



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα
Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Εκ νίνο Μελέτη της Επίδρασης Μεταβολικών Προσβολών στον Ιππόκαμπο Επίμυος

Κουρής Σπυρίδων

Μοριακός Βιολόγος

Λάρισα, Νοέμβριος 2022



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα
Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής



MASTER THESIS

***Ex vivo* Study of the Effect of Metabolic Insults on the
Rat Hippocampus**

Kouris Spyrodon

Molecular Biologist

Larissa, November 2022

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Άννα Βασιλάκη (Επιβλέπουσα Καθηγήτρια)

Επίκουρος Καθηγήτρια Φαρμακολογίας

Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευτυχία Ασπροδίνη

Καθηγήτρια Φαρμακολογίας

Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δημήτριος Μπόγδανος

Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων

Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Πρόλογος - Ευχαριστίες

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία, εκπονήθηκε στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών με αντικείμενο τις «Κλινικές Εφαρμογές της Μοριακής Ιατρικής», τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Συγκεκριμένα, αντικείμενο εστίασής της είναι οι μεταβολικές προσβολές της υπογλυκαιμίας, υποξίας και ισχαιμίας στον ιππόκαμπο αρουραίου. Οι εκτιμήσεις, τα συμπεράσματα αλλά και τα στατιστικά αποτελέσματα προέρχονται από δεδομένα που συλλέχτηκαν μετά από ανάλυση φωτογραφιών από το οπτικό μικροσκόπιο.

Στο σημείο αυτό, επιθυμώ να ευχαριστήσω:

*Την κυρία **Βασιλάκη Άννα**, Επίκουρη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας Τμήμα Ιατρικής ΠΘ, η οποία ανέλαβε με ευχαρίστηση την επίβλεψη της πορείας της διπλωματικής αυτής εργασίας, η οποία ανταποκρινόμενη θετικά στην πρότασή μου για συνεργασία, μου παρείχε τη δυνατότητα εστίασης της διπλωματικής εργασίας μου στην επίδραση μεταβολικών προσβολών στον ιππόκαμπο αρουραίου. Η προθυμία, οι κατευθύνσεις και η βοήθειά της, ήταν καθοριστικής σημασίας για την επιτυχή έκβαση της παρούσας εργασίας καθώς η μεταξύ μας επικοινωνία ήταν άριστη με την παροχή οποιασδήποτε συμβουλής και στήριξης, ανά πάσα χρονική στιγμή, χωρίς καμία αναβολή ή καθυστέρηση.*

*Την κυρία **Ασπροδίνη Ευτυχία**, Καθηγήτρια Φαρμακολογίας και την κ. **Χατζηευθυμίου Αποστολία** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας του οικείου Τμήματος Ιατρικής γιατί οι γνώσεις που μου μετέφεραν ήταν καθοριστικής σημασίας για την ολοκλήρωση της διπλωματικής εργασίας αυτής εργασίας.*

*Θα ήθελα ιδιαίτερα να ευχαριστήσω την μεταπτυχιακή συμφοιτήτριά κυρία **Τρισόκκα Παναγιώτα** η οποία μου παρείχε τα ιστολογικά παρασκευάσματα πάνω στα οποία εγώ δούλεψα.*

Ακόμη, σημαντικό ρόλο διαδραμάτισε, καθ' όλη τη διάρκεια της συγκεκριμένης εργασίας, η οικογένειά μου, καθώς χωρίς αυτήν δεν θα είχα φτάσει στο σημείο στο οποίο βρίσκομαι σήμερα. Η απεριόριστη στήριξη που μου παρέχει καθημερινά, αποτελεί την πηγή από την οποία αντλώ δύναμη για να προχωράω στο κάθε μου βήμα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ABSTRACT	2
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
Ιππόκαμπος	3
Ανατομία ιππόκαμπου	3
Κύτταρο-Αρχιτεκτονική Οργάνωση και Ιστολογία του Ιπποκάμπειου Σχηματισμού.....	4
Λειτουργίες του Ιππόκαμπου	12
Νευροδιαβιβαστές του Ιπποκάμπου	13
Αιμάτωση ιππόκαμπου	14
Ισχαιμία	15
Παθοφυσιολογία-βιοχημικές διεργασίες της ισχαιμίας	15
Υπογλυκαιμία.....	17
Ιππόκαμπος και ισχαιμία.....	20
Ιππόκαμπος και Υπογλυκαιμία	21
Πειραματική προσέγγιση της εγκεφαλικής ισχαιμίας	21
ΣΚΟΠΟΣ.....	23
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	24
Πειραματόζωα.....	24
Πειραματική Διαδικασία	24
Χρώση Cresyl Violet.....	24
Πρωτόκολλο.....	24
Ανοσοϊστοχημεία	25
Πρωτόκολλο.....	25
Ανάλυση εικόνας.....	25
Ανάλυση αποτελεσμάτων	25
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	26
Επίδραση υποξία, υπογλυκαιμία και ισχαιμία στη έκφραση των σωματιδίων Nissl.....	26
Επίδραση της ισχαιμίας στον αριθμό των κυττάρων.....	29
Επίδραση της ισχαιμίας στην έκφραση του GABA.....	32
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	34
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	37

Άρθρα	37
Ελληνική Βιβλιογραφία	43
Βιβλία	43
Ιστότοποι	43

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της άμεσης επίδρασης των μεταβολικών προσβολών της ισχαιμίας, υποξίας και υπογλυκαιμίας στον ιππόκαμπο του αρουραίου *ex vivo*.

Οι ιστοπαθολογικές αλλαγές που προκαλούν οι μεταβολικές αυτές προσβολές μελετήθηκαν με χρώση των σωματιδίων Nissl (χρωστική Cresyl Violet), ενώ, η επίδραση της ισχαιμίας στην GABAεργική νευροδιαβίβαση και τον συνολικό αριθμό των κυττάρων με τη βοήθεια του έμμεσου ανοσοφθορισμού των GABAεργικών κυττάρων και της χρώση των πυρήνων των κυττάρων με DAPI, αντίστοιχα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, 66 λεπτά *ex vivo* ισχαιμία, υποξία και υπογλυκαιμίας δεν είχαν κάποια στατιστικώς σημαντική επίδραση στην έκφραση των σωματιδίων Nissl στην πυραμιδική στοιβάδα των CA1 και CA3 περιοχών του ιπποκάμπου και στην κοκκώδη στοιβάδα της οδοντωτής έλικας. Επιπλέον, η ισχαιμία δεν έχει κάποια επίδραση στον αριθμό των κυττάρων στην πυραμιδική στοιβάδα των CA1 και CA3 περιοχών του ιπποκάμπου και στην κοκκώδη στοιβάδα της οδοντωτής έλικας ενώ προκάλεσε μείωση της ανοσοδραστικότητας για το GABA στην CA1 περιοχή και την οδοντωτή έλικα. Η μείωση της ανοσοδραστικότητας του GABA ήταν μικρότερη στην περίπτωση της CA3 περιοχής.

Συμπερασματικά, διαπιστώσαμε ότι, 66 λεπτά υποξίας, υπογλυκαιμίας και ισχαιμίας δεν έχουν κάποια εμφανή επίδραση στην ιστοπαθολογία του ιπποκάμπου (σήμανση των σωματιδίων Nissl). Επιπλέον, η ισχαιμία δεν έχει κάποια επίδραση στον θάνατο των πυραμιδικών και των κοκκωδών κυττάρου του ιπποκάμπου ενώ επηρεάζουν κατά διαφορετικό τρόπο την έκφραση του GABA στον ιστό. Η διαφορετική επίδραση της ισχαιμίας στην ανοσοδραστικότητα του GABA στην CA3 περιοχή του ιπποκάμπου έναντι των άλλων δύο περιοχών που μελετήθηκαν υπογραμμίζει την ανθεκτικότητα της περιοχής αυτής του ιπποκάμπου στην ισχαιμία. Περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες προκειμένου να διερευνηθούν διεξοδικά οι μηχανισμοί που οδηγούν στην διαφορετική αυτή ανοχή στην ισχαιμία της CA3 περιοχής του ιπποκάμπου.

ABSTRACT

The purpose of this work was to study the direct effects of ischemia, hypoxia and hypoglycemia on the rat hippocampus *ex vivo*.

The histopathological changes caused by these metabolic insults were studied by staining the Nissl particles, while, the effect of ischemia on GABAergic neurotransmission and total cell count with GABA-immunoreactivity and DAPI staining evaluation, respectively.

According to our results, 66 minutes of *ex vivo* ischemia, hypoxia or hypoglycemia had no statistically significant effect on Nissl particles expression on the pyramidal cell layer of the CA1 and CA3 hippocampal fields and the granular cell layer of the dentate gyrus. In addition, ischemia has no effect on the number of cells in the pyramidal layer of the CA1 and CA3 regions of the hippocampus and the granular layer of the dentate gyrus while it led to a decrease of GABA immunoreactivity in the CA1 region and the dentate gyrus. The decrease of GABA immunoreactivity in the CA3 hippocampal field was less prominent.

In conclusion, we found that 66 minutes of ischemia, hypoxia or hypoglycemia had no obvious effect on the rat hippocampus histopathology. Ischemia had no effect on the pyramidal and granular cell death while it had a differential effect on GABA immunoreactivity on the tissue. The differential effect of ischemia on the GABA immunoreactivity in the CA3 region of the hippocampus versus the other two regions studied highlights the resistance of this hippocampus region to ischemia. Further studies are necessary in order to thoroughly investigate the mechanisms that lead to the differential tolerance of the CA3 hippocampal region to ischemia.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο υπόκαμπος είναι από τις πιο καλά μελετημένες περιοχές του εγκεφάλου εξαιτίας του χαρακτηριστικού σχήματος και της ιστολογίας του και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις λειτουργίες της μνήμης και της μάθησης, ενώ εμπλέκεται και σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Το τρισυναπτικό δίκτυο συνδέσεων του υποκάμπου είναι απλό και έτσι δίνεται η ευκαιρία στους μελετητές να εξάγουν συμπεράσματα σχετικά με τη τα νευροδιαβιβαστικά κυκλώματα. Επίσης, προσφέρεται η δυνατότητα απομόνωσης τομών υποκάμπου και μελέτης του δικτύου σε *ex vivo* συνθήκες, κάτι που φαίνεται από την ευρεία χρήση του στη διεθνή βιβλιογραφία.

Έχουν πραγματοποιηθεί πάρα πολλές μελέτες της επίδρασης ισχαιμικών προσβολών στον υποκάμπο, προφανώς για τους λόγους που αναφέρθηκαν παραπάνω, αλλά και γιατί αποτελεί τομέα ενδιαφέροντος ανάπτυξης νέων φαρμάκων αλλά και μελέτης των νευροπροστατευτικών μηχανισμών που αναπτύσσονται έναντι της ισχαιμίας, υποξίας και υπογλυκαιμίας του ιστού.

Υπάρχει μεγάλη ετερογένεια παγκοσμίως στις μελέτες των συνθηκών και των πρωτοκόλλων πρόκλησης υποξίας, ισχαιμίας και υπογλυκαιμίας, αλλά σε γενικές γραμμές τα συμπεράσματα από όλες αυτές τις μελέτες συγκλίνουν στην βλαπτική επίδραση τους στον υποκάμπο.

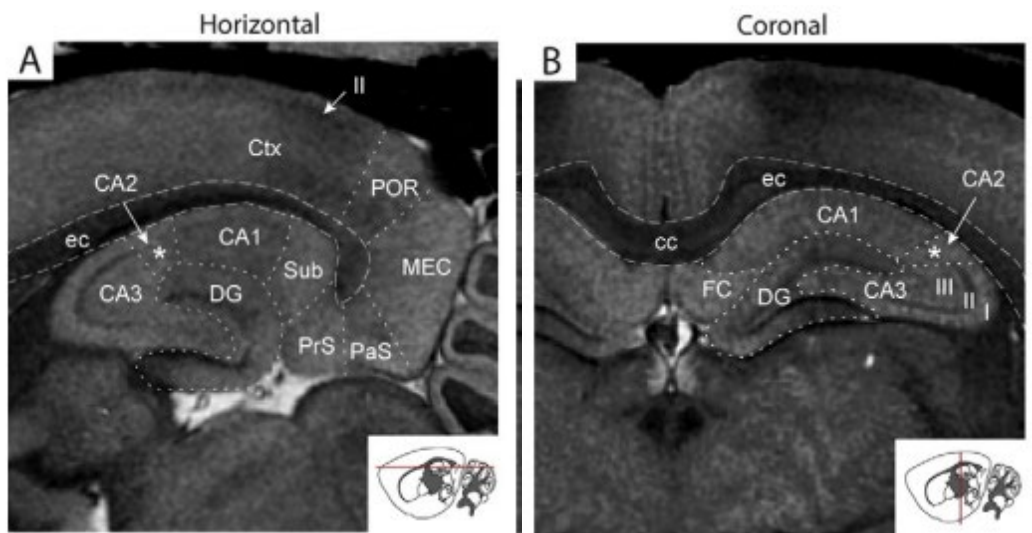
Υπόκαμπος

Ανατομία υποκάμπου

Η υποκάμπεια περιοχή αποτελείται από τον υποκάμπειο σχηματισμό και την παραϊπποκάμπεια περιοχή (Carraert και συν., 2014). Ο υποκάμπειος σχηματισμός έχει σχήμα C, και βρίσκεται εσωτερικά των ημισφαιρίων στον εγκέφαλο (Εικόνα 1), ενώ συνορεύει με το διάφραγμα ραχιαία και με την αμυγδαλή κοιλιακά. Έχει τη χαρακτηριστική οργάνωση του αλλοφλοιού με τρία στρώματα, το επιφανειακό (πολύμορφο με αραιούς νευρώνες), το ενδιάμεσο (πυκνό στρώμα βασικών κυττάρων) και το εσωτερικό (ινώδες πολύμορφο στρώμα). Ο υποκάμπειος σχηματισμός αποτελείται από τέσσερις υποπεριοχές, οι οποίες εκτίνονται από το εγγύς στο άπω κατά μήκος του εγκάρσιου άξονα, με την οδοντωτή έλικα (dentate gyrus DG) να καταλαμβάνει εγγύς και μέση περιοχή, ενώ πλευρικά υπάρχει το αμμώνιο κέρας (cornu ammonis (CA) με τις τρεις υποπεριοχές του (CA1, CA2, CA3), και το υπόθεμα (subiculum). Η τέταρτη υποπεριοχή είναι το φαιό ταινίδιο (fasciola cinereum) το οποίο εκτείνεται ενδιάμεσα του επιμήκη άξονα του υποκάμπειου σχηματισμού (Εικόνα 2). Η παραϊπποκάμπεια περιοχή περιλαμβάνει πολλές φλοιϊκές περιοχές οι οποίες συνδέονται αμοιβαία με τον υποκάμπειο σχηματισμό. (Carraert και συν., 2014). Η παραϊπποκάμπεια περιοχή περιλαμβάνει το προϋπόθεμα, παραϋπόθεμα, ενδορινικό φλοιό (με την ενδιάμεση και πλευρική περιοχή), περιρρινικό φλοιό (περιλαμβάνονται οι περιοχές 35 και 36) και τον μεταρρινικό φλοιό (Εικόνα 2).



Εικόνα 1 Ιπποκάμπειος σχηματισμός και παραϊπποκάμπεια περιοχή του επίμυος. Τρισδιάστατη απεικόνιση του ιπποκάμπειου σχηματισμού με το χαρακτηριστικό C σχήμα (L.J. Kjonigsen και συν. 2015).



Εικόνα 2 Απεικόνιση του ιπποκάμπειου σχηματισμού όπως φαίνεται στην μαγνητική τομογραφία στην ακολουθία T2, A) οριζόντια και B) στεφανιαία διατομή. Ο αστερίσκος σημαδεύει την απουσία της σκοτεινής ζώνης II στην CA2. CA1: αμμώννιο κέρασ 1, CA2: αμμώννιο κέρασ 2; CA3: αμμώννιο κέρασ 3; cc: μεσολόβιο; Ctx: νεοφλοιός; DG: οδοντωτή έλικα; ec: έξω κάψα; EC: ενδορινικός φλοιός; FC: φαιό ταινίδιο; MEC: μέσος ενδορινικός φλοιός; PaS: παραυπόθεμα; POR: μεταρινικός φλοιός; PrS: προυπόθεμα; Sub: υπόθεμα. (L.J. Kjonigsen και συν. 2015)

Κύτταρο-Αρχιτεκτονική Οργάνωση και Ιστολογία του Ιπποκάμπειου Σχηματισμού

Η μικροσκοπική δομή του ιπποκάμπειου σχηματισμού στα τρωκτικά μελετήθηκε εκτενώς από τον Cajal (1911) και τον μαθητή του Lorente de No (1934).

Οδοντωτή Έλικα

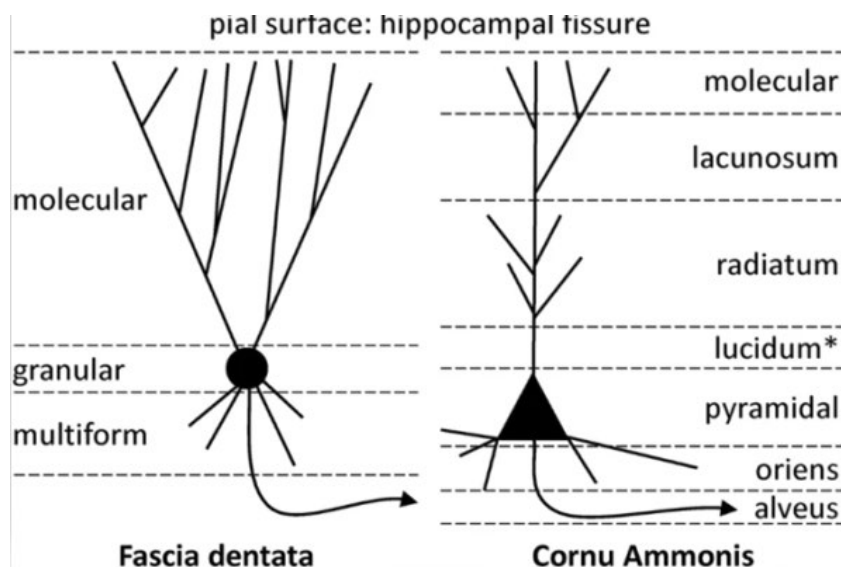
Η οδοντωτή έλικας απαρτίζεται από τρεις στιβάδες (Εικόνα 3):

- **Μοριώδης στιβάδα** (molecular layer, ML): Βρίσκεται επιφανειακά, κοντά στην ιπποκάμπεια σχισμή και είναι σχετικά ελεύθερη κυττάρων στοιβάδα. Στους επίμυες, αυτό το στρώμα έχει πάχος περίπου 250μm.

- **Κοκκιώδης στιβάδα** (granular cell layer, GL): Αποτελεί την κύρια κυτταρική στοιβάδα της οδοντωτής έλικας και βρίσκεται βαθύτερα της μοριώδης στοιβάδας και αποτελεί πυκνή στοιβάδα κυττάρων (κινοσειδή κοκκιώδη κύτταρα) (πάχους 4-8 κοκκιωδών κυττάρων) και είναι πυκνά διατεταγμένα σε στήλες

Η κοκκιώδης και η μοριώδης στοιβάδα αναφέρονται μαζί ως οδοντωτή ταινία (fascia dentata) και έχουν σχήμα V ή U και περικλείουν μια κυτταρική περιοχή, την πολύμορφη στοιβάδα, η οποία είναι το τρίτο στρώμα κυττάρων της οδοντωτής έλικας

- **Πολύμορφη στιβάδα** ή πύλη της οδοντωτής έλικας (Hilus, H): περιέχει με ποικιλία νευρικά κύτταρα με πιο κοινά τα βρυώδη κύτταρα (mossy cells, Amaral και Witter, 1995)



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση των δομών των στοιβάδων της οδοντωτής ταινίας στα αριστερά και του αμμώνειου κέρατος δεξιά. Σημειούται η διαηγής στοιβάδα με αστερίσκο και παρατηρείται μόνο στο αμμώνειο κέρατος και μάλιστα στις CA3 και CA4 περιοχές και περιλαμβάνει μόνο λεπτό στρώμα πυραμιδικών κυττάρων. Οι άξονες σημειούνται με καμπυλωτές γραμμές με βέλη. (από Palomero-Gallagher και συν 2020).

Νευρώνες οδοντωτής έλικας

Κοκκιώδες κύτταρο της οδοντωτής έλικας ()

Το βασικό κύτταρο της οδοντωτής έλικας είναι το **κοκκιώδες κύτταρο** (Granule cell, Εικόνα 3). Έχει ελλειπτικό κυτταρικό σώμα. Κάθε κύτταρο βρίσκεται δίπλα σε κάποιο άλλο και στις περισσότερες περιπτώσεις δεν μεσολαβεί μεταξύ τους γλοία. Το κοκκιώδες κύτταρο έχει χαρακτηριστικού σχήματος δενδρίτες που μοιάζουν με πεύκο, που εκτείνονται επιφανειακά ως τη μοριώδη στοιβάδα. Το κοκκιώδες κύτταρο είναι το μόνο κύτταρο που δίνει άξονες οι οποίοι φεύγουν από την οδοντωτή έλικα και εισέρχονται σε άλλες ιπποκάμπειες περιοχές πχ. CA3 (Amaral και Witter, 1995). Πρόκειται για διεγερτικούς νευρώνες.

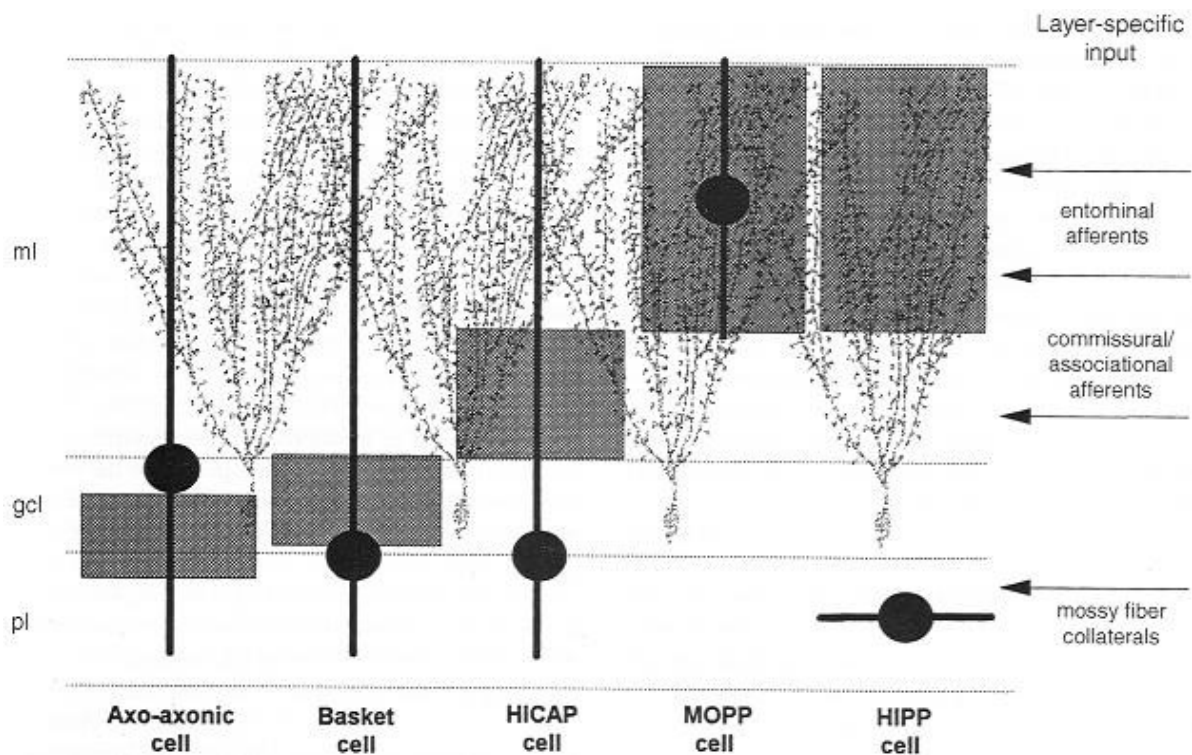
Καλαθοειδές κύτταρο (basket cell)

Ο πιο εκτενώς μελετημένος ενδονευρώνας είναι το πυραμιδικό **καλαθοειδές κύτταρο**.

Εντοπίζονται στη βαθύτερη επιφάνεια της κοκκιώδους στοιβάδας, έχουν κυτταρικά σώματα με μορφή πυραμίδας (Εικόνα 4). Ο όρος καλαθοειδή αναφέρεται στο γεγονός ότι οι άξονές τους περιβάλλουν τα κοκκιώδη κύτταρα και σχηματίζουν συνάψεις με αυτά. Ο Cajal περιέγραψε το πυραμιδικό καλαθοειδές κύτταρο ως κύτταρο που έχει ένα μόνο κορυφαίο δενδρίτη ο οποίος φτάνει ως την μοριώδη στοιβάδα και πολλούς βασικούς δενδρίτες στην πολύμορφη στοιβάδα. Περιέχουν βιοχημικούς δείκτες για την ανασταλτική δράση του GABA (Ribak και συν., 1978).

Άλλοι τύποι ενδονευρώνων

Υπάρχει σημαντικός αριθμός ενδονευρώνων οι οποίοι αναγνωρίστηκαν στον ιπποκάμπο επίμουσ. Αναλυτική περιγραφή των χαρακτηριστικών τους δημοσιεύτηκε από Freund and Buzsaki (1996). Οι ιπποκάμπειοι ενδονευρώνες έχουν διαφορετικές λειτουργίες. Πολλοί GABAεργικοί. Οι ενδονευρώνες αυτοί περιγράφονται παρακάτω (Εικόνα 4).



Εικόνα 4 Μορφολογική ταξινόμηση ενδονευρώνων στην οδοντωτή έλικα ποντικού. Οι κύκλοι αντιστοιχούν στα κυτταρικά σώματα και οι λεπτές γραμμές δείχνουν τον προσανατολισμό και την κατανομή των δενδριτών. Τα κοκκιώδη κύτταρα της οδοντωτής έλικας απεικονίζονται ως γκρι περιοχές στο βάθος της εικόνας και έτσι παρέχεται ένδειξη για το ποιες περιοχές νευρώνονται από ποιον ενδονευρώνα. Από Freund and Buzsaki, 1996.) *The Hippocampus Book*

Νευρώνες της μοριώδους στοιβάδας

Η μοριώδης στοιβάδα αποτελείται κυρίως από τους δενδρίτες των κοκκιώδων κυττάρων, καλαθοφόρων και πολύμορφων κυττάρων καθώς και άξονες από τον ενδορινικό φλοιό. Τουλάχιστον δύο τύποι νευρώνων έχουν περιγραφεί στην μοριώδη στοιβάδα. Ο πρώτος εντοπίζεται βαθιά στη μοριώδη στοιβάδα και έχει τριγωνικό κυτταρικό σώμα, ενώ ο άξονας του

φτάνει στα εξωτερικά 2/3 της μοριώδους στοιβάδας. Αυτός ο νευρώνας, είναι ενδονευρώνας και οι δενδρίτες του παραμένουν στην μοριώδη στοιβάδα, ονομάζεται **MOPP κύτταρο** (molecular layer perforant path-associated cell) όρος προτάθηκε από Han και συν. (1993, Εικόνα 4).

Ο Frotscher περιέγραψε έναν δεύτερο τύπο νευρώνα στη μοριώδη στοιβάδα που μοιάζει με πολυέλαιο, και ονομάζονται **αξονο-αξονικά κύτταρα** (axo-axonic cell). Αυτά πρόσκεινται στην κοκκιώδη στοιβάδα ή και μέσα σε αυτήν. Τα αξονο-αξονικά κύτταρα ονομάστηκαν έτσι γιατί οι άξονες αρχίζουν από την μοριώδη στοιβάδα και φτάνουν στην κοκκιώδη στους άξονες των κοκκιωδων κυττάρων. Είναι ανασταλτικοί GABAεργικοί νευρώνες (Εικόνα 4).

Άλλοι νευρώνες με τα κυτταρικά τους σώματα στη μοριώδη στοιβάδα είναι οι **IS** (interneuron-specific) οι οποίοι ειδικεύονται στον τερματισμό άλλων ενδονευρώνων. Οι IS νευρώνες απεικονίστηκαν με τη χρήση ανοσοιστοχημείας για το VIP πεπτίδιο και οι άξονές τους υπερπηδούν τους δενδρίτες των O-LM και HIPP κυττάρων (Εικόνα 4).

Νευρώνες της πολύμορφης στοιβάδας

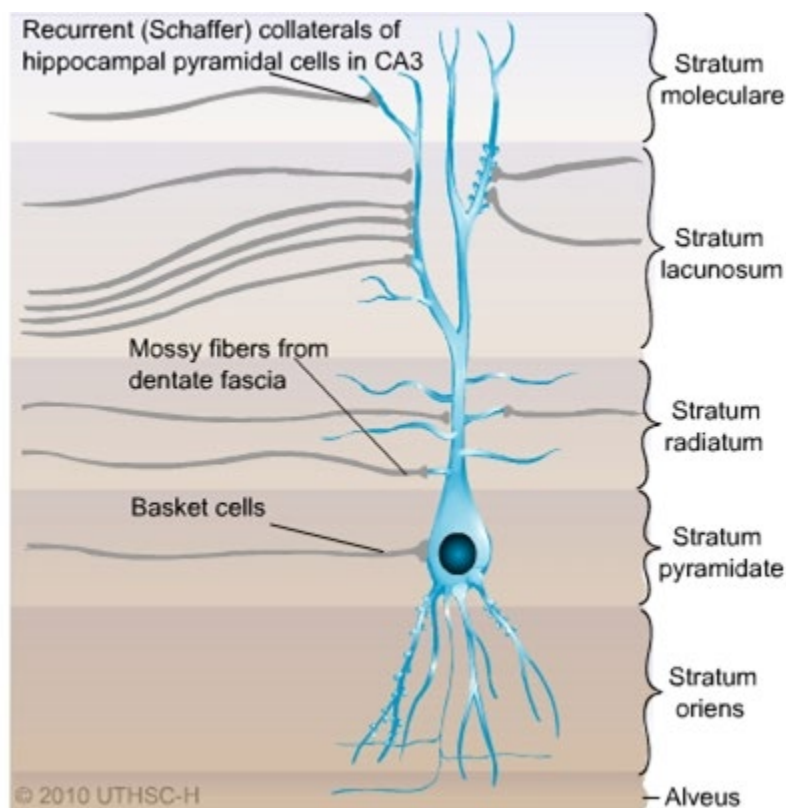
Η πολύμορφη στοιβάδα περιέχει ποικιλία νευρώνων. Ο πιο κοινός τύπος και ο πιο εντυπωσιακός είναι τα **βρυώδη κύτταρα**. Τα κυτταρικά σώματα των νευρώνων αυτών είναι μεγάλα και είναι συνήθως τριγωνικά σε σχήμα. Τρεις ή περισσότεροι παχύς δενδρίτες ξεκινούν από το κυτταρικό σώμα και εκτείνονται στην πολύμορφη στοιβάδα. Κάθε βασικός δενδρίτης διχάζεται μία ή δύο φορές και δίνει πολλούς κλάδους. Αν και οι περισσότεροι κλάδοι παραμένουν στην πολύμορφη στοιβάδα, ένας τυχαίος δενδρίτης εισχωρεί στην κοκκιώδη στοιβάδα και εισέρχεται στην μοριώδη στοιβάδα. Οι δενδρίτες των βρυώδων κυττάρων δεν εισέρχονται σχεδόν ποτέ στην προσκείμενη CA3 περιοχή. Το πιο διακριτικό χαρακτηριστικό των βρυωδών κυττάρων είναι ότι όλοι οι εγγύς δενδρίτες καλύπτονται από μεγάλες ακανθώδεις προεκβολές. Είναι ανοσοαντιδραστικοί στο γλουταμικό οξύ για αυτό και είναι διεγερτικοί νευρώνες. Δίνουν άξονες που προβάλλουν στο εσωτερικό 1/3 της μοριώδους στοιβάδας και στην οδοντωτή έλικα. Τα βρυώδη κύτταρα είναι η κύρια οδός που εισέρχεται στην οδοντωτή έλικα.

Υπάρχουν επίσης ένας αριθμός πολύμορφων κυττάρων στην πολυμορφική στοιβάδα. Ένας τύπος κυττάρων έχει μακρύ πολυπολικό σχήμα και περιγράφηκε από τον Amaral (1978) και ονομάζεται κύτταρο **HIPP** (hilar perforant path-associated cell). Αυτά έχουν δύο ή τρεις βασικούς δενδρίτες που ξεκινούν από τα HIPP κύτταρα και διατρέχουν την κοκκιώδη στοιβάδα (Εικόνα 4). Με ενδοκυτταριες τεχνικές χρώσης αποκαλύφθηκε ότι αυτά τα κύτταρα έχουν άξονες που φτάνουν στα εξωτερικά 2/3 της μοριώδους στοιβάδας και λέγεται οδός των διατιτραίνουσών ινών. Ένα θαυμαστό χαρακτηριστικό αυτών των νευρώνων είναι ότι το αξονικό τους πλέγμα εκτείνεται 3,5 mm κατά μήκος διαφραγματοκροταφικά της οδοντωτής έλικας. Είναι ανασταλτικοί νευρώνες.

Υπάρχουν και άλλα πολυπολικά ή τριγωνικά κύτταρα στην πολύμορφη στοιβάδα με λεπτούς και χωρίς άκανθες δενδρίτες που εκτείνονται μεταξύ hilus(πύλη της οδοντωτής έλικας) και μοριώδους στοιβάδας. Οι άξονες αυτών των **HICAP** κυττάρων (hilar commissural-associational pathwayrelated cells) εκτείνονται διαμέσου της κοκκιώδους στοιβάδας και φτάνουν στο εσωτερικό 1/3 της πολύμορφης στοιβάδας .

Αμμώνειο Κέρας ή Κυρίως ιππόκαμπος

Στο Αμμώνειο κέρας διακρίνονται οι εξής στιβάδες καθ' όλο το μήκος του ιπποκάμπου (Εικόνα 5):



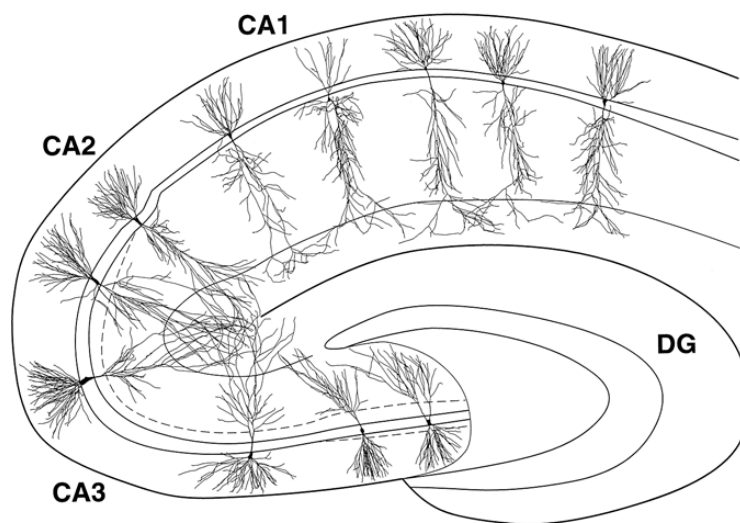
Εικόνα 5 Στοιβάδες αμμώνειου κέρατος

- η **σκάφη** (alveus): είναι η λεπτή και περιέχει ίνες νευρικών κυττάρων
- η στιβάδα των **πολύμορφων κυττάρων** (stratum oriens): Η στενή και σχετικώς ακυτταρική στοιβάδα και βρίσκεται βαθύτερα της πυραμιδικής στοιβάδας. Αποτελείται από τους βασικούς δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων και πολλούς ενδονευρώνες. Ονομάζεται επίσης και ενδοπυραμιδική περιοχή όπου υπάρχουν συνδέσεις μεταξύ των CA3 υποπεριοχών, αλλά και από το CA3 στο CA1 μέσω ιών του Schaffer.
- η **πυραμιδική στιβάδα** (stratum pyramidale): Είναι η βασική στοιβάδα του ιπποκάμπου, περιλαμβάνει τα κυτταρικά σώματα των πυραμιδικών νευρώνων που αποτελούν τους κυρίως νευρώνες του Αμμώνειου κέρατος.
- η **διαφανής στιβάδα** (stratum lucidum). Στην CA3 και όχι στην CA2 και CA1 υποπεριοχή, βρίσκεται μια στενή ακυτταρική ζώνη, η stratum lucidum, η οποία αποτελείται από βρωύδη κύτταρα
- η **ακτινωτή στιβάδα** (stratum radiatum): βρίσκεται πιο επιφανειακά της stratum lucidum στη CA3 περιοχή και κάτω από την πυραμιδική στιβάδα στη CA2 και CA1 περιοχή. Ορίζεται και ως υπερπυραμιδική περιοχή όπου υπάρχουν συνδέσεις μεταξύ των CA3 υποπεριοχών, αλλά και από το CA3 στο CA1 μέσω ιών του Schaffer.

- η **βοθριώδης-μοριώδης στιβάδα** (stratum lacunosum-moleculare). Είναι η πιο επιφανειακή στοιβάδα του κυρίως ιππόκαμπου. Σε αυτό το στρώμα τερματίζουν οι ίνες που προέρχονται από τον ενδορινικό φλοιό, και τον θάλαμο. Τόσο η βοθριώδης-μοριώδης στιβάδα (stratum lacunosum-moleculare) αλλά και η ακτινωτή στιβάδα (stratum radiatum) περιέχουν ποικιλία ενδονευρώνων, (Andersen και συν., 2007)

Νευρώνες Αμμώνειου Κέρατος

Ο κύριος νευρώνας του Αμμώνειου κέρατος είναι το **πυραμιδικό κύτταρο**, και η ονομασία του οφείλεται στο σχήμα του σώματός του (Εικόνα 6). Έχει διαφορετικό μέγεθος στις τρεις περιοχές καθώς και διαφορετικές διασυνδέσεις. Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται τα πυραμιδικά κύτταρα και οι διαφορές τους στις ξεχωριστές περιοχές του ιππόκαμπου.



Εικόνα 6. Σύνοψη της οργάνωσης των πυραμιδικών κυττάρων στις περιοχές CA3, CA2, και CA1 του ιππόκαμπου. Οι στικτές γραμμές στην CA3 ορίζουν την περιοχή που καταλαμβάνεται από ενδοπυραμιδικές και υπερπυραμιδικές ινώδεις ίνες (Adapted from Ishizuka και συν., 1995).

Πυραμιδικά κύτταρα της περιοχής CA3 και CA2

Ο κύριος νευρώνας του ιππόκαμπου είναι το **πυραμιδικό κύτταρο**, και αποτελεί το πιο σημαντικό νευρώνα της πυραμιδικής στοιβάδας. Τα πυραμιδικά κύτταρα έχουν ένα βασικό δενδρίτη ο οποίος εκτείνεται στην στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων (stratum oriens) και έναν άπω δενδρίτη που εκτείνεται ως την υποκάμπεια σχισμή.

Ο Ishizuka και οι συνεργάτες (1995) μελέτησαν το μήκος του δενδρίτη και την οργάνωση των CA3 πυραμιδικών κυττάρων. Το μικρότερο σε μέγεθος πυραμιδικό κύτταρο βρίσκεται στο άκρο της στοιβάδας κοντά στην οδοντωτή έλικα, ενώ το μεγαλύτερο στις πιο απομακρυσμένες περιοχές. Η κατανομή των δενδριτών των CA3 πυραμιδικών κυττάρων ποικίλλει ανάλογα με το που βρίσκεται το κυτταρικό σώμα. Έτσι, πυραμιδικά κύτταρα κοντά στην οδοντωτή έλικα έχουν λίγους ή καθόλου δενδρίτες που να εκτείνονται ως την βοθριώδης-μοριώδης στιβάδα, και αυτά τα κύτταρα λαμβάνουν λίγες ή καθόλου προσαγωγές ίνες από τον ενδορινικό φλοιό. Τα κύτταρα αυτά όμως

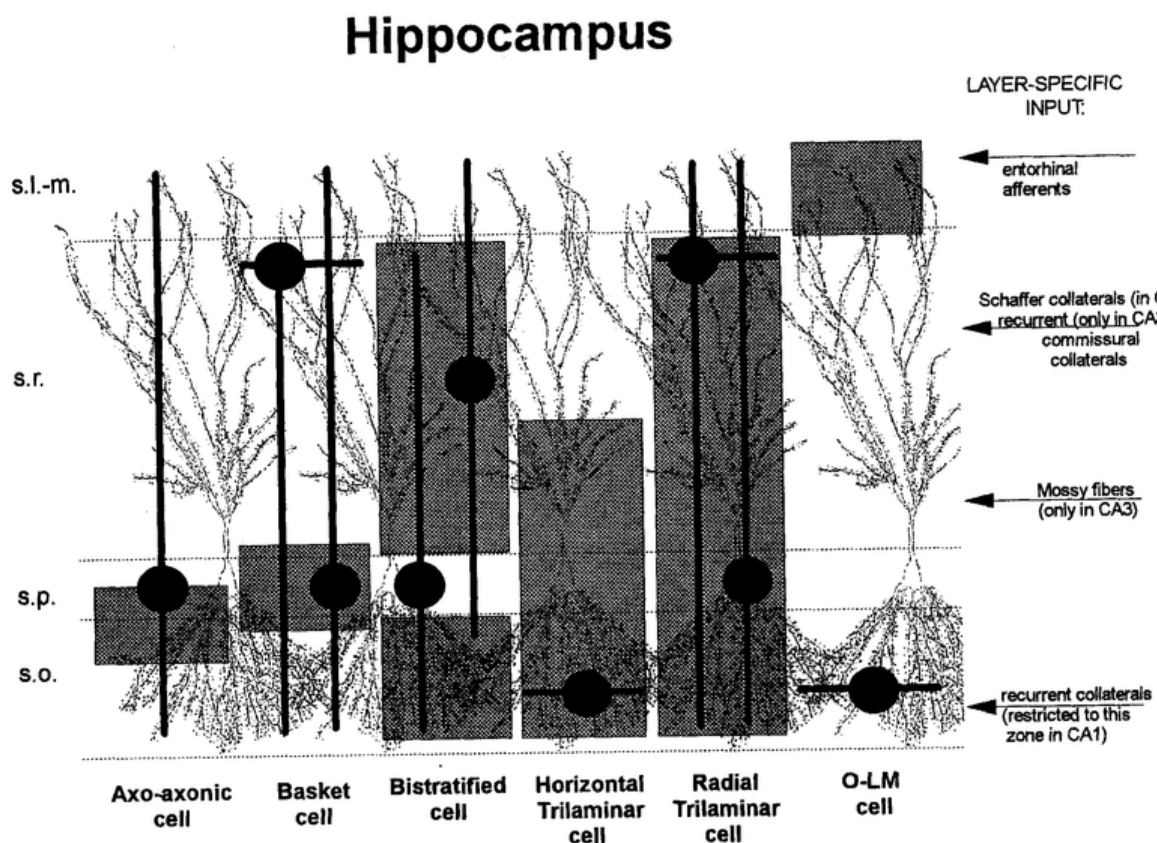
λαμβάνουν μεγάλο αριθμό βρυωδών ινών στους βασικούς και άπω δενδρίτες.

Πυραμιδικό κύτταρο της CA1 υποπεριοχής

Τα CA1 πυραμιδικά κύτταρα (Εικόνα 10) παρουσιάζουν ομογένεια στους δενδρίτες (Ishizuka και συν., 1995). Καθώς αυτά είναι πιο ομοιογενή, είναι και μικρότερα από τα CA3 πυραμιδικά κύτταρα. Ανεξάρτητα με το που βρίσκεται το σώμα των πυραμιδικών κυττάρων στην CA1 περιοχή, όλοι έχουν το ίδιο μήκος δενδριτών και την ίδια κατανομή. Μερικά πυραμιδικά κύτταρα έχουν έναν άπω δενδρίτη, ενώ άλλα έχουν δύο. Παρόλη την ανατομική ομοιογένεια, δεν υπάρχει και λειτουργική ομοιογένεια.

Ενδονευρώνες

Οι πυραμιδικοί νευρώνες είναι οι πιο πολυπληθείς νευρώνες στον ιππόκαμπο. Όπως στην οδοντωτή έλικα, υπάρχει μια ετερογένεια ενδονευρώνων που κατανέμονται σε όλες τις στοιβάδες του κυρίως ιππόκαμπου. (Freund and Buzsaki, 1996).



Εικόνα 7 Ενδονευρώνες στην περιοχή CA3/CA1. Σχηματική απεικόνιση και ταξινόμηση των ενδονευρώνων του αμμόνιου κέρατος του αρουραίου. Οι μαύροι κύκλοι δείχνουν τη θέση των κυτταρικών σωμάτων και οι μαύρες γραμμές τον προσανατολισμό και την κατανομή των δενδριτών τους, ενώ οι γκρι περιοχές τις αξονικές προβολές σε σχέση με τα πυραμιδικά κύτταρα που φαίνονται στο βάθος (Freund & Buzsaki, 1996).

Οι ενδονευρώνες διακρίνονται στις εξής υποκατηγορίες (Εικόνα 7):

- **καλαθοφόρα κύτταρα (basket cells)**. Τα πυραμιδικά καλαθοφόρα κύτταρα είναι κοντά ή/και βρίσκονται μέσα στην πυραμιδική στοιβάδα του κυρίως ιππόκαμπου και οι δενδρίτες τους εκτείνονται ως την στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων (stratum oriens), ακτινωτή στιβάδα (stratum radiatum) και βοθριώδης-μοριώδης στιβάδα (stratum lacunosum-moleculare). Αυτοί οι δενδρίτες μοιάζουν με χάντρες και δεν έχουν άκανθες και λαμβάνουν συμμετρικές και ασύμμετρες συνάψεις. Κάθε πυραμιδικό κύτταρο δημιουργεί μία μόνο σύναψη με ένα καλαθοφόρο κύτταρο. Οι νευράξονες αυτών των καλαθοφόρων κυττάρων έχουν ποικίλη μορφολογία. Έχουν ατρακτοειδές σχήμα στην stratum oriens και αστεροειδές σχήμα στην stratum radiatum. Σε κάθε περίπτωση, οι άξονες αυτών των ενδονευρώνων, νευρώνουν το σώμα και τους εγγύς δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων. Τα καλαθοφόρα κύτταρα έχουν ανασταλτική δράση επί των πυραμιδικών νευρώνων.
- **άξονο-αξονικά κύτταρα ή chandelier cells**. Τα αξονο-αξονικά ή chandelier κύτταρα που βρίσκονται στον κυρίως ιππόκαμπο είναι όμοια με αυτά της οδοντωτής έλικας. Τα κυτταρικά σώματα είναι κοντά ή/και βρίσκονται μέσα στην πυραμιδική στοιβάδα και οι δενδρίτες διατρέχουν τις στοιβάδες του ιππόκαμπου. Οι άξονες έχουν εγκάρσια εξάπλωση 1mm.
- **διστιβαδωτά κύτταρα (bistratified cells)**. Το σώμα βρίσκεται κοντά στα πυραμιδικά κύτταρα, οι δενδρίτες είναι πολυπολικοί αλλά δεν φτάνουν στην βοθριώδης-μοριώδης στιβάδα (stratum lacunosum-moleculare) και οι άξονες στέλνουν συνδέσεις στην stratum oriens και βαθιά στην stratum radiatum όπου σχηματίζουν πυκνό δίκτυο. Οι εξερχόμενες ίνες φτάνουν και δημιουργούν συνδέσεις με την CA3 υποπεριοχή και με τις ίνες του Schaffer στην CA1.
- **O-LM κύτταρα (lacunosum-moleculare cells)**. Έχουν ως χαρακτηριστικό τους έναν πυκνό αξονικό κλάδο που φτάνει ως την βοθριώδη-μοριώδη στιβάδα (stratum lacunosum-moleculare). Η κατανομή του σώματος αυτών των ενδονευρώνων ποικίλει και εξαρτάται από ποια ιπποκάμπεια περιοχή βρίσκονται. Το σώμα και οι δενδρίτες βρίσκονται στην πυραμιδική στοιβάδα. Συγκεκριμένα για την CA3 φτάνουν σε όλες τις στοιβάδες εκτός της βοθριωδομοριώδους, αλλά στην CA1 μόνο στην stratum oriens. Οι άξονες των O-LM αφήνουν την stratum oriens και κατευθύνονται στην stratum lacunosum-moleculare. Αυτοί οι άξονες σχηματίζουν συμμετρικές συνάψεις με τους άπω δενδρίτες των πυραμιδικών νευρώνων. Οι περισσότερες διεγερτικές είσοδοι στην O-LM προέρχονται από τα πυραμιδικά κύτταρα, και έτσι αυτοί οι ενδονευρώνες έχουν ανασταλτική δράση στους άπω δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων με τρόπο δισυναπτικής ανατροφοδότησης.
- **τριστιβαδωτά κύτταρα (trilaminar cells)**
- **κύτταρα της ακτινωτής στιβάδας (stratum radiatum cells)** Οι ενδονευρώνες αυτοί βρίσκονται στην ακτινωτή στοιβάδα και οι αστεροειδείς ή ατρακτοειδείς δενδρίτες βρίσκονται σε αυτή τη στοιβάδα. Οι άξονές τους διακλαδίζονται στην ακτινωτή στοιβάδα.
- **κύτταρα της μοριώδους-βοθριώδους στιβάδας (stratum lacunosummoleculare cells-LM neurons)**. Έχουν δενδρίτες που προσανατολίζονται οριζόντια, αλλά κάποιοι κλάδοι φτάνουν

ως την πυραμιδική στοιβάδα. Ο νευράξονας έχει οριζόντιο προσανατολισμό και διακλαδίζεται κυρίως στην μοριώδης-βοθριώδης στιβάδα. Οι ακριβείς συνδέσεις τους δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως

- **IS νευρώνες (interneuron-selective):** Εντοπίζονται σε όλες τις στιβάδες και αναγνωρίζονται με χρώση αντισωμάτων έναντι στην ασβεστιο δεσμευτική πρωτεΐνη καλρετινίνη. Χαρακτηριστικό τους είναι ότι συνάπτονται μόνο με τους δενδρίτες των άλλων IS ενδονευρώνων

Όλοι οι ενδονευρώνες που περιγράφηκαν είναι GABAεργικοί.

Υπόθεμα

Οι κύριες κυτταρικές του στιβάδες είναι η **πυραμιδική**, και η **μοριώδης**.

Νευρώνες υποθέματος

Η κύρια στοιβάδα του υποθέματος αποτελείται από μεγάλους πυραμιδικούς νευρώνες. Αυτή η στοιβάδα ξεκινά ακριβώς κάτω από το άπω τέλος του CA1 και συνεχίζει βαθιά μέσα στο υπόθεμα. Αυτά τα κύτταρα είναι σχετικά όμοια σε μέγεθος και σχήμα, και οι κορυφαίοι δενδρίτες εκτείνονται ως τη μοριώδη στοιβάδα, ενώ οι δενδρίτες της βάσης στα βαθύτερα στρώματα της πυραμιδικής στοιβάδας. Δύο κυτταρικοί τύποι έχουν περιγραφεί : τα κανονικά spiking κύτταρα και τα bursting κύτταρα (Greene and Totterdell, 1997). Αν και δεν διαφέρουν στα μορφολογικά χαρακτηριστικά, παρουσιάζουν διαφορετική κατανομή στη πυραμιδική στοιβάδα. Τα bursting cells είναι περισσότερα στην βαθύτερη πυραμιδική στοιβάδα, ενώ τα spiking είναι πιο κοινά στην επιφανειακή στοιβάδα. Και οι δύο κυτταρικοί τύποι είναι προσεκβάλλοντες νευρώνες, αλλά διαφέρουν στο που συνδέονται. Μόνο τα bursting cells στάνουν ως τον ενδορινικό φλοιό. Ανάμεσα στα πυραμιδικά κύτταρα, υπάρχουν και άλλοι μικρότεροι νευρώνες, που πιθανά να αντιπροσωπεύουν τους ενδονευρώνες του υποθέματος. Λίγα είναι γνωστά για το αν οι ενδονευρώνες του υποθέματος είναι όμοιοι με αυτούς του κυρίως ιππόκαμπου. Υποπληθυσμοί αυτών των νευρώνων είναι GABAεργικά κύτταρα που βάζονται με τη χρώση παρβαλβουμίνη. (Amaral, D. G., & Lavenex, P. The Hippocampus Book, Oxford University Press, 2007)

Λειτουργίες του Ιππόκαμπου

Η βασική λειτουργία του ιππόκαμπου στον άνθρωπο είναι να στηρίζει τη δηλωτική και βιωματική μνήμη (Cohen & Squire, 1980). Επίσης ο ιππόκαμπος είναι υπεύθυνος για τη συγκρότηση συσχετιστικών αναπαραστάσεων, οι οποίες συνδέουν στη μνήμη ποικίλα στοιχεία των βιωματικών εμπειριών σε ένα συνεκτικό μνημονικό κρίωμα ή μνημονικό χώρο (Eichenbaum και συν., 1999, Konkel & Cohen, 2009). Σημαντικός είναι ο ρόλος του ιππόκαμπου στην πλοήγηση στον χώρο και τη χωρική μάθηση και μνήμη (O'Keefe και συν 1998). Ο ιππόκαμπος έχει καθοριστική συμμετοχή στη διεργασία της μνημονικής παγίωσης, δηλαδή της διεργασίας μέσω των οποίων οι νέες εμπειρίες συγκρατούνται στον εγκέφαλο μακροπρόθεσμα (Wang & Morris, 2010). Συνεπώς, ο ιππόκαμπος είναι υπεύθυνος για τη δημιουργία αναπαραστάσεων πολύπλοκων συνειρμικών σχέσεων μεταξύ πολυποίκιλων στοιχείων της εμπειρίας (Eichenbaum & Cohen, 2014, Howard & Eichenbaum, 2015).

Ο ιππόκαμπος, επίσης, παίζει ρόλο σε ορισμένες μορφές φοβικής μάθησης και απαλοιφής (Ji & Maren, 2007). Τα άτομα με νόσο Alzheimer παρουσιάζουν δυσκολία προσανατολισμού στον χώρο και τον χρόνο και θυμίζουν δυσλειτουργία του ιππόκαμπου. Πράγματι αλλαγές υφίστανται στο CA1 πεδίο του ιππόκαμπου και συγκεκριμένα καταστροφή των συνδέσεων μεταξύ της δομής του ιππόκαμπου και του ενδορινικού φλοιού, σε καταστροφή δηλαδή ινών της διαιτριαινουσας οδού και των ινών των πυραμιδικών κυττάρων της CA1 περιοχής και του υποθέματος. Τέλος, ο ιππόκαμπος παίζει σημαντικό ρόλο στην επιληψία του κροταφικού λοβού (Babb & Brown 1987). Περιοχές με απώλεια νευρώνων αναφέρονται στην οδοντωτή ταινία, στο Αμμώνειο κέρασ, στο προϋπόθεμα και το υπόθεμα ενώ το μεταϋπόθεμα και η ιπποκάμπεια έλικα δεν παρουσίαζαν παραδόξως καμιά κυτταρική μεταβολή (Mouritzen-Dam 1982).

Νευροδιαβιβαστές του Ιπποκάμπου

Ένας μεγάλος αριθμός νευροδιαβιβαστών και νευροτροποποιητών έχουν μελετηθεί στον ιππόκαμπο (Πίνακας 1). Οι κυριότεροι από αυτούς είναι το γλουταμινικό και το GABA.

Πίνακας 1 Νευροδιαβιβαστές ιπποκάμπου Πηγή: Nicoll (1988)

Νευροδιαβιβαστές		
Γλουταμινικό	Νορεπινεφρίνη	Αγαιοδραστικό εντερικό πεπτίδιο (VIP)
Εγκεφαλίνη	Σεροτονίνη	Γαλανίνη
Δυνορφίνη	Αδενοσίνη	Νευροπεπτίδιο Υ
Ασπαρτικό	Ισταμίνη	Παράγοντας απελευθέρωσης κορτικοτροπίνης
GABA	Ντοπαμίνη	Ουσία Ρ
Αγγειοτενσίνη	Σωματοστατίνη	
Ακετυλοχολίνη	Χολοκυστοκίνη	

L-γλουταμικό οξύ

Το L-γλουταμικό είναι ο κύριος διεγερτικός νευροδιαβιβαστής στον ιππόκαμπο. Η σύνθεσή του ξεκινά από το α-κετογλουταρικό, το οποίο παράγεται στον κύκλο του Krebs, με τη βοήθεια της αμινοτρανσφοράς του α-κετογλουταρικού.

Υπάρχουν δύο μεγάλες κατηγορίες υποδοχέων γλουταμικού: οι μεταβοτροπικοί και οι ιοντοτροπικοί. Υπάρχουν 7 είδη μεταβοτρόπων υποδοχέων του γλουταμικού (mGluR1-mGluR7), ενώ οι ιοντοτρόποι διακρίνονται στους: α) υποδοχείς AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate, GluR1-GluR4), β) υποδοχείς καϊνικού οξέος (GluR5-GluR7) και γ) υποδοχείς NMDA (N-methyl-D-aspartate, Petralia και συν., 1994). Οι ιοντοτρόποι υποδοχείς μετά τη σύνδεση με το νευροδιαβιβαστή, προκαλούν μεταφορά ιόντων διαμέσου του διαύλου που σχηματίζεται από το σύμπλεγμα του υποδοχέα. Η ροή αυτή ιόντων προκαλεί την εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης και τη δημιουργία δυναμικού ενέργειας που μεταδίδεται στο μετασυναπτικό κύτταρο. Οι ιοντοτρόποι υποδοχείς αποτελούνται από υπομονάδες με παρόμοια δομή. Οι NMDA υποδοχείς αποτελούνται από τέσσαρις πρωτεϊνικές υπομονάδες, δύο NR1 και δύο NR2 υπομονάδες. Η έκφραση και των τεσσάρων υπομονάδων είναι απαραίτητη για τη δημιουργία λειτουργικών διαύλων.

Η διέγερση των NMDA υποδοχέων προκαλεί την εισροή ιόντων ασβεστίου στο κύτταρο. Η αύξηση του ενδοκυττάρου ασβεστίου προκαλεί την ενεργοποίηση της συνθάσης της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου (NOS). Το ένζυμο αυτό ρυθμίζει τη σύνθεση της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου (NO), η οποία διαχέεται ελεύθερα διαμέσου της μεμβράνης του κυττάρου και μπορεί και δρα και στον προσυναπτικό νευρώνα (Mao και συν., 1995). Στον ιππόκαμπο NMDA υποδοχείς βρίσκονται κυρίως στα πυραμιδικά κύτταρα και στους ενδονευρώνες, δηλαδή στην πυραμιδική στιβάδα της CA1, CA2, CA3 περιοχής και στην κοκκώδη της οδοντωτής έλικας (Wedzony και συν., 1997). Τα υψηλότερα επίπεδα υποδοχέων NMDA έχουν βρεθεί στη CA1 περιοχή του ιπποκάμπου (Ozawa και συν., 1998).

γ-Αμινοβουτυρικό οξύ (GABA)

Το GABA (γ-αμινοβουτυρικό οξύ) είναι ο πιο σημαντικός ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ). Μαζί με τη γλυκίνη ευθύνεται για την πλειονότητα της ανασταλτικής νευροδιαβίβασης στο ΚΝΣ. Οι δράσεις του GABA πραγματοποιούνται μέσω τριών διαφορετικών ειδών υποδοχέων: τους ιοντοτρόπους GABA_A, τους μεταβολοτρόπους GABA_B και τους ιοντοτρόπους GABA_C υποδοχείς.

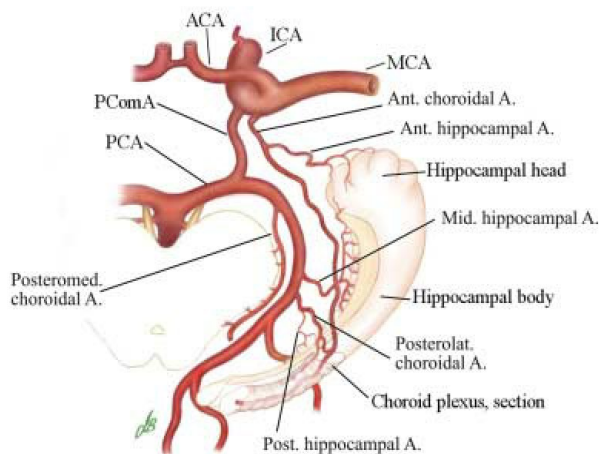
Στον ιππόκαμπο το GABAεργικό κύκλωμα ανασταλτικών ενδονευρώνων αντιπροσωπεύει μόνο ~10-15% του συνολικού νευρωνικού πληθυσμού. Ωστόσο, η αξιοσημείωτη ανατομική και φυσιολογική ποικιλομορφία τους, τους επιτρέπει να ρυθμίζουν σχεδόν όλες τις πτυχές της κυτταρικής λειτουργίας και της λειτουργίας του κυκλώματος (Pelkey και συν., 2017).

Αιμάτωση ιππόκαμπου

Ο ιππόκαμπος στον ανθρώπινο εγκέφαλο αιματώνεται από πολλές αρτηρίες, οι περισσότερες από τις οποίες προέρχονται είτε από την οπίσθια εγκεφαλική αρτηρία ή από τη πρόσθια χοριοειδή αρτηρία (Εικόνα 8). Η δομή του αγγειακού συστήματος που αρδεύει τον ιππόκαμπο ποικίλλει μεταξύ των ανθρώπων. Σε κάποιες περιπτώσεις η πρόσθια ιπποκάμπια αρτηρία εκφύεται από την οπίσθια εγκεφαλική αρτηρία, ενώ άλλες φορές από τη πρόσθια χοριοειδή αρτηρία. Οι μέσες και οπίσθιες ιπποκάμπιες αρτηρίες έχουν επίσης διαφορές μεταξύ των ανθρώπων. Οι φλέβες του ιπποκάμπου είναι οι υποεπενδυματικές ενδοϊπποκάμπες φλέβες (subependymal intrahippocampal veins) και οι ενδοϊπποκάμπιες φλέβες των αυλάκων, οι οποίες κατευθύνονται προς τις επιφανειακές ιπποκάμπιες φλέβες και σχηματίζουν δύο φλεβικά τόξα: το φλεβικό τόξο της ψαλιδο-οδοντωτής αύλακας και το φλεβικό τόξο της ιπποκάμπιας αύλακας. Το φλεβικό τόξο της ψαλιδο-οδοντωτής αύλακας δέχεται τις υποεπενδυματικές ενδοϊπποκάμπιες φλέβες ενώ το φλεβικό τόξο της ιπποκάμπιας αύλακας δέχεται τις φλέβες που προκύπτουν από τον ιππόκαμπο στο σημείο ένωσης της οδοντωτής έλικας και του κυρίως ιππόκαμπου (Tatu & Vuillier 2014).

Η αιμάτωση του ιππόκαμπου επίμυος γίνεται μέσω της επιμήκη ιπποκάμπιας αρτηρίας, η οποία είναι κλάδος της οπίσθιας εγκεφαλικής αρτηρίας. Εσωτερικές εγκάρσιες ιπποκάμπιες αρτηρίες εδράζονται στην ιπποκάμπια σχισμή και δίνουν μικρούς κλάδους στην οδοντωτή ταινία, στην οδοντωτή περιοχή και στο CA3 πεδίο. Άλλοι κλάδοι της επιμήκη αρτηρίας αιματώνουν τις υπόλοιπες περιοχές της οδοντωτής ταινίας, περιοχές του υποθέματος και ενδορινικού φλοιού. Η αγγείωση παρουσιάζει ανατομικές διαφορές στις περιοχές CA1 και CA3. Η CA1 αγγειώνεται από τη

μεγάλη κοιλιακή αρτηρία, ενώ η CA3 από μικρά τριχοειδή (Duvernoy και συν., 1983). Οι εσωτερικές εγκάρσιες ιπποκάμπειες φλέβες πορεύονται σε αντίθετη πορεία από τις αρτηρίες και αρδεύουν το αίμα από τις εσωτερικές εγκάρσιες αρτηρίες. Βαθιές εγκάρσιες ιπποκάμπειες φλέβες λαμβάνουν φλεβικό αίμα από κλάδους στην σκάφη και γειτονική στοιβάδα πολύμορφων κυττάρων της CA1 περιοχής. Οι εγκάρσιες φλέβες στραγγίζουν στην βασική φλέβα (Coyle P, 1976).



Εικόνα 8 Αιμάτωση του ιππόκαμπου από <https://www.quora.com/What-is-the-main-artery-that-feeds-the-hippocampus>

Ισχαιμία

Η εγκεφαλική ισχαιμία είναι μία παθολογική κατάσταση κατά την οποία η αιματική ροή στον εγκέφαλο περιορίζεται. Υπό αυτές τις συνθήκες, η οξυγόνωση και η μεταφορά γλυκόζης στον εγκέφαλο διαταράσσεται με επιβλαβείς συνέπειες. Με τον όρο υποξία ορίζεται η ανεπαρκής παροχή O_2 στους ιστούς, ενώ ως ανοξία η πλήρης απουσία O_2 από τους ιστούς. Οι νευρώνες είναι τα κύτταρα του σώματος με τη μεγαλύτερη ευαισθησία στην υποξία, αφού έχουν έναν υποχρεωτικά αερόβιο γλυκολυτικό μεταβολισμό. Ο εγκέφαλος είναι πολύ ενεργός μεταβολικά – καταναλώνει ενέργεια δυσανάλογα μεγάλη ως προς το μέγεθός του. Αν και ο αναπτυγμένος εγκέφαλος αποτελεί το 2% της μάζας του σώματος, καλύπτει περίπου το 20% της χρήσης του οξυγόνου στον οργανισμό (Clarke 1999).

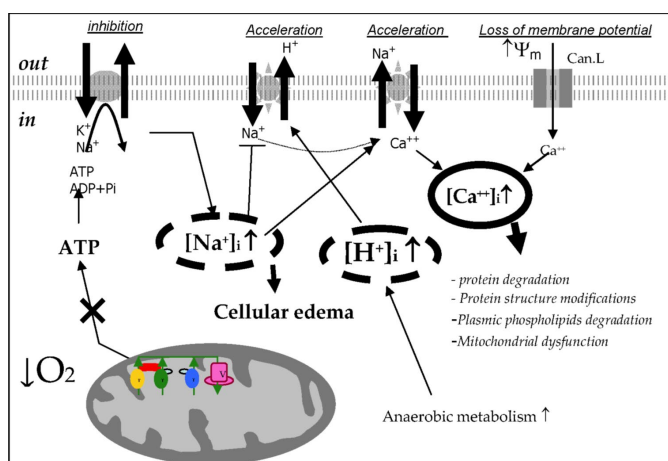
Παθοφυσιολογία-βιοχημικές διεργασίες της ισχαιμίας

Κατά την ισχαιμία-υποξία ο μεταβολισμός γίνεται από αερόβιος, αναερόβιος (γλυκόλυση) και οδηγεί στη συσσώρευση NADH, FADH, γαλακτικού οξέος και κατιόντων υδρογόνου. Για αυτό τον λόγο, με τον αναερόβιο μεταβολισμό μειώνεται η οξειδωτική φωσφορυλίωση γεγονός που οδηγεί στη μείωση του των επιπέδων του ATP. Τα επίπεδα της ATP διατηρούνται στην αρχή μέσω της αποδόμησης της φωσφοκρεατίνης (Pcr) από την κρεατινική κινάση, η οποία ενεργοποιείται από τη συνάθροιση της ADP και H^+ . Έτσι, η ελάττωση της Pcr προηγείται αυτής της ATP, τα αποθέματα της Pcr εξαντλούνται ταχέως και σχηματίζεται γαλακτικό μέσω της αναερόβιας γλυκόλυσης (Cox και συν. 1988, Ekholm και συν. 1992, Erecinska M, Silver A.1994). Σε αντίθεση με την οξειδωτική φωσφορυλίωση που παράγει 36moles ATP/mole γλυκόζης, η γλυκόλυση αποδίδει μόνο 2moles

ATP/μολε γλυκόζης. Αρχικά, η αναερόβια γλυκόλυση διατηρεί τα επίπεδα της ATP στο 90% περίπου των φυσιολογικών (όσο είναι διαθέσιμη η γλυκόζη) αλλά αργότερα η ολική δεξαμενή των αδενινο-νουκλεοτιδίων (ATP, ADP, AMP) ελαττώνεται (Gourdin και Dubois, 2013).

Η εξάντληση των κυτταρικών αποθεμάτων του ATP δυσχεραίνει όλες οι μεταβολικές αντιδράσεις. Πιο συγκεκριμένα, οι διαμεμβρανικές ιοντικές αντλίες (κυρίως οι αντλίες νατρίου) Na^+/K^+ -ATPάση δυσλειτουργούν, έχουμε εκπόλωση της μεμβράνης, με αποτέλεσμα τον περιορισμό της εξόδου Na^+ από την κυτταροπλασματική μεμβράνη σε ανταλλαγή με το K^+ . Έτσι, έχουμε την ενδοκυττάρια συσσώρευση Na^+ , Ca^{++} , Cl^- και H_2O , ελάττωση του K^+ και την εμφάνιση κυτταροτοξικού οιδήματος (Hansen 1985, Hansen και Nedergaard 1988, Gourdin και Dubois, 2013, Εικόνα 9).

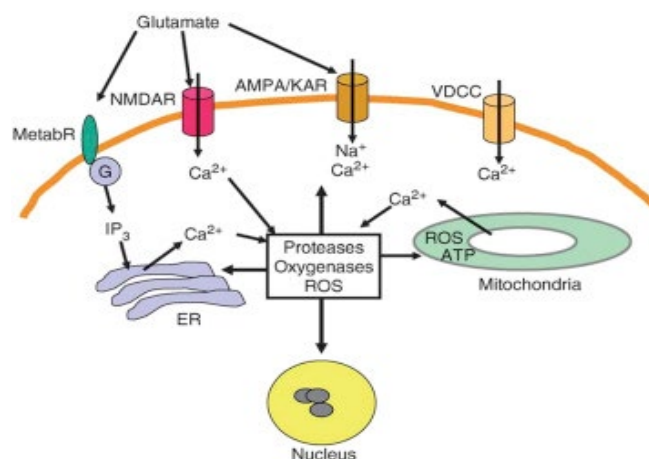
Αυτό που συμβαίνει κατά την ισχαιμία-υποξία είναι η απελευθέρωση διεγερτικών αμινοξέων και κυρίως του γλουταμινικού οξέος. Ο ασβέστιο-εξαρτώμενος μηχανικός προάγει την αυξημένη απελευθέρωση του γλουταμινικού οξέος, αλλά λόγω έλλειψης ATP δεν μπορούν να λειτουργήσουν οι μηχανισμοί επαναπρόσληψής του που απαιτούν κατανάλωση ενέργειας. Έτσι αυξάνεται υπερβολικά η συγκέντρωσή γλουταμινικού στην συναπτική σχισμή.



Εικόνα 9. Ιοντικές αλλαγές κατά την ισχαιμία (Gourdin M and Dubois P, 2013)

Η συσσώρευση διεγερτικών αμινοξέων αυξάνει ακόμη περισσότερο το Na^+ και Ca^{++} (Andine και συν., 1991), με αποτέλεσμα την εμφάνιση του φαινομένου της διεγερτοτοξικότητας ή τοξικότητας εκ διεγέρσεως (Excitotoxicity, Gourdin και Dubois, 2013, Εικόνα 10).

Η διέγερση των NMDA υποδοχέων του γλουταμινικού οδηγεί στην εισροή ιόντων ασβεστίου, τα οποία συντελούν στο σχηματισμό οξειδίων του αζώτου. Ξεκινά έτσι ο «καταρράκτης» των αντιδράσεων του ισχαιμικού-υποξικού επεισοδίου. Οι NMDA υποδοχείς ενεργοποιούνται και οι διαυλοί τους ανοίγουν παθητικά κατά την μείωση του δυναμικού της μεμβράνης που συμβαίνει κατά την υποξία, ακόμη και αν τα επίπεδα του γλουταμινικού δεν είναι υψηλά (Hammond και συν., 1994). Ο συνδυασμός ενεργειακής εξάντλησης, οξείδωσης, διεγερτοτοξικότητας, συσσώρευσης ασβεστίου και ελευθέρων ριζών καθώς και η υπεροξείδωση των λιπιδίων, οδηγούν στη διάσπαση των δομικών συστατικών του κυττάρου και το θάνατο. Όταν η ισχαιμική-υποξική προσβολή είναι μικρότερης βαρύτητας τότε ο κυτταρικός θάνατος είναι «προγραμματισμένος» και χαρακτηρίζεται (απόπτωση, Beilharz και συν., 1995, Puleria και συν., 1998).



Εικόνα 10. Μηχανισμοί διεγερτοτοξικότητας. Η πρόσδεση του γλουταμικού στους AMPA υποδοχείς και υποδοχείς καναϊκού, ανοίγει τα κανάλια και οδηγεί σε εισροή ιόντων Na^+ εκπόλωση της μεμβράνης και άνοιγμα των τασεούποδοχών καναλιών ασβεστίου Ca^{++} (VDCC-voltage-dependent Ca^{++} channels). Μερικοί AMPA υποδοχείς είναι επίσης διαπερατοί στο ασβέστιο. Η πρόσδεση του γλουταμικού στους NMDAR υπό συνθήκες εκπόλωσης ανοίγει τα κανάλια NMDAR και οδηγεί σε εισροή μεγάλης ποσότητας Ca^{++} . Η ενεργοποίηση των μεταβοτροπικών υποδοχών του γλουταμικού (MetR) επάγει την παραγωγή IP_3 (τριφωσφορική ινοσιτόλη) και την ενεργοποίηση καναλιών των IP_3 υποδοχών και υποδοχών γυανιδίνης στην μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου(ΕΔ) με αποτέλεσμα την απελευθέρωση Ca^{++} από το ΕΔ στο κυτταρόπλασμα. Η αύξηση των επιπέδων Ca^{++} στο κυτταρόπλασμα επάγει την ενεργοποίηση των υποδοχών γλουταμικού και επάγει πρόσληψη Ca^{++} από τα μιτοχόνδρια, η οποία αν είναι εκσεσημασμένη επάγει την παραγωγή ROS (reactive oxygen species) και αναστολή παραγωγής του ATP. Με την ενεργοποίηση των πρωτεασών και την επαγωγή του οξειδωτικού stress, το Ca^{++} είναι το κλειδί μεσολαβητής του εξωτοξικού κυτταρικού θανάτου. Από Mattson MP. Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. *Neuromol Med.* 2003;3:65–94.

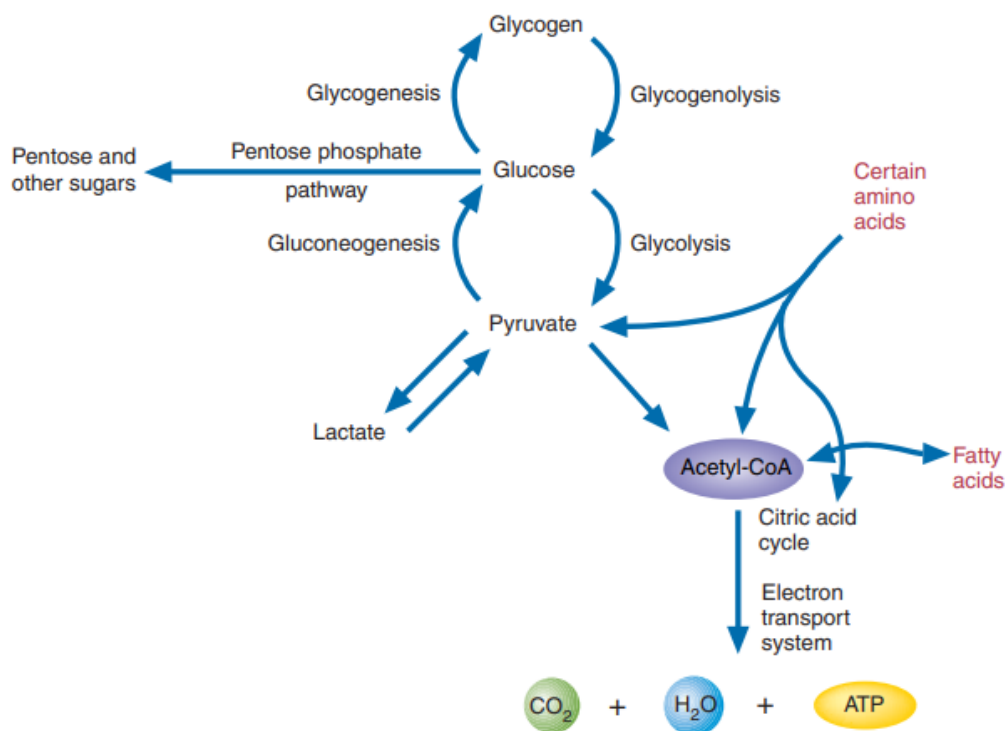
Υπογλυκαιμία

Η υπογλυκαιμία ονομάζεται το χαμηλό επίπεδο γλυκόζης στο αίμα. Το επίπεδο γλυκόζης που καθορίζει την υπογλυκαιμία είναι μεταβλητό. Σε άτομα με σακχαρώδη διαβήτη, επίπεδα κάτω από 3,9mmol/L (70mg/dL) είναι διαγνωστικά, σε ενήλικες χωρίς διαβήτη τα επίπεδα αυτά είναι κάτω από 2,8mmol/L (50mg/dL) μετά από νηστεία ή μετά την άσκηση (ΕΔΕ 2019).

Γενικά στοιχεία μεταβολισμού γλυκόζης

Όπως είναι γνωστό, κατά την **γλυκόλυση** η γλυκόζη μετατρέπεται σε δύο μόρια πυροσταφυλικού οξέος και παράγεται ενέργεια υπό τη μορφή του ATP. Σε αναερόβιες συνθήκες το πυροσταφυλικό μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ. Το γλυκογόνο είναι μια μορφή αποθήκευσης της γλυκόζης και συντίθεται μέσω της **γλυκογένεσης** όταν τα επίπεδα γλυκόζης είναι αρκετά υψηλά, ενώ καταβολίζεται μέσω της **γλυκογονόλυσης** όταν τα επίπεδα σακχάρου είναι χαμηλά. Η γλυκόζη μπορεί επίσης να συντεθεί από μη καρβουδρογονωμένα μόρια μέσω της **γλυκονεογένεσης**. Ο δρόμος των **φωσφορικών πεντοζών** επιτρέπει στα κύτταρα να μετατρέπουν την 6-φωσφορική γλυκόζη σε 5-ριβο-φωσφορική γλυκόζη (το σάκχαρο που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση

νουκλεοτιδίων και νουκλεϊκών οξέων) και άλλους μονοσακχαρίτες (Mc Kee 2012, Εικόνα 11). Εξαιτίας των πολλών μονοπατιών που μπορεί να ακολουθήσει, η γλυκόζη είναι ικανή να παράγει τεράστια ποικιλία μεταβολικών ενδιάμεσων προϊόντων για βιοσυνθετικές αντιδράσεις και ενέργεια (Nelson 2005, Koolman 2005). Ο αναερόβιος καταβολισμός της γλυκόζης σε γαλακτικό είναι υπαρκτός στον εγκέφαλο σε μικρό βαθμό (Pellerin και συν 2002).

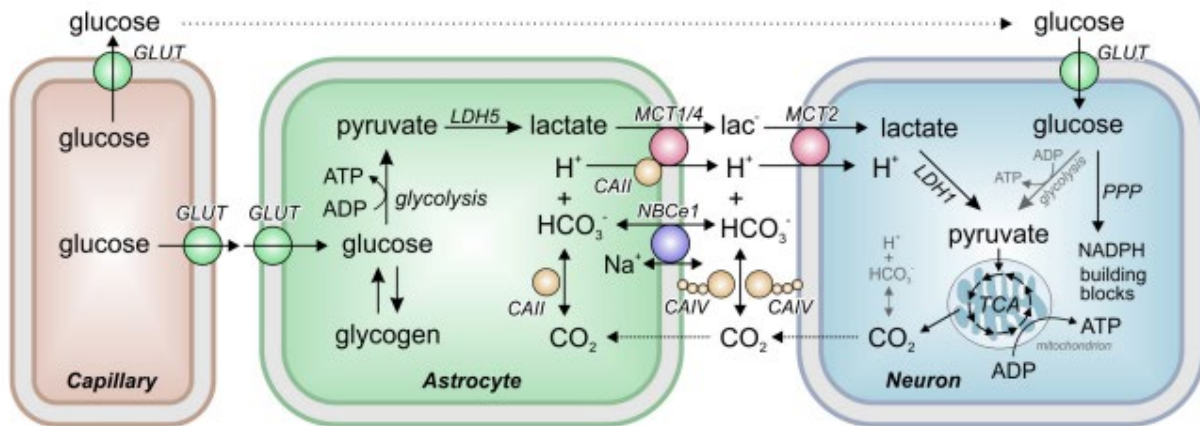


Εικόνα 11. Κυριότερα Μονοπάτια του Μεταβολισμού των Υδατανθράκων. Στους ζωικούς οργανισμούς η περίσσεια γλυκόζης μετατρέπεται στην υποθηκεύσιμη μορφή της, το γλυκογόνο μέσω της γλυκογένεσης. Όταν η γλυκόζη απαιτείται ως ενεργειακό καύσιμο ή ως πρόδρομο μόριο σε βιοσυνθετικές διεργασίες, το γλυκογόνο διασπάται μέσω της γλυκογονόλυσης. Η γλυκόζη μπορεί να μετατραπεί σε 5-φωσφορική ριβόζη (συστατικό των νουκλεοτιδίων) και NADPH μέσω της οδού των φωσφορικών πεντοζών. Η γλυκόζη οξειδώνεται κατά τη γλυκόλυση και παράγει ενέργεια κατά την μετατροπή της σε πυροσταφυλικό οξύ. Σε συνθήκες απουσίας οξυγόνου το πυροσταφυλικό μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ. Σε αερόβιες συνθήκες το πυροσταφυλικό μετατρέπεται περαιτέρω σε ακετύλο-CoA. Μεγάλα ποσά ενέργειας με τη μορφή ATP παράγονται κατά την είσοδο του ακετύλο-CoA στον κύκλο του Krebs. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο μεταβολισμός των υδατανθράκων συνδέεται με το μεταβολισμό άλλων ουσιών. Για παράδειγμα, το ακετύλο-CoA παράγεται επίσης και από τον καταβολισμό των λιπαρών οξέων και αμινοξέων. Αντίστροφα, σε περίσσεια ακετύλο-CoA, το τελευταίο με ένα διαφορετικό μονοπάτι μετατρέπεται σε λιπαρά οξέα (Mc Kee 2012).

Γλυκόζη και εγκέφαλος

Ο εγκέφαλος των θηλαστικών εξαρτάται από την γλυκόζη, καθώς είναι η κύρια πηγή ενέργειας για τον εγκέφαλο, αλλά χρησιμοποιείται από όλα τα κύτταρα στον οργανισμό (Zierler 1999). Στον ενήλικο εγκέφαλο οι νευρώνες έχουν τις μεγαλύτερες απαιτήσεις σε ενέργεια (Howarth C, και συν 2012). Στον άνθρωπο ο εγκέφαλος αποτελεί το 2% του σωματικού βάρους, αλλά καταναλώνει περίπου το 20% της ενέργειας που προέρχεται από τη γλυκόζη (Erbisloh F, και συν. 1958). Ο μεταβολισμός της γλυκόζης παρέχει το καύσιμο για τις φυσιολογικές λειτουργίες του εγκεφάλου

μέσω παραγωγής ATP και για την παραγωγή νευροδιαβιβαστών. Συνεπώς η ρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης είναι σημαντική για τη φυσιολογική λειτουργία του εγκεφάλου, ενώ η διαταραχή στον μεταβολισμό της γλυκόζης επηρεάζει όχι μόνο τον εγκέφαλο αλλά και όλο τον οργανισμό. Το μεγαλύτερο ποσοστό της ενέργειας στον εγκέφαλο καταναλώνεται για την παραγωγή δυναμικών ενεργείας και μετασυναπτικών δυναμικών, για τη διατήρηση των επιπέδων ιόντων και του δυναμικού ηρεμίας, αλλά και για τη σύνθεση των νευροδιαβιβαστών. Η γλυκόζη έρχεται στον εγκέφαλο διαμέσου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού με τη βοήθεια των μεταφορέων γλυκόζης GLUT και μπορεί είτε να αποθηκευτεί ως γλυκογόνο είτε να ακολουθήσει την γλυκολυτική πορεία (Mergenthaler και συν 2013, Εικόνα 12).



Εικόνα 12 Η πορεία του γαλακτικού από αστροκύτταρο σε νευρώνα (Astrocyte to Neuron Lactate Shuttle). (Deitmer και συν 2019)

Η κύρια αποθήκη γλυκογόνου στο εγκεφαλο είναι τα αστροκύτταρα. Τα αστροκύτταρα παίρνουν τη γλυκόζη από τα αιμοφόρα αγγεία μέσω των μεταφορέων γλυκόζης. Στα αστροκύτταρα η γλυκόζη είτε αποθηκεύεται ως γλυκογόνο ή μεταβολίζεται σε πυροσταφυλικό μέσω της γλυκόλυσης. Το πυροσταφυλικό μετατρέπεται σε γαλακτικό μέσω της ισομορφής LDH5 της γαλακτικής αφυδρογονάσης. Σύμφωνα με την υπόθεση της εναλλακτικής πορείας του γαλακτικού οξέος από αστροκύτταρα σε νευρώνα (Astrocyte-to-Neuron Lactate Shuttle, ANLS, Magistretti και συν., 1999), το γαλακτικό μεταφέρεται από τα αστροκύτταρα στα νευρικά κύτταρα μέσω μεταφορέων των μονοκαρβοξυλικών (Monocarboxylate, MCT) MCT1, MCT2, και MCT4 με ταυτόχρονη μεταφορά ενός πρωτονίου. Η δράση των μεταφορέων μονοκαρβοξυλικών διευκολύνεται με την επίδραση καρβονικών ανυδρασών (CAs) CAII και CAIV, οι οποίες καταλύουν την ισορροπία των H^+ , HCO_3^- και CO_2 τόσο ενδοκυττάρια όσο και εξωκυττάρια, και από την δράση των νάτριο-δικαρβονικών μεταφορέων NBCe1. Στους νευρώνες, το γαλακτικό μετατρέπεται ξανά σε πυροσταφυλικό μέσω της LDH1 και μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια για αερόβιο καταβολισμό στον κύκλο του Krebs ή μετατρέπεται σε γαλακτικό υπό αναερόβιες συνθήκες. Η μετατροπή σε γαλακτικό καταλύεται από την οξειδοαναγωγή γαλακτική αφυδρογονάση (Mergenthaler και συν 2013, Deitmer και συν, 2019, Εικόνα 12).

Η λειτουργία και η επιβίωση των νευρικών κυττάρων καθορίζονται από την αποδοτικότητα του μεταβολισμού σε παροχή ενέργειας (Hertz 2002). Μία πτώση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα επιφέρει άμεσα πτώση των επιπέδων του ATP στον εγκέφαλο (Harris 2006), γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε σπασμούς, κώμα, απώλεια της συνείδησης, μόνιμη εγκεφαλική βλάβη μέχρι και θάνατο.

Ιππόκαμπος και ισχαιμία

Όπως προαναφέρθηκε ο ιππόκαμπος, ως μέρος του μεταιχμιακού συστήματος του εγκεφάλου, είναι βασική περιοχή του εγκεφάλου για την μακροπρόθεσμη μνήμη (Bartsch και συν., 2010; Robin και συν., 2015) και εμφανίζει ποικίλες δομικές, μορφολογικές και ηλεκτροφυσιολογικές διαφορές σε πολλές νευροεκφυλιστικές ασθένειες πχ νόσο Alzheimer καθώς και στην ισχαιμία (Liu και συν., 2005).

Σε ασθενείς με εγκεφαλική ισχαιμία/υποξία, οι CA1 πυραμιδικοί νευρώνες είναι από τους πιο ευαίσθητους (Zola-Morgan και συν., 1986, Petit και συν. 1987, Mitani και συν., 1992) όπως φάνηκε επιπλέον και από πειράματα υποξίας/ισχαιμίας σε ζώα, πχ χάμστερ (Kirino, 1982) και ποντίκια (Pulsinelli και συν., 1982). Σύμφωνα με τις μελέτες τελευταίες μελέτες, κάτω από συνθήκες ισχαιμίας, φάνηκε ότι ο ιππόκαμπος δεν πεθαίνει άμεσα μέσα σε λίγα λεπτά, αλλά χρειάζονται ώρες ή και μέρες. Υπό αυτές τις συνθήκες οι μορφολογικές αλλαγές στα κύτταρα απαιτούν μέρες για να γίνουν αντιληπτές. Μικρό χρονικό διάστημα υποξίας/ισχαιμίας σε πειράματα που έγιναν σε τρωκτικά προκάλεσε εκλεκτικό θάνατο στα πυραμιδικά κύτταρα της CA1 περιοχής του ιππόκαμπου. Η επαναιμάτωση του ιστού είναι από τους κυριότερους παράγοντες που συμβάλλουν στην παθογένεση των πυραμιδικών νευρώνων ιδιαίτερα της CA1 περιοχής του ιππόκαμπου (Colbourne και συν., 1999). Οι CA1 πυραμιδικοί νευρώνες στον ιππόκαμπο επίμυος εκφυλλίζονται εντός 2 έως 4 ημέρες μετά την παροδική ισχαιμία (Erfani και συν., 2015).

Οι υποκείμενοι μηχανισμοί που επάγουν τη σχετιζόμενη με ισχαιμία νευρολογική βλάβη δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως. Έως τώρα μελέτες έχουν περιγράψει πολλούς τύπους κυτταρικού θανάτου, όπως η αυτοφαγία (Adhami και συν., 2006), η απόπτωση και νέκρωση κατά την ισχαιμική βλάβη του εγκεφάλου (Zheng και συν., 2009). Η έλλειψη ενέργειας μειώνει τα επίπεδα του ενδοκυττάριου ATP, τροποποιεί τη συγκέντρωση ιόντων και αντιστρέφει την πρόσληψη γλουταμικού στα πυραμιδικά CA1 και CA3 κύτταρα in vitro (Jaubaudon και συν., 2000, Rossi και συν., 2000).

Πολλές υποθέσεις έχουν διατυπωθεί σχετικά με την ευαισθησία των CA1 νευρώνων στην έλλειψη οξυγόνου και γλυκόζης (Gee και συν., 2006, Pugliese και συν., 2006, Cimarosti and Henley 2008, Dixon και συν. 2009, Sun και συν., 2010). Λίγα λεπτά μετά την ισχαιμία παρατηρείται αύξηση του γλουταμικού στις CA1 και CA3 περιοχές με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των υποδοχέων του γλουταμικού και νευροτοξικότητα. Οι γλουταμικοί NMDA (NR) υποδοχείς παίζουν ρόλο στην επαγόμενη από Ca^{++} διεγερσιμοτοξικότητα και εκφράζονται διαφορετικά στις περιοχές CA1 και CA3. Επιπλέον, η ισορροπία μεταξύ των δράσεων των κινασών και φωσφατασών είναι διαφορετική στις υποπεριοχές του ιππόκαμπου, με την CA1 περιοχή να ευνοείται από τη δράση της τυροσινικής κινάσης, ενώ η CA3 από την φωσφατάση (Gee και συν., 2006). Στα χάμστερ η ισχαιμία αυξάνει την φωσφορυλίωση της τυροσίνης στις υπομονάδες NR2A και NR2B των NMDA υποδοχέων (Zalewska και συν., 2005). Επίσης, η έκφραση των NR2 είναι υψηλότερη στην CA1 σχετικά με την CA3 περιοχή, εξηγώντας με αυτό τον τρόπο την μεγαλύτερη ευαισθησία της CA1 περιοχής μετά από ισχαιμία.

Ακόμα, δεδομένου ότι (i) οι νευρώνες καταναλώνουν το 75-80% (Hyder και συν., 2013) της εγκεφαλικής ενέργειας για αποκατάσταση των μεμβρανικών δυναμικών μετά από την εκπόλωση, για σύνθεση νευροδιαβιβαστών, και απελευθέρωση τους και (ii) αυτή η απαίτηση ενέργειας είναι ακόμα μεγαλύτερη σε νευρώνες με μεγάλη δραστηριότητα, όπως οι πυραμιδικοί νευρώνες της CA1

περιοχής σε σχέση με τους CA3 νευρώνες (Mizuseki και συν., 2012) πιθανά οι νευρώνες CA1 είναι πιο ευαίσθητοι στο ισχαιμικό στρες (Wilde και συν., 1997, Padurariu και συν., 2012, De Jong και συν., 1999). Τέλος, μελέτες έχουν δείξει ότι η ισχαιμία αυξάνει τα επίπεδα υπεροξειδίων και ROS με την αύξηση αυτή είναι μεγαλύτερη στην CA1 από ότι στην CA3 περιοχή ενώ επιπλέον οι ROS επάγουν τα ενεργοποιημένα από το stress MTPs (mitochondrial transition pores) κυρίως στην CA1 του υπόκαμπου (Mattiasson και συν. 2003, Kanak και συν., 2013).

Ενώ η ισχαιμία ενεργοποιεί ένα πλήθος κυτταροτοξικών μονοπατιών στον εγκέφαλο, από την άλλη ενεργοποιεί επίσης ενδογενείς προστατευτικούς μηχανισμούς με σκοπό να περιοριστεί η βλάβη. Ένας από αυτούς είναι η ενεργοποίηση των ενδονευρώνων με ακόλουθο αποτέλεσμα την απελευθέρωση του GABA και την επακόλουθη μείωση της υπερδιεγερσιμότητας (Lee και συν., 2000).

Ιππόκαμπος και Υπογλυκαιμία

Η υπογλυκαιμική βλάβη στον εγκέφαλο, όπως και η ισχαιμία επηρεάζει τον ιππόκαμπο και παρουσιάζει συγκεκριμένο μοτίβο νέκρωσης των νευρώνων. Κατά την υπογλυκαιμία, οι νευρώνες της οδοντωτής έλικας είναι τα πιο ευπαθή κύτταρα του ιππόκαμπου. Υπό συνθήκες υπογλυκαιμίας μεγάλες ποσότητες ασπαρτικού και γλουταμικού ελευθερώνονται στο εξωκυττάριο υγρό του εγκεφάλου. Σε επίμυες, κουνέλια αλλά και στον άνθρωπο φάνηκε ότι οι νευρώνες της οδοντωτής έλικας φέρουν διεγερτικούς υποδοχείς στην μοριώδη στοιβάδα η οποία είναι σε γειτνίαση με το εγκεφαλονωτιαίο υγρό που περιέχεται από κοιλίες του εγκεφάλου. Επειδή κατά την υπογλυκαιμία ελευθερώνονται μεγάλες ποσότητες γλουταμικού στο εξωκυττάριο εγκεφαλικό υγρό, η παρουσία αυτών των υποδοχέων στην οδοντωτή έλικα πιθανό να ευθύνεται για την ευαισθησία των νευρώνων της οδοντωτής έλικας κατά την υπογλυκαιμία (Auer και συν. 1989).

Πειραματική προσέγγιση της εγκεφαλικής ισχαιμίας

Έχει περιγραφεί ποικιλία μοντέλων που αναπαριστούν τις συνθήκες της ισχαιμίας στον εγκέφαλο στα πειράματα, τόσο *in vivo* όσο και *ex vivo*. Τα *in vivo* μοντέλα της ισχαιμίας συνήθως διαχωρίζονται σε μοντέλα πλήρης ισχαιμίας και ατελής/μερικής ισχαιμίας. Ως πλήρης ισχαιμία ορίζεται η παντελής διακοπή της αιματικής κυκλοφορίας στον εγκέφαλο, ενώ κατά την ατελή/μερική ισχαιμία, η αιματική ροή μειώνεται σημαντικά σε επίπεδα που δεν είναι ικανή να διατηρηθεί ο εγκεφαλικός μεταβολισμός και η λειτουργία (Traystman, 2003). Μοντέλα πλήρης ισχαιμίας είναι η καρδιακή ανακοπή και η απόφραξη αορτής, ενώ μοντέλα μερικής ισχαιμίας αποτελούν η απόφραξη 2 αγγείων (2VO) και 4 αγγείων (4VO). Συνήθως η ισχαιμία ακολουθείται από την επαναιμάτωση του ιστού και άρα επαναφορά των επιπέδων γλυκόζης και οξυγόνου στον εγκέφαλο (Dos-Anjos και συν., 2009).

Οι *ex vivo* μέθοδοι της ισχαιμίας βασίζονται στην επώαση εγκεφαλικών τομών σε φυσιολογικά διαλύματα σε συνθήκες απουσίας οξυγόνου και γλυκόζης. Η συνθήκη αυτή αναφέρεται ως OGD (oxygen and glucose deprivation, στέρηση οξυγόνου και γλυκόζης), και μιμείται τις συνέπειες της έλλειψης αιματικής παροχής στον εγκέφαλο. Μερικά *ex vivo* πειράματα μπορούν να πραγματοποιηθούν μόνο σε συνθήκες σύντομου χρόνου σε τομές (Whittingham και συν., 1984). Τα μεγαλύτερης διάρκειας πειράματα απαιτούν κάποιου τύπου σταθεροποίηση, όπως για

παράδειγμα τα μοντέλα οργανοτυπικής καλλιέργειας ιππόκαμπου (Vorhov και συν., 1994).

Τα κυριότερα πλεονεκτήματα των *ex vivo* πειραμάτων σε σύγκριση με τα *in vivo* είναι ο καλύτερος έλεγχος των παραμέτρων που επηρεάζουν την ισχαιμική βλάβη, η ευκολότερη ανάλυση μοριακών μηχανισμών πριν, κατά τη διάρκεια ή μετά την ολοκλήρωση της ισχαιμικής βλάβης, το χαμηλότερο κόστος και ο μικρότερος αριθμός ζώων που χρησιμοποιούνται. Συγκρινόμενα με τις καλλιέργειες κυττάρων, τα *ex vivo* πειράματα εμφανίζουν το πλεονέκτημα ότι έχουν όμοια δομή με αυτά που παρατηρούνται στα *in vivo* μοντέλα. Παρόλα αυτά τα *ex vivo* μοντέλα έχουν και κάποια μειονεκτήματα, όπως η βλάβη των ιστών κατά την διάρκεια απομόνωσης τους, οι διαφορές μεταξύ του μέσου επώασης και του ενδογενούς εξοκυττάρου μέσου, η απουσία αιματικής ροής και προστασία από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες ιστολογικές χρώσεις, η χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης και η χρώση Nissl, έχουν ως κύριο πλεονέκτημα το ότι μπορούν γρήγορα και εύκολα να γίνουν σε τομές ιστών. Σε πολλές εργασίες με τη χρήση αυτών των χρώσεων, έγιναν προσπάθειες για να διακρίνουν ξεκάθαρες χωροχρονικές μορφολογικές αλλαγές (Back και συν, 2004). Όμως, επειδή η εξέλιξη των μετα-ισχαιμικών αλλαγών εξαρτάται από τη σοβαρότητα και τη διάρκεια της ισχαιμίας, η παθολογική εικόνα που παρατηρείται εξαρτάται από τις πειραματικές συνθήκες. Γενικά, εμφανίζεται απώλεια της ουσίας Nissl, σε περίπου 2-3 ώρες μετά από πειραματική ισχαιμία. Στην χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης η απεικόνιση της νευρωνικής εκφύλισης ονομάζεται "ηωσινοφιλικός νευρώνας" και χαρακτηρίζεται από συρρίκνωση του κυτταρικού σώματος, σκουρόχρωμο πυκνωτικό πυρήνα και έντονα χρωματισμένο κόκκινο κυτταρόπλασμα. Αυτές οι αλλαγές σχετίζονται με κενοδοπιώδεις αλλαγές εντός του κυτταροπλάσματος και εμφανίζονται τις πρώτες 2-3 ώρες μετά από σοβαρή ισχαιμία (Sun και συν, 2009). Σε μελέτη των Garcia και των συνεργατών του (1993) 48 ώρες μετά από απόφραξη της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας στους επίμυες, οι νευρώνες χάνουν την συγγενειά τους προς την αιματοξυλίνη και οι νευρώνες αυτοί ονομάζονται "νευρώνες φάντασμα". Οι μορφολογικές αυτές αλλαγές εμφανίζονται και στον άνθρωπο (Love και συν, 2000).

Με τη χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης και Nissl εμφανίζεται το φαινόμενο των "dark neurons" (μεγάλοι έντονα βαμμένοι νευρώνες). Οι πρώτες περιγραφές των dark neurons χρονολογούνται στο 1960 (Cammermeyer, 1961). Αρχικά θεωρήθηκε ότι οι dark neurons είναι ένδειξη θανάτου των νευρικών κυττάρων. Κάποιοι ερευνητές αποφάνθηκαν ότι προέρχονται από τη μηχανική πίεση του εγκεφαλικού ιστού (Cammermeyer, 1978, Ooigawa και συν, 2006) ενώ άλλοι προτείνουν ότι οι dark neurons επάγονται από την εκπόλωση, απελευθέρωση γλουταμικού κα ενεργοποίηση υποδοχέων (Kherani και Auer, 2008). Μάλιστα, μετά τη διακοπή του εκλυτικού παράγοντα, πολλοί dark neurons επιστρέφουν στο φυσιολογικό, και άρα δεν θα πρέπει να εξισώνεται η παρουσία των dark neurons με τον κυτταρικό θάνατο (Auer και συν 1985).

ΣΚΟΠΟΣ

Από το σύνολο του εγκεφάλου, ο ιππόκαμπος είναι ο πιο ευαίσθητος στην ισχαιμία, με εκλεκτική απώλεια των CA1 πυραμιδικών νευρώνων (Kirino και συν., 1986, Johnston, 2001, Northington και συν., 2011). Η απώλεια των CA1 νευρώνων μετά από ισχαιμία οδηγεί σε απώλεια μνήμης (Χυ και συν., 2016) και σοβαρές γνωστικές διαταραχές (Morán και συν., 2017) και το αποτέλεσμα μπορεί να είναι εμφανές σε σύντομο χρονικό διάστημα ή να εμφανίζεται καθυστερημένα. Διαφορετικά πειραματικά μοντέλα έχουν αναπτυχθεί για να διαφωτίσουν τους μηχανισμούς αυτού του φαινομένου καθώς και πιθανές νευροπροστατευτικές δράσεις εναντίον της ισχαιμικής καταστροφής, και τα πειραματικά αυτά μοντέλα ομοιάζουν συνθήκες εγκεφαλικής ισχαιμίας σε συνθήκες *in vivo*, *in situ*, ή *in vitro* και διαφορετική διάρκεια ισχαιμίας στα διαφορά μοντέλα.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης των μεταβολικών προσβολών της ισχαιμίας, υποξίας και υπογλυκαιμίας στα κύτταρα ιππόκαμπου του αρουραίου *ex vivo*. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν η επίδραση των μεταβολικών αυτών προσβολών στην έκφραση των σωματιδίων Nissl καθώς επίσης και η επίδραση της ισχαιμίας στον συνολικό αριθμό των κυττάρων στην πυραμιδική στιβάδα των CA1 και CA3 πεδίων του ιπποκάμπου και στην κοκκώδη στιβάδα της οδοντωτής έλικας και στην έκφραση του νευροδιαβιβαστή GABA στην CA1 και CA3 περιοχή του ιπποκάμπου και την οδοντωτή έλικα.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Πειραματόζωα

Στην συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια Wistar 1 με 1.5 μηνών, τα οποία αναπτύχθηκαν στο εργαστήριο Φαρμακολογία σε θερμοκρασία 22°C και κύκλο ημέρα-νύκτα 12 ωρών. Τα ζώα είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό και ο χειρισμός του έγινε σύμφωνα με την Ελληνική και Ευρωπαϊκή Νομοθεσία (άδεια λειτουργίας εγκαταστασης εκτροφής (EL33-BIObr01), προμήθειας (EL33-BIOsup01) και χρήσης/πειραματισμού (EL33BIO-exr01) ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς.

Πειραματική Διαδικασία

Η πραγματοποίηση του πειράματος ex vivo ισχαιμίας έγινε στο πλαίσιο της προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας της κας Τρισόκκα Παναγιώτας. Εν συντομία, μετά τη θανάτωση των ζώων, ο εγκέφαλος τοποθετήθηκε σε παγωμένο τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό (arti-CSF με 11mM γλυκόζης) το οποίο είχε κορεσθεί με 95%O₂/5%CO₂. Μετά την απομόνωση του υποκάμπτου, ο ιστός κόπηκε σε τομές 250μm και τοποθετήθηκε σε φιαλίδια όπου επιτυγχάνεται διάχυση των ιστών με arti-CSF 1.2ml/min, σε τελικό όγκο 500μl και στου 36.5°C. Το πείραμα ξεκινά, μετά από μια ώρα εξισορρόπησης των ιστών. Οι ιστοί ελέγχου διαχέονται με arti-CSF που περιέχει 11mM γλυκόζης και 95%O₂/5%CO₂ για όλη τη διάρκεια του πειράματος (92min) ενώ ιστοί που υποβάλλονται σε κάποια μεταβολική μετά τα πρώτα 26 λεπτά του πειράματος διαχέονται για 66 ακόμα λεπτά με arti-CSF που περιέχει 11mM σουκρόζη και 95%N₂/5%CO₂ (ισχαιμία), arti-CSF με 11mM γλυκόζης και 95%O₂/5%CO₂ (υποξία) ή arti-CSF με 11mM σουκρόζη και 95%O₂/5%CO₂ (υπογλυκαιμία) για 66 λεπτά.

Στο τέλος του πειράματος οι ιστοί συλλέχθηκαν, μονιμοποιήθηκαν με 4% PFA για μια ώρα. Η κρουπροστασία των ιστών έγινε με χρήση διαλύματος 30% σουκρόζης, η ταχεία ψύξη τους με εμβύθιση για 1 λεπτό σε ισοπεντάνιο στου -65°C και η φύλαξη τους στους -80°C μέχρι την κοπή τους σε τομές 10μm στους -20°C.

Χρώση Cresyl Violet

Η συγκεκριμένη χρώση βάφει τα σωματίδια Nissl που βρίσκονται στους δενδρίτες και τα σώματα των νευρώνων. Τα σωματίδια Nissl αποτελούνται από ενδοπλασματικό δίκτυο και ριβοσώματα. Τα νευρικά κύτταρα έχουν μεγάλη δυνατότητα πρωτεϊνοσύνθεσης και γι'αυτό έχουν και αυξημένο σύνολο σωματίων Nissl σε σχέση με τα υπόλοιπα κύτταρα. Λόγω αυτής της έντονης ικανότητας των κυττάρων η συγκεκριμένη χρώση βάφει συγκεκριμένα στο κυτταρόπλασμα των νευρικών κυττάρων και σε μικρότερο βαθμό άλλα κύτταρα. Για το λόγο αυτό η Cresyl Violet είναι εξαιρετικά χρήσιμη στο να μελετήσουμε τη φυσιολογία των νευρικών κυττάρων.

Πρωτόκολλο

Τα πλακάκια έμειναν για λίγο στους 22°C και έπειτα τοποθετήθηκαν σε αιθυλική αλκοόλη

διαβαθμιζόμενης περιεκτικότητας (50, 70, 80, 100%) για 3min. Στη συνέχεια τα πλακάκια τοποθετήθηκαν με τη σειρά τους για 3min σε αιθυλική αλκοόλη ελαττωμένης περιεκτικότητας (100, 95, 80, 75 και 50%) για να ενυδατωθούν οι ιστοί και μετά τους αφήσαμε για 15 λεπτά στη χρωστική. Ακολουθεί αφυδάτωση σε αιθυλική αλκοόλη για 3 λεπτά και μετά αφήνονται για λίγο σε ξυλόλη ενώ με το πέρας της διαδικασίας επικαλύπτονται με ιστολογικό υλικό DPX και μένουν στους 22°C.

Ανοσοϊστοχημεία

Ο όρος **ανοσοϊστοχημεία** (*immunohistochemistry, IHC*) αναφέρεται στη διαδικασία και τεχνική της επιλεκτικής απεικόνισης αντιγόνων στα κύτταρα τμήματος ενός ιστού, η οποία εκμεταλλεύεται την αρχή της ειδικής συνδέσεως των αντισωμάτων σε αντιγόνα σε βιολογικούς ιστούς. Η διαδικασία επινοήθηκε και εφαρμόστηκε για πρώτη φορά από τον Άλμπερτ Κουνς το 1941.

Πρωτόκολλο

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε ο έμμεσος ανοσοφθορισμός σε τομές ιπποκάμπου 10μm. Αρχικά φτιάξαμε διάλυμα TBS 0,1M PH=7,4. Έπειτα αποψύχουμε τα πλακάκια για τριάντα λεπτά και πλένουμε 2 φορές με TBS ενώ κάνουμε επώαση για μισή ώρα σε TBS 0,1 M που είχε 3.3% φυσιολογικός ορός από το ζώο από το οποίο προέρχεται το δεύτερο αντίσωμα έτσι ώστε να ελατρωθεί η περίπτωση μη ειδικής δέσμευσης του 2^{ου} αντισώματος με άλλα διαφορετικά του 1^{ου} που στοχοποιούμε. Μετά ξεπλένουμε τρεις φορές με TBS και επωάζουμε με αντίσωμα έναντι του GABA (1/500, AB 2052, Sigma Aldrich) για 16-18 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Το 1ο αντίσωμα βρισκόταν σε 0.1 TBS με 0.5% NDS και 0.3% Triton X-100 (απορρυπαντικό που κάνει τις κυτταρικές μεμβράνες διαπεράσιμες). Στη συνέχεια, ξεπλένουμε τους ιστούς x3 με 0.1 TBS και επωάζουμε για μια μιση ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με το φθορίζων 2^ο αντίσωμα (Donkey anti-rabbit IgG (H+L) 1/200, 20015 Biotium), ξεπλένουμε τις τομές x3 για 5 λεπτά με TBS και καλύπτουμε με DAPI. Τέλος αποθηκεύουμε στους τέσσερις βαθμούς κελσίου μέχρι να δούμε στο μικροσκόπιο.

Ανάλυση εικόνας

Μετά τη φωτογράφιση, η επεξεργασία των εικόνων έγινε με το πρόγραμμα ImageJ. Με τη βοήθεια του προγράμματος υπολογίστηκε η ένταση του σήματος στην εικόνες των χρώσεων Nissl και ο αριθμός των πυρήνων κυττάρων στις εικόνες της χρώσης DAPI.

Ανάλυση αποτελεσμάτων

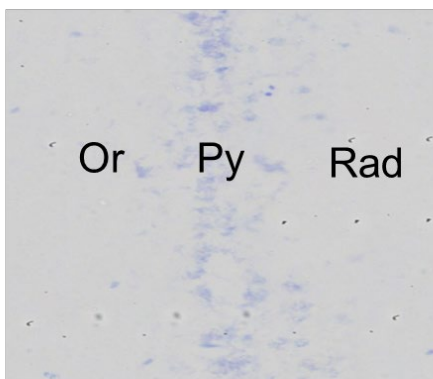
Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε one-way ANOVA με τη βοήθεια του προγράμματος GraphPad Prism.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

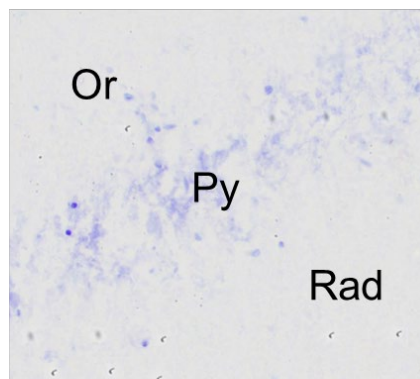
Επίδραση υποξία, υπογλυκαιμία και ισχαιμία στη έκφραση των σωματιδίων Nissl

Πυραμιδική στοιβάδα CA1 περιοχής του ιπποκάμπου

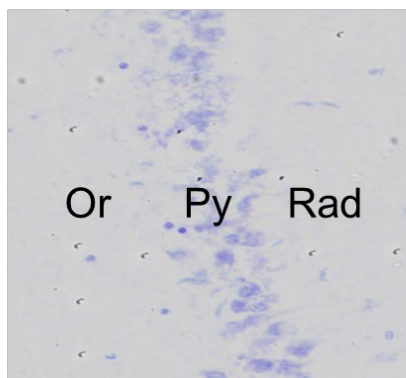
Φυσιολογικές Συνθήκες



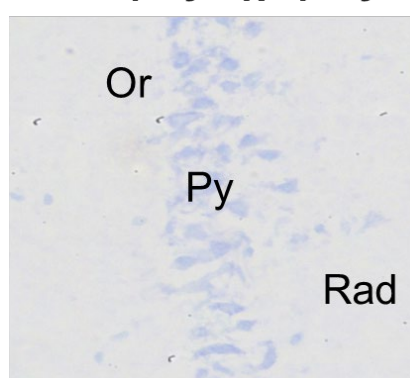
Συνθήκες Υποξίας



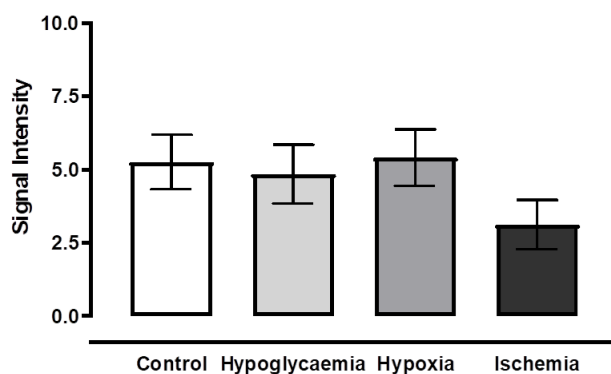
Συνθήκες Υπογλυκαιμίας



Συνθήκες Ισχαιμίας



Εικόνα 13: Έκφραση των σωματιδίων Nissl στην πυραμιδική στοιβάδα CA1 περιοχής του ιπποκάμπου σε φυσιολογικές συνθήκες και συνθήκες υποξίας, υπογλυκαιμίας και ισχαιμίας

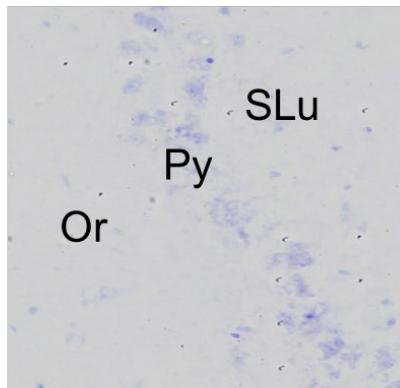


Εικόνα 14: Μεταβολή της έκφραση των σωματιδίων Nissl στην πυραμιδική στοιβάδα CA1 περιοχής του ιπποκάμπου σε φυσιολογικές συνθήκες και συνθήκες υποξίας, υπογλυκαιμίας και ισχαιμίας (n=5)

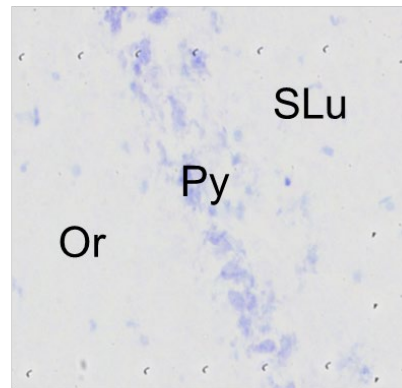
[26]

Πυραμιδική στοιβάδα CA3 περιοχής του ιπποκάμου

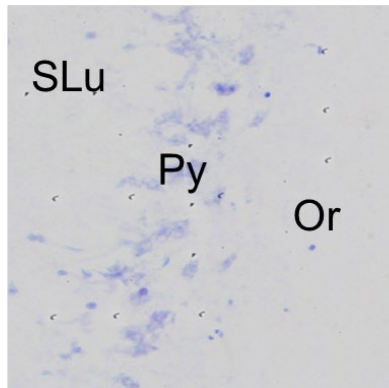
Φυσιολογικές Συνθήκες



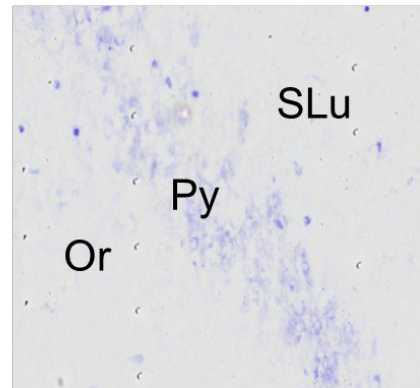
Συνθήκες Υποξίας



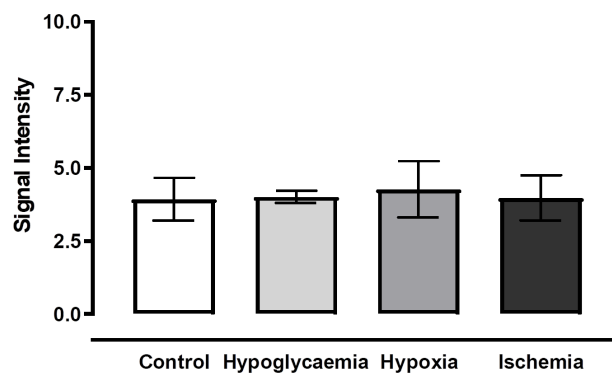
Συνθήκες Υπογλυκαιμίας



Συνθήκες Ισχαιμίας

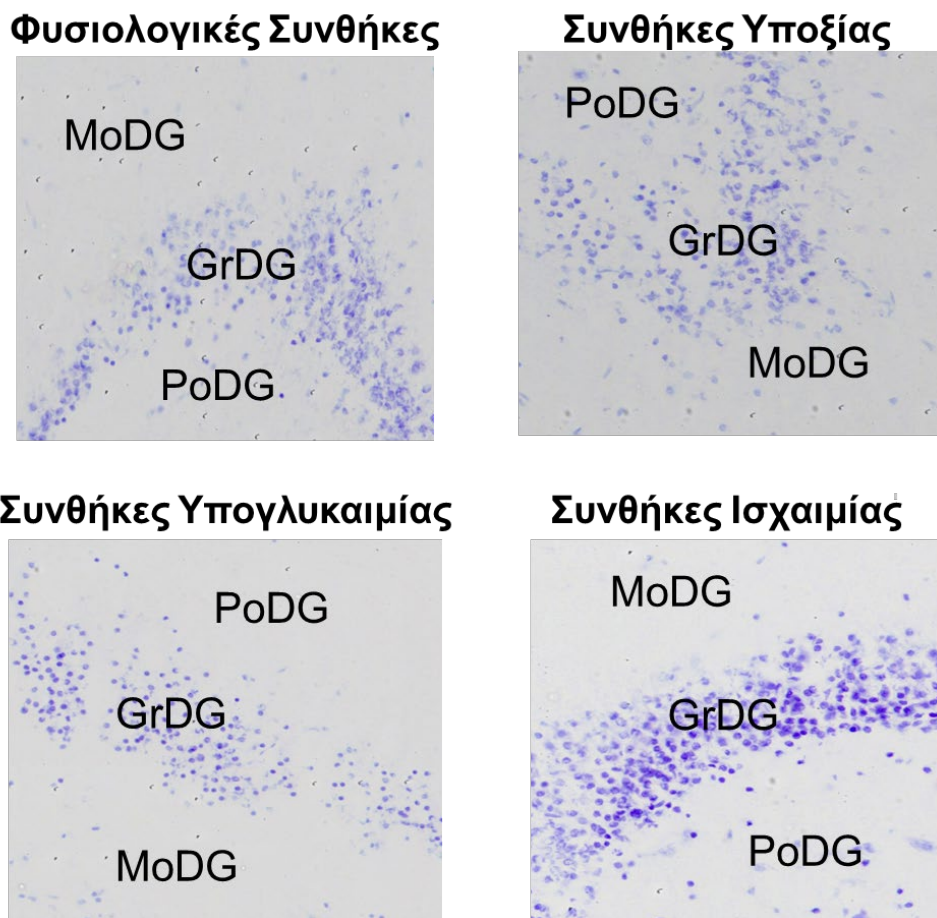


Εικόνα 15: Έκφραση των σωματιδίων Nissl στην πυραμιδική στοιβάδα CA3 περιοχής του ιπποκάμπου σε φυσιολογικές συνθήκες και συνθήκες υποξίας, υπογλυκαιμίας και ισχαιμίας

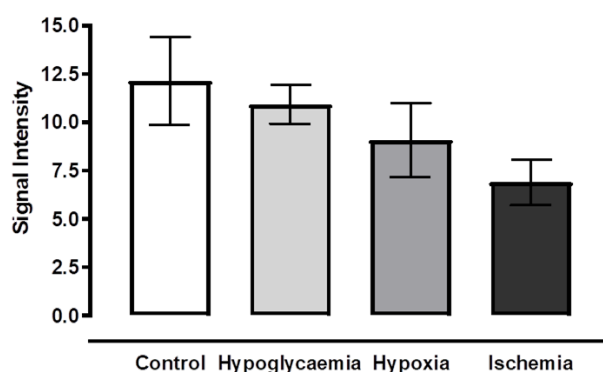


Εικόνα 16: Μεταβολή της έκφραση των σωματιδίων Nissl στην πυραμιδική στοιβάδα CA3 περιοχής του ιπποκάμπου σε φυσιολογικές συνθήκες και συνθήκες υποξίας, υπογλυκαιμίας και ισχαιμίας (n=5)

Κοκκώδη στοιβάδα οδοντωτής έλικας



Εικόνα 17: Έκφραση των σωματιδίων Nissl στην κοκκώδη στοιβάδα της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου σε φυσιολογικές συνθήκες και συνθήκες υποξίας, υπογλυκαιμίας και ισχαμίας



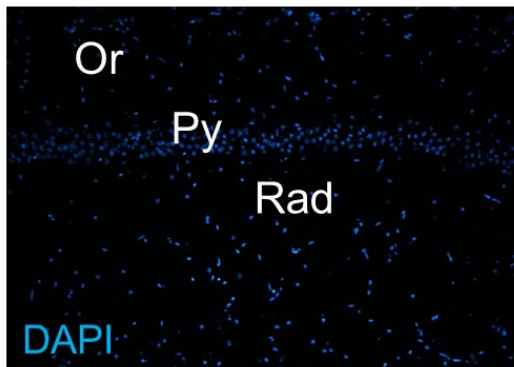
Εικόνα 18: Μεταβολή της έκφραση των σωματιδίων Nissl σ στην κοκκώδη στοιβάδα της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου σε φυσιολογικές συνθήκες και συνθήκες υποξίας, υπογλυκαιμίας και ισχαμίας (n=5)

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας (Εικόνες 13-18), 66 λεπτά *ex vivo* ισχαμίας δεν είχαν κάποια επίδραση στην ένταση του σήματος των σωματιδίων Nissl στην πυραμιδική στοιβάδα της CA1 και CA3 περιοχής και της κοκκώδους στοιβάδας της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου.

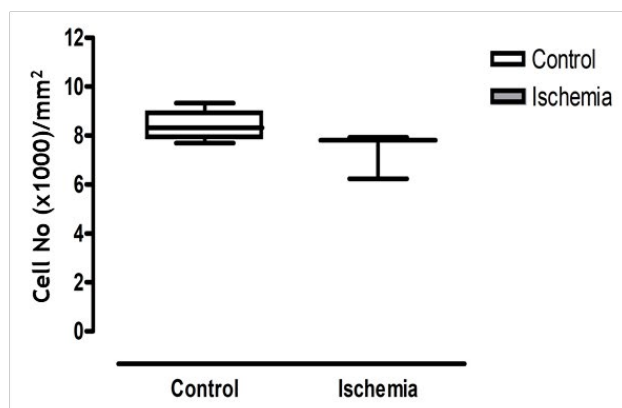
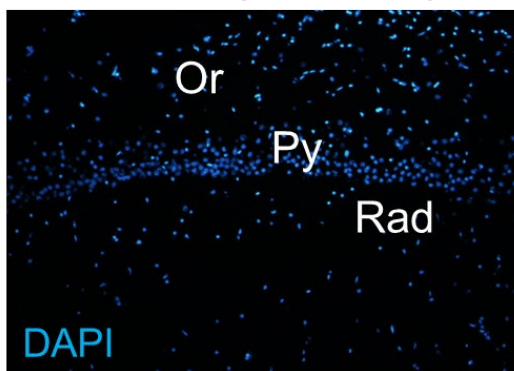
Επίδραση της ισχαιμίας στον αριθμό των κυττάρων

Πυραμидική στοιβάδα CA1 περιοχής του ιπποκάμπου

Φυσιολογικές Συνθήκες



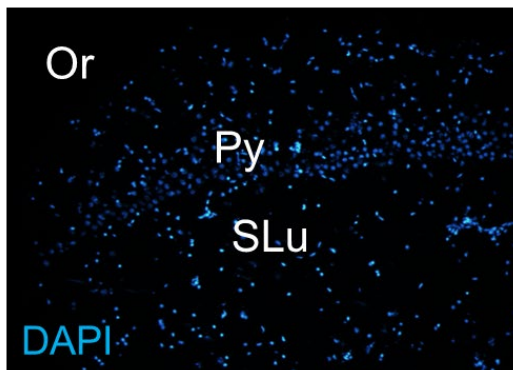
Συνθήκες Ισχαιμίας



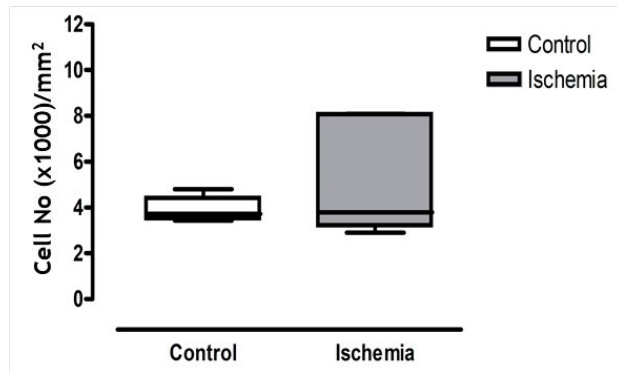
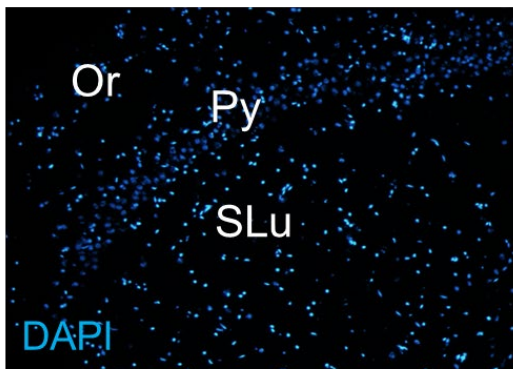
Εικόνα 19: Επίδραση της ισχαιμίας στον αριθμό των κυττάρων της πυραμидικής στοιβάδας της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου σε φυσιολογικές συνθήκες και συνθήκες υποξίας, υπογλυκαιμίας και ισχαιμίας. Δεξιά: Χρώση των πυρήνων των κυττάρων με τη χρωστική DAPI, Αριστερά: Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Πυραμιδική στοιβάδα CA3 περιοχής του υποκάμπου

Φυσιολογικές Συνθήκες



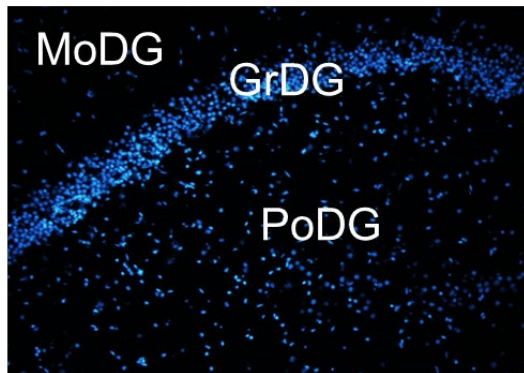
Συνθήκες Ισχαιμίας



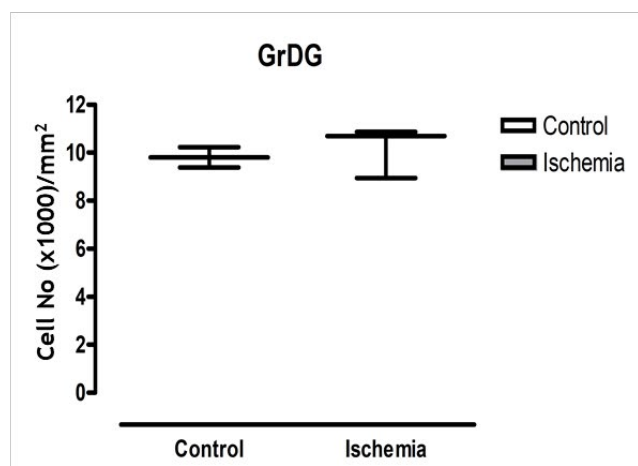
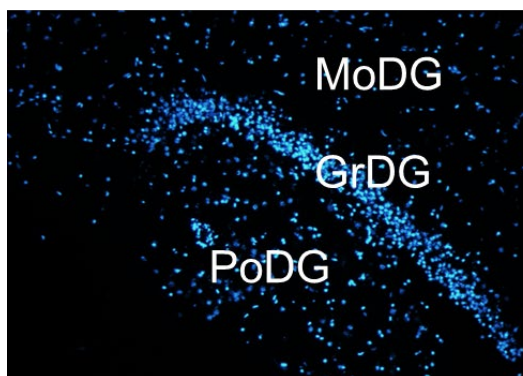
Εικόνα 20: Επίδραση της ισχαιμίας στον αριθμό των κυττάρων της πυραμιδικής στοιβάδας της CA3 περιοχής του υποκάμπου σε φυσιολογικές συνθήκες και συνθήκες υποξίας, υπογλυκαιμίας και ισχαιμίας. Δεξιά: Χρώση των πυρήνων των κυττάρων με τη χρωστική DAPI, Αριστερά: Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Κοκκώδη στοιβάδα οδοντωτής έλικας

Φυσιολογικές Συνθήκες



Συνθήκες Ισχαιμίας

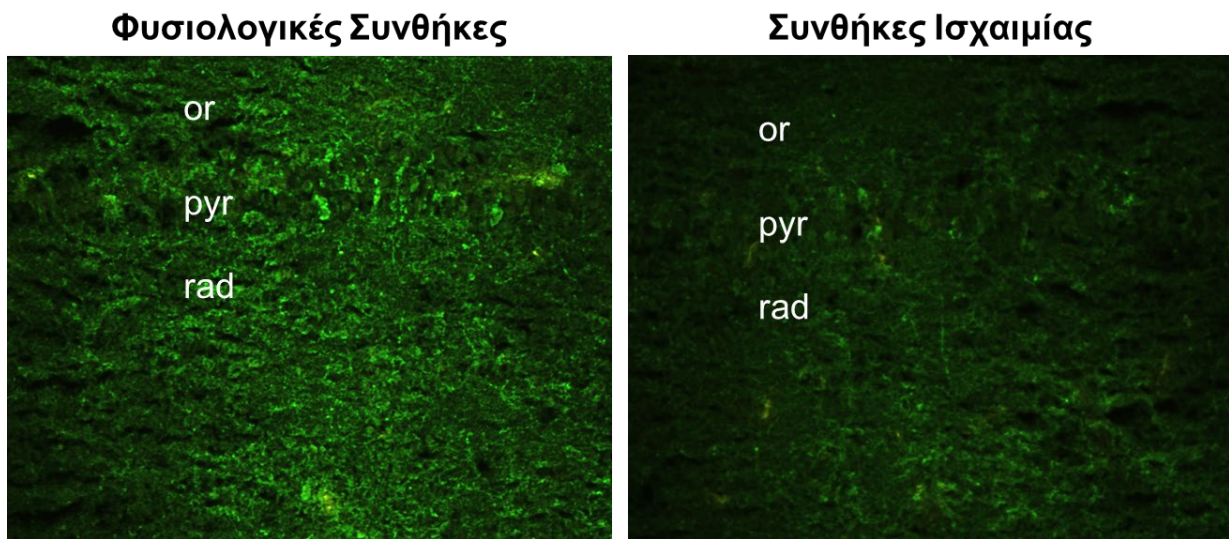


Εικόνα 21: Επίδραση της ισχαιμίας στον αριθμό των κυττάρων της κοκκώδους στοιβάδας της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου σε φυσιολογικές συνθήκες και συνθήκες υποξίας, υπογλυκαιμίας και ισχαιμίας. Δεξιά: Χρώση των πυρήνων των κυττάρων με τη χρωστική DAPI, Αριστερά: Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας (Εικόνα 19-21), 66 λεπτά ex vivo ισχαιμίας δεν είχαν κάποια επίδραση στον αριθμό των κυττάρων στην πυραμιδική στοιβάδα της CA1 και CA3 περιοχής και της κοκκώδους στοιβάδας της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου.

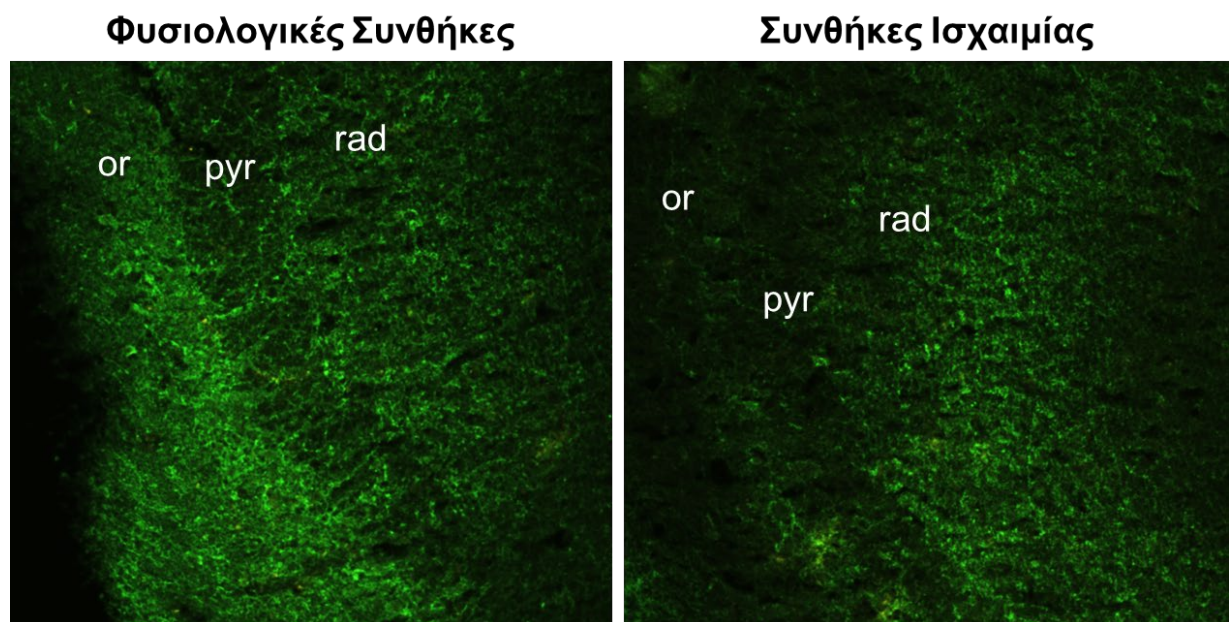
Επίδραση της ισχαιμίας στην έκφραση του GABA

Πυραμιδική στοιβάδα CA1 περιοχής του ιπποκάμπου



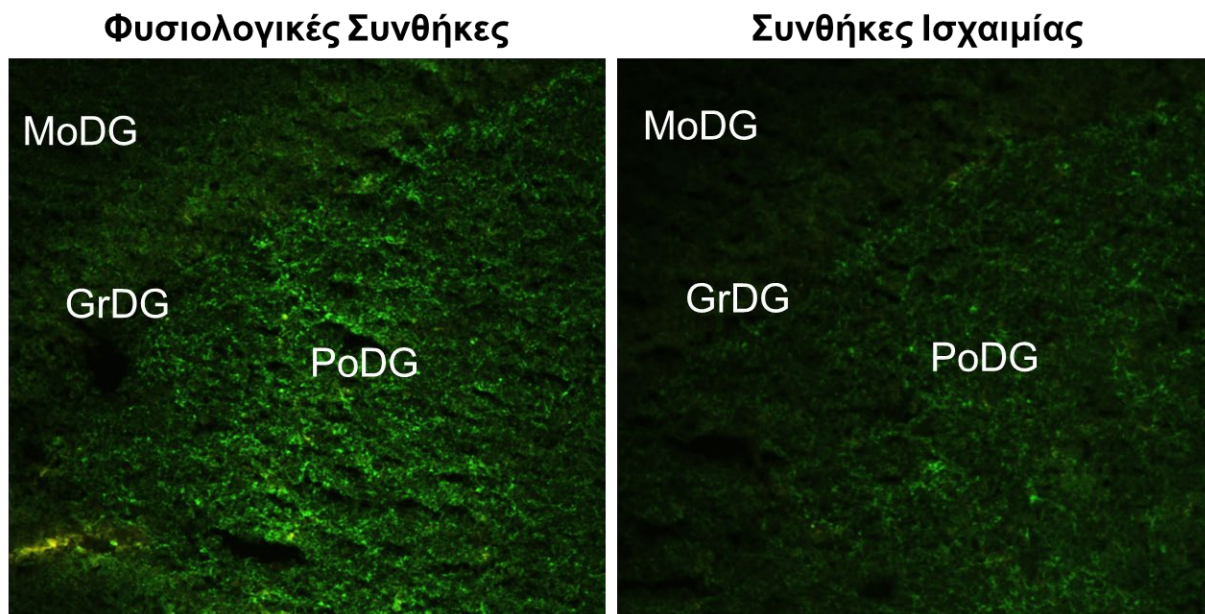
Εικόνα 22: Επίδραση της ισχαιμίας στην έκφραση του GABA στην CA1 περιοχή του ιπποκάμπου σε φυσιολογικές συνθήκες και συνθήκες υποξίας, υπογλυκαιμίας και ισχαιμίας. Παρατηρείται μείωση της ανοσοδραστικότητας για τον GABA μετά από 66 λεπτά εν vivo ισχαιμίας σε σχέση με τις φυσιολογικές συνθήκες

Πυραμιδική στοιβάδα CA3 περιοχής του ιπποκάμπου



Εικόνα 24: Επίδραση της ισχαιμίας στην έκφραση του GABA στην CA3 περιοχή του ιπποκάμπου σε φυσιολογικές συνθήκες και συνθήκες υποξίας, υπογλυκαιμίας και ισχαιμίας. Παρατηρείται μικρότερη μείωση της ανοσοδραστικότητας για τον GABA μετά από 66 λεπτά εν vivo ισχαιμίας σε σχέση με τις φυσιολογικές συνθήκες και την CA1 περιοχή του ιπποκάμπου

Κοκκώδη στοιβάδα οδοντωτής έλικας



Εικόνα 25: Επίδραση της ισχαιμίας στην έφκραση του GABA στην οδοντωτή έλικας του ιπποκάμπου σε φυσιολογικές συνθήκες και συνθήκες υποξίας, υπογλυκαιμίας και ισχαιμίας. Παρατηρείται μείωση της ανοσοδραστικότητας για τον GABA μετά από 66 λεπτά εν νίνο ισχαιμίας σε σχέση με τις φυσιολογικές συνθήκες

Παρατηρούμε μείωση της ανοσοδραστικότητας για το GABA ιδιαίτερα στη CA1 περιοχή του ιπποκάμπου και στην οδοντωτή έλικα (Εικόνα 23-25).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης των μεταβολικών προσβολών της ισχαιμίας, υποξίας και υπογλυκαιμίας στα κύτταρα ιππόκαμπου του αρουραίου *ex vivo*. Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε μοντέλο *ex vivo* υποξίας, υπογλυκαιμίας και ισχαιμίας, με στέρηση οξυγόνου ή/και γλυκόζης και έγινε προσπάθεια εκτίμησης της επίδρασης των μεταβολικών αυτών προσβολών στον ιππόκαμπο. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν η επίδραση των μεταβολικών αυτών προσβολών στην έκφραση των σωματιδίων Nissl καθώς επίσης και η επίδραση της ισχαιμίας στον συνολικό αριθμό των κυττάρων της πυραμιδικής στιβάδας των CA1 και CA3 πεδίων του ιπποκάμπου και της κοκκώδης στιβάδας της οδοντωτής έλικας και στην έκφραση του νευροδιαβιβαστή GABA στο ιστό.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, 66 λεπτά *ex vivo* ισχαιμίας, υποξίας και υπογλυκαιμίας του ιπποκάμπου δεν είχε κάποια εμφανή επίδραση στην εκφύλιση (όπως αυτή εκτιμήθηκε με τη βοήθεια της χρώσης Nissl). Συγκεκριμένα, 66 λεπτά *ex vivo* ισχαιμίας, υποξίας και υπογλυκαιμίας του ιπποκάμπου δεν είχε κάποια στατιστικώς σημαντική επίδραση στην έκφραση των σωματιδίων Nissl στην πυραμιδική στοιβάδα της CA1 και CA3 περιοχής του ιπποκάμπου καθώς επίσης και στην στοιβάδα των κοκκωδών κυττάρου της οδοντωτής έλικας. Εντούτοις, υπήρξε μια τάση μείωσης της πυκνότητας των σωματιδίων Nissl στην πυραμιδική στοιβάδα της CA1 περιοχής καθώς επίσης και στην στοιβάδα των κοκκωδών κυττάρου της οδοντωτής έλικας μετά από 66 λεπτά *ex vivo* ισχαιμίας, υποδηλώνοντας ότι η ισχαιμία ίσως προκαλεί βλάβη/κυτταρικό θάνατο σε μικρό αριθμό κυττάρων στις στοιβάδες αυτές. Παρόλα αυτά, η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων (με καταμέτρηση των πυρήνων των κυττάρων με τη βοήθεια της χρώσης DAPI) της πυραμιδικής στοιβάδας της CA1 και CA3 περιοχής του ιπποκάμπου καθώς επίσης και στην στοιβάδα των κοκκωδών κυττάρου της οδοντωτής έλικας δεν έδειξε καμία στατιστικώς σημαντική αλλαγή στον αριθμό των κυττάρων αυτών.

Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι 66 λεπτά *ex vivo* ισχαιμίας δεν προκαλούν κυτταρικό θάνατο στις πυρηνικές στοιβάδες των CA1 και CA3 περιοχών του ιπποκάμπου καθώς επίσης και στην στοιβάδα των κοκκωδών κυττάρου της οδοντωτής έλικας. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και σε άλλες μελέτες όπου διαπιστώθηκε ότι εκλεκτικός θάνατος των πυραμιδικών νευρώνων της CA1 περιοχής συμβαίνει 24-48 ώρες μετά από ένα παροδικό επεισόδιο εγκεφαλικής ισχαιμίας *in vivo* δηλαδή μετά την επαναιμάτωση του ιστού (Kirino, 2000).

Αξίζει να σημειωθεί ότι, σε ότι αφορά στην υπογλυκαιμία, ο **Dave και οι συνεργάτες του (2011)** παρατήρησαν ότι επαναλαμβανόμενη έκθεση τομών ιπποκάμπου σε υπογλυκαιμία (2 φορές την ημέρα για 30 λεπτά, για 10 ημέρες) δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική διαφορά στο ποσοστό των κυττάρων που υπόκεινται σε κυτταρικό θάνατο γεγονός που υποδηλώνει την ανθεκτικότητα του ιστού στις υπογλυκαιμίες.

Η επαναιμάτωση του ιστού μετά την ισχαιμία φαίνεται να παίζει καταλυτικό ρόλο στον θάνατο των κυττάρων του ιπποκάμπου. Σε μελέτη των Rybachuk και συν. 2017, φάνηκε ότι παρατεταμένη ισχαιμία (30min, OGD) σε οργανοτυπικές καλλιέργειες ιπποκάμπου, είχε ως αποτέλεσμα μαζικό νευρωνικό θάνατο CA1 νευρώνων και αστρογλοίωση μια εβδομάδα μετά την ισχαιμία (κατά την

επαναιμάτωση του ιστού), ενώ ήπιας διάρκειας ισχαιμία (10min) προκάλεσε κυτταρικό θάνατο μετά από δύο εβδομάδες επαναιμάτωσης. Επίσης, με τα πειράματα των Kirino 1982 και Nakano και συν., 1990 διαπιστώθηκε ότι, υπό συνθήκες ισχαιμίας ο υποκάμπος δεν πεθαίνει άμεσα μέσα σε λίγα λεπτά, αλλά απαιτούνται ώρες ή και μέρες μετά την επαναιμάτωση του προκειμένου να εμφανιστεί κυτταρικός θάνατος στον ιστό. Υπό αυτές τις συνθήκες, οι μορφολογικές αλλαγές στα κύτταρα απαιτούν μέρες για να γίνουν αντιληπτές. Το γεγονός ότι η επαναιμάτωση του ιστού είναι ο κυριότερος παράγοντας που συμβάλλει στην εκφύλιση των πυραμιδικών νευρώνων της CA1 περιοχής του υποκάμπου επιβεβαιώνεται και από τις μελέτες του Colbourne και των συνεργατών του (1999) καθώς και του Erfani και των συνεργατών του (2015) οι οποίοι διαπίστωσαν ότι οι νευρώνες αυτοί στον υποκάμπο επίμυος εκφυλλίζονται εντός 2 έως 4 ημέρες μετά την παροδική ισχαιμία.

Οι υποκείμενοι μηχανισμοί που επάγουν τη σχετιζόμενη με την ισχαιμία νευρολογική καταστροφή μετά την επαναιμάτωση του ιστού δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως. Έως τώρα μελέτες έχουν περιγράψει πολλούς τύπους κυτταρικού θανάτου, όπως η αυτοφαγία (Adhami και συν., 2006), η απόπτωση και νέκρωση στην ισχαιμική βλάβη του εγκεφάλου (Zheng και συν., 2009).

Σε ότι αφορά την ανοσοδραστικότητα του GABA, σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, 66 λεπτά *ex vivo* ισχαιμίας προκάλεσαν μείωση της ανοσοδραστικότητας του GABA στην CA1 περιοχή του υποκάμπου και την οδοντωτή έλικα ενώ δεν είχαν σημαντική επίδραση στην ανοσοδραστικότητα του νευροδιαβιβαστή αυτού στην CA3 περιοχή του υποκάμπου. Η μείωση της ανοσοδραστικότητας του GABA την οποία παρατηρήσαμε στις περισσότερες περιοχές του υποκάμπου συνάδει με προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του ίδιου *ex vivo* μοντέλου ισχαιμίας και έδειξαν ότι, κατά την ισχαιμία η απελευθέρωση του GABA αυξάνει σε σχέση με του ιστούς ελέγχου (~10 φορές).

Η παρατήρηση ότι, οι GABAεργικοί νευρώνες της CA3 περιοχής του υποκάμπου εμφανίζουν μεγαλύτερη αντοχή στις συνθήκες ισχαιμίας πιθανά σχετίζεται με την παρουσία αυξημένου αριθμού μικρογλοιακών κυττάρων και αστροκυττάρων στην περιοχή αυτή γεγονός που συμβάλλει στη γρήγορη απομάκρυνση μεταβολικών παραπροϊόντων και κυτταρικών θραυσμάτων (Lana και συν., 2014, 2017, 2020). Η ενεργοποίηση της μικρογλοίας θεωρείται προστατευτικός μηχανισμός κατά την ισχαιμία (Hanisch and Kettenmann, 2007; Ransohoff and Perry, 2009, Kettenmann και συν., 2013), και πιθανά η περαιτέρω αύξηση της μικρογλοίας στην CA3 η οποία θα συμβεί μετά την επαναιμάτωση του ιστού πιθανόν να εξηγεί και την καλύτερη απάντηση αυτής της περιοχής στην βλάβη ισχαιμίας/επαναιμάτωσης (Lana, 2020).

Σε ότι αφορά στην μείωση της ανοσοδραστικότητας του GABA που παρατηρήσαμε μετά από 66 λεπτά *ex vivo* ισχαιμίας στην CA1 περιοχή του υποκάμπου, έχουν αναπτυχθεί πολλές υποθέσεις σχετικά με το λόγο για τον οποίο οι CA1 νευρώνες είναι περισσότερο ευαίσθητοι στην έλλειψη οξυγόνου και γλυκόζης (Gee και συν., 2006, Pugliese και συν., 2006, Cimarosti & Henley 2008, Dixon και συν., 2009, Sun και συν., 2010). Όπως προαναφέρθηκε, οι νευρώνες καταναλώνουν το 75-80% (Hyder και συν., 2013) της εγκεφαλικής ενέργειας για αποκατάσταση των μεμβρανικών δυναμικών μετά από την εκπόλωση, για σύνθεση νευροδιαβιβαστών, και απελευθέρωση τους. Αυτή η απαίτηση ενέργειας είναι ακόμα μεγαλύτερη σε νευρώνες με μεγάλη δραστηριότητα, όπως οι πυραμιδικοί νευρώνες της CA1 περιοχής σε σχέση με τους CA3 νευρώνες (Mizuseki και συν., 2012) και για αυτό το λόγο οι νευρώνες CA1 είναι πιο ευαίσθητοι στο ισχαιμικό στρες (Wilde και συν.,

1997, Padurariu και συν., 2012, De Jong και συν., 1999).

Είναι γνωστό ότι, μερικά λεπτά μετά την ισχαιμία, (έλλειψη γλυκόζης και οξυγόνου) μειώνει τα επίπεδα του ενδοκυττάρου ATP, με επακόλουθη δυσλειτουργία των διαύλων Na^+/K^+ , εκπόλωση και αύξηση του εξωκυττάρου γλουταμινικού (διεγερτοτοξικότητα). Θεωρείται ότι, η ενεργοποίηση κατά κύριο λόγο των NMDA υποδοχέων του γλουταμινικού παίζει ρόλο στην επαγόμενη από το Ca^{++} διεγερτοτοξικότητα. Έχει διαπιστωθεί ότι, οι διάφορες υπομονάδες των NMDA υποδοχέων παίζουν διαφορετικό ρόλο (νευροτοξικό ή προστατευτικό), (Shen και συν., 2022) και εκφράζονται σε διαφορετικές αναλογίες στις CA1 και CA3 περιοχές του ιπποκάμπου. Επιπλέον, η ισορροπία μεταξύ των δράσεων των κινασών και φωσφατασών είναι διαφορετική στις υποπεριοχές του ιπποκάμπου, με την CA1 περιοχή να ευνοείται από τη δράση της τυροσινικής κινάσης, ενώ η CA3 από την φωσφατάση (Gee και συν., 2006). Επίσης, η έκφραση των NR2B είναι υψηλότερη στην CA1 από την CA3 περιοχή, εξηγώντας με αυτό τον τρόπο την μεγαλύτερη ευαλωτότητα της CA1 περιοχής μετά από ισχαιμία.

Συμπερασματικά θα μπορούσαμε να πούμε ότι, σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, 66 λεπτά ισχαιμίας δεν έχουν κάποια εμφανή επίδραση στην ιστοπαθολογία του ιστού (σήμανση των σωματιδίων Nissl) και τον κυτταρικό θάνατο στον ιπποκάμπο επίμυων ενώ επηρεάζουν κατά διαφορετικό τρόπο την έκφραση του GABA στον ιστό. Η διαφορετική επίδραση της ισχαιμίας στην ανοσοδραστικότητα του GABA στην CA3 περιοχή του ιπποκάμπου έναντι των άλλων δύο περιοχών που μελετήθηκαν υπογραμμίζει την ανθεκτικότητα της περιοχής αυτής του ιπποκάμπου στην ισχαιμία. Περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες προκειμένου να διερευνηθούν διεξοδικά οι μηχανισμοί που οδηγούν στην διαφορετική αυτή ανοχή στην ισχαιμία της CA3 περιοχής του ιπποκάμπου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Άρθρα

- Adhami F, Liao G, Morozov YM, Schloemer A, Schmithorst VJ, Lorenz JN, Dunn RS, Vorhees CV, Wills-Karp M, Degen JL (2006) Cerebral ischemia-hypoxia induces intravascular coagulation and autophagy. *Am J Pathol* 169:566-583.
- Amaral DG (1978) A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J Comp Neurol* 182: 851-914.
- Amaral DG, Kurz J. An analysis of the origins of the cholinergic noncholinergic septal projections to the hippocampal formation of the rat. *J Comp Neurol*, 240:37-59,1985
- Amaral DG, Witter MP. 1995, Hippocampal Formation, In: *The rat nervous system*, 2nd ed. Academic Press Inc.
- Amaral, D. G., & Lavenex, P. (2007). Hippocampal Neuroanatomy. In P. Andersen, R. Morris, D. Amaral, T. Bliss & J. O'Keefe (Eds.), *The Hippocampus Book* (pp. 37-114). Oxford: Oxford University Press
- Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., & O'Keefe, J. (2007). Historical Perspective: Proposed Functions, Biological Characteristics, and Neurobiological Models of the Hippocampus. In P. Andersen, R. Morris, D. Amaral, T. Bliss & J. O'Keefe (Eds.), *The Hippocampus Book* (pp. 9-36). Oxford: Oxford University Press Download από <http://213.230.96.51/files/ebooks/Biologiya>
- Andine P, Sandberg M, Lehmann A, Hagberg H. Intra- and extracellular changes of aminoacids in the cerebral cortex of the neonatal rat during hypoxia ischemia. *Brain Res Dev Brain Res*, 64:115-120, 1991
- Auer RN, Hugh J, Cosgrove E, Curry B. Neuropathologic findings in three cases of profound hypoglycemia. *Clin Neuropathol* 1989;8:63-8.
- Auer RN, Kalimo H, Olsson Y, Siesjo BK (1985) The temporal evolution of hypoglycemic brain damage. I. Light- and electron-microscopic findings in the rat cerebral cortex. *Acta Neuropathol* 67:13-24
- Babb TL., Brown WJ. Pathological findings in epilepsy. In: Engel J Jr, ed. *Surgical treatment of the epilepsies*. New York: Raven Press 1987:511-40
- Back T, Hemmen T, Schuler OG (2004) Lesion evolution in cerebral ischemia. *J Neurol* 251:388-97
- Bartsch T, Schönfeld R, Müller F, Alfke K, Leplow B, Aldenhoff J, Deuschl G, Koch J (2010) Focal lesions of human hippocampal CA1 neurons in transient global amnesia impair place memory. *Science* 328:1412-1415.
- Beilharz EJ, Williams CE, Dragunow M, Sirimanne ES, Gluckman PD. Mechanisms of delayed cell death following hypoxic-ischemic injury in the immature rat: evidence for apoptosis during selective neuronal loss. *Brain Res Mol Brain Res*, 29:1-14,1995
- Cajal Rammon S (1893) Estructura del asta de Ammon y fascia dentata. *Ann Soc Esp Hist Nat* 22.
- Cammermeyer J (1961) The importance of avoiding 'dark' neurons in experimental neuropathology. *Acta Neuropathol* 1:245-70
- Cammermeyer J (1978) Is the solitary dark neuron a manifestation of postmortem trauma to the brain inadequately fixed by perfusion? *Histochemistry*;56(2):97-115.
- Cappaert, N.L.M., van Strien, N.M., Witter, M.P., 2014. Hippocampal Formation. In: Paxinos, G. (Ed.), *The Rat Brain*. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, US, London, UK, pp. 511-574

- Cimarosti, H., and Henley, J. M. (2008). Investigating the mechanisms underlying neuronal death in ischemia using in vitro oxygen-glucose deprivation: Potential involvement of protein SUMOylation. *Neuroscientist* 14, 626–636
- Clarke DD, Sokoloff L. Circulation and energy metabolism of the brain, in: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Molinoff SK, Fisher PB, Uhler MD (Eds), *Basic Neurochemistry*. Lippincott-Raven Philadelphia, 1999: 637-669.
- Cohen, N. J., & Squire, L. R. (1980). Preserved learning and retention of pattern-analyzing skill in amnesia: dissociation of knowing how and knowing that. *Science*, 210(4466), 207-210
- Colbourne F, Li H, Buchan AM (1999) Continuing postischemic neuronal death in CA1 influence of ischemia duration and cytoprotective doses of NBQX and SNX-111 in rats. *Stroke* 30:662-668.
- Cox DW, Morris PG, Bachelard HS. Kinetic analysis of the cerebral creatine kinase reaction under hypoxic and hypoglycaemic conditions in vitro. A ³¹P-NMR study. *Biochem J* 1988;255(2):523-27
- Coyle P, (1976) Vascular Patterns of the Rat Hippocampal Formation, *EXPERIMENTAL NEUROLOGY* 52, 447-458
- De Jong, G. I., Farkas, E., Stienstra, C. M., Plass, J. R. M., Keijsers, J. N., De La Torre, J. C., και συν. (1999). Cerebral hypoperfusion yields capillary damage in the hippocampal CA1 area that correlates with spatial memory impairment. *Neuroscience* 91, 203–210
- Deitmer JW, Theparambil SM, Ruminot I, Noor SI, Becker HM,(2019) Energy Dynamics in the Brain: Contributions of Astrocytes to Metabolism and pH Homeostasis, *Front. Neurosci.* 13:1301.
- Dixon, R. M., Mellor, J. R., and Hanley, J. G. (2009). PICK1-mediated glutamate receptor subunit 2 (GluR2) trafficking contributes to cell death in oxygen/glucose-deprived hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* 284, 14230–14235.
- Dos-Anjos S., Martínez-Villayandre B., Montori S., Pérez-García C. C., and Fernández-López A. 2009. Early modifications in N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNA levels in an oxygen and glucose deprivation model using rat hippocampal brain slices. *Neuroscience*. 164(3):1119-26.
- Duvernoy, H., Delon, S., and Vannson, J. L. (1983). The vascularization of the human cerebellar cortex. *Brain Res. Bull.* 11, 419–480
- Eichenbaum, H., & Cohen, N. J. (2014). Can we reconcile the declarative memory and spatial navigation views on hippocampal function? *Neuron*, 83(4), 764-770. doi: 10.1016/j.neuron.2014.07.032
- Eichenbaum, H., Dudchenko, P., Wood, E., Shapiro, M., & Tanila, H. (1999). The hippocampus, memory, and place cells: is it spatial memory or a memory space? *Neuron*, 23(2), 209-226
- Ekholm A, Asplund B, Siesjö BK. Perturbation of cellular energy in complete ischemia: Relationship to dissipative ion fluxes. *Exp Brain Res* 1992;90:47-53.
- Erbsloh F, και συν. The glucose consumption of the brain & its dependence on the liver. *Arch Psychiatr Nervenkr Z Gesamte Neurol Psychiatr.* 1958; 196:611–626.
- Erecinska M, Silver A. Ions and energy in mammalian brain. *Prog Neurobiol* 1994;43:37-71.
- Erfani S, Khaksari M, Oryan S, Shamsaei N, Aboutaleb N, Nikbakht F, Jamali-Raeufy N, Gorjipour F (2015) Visfatin reduces hippocampal CA1 cells death and improves learning and memory deficits after transient global ischemia/reperfusion. *Neuropeptides* 49:63-68.
- Freund T. F. and Buzaki G. (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6(4): 347-470.
- Frotscher M (1992) Application of the Golgi/electron microscopy technique for cell identification in immunocytochemical, retrograde labeling, and developmental studies of hippocampal neurons. *Microsc Res Tech* 23:306–323

- Garcia JH, Yoshida Y, Chen H, Li Y, Zhang ZG, Lian J, Chen S, Chopp M (1993) Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Pathol* 142:623–35
- Gee, C. E., Benquet, P., Raineteau, O., Rietschin, L., Kirbach, S. W., and Gerber, U. (2006). NMDA receptors and the differential ischemic vulnerability of hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* 23, 2595–2603
- Gourdin M and Dubois P, Impact of Ischemia on Cellular Metabolism, Published: March 13th 2013 <https://www.intechopen.com/chapters/43476>
- Hammond C, Crepel V, Gozlan H, Ben-Ari Y. Anoxic LTP sheds light on the multiple facets of NMDA receptors. *Trends Neurosci*, 17:497–503,1994
- Han ZS, Buhl EH, Lorinczi Z, Somogyi P (1993) A high degree of spatial selectivity in the axonal and dendritic domains of physiologically identified local-circuit neurons in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 5:395–410.
- Hanisch, U. K., and Kettenmann, H. (2007). Microglia: Active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. Neurosci.* 10, 1387–1394
- Hansen AJ, Nedergaard M. Brain ion homeostasis in cerebral ischemia. *Neurochem Pathol* 1988;9:195-209.
- Hansen AJ. Effect of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiol Rev* 1985;65:101-48.
- Harris A Robert. Carbohydrate Metabolism I: Major metabolic pathways and their control. In: Devlin M. Thomas. *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. Wiley-Liss Sixth Edition United States of America, 2006: pp 582-633.
- Hertz L, Dienel AG. Energy metabolism in the brain, in: Dwyer Donard και συν. *Glucose Metabolism in the Brain*, International Review of Neurobiology Volume 51, Academic Press 2002: 2-14, 24-28.
- Howard, M. W., & Eichenbaum, H. (2015). Time and space in the hippocampus. *Brain Res*, 1621, 345-354. doi: 10.1016/j.brainres.2014.10.06
- Howarth C, και συν. Updated energy budgets for neural computation in the neocortex and cerebellum. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012; 32:1222–1232.
- Hyder, F., Rothman, D. L., and Bennett, M. R. (2013). Cortical energy demands of signaling and non-signaling components in brain are conserved across mammalian species and activity levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 110, 3549–3554.
- Ishizuka N, Cowan WM, Amaral DG (1995) A quantitative analysis of the dendritic organization of pyramidal cells in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 362:17–45.
- Jabaudon, D., Scanziani, M., Gähwiler, B. H., and Gerber, U. (2000). Acute decrease in net glutamate uptake during energy deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97, 5610–5615
- Ji J, Maren S. (2007) Hippocampal involvement in contextual modulation of fear extinction. *Hippocampus* 17: 749-758
- Johnston, M. T. (2001). A clinician's guide to resources on evidence-based medicine. *Proc. (Bayl. Univ. Med. Cent).* 14, 32–33.
- Kanak, D. J., Rose, G. M., Zaveri, H. P., and Patrylo, P. R. (2013). Altered Network Timing in the CA3-CA1 Circuit of Hippocampal Slices from Aged Mice. *PLoS One* 8:e61364
- Kettenmann, H., Kirchhoff, F., and Verkhratsky, A. (2013). Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. *Neuron* 77, 10–18.
- Kherani ZS, Auer RN (2008) Pharmacologic analysis of the mechanism of dark neuron production in cerebral cortex. *Acta Neuropathol* 116:447–52

- Kirino, T. (1982). Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.* 239, 57–69
- Kirino, T., Tamura, A., and Sano, K. (1986). A reversible type of neuronal injury following ischemia in the gerbil hippocampus. *Stroke* 17, 455–459
- Kjonigsen LJ, Lillehauga S, Bjaalie JG, Witter MP, Leergaard TB. (2015) Waxholm Space atlas of the rat brain hippocampal region: Three-dimensional delineations based on magnetic resonance and diffusion tensor imaging, *Neuroimage* 2015, 108:441-9
- Konkel, A., & Cohen, N. J. (2009). Relational memory and the hippocampus: representations and methods. *Front Neurosci*, 3(2), 166-174. doi: 10.3389/neuro.01.023.2009
- Lana D, Ugolini F, Giovannini MG, 2020, An Overview on the Differential Interplay Among Neurons–Astrocytes–Microglia in CA1 and CA3 Hippocampus in Hypoxia/Ischemia, *Front. Cell. Neurosci.* 14 : (585833)
- Lana, D., Melani, A., Pugliese, A. M., Cipriani, S., Nosi, D., Pedata, F., και συν. (2014). The neuron-astrocyte-microglia triad in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion: Protective effect of dipyridamole. *Front. Aging Neurosci.* 6:322.
- Lana, D., Ugolini, F., Melani, A., Nosi, D., Pedata, F., and Giovannini, M. G. (2017a). The neuron-astrocyte-microglia triad in CA3 after chronic cerebral hypoperfusion in the rat: Protective effect of dipyridamole. *Exp. Gerontol.* 96, 46–62
- Lee J. M., Crabb M. C., Zipfel G. J., Choi D. W. (2000) Brain tissue responses to ischemia. *The Journal of Clinical Investigation.* 106(6): 723-31.
- Liu, H. X., Zhang, J. J., Zheng, P., and Zhang, Y. (2005). Altered expression of MAP-2, GAP-43, and synaptophysin in the hippocampus of rats with chronic cerebral hypoperfusion correlates with cognitive impairment. *Mol. Brain Res.* 139, 169–177.
- Love S, Barber R, Wilcock GK (2000) Neuronal death in brain infarcts in man. *Neuropathol Appl Neurobiol* 26:55–66
- Magistretti PJ, Pellerin L, Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354:1155-1163,(1999)
- Mao J., Price D. D., Philips L. L., Lu J., Mayer J. D. (1995) Increases in protein kinase C gamma immunoreactivity in the spinal cord of rats associated with tolerance to the analgesic effects of morphine. *Brain Res.* 677(2): 257-67.
- Mattiasson, G., Friberg, H., Hansson, M., Elmér, E., and Wieloch, T. (2003). Flow cytometric analysis of mitochondria from CA1 and CA3 regions of rat hippocampus reveals differences in permeability transition pore activation. *J. Neurochem.* 87, 532–544.
- Mattson MP. Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. *Neuromol Med.* 2003;3:65–94.
- Mc Kee T, McKee J, *Biochemistry : the molecular basis of life*, Oxford Press 2012, Chapter 9, Carbohydrate Metabolism
- Mergenthaler P, Lindauer U, Diene GA, Meisel A, (2013) Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function *Trends Neurosci.* October ; 36(10): 587–597
- Mitani A, Andou Y, Kataoka K (1992) Selective vulnerability of hippocampal CA1 neurons cannot be explained in terms of an increase in glutamate concentration during ischemia in the gerbil: brain microdialysis study. *Neuroscience* 48:307-313.
- Mizuseki, K., Royer, S., Diba, K., and Buzsáki, G. (2012). Activity dynamics and behavioral correlates of CA3 and CA1 hippocampal pyramidal neurons. *Hippocampus* 22, 1659–1680

- Morán, J., Stokowska, A., Walker, F. R., Mallard, C., Hagberg, H., and Pekna, M. (2017). Intranasal C3a treatment ameliorates cognitive impairment in a mouse model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Exp. Neurol.* 290, 74–84
- Mouritzen-Dam A. Hippocampal neuron loss in epilepsy after experimental seizures. *Acta Neurol* 1982;66:601-42.
- Nakano S, Kogure K, Fujikura H. Ischemia-induced slowly progressive neuronal damage in the rat brain. *Neuroscience* 1990;38:115–24
- Nelson L.D., Cox M.M. Carbohydrates and Glycobiology, in: Nelson L.D., Cox M.M. *Lehninger Biochemistry*, 4th Edition, WH Freeman and Company, New York, 2005: 238 – 247.
- Nicoll RA, Kauer JA, Malenka RC. The current excitement in long-term potentiation. *Neuron*.1988 Apr;1(2):97-103.
- Northington, F. J., Chavez-Valdez, R., and Martin, L. J. (2011). Neuronal cell death in neonatal hypoxia-ischemia. *Ann. Neurol.* 69, 743–758
- O’Keefe, J., Burgess, N., Donnett, J. G., Jeffery, K. J., & Maguire, E. A. (1998). Place cells, navigational accuracy, and the human hippocampus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 353(1373), 1333-1340. doi: 10.1098/rstb.1998.0287
- Ooigawa H., Nawashiro H., Fukui S., Otani N., Osumi A., Toyooka, T. and Shima K., 2006, “The fate of Nissl-stained dark neurons following traumatic brain injury in rats: difference between neocortex and hippocampus regarding survival rate”, *Acta Neuropathologica*, 112(4), p.471- 481.
- Ozawa S., Kamiya H., Tsuzuki K. (1998) Glutamate receptors in the mammalian nervous system. *Progress in Neurobiology*. 54(5): 581-618.
- Padurariu, M., Ciobica, A., Mavroudis, I., Fotiou, D., and Baloyannis, S. (2012). Hippocampal Neuronal Loss in the CA1 and CA3 Areas of Alzheimer’s Disease Patients - PubMed.Psychiatr. Danub 24, 152–158.
- Palomero Gallagher N, Kedo O, Mohlberg H, Zilles K, Amunts K, Multimodal mapping and analysis of the cyto and receptor architecture of the human hippocampus *Brain Structure and Function* (2020) 225:881–907
- Pellerin L, Bonvento G, Chatton JY, Pierre K, Magistretti PJ. Role of neuron-glia interaction in the regulation of brain glucose utilization. *Diabetes Nutr Metab* 2002;15(5):268-273.
- Pelkey KA, Chittajallu R, Craig MT, Tricoire L, Wester JC, and McBain CJ (2017) Hippocampal GABAergic Inhibitory Interneurons.” *Physiological Reviews* 97, no. 4.
- Petito, C. K., Feldmann, E., Pulsinelli, W. A., and Plum, F. (1987). Delayed hippocampal damage in humans following cardiorespiratory arrest., *Neurology* 37, 1281–1286.
- Petralia R. S., Wang Y. X., Wenthold R. J. (1994) The NMDA receptor subunits NR2A and NR2B show histological and ultrastructural localization patterns similar to those of NR1. *The Journal of neuroscience*. 14(10): 6102-6120.
- Pugliese, A. M., Coppi, E., Spalluto, G., Corradetti, R., and Pedata, F. (2006). A 3 adenosine receptor antagonists delay irreversible synaptic failure caused by oxygen and glucose deprivation in the rat CA1 hippocampus in vitro. *Br. J. Pharmacol.*147, 524–532.
- Pulera MR, Adams LM, Liu H, Santos DG, Nishimura RN, Yang F, Cole GM, Wasterlain CG. Apoptosis in a neonatal rat model of cerebral hypoxiaischemia. *Stroke*, 29:2622–2630,1998
- Pulsinelli, W. A., Brierley, J. B., and Plum, F. (1982). Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann. Neurol.*, 11, 491–498

- Ransohoff, R. M., and Perry, V. H. (2009). Microglial Physiology: Unique Stimuli. Specialized Responses. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 119–145.
- Ribak C. E., Vaughn J. E., Saito K. (1978) Immunocytochemical localization of glutamic acid decarboxylase in neuronal somata following colchicine inhibition of axonal transport. *Brain Res.* 140(2): 315-332.
- Robin J, Hirshhorn M, Rosenbaum RS, Winocur G, Moscovitch M, Grady CL (2015) Functional connectivity of hippocampal and prefrontal networks during episodic and spatial memory based on realworld environments. *Hippocampus* 25:81-93.
- Rossi, D. J., Oshima, T., and Attwell, D. (2000). Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403, 316–321
- Rybachuk O, Kopach O, Krotov V, Voirenko N, Pinveva T,(2017), Optimized Model of Cerebral Ischemia *In situ* for the Long-Lasting Assessment of Hippocampal Cell Death, *Front. Neurosci.* 11 (388)
- Rytter, A., Cronberg, T., Aszte, F., Nemali, S., and Wieloch, T. (2003). Mouse hippocampal organotypic tissue cultures exposed to *in vitro* “ischemia” show selective and delayed CA1 Damage that is aggravated by glucose. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23, 23–33
- Shen, Zihuan, Mi Xiang, Chen Chen, Fan Ding, Yuling Wang, Chang Shang, Laiyun Xin, Yang Zhang, and Xiangning Cui (2022) Glutamate Excitotoxicity: Potential Therapeutic Target for Ischemic Stroke. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 151: 113125.
- Sun L, Kuroiwa T, Ishibashi S, Miki K, Li S, Xu H, Endo S, Mizusawa H (2009) Two region-dependent pathways of eosinophilic neuronal death after transient cerebral ischemia. *Neuropathology* 29:45–54
- Sun, X., Yao, H., Douglas, R. M., Gu, X. Q., Wang, J., and Haddad, G. G. (2010). InsulinPI3K signaling protects dentate neurons from oxygen-glucose deprivation in organotypic slice cultures. *J. Neurochem.* 112, 377–388
- Tatu L. and Vuillier F., 2014, “Structure and Vascularization of the Human Hippocampus. *Frontiers of Neurology and Neuroscience*, p. 18-25.
- Traystman R. J. 2003. Animal models of focal and global cerebral ischemia.” *ILAR J.* 44(2):85-95.
- Vannuci RC. Experimental biology of cerebral hypoxia-ischemia:relation to perinatal brain damage. *Pediatr Res*, 27(4):317-326,1990
- Vannuci RC, Palmer C. Hypoxic-ischemic encephalopathy:pathogenesis and neuropathology. *Neonatal-Perinatal Medicine*, 856-877,1997
- Vornov J. J., Tasker R. C. and Coyle J. T. 1994. Delayed protection by MK-801 and tetrodotoxin in a rat organotypic hippocampal culture model of ischemia. *Stroke.* 25(2):457-64-5.
- Wang, S. H., & Morris, R. G. (2010). Hippocampal-neocortical interactions in memory formation, consolidation, and reconsolidation. *Annu Rev Psychol*, 61, 49-79, c41-44. doi: 10.1146/annurev. Psych.093008.100523
- Wedzony K., Czyrak A. (1997) The distribution of the NMDA R1 subunit in the rat hippocampus – an immunocytohistochemical study. *Brain Research.* 768: 333–337.
- Whittingham T. S., Lust W. D. and Passonneau J. V. 1984. An in vitro model of ischemia: metabolic and electrical alterations in the hippocampal slice. *J Neurosci.* 4(3):793-802
- Wilde, G. J. C., Pringle, A. K., Wright, P., and Iannotti, F. (1997). Differential vulnerability of the CA1 and CA3 subfields of the hippocampus to superoxide and hydroxyl radicals in vitro. *J. Neurochem.* 69, 883–886.

- Xu, Y., Tian, Y., Tian, Y., Li, X., and Zhao, P. (2016). Autophagy activation involved in hypoxic-ischemic brain injury induces cognitive and memory impairment in neonatal rats. *J. Neurochem.* 139, 795–805
- Zalewska, T., Ziemka-Nafęcz, M., and Domańska-Janik, K. (2005). Transient forebrain ischemia effects interaction of Src, FAK, and PYK2 with the NR2B subunit of N-methyl-d-aspartate receptor in gerbil hippocampus. *Brain Res.* 1042, 214–223
- Zheng YQ, Liu JX, Li X.Z, Xu L, Xu YG (2009) RNA interference-mediated downregulation of Beclin1 attenuates cerebral ischemic injury in rats. *Acta Pharmacol Sin* 30:919-927.
- Zierler K. Whole body glucose metabolism. *Am J Physiol.* 1999 Mar; 276(3 Pt 1): E409-26. Review.
- Zola-Morgan, S., Squire, L. R., and Amaral, D. G. (1986). Human amnesia and the medial temporal region: Enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J. Neurosci.* 6, 2950–2967

Ελληνική Βιβλιογραφία

Ελληνική Διαβητολογική εταιρεία (ΕΔΕ), Κατευθυντήριες οδηγίες για τη διαχείριση του διαβητικού ασθενούς, 2019

Βιβλία

The Hippocampus Book, Oxford University Press, 2007; 37-114

Ιστότοποι

<https://www.quora.com/What-is-the-main-artery-that-feeds-the-hippocampus>