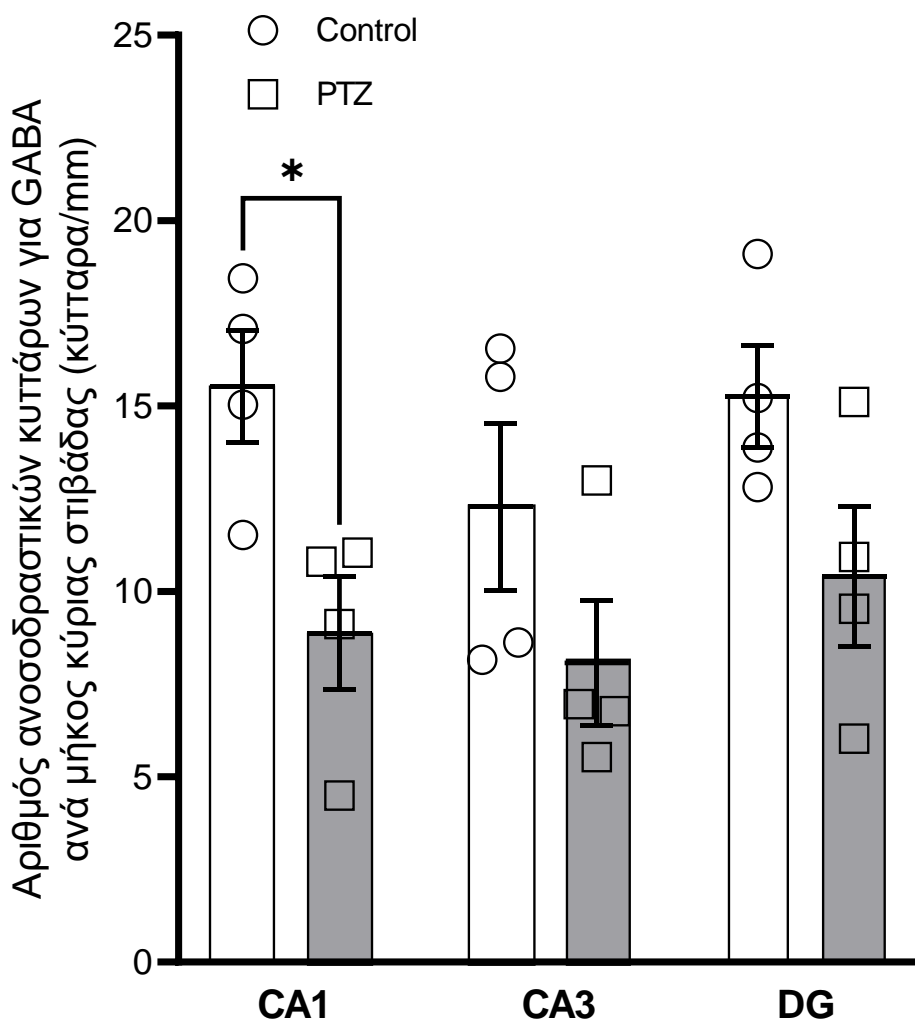


Εικόνα 27: A. Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κηλίδας με αντίσωμα για NMDAR₁ ή β-actin σε ομογενοποίημα ιπποκάμπου ζώων ομάδας ελέγχου (control) και ζώων προκλήθηκε status epilepticus με πεντυλενετετραζόλη (PTZ) την 21^η μέρα μετά τη γέννηση τους. Τα control και PTZ ζώα θυσιάστηκαν την 42^η-47^η μέρα της ζωής τους. B. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης του NMDAR₁ ως προς β-actin στα control και στα PTZ ζώα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος ± SEM από μετρήσεις σε 4 ζώα.

Ακολούθως μελετήθηκε η επίδραση του SE με PTZ στη GABAεργική διαβίβαση με τη χρήση αντισώματος anti-GABA με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού (Εικόνα 28) και μετρήθηκε ο αριθμός των GABAεργικών νευρώνων. Από την ανάλυση του αριθμού των ανοσοδραστικών κυττάρων για GABA ανά μήκος κύριας στιβάδας καταδείχθηκε στατιστικά σημαντική ελάττωση του αριθμού των GABAεργικών κυττάρων στη CA1 περιοχή και ελάττωση του αριθμού στις περιοχές CA3 και οδοντωτή έλικα, η οποία δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Διάγραμμα 5). Ο αριθμός των GABAεργικών κυττάρων ανά μήκος κύριας στιβάδας ήταν 16±2 στα control και 9±2 στα PTZ ζώα στη CA1, 12±2 στα control και 8±2 στα PTZ ζώα στη CA3 και 15±1 στα control και 10±2 στα PTZ ζώα στην οδοντωτή έλικα.



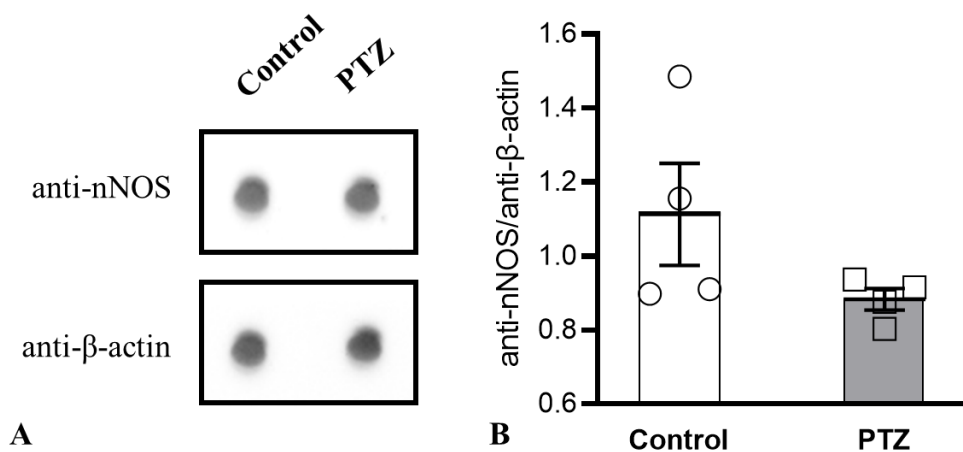
Εικόνα 28: Αποτύπωση των GABAεργικών νευρώνων με ανοσοφθορισμό με τη χρήση αντισώματος για GABA στις περιοχές CA1, CA3 και οδοντωτή έλικα (DG) σε ζώα της ομάδας ελέγχου (αριστερή στήλη A, Γ, E) και σε ζώα με status epilepticus την 21^η μέρα μετά τη γέννηση που προκλήθηκε με πεντυλενετετραζόλη (PTZ, δεξιά στήλη B, Δ, ΣΤ). Τα ζώα θυσιάστηκαν την 52^η-55^η μέρα της ζωής τους. Οι φωτογραφίες ελήφθησαν με μικροσκόπιο φθορισμού (Zeiss Axioskop 40, σε μεγέθυνση 10x), Or=πολύμορφη στιβάδα, Pyr=πυραμιδική στιβάδα, Slu=διαγωγής στιβάδα, Rad=ακτινωτή στιβάδα, MoDG=μοριακή στιβάδα, GrDG=κοκκάδης στιβάδα, PoDG=πολύμορφη στιβάδα οδοντωτής έλικας. Κλίμακα=100μm



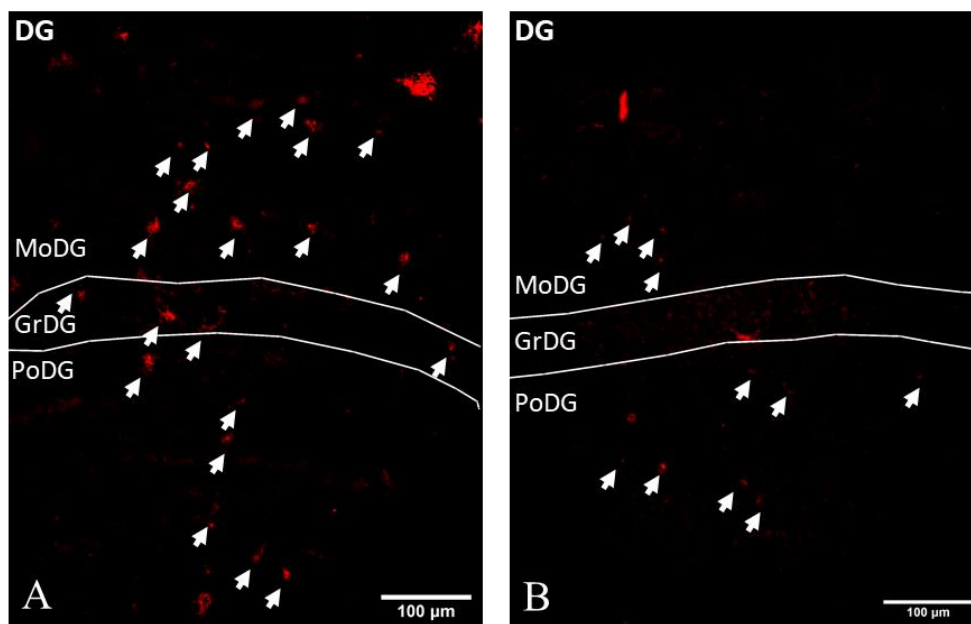
Διάγραμμα 5: Αριθμός ανοσοδραστικών κυττάρων για GABA ανά mm μήκους κύριας στιβάδας στις περιοχές CA1, CA3 και οδοντωτή έλικα (DG) στα ζώα της ομάδας ελέγχου (control) ή με status epilepticus την 21^η μέρα μετά τη γέννηση που προκλήθηκε με πεντυλενετετραζόλη (PTZ). Τα control και PTZ ζώα θυσιάστηκαν την 52^η-55^η μέρα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος ± SEM από μετρήσεις σε 4 ζώα. * $p < 0.05$ (unpaired t -test)

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση του προκαλούμενου από PTZ SE στην έκφραση της nNOS με ανοσοαποτύπωση κηλίδας με τη χρήση αντισώματος έναντι της nNOS. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων αυτών έδειξε ελάττωση της έκφρασης της nNOS στα PTZ ζώα η οποία όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική (Εικόνα 29).

Ύστερα, με πειράματα έμμεσου ανοσοφθορισμού εκτιμήθηκε η έκφραση της nNOS και ο αριθμός των κυττάρων που την εκφράζουν, στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου των PTZ ζώων και σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 30 στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου των PTZ ζώων φαίνεται ελαττωμένη έκφραση nNOS σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

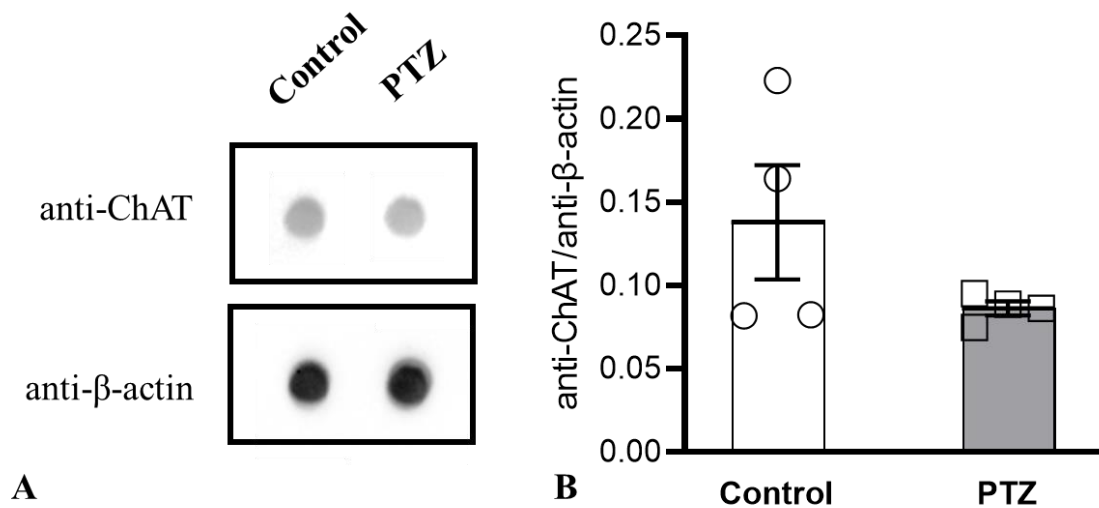


Εικόνα 29: A. Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κηλίδας με αντίσωμα για nNOS ή β-actin σε ομογενοποίηση ιπποκάμπου ζώων ομάδας ελέγχου (control) και ζώων προκλήθηκε status epilepticus με πεντυλενετετραζόλη (PTZ) την 21^η μέρα μετά τη γέννηση τους. Τα control και PTZ ζώα θυσιάστηκαν την 42^η-47^η μέρα της ζωής τους. B. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της nNOS ως προς β-actin στα control και στα PTZ ζώα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος ± SEM από μετρήσεις σε 4 ζώα.



Εικόνα 30: Σήμανση των νευρώνων που παράγουν nNOS με ανοσοφθορισμό με τη χρήση αντισώματος για nNOS στην οδοντωτή έλικα (DG) σε ζώα της ομάδας ελέγχου (A) και σε ζώα με status epilepticus την 21^η μέρα μετά τη γέννηση που προκλήθηκε με πεντυλενετετραζόλη (PTZ, B). Τα ζώα θυσιάστηκαν την 42^η-47^η μέρα της ζωής τους. Οι φωτογραφίες ελήφθησαν με μικροσκόπιο φθορισμού (Zeiss Axioskop 40, σε μεγέθυνση 10x), MoDG=μοριακή στιβάδα, GrDG=κοκκώδης στιβάδα, PoDG=πολύμορφη στιβάδα οδοντωτής έλικας. Κλίμακα=100μm

Τέλος, εξετάστηκε η επίδραση της χορήγησης PTZ στην έκφραση της ακετυλοτρανσφεράσης της χολίνης με τη χρήση αντισώματος anti-ChAT με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κηλίδας (Εικόνα 31). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων αυτών έδειξε ελάττωση της έκφρασης της ChAT στα PTZ ζώα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου η οποία όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική.



Εικόνα 31: A. Ανάλυση ανοσοαπότυπωσης κηλίδας με αντίσωμα για ChAT ή β-actin σε ομογενοποίημα ιπποκάμπου αρουραίων ομάδας ελέγχου (control) και ζώων προκλήθηκε status epilepticus με πεντυλενετετραζόλη (PTZ) την 21^η μέρα μετά τη γέννηση τους. Τα control και PTZ ζώα θυσιάστηκαν την 42^η-47^η μέρα της ζωής τους. B. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης του ChAT ως προς β-actin στα control και PTZ ζώα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος ± SEM από μετρήσεις σε 4 ζώα.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το SE είναι η σοβαρότερη εκδήλωση μιας επιληπτικής κρίσης και μπορεί να έχει μακροπρόθεσμες δομικές και λειτουργικές επιπτώσεις στον εγκέφαλο. Είναι μια ταχέως εξελισσόμενη κατάσταση που χαρακτηρίζεται από διαταραχή στην ισορροπία διέγερσης/αναστολής με αποτέλεσμα τη νευρωνική βλάβη από διεγερτοτοξικότητα [11,16]. Η παρούσα εργασία εστίασε στην περιοχή του ιπποκάμπου καθώς αυτή είναι ιδιαίτερα ευπαθής στις νευρωνικές προσβολές λόγω των αμφίδρομων συνδέσεών της με το μεταιχμιακό σύστημα και τον υπόλοιπο εγκέφαλο [3]. Η ευπάθεια του αυτή δεν είναι σταθερή και φαίνεται να έχει διακυμάνσεις ανάλογα με την ηλικία. Οι ανώριμοι εγκέφαλοι παρουσιάζουν μια σχετική ανθεκτικότητα στη νευρωνική βλάβη από SE σε σχέση με τους ώριμους, η οποία σταδιακά υποχωρεί την περίοδο του απογαλακτισμού, δηλαδή περίπου την τρίτη εβδομάδα της ζωής στους επίμυες [23,60]. Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η περίοδος αυτή καθώς είναι μια μεταβατική περίοδος από τον ανθεκτικό ανώριμο εγκέφαλο προς τον ευπαθή ενήλικο.

Για την επαγωγή SE στους επίμυες αναφέρονται βιβλιογραφικά διάφορα μοντέλα, όπως είναι το μοντέλο σπασμών με το μουσκαρινικό αγωνιστή πιλοκαρπίνη και το μοντέλο σπασμών με το γλουταμινεργικό αγωνιστή καϊνικό οξύ [61]. Το μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική είναι αυτό της φαρμακευτικής επαγωγής με PTZ, έναν ανταγωνιστή των GABA_A υποδοχέων. Η πρόκληση σπασμών με PTZ πλεονεκτεί σε σχέση με άλλα μοντέλα στη μελέτη κυτταρικών απαντήσεων και επιβραδυνόμενου νευρωνικού θανάτου που επάγονται από τους σπασμούς. Από τη μία το PTZ φαίνεται να ασκεί τη δράση του πιο γρήγορα σε σχέση με τα άλλα μοντέλα και από την άλλη προκαλεί λιγότερη νευροεκφύλιση και με μεγαλύτερη καθυστέρηση συγκριτικά με άλλα μοντέλα [63].

Για τη μορφολογική και παθολογοανατομική μελέτη των νευρικών κυττάρων του ιπποκάμπου εφαρμόστηκε αρχικά η χρώση Cresyl Violet που σημαίνει την ουσία Nissl. Με τη μέθοδο αυτή διακρίνονται οι νευρώνες από άλλους τύπους κυττάρων, όχι όμως από τα γλοιακά κύτταρα [65]. Επειδή είναι γνωστό ότι οι νευρωνικές προσβολές μπορεί να προκαλέσουν αλλαγές στον αριθμό και στο μέγεθος των κυττάρων [68] έγινε ανάλυση του πάχους και της έντασης του σήματος των κύριων στιβάδων, δηλαδή της πυραμιδικής στις CA1, CA3 περιοχές και της κοκκώδους στην οδοντωτή έλικα. Από την ανάλυση του πάχους των στιβάδων δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μαρτύρων και των ζώων που έλαβαν PTZ κατά τον απογαλακτισμό ενώ η ανάλυση της έντασης του σήματος στις ίδιες στιβάδες ανέδειξε στατιστικά σημαντική ελάττωσή του στα PTZ ζώα. Από την πιο λεπτομερή παρατήρηση των τομών σε μεγέθυνση 10x δεν εντοπίστηκε κάποια ειδική παθολογοανατομική αλλαγή στις στιβάδες αυτές όπως για παράδειγμα νέκρωση ή απόπτωση. Στο βαθμό λοιπόν που μπορούν να ανιχνευθούν κυτταρικές βλάβες με την

τεχνική αυτή, δε βρέθηκε το SE κατά τον απογαλακτισμό να προκαλεί μακροπρόθεσμες αλλαγές στη μορφολογία των νευρώνων όπως αυτό φαίνεται από τη μελέτη του πάχους των κύριων στιβάδων και από την παρατήρηση των χρωσμένων με Cresyl Violet νευρώνων στο οπτικό μικροσκόπιο. Τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων διαφέρουν από τα ευρήματα των Rutten και συν. (2002) [69], των Cilio και συν. (2003) [70] και των Sankar και συν. (2000) [71] σε ιππόκαμπο επίμυων, στους οποίους προκλήθηκε με πιλοκαρπίνη ένα επεισόδιο SE σε ηλικία 20 ημερών και ο ιππόκαμπος μελετήθηκε 30-40 ημέρες μετά. Στην περίπτωση αυτή παρατηρείται εκβλάστηση των βρυωδών ινών και απώλεια νευρώνων στις περιοχές CA1, CA3 και οδοντωτή έλικα. Η απώτερη επίδραση του SE στην δομή του ιπποκάμπου φαίνεται ότι επηρεάζεται τόσο από την ηλικία του ζώου όσο και από το μοντέλο που χρησιμοποιείται για την πρόκλησή του.

Με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας, φαίνεται ότι το SE στην ηλικία των 21 ημερών προκαλεί ελάττωση στην ένταση του σήματος. Καθώς είναι η ουσία Nissl που δίνει το σήμα κατά την ανάλυση των τομών με Cresyl Violet, η ελάττωση του σήματος του μπορεί να αποδοθεί είτε σε ελάττωση του συνολικού αριθμού των κυττάρων είτε σε ελάττωση των σωματιδίων Nissl- χωρίς μεταβολή του αριθμού των νευρώνων.

Για το λόγο αυτό εκτιμήθηκε ο αριθμός των κυττάρων στις κύριες στιβάδες του ιπποκάμπου μετά από χρώση των πυρήνων με DAPI, που σημαίνει τους πυρήνες όλων των τύπων κυττάρων, νευρικών και μη. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων αυτών δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στον συνολικό αριθμό κυττάρων στα ζώα που είχαν λάβει PTZ σε σύγκριση με τα ζώα της ομάδας ελέγχου. Για να εκτιμηθεί ειδικότερα η πιθανή μεταβολή στον αριθμό των νευρώνων μετά από SE στα PTZ ζώα, ακολούθησε η διερεύνηση του αριθμού των νευρώνων με δείκτη ειδικό γι' αυτούς. Ο δείκτης που επιλέχτηκε είναι το NeuN, ένα αντιγόνο που εκφράζεται αποκλειστικά στους πυρήνες των νευρικών κυττάρων [72]. Η χρήση αντισωμάτων έναντι του NeuN με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κηλίδας ανέδειξε ελάττωση στον αριθμό των νευρικών κυττάρων η οποία δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Για να διερευνηθεί περαιτέρω μια πιθανή μεταβολή στον αριθμό των νευρώνων σε επιμέρους περιοχές του ιπποκάμπου μελετήθηκε η έκφραση του NeuN με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Τα πειράματα αυτά, σε συμφωνία με την ανοσοαποτύπωση κηλίδας δεν έδειξαν διαφορές στον αριθμό των νευρώνων στις κύριες στιβάδες των περιοχών CA1, CA3 και οδοντωτή έλικα μεταξύ των PTZ ζώων και της ομάδας ελέγχου.

Η σειρά λοιπόν των πειραμάτων αυτών δείχνει ότι η πρόκληση ενός επεισοδίου SE με PTZ κατά τον απογαλακτισμό δε μεταβάλλει μακροπρόθεσμα τον αριθμό των νευρώνων του ιπποκάμπου, όπως αναδεικνύει η μελέτη του ιπποκάμπου ένα μήνα μετά την προσβολή. Με βάση τα ευρήματα αυτά μπορούμε να υποθέσουμε ότι το προκαλούμενο από PTZ SE στην ηλικία των 21 ημερών στους επίμυες ή δεν προκαλεί νευρωνική βλάβη ή ότι η βλάβη είναι αντιστρεπτή. Όπως

προαναφέρθηκε η περίοδος του απογαλακτισμού είναι μια ενδιάμεση περίοδος στην ανθεκτικότητα του ιπποκάμπου και πρόκληση SE στην ηλικία αυτή με πιλοκαρπίνη προκαλεί απώλεια νευρώνων στις CA1, CA3 και οδοντωτή έλικα που παραμένει και στις PND50-PND60 [69,70]. Όμως, πειράματα πρόκλησης SE σε επίμυες ηλικίας P21 με καϊνικό οξύ έδειξαν ότι οι παρατηρούμενες αλλαγές (παρουσία οιδηματωδών και νεκρωτικών νευρώνων στη CA1 και την οδοντωτή έλικα) επανέρχονται 1-2 εβδομάδες μετά από το επεισόδιο σπασμών [73]. Είναι πιθανό και στο δικό μας μοντέλο οι όποιες αλλαγές που προκλήθηκαν από το SE με PTZ να μην εμμένουν και στην ηλικία των 1.5-2 μηνών.

Εφόσον δεν αναδείχθηκε ελάττωση του συνολικού αριθμού των νευρώνων στις κύριες στιβάδες, η παρατηρούμενη ελάττωση της έντασης του σήματος μετά από χρώση των τομών του ιπποκάμπου με Cresyl Violet σε όλες τις περιοχές του, δεν μπορεί να αποδοθεί σε μειωμένο αριθμό νευρώνων αλλά θα μπορούσε να αποδοθεί σε stress του ενδοπλασματικού δικτύου επαγόμενο από διεγερτοτοξικότητα το οποίο εμμένει μέχρι και την ηλικία των 1.5-2 μηνών. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται κατά τη διάρκεια νευρωνικών προσβολών μπορεί να διαταράξουν την ομοιοστασία και σωστή λειτουργία του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου [74]. Η παρατήρηση διαταραχών στο ενδοπλασματικό δίκτυο έχει γίνει και σε πειράματα με μελέτη ιπποκάμπων μετά από επαναλαμβανόμενη χορήγηση PTZ και η παθολογοανατομική αποτύπωση των διαταραχών αυτών είναι η ελάττωση της έντασης του σήματος της ουσίας Nissl καθώς αυτή αποτελείται από στιβάδες αδρού ενδοπλασματικού δικτύου [52].

Είναι γνωστό ότι το SE μπορεί να επηρεάσει την κυτταροαρχιτεκτονική του ιπποκάμπου, και η πιο κοινή διαταραχή που παρατηρείται είναι η εκβλάστηση των βρυωδών ινών στην οδοντωτή έλικα [21,34]. Για το λόγο αυτό μελετήθηκε η επίδραση του SE στην έκφραση των νευροϊνιδίων, που είναι βασικό στοιχείο του κυτταροσκελετού και αποτελούν τα κύρια ενδιάμεσα ινίδια του νευρικού κυττάρου. Τα νευροϊνίδια παίζουν μείζονα ρόλο στη νευρωνική ανάπτυξη, την οργάνωση, την πλαστικότητα και τη διατήρηση του σχήματος του κυττάρου και η έκφραση τους μπορεί να μεταβληθεί σε παθολογικές καταστάσεις [24,25,26,75]. Η ανοσοαποτύπωση κηλίδας με χρήση αντισώματος για τα ελαφρά νευροϊνίδια (NF-L) σε ομογενοποίημα ιπποκάμπου δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντική μεταβολή στην έκφραση των NF-L στα PTZ ζώα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Αντιθέτως η ανάλυση των φωτογραφιών από τον έμμεσο ανοσοφθορισμό με anti-NF-L στις στιβάδες CA1, CA3 και στην οδοντωτή έλικα έδειξε εμφανή μείωση στην ανοσοδραστικότητα για NF-L. Η διαφορά στα αποτελέσματα μεταξύ των δύο μεθόδων μπορεί να οφείλεται στη διαφορετική ευαισθησία που έχουν καθώς με τον έμμεσο ανοσοφθορισμό εξετάζουμε τις επιμέρους περιοχές και όχι ολόκληρο τον ιπποκάμπο. Η ελάττωση στην ανοσοδραστικότητα για NF-L είναι σε συμφωνία με πειράματα πρόκλησης ηλεκτροσπασμωδικών κρίσεων που έδειξαν ελάττωση στην έκφραση NF-L στον ιπποκάμπο έως και 24 ώρες μετά το

επεισόδιο [26]. Τα NF-L είναι ο πιο ευάλωτος τύπος νευροϊνιδίων στην καταστροφή από ασβεστιοεξαρτώμενες πρωτεάσες [76] και δεδομένου ότι κατά τη διάρκεια των σπασμών η διεγερτοτοξικότητα προκαλεί αθρόα είσοδο ασβεστίου είναι πιθανή η παρατηρούμενη ελάττωση στην ανοσοδραστικότητα για NF-L να οφείλεται στην καταστροφή τους κατά το SE με PTZ.

Στην παθοφυσιολογία του SE εμπλέκονται πολλά νευροδιαβιβαστικά συστήματα του ιπποκάμπου [43]. Έτσι, μελετήθηκε στη συνέχεια η μακροχρόνια επίδραση που έχει το SE κατά τον απογαλακτισμό στη νευροδιαβίβαση του ιπποκάμπου. Οι NMDA υποδοχείς είναι γνωστό ότι συμμετέχουν τόσο στις άμεσες όσο και στις απώτερες μεταβολές που προκαλούνται από το SE. Από τη μία οι υποδοχείς αυτοί εμπλέκονται στο μηχανισμό έναρξης ενός επεισοδίου SE και από την άλλη ενοχοποιούνται για την αθρόα είσοδο Ca^{2+} που προκαλεί νευρωνική βλάβη, φαινόμενο γνωστό ως διεγερτοτοξικότητα [77]. Για το λόγο αυτό μελετήθηκε με ανοσοαποτύπωση κηλίδας με τη χρήση αντισώματος έναντι της NR1 υπομονάδας των NMDA υποδοχέων η συνολική τους έκφραση στον ιπποκάμπο των ζώων. Στα πειράματα αυτά δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή στα PTZ ζώα σε σχέση με τα control. Τα ευρήματα αυτά διαφέρουν από αυτά μελέτης σε επίμυες ηλικίας PND20-22 που δείχνουν αύξηση της έκφρασης των NMDAR1 3 ώρες μετά από χορήγηση PTZ [30]. Είναι πιθανό να υπάρχουν μεταβολές στην έκφραση των NMDA υποδοχέων στις διάφορες περιοχές του ιπποκάμπου που δεν αναδεικνύονται με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κηλίδας και απαιτείται περαιτέρω μελέτη της έκφρασης των υποδοχέων αυτών με έμμεσο ανοσοφθορισμό. Επιπλέον, μπορεί οποιαδήποτε αρχική διαταραχή στην έκφραση των NMDA υποδοχέων που παρατηρείται μετά το SE να μην επιμένει και στην ηλικία των 1.5-2 μηνών.

Η μελέτη της GABAεργικής διαβίβασης με χρήση anti-GABA αντισώματος στον έμμεσο ανοσοφθορισμό έδειξε στατιστικά σημαντική ελάττωση του αριθμού των GABAεργικών κυττάρων κυρίως στη CA1 περιοχή. Η παρατήρηση αυτή είναι σύμφωνη με βιβλιογραφικές αναφορές απώλειας GABAεργικών διανευρώνων στην περιοχή αυτή σε μοντέλο σπασμών με πιλοκαρπίνη [78] ενώ η απώλεια GABAεργικών διανευρώνων γενικότερα αναφέρεται σε ιστολογικές μελέτες ιπποκάμπων ανθρώπων με ανθεκτική επιληψία [79]. Η απώλεια των νευρώνων αυτών έχει ιδιαίτερη λειτουργική σημασία καθώς οι GABAεργικοί διανευρώνες συμμετέχουν στην αναστολή των πυραμιδικών κυττάρων και η ελάττωση τους διαταράσσει την ισορροπία διέγερσης/αναστολής προς όφελος της διέγερσης. Έτσι η διαταραχή αυτή μπορεί να συμβάλει στην επιληπτογένεση καθώς είναι γνωστό ότι ακόμα και ένα μεμονωμένο επεισόδιο SE στην ηλικία αυτή μπορεί να προκαλέσει την εμφάνιση αυτόματων σπασμών μετέπειτα στη ζωή [80].

Στη συνέχεια η μελέτη της έκφρασης της nNOS με τη χρήση anti-nNOS στην ανοσοαποτύπωση κηλίδας δεν έδειξε στατιστικά σημαντική μεταβολή στην έκφραση της nNOS συνολικά στον

ιππόκαμπο. Αντιθέτως, η χρήση του ίδιου αντισώματος σε έμμεσο ανοσοφθορισμό έδειξε ελάττωση της έκφρασης nNOS στην οδοντωτή έλικα. Ενώ η βιβλιογραφία αναφέρει αυξημένα επίπεδα του ενζύμου αυτού μετά από SE με επαναλαμβανόμενη χορήγηση PTZ ή τοξίνης τετάνου σε επίμυες 4 και 2 εβδομάδων αντίστοιχα [52,55] η πιθανή ελάττωση της έκφρασης της nNOS μπορεί να συσχετιστεί με την απώλεια GABAεργικών διανευρώνων που βρέθηκε στα πειράματα του ανοσοφθορισμού με anti-GABA, καθώς μέρος αυτών των κυττάρων εκφράζει και nNOS [81]. Είναι επίσης πιθανό να υπάρχει μεμονωμένη μείωση της έκφρασης της nNOS όταν τα επίπεδα της μελετώνται στην ηλικία των 1.5-2 μηνών, δεν υπάρχουν όμως βιβλιογραφικά δεδομένα για την ηλικία αυτή.

Τέλος η μελέτη της επίδρασης του SE με PTZ κατά τον απογαλακτισμό στη χολινεργική διαβίβαση του ιπποκάμπου με τη χρήση anti-ChAT στην ανοσοαποτύπωση κηλίδας δεν έδειξε στατιστικά σημαντική μεταβολή της έκφρασης του ενζύμου αυτού. Μελέτη σε ενήλικες επίμυες με μοντέλο σπασμών με καϊνικό οξύ αναφέρει αύξηση των επιπέδων της ChAT 6 μήνες μετά [45]. Καθώς απουσιάζουν βιβλιογραφικά δεδομένα για τη μελέτη της επίδρασης του SE κατά την ηλικία του απογαλακτισμού στη χολινεργική διαβίβαση, είναι πιθανό οποιαδήποτε επίδραση του SE κατά τον απογαλακτισμό σε αυτήν να μην εμμένει και στην ηλικία των 1.5-2 μηνών.

Συμπερασματικά, ένα μόνο επεισόδιο SE με PTZ κατά την περίοδο του απογαλακτισμού είναι ικανό να προκαλέσει μακροπρόθεσμες λειτουργικές (stress ενδοπλασματικού δικτύου), κυτταροαρχιτεκτονικές (μεταβολή στην έκφραση των νευροϊνιδίων) και αλλαγές σε επίπεδο νευροδιαβίβασης (ελάττωση GABAεργικών νευρώνων και νευρώνων που συνθέτουν nNOS) στον ιππόκαμπο των επίμυων μετέπειτα στη ζωή. Φαίνεται επομένως ότι η ανθεκτικότητα του ιπποκάμπου στην ηλικία του απογαλακτισμού έχει υποχωρήσει συγκριτικά με τη βρεφική ηλικία και ότι νευρωνική προσβολή με SE κατά την περίοδο αυτή είναι ικανή να έχει μακροπρόθεσμες επιπτώσεις στον ιππόκαμπο των επίμυων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bir SC, Ambekar S, Kukreja S, Nanda A, Julius Caesar Arantius-Giulio Cesare Aranzi, 1530–1589-and the hippocampus of the human brain: history behind the discovery, *Journal of Neurosurgery*, 2015; 122(4): 971–975
2. Paxinos G, *The Rat Nervous System*, 4th edition, Elsevier, 2015: 511-559
3. Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, *The hippocampus book*, Oxford Univeristy Press, 2006: 47-81
4. Lorente De Nó R, Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *Journal für Psychologie und Neurologie*, 1934; 46: 113–177
5. Catani M, Dell'Acqua F, Thiebaut de Schotten M, A revised limbic system model for memory, emotion and behaviour, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2013; 37: 1724-1737
6. O'Keefe J, Dostrovsky J, The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat, *Brain Research*, 1971; 34(1): 171-175
7. Maguire EA, Intraub H, Mullally SL, Scenes, Spaces, and Memory Traces: What Does the Hippocampus Do?, *The Neuroscientist*, 2015; 22(5): 432-439
8. Anand KS, Dhikav V, Hippocampus in health and disease: A review, *Ann Indian Acad Neurol*, 2012; 15(4): 239-246
9. Alarcón G, Valentín A, *Introduction to Epilepsy*, Cambridge University Press, 2012: 37-40
10. Haut S, Veliskova J, Moshe S, Susceptibility of immature and adult brains to seizure effects, *Lancet Neurol*, 2004; 3:608-617
11. Trinka E, Cock H, Hesdorffer D, Rossetti AO, Scheffer IE, A definition and classification of status epilepticus – Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus *Epilepsia*, 2015; 56(10):1515–1523
12. Chang B, Lowenstein D, Epilepsy, *New England Journal of Medicine*, 2003; 349:1257-1266
13. Ascoli M, Ferlazzo E, Gasparini S, Mastroianni G, Citraro R, Roberti R, Russo E, Epidemiology and Outcomes of Status Epilepticus, *International Journal of General Medicine*, 2021; 14: 2965-2973
14. Lowenstein D, Alldredge B, Status Epilepticus, *New England Journal of Medicine*, 1998; 338(14): 970-971
15. Yang H, Wu J, Guo R, Peng Y, Zheng W, Liu D, Song Z, Glycolysis in energy metabolism during seizures, *Neural Regeneration Research*, 2013; 8(14): 1316-1326

16. Wasterlain C, Chen J, Mechanistic and pharmacologic aspects of status epilepticus and its treatment with new antiepileptic drugs, *Epilepsia*, 2008; 46(9): 63-73
17. Rajasekaran K, Zanelli SA, Goodkin HP, Lessons from the Laboratory: The pathophysiology and Consequences of Status Epilepticus, *Semin Pediatr Neurol*, 2010; 17(3): 136-143
18. Nehlig A, What is animal experimentation telling us about new drug treatments of status epilepticus, *Epilepsia*, 2007; 48(8): 78-81
19. Dingledine R, Varvel NH, Dudek FE, When and How Do Seizures Kill Neurons, and is Cell Death Relevant to Epileptogenesis?, *Adv Exp Med Biol*, 2014; 813:109-122
20. Baram TZ, Jensen FE, Brooks-Kayal A, Does Acquired Epileptogenesis in the Immature Brain Require Neuronal Death? *Epilepsy Current*, 2011; 11(1):21-26
21. Scott RC, What are the effects of prolonged seizures in the brain? *Epileptic Discord*, 2014; 16(NS1): 6-11
22. Holmes GL, Effects of early seizures on later behavior and epileptogenicity, *Mental retardation and developmental disabilities research reviews*, 2004; 10: 101-105
23. Wasterlain CG, Gloss DS, Niquet J, Wasterlain AS, Epileptogenesis in the developing brain, *Handbook of Clinical Neurology*, Elsevier 2013: 427-439
24. Yang Q, Wang S, Karlsson J, Hamberger A, Haglid K, Phosphorylated and non-phosphorylated neurofilament proteins: distribution in the rat hippocampus and early changes after kainic acid induced seizures, *Journal of Neuroanatomy* 1995; 9: 217-228
25. Yang Q, Wang S, Hamberger A, Haglid K, Plasticity of granule cell-mossy fiber system following kainic acid induced seizures: an immunocytochemical study on neurofilament proteins, *Neuroscience Research*, 1996; 26: 57-64
26. Vaidya V, Zerwilliger R, Duman R, Alterations in Heavy and Light Neurofilament Proteins in Hippocampus Following Chronic ECS Administration, *Synapse*, 2000; 35: 137-143
27. Scott RC, Status epilepticus in the developing brain: Long-term effects seen in humans, *Epilepsia*, 2009; 50(12): 32–33
28. Chipres-Tinajero GA, Nunez-Ochoa MA, Medina-Ceja L, Increased immunoreactivity of glutamate receptors, neuronal nuclear protein and glial fibrillary acidic protein in the hippocampus of epileptic rats with fast ripple activity, *Experimental Brain Research*, 2021; 239: 2015-2024
29. Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ, *Principles of Neural Science* 5th Edition, McGraw Hill, 2013: 289-295

30. Postnikova TY, Zubareva OE, Kovalenko AA, Kim KK, Magazanik LG, Zaitsev AV, Status epilepticus impairs synaptic plasticity in rat hippocampus and is followed by changes in expression of NMDA receptors, *Biochemistry*, 2017; 82(3):282-290
31. Frasca A, Aalbers M, Frigerio FM, Fiordaliso F, Salio M, Gobbi M, Cagnott, A, Gardoni F, Battaglia GS, Hoogland G, Di Luca M, Vezzani A, Misplaced receptors in epileptogenesis contribute to excitotoxicity, *Neurobiology of Disease*, 2011; 43(2): 507-515
32. Mikroulis AV, Psarropoulou C, Endogenous Ach effects on NMDA-induced interictal-like discharges along the septotemporal hippocampal axis of adult rats and their modulation by an early life generalized seizure, *Epilepsia*, 2012; 53(5):879-887
33. Postnikova TY, Diespirov GP, Amakhin DV, Vylekhzhanina EN, Soboleva EB, Zaitsev AV, Impairments of Long-Term Synaptic Plasticity in the Hippocampus of Young Rats during the Latent Phase of the Lithium-Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy, *International journal of Molecular Sciences*, 2021; 22(24): 1-21
34. Mathern GW, Pretorius JK, Mendoza D, Lozada A, Kornblum HI, Hippocampal AMPA and NMDA mRNA levels Correlate with aberrant fascia dentata mossy fiber sprouting in the pilocarpine model of spontaneous limbic epilepsy, *Journal of Neuroscience Research*, 1998; 54(6): 734-753
35. Di Maio R, Mastroberardino PG, Hu X, Montero L, Greenamyre T, Pilocarpine alters NMDAR expression and function in hippocampal neurons: NADPH oxidase and ERK1/2 mechanisms, *Neurobiology of Disease*, 2011; 42(3): 482-495
36. Yilmaz M, Naziroglu M, Kutluhan S, Yilmaz N, Yurekli VA, Vural H, Topiramate modulates hippocampus NMDA receptors via brain Ca²⁺ homeostasis in pentylenetetrazol-induced epilepsy of rats, *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 2011; 31(2):173-179
37. Zhu X, Dong J, Shen K, Bai Y, Zhang Y, Lv X, Chao J, Yao H, NMDA receptor NR2B subunits contribute to PTZ-kindling-induced hippocampal astrocytosis and oxidative stress, *Brain Research Bulletin*, 2015; 114: 70-78
38. Ekonomou A, Angelatou F, Upregulation of NMDA Receptors in Hippocampus and Cortex in the Pentylenetetrazol-Induced “Kindling” model of epilepsy, *Neurochemical Research*, 1999; 24(12): 1515-1522
39. Cremer CM, Palomero-Gallagher N, Bidmon HJ, Schleicher A, Speckmann EJ, Zilles K, Pentylenetetrazole-induced seizures affect binding site densities for GABA, glutamate and adenosine receptors in the rat brain, *Neuroscience*, 2009; 163(1): 490-499

40. Tirassa P, Costa N, Aloe L, CCK-8 prevents the development of kindling and regulates the GABA and NPY expression in the hippocampus of PTZ-treated adult rats, *Neuropharmacology*, 2005; 48(5):732-742
41. Wang Y, Tan B, Wang Y, Chen Z, Cholinergic signaling, neural excitability and epilepsy, *Molecules*, 2021; 26(8): 2258
42. Mega MS, Cummings JL, Salloway S, Malloy P, The limbic system: an anatomic, phylogenetic and clinical perspective, *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 1997; 9(3): 315-330
43. Werner F, Covenas R, Review: Classical neurotransmitters and neuropeptides involved in generalized epilepsy in a multi-neurotransmitter system: How to improve the antiepileptic effect?, *Epilepsy & Behavior*, 2017; 71: 124-129
44. Giorgi F, Galgani A, Gaglione A, Ferese R, Fornai F, Effects of prolonged seizures on basal forebrain cholinergic neurons: evidence and potential clinical relevance, *Neurotoxicity Research*, 2020; 38(2): 249-265
45. Baran H, Kepplinger B, Draxler M, Skofitsch G, Choline acetyltransferase, glutamic acid decarboxylase and somatostatin in the kainic acid model for chronic temporal lobe epilepsy, *Neurosignals*, 2004; 13(6): 290-297
46. Emson PC, Joseph MH, Neurochemical and morphological changes during the development of cobalt-induced epilepsy in the rat, *Brain Research*, 1975; 93(1): 61-110
47. Biagioni F, Gaglione A, Giorgi FS, Bucci D, Moyanova S, De Fusco A, Madonna M, Fornai F, Degeneration of cholinergic basal forebrain nuclei after focally evoked status epilepticus, *Neurobiology of Disease*, 2018; 121: 76-94
48. Rasgado LAV, Reyes GC, Diaz FV, Role of nitric oxide synthase on brain GABA transaminase activity and GABA levels, *Acta Pharm*, 2018; 68(3): 349-359
49. Chen Z, Mou R, Feng D, Wang Z, Chen G, The role of nitric oxide in stroke, *Medical Gas Research*, 2017; 7(3): 194-203
50. Kashihara K, Akiyama K, Kodama M, Kohira I, Abe I, Temporal changes in expression of neuronal nitric oxide synthase mRNA in the rat hippocampus associated with kainate-induced seizures, *Neurological Research*, 2000, 22(4):409-412
51. Tricoire L, Vitalis T, Neuronal nitric oxide synthase expressing neurons: a journey from birth to neuronal circuits, *Frontiers in Neural Circuits*, 2012; 6: 82
52. Zhu X, Dong J, Han B, Huang R, Zhang A, Xia Z, Chang H, Chao J, Yao H, Neuronal Nitric Oxide Synthase contributes to PTZ kindling epilepsy-induced hippocampal endoplasmic reticulum stress and oxidative damage, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2017; 11:377

53. Zhu X, Dong J, Shen K, Bai Y, Chao J, Yao H, Neuronal nitric oxide synthase contributes to pentylenetetrazole-kindling-induced hippocampal neurogenesis, *Brain Research Bulletin*, 2016; 121: 138-147
54. Rajasekaran K, Seizure-induced oxidative stress in rat brain regions: blockade by nNOS inhibition, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 2005; 80(2): 263-272
55. Kim D, Increased seizure susceptibility and up-regulation of nNOS expression in hippocampus following recurrent early-life seizures in rats, *J Korean Med*, 2010 28(6): 905-911
56. Ben-Ari Y, Holmes GL, Effects of seizures on developmental processes in the immature brain, *Lancet Neurol*, 2006; 5(12):1055-1063
57. Lopez-Picon F, Puustinen N, Kukko-Lukjanov T, Holopainen IE, Resistance of neurofilaments to degradation and lack of neuronal death and mossy fiber sprouting after kainic acid-induced status epilepticus in the developing rat hippocampus, *Neurobiology of Disease*, 2004; 17(3): 415-426
58. Sengupta P, The Laboratory Rat: Relating Its Age with Human's, *International Journal of Preventive Medicine*, 2013; 4(6): 624-630
59. Wasterlain CG, Niquet J, Thompson KW, Baldwin R, Liu H, Sankar R, Mazarati AM, Naylor D, Katsumori H, Suchomelova L, Shirasaka Y, Seizure-induced neuronal death in the immature brain, *Progress in Brain Research*, 2002; 135: 335-353
60. Sayin U, Hutchinson E, Meyerand ME, Sutula T, Age-dependent long-term structural and functional effects of early life seizures: evidence for a hippocampal critical period influencing plasticity in adulthood, *Neuroscience*, 2015; 288: 120-134
61. Löscher W, Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs, *Neurochemical Research*, 2017; 42(7): 1873-1888
62. Ramanjaneyulu R, Ticku MK, Interactions of pentamethylenetetrazole and tetrazole analogues with the picrotoxin site of the benzodiazepine-GABA receptor-ionophore complex, *European Journal of Pharmacology*, 1984; 98(3-4): 337-345
63. Zhvania MG, Ksovreli M, Japaridze NJ, Lordkipanidze TG, Ultrastructural changes to rat hippocampus in pentylenetetrazol and kainic acid-induced status epilepticus: a study using electron microscopy, *Micron*, 2015; 74: 22-29
64. Byrne JH, Heidelberger R, Waxham MN, From molecules to networks-An Introduction to Cellular and Molecular Neuroscience, 3rd Edition, Elsevier, 2014: 23-24
65. Kadar A, Wittmann G, Liposits Z, Fekete C, Improved method for combination of immunocytochemistry and Nissl staining, *J Neurosci Methods*, 2009; 184(1): 115-118

66. Dun NJ, Dun SL, Wong RKS, Forstermann U, Colocalization of nitric oxide synthase and somatostatin immunoreactivity in rat dentate hilar neurons, *Proc. Natl. Acad. Sci*, 1994; 91: 2955-2959
67. Bradford MN, A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry*, 1976; 72: 248-254
68. Lopez-Meraz M, Niquet J, Wasterlain CG, Distinct caspase pathways mediate necrosis and apoptosis in subpopulations of hippocampal neurons after status epilepticus, *Epilepsia*, 2010; 51(3): 56-60
69. Rutten A, Van Albada M, Silveira DC, Cha BH, Liu X, Hu YN, Cilio MR, Holmes GL, Memory impairment following status epilepticus in immature rats: time-course and environmental effects, *European Journal of Neuroscience*, 2002; 16: 501-513
70. Cilio MR, Sogawa Y, Cha BH, Liu X, Huang L, Holmes GL, Long-term Effects of Status Epilepticus in the Immature Brain Are Specific for Age and Model, *Epilepsia*, 2003 44(4):518–528
71. Sankar R, Shin D, Mazarati AM, Liu H, Katsumori H, Lezama R, Wasterlain CG. Epileptogenesis after status epilepticus reflects age- and model-dependent plasticity. *Ann Neurol*, 2000;48(4):580-9
72. Gusel'nikova VV, Korzhevskiy DE, NeuN as a neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker⁷⁰, *Acta Naturale*, 2015; 7(2): 42-47
73. Nitecka L, Tremblay E, Charton G, Bouillot JP, Berger ML, Ben-Ari Y, Maturation of kainic acid seizure-brain damage syndrome in the rat II. Histopathological sequelae, *Neuroscience*, 1984; 13(4): 1073-1094
74. Hall ED, Wang JA, Miller DM, Relationship of nitric oxide synthase induction to peroxynitrite-mediated oxidative damage during the first week after experimental traumatic brain injury, *Experimental Neurology*, 2012; 238(2): 176-182
75. Lopez-Picon FR, Uusi-Oukari M, Holopainen IE, Differential Expression and Localization of the Phosphorylated and Nonphosphorylated Neurofilaments During the Early Postnatal Development of Rat Hippocampus, *Hippocampus*, 2003; 13: 767–779
76. Zimmerman UJ, Schlaepfer WW, Characterization of a brain calcium-activated protease that degrades neurofilament proteins, *Biochemistry*, 1982; 21(17): 3977-3982
77. Ergina J L, Kovalenko AA, Zaitsev AV, The Role of NMDA Receptors in Epileptogenesis *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 2021; 51(6): 793-806
78. Dinocourt C, Petanjek Z, Freund T, Ben-Ari Y, Esclapez M, Loss of interneurons innervating pyramidal cell dendrites and axon initial segments in the CA1 region of the

- hippocampus following pilocarpine-induced seizures, *The Journal of Comparative Neurology*, 2003; 459: 407-425
79. Lanerolle NC, Kim JH, Robbins RJ, Spencer DD, Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy, *Brain Research*, 1989; 495: 387-395
80. Kubova H, Mares P, Suchomelova L, Brozek G, Druga R, Pitkanen A, Status epilepticus in immature rats leads to behavioural and cognitive impairment and epileptogenesis, *European Journal of Neuroscience*, 2004; 19: 3255-3265
81. Keser A, Balkan B, Gozen O, Kanit L, Pogun S, Hippocampal neuronal nitric oxide synthase (nNOS) is regulated by nicotine and stress in female but not in male rats, *Brain Research*, 2011; 1368: 134-142