



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη και επιληπτογένεση –
Μακροχρόνιες αλλαγές στον ιππόκαμπο επίμυων»

Δήμητρα Τζίνη

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Άννα Βασιλάκη, Επίκουρος Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Επιβλέπουσα

Ευτυχία Ασπροδίνη, Καθηγήτρια Φαρμακολογίας

Δημήτριος Μπόγδανος, Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων

*Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
ως μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στις Κλινικές
Εφαρμογές της Μοριακής Ιατρικής*

Λάρισα, Μάρτιος 2023



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

“Prenatal alcohol exposure and epileptogenesis – Long-term
alterations in the rat hippocampus”

By

Dimitra Tzini

Advisory Thesis Committee:

Anna Vasilaki, Assistant Professor of Pharmacology, Supervisor

Eftihia Asproдини, Professor of Pharmacology

Bogdanos Dimitrios, Professor of Pathology and Autoimmune Diseases

*Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment
of the requirements for the degree of Master in Clinical Applications of Molecular Medicine*

Larissa, March 2023

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη της Επίκουρου Καθηγήτριας Φαρμακολογίας, Δρ. Άννας Βασιλάκη, την οποία θα ήθελα να ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου καθώς αποτέλεσε μέντορα για εμένα, παρέχοντάς μου συνεχή επιστημονική καθοδήγηση, κίνητρα για προβληματισμό και εξέλιξη και αμέριστη υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας μου.

Αδιαμφισβήτητα οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Καθηγήτρια Φαρμακολογίας Δρ. Ευτυχία Ασπροδίνη για την υποστήριξη, την εμπιστοσύνη προς το πρόσωπό μου, το αμείωτο ενδιαφέρον σχετικά με την πρόοδο των πειραμάτων και τις καίριες συμβουλές της καθ' όλη τη διάρκεια διεκπεραίωσης της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Φυσικά, ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια Φυσιολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων Δρ. Αικατερίνη Ψαρροπούλου καθώς και τις φοιτήτριες κκ Τατιάνα Κουκοβίνη και Αικατερίνη Παλιάγκα για την παροχή των πειραματόζωων και την καταλυτική συμβολή τους στη μεθοδολογία της εργασίας αυτής.

Έπειτα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Πρόεδρο του ΠΜΣ Δρ. Δημήτριο Μπόγδανο, Καθηγητή Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων, διότι χάρη σε εκείνον το πρόγραμμα σπουδών παραμένει άκρως ενδιαφέρον και δίνει έναυσμα σε νέους ερευνητές να διεκπεραίνουν το πεδίο των γνώσεών τους τόσο σε θεωρητικό επίπεδο όσο και σε επίπεδο εργαστηριακών τεχνικών.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω ολόψυχα την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας Δρ. Αποστολία Χατζηευθυμίου, την Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια Δρ. Ροδόπη Σταματίου, το μέλος Ε.Τ.Ε.Π. του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας Δρ. Ηλία Μπέγα καθώς και τους φοιτητές και συναδέλφους μου στο εργαστήριο· την Ευαγγελία Λέμα, την Παναγιώτα Τρισόκκα, το Θεοφάνη Πράττο, τη Βέρα Ρίγγα και το Χρήστο Κορσκετίδη για την ουσιαστική συνεργασία, τη βοήθεια και την υποστήριξή τους.

Κλείνοντας, το μεγαλύτερο ευχαριστώ οφείλω να εκφράσω στην αγαπημένη μου οικογένεια που υποστηρίζει καθένα όνειρο, στόχο και φιλοδοξία μου και, φυσικά, τις φίλες μου και το σύντροφό μου για τη συνεχή υποστήριξη, κατανόηση και ενθάρρυνση.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ABSTRACT	2
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
1.1. Κεντρικό Νευρικό Σύστημα	3
1.1.1. Φυσιολογική ανάπτυξη στον άνθρωπο και τον επίμυ	3
1.1.2. Κυτταρικοί τύποι	7
1.2. ΑΛΚΟΟΛ ΚΑΙ ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	13
1.2.1. Γενικά χαρακτηριστικά	13
1.2.2. Μεταβολισμός της αιθανόλης από το έμβρυο	13
1.2.3. Επιπτώσεις της αιθανόλης στο αναπτυσσόμενο ΚΝΣ	14
1.2.4. Ζωικά μοντέλα προγεννητικής έκθεσης στην αλκοόλη	19
1.3. ΑΛΚΟΟΛ ΚΑΙ ΕΠΙΛΗΨΙΑ	22
1.3.1. Παθοφυσιολογία του <i>Status Epilepticus</i>	22
1.3.2. ΗΜGB1 και διεγερτοτοξικότητα	23
1.3.3. Αστροκύτταρα και διεγερτοτοξικότητα	25
1.3.4. Ζωικά μοντέλα επιληψίας	27
1.4. ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΣ	28
1.4.1. Ανατομία και κυτταρικοί τύποι ιδίως ιππόκαμπου	29
1.4.2. Ανατομία και κυτταρικοί τύποι οδοντωτής έλικας	31
1.4.3. Διασυνδέσεις του ιπποκάμπειου σχηματισμού	33
1.4.4. Λειτουργίες	35
1.4.5. Επιπτώσεις της ΡΑΕ στον ιπποκάμπειο σχηματισμό	35
1.5. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	37
2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	38
2.1. Πειραματόζωα	38
2.2. Πρωτόκολλο έκθεσης στην αιθανόλη	38

2.3.	Ενδοκαρδιακή μονιμοποίηση επίμυος (transcardial perfusion)	39
2.4.	Ζελατινοποίηση αντικειμενοφόρων πλακών	40
2.5.	Ανοσοφθορισμός	41
2.6.	Ομογενοποίηση ιστών και εκχύλιση κυτταρικών πρωτεϊνών	42
2.7.	Ανίχνευση ολικής πρωτεΐνης δείγματος	43
2.8.	Ανοσοαποτύπωση κηλίδας (<i>Dot Blot Assay, DBA</i>)	43
2.9.	Ανοσοανίχνευση των υπό μελέτη πρωτεϊνών	45
2.10.	Μέθοδος χρώσης Golgi – Cox (<i>Golgi-Cox Staining Method</i>)	46
2.11.	Ανάλυση εικόνας και στατιστική ανάλυση δεδομένων	50
2.11.1.	Αριθμός κυττάρων στις στιβάδες των CA1, CA3 και DG περιοχών του ιππόκαμπου.....	50
2.11.2.	Έκταση που καταλαμβάνουν τα αστροκύτταρα στις στιβάδες των CA1, CA3 και DG περιοχών του ιππόκαμπου.....	51
2.11.3.	Αριθμός νευρώνων στις στιβάδες των CA1, CA3 και DG περιοχών του ιππόκαμπου.....	51
2.11.4.	Αριθμός διακλαδώσεων και δενδριτικών ακανθών των νευρώνων....	52
2.11.5.	Συγχώνευση φθορισμών	53
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	54
3.1.	Επίδραση της προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη και της επιληπτογένεσης στον αριθμό των κυττάρων στον ιππόκαμπο	54
3.1.1.	CA1 πεδίο	54
3.1.2.	CA3 πεδίο	56
3.1.3.	Οδοντωτή έλικα.....	58
3.2.	Επίδραση της προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη και της επιληπτογένεσης στον αριθμό και τη μορφολογία των νευρώνων στον ιππόκαμπο	
	60	
3.2.1.	CA1 πεδίο	61
3.2.2.	CA3 πεδίο	62
3.2.3.	Οδοντωτή έλικα.....	64
3.2.4.	Μορφολογία νευρώνων	65

3.3. Επίδραση της προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη και της επιληπτογένεσης στην έκφραση και στην ανοσοδραστικότητα της GFAP των αστροκυττάρων στον υπόκαμπο	66
3.3.1. Ανοσοαποτύπωση κηλίδας για την πρωτεΐνη GFAP	66
3.3.2. Ανοσοδραστικότητα της GFAP στο CA1 πεδίο.....	67
3.3.3. Ανοσοδραστικότητα της GFAP στο CA3 πεδίο.....	69
3.3.4. Ανοσοδραστικότητα της GFAP στην οδοντωτή έλικα.....	71
3.4. Επίδραση της προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη και της επιληπτογένεσης στην έκφραση της πρωτεΐνης Iba1 των κυττάρων της μικρογλοίας στον υπόκαμπο	73
3.4.1. Ανοσοαποτύπωση κηλίδας για την πρωτεΐνη Iba1.....	73
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	75
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	82
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	92

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κατανάλωση αλκοόλ από τη μητέρα κατά τη διάρκεια της κύησης έχει δυσμενείς επιδράσεις σε πλήθος εγκεφαλικών περιοχών του αναπτυσσόμενου Κεντρικού Νευρικού Συστήματος του εμβρύου οι οποίες, σε κυτταρικό επίπεδο, μεταφράζονται, μεταξύ άλλων, σε έντονο κυτταρικό θάνατο, φλεγμονή και διαταραχές στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Μεταξύ των περιοχών που επηρεάζονται από την προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη (*Prenatal Alcohol Exposure, PAE*) περιλαμβάνεται και ο ιππόκαμπος, εγκεφαλική δομή με ουσιαστικό ρόλο στις διαδικασίες της μνήμης και της μάθησης και τη γένεση ή/και την εξάπλωση της επιληπτικής δραστηριότητας στον εγκέφαλο. Οι αλλαγές που επιφέρει η PAE στον εγκέφαλο προάγουν την εμφάνιση επιληπτικών κρίσεων σε ποσοστό 3-21% παιδιών των οποίων οι μητέρες κατανάλωναν αλκοόλ κατά τη διάρκεια της κύησης έναντι του 0,6% του γενικού πληθυσμού, φαινόμενο το οποίο δεν παρατηρείται στους επίμυες.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η μελέτη μακροχρόνιων αλλαγών που επιφέρει η PAE, η επιληπτογένεση με τον GABA_A ανταγωνιστή πεντυλενοτετραζόλη (*pentylene-tetrazol, PTZ*) και ο συνδυασμός τους στον ιππόκαμπο Sprague-Dawley επίμυων. Οι αλλαγές στον αριθμό των νευρώνων, των αστροκυττάρων και των κυττάρων της μικρογλοίας διερευνήθηκαν μέσω ανοσοϊστοχημικών χρώσεων και ανοσοαποτύπωσης κηλίδας σε τομές και πρωτεϊνικά λύματα ιππόκαμπου, αντίστοιχα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η PAE προκάλεσε στατιστικώς σημαντική μείωση στον αριθμό των κυττάρων στις στιβάδες των υπό μελέτη περιοχών, μέρος των οποίων διαπιστώθηκε ότι αφορούσε ώριμους νευρώνες. Παράλληλα, παρατηρήθηκε ύπαρξη αντιδραστικών αστροκυττάρων η οποία επιβεβαιώθηκε από την αύξηση της ανοσοδραστικότητας και της πρωτεϊνικής έκφρασης της όξινης πρωτεΐνης των ενδιάμεσων ινιδίων της γλοίας (*GFAP, ένδειξη φλεγμονής*). Στους επίμυες με το συνδυασμό των δύο προσβολών, τα κύτταρα και, κατ' επέκταση, τα νευρικά κύτταρα ήταν στατιστικώς σημαντικά αυξημένα, αύξηση που στην περίπτωση της οδοντωτής έλικας μπορεί να μεταφραστεί σε νευρογένεση. Η πιθανότητα ύπαρξης νευρογένεσης ενισχύεται από την παρατήρηση στατιστικώς σημαντικής αύξησης της ανοσοδραστικότητας της GFAP στην υποκοκκώδη ζώνη (*Subgranular Zone, SGV*) και των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης προσαρμογής 1 που δεσμεύει ελεύθερο Ca²⁺ (*Iba1*) και εκφράζεται στα κύτταρα της μικρογλοίας.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υποδεικνύουν πιθανή διαταραχή της διαδικασίας της νευρογένεσης ή εκφυλισμό των νευρώνων και φλεγμονή στον εγκέφαλο PAE επίμυων. Η πρόκληση μιας και μόνης επιληπτικής κρίσης επί εδάφους PAE πιθανώς εγείρει τη νευρογένεση στην οδοντωτή έλικα του ιππόκαμπου. Ωστόσο, περαιτέρω μελέτες καθίστανται απαραίτητες για τη διερεύνηση των υποκείμενων μηχανισμών.

ABSTRACT

Fetal alcohol exposure (PAE) has detrimental effects on the developing Central Nervous System including, increased epileptic-form activity in humans and pronounced cell death, inflammation and impaired cell proliferation in all species studied. Among the areas that are severely affected by PAE is the hippocampus; a brain region involved in memory and learning processing and the onset and/or spreading of epileptic brain activity.

The purpose of this master thesis was the study of the possible long-term effects of PAE and/or a single *status epilepticus* episode at weaning (P21; postnatal day 21) on the hippocampus of Sprague-Dawley rats. In particular, treated animals were exposed throughout gestation and up to P14 to low alcohol levels and/or intraperitoneally injected with the GABA_A antagonist pentylenetetrazol (PTZ) in order to induce a *status epilepticus* episode. All animals were sacrificed at 2 months of age. Changes in the number of neuronal cells in general and astrocyte and microglia activation status were investigated using tissue immunofluorescent and dot blot immunostaining methodologies.

According to our results, PAE led to significantly lower cell number-count in all hippocampal areas studied, including less mature neurons [Neuronal Nuclei antigen (NeuN)⁺-cells] in the pyramidal layers of CA1 and CA3 fields and granular cell layer of the dentate gyrus compared to naïve animals. In addition, PAE animals exhibited increased glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression and immunoreactivity indicating the presence of reactive astrocytes, which is a sign of long-term inflammation. Conversely, PAE – PTZ animals exhibited significantly higher total number of cells, and in particular mature neurons, suggesting increased neurogenesis specifically in the dentate gyrus. The likelihood of neurogenesis in these animals is further substantiated by the observation of statistically significant increased GFAP immunoreactivity in the subgranular zone (SGV) of the dentate gyrus and increased hippocampal ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (*Iba1*) protein levels, a protein expressed in microglia.

The results of the present thesis point towards arrest of neurogenesis or neuronal degeneration and inflammation in the brain of PAE rats. An epileptic crisis in these animals probably triggers neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus. However, further studies are required to investigate the underlying mechanisms of this hypothesis.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

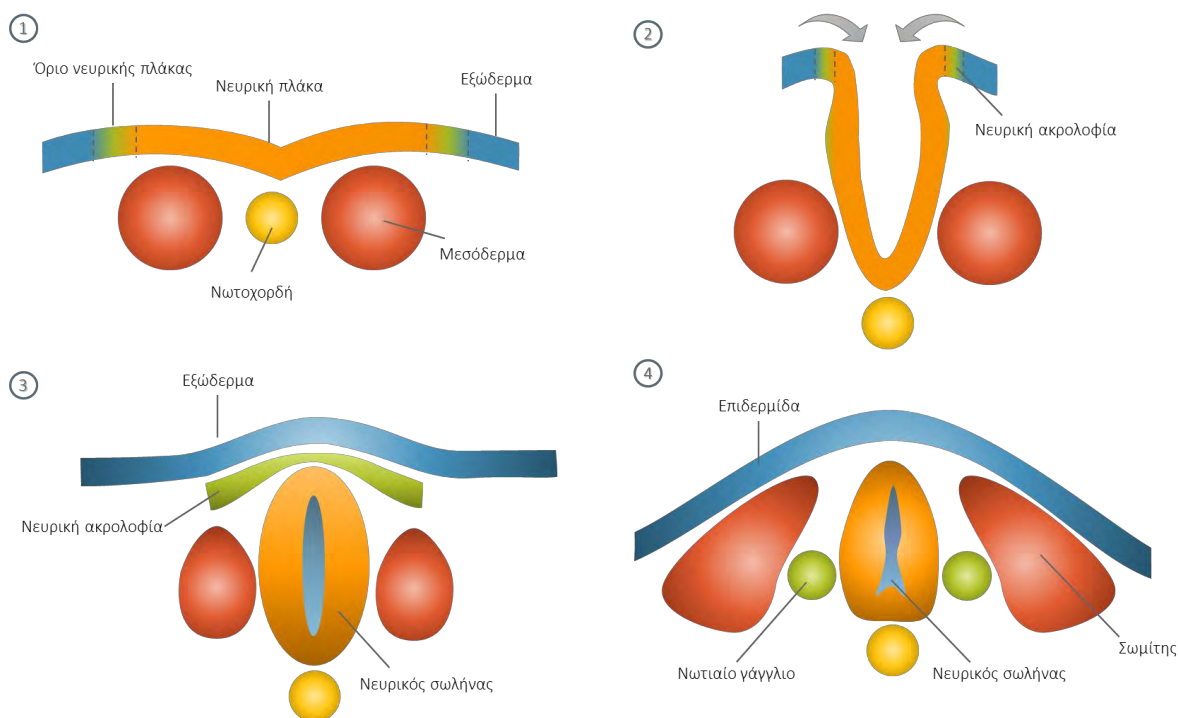
Το νευρικό και το ενδοκρινολογικό σύστημα αποτελούν τα δύο βασικά ρυθμιστικά συστήματα του ανθρώπινου οργανισμού. Στο νευρικό σύστημα λαμβάνουν χώρα πολύπλοκες, αυστηρά οργανωμένες, διακριτές διεργασίες οι οποίες είναι θεμελιώδους σημασίας για τη διατήρηση της ζωής αλλά και για την πραγμάτωση των ενεργειών και των αντιδράσεων των οργανισμών. Όπως είναι γνωστό, το νευρικό σύστημα υποδιαιρείται στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (Central Nervous System, CNS), το οποίο συνίσταται από τον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό, και το Περιφερικό Νευρικό Σύστημα (Peripheral Nervous System, PNS), το οποίο αποτελείται από γάγγλια και νευρικές ίνες που διαβιβάζουν πληροφορίες ανάμεσα στο ΚΝΣ και σε άλλες περιοχές του σώματος [2].

1.1. Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

1.1.1. Φυσιολογική ανάπτυξη στον άνθρωπο και τον επίμυ

Η ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, και κατ' επέκταση του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ), πραγματοποιείται μέσω της αλληλεπίδρασης αρκετών συγχρονισμένων διαδικασιών, μερικές από τις οποίες ολοκληρώνονται πριν από τη γέννηση, ενώ άλλες συνεχίζονται μέχρι και το στάδιο της ενηλικίωσης [3]. Το πρωταρχικό και εξέχουσας σημασίας γεγονός που σηματοδοτεί την ανάπτυξη του ΚΝΣ σε όλα τα σπονδυλωτά είναι ο σχηματισμός μίας ιδιαίτερης πτυχής εξωδερμικής προέλευσης που ονομάζεται νευρικός σωλήνας (*neural tube*, Εικόνα 1) και από τον οποίο θα προκύψει ο νωτιαίος μυελός και ο εγκέφαλος. Ο σχηματισμός του νευρικού σωλήνα στον άνθρωπο λαμβάνει χώρα μεταξύ της 24^{ης} και 28^{ης} ημέρας της κύησης (*Gestational days, GDs 24-28*) με την κύηση να διαρκεί συνολικά 266-280 ημέρες (40 εβδομάδες) ενώ στον επίμυ πραγματοποιείται κατά τις GDs 10.5-11 με την κύηση να διαρκεί συνολικά 20-21 ημέρες [4].

Η κοιλότητα του νευρικού σωλήνα είναι αυτή από την οποία τελικά θα σχηματιστούν οι κοιλίες του εγκεφάλου, ενώ περιοχές που σχηματίζονται πλησίον των κοιλιών και χαρακτηρίζονται ως «ζώνες πολλαπλασιασμού», δίνουν γένεση στους νευρώνες και στα κύτταρα της γλοίας. Ακολουθεί μία περίοδος πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης των νευρώνων σε περιοχές του φλοιού μέσα σε ένα πλέγμα κυττάρων της γλοίας και, εν συνεχεία, μία περίοδος ραγδαίας κυτταρικής απόπτωσης η οποία εξακολουθεί να υφίσταται μεταγεννητικά τόσο στον επίμυ όσο και στον άνθρωπο (Εικόνα 3) [3].



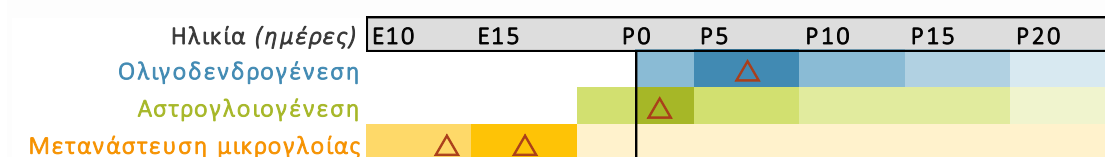
Εικόνα 1: Στάδια σχηματισμού του νευρικού σωλήνα (Συγγραφέας: Άννα Βασιλάκη¹).

Συγκεκριμένα, η νευρογένεση, στους επίμυες συνεχίζεται και κατά τις δύο πρώτες μεταγεννητικές εβδομάδες [5], με χαρακτηριστικό το σχηματισμό του μεγαλύτερου ποσοστού των κοκκωδών κυττάρων της οδοντωτής έλικας του ιππόκαμπου. Ειδικότερα, ο ιππόκαμπος σχηματίζεται τόσο προγεννητικά όσο και μεταγεννητικά στον επίμυ αλλά και στον άνθρωπο. Ωστόσο, στους επίμυες, αν και η πλειοψηφία των πυραμιδικών νευρώνων του ιππόκαμπου παράγεται προγεννητικά, μόνο ένα ποσοστό της τάξεως του 15% των κοκκωδών κυττάρων εντοπίζεται στην οδοντωτή έλικα του ιππόκαμπου κατά τη γέννηση. Στον άνθρωπο, αντιθέτως, το 80% των κοκκωδών κυττάρων της οδοντωτής έλικας έχει δημιουργηθεί πριν τη γέννηση [4].

Κατά την 20^η εβδομάδα της κύησης στον άνθρωπο και κατά τις τρεις πρώτες μεταγεννητικές εβδομάδες στον επίμυ, παρατηρείται μία ακόμη σημαντική αναπτυξιακή διεργασία, η συναπτογένεση (*synaptogenesis*), κατά την οποία λαμβάνει χώρα ο πολλαπλασιασμός και η οργάνωση των συνάψεων. Η συναπτική πυκνότητα, ωστόσο, αυξάνεται ραγδαία μετά τη γέννηση, φαινόμενο που συνοδεύεται από μία ταυτόχρονη απώλεια συνδέσεων μεταξύ των συνάψεων (*synaptic elimination/pruning*). Στον άνθρωπο, η περίοδος απώλειας των συνδέσεων μεταξύ των συνάψεων είναι αρκετά εκτεταμένη και εξακολουθεί να υφίσταται μέχρι και την ενηλικίωση, δίχως να παρατηρείται οποιαδήποτε σημαντική απώλεια νευρικών κυττάρων, και πιθανόν να αντανακλά τη βελτιστοποίηση και ωρίμανση των νευρικών κυκλωμάτων [4].

¹ Ζήτησα και έλαβα άδεια χρήσης όλων των σχημάτων που φέρουν το όνομα της επιβλέπουσα και της συνεπιβλέπουσας της διπλωματικής μου εργασίας κ.κ. Άννα Βασιλάκη και Ευτυχία Ασπροδίνη.

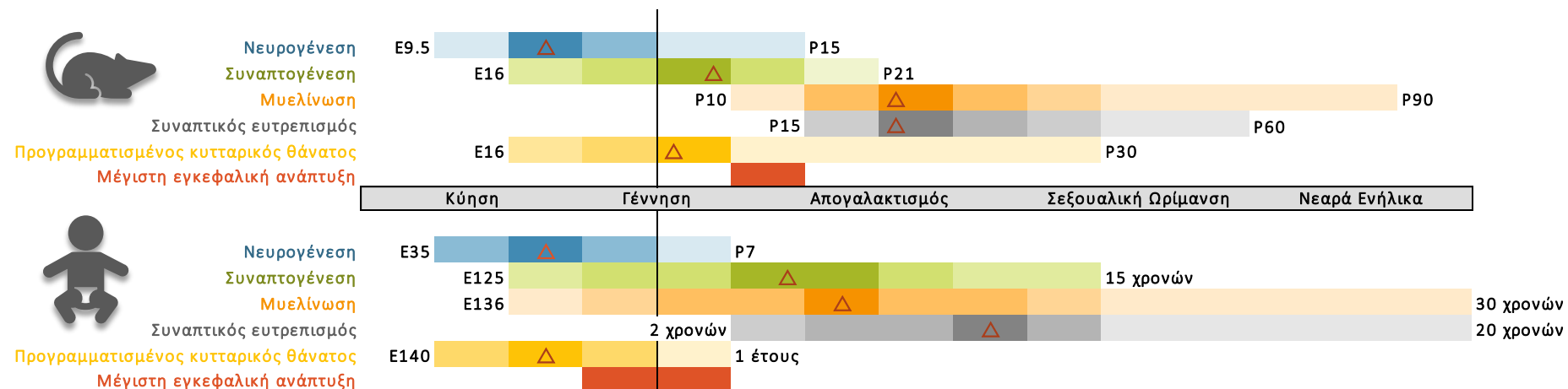
Η συναπτογένεση συμπίπτει χρονικά με την ανάπτυξη των αστροκυττάρων (*astrogliogenesis*) τα οποία πιθανότατα απελευθερώνουν παράγοντες, όπως οι θρομβοσπονδίνες 1 και 2, που ρυθμίζουν την συναπτογένεση. Στον επίμου, η δημιουργία των αστροκυττάρων και των ολιγοδενδροκυττάρων (*oligodendrogenesis*) εκκινεί προς το τέλος της κύησης, κορυφώνεται στην αρχή της μεταγεννητικής περιόδου και ελαττώνεται κατά την PND 20. Από την άλλη πλευρά, τα κύτταρα της μικρογλοίας αποικίζουν τον εγκέφαλο αρκετά νωρίτερα (την εμβρυϊκή μέρα 9.5 στο ποντίκι και λίγο αργότερα στον επίμου, Εικόνα 2). Ομοίως στον άνθρωπο, η γλοιογένεση λαμβάνει χώρα τόσο προγεννητικά όσο και μεταγεννητικά [5].



Εικόνα 2: Χρονοδιάγραμμα της γένεσης των κυττάρων της γλοίας στον επίμου. Η διαφοροποίηση στο χρώμα αντιστοιχεί σε διαφοροποίηση στην ένταση του φαινομένου, Δ: χρονική στιγμή μέγιστης έντασης της εκάστοτε διαδικασίας (Συγγραφέας: Άννα Βασιλάκη, [6]).

Τέλος, μία καθοριστικής σημασίας για τη νευροδιαβίβαση αναπτυξιακή διαδικασία αποτελεί ο σχηματισμός ελύτρων μυελίνης ή μυελίνωση (*myelination*) κατά την οποία ολιγοδενδροκύτταρα περιελίσσονται γύρω από τους νευράξονες των νευρικών κυττάρων [4]. Η μυελίνωση σηματοδοτείται περιφερειακά από το εγκεφαλικό στέλεχος την 29^η εβδομάδα της κύησης στον άνθρωπο και, σε γενικές γραμμές, ακολουθεί συγκεκριμένη κατεύθυνση: κοιλιακά προς ραχιαία και εμπρόσθια προς οπίσθια [3]. Στον άνθρωπο, είναι πλέον κοινώς αποδεκτό ότι η μυελίνωση είναι μία εκτεταμένη χρονικά διεργασία η οποία συνεχίζεται μέχρι την ενήλικη ζωή σε συγκεκριμένες εγκεφαλικές περιοχές και μπορεί να τροποποιηθεί σημαντικά ως απάντηση στην απόκτηση νέων δεξιοτήτων [4,5]. Στον επίμου, ωστόσο, παρατηρείται περιορισμένη μυελίνωση κατά τη γέννηση καθώς, όπως προαναφέρθηκε, η ολιγοδενδρογένεση εκκινεί προς το τέλος της κύησης (Εικόνα 2) [5].

Συμπερασματικά, αν και οι βασικές διαδικασίες της ανάπτυξης του εγκέφαλου των τρωκτικών και του ανθρώπου είναι κοινές, συμβαίνουν σε σημαντικά διαφορετικές χρονικές περιόδους (Εικόνα 3), με το ΚΝΣ του επίμου να χαρακτηρίζεται από έντονη «ανωριμότητα» κατά τη γέννηση και επιταχυνόμενη ανάπτυξη μεταγεννητικά σε σύγκριση με αυτό του ανθρώπου [5].



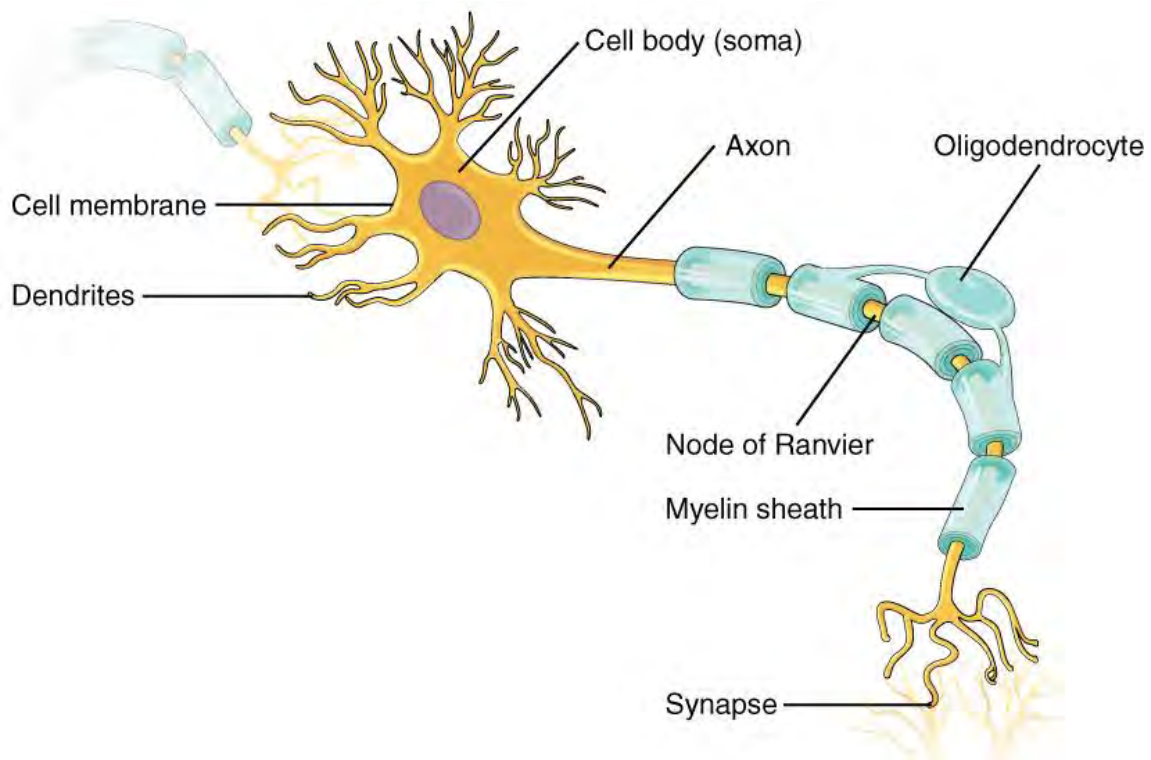
Εικόνα 3: Χρονοδιάγραμμα των αναπτυξιακών διεργασιών στο ΚΝΣ του επίμου και του ανθρώπου. Δ : μέγιστο, η διαφοροποίηση στο χρώμα αντιστοιχεί σε διαφοροποίηση στην ένταση του φαινομένου (Συγγραφέας: Άννα Βασιλάκη, [5]).

1.1.2. Κυτταρικοί τύποι

Μεταξύ των κυττάρων που εντοπίζονται στο ΚΝΣ περιλαμβάνονται τα νευρικά κύτταρα ή νευρώνες και τα νευρογλοιακά κύτταρα ή νευρογλοία.

1.1.2.1. Νευρώνες

Ένας συνήθης νευρώνας αποτελείται από τρεις βασικές περιοχές: το κυτταρικό σώμα, τους δενδρίτες και τον νευράξονα. Ο πυρήνας και τα κυτταρικά οργανίδια εντοπίζονται στο κυτταρικό σώμα, το κέντρο μεταβολισμού του κυττάρου. Από το κυτταρικό σώμα εκφύονται δύο είδη κυτταρικών αποφύσεων: **α.** οι δενδρίτες που, μαζί με το κυτταρικό σώμα, αποτελούν τα σημεία υποδοχής των σημάτων από άλλα κύτταρα και **β.** ο νευράξονας, το τμήμα του νευρώνα που άγει τα μηνύματα σε άλλα κύτταρα [2,7].



Εικόνα 4: Τυπική ανατομία ενός νευρώνα. Τα έλυτρα μυελίνης που περιβάλλουν τον νευράξονα συμβάλλουν ταχεία μετάδοση των νευρικών ώσεων από τους κόμβους του Ranvier (Πηγή: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:1206_The_Neuron.jpg, Άδεια: [Attribution 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) (CC BY 4.0), Συγγραφέας: OpenStax / CC <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Στην πλειοψηφία τους, οι νευρώνες έχουν αρκετούς δενδρίτες οι οποίοι διακλαδίζονται αυξάνοντας, κατ' αυτό τον τρόπο, την επιφάνεια υποδοχής των σημάτων που δέχεται ο νευρώνας. Παράλληλα, μικρού μεγέθους τελικές προεκβολές που έχουν σχήμα καρφιού ή κομβίου και ονομάζονται δενδριτικές άκανθοι (*dendritic spines*) προβάλλουν από τους δενδρίτες και συμβάλλουν στην περαιτέρω αύξηση της επιφάνειας πρόσληψης των εισερχόμενων σημάτων του νευρώνα (Εικόνα 4). Στους περισσότερους νευρώνες, η κυτταρική μεμβράνη των δενδριτών και του κυτταρικού σώματος φέρει πρωτεΐνες – υποδοχείς στις οποίες προσδένονται χημικοί

αγγελιοφόροι που παράγονται από άλλους νευρώνες και, ως απόκριση, δημιουργούνται διαβαθμισμένα δυναμικά² [2].

Οι νευρώνες ταξινομούνται σε μονόπολους, δίπολους ή πολύπολους, ανάλογα με τον αριθμό των αποφύσεων που εκφύονται από το κυτταρικό τους σώμα. Τα *μονόπολα κύτταρα* είναι ο απλούστερος τύπος νευρώνα και εντοπίζεται στο νευρικό σύστημα των ασπόνδυλων. Φέρουν μόνο μία κύρια απόφυση με πολλούς κλάδους εκ των οποίων ο ένας συνιστά τον νευράξονα και οι υπόλοιποι λειτουργούν ως δενδρίτες [7].

Τα *δίπολα κύτταρα* έχουν ωοειδές κυτταρικό σώμα από το οποίο εκφύονται δύο εξειδικευμένες λειτουργικά αποφύσεις: ένας δενδρίτης που μεταφέρει πληροφορίες από την περιφέρεια προς το κυτταρικό σώμα, και ένας νευράξονας που μεταφέρει πληροφορίες από το κυτταρικό σώμα προς το ΚΝΣ. Ορισμένοι νευρώνες που μεταφέρουν αισθητικές πληροφορίες στο νωτιαίο μυελό ανήκουν σε μία υποκατηγορία δίπολων κυττάρων που ονομάζονται *ψευδομονόπολα* καθώς, κατά την ανάπτυξη τους, οι αποφύσεις τους συγχωνεύονται και προεκβάλλουν ως μία από το κυτταρικό τους σώμα. Η απόφυση αυτή αποσχίζεται σε δύο κλάδους, έναν περιφερικό προς το δέρμα ή τους μύες και έναν κεντρικό προς τον νωτιαίο μυελό [7].

Τα *πολύπολα κύτταρα* υπερτερούν σε αριθμό στο νευρικό σύστημα των θηλαστικών και έχουν έναν νευράξονα και δύο ή περισσότερους δενδρίτες οι οποίοι, συνήθως, εκφύονται από όλα τα μέρη του κυτταρικού τους σώματος. Τρία παραδείγματα νευρώνων φανερώνουν την ποικιλομορφία στο σχήμα και την οργάνωση των πολύπολων κυττάρων: οι *κινητικοί νευρώνες του νωτιαίου μυελού* οι οποίοι νευρώνουν σκελετικές μυϊκές ίνες, οι *πυραμιδικοί νευρώνες* και τα *κύτταρα Purkinje* της παρεγκεφαλίδας. Όσον αφορά στους πυραμιδικούς νευρώνες, έχουν κυτταρικό σώμα τριγωνικού σχήματος και οι δενδρίτες τους προεκβάλλουν από την κορυφή (κορυφαίοι δενδρίτες) και από τη βάση (βασικοί δενδρίτες) του κυτταρικού τους σώματος. Οι πυραμιδικοί νευρώνες εντοπίζονται στον ιππόκαμπο και σε όλη την έκταση του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων [7].

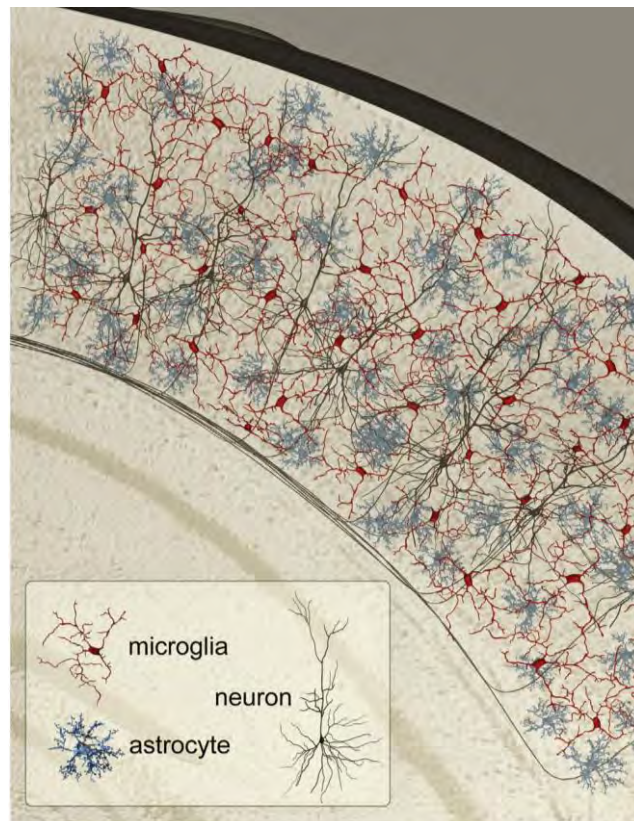
Το ΚΝΣ αποτελείται από τρεις λειτουργικά διακριτές κατηγορίες νευρώνων που είναι δυνατόν να διεγερθούν αποκρινόμενοι σε διάφορα ερεθίσματα: τους αισθητικούς ή προσαγωγούς, τους απαγωγούς ή κινητικούς και τους διάμεσους νευρώνες, οι οποίοι αλληλεπιδρούν σχηματίζοντας πολύπλοκα δίκτυα. Μόνο οι απολήξεις των προσαγωγών νευρώνων και τα κυτταρικά σώματα των απαγωγών νευρώνων εντοπίζονται στο ΚΝΣ. Περίπου το 99% των νευρώνων του νευρικού συστήματος είναι διάμεσοι νευρώνες και συναντώνται αποκλειστικά στο ΚΝΣ. Εντοπίζονται μεταξύ των προσαγωγών και απαγωγών νευρώνων και διαδραματίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην επεξεργασία και την ολοκλήρωση των περιφερικών

² Διαβαθμισμένο δυναμικό: παροδική, τοπική εκπόλωση ενός τμήματος της μεμβράνης ως απόκριση σε ένα ερέθισμα που μπορεί να πυροδοτήσει την παραγωγή δυναμικού ενέργειας σε παρακείμενη περιοχή.

ερεθισμάτων, καθώς και τη διαμόρφωση των εντολών του ΚΝΣ στα όργανα της περιφέρειας [2].

1.1.2.2. Νευρογλοιακά κύτταρα

Το 90% των κυττάρων του ΚΝΣ δεν είναι νευρώνες, αλλά νευρογλοιακά κύτταρα (*glial cells* ή *neuroglia*, Εικόνα 5). Παρά το συντριπτικά μεγαλύτερο αριθμό τους, τα νευρογλοιακά κύτταρα καταλαμβάνουν μόνο το 50% του όγκου του εγκεφάλου επειδή έχουν μικρό μέγεθος και δε φέρουν τόσο εκτεταμένες διακλαδώσεις όσο οι νευρώνες. Σε αντίθεση με τους νευρώνες, τα νευρογλοιακά κύτταρα δεν έχουν τη δυνατότητα να παράγουν και να άγουν νευρικές ώσεις. Εκτελούν, ωστόσο, ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών απαραίτητων για την ανάπτυξη και τη φυσιολογία του νευρικού συστήματος, από τη δομική και μεταβολική στήριξη των νευρώνων έως την επένδυση των αξόνων (ολιγοδενδροκύτταρα) για να επιτρέψουν την ταχεία αγωγιμότητα των νευρικών ώσεων έως τη διαμόρφωση και τροποποίηση των συναπτικών συνδέσεων. Στο ΚΝΣ υπάρχουν τέσσερις τύποι νευρογλοιακών κυττάρων με συγκεκριμένους ρόλους: τα αστροκύτταρα, τα ολιγοδενδροκύτταρα, τα μικρογλοιακά κύτταρα και τα επενδυματικά κύτταρα [2].



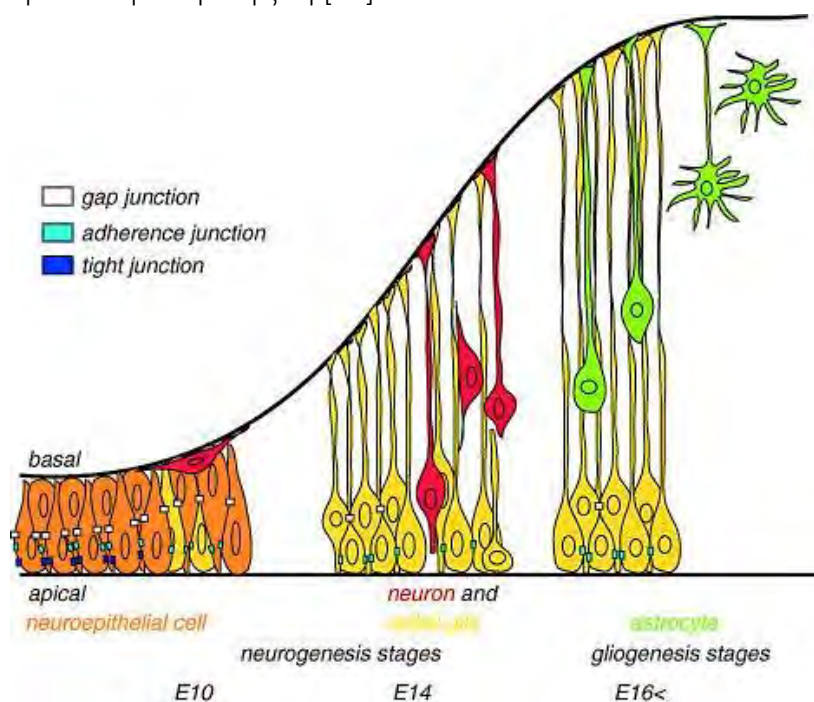
Εικόνα 5: Τυπικό δίκτυο νευρώνων και κυττάρων της γλοίας στο ΚΝΣ (Πηγή: [8], Αριθμός άδειας: 5510191232831, Συγγραφείς: Helmut Kettenmann, Frank Kirchhoff, Alexei Verkhratsky).

1.1.2.2.1. Αστροκύτταρα

Τα αστροκύτταρα είναι η ομάδα εκείνη των κυττάρων της γλοίας η οποία θα μας απασχολήσει στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία για αυτό και παρακάτω εστιάζουμε σε αυτή.

Προέλευση

Τα αστροκύτταρα συνιστούν μία ομάδα κυττάρων εξωδερμικής προέλευσης τα οποία έχουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης του ΚΝΣ. Τα κύτταρα αυτά προέρχονται από τα κύτταρα ακτινωτής γλοίας (*radial glia*) -πρόδρομα νευρικά κύτταρα του ΚΝΣ- τα οποία προκύπτουν από τη διαφοροποίηση νευροεπιθηλιακών κυττάρων εξωδερμικής προέλευσης [9] και υποστηρίζουν τη μετανάστευση των νευρώνων προς τις τελικές θέσεις τους. Τα κύτταρα ακτινωτής γλοίας εμφανίζονται κατά τη 10^η-12^η ημέρα της εμβρυϊκής φάσης και δίνουν γένεση, έπειτα από ασύμμετρη διαίρεση, τόσο σε νευρώνες όσο και σε αστροκύτταρα (Εικόνα 6) [10]. Μετά τη γέννηση, τα κύτταρα ακτινωτής γλοίας διαφοροποιούνται άμεσα σε αστροκύτταρα τα οποία, σε περιοχές όπου εξακολουθεί να τελείται νευρογένεση, μπορούν να δράσουν ως βλαστοκύτταρα αποτελώντας τη βάση για νευρογένεση κατά την ενήλικη ζωή [11].



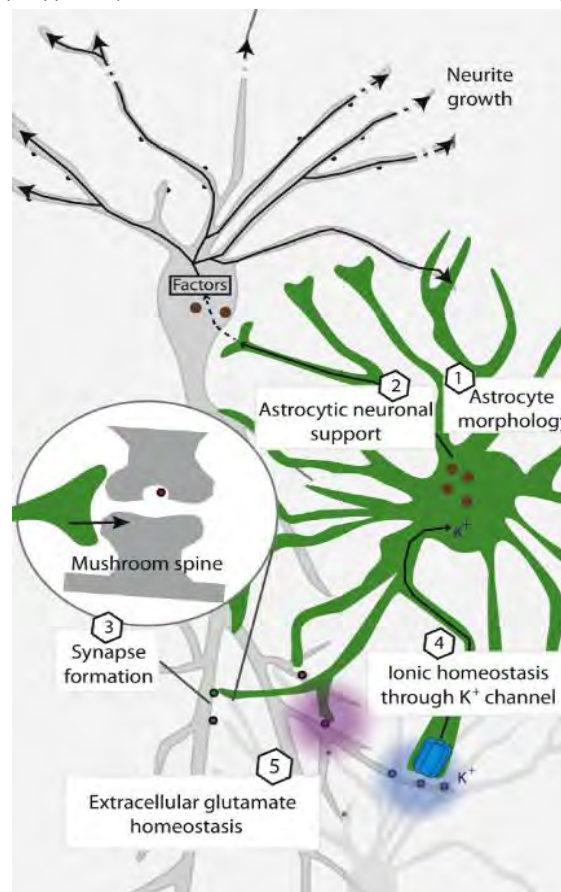
Εικόνα 6: Γένεση νευρώνων και αστροκυττάρων από τα κύτταρα ακτινωτής γλοίας (Πηγή: [10], Αριθμός άδειας: 5510200055445, Συγγραφείς: Tetsuji Mori, Annalisa Buffo, Magdalena Götz).

Η εμβρυϊκή αστρογλιογένεση παράγει ένα μόνο τμήμα των αστροκυττάρων του ΚΝΣ. Η μέγιστη παραγωγή των κυττάρων της γλοίας παρατηρείται κατά τη δεύτερη και τρίτη μεταγεννητική εβδομάδα (στα τρωκτικά), όπου ο αριθμός των μη νευρικών (γλοιακών) κυττάρων αυξάνει από τα περίπου 4 εκατομμύρια κατά τη γέννηση στα

140 εκατομμύρια. Η μεταγεννητική αστρογλιογένεση, κατά την οποία δημιουργείται το περίπου 50% όλων των αστροκυττάρων, πραγματοποιείται κυρίως μέσω συμμετρικής διαίρεσης των διαφοροποιημένων αστροκυττάρων τα οποία έχουν εποικίσει το ΚΝΣ. Ο μηχανισμός αυτός προτάθηκε πριν από έναν αιώνα από τον Santiago Ramón y Cajal ο οποίος παρατήρησε ζεύγη αστροκυττάρων ενωμένα στο σώμα τους τα οποία όρισε ως δίδυμα αστροκύτταρα ή “*astrocitos gemelos*” [11].

Λειτουργίες

Τα αστροκύτταρα διεκπεραιώνουν κάθε ευρέως γνωστή ομοιοστατική διαδικασία στο ΚΝΣ σε όλα τα επίπεδα οργάνωσης. Ειδικότερα, ελέγχουν την ομοιόσταση των ιόντων, του pH και των νευροδιαβιβαστών, παρέχουν στους νευρώνες μεταβολικά υποστρώματα, υποστηρίζουν τα ολιγοδενδροκύτταρα και τους νευράξονες, ρυθμίζουν την συναπτογένεση, τη νευρογένεση και τη δημιουργία και διατήρηση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (*Blood-Brain Barrier, BBB*, Εικόνα 7) [11].



Εικόνα 7: Διαδικασίες που ελέγχονται από τα αστροκύτταρα (Πηγή: [13], Αριθμός άδειας: 5510200370612, Συγγραφείς: Noémie Cresto, Laure-Elise Pillet, Pierre Billuart, Nathalie Rouach).

Τα αστροκύτταρα ρυθμίζουν τη συγκέντρωση ιόντων όπως: α] τα *εξωκυττάρια* ιόντα K^+ , τα οποία συνδέονται άμεσα με την νευρική δραστηριότητα και διεγερσιμότητα, β] τα *εξωκυττάρια* ιόντα Ca^{2+} στα οποία παρέχουν ένα μηχανισμό αναπλήρωσης προκειμένου να επιτευχθεί η απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών

από το προσυναπτικό κύτταρο, γ] τα *εξωκυττάρια* ιόντα Cl^- όπου, σε περιπτώσεις υπερδιέγερσης των νευρικών ιοντοτροπικών υποδοχέων GABA_A, συσσωρεύονται στο εσωτερικό των νευρώνων και μειώνονται αλλά τα αστροκύτταρα λόγω ηλεκτροχημικής διαβάθμισης απελευθερώνουν ιόντα Cl^- για να επαναφέρουν την εξωκυττάρια συγκέντρωσή τους σε φυσιολογικά επίπεδα [12].

Παράλληλα, τα αστροκύτταρα ελέγχουν την ομοιόσταση των νευροδιαβιβαστών όπως το γλουταμινικό, το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA), η αδενοσίνη και η νοραδρεναλίνη μέσω της κάθαρσης από εξειδικευμένους μεταφορείς και της απενεργοποίησης από ένζυμα. Όσον αφορά στο γλουταμινικό, επειδή οι νευρώνες δεν έχουν ένζυμα για τη *de novo* σύνθεσή του από το πυροσταφλικό οξύ, εκείνη συμβαίνει αποκλειστικά στα αστροκύτταρα. Το γλουταμινικό που παράγεται στα αστροκύτταρα μετατρέπεται, μέσω της συνθετάσης της γλουταμίνης, σε βιολογικά αδρανή γλουταμίνη η οποία θα μεταφερθεί στους νευρώνες όπου θα μετατραπεί σε γλουταμινικό από το ένζυμο γλουταμινάση. Σε ανασταλτικούς νευρώνες, το γλουταμινικό μετατρέπεται περαιτέρω σε GABA. Τέλος, η κάθαρση του γλουταμινικού από τα αστροκύτταρα (80%) στη συναπτική σχισμή μέσω των μεταφορέων EAAT1/2 (*Excitatory Amino Acid Transporters*) προστατεύει το νευρικό ιστό από τη διεγερτοτοξικότητά του [11,12].

Οι αποφύσεις των αστροκυττάρων εγκαθιδρύουν δυναμικές επαφές με τις συναπτικές δομές και, ειδικότερα, τουλάχιστον το 50%-60% των συνάψεων στο ΚΝΣ καλύπτονται από τις μεμβράνες των αποφύσεων των αστροκυττάρων, ποσοστό το οποίο διαφέρει μεταξύ των εγκεφαλικών περιοχών. Οι περισυναπτικές αποφύσεις των αστροκυττάρων είναι ουσιαστικής σημασίας για τη συναπτική συνδεσιμότητα και εμπλέκονται στη ρύθμιση της συναπτογένεσης, της ωρίμανσης των συνάψεων, της διατήρησης των συνάψεων, της απομόνωσης μίας συγκεκριμένης σύναψης από άλλες και την εξάλειψη συνάψεων. Δίχως τα αστροκύτταρα, οι συνάψεις δεν σχηματίζονται, όπως έχει αποδειχτεί τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* πειράματα, καθώς τα αστροκύτταρα υποστηρίζουν τη δημιουργία τους εκκρίνοντας ποικίλους παράγοντες με πιο σημαντικούς τη χοληστερόλη και τις θρομβοσπονδίνες. Η χοληστερόλη, συγκεκριμένα, χρησιμεύει στο σχηματισμό των μεμβρανών και ίσως μετατρέπεται τοπικά σε στεροειδείς ορμόνες οι οποίες πιθανώς δρουν ως συναπτογόνα σήματα. Παράλληλα, τα αστροκύτταρα παράγουν και εκκρίνουν την πρωτεΐνη χεβίνη (*hevin*) η οποία προωθεί το σχηματισμό διεγερτικών συνάψεων [11,12].

Τέλος, τα αστροκύτταρα ασκούν αντιοξειδωτική δράση καθώς αποτελούν το σημείο όπου εντοπίζεται η μεγαλύτερη συγκέντρωση της γλουταθειόνης η οποία, μαζί με το ασκορβικό οξύ, συνιστούν το αντιοξειδωτικό σύστημα του νευρικού ιστού. Επιπλέον, η σύνθεση της γλουταθειόνης από τους νευρώνες βασίζεται στα αστροκύτταρα τα οποία παρέχουν σημαντικά πρόδρομα μόρια της γλουταθειόνης στους νευρώνες όπως είναι η κυστεΐνη ή η γλουταμυλ-κυστεΐνη [12].

1.2.ΑΛΚΟΟΛ ΚΑΙ ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

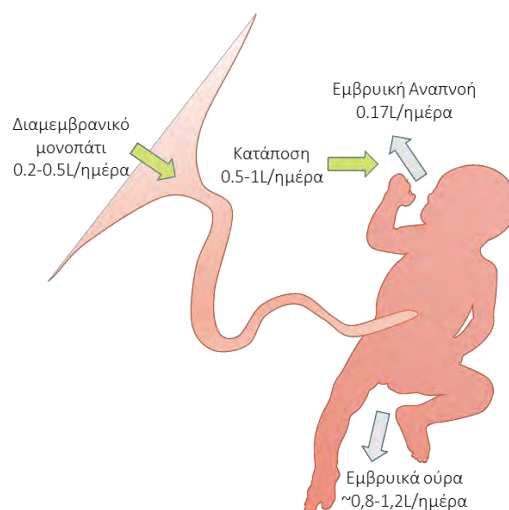
1.2.1. Γενικά χαρακτηριστικά

Η αιθανόλη αποτελεί μία οργανική ένωση ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) που συνιστά το κύριο συστατικό των αλκοολούχων ποτών. Εξαιτίας του μικρού μεγέθους και της υψηλής διαλυτότητάς της, η αιθανόλη απορροφάται με ταχύ ρυθμό μέσω διάχυσης και κατανέμεται ομοιόμορφα στο αίμα και στους διάφορους ιστούς του σώματος, με την ταχύτερη κατανομή να παρατηρείται στους ιστούς με τη μεγαλύτερη αιμάτωση [14]. Αναφορικά με την απορρόφηση, το μεγαλύτερο μέρος της αιθανόλης απορροφάται σχεδόν εξ' ολοκλήρου από το γαστρεντερικό σωλήνα και πιο συγκεκριμένα από το λεπτό έντερο και το στομάχι, ενώ μικρά ποσοστά απορρόφησης παρατηρούνται από τους πνεύμονες και το δέρμα [15].

Η απέκκριση της αιθανόλης λαμβάνει χώρα μέσω δύο μονοπατιών: **(α)** σε ποσοστό 90-98% η αιθανόλη βιομετατρέπεται στο ήπαρ σε ακεταλδεΐδη μέσω ενζυμικής οξειδωσης από την αλκοολική αφυδρογονάση (*Alcohol Dehydrogenase, ADH*) και το ένζυμο της υπεροξεικογένειας του κυτοχρώματος P450 2E1 (*CYP2E1*) και **(β)** σε ποσοστό 2% αποβάλλεται από τους νεφρούς, τους πνεύμονες και τον ιδρώτα, με το ποσοστό αυτό να αγγίζει το 10% εάν έχει καταναλωθεί μεγάλη ποσότητα αιθανόλης [16,17]. Τέλος, σε ένα μικρό ποσοστό, η αιθανόλη υφίσταται σύζευξη με ενδογενείς μεταβολίτες όπως το γλυκουρονικό οξύ, τα φωσφολιπίδια και τα λιπαρά οξέα (μη οξειδωτική οδός) [18].

1.2.2. Μεταβολισμός της αιθανόλης από το έμβρυο

Η κατανάλωση αλκοόλ από τη μητέρα κατά την εγκυμοσύνη αποτελεί το πρωταρχικό βήμα της προγεννητικής έκθεσης του εμβρύου στο αλκοόλ (*Prenatal Alcohol Exposure, PAE*). Πειραματικές και κλινικές μελέτες έχουν δείξει πως η αιθανόλη διαχέεται ταχύτατα μέσω του πλακούντα στο εμβρυϊκό διαμέρισμα όπου ο ρυθμός απομάκρυνσής της είναι πιο αργός συγκριτικά με τον αντίστοιχο της μητέρας, με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται στο αμνιακό υγρό. Έτσι, το έμβρυο εκτίθεται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στην αιθανόλη, φαινόμενο το οποίο επιδεινώνεται από την εμβρυϊκή κατάποση της αιθανόλης που απεκκρίνεται από το έμβρυο στο αμνιακό υγρό, είτε μέσω της πνευμονικής οδού, είτε μέσω των νεφρικών απεκκρίσεων (Εικόνα 8) [17].



Εικόνα 8: Οδοί απέκκρισης και επαναρρόφησης της αιθανόλης στο εμβρυϊκό διαμέρισμα. →: απέκκριση, →: επαναρρόφηση ή πρόσληψη (Συγγραφέας: Άννα Βασιλάκη).

Ο πλακούντας είναι ένα μεταβολικά ενεργό όργανο καθώς χαρακτηρίζεται από έκφραση ενζύμων του μεταβολισμού, ειδικά στο πρώτο τρίμηνο της ανθρώπινης κύησης όπου λαμβάνει χώρα η ανάπτυξη του ήπατος. Στον πλακούντα, ωστόσο, το βασικό ένζυμο οξείδωσης της αιθανόλης, η αλκοολική αφυδρογονάση, χαρακτηρίζεται από μειωμένη συγγένεια για την αιθανόλη -ενώ παρατηρείται αυξημένη συγγένεια της αιθανόλης για το ένζυμο του κυτοχρώματος P450 2E1 του πλακούντα- με αποτέλεσμα, ο πλακούντας να μην διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ενζυμική οξείδωση της αιθανόλης [17,19]. Παράλληλα, αν και ο πλακούντας χαρακτηρίζεται από ικανότητα μεταβολισμού της αιθανόλης σε αιθυλεστέρες λιπαρών οξέων (*Fatty Acid Ethyl Esters*) λόγω της παρουσίας της FAEE συνθάσης, ο περιορισμένος ρόλος της FAEE συνθάσης στο φυσιολογικό μεταβολισμό της αιθανόλης υποδηλώνει ότι η μη οξειδωτική οδός δεν συμβάλλει σημαντικά στην ικανότητα του πλακούντα να μεταβολίζει το αλκοόλ. Συμπερασματικά, η αναποτελεσματικότητα τόσο των οξειδωτικών όσο και των μη οξειδωτικών οδών μεταβολισμού της αιθανόλης εντός του πλακούντα έχει ως αποτέλεσμα την απεριόριστη διάχυση αιθανόλης μέσω του πλακούντα στο εμβρυϊκό διαμέρισμα [19].

1.2.3. Επιπτώσεις της αιθανόλης στο αναπτυσσόμενο ΚΝΣ

1.2.3.1. Ευάλωτες αναπτυξιακές διαδικασίες και εγκεφαλικές περιοχές

Οι ζωτικής σημασίας αναπτυξιακές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του ΚΝΣ είναι ιδιαίτερα ευάλωτες σε περιβαλλοντικές προσβολές [20]. Έτσι, η προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη (*Prenatal Alcohol Exposure, PAE*) επηρεάζει διαφορετικά βασικές αναπτυξιακές διεργασίες όπως είναι ο πολλαπλασιασμός, η μετανάστευση και η διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων, η συναπτογένεση, η γλοιογένεση, η μυελίνωση και η απόπτωση, ανάλογα με το

αναπτυξιακό στάδιο στο οποίο χορηγείται (πίνακας 1), και οδηγεί σε συγγενείς ανωμαλίες και λειτουργικά ελλείματα στο ΚΝΣ [21].

Πιο συγκεκριμένα, μία «ευάλωτη» σε περιβαλλοντικές προσβολές περίοδος είναι αυτή μεταξύ της 5^{ης} και 11^{ης} ημέρας της κύησης του επίμου που αντιστοιχεί περίπου στην 3^η εβδομάδα κύησης του ανθρώπου και κατά τη διάρκεια της οποίας τελείται η διαμόρφωση του νευρικού σωλήνα και ο πολλαπλασιασμός των νευρικών πρόδρομων κυττάρων σε περιοχές γειτονικές του νευρικού σωλήνα. Υψηλά ποσοστά αιθανόλης κατά την περίοδο αυτή, συνεπάγονται ανωμαλίες του νευρικού σωλήνα, μείωση στον αριθμό των νευρικών πρόδρομων κυττάρων και χαρακτηριστικές δυσμορφίες του προσώπου [22].

Πίνακας 1: Βιοδείκτες αναπτυξιακών διαδικασιών η έκφραση των οποίων επηρεάζεται από την προγεννητική έκθεση στο αλκοόλ. Τα βέλη υποδεικνύουν αλλαγές (αύξηση ή μείωση) που επιφέρει η έκθεση στην αιθανόλη [21].

Αναπτυξιακές Διαδικασίες	Επίδραση του αλκοόλ στα επίπεδα έκφρασης βιοδεικτών των αναπτυξιακών διαδικασιών
Νευροποίηση	↓ Shh, ephrin-A5, NCAM, N-cadherin, twist, cart1, Enah, Casp9, Bcl10, Tulp1
Πολλαπλασιασμός	↓ NeuN, Ki67, ↓ DCX, ↓ IGF, ↑ GSK3β
Μετανάστευση	↓ MeCP2, ↓ BDNF, ↑ DLX5, ↑ GSK3β, ↑ CDK5, ↑ ↓ HNK-1
Γλοιογένεση	↑ ↓ GFAP, ↓ S100B, ↑ COX-2, ↑ ↓ GDNF
Διαφοροποίηση	↑ ↓ GFAP, ↑ ↓ GDNF, ↓ SOX, ↓ S100β, ↓ cAMC, ↓ CREB, ↑ GSK3β
Συναπτογένεση	↑ Synapsin I-II, ↓ GAP-43, ↑ ↓ NCAM, ↓ L1
Μυελίνωση	↑ MAPK, ↑ NFκB, ↑ COX2, ↑ iNOS, ↑ HMGB1, ↑ TLR4
Απόπτωση	↓ Bcl-xL, ↑ Caspase 3, ↑ Bax
Πλαστικότητα	↓ NGF, ↑ ↓ BDNF, ↑ MMP-9

Μεταξύ της 11^{ης} και 21^{ης} ημέρας της κύησης στον επίμου και των εβδομάδων 7-20 στον άνθρωπο, υφίσταται μία ακόμη κρίσιμη περίοδος της εγκεφαλικής ανάπτυξης κατά την οποία, στις περισσότερες περιοχές του ΚΝΣ πραγματοποιούνται διακριτές διαδικασίες διαφοροποίησης, ενώ αρκετοί τύποι νευρικών κυττάρων αναδύονται και εν συνεχεία μεταναστεύουν σε συγκεκριμένες εγκεφαλικές περιοχές [21]. Πειραματικές μελέτες υποδεικνύουν πως η έκθεση στην αιθανόλη στο συγκεκριμένο στάδιο επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των νευρικών και νευρογλοιακών κυττάρων του νεοφλοιού και του ιππόκαμπου. Όπως συμβαίνει και σε άλλες νευροαναπτυξιακές διαταραχές, η επίδραση της αιθανόλης στον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των νευρικών και νευρογλοιακών κυττάρων επιφέρει μακροπρόθεσμες ανωμαλίες στον εγκεφαλικό φλοιό και μείωση του μεγέθους του εγκεφάλου και πιθανώς συμβάλλει σε γνωστικά ελαττώματα που

παρατηρούνται σε ενήλικες με Διαταραχές Φάσματος Εμβρυϊκού Αλκοολισμού (*Fetal Alcohol Spectrum Disorder, FASD*). Επιπλέον, δεδομένου ότι ο σχηματισμός του μεσολόβιου (*corpus callosum*) εκκινεί περίπου κατά την 7^η εβδομάδα της κύησης στους ανθρώπους, η έκθεση στο αλκοόλ σε αυτό το στάδιο μπορεί να διαταράξει τα πρώιμα στάδια σχηματισμού του, οδηγώντας σε αγενεσία, υποπλασία ή ανωμαλίες του [23].

Η τελευταία καθοριστικής σημασίας αναπτυξιακή περίοδος είναι αυτή μεταξύ της 18^{ης} ημέρας της κύησης μέχρι την 19^η ημέρα μετά τη γέννηση στους επίμυες που αντιστοιχεί προσεγγιστικά στο τρίτο τρίμηνο της ανθρώπινης κύησης. Το στάδιο αυτό χαρακτηρίζεται από τον έντονο πολλαπλασιασμό των κυττάρων της γλοίας, τη συναπτογένεση και τη διακλάδωση των δενδριτών των νευρώνων, ενώ, κατά τη διάρκεια του, η παρεγκεφαλίδα υφίσταται ραγδαία ανάπτυξη και η νευρογένεση στην οδοντωτή έλικα του ιππόκαμπου συνεχίζεται. Η έκθεση στην αλκοόλη στο στάδιο αυτό οδηγεί σε σοβαρές απώλειες νευρώνων, προβλήματα στη μυελίνωση, καθολική γλοίωση, καθώς και καταστροφή του προμετωπιαίου φλοιού, του ιππόκαμπου και περιοχών της παρεγκεφαλίδας [21].

Όπως γίνεται κατανοητό, το σύνολο των εγκεφαλικών περιοχών του ΚΝΣ επηρεάζεται από την προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη. Ωστόσο, πειραματικές και κλινικές μελέτες έχουν αποδείξει πως υπάρχουν εγκεφαλικές περιοχές οι οποίες είναι περισσότερο ευάλωτες στις νευροτοξικές δράσεις της αιθανόλης. Οι περιοχές αυτές είναι: οι **μετωπιαίοι λοβοί** (*frontal lobes*) υπεύθυνοι για την εκούσια κίνηση, την ικανότητα του λόγου και τη διεκπεραίωση της σκέψης, το **μεσολόβιο** (*corpus callosum*) υπεύθυνο για την ταχύτητα και συνεχή μεταβίβαση πληροφοριών μεταξύ των εγκεφαλικών ημισφαιρίων, τα **βασικά γάγγλια** (*basal ganglia*) με εξέχων ρόλο στον έλεγχο των κινήσεων, ο **ιππόκαμπος** (*hippocampus*) υπεύθυνος για τη χωρική μνήμη και τη βιωματική μάθηση, η **αμυγδαλή** (*amygdala*) υπεύθυνη για την αντίληψη και τον έλεγχο συναισθημάτων, όπως ο φόβος, ο θυμός, η θλίψη και η επιθετικότητα, ο **θάλαμος** (*thalamus*) ο οποίος συμμετέχει στην εστίαση της προσοχής προς σημαντικά ερεθίσματα και βοηθά στον έλεγχο της εκούσιας κίνησης και η **παρεγκεφαλίδα** (*cerebellum*) η οποία έχει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ισορροπίας και στο σχεδιασμό και την εκτέλεση των εκούσιων κινήσεων [24,25].

1.2.3.2. Φλεγμονώδεις αποκρίσεις και νευροεκφύλιση

Η πρόσληψη αλκοόλ ενεργοποιεί στον εγκέφαλο σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν σε ενεργοποίηση των κυττάρων της νευρογλοίας και εκτεταμένη παραγωγή φλεγμονωδών μορίων τα οποία επιφέρουν τον εκφυλισμό νευρώνων. Ειδικότερα, αν και η ενεργοποίηση των κυττάρων της νευρογλοίας αποτελεί σημαντικό βήμα για την προστασία του εγκεφάλου από επιβλαβή ενδογενή και εξωγενή ερεθίσματα, οι παρατεταμένες ή/και ανεξέλεγκτες νευροφλεγμονώδεις αποκρίσεις συμβάλλουν, μέσω ποικίλων μηχανισμών, στον κυτταρικό θάνατο των νευρώνων [26].

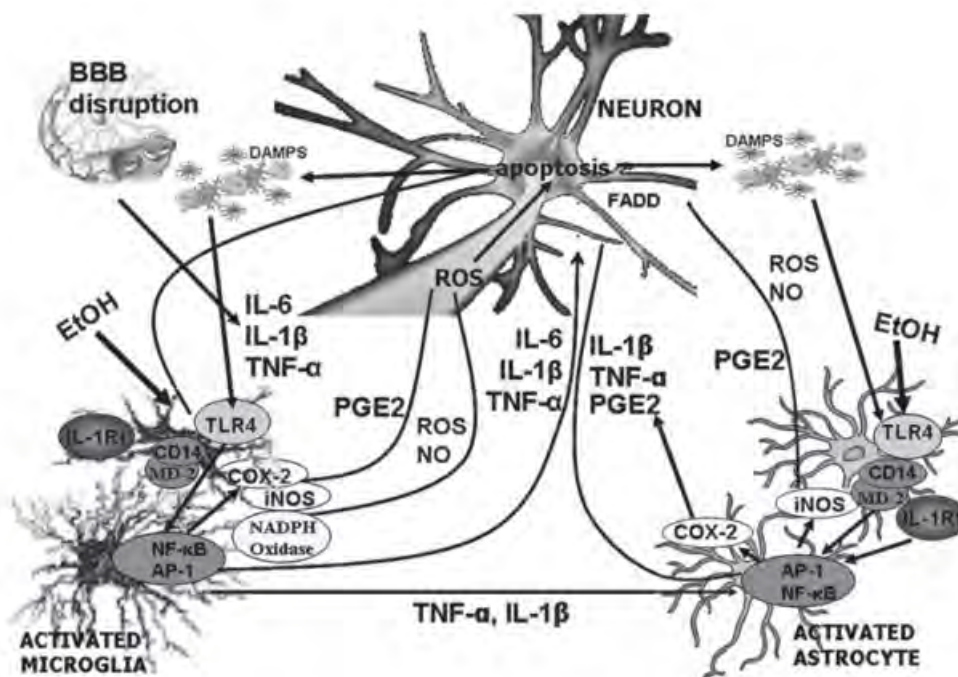
Στον εγκέφαλο, οι δράσεις της αιθανόλης μεσολαβούνται, κυρίως, μέσω της ενεργοποίησης του υποδοχέα TLR4 (*Toll-Like Receptor 4*) έπειτα από στρατολόγησή του στις λιπιδιακές σχεδίες³ των κυτταρικών μεμβρανών των αστροκυττάρων και των κυττάρων της μικρογλοίας, οδηγώντας σε εσωτερίκευσή του και επακόλουθη ενεργοποίηση σηματοδοτικών φλεγμονωδών μονοπατιών και μονοπατιών εκφυλισμού των νευρώνων [27]. Ο συγκεκριμένος υποδοχέας αναγνωρίζει δύο τύπους μοριακών μοτίβων: [1] τα μοτίβα που σχετίζονται με παθογόνα (*Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs*) και [2] τα μοτίβα που σχετίζονται με βλάβη (*Damage-Associated Molecular Patterns, DAMPs*) και παράγονται ενδογενώς ως απόκριση, παραδείγματος χάριν, στην ιστική βλάβη [28] και σε περιπτώσεις μη προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου.

Η σημασία του υποδοχέα TLR4 στις επαγόμενες από την αιθανόλη φλεγμονώδεις αποκρίσεις και τον επερχόμενο κυτταρικό θάνατο των νευρώνων, αναδεικνύεται από πειράματα χορήγησης αιθανόλης σε άγριου ($TLR4^{+/+}$) και knockout ($TLR4^{-/-}$) τύπου ποντίκια. Ειδικότερα, έχει παρατηρηθεί πως η αιθανόλη, σε $TLR4^{+/+}$ ποντίκια, προκαλεί αύξηση των επιπέδων έκφρασης φλεγμονωδών μεσολαβητών όπως η κυκλοξυγενάση 2 (*Cyclooxygenase-2, σύνθεση προσταγλανδινών*) και η επαγόμενη συνθάση του NO (*inducible NO Synthase, iNOS*) μέσω ενεργοποίησης των μονοπατιών των MAP κινασών και του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, τόσο στα αστροκύτταρα όσο και στα κύτταρα της μικρογλοίας [29,30]. Η ενεργοποίηση του NF-κB έπειτα από οξεία χορήγηση αιθανόλης έχει παρατηρηθεί και σε ανθρώπινα αστροκύτταρα *in vitro* [31].

Παράλληλα, σε $TLR4^{+/+}$ ποντίκια, έχει παρατηρηθεί ότι η αιθανόλη αυξάνει τη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση των κινασών p38, ERK και JNK, την παραγωγή ROS και φλεγμονωδών μορίων όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων α (*Tumor Necrosis Factor α , TNF- α*) και η ιντερλευκίνη-1β (*interleukin-1 β , IL-1 β*) από τα μικρογλοιακά κύτταρα και, συμβάλλει στον αυξημένο ρυθμό απόπτωσης των νευρώνων του φλοιού όταν εκείνοι επωάζονται με θρεπτικό που περιέχει τα κύτταρα της μικρογλοίας των $TLR4^{+/+}$ ποντικών [27]. Πολλές μελέτες εμπλέκουν τα κύτταρα της μικρογλοίας στην επαγόμενη από την αιθανόλη παραγωγή ROS και την επακόλουθη νευροτοξικότητα. Παραδείγματος χάριν, έχει βρεθεί πως η χρόνια (10 ημέρες) ενδογαστρική χορήγηση αιθανόλης σε ποντίκια οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα της NADPH οξειδάσης (ένζυμο που παράγει ROS), ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων και κυτταρικό θάνατο των νευρώνων σε περιοχές του φλοιού και του ιππόκαμπου, φαινόμενα τα οποία δεν παρατηρούνταν όταν το ένζυμο της NADPH οξειδάσης αναστέλλονταν, αναδεικνύοντας έτσι τη σχέση μεταξύ της επαγόμενης από το αλκοόλ ενεργοποίησης των κυττάρων της μικρογλοίας και της νευροτοξικότητας [32].

³ Λιπιδιακές σχεδίες (*lipid rafts*): μικρής έκτασης μεμβρανικές δομές πλούσιες σε χοληστερόλη και σφιγγολιπίδια που δρουν ως πλατφόρμες σηματοδότησης υποδοχέων

Επιπρόσθετα, μελέτες έχουν δείξει πως, σε TLR4^{+/+} ποντίκια, η αιθανόλη αυξάνει την έκφραση των φλεγμονωδών μορίων IL-6 και TNF- α αλλά και του αποπτωτικού δείκτη κασπάση 3 (*caspace 3*) στα αστροκύτταρα, φαινόμενα τα οποία δεν παρατηρούνταν στα TLR4^{-/-} ποντίκια [30]. Σε ανθρώπινους εγκέφαλους αλκοολικών, έχει επίσης παρατηρηθεί αύξηση στον αριθμό των θετικών για την TUNEL⁴ (*Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling*) κυττάρων [33].



Εικόνα 9: Φλεγμονώδη μόρια που παράγονται από τη μικρογλοία και τα αστροκύτταρα δρουν συνεργικά για να προάγουν επαγόμενη από την αιθανόλη καταστροφή των νευρώνων. *Συντμήσεις:* BBB = Blood Brain Barrier, αιματοεγκεφαλικός φραγμός (Πηγή: Alfonso-Loeches S, Guerri C, 2011, Άδεια από: Taylor & Francis Journal Permissions).

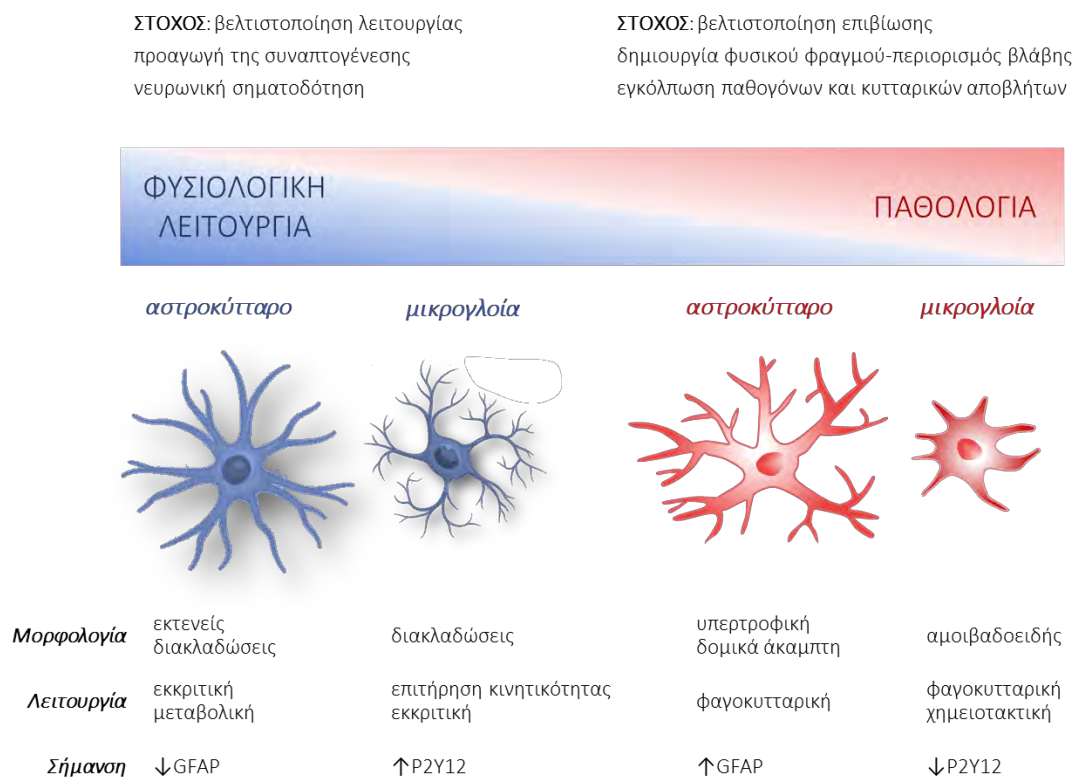
Συνολικά, οι προαναφερθείσες μελέτες προτείνουν ότι ο υποδοχέας TLR4 παίζει κρίσιμο ρόλο στην παραγωγή μορίων από το κύτταρα της μικρογλοίας και τα αστροκύτταρα που είναι έμμεσα τοξικά για τους νευρώνες (Εικόνα 9).

Η μείωση στον αριθμό των νευρώνων έχει αποδειχθεί σε *in vivo* πειράματα οξείας και χρόνιας χορήγησης αιθανόλης στον υπόκαμπο επίμυων με τη χρήση, μεταξύ άλλων, και του αντισώματος έναντι του νευρικού πυρηνικού αντιγόνου (*Neuronal Nuclei antigen, NeuN*) το οποίο σημαίνει ώριμους νευρώνες [34,35,36,37].

Επιπλέον, χαρακτηριστική είναι η επίδραση της αιθανόλης στη μορφολογία των κυττάρων της μικρογλοίας τα οποία υφίστανται διόγκωση του κυτταρικού σώματος και των αποφύσεων τους και αποκτούν αμοιβαδοειδές σχήμα (Εικόνα 10) [37,38]. Οι συγκεκριμένες μορφολογικές διαφορές έχουν παρατηρηθεί μέσω της πρωτεΐνης προσαρμογής 1 που δεσμεύει ελεύθερο Ca²⁺ (*ionized calcium-binding adaptor*

⁴ Χρώση TUNEL: ανίχνευση κυττάρων που υφίστανται απόπτωση καθώς σημαίνουν τα τυφλά άκρα των θραυσμάτων του δίκλωνου DNA

molecule 1, Iba1) που περιορίζεται στα μικρογλοιακά κύτταρα και τα μακροφάγα και είναι ενδεικτική της ενεργοποίησης των μικρογλοιακών κυττάρων. Επιπλέον, η Iba1 αυξάνεται έπειτα από έκθεση στην αιθανόλη σε *in vivo* μοντέλα οξείας και χρόνιας χορήγησης αιθανόλης [30,35,39,40].



Εικόνα 10: Χαρακτηριστικά των αστροκυττάρων και των κυττάρων της μικρογλοίας σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις [45] (Συγγραφέας: Ευτυχία Ασπροδίνη).

Τέλος, *in vivo* μελέτες χρόνιας έκθεσης στην αιθανόλη υποδηλώνουν ότι η αιθανόλη προκαλεί στον εγκέφαλο γλοίωση [30] η οποία αφορά ποικίλες μοριακές και μορφολογικές αλλαγές στα αστροκύτταρα [41] τα οποία γίνονται αντιδραστικά ως απόκριση στην προσβολή [42]. Χαρακτηριστικό των αντιδραστικών αστροκυττάρων είναι η αύξηση των επιπέδων της όξινης πρωτεΐνης των ενδιάμεσων ινιδίων της γλοίας (*Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP*) σε συνδυασμό με την υπερτροφία του κυτταρικού σώματος και των αποφύσεων τους (Εικόνα 10) [43]. **Η αστρογλοίωση, ως απόκριση σε μία προσβολή του ΚΝΣ, μπορεί να είναι ωφέλιμη στην οξεία φάση της προσβολής αλλά να έχει ανασταλτικό ρόλο στην επιδιόρθωση και τη λειτουργική ανάκαμψη του ιστού μεταγενέστερα [44].**

1.2.4. Ζωικά μοντέλα προγεννητικής έκθεσης στην αλκοόλη

Η χρήση ζωικών μοντέλων επιτρέπει τη μελέτη των επιδράσεων της έκθεσης στο αλκοόλ στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο, παρακάμπτοντας περιορισμούς που συνήθως υφίστανται στις κλινικές μελέτες που αφορούν τον άνθρωπο. Κατά τη

δημιουργία των συγκεκριμένων μοντέλων, συνθήκες όπως η περίοδος της ανάπτυξης του εγκεφάλου που επηρεάζεται από το αλκοόλ (πρώτο, δεύτερο ή τρίτο τρίμηνο κύησης στον άνθρωπο), το μοτίβο της έκθεσης (χρόνια ή οξεία έκθεση) και η οδός χορήγησης μπορούν να τροποποιηθούν ανάλογα με τις ανάγκες της εκάστοτε μελέτης [46].

Μεταξύ των ζώων που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη των επιδράσεων της αιθανόλης στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο, τα τρωκτικά και κυρίως οι επίμυες και τα ποντίκια, αποτελούν τα πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενα θηλαστικά. Οι λόγοι για τους οποίους προτιμώνται έναντι άλλων είναι η ευκολία στο χειρισμό τους, η σύντομη διάρκεια κύησης και η γέννηση μεγάλου αριθμού απογόνων. Επιπρόσθετα, οι επίμυες πλεονεκτούν έναντι των ποντικών λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους τους και των πιο εξελιγμένων συμπεριφορικών χαρακτηριστικών τους [21].

Ωστόσο, σημαντικό μειονέκτημα της χρήσης των επίμυων στη μελέτη των επιδράσεων της αιθανόλης στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο αποτελεί η χρονική αναντιστοιχία στις αναπτυξιακές διαδικασίες που συμβαίνουν στον εγκέφαλο του επίμου και του ανθρώπου (βλ. *Φυσιολογική ανάπτυξη στον άνθρωπο και τον επίμου*). Πιο συγκεκριμένα, οι διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα κατά το τρίτο τρίμηνο της ανθρώπινης κύησης συμβαίνουν σε μεταγεννητικό στάδιο στους επίμυες.

1.2.4.1. Μοτίβα έκθεσης στο αλκοόλ

Τα μοτίβα έκθεσης στο αλκοόλ ορίζονται από την ποσότητα, τη διάρκεια και από τη συχνότητα κατανάλωσης. Έτσι, μια συγκεκριμένη ποσότητα αλκοόλ μπορεί να καταναλωθεί είτε σε ένα συνεχές (*chronic*) μοτίβο, είτε σε ένα μοτίβο οξείας έκθεσης (*binge-like*). Στην πρώτη περίπτωση, η συνολική ποσότητα του αλκοόλ που καταναλώνεται, κατανέμεται σε ένα εκτεταμένο χρονικά διάστημα (π.χ. μίας εβδομάδας ή ενός μήνα) και οι μεμονωμένες δόσεις συνήθως απέχουν μεταξύ τους με συνέπεια (π.χ. 2 ποτά την εβδομάδα ή 1 ποτό την ημέρα), ενώ στη δεύτερη περίπτωση η συνολική κατανάλωση του αλκοόλ συμπιέζεται σε ένα σύντομο χρονικό διάστημα (π.χ. ένα βράδυ ή μία ημέρα) και ο χρόνος μεταξύ της κατανάλωσης των μεμονωμένων δόσεων είναι σύντομος και πιθανώς ασυνεπής [47]. Γίνεται κατανοητό πως, στα προαναφερόμενα μοτίβα έκθεσης, η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης στο αίμα (*Blood Alcohol Concentration, BAC*) που επιτυγχάνεται και στην οποία εκτίθεται η μητέρα και συνεπακόλουθα το έμβρυο, είναι διαφορετική και επιδρά αλλότροπα στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο. Πιο συγκεκριμένα, πειραματικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι η έκθεση σε μεγάλες δόσεις αιθανόλης σε σύντομο χρονικό διάστημα (*binge-like μοτίβο οξείας έκθεσης*), που συνεπάγεται και μεγαλύτερη BAC, έχει σοβαρότερες επιπτώσεις στη φυσιολογική ανάπτυξη του εγκεφάλου επίμυων, συγκριτικά με την έκθεση στην ίδια ποσότητα αλκοόλ για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα [21].

1.2.4.2. Οδοί χορήγησης

Κατά τη δημιουργία απογόνων που έχουν προγεννητικά εκτεθεί στο αλκοόλ (ΡΑΕ: Prenatal Alcohol Exposure), ανάλογα με την επιθυμητή συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα της μητέρας, εφαρμόζονται τρεις βασικές τεχνικές χορήγησης της αιθανόλης: εκούσια πρόσληψή της μέσω της τροφής ή του νερού ή ακούσια ενδογαστρική χορήγησή της, ενέσιμη χορήγησή της και πρόσληψή της μέσω της εισπνοής [46].

Η εκούσια πρόσληψη νερού (*voluntary drinking*) ή τροφής που περιέχει αιθανόλη (*liquid diet model*) αποτελεί την πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική χορήγησης της αιθανόλης. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις όπου η συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα επιθυμείται να διατηρηθεί σε χαμηλά επίπεδα ενώ, συγκριτικά με τις υπόλοιπες τεχνικές, είναι απλή, λιγότερο στρεσογόνος για τα πειραματόζωα και κατά την εφαρμογή της δεν παρατηρούνται υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Ωστόσο, η από του στόματος χορήγηση της αιθανόλης δεν επιτρέπει τον ακριβή έλεγχο της ποσότητας αιθανόλης που λαμβάνεται από τη μητέρα και κατά συνέπεια από το έμβρυο, με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγάλη διακύμανση στις τιμές των BAC που επιτυγχάνονται. Τέλος, όταν η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται και μεταγεννητικά προκειμένου να προσομοιάσει την τελειόμηνη ανθρώπινη κύηση και εγκεφαλική ανάπτυξη, κατά τη διάρκεια του θηλασμού είναι αβέβαιο πόση αιθανόλη μπορεί να περάσει στο μητρικό γάλα και δύσκολο να προσδιοριστεί η πραγματική δόση της αιθανόλης που καταναλώνεται από τα νεογνά [46].

Σε αντίθεση με την εκούσια πρόσληψη της αιθανόλης μέσω του νερού ή της τροφής, η ακούσια ενδογαστρική χορήγησή της (*intragastric intubation* ή *gavage*) τόσο στις μητέρες κατά τη διάρκεια της κύησης όσο και στα νεογνά, προσφέρει ακριβή έλεγχο της ποσότητας πρόσληψης της αιθανόλης και οδηγεί σε υψηλότερη συγκέντρωσή της στο αίμα. Ένα πλεονέκτημα της συγκεκριμένης οδού χορήγησης της αιθανόλης είναι ότι, όπως και κατά την εκούσια πρόσληψη, η αιθανόλη λαμβάνεται από το στόμα και επομένως εισέρχεται στην κυκλοφορία μέσω του γαστρεντερικού συστήματος όπως συμβαίνει όταν μια μητέρα καταναλώνει αλκοόλ. Παρ' όλα αυτά, σε αντίθεση με την εκούσια πρόσληψη αιθανόλης, η τεχνική αυτή είναι ιδιαίτερα επεμβατική και χρονοβόρος και συνδέεται με αυξημένο άγχος και υψηλά ποσοστά θνησιμότητας των πειραματόζωων [46].

Μία ακόμη μέθοδος χορήγησης της αιθανόλης η οποία εφαρμόζεται κατά το μεταγεννητικό στάδιο ανάπτυξης, είναι η συνέχιση προσομοίωσης των συνθηκών εμβρυικής ανάπτυξης (*artificial rearing* ή *rup in a cup*) των πειραματόζωων για το χρονικό διάστημα που ισοδυναμεί στο τρίτο τρίμηνο της ανθρώπινης κύησης. Κατά την εφαρμογή της μεθόδου, πραγματοποιείται ενδογαστρική χορήγηση της αιθανόλης, γεγονός που επιτρέπει τον έλεγχο και τη ρύθμιση της ποσότητας πρόσληψής της, ενώ τα νεογνά διαβιούν απομονωμένα από τη μητέρα τους. Γίνεται κατανοητό πως η συγκεκριμένη τεχνική είναι αρκετά επεμβατική και ταυτόχρονα,

λόγω της απομόνωσής τους από τη μητέρα, τα νεογνά αποτρέπονται από κοινωνικά φαινόμενα που λαμβάνουν χώρα κατά τη νεογνική περίοδο [46].

Τέλος, η χορήγηση αιθανόλης μέσω εισπνοής ή μέσω ένεσης συνεπάγεται την επίτευξη υψηλών BAC και χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις όπου διερευνάται η οξεία επίδραση της αιθανόλης σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια. Σημαντικό μειονέκτημα, όμως, και των δύο οδών χορήγησης είναι ότι δεν προσομοιάζουν την κατανάλωση του αλκοόλ από τον άνθρωπο [46].

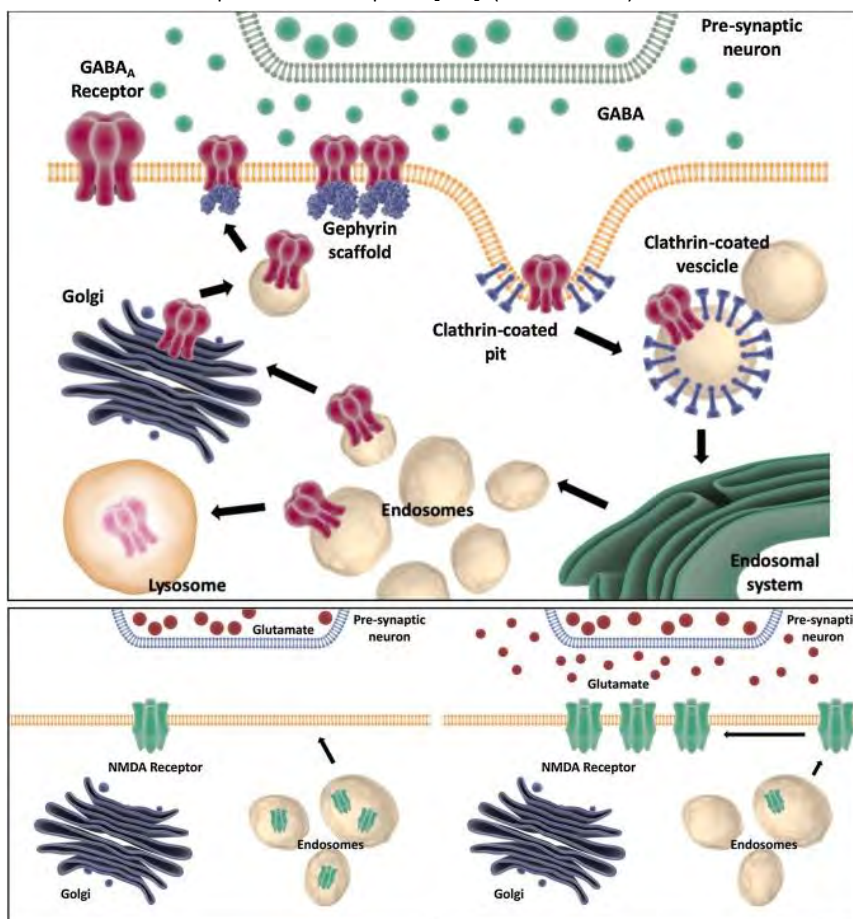
1.3. ΑΛΚΟΟΛ ΚΑΙ ΕΠΙΛΗΨΙΑ

Η διεγερτοτοξικότητα που προκαλείται από το γλουταμινικό οξύ, η φλεγμονή του ΚΝΣ και το οξειδωτικό στρες συνιστούν βασικά γεγονότα του νευρικού εκφυλισμού και αποτελούν την κυτταρική βάση της επιληψίας [48]. Η επιληψία συνιστά μία εξέχουσα συννοσηρότητα που παρατηρείται σε πολλά παιδιά των οποίων οι μητέρες κατανάλωναν αλκοόλ κατά τη διάρκεια της κύησης και στα οποία το αλκοόλ έχει προκαλέσει ένα εύρος δυσμενών αναπτυξιακών ανωμαλιών που εντάσσονται στο Φάσμα Διαταραχών της Εμβρυϊκής Ανάπτυξης οφειλόμενη στην κατάχρηση του αλκοόλ (Fetal Alcohol Spectrum Disorders, FASD) [49]. Η επιληψία χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση διαλειπόντων μη προκλητών (αυθόρμητων) επιληπτικών κρίσεων [50] οι οποίες προκύπτουν στο πλαίσιο μίας ανισορροπίας μεταξύ διέγερσης και αναστολής [51] και επηρεάζει το 0,6% του γενικού πληθυσμού, ποσοστό το οποίο στα παιδιά με εμβρυϊκό αλκοολικό σύνδρομο (*Fetal Alcohol Syndrome, FAS*), την σοβαρότερη εκδήλωση του FASD, κυμαίνεται από 3-21% [49].

1.3.1. Παθοφυσιολογία του *Status Epilepticus*

Οι γενικευμένες τονικοκλονικές επιληπτικές κρίσεις (*Generalized Tonic-Clonic Seizures, GTCSs*) αποτελούν τον πιο συνηθισμένο τύπο επιληπτικών κρίσεων μεταξύ των ασθενών με FASD και μπορεί να εμφανιστούν ήδη από την ηλικία των 6 μηνών - το ισοδύναμο της μεταγεννητικής ημέρας 7 (*postnatal day 7, PND7*) στους επίμυες [52]. Όταν μία GTCS και γενικότερα μία επιληπτική κρίση διαρκεί περισσότερο από 5 λεπτά ή όταν λαμβάνουν χώρα δύο ή περισσότερες επιληπτικές κρίσεις μεταξύ των οποίων δεν ανακτάται πλήρως η συνείδηση του ατόμου, προκύπτει μία κατάσταση η οποία ορίζεται ως «*status epilepticus*» (SE). Το SE απορρέει είτε από την αποτυχία των υπεύθυνων για τον τερματισμό μιας επιληπτικής κρίσης μηχανισμών (GABAεργικής αναστολή) είτε από την πυροδότηση μηχανισμών που οδηγούν σε παρατεταμένες επιληπτικές κρίσεις (γλουταμινεργική διέγερση) [53]. Ειδικότερα, έχει διαπιστωθεί ότι κατά το SE οι GABA_A υποδοχείς ενδοκυτταρώνονται έπειτα από την ενσωμάτωσή τους σε σωματίδια της συναπτικής μεμβράνης που καλύπτονται με κλαθρίνη (*clathrin-coated pits, CCPs*) και, έτσι, καθίστανται ανενεργοί. Αντίθετα, οι υπομονάδες των NMDA (*N-methyl-D-aspartate*) υποδοχέων του γλουταμινικού οξέος στρατολογούνται προς τη σύναψη όπου σχηματίζουν επιπρόσθετους υποδοχείς,

γεγονός το οποίο ενισχύει περαιτέρω τη διέγερση και συμβάλλει στη διεγερτοτοξικότητα και τη διατήρηση του SE (Εικόνα 11) [54]. Ο όρος διεγερτοτοξικότητα περιγράφει τις τοξικές δράσεις των διεγερτικών νευροδιαβιβαστών -κυρίως του γλουταμινικού οξέος- οι οποίες εκκινούν με την υπέρμετρη ενεργοποίηση των υποδοχέων τους και των σηματοδοτικών μονοπατιών καθοδικά αυτών, γεγονός που επιφέρει την απώλεια της εύρυθμης λειτουργίας και τελικά, το θάνατο των νευρικών κυττάρων [55] (Εικόνα 14).



Εικόνα 11: Γεγονότα που συμβαίνουν κατά το *status epilepticus* στις ανασταλτικές (επάνω) και τις διεγερτικές (κάτω) συνάψεις (Πηγή: [51], Αριθμός άδειας: 5510280676763, Συγγραφείς: Lara Prisco, Mario Ganau, Sidra Aurangzeb, Olivia Moswela, Claire Hallett, Simon Raby, Karina Fitzgibbon, Christopher Kearns, Arjune Sen).

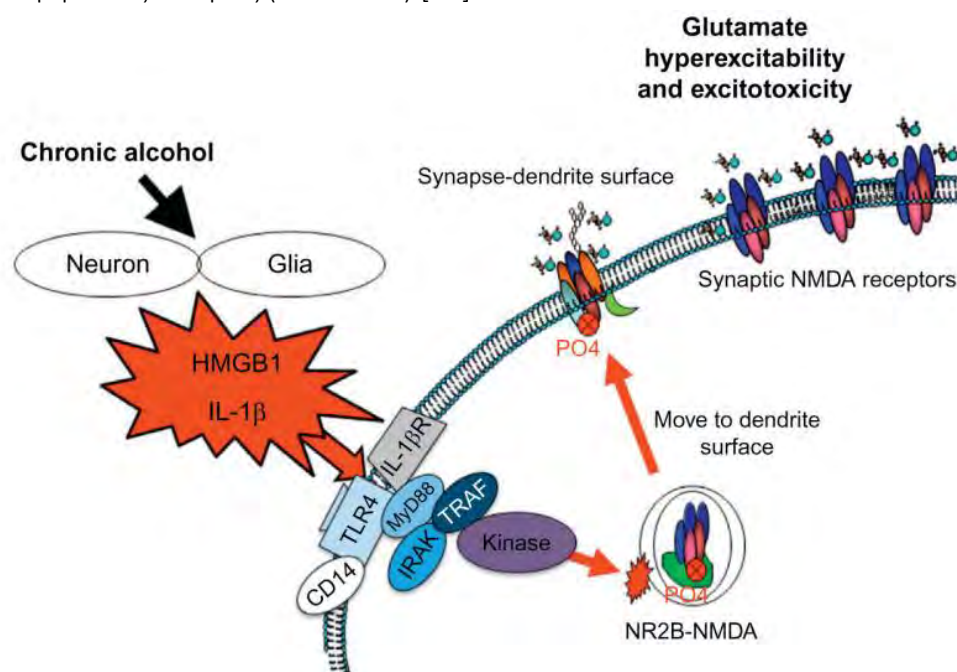
1.3.2. HMGB1 και διεγερτοτοξικότητα

Έχει διαπιστωθεί ότι, σημαντικό ρόλο στη στρατολόγηση και την επερχόμενη αύξηση των NMDA υποδοχέων στη σύναψη διαδραματίζει το σηματοδοτικό μονοπάτι της ενδογενούς φλεγμονώδους κυτοκίνης HMGB1⁵ (*High-Mobility Group*

⁵ Η HMGB1 (γνωστή και ως αμφοτερίνη ή HMG-1: *high-mobility group protein*) είναι μια πυρηνική πρωτεΐνη που οργανώνει το DNA και ρυθμίζει τη μεταγραφή. Στον πυρήνα το HMGB1 αλληλεπιδρά με νουκλεοσώματα, μεταγραφικούς παράγοντες και ιστόνες. Η υπερακετυλίωση της HMGB1 σε υπολείμματα λυσίνης προκαλεί τη μετατόπιση της στο κυτταρόπλασμα ενώ σε ότι αφορά τα κύτταρα του ανοσοποιητικού έχει διαπιστωθεί ότι, ενεργοποιημένα μακροφάγα και μονοκύτταρα εκκρίνουν την HMGB1 ως πρό-φλεγμονώδη κυτοκίνη.

Box 1) και του υποδοχέα TLR4 (*Toll-like receptor 4*). Η HMGB1 συνιστά ένα μοριακό μοτίβο που σχετίζεται με βλάβη (*Damage-Associated Molecular Pattern, DAMP*) [56] καθώς εκκρίνεται από νεκρά κύτταρα, νευρώνες, κύτταρα της μικρογλοίας και αστροκύτταρα ως απόκριση σε προσβολές του ΚΝΣ, συμπεριλαμβανομένης της επιληψίας και της χρόνιας έκθεσης στο αλκοόλ [57,58]. Συγκεκριμένα, σε μοντέλα πρόκλησης επιληπτικών κρίσεων σε ποντίκια και επίμυες με πιλοκαρπίνη, καϊνικό οξύ και πεντυλενοτετραζόλη έχει παρατηρηθεί αύξηση των επιπέδων έκφρασης της HMGB1 έπειτα από ένα επεισόδιο SE καθώς και μετατόπιση της από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα νευρώνων και αστροκυττάρων αλλά και στον εξωκυττάριο χώρο στην περιοχή του υποκάμπου [57,59,60]. Αύξηση των επιπέδων της HMGB1 έχει παρατηρηθεί και σε επιληπτικούς ασθενείς [61].

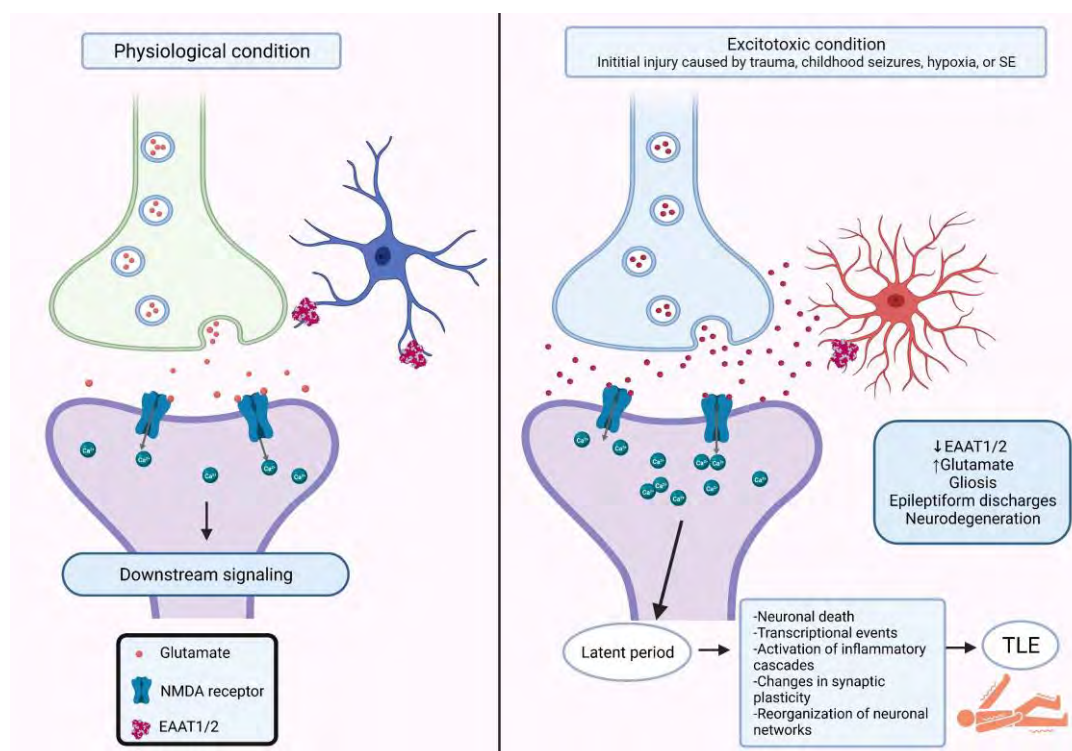
Σε ότι αφορά στην αιθανόλη, έχει βρεθεί ότι, χρόνια χορήγηση αυτής προκαλεί αύξηση των επιπέδων έκφρασης και απελευθέρωσης της HMGB1 από τους νευρώνες και τα κύτταρα της γλοίας [58,62]. Αύξηση των επιπέδων της HMGB1 παρατηρείται όχι μόνο σε ζωικά μοντέλα έκθεσης στην αιθανόλη αλλά και σε εγκεφάλους αλκοολικών μετά θάνατο [58]. Μετά την απελευθέρωσή της από τα κύτταρα, η HMGB1 προσδένεται στον TLR4 υποδοχέα και επάγει την ενεργοποίηση κινάσων οι οποίες φωσφορυλιώνουν την NR2B υπομονάδα των NMDA υποδοχέων προκαλώντας τη μετανάστευση περισσότερων υποδοχέων στη συναπτική μεμβράνη γεγονός που οδηγεί σε αύξηση της διέγερσης των νευρώνων και την εμφάνιση του φαινομένου της διεγερτοτοξικότητας (Εικόνα 12) [63].



Εικόνα 12: Επίδραση της χρόνιας έκθεσης στην αιθανόλη στους μηχανισμούς που οδηγούν σε διεγερτοτοξικότητα (Πηγή: [134], Αριθμός άδειας: 5510290191575, Συγγραφείς: Fulton T. Crews, Ryan P. Vetreno).

1.3.3. Αστροκύτταρα και διεγερτοτοξικότητα

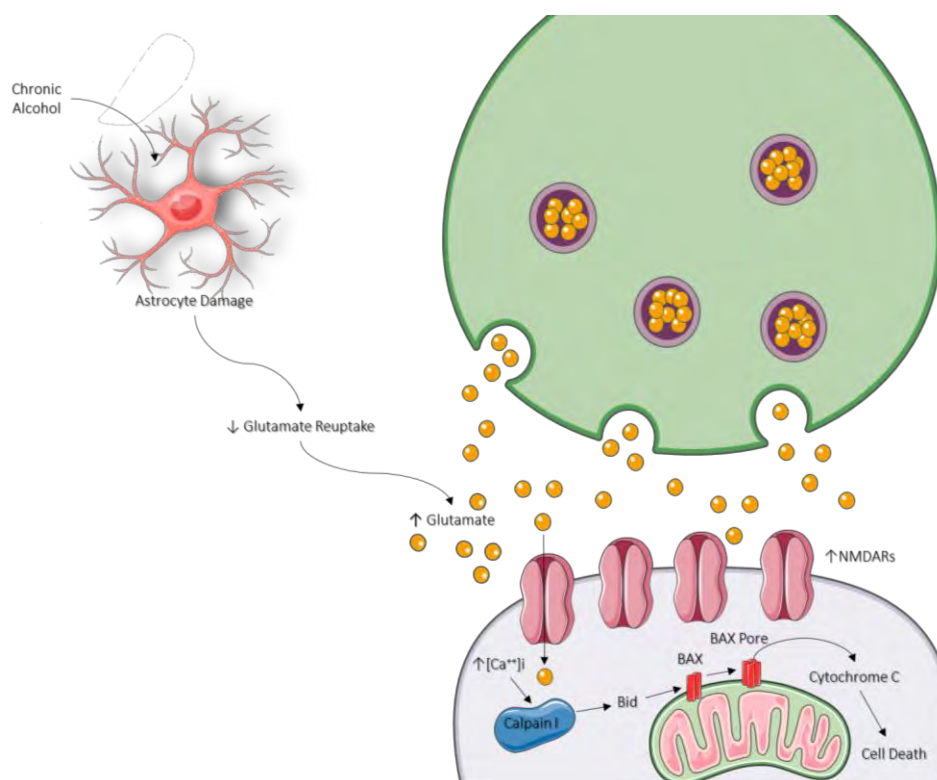
Το φαινόμενο της διεγερτοτοξικότητας, επιδεινώνεται από τις αρνητικές επιδράσεις που επιφέρει τόσο η επιληψία όσο και η χρόνια έκθεση στο αλκοόλ στους μηχανισμούς ελέγχου της εξωκυττάριας συγκέντρωσης του γλουταμινικού οξέος. Όπως προαναφέρθηκε, η κάθαρση του γλουταμινικού πραγματοποιείται σε ποσοστό 80% από τα αστροκύτταρα στη συναπτική σχισμή μέσω εξειδικευμένων μεταφορέων, συμπεριλαμβανομένου και του μεταφορέα EAAT2 ή GLT-1 (*glutamate transporter-1*).



Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση της τριμερούς γλουταμινεργικής σύναψης (προ- και μετασυναπτικός νευρώνας και αστροκύτταρα), υπό φυσιολογικές (αριστερά) και διεγερτοτοξικές συνθήκες που οδηγούν στην ανάπτυξη επιληψίας (δεξιά, Πηγή: [67], Αριθμός άδειας: 5510291089118, Συγγραφείς: Jennifer Leigh Green, Wagner Ferreira dos Santos, Andréia Cristina Karklin Fontana).

Έχει διαπιστωθεί ότι GLT-1^{-/-} ποντίκια αναπτύσσουν αυθόρμητες θανατηφόρες επιληπτικές κρίσεις, ενώ διαγονιδιακά ποντίκια στα οποία ο GLT-1 υπερεκφράζεται έχουν αυξημένο κατώφλι (*threshold*) πρόκλησης επιληπτικών κρίσεων από την πιλοκαρπίνη συγκριτικά με τα αγρίου τύπου ζώα. Με βάση τα παραπάνω, η παρουσία του GLT-1 φαίνεται ότι αποτρέπει την εμφάνιση επιληπτικών κρίσεων και προστατεύει το νευρικό ιστό από τις τοξικές δράσεις του γλουταμινικού οξέος [64,65]. Επιπλέον, σε μοντέλο πρόκλησης SE με καϊνικό οξύ έχει βρεθεί πως τα επίπεδα του GLT-1 μειώνονται σημαντικά στην πλασματική μεμβράνη των αστροκυττάρων που βρίσκονται στις συνάψεις της CA1 και CA3 περιοχής του ιππόκαμπου [66]. Τέλος, σε μοντέλα επιληψίας του κροταφικού λοβού (Temporal Lobe Epilepsy, TLE) με χορήγηση καϊνικού οξέος που χαρακτηρίζονται από μία

περίοδο SE (αρχική προσβολή), ακολουθούμενη από μία λανθάνουσα περίοδο όπου τα πειραματόζωα δεν εμφανίζουν κρίσεις και μία περίοδο κατά την οποία παρατηρείται εμφάνιση αυθόρμητων επιληπτικών κρίσεων, παρατηρήθηκε μείωση στα επίπεδα της πρωτεΐνης του GLT-1 μεταφορέα. Στις μελέτες αυτές, διαπιστώθηκε ότι η μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης του GLT-1 συμπίπτει χρονικά με την εμφάνιση των αυθόρμητων επιληπτικών κρίσεων, αποδεικνύοντας ότι η δυσλειτουργία του συγκεκριμένου μεταφορέα θα μπορούσε να συμβάλλει στην ανάπτυξη επιληψίας (Εικόνα 13) [66,67,68]. Μείωση στα επίπεδα της πρωτεΐνης του GLT-1 συνοδευόμενη από σοβαρή απώλεια νευρικών κυττάρων έχει βρεθεί και σε ασθενείς με TLE [69] υποδηλώνοντας ότι η απώλεια μεταφορέων του γλουταμινικού οξέος θα μπορούσε να επιδεινώσει τη νευροτοξικότητα που προκαλεί η επιληψία στον άνθρωπο.



Εικόνα 14: Χρόνια έκθεση στο αλκοόλ, διεγερτοτοξικότητα και κυτταρικός θάνατος νευρώνων (Συγγραφέας: Άννα Βασιλάκη).

Το αλκοόλ περιορίζει την επαναπρόσληψη του γλουταμινικού από τον GLT-1 με συνέπεια την αύξηση της εξωκυττάριας συγκέντρωσής του (Εικόνα 14). Συγκεκριμένα, μεταθανάτια ανάλυση εγκεφάλων αλκοολικών έδειξε μειωμένη έκφραση του GLT-1 στον πλάγιο-βασικό πυρήνα της αμυγδαλής (basolateral amygdala, BLA) σε σύγκριση με εγκεφάλους μη αλκοολικών [70]. Όπως είναι γνωστό, η αύξηση του εξωκυττάριας γλουταμινικού οδηγεί σε υπέρμετρη ενεργοποίηση των NMDA υποδοχέων, αυξημένη εισροή ιόντων Ca^{2+} στους νευρώνες, δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και κυτταρικό θάνατο. Σε πειράματα που έγιναν σε επίμυες μετά

από χρόνια έκθεση στην αιθανόλη διαπιστώθηκε ότι η αύξηση του ενδοκυττάριου Ca^{2+} οδηγεί σε ενεργοποίηση την πρωτεάση Calpain I η οποία εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στους νευρώνες και της οποίας η δραστηριότητα αυξάνεται στον εγκεφαλικό φλοιό, την παρεγκεφαλίδα [71] και τον υπόκαμπο [72]. Η ενεργή Calpain I διασπά και ενεργοποιεί την αποπτωτική πρωτεΐνη Bid (*BH3 interacting - domain death agonist*) η οποία αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη BAX (*B-cell lymphoma-2-associated X protein*). Στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων η BAX ολιγομερίζεται και σχηματίζει πόρους με αποτέλεσμα την απελευθέρωση αποπτωτικών παραγόντων, όπως το κυτόχρωμα C, στο κυτταρόπλασμα και την εκκίνηση αποπτωτικού θανάτου μέσω της δράσης κασπασών (Εικόνα 14) [73].

1.3.4. Ζωικά μοντέλα επιληψίας

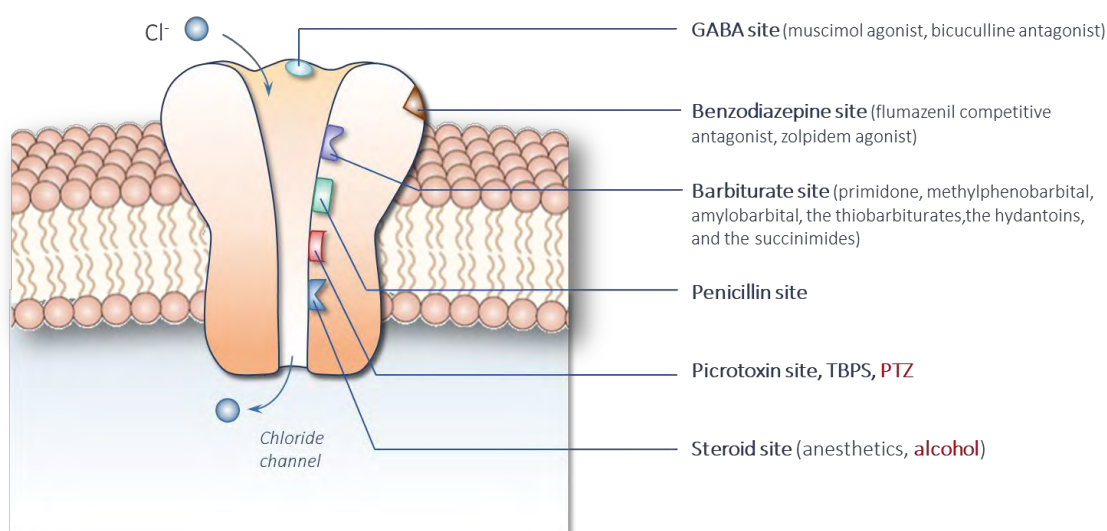
Σε μοντέλα επίμυων, έχει παρατηρηθεί σημαντική επικάλυψη εγκεφαλικών περιοχών που υφίστανται παθολογικές αλλαγές εξαιτίας της προγεννητικής ή/και μεταγεννητικής έκθεσης στο αλκοόλ και δομών που σχετίζονται με τη γένεση ή/και την εξάπλωση της επιληπτικής δραστηριότητας στον εγκέφαλο, συμπεριλαμβανομένου του υπόκαμπου [49]. Οι νεαροί ΡΑΕ επίμυες δεν εμφανίζουν αυθόρμητες επιληπτικές κρίσεις, όπως συμβαίνει στα παιδιά με εμβρυϊκό αλκοολικό σύνδρομο, ωστόσο παρατηρείται μείωση στο κατώφλι πρόκλησης των επιληπτικών κρίσεων καθώς και αύξηση στη συχνότητα εμφάνισης συγκεκριμένων τύπων επιληπτικών κρίσεων έπειτα από διέγερση των επιληπτογόνων μηχανισμών [52,74,75]. Συνεπώς, προκειμένου να προσομοιαστούν όσο το δυνατόν ακριβέστερα οι αλλαγές που συνεπάγεται η προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη στον ανθρώπινο εγκέφαλο και η συνεπακόλουθη εμφάνιση επιληπτικών κρίσεων, στα ζωικά μοντέλα ΡΑΕ προκαλούνται επιληπτικές κρίσεις κυρίως μέσω χημικών ουσιών που επάγουν άμεσα ή έμμεσα μία ανισορροπία μεταξύ διέγερσης και αναστολής η οποία ευοδώνει την εμφάνιση επιληπτικών κρίσεων ή/και SE.

Η πρόκληση επιληπτικών κρίσεων ή/και SE στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο πραγματοποιείται κυρίως με τη συστηματική χορήγηση, σε τρωκτικά μικρότερα των 21 ημερών (<PND21), **καϊνικού οξέος** (ανάλογο του γλουταμινικού οξέος) που δρα ως αγωνιστής των υποδοχέων του καϊνικού και ως μερικός αγωνιστής των AMPA υποδοχέων του γλουταμινικού, **πιλοκαρπίνης** που δρα ως μη εκλεκτικός μουςκαρινικός αγωνιστής, **πεντυλενοτετραζόλης** (*pentylenetetrazol*, PTZ) που συνιστά ανταγωνιστή των GABA_A υποδοχέων ή **φθοροθειόλης** η οποία πιθανώς δρα στους υποδοχείς του GABA και σε κανάλια Na^+ . Τα πρωτόκολλα χορήγησης που χρησιμοποιούνται είναι παρόμοια με αυτά που εφαρμόζονται στα ενήλικα τρωκτικά με τη διαφορά ότι χορηγούνται μικρότερες δόσεις καθώς τα νεαρά τρωκτικά έχουν αυξημένη ευαισθησία στην πρόκληση των επιληπτικών κρίσεων [76].

Έχει διαπιστωθεί ότι η πρόκληση SE κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης τρωκτικών δεν οδηγεί σε σημαντικές κυτταρικές απώλειες στην ενήλικη ζωή [77,78]. Ωστόσο,

μελέτες σχετικά με τις οξείες και βραχυπρόθεσμες επιδράσεις του SE υποδεικνύουν κυτταρική βλάβη στους νευρώνες του ιππόκαμπου, της αμυγδαλής και του μέσου-ραχιαίου πυρήνα του θαλάμου [79,80]. Παράλληλα, σε μοντέλα πρόκλησης SE με καϊνικό και πιλοκαρπίνη σε νεαρούς επίμυες, παρατηρείται εκβλάστηση (*sprouting*) των βρυωδών ινών που αυξάνει τη διεγερσιμότητα του ιπποκάμπου δίχως, όμως, να παρατηρείται η εξέχουσα αναδιοργάνωση αυτών που τυπικά υπάρχει στους ενήλικες [77,78].

Η PTZ προκαλεί στα τρωκτικά κρίσεις ανάλογες με τις GTCS κρίσεις στον άνθρωπο και χρησιμοποιείται ευρέως καθώς η PTZ εγείρει την επιληπτική δραστηριότητα σχετικά γρήγορα [81] ενώ μπορεί να προκαλέσει SE ακόμα και μετά από μία συστηματική χορήγηση εάν χορηγηθεί σε επαρκή ποσότητα [76]. Ο μηχανισμός δράσης της PTZ έγκειται στη σύνδεσή της στη θέση αναγνώρισης της πικροτοξίνης στο μετασυναπτικό GABA_A υποδοχέα (Εικόνα 15). Ως αποτέλεσμα της δέσμευσης της PTZ, η επίδραση του ενδογενούς GABA και άλλων ανασταλτικών νευροδιαβιβαστών μειώνεται και, έτσι, κυριαρχεί μία κατάσταση υπερδιέγερσης [82]. Όσον αφορά στη φθοροθειόλη, είναι μία πτητική διεγερτική ουσία του ΚΝΣ η οποία όταν εξατμίζεται σχηματίζει ατμούς που προκαλούν σπασμούς. Η ανάρρωση από τις κρίσεις είναι πολύ γρήγορη και τα ζώα εμφανίζουν φυσιολογική συμπεριφορά εντός 30 λεπτών. Όπως και στο PTZ μοντέλο επιληψίας, έτσι και στο μοντέλο πρόκλησης επιληπτικών κρίσεων με τη φθοροθειόλη δεν παρατηρείται εμφανής απώλεια νευρώνων. Ωστόσο, και στα δύο μοντέλα παρατηρείται εκβλάστηση βρυωδών ινών στον ιππόκαμπο των ενήλικων ζώων [76].



Εικόνα 15: Θέσεις δέσμευσης διαφόρων φαρμάκων και ουσιών στους GABA_A υποδοχείς. Διακρίνονται οι θέσεις δέσμευσης της αλκοόλης και της PTZ (Συγγραφέας: Ευτυχία Ασπροδίνη).

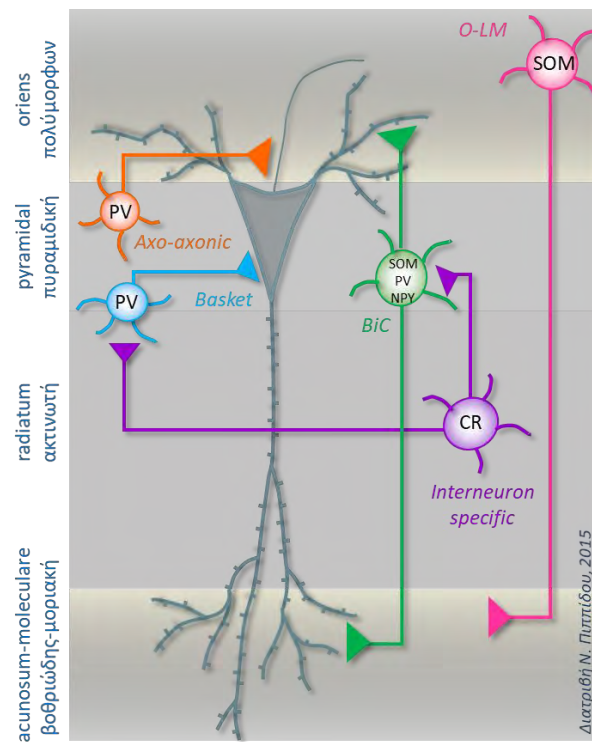
1.4. ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΣ

Η διερεύνηση της ανατομίας του ιπποκάμπειου σχηματισμού εκκινεί από την εποχή του Arantius (1530 – 1589) ο οποίος έδωσε για πρώτη φορά τη χαρακτηριστική

αυτή ονομασία στην εν λόγω περιοχή εξαιτίας της ομοιότητάς της με το ομώνυμο θαλάσσιο ζώο. Ο υποκάμπος σχηματισμός έχει επίμηκες σχήμα το οποίο παρομοιάζεται με το λατινικό γράμμα C και εντοπίζεται στο κάτω τοίχωμα του κροταφικού κέρατος της πλάγιας κοιλίας [84]. Με τον όρο υποκάμπος σχηματισμό περιγράφεται μία ομάδα διακριτών, από άποψη κυτταρικής αρχιτεκτονικής, παρακείμενων περιοχών οι οποίες είναι ο ιδίως υπόκαμπος ή αμμώνιο κέρας (*Cornu Ammonis, CA*), η οδοντωτή έλικα (*Dentate Gyrus, DG*) και το υπόθεμα (*subiculum*). Στη βιβλιογραφία περιλαμβάνονται ενίοτε στον υποκάμπος σχηματισμό ο ενδορινικός φλοιός, το προϋπόθεμα και το παραϋπόθεμα ενώ, άλλοτε, αναφέρονται ξεχωριστά ως παραϊπποκάμπος σχηματισμός [85]. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία η προσοχή μας εστιάζεται στον ιδίως υπόκαμπο και στην οδοντωτή έλικα.

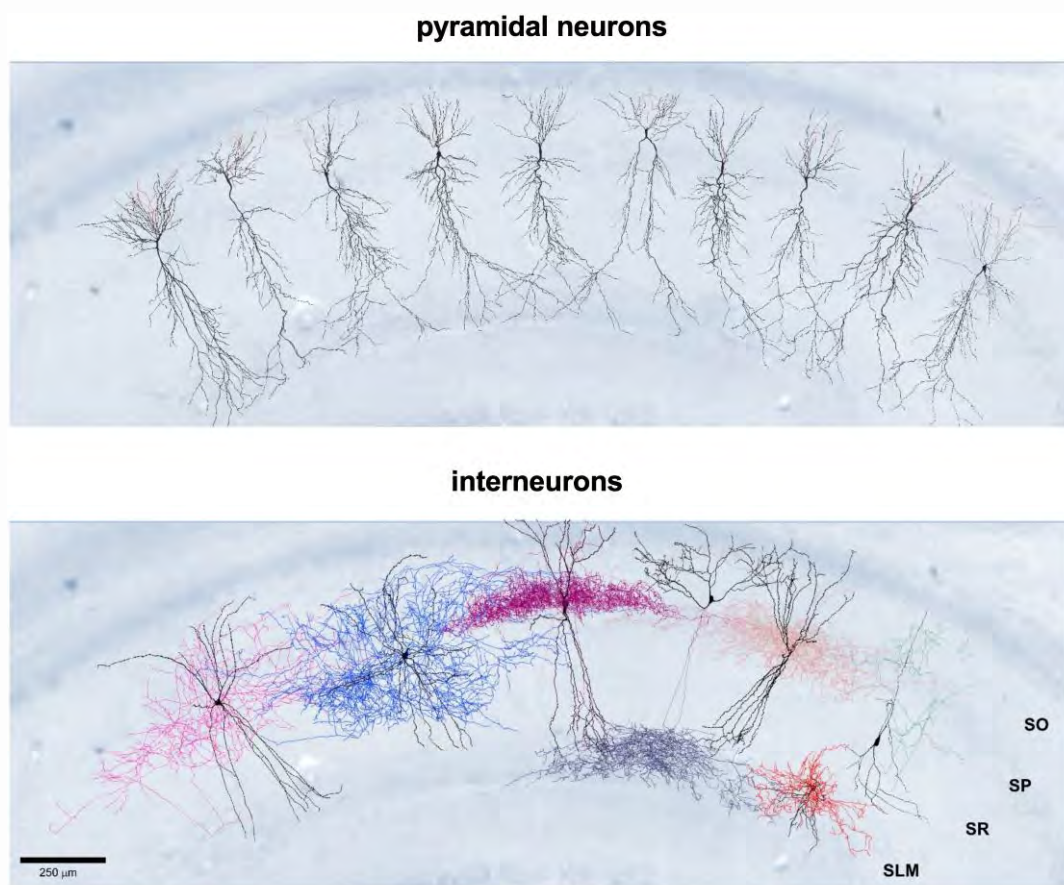
1.4.1. Ανατομία και κυτταρικοί τύποι ιδίως υπόκαμπου

Ο ιδίως υπόκαμπος του επίμυος συνίσταται από τα πεδία CA1, CA2 και CA3 τα οποία οργανώνονται σε 5 (CA1, CA2) ή 6 (CA3) στιβάδες. Η κύρια κυτταρική στιβάδα των πεδίων αυτών ονομάζεται **πυραμιδική** (*pyramidal cell layer*) και φέρει τα σώματα των πυραμιδικών κυττάρων, των κύριων κυττάρων του ιδίως υπόκαμπου. Τα πυραμιδικά κύτταρα συνιστούν προβλητικούς διεγερτικούς νευρώνες και απαρτίζονται από ένα βασικό δενδριτικό δέντρο που εκτείνεται στη **στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων** (*stratum oriens*) και ένα κορυφαίο δενδριτικό δέντρο που εκτείνεται μέχρι τη σχισμή (*fissure*) του υπόκαμπου [84].



Εικόνα 16: Οργάνωση σε στιβάδες και κυτταρικοί τύποι του ιδίως υπόκαμπου [87] (Συγγραφέας: Ευτυχία Ασπροδίνη).

Η στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων βρίσκεται εν τω βάθει της πυραμιδικής και είναι σχετικά ακυτταρική. Εν τω βάθει της πολύμορφης στιβάδας είναι η **σκάφη** (*alveus*) αποτελούμενη από νευράξονες των πυραμιδικών και πολύμορφων νευρώνων του υποθέματος (*subiculum*) και του ιδίως υπόκαμπου. Επιπολής της πυραμιδικής στιβάδας βρίσκεται η **ακτινωτή στιβάδα** (*stratum radiatum*) στην οποία εντοπίζονται οι ίνες του Schaffer από τη CA3 προς τη CA1 περιοχή, ενώ επιπολής της πυραμιδικής και αποκλειστικά στο CA3 πεδίο, εντοπίζεται μια στενή ακυτταρική ζώνη, η **διαυγής στιβάδα** (*stratum lucidum*) που καταλαμβάνεται από τις βρυώδεις ίνες (*mossy fibers*), τους νευράξονες των κοκκωδών κυττάρων της οδοντωτής έλικας. Η πλέον επιπολής στιβάδα είναι η **βοθριώδης - μοριακή** (*stratum lacunosum-moleculare*) στην οποία καταλήγουν οι διατιτραίνουσες ίνες (*perforant pathway fibers*) από τον ενδορινικό φλοιό (Εικόνα 16,18) [84,86].



Εικόνα 17: 3D αναπαράσταση πυραμιδικών νευρώνων και διανευρώνων (πάνω) και σχηματική απεικόνιση των διανευρώνων της CA1 περιοχής του ιδίως υπόκαμπου (Πηγή: [135], Άδεια: [Attribution 4.0 International](#) (CC BY 4.0)).

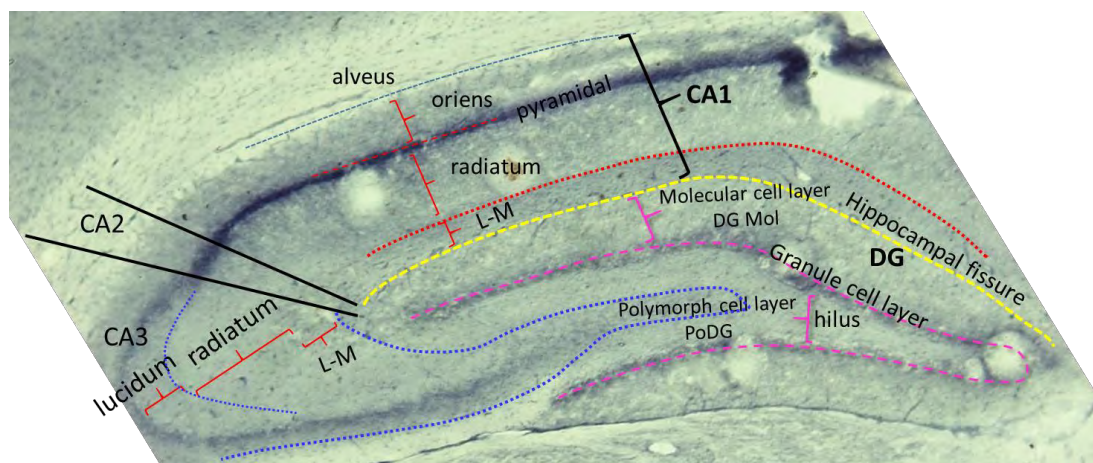
Εκτός των κύριων κυτταρικών τύπων, στον ιδίως υπόκαμπο εντοπίζονται και πολυάριθμοι διανευρώνες οι οποίοι είναι κυρίως ανασταλτικοί και συνθέτουν GABA (Εικόνα 17). Τα καλαθοφόρα (*basket*) κύτταρα συνιστούν τον κυριότερο τύπο διανευρώνων του ιδίως υπόκαμπου και ονομάζονται έτσι καθώς οι άξονές τους σχηματίζουν περικυτταρικά πλέγματα γύρω από τα πυραμιδικά κύτταρα. Ένας

δεύτερος τύπος διανευρώνων είναι τα διστιβαδωτά (*bistratified*) κύτταρα τα οποία αποθέτουν το κύριο αξονικό πλέγμα τους στην ακτινωτή και την πολύμορφη στιβάδα νευρώνοντας τους δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων [86,88].

Επιπλέον, διανευρώνες συνιστούν και τα κύτταρα τύπου πολυελαίου (*chandelier*) των οποίων τα σώματα βρίσκονται στην πυραμιδική στιβάδα και οι δενδρίτες τους έγκεινται παράλληλα των δενδριτών των πυραμιδικών κυττάρων, γεγονός που καθιστά πιθανό να λαμβάνουν παρόμοιες προβολές με εκείνες που τερματίζουν στα πυραμιδικά κύτταρα. Παράλληλα, επειδή οι νευράξονες τους τερματίζουν στα αρχικά τμήματα των νευραξόνων των πυραμιδικών κυττάρων χαρακτηρίζονται και ως αξο-αξονικά κύτταρα. Ένας ακόμη τύπος διανευρώνων είναι τα κύτταρα O-LM (*oriens lacunosum-moleculare-associated cell*) των οποίων το σώμα και οι δενδρίτες περιορίζονται στην πολύμορφη στιβάδα ενώ ο νευράξονάς τους καταλήγει στη βοθριώδη-μοριακή στιβάδα όπου σχηματίζει συνάψεις με τους κορυφαίους δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων. Τέλος, εντοπίζονται διανευρώνες ειδικοί για διανευρώνες (*interneuron specific-IS*) οι άξονες των οποίων τερματίζουν αποκλειστικά σε άλλους διανευρώνες και τριστιβαδωτοί (*trilaminar*) διανευρώνες οι οποίοι, όπως και τα διστιβαδωτά κύτταρα, σχηματίζουν συνάψεις με τους δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων [86,88].

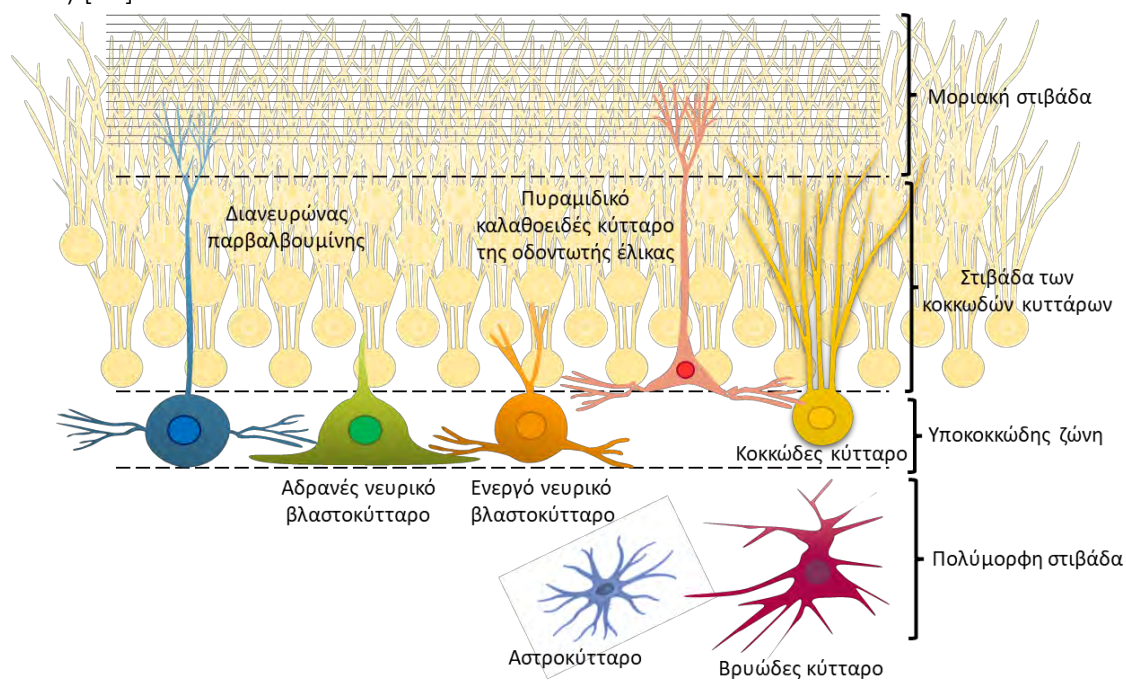
1.4.2. Ανατομία και κυτταρικοί τύποι οδοντωτής έλικας

Η οδοντωτή έλικα οργανώνεται σε τρεις στιβάδες. Επιπολής εντοπίζεται μία σχετικά ακυτταρική στιβάδα, που καλείται **μοριακή** (*molecular layer*) και καταλαμβάνεται κυρίως από τους δενδρίτες των κοκκωδών, των καλαθοειδών και των πολύμορφων κυττάρων καθώς και από τερματικές αξονικές απολήξεις νευρώνων του ενδορινικού φλοιού και άλλων περιοχών. Εν τω βάθει της μοριακής, έγκειται η **κοκκώδης** στιβάδα (*granule cell layer*) η οποία συνίσταται από πυκνές στήλες κοκκωδών κυττάρων με πάχος 4-8 κύτταρα. Τα κοκκώδη κύτταρα αποτελούνται από ένα ελλειπτικού σχήματος κυτταρικό σώμα και φέρουν ένα χαρακτηριστικό κωνοειδές δέντρο από ακανθώδεις δενδρίτες οι οποίοι κατευθύνονται προς το επιπολής τμήμα της μοριακής στιβάδας. Τέλος, η κοκκώδης μαζί με τη μοριακή στιβάδα σχηματίζουν ένα V ή U που περικλείει την τελευταία στιβάδα που ονομάζεται **πολύμορφη** (*polymorphic layer* ή *hilus*) και περιέχει μία ποικιλία τύπων νευρώνων, εκ των οποίων οι πιο κοινοί είναι τα βρυώδη κύτταρα (*mossy cells*, Εικόνα 18)[89].



Εικόνα 18: Οργάνωση σε στιβάδες του ιδίως υπόκαμπου και της οδοντωτής έλικας (Πηγή: Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Συγγραφείς: Ευτυχία Ασπροδίνη).

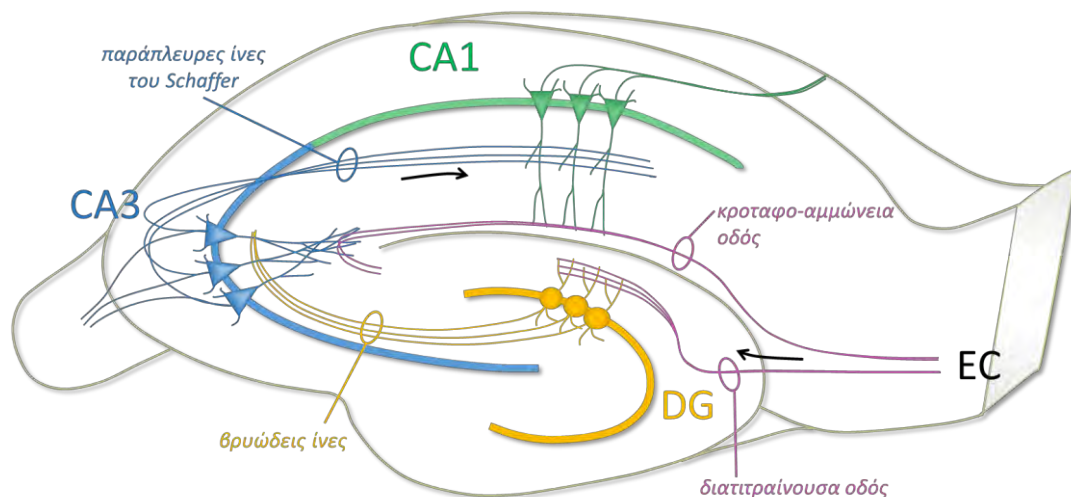
Σε αντιστοιχία με τον ιδίως υπόκαμπο, στην οδοντωτή έλικα εντοπίζονται και πολυάριθμοι διανευρώνες (Εικόνα 19). Κατά μήκος των ορίων της κοκκώδους και της πολύμορφης στιβάδας εντοπίζονται τα καλαθοφόρα κύτταρα των οποίων οι άξονες σχηματίζουν περικυτταρικά πλέγματα γύρω από τα κοκκώδη κύτταρα. Στη μοριακή στιβάδα βρίσκονται τα κύτταρα MOPP (*molecular layer perforant path-associated cell*) και τα αξο-αξονικά κύτταρα των οποίων οι άξονες καταλήγουν στη ζώνη έκφυσης του νευράξονα των κοκκωδών κυττάρων. Στην πολύμορφη στιβάδα βρίσκονται ατρακτοειδή (*fusiform*) κύτταρα όπως τα HIPP (*hilar perforant path-associated cells*) και τα HICAP κύτταρα (*hilar commissural-associated pathway-related cells*) [86].



Εικόνα 19: Διανευρώνες της οδοντωτής έλικας (Συγγραφείς: Άννα Βασιλάκη, Ευτυχία Ασπροδίνη, Δήμητρα Τζίνη).

1.4.3. Διασυνδέσεις του ιπποκάμπειου σχηματισμού

Οι συνδέσεις του ιδίως ιπποκάμπου και της οδοντωτής έλικας παρουσιάζονται ως ένα «τρισυναπτικό κύκλωμα» κατά το οποίο η οδοντωτή έλικα δέχεται απευθείας νεύρωση από τη στιβάδα II του ενδορινικού φλοιού μέσω των αξόνων της διαττραίνουσας οδού. Οι άξονες αυτοί σχηματίζουν διεγερτικές συνάψεις με τους δενδρίτες των κοκκωδών κυττάρων τα οποία προβάλλουν μέσω των αμμύλων αξόνων τους, τις βρυώδεις ίνες, στους εγγύς κορυφαίους δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων της CA3 περιοχής τα οποία, εν συνεχεία, προβάλλουν ομόπλευρα (*ipsilateral*) στα πυραμιδικά κύτταρα της CA1 περιοχής μέσω των ινών του Schaffer και μέσω ετερόπλευρων (*commissural*) συνδέσεων στα πυραμιδικά κύτταρα της CA3 και CA1 περιοχής του ετερόπλευρου ιπποκάμπου. Τα πυραμιδικά κύτταρα της CA3 περιοχής δέχονται, παράλληλα, νεύρωση και από τα κύτταρα της στιβάδας II του ενδορινικού φλοιού, ενώ οι απώτεροι κορυφαίοι δενδρίτες των πυραμιδικών νευρώνων της CA1 περιοχής δέχονται απευθείας προβολές από τα κύτταρα της στιβάδας III του ενδορινικού φλοιού των οποίων οι προβολές τερματίζονται και στο υπόθεμα (Εικόνα 20) [90].

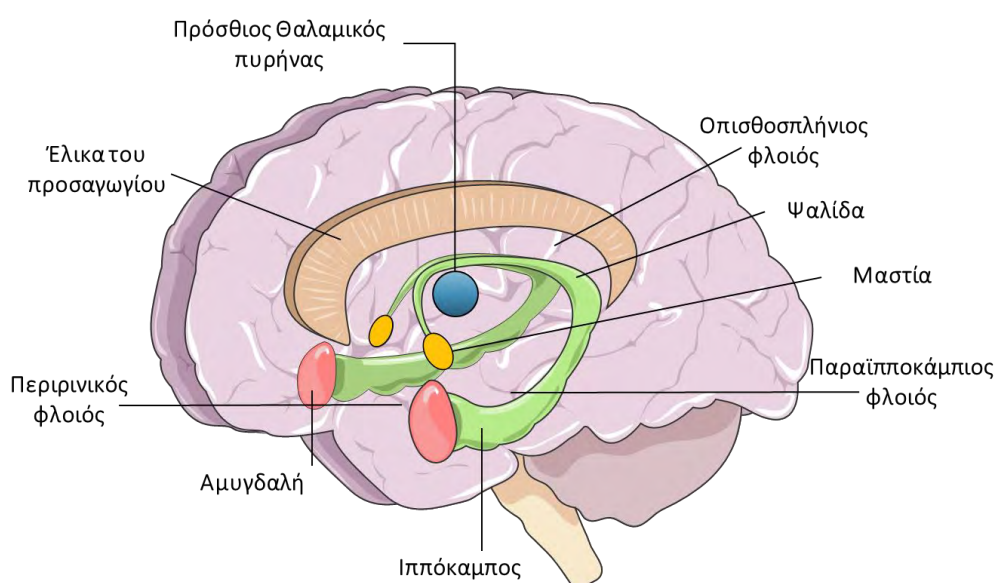


Εικόνα 20: Διασυνδέσεις του ενδορινικού φλοιού, της οδοντωτής έλικας και του ιδίως ιπποκάμπου (Συγγραφέας: Ευτυχία Ασπροδίνη).

Ο ιπποκάμπος εντοπίζεται στους έσω κροταφικούς λοβούς οι οποίοι περιβάλλονται από τον ενδορινικό (*entorhinal*), τον παραϊπποκάμπιο (*parahippocampal*) και τον περιρινικό (*perirhinal*) φλοιό. Είναι μέρος του κυκλώματος του Papez και έτσι συνδέεται με διάφορες υποφλοιικές και φλοιικές δομές, όπως ο πρόσθιος θαλαμικός πυρήνας (*Anterior Thalamic Nuclei, ATN*), τα μαστία (*mammillary bodies*), ο διαφραγματικός πυρήνας (*septal nuclei*) του βασικού πρόσθιου εγκεφάλου (*basal forebrain*), ο οπισθοσπλήνιος φλοιός (*retrosplenial cortex, RSp*) και ο παραϊπποκάμπος φλοιός (*parahippocampal cortex*, Εικόνα 21) [91].

Ο ιπποκάμπος δέχεται προβολές από περιοχές του νεοφλοιού μέσω του περιρινικού και του παραϊπποκάμπου φλοιού οι οποίοι προβάλλουν στον ενδορινικό

φλοιό ενώ δίνει προβολές στις περιοχές αυτές μέσω του υποθέματος το οποίο επίσης προβάλλει πίσω στον ενδορινικό φλοιό αλλά και στα μαστία. Ο περιρινικός φλοιός είναι ζωτικής σημασίας για την αναπαράσταση σύνθετων αντικειμένων, ενώ ο παραϊπποκάμπιος φλοιός, με τις ισχυρές συνδέσεις του με τους οπίσθιους βρεγματικούς [7a/πλευρική ενδοβρεγματική περιοχή (*lateral intraparietal area, LIP*)] και τους οπισθοσπλήνιους φλοιούς, έχει μεγαλύτερο ρόλο στην επεξεργασία οπτικοχωρικών πληροφοριών. Τέλος, έχει προταθεί πως οι συνδέσεις του ιππόκαμπου με τον πρόσθιο θαλαμικό πυρήνα συμβάλλουν στην ανάκληση (*recollection*) πληροφοριών ενώ η εξοικείωση (*familiarity*) μπορεί να μεσολαβηθεί από άμεσες συνδέσεις μεταξύ του περιρινικού φλοιού και των έσω ραχιαίων θαλαμικών πυρήνων (*Medial Dorsal Thalamic Nuclei, MDTN*) [91].



Εικόνα 21: Δομές που περιβάλλουν τον ιππόκαμπο (Συγγραφέας: Άννα Βασιλάκη, Άδεια: Attribution 3.0 International (CC BY 3.0)).

Επιπλέον, σημαντικές συνδέσεις υπάρχουν μεταξύ του ιπποκάμπειου σχηματισμού και της αμυγδαλής. Ο πλάγιος πυρήνας της αμυγδαλής προβάλλει στο στρώμα III του πλάγιου ενδορινικού φλοιού. Στα πρωτεύοντα, οι πλάγιοι και βασικοί πυρήνες προβάλλουν επίσης στον ενδορινικό φλοιό και υπάρχουν επιπρόσθετες προβολές από τον βοηθητικό βασικό πυρήνα στο υπόθεμα. Το υπόθεμα προβάλλει αμφίδρομα στον βασικό πυρήνα, ενώ ο ενδορινικός φλοιός προβάλλει τόσο στον βασικό όσο και στον πλάγιο πυρήνα [84].

Άλλες εξέχουσες υποφλοιικές δομές που προβάλλουν στον ιπποκάμπειο σχηματισμό περιλαμβάνουν τον έσω πυρήνα του διαφράγματος (*medial septal nuclei*) και τη διαγώνια δεσμίδα του Broca, οι ίνες των οποίων καταλήγουν στην πολύμορφη και την ακτινωτή στιβάδα της CA3 περιοχής. Περίπου το 50% των κυττάρων του έσω διαφραγματικού πυρήνα που προβάλλουν στον ιπποκάμπειο σχηματισμό είναι χολινεργικά ενώ οι μη χολινεργικοί νευρώνες αυτού που

προβάλλουν στον ιππόκαμπο είναι πιθανώς GABAεργικοί. Όσον αφορά την νεύρωση από το εγκεφαλικό στέλεχος, ο ιπποκάμπειος σχηματισμός δέχεται σημαντική νοραδρενεργική νεύρωση από τον υπομέλα τόπο (*locus coeruleus*), σημαντική σεροτονινεργική νεύρωση από τον μεσεγκεφαλικό πυρήνα της ραφής (*mesencephalic raphe nuclei*). Τέλος, ο ιπποκάμπειος σχηματισμός λαμβάνει ντοπαμινεργικές προβολές από το κοιλιακό καλυπτρικό πεδίο (*ventral tegmental area*) [84].

1.4.4. Λειτουργίες

Ο ιππόκαμπος έχει καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία της μνήμης και της μάθησης. Ειδικότερα, είναι κρίσιμος για την επεισοδιακή μνήμη (*episodic memory*, μνήμη που προκύπτει από ένα προσωπικό συμβάν), για την σημαντική μνήμη (*semantic memory*, γνώσεις χωρίς να υπάρχει μνήμη σχετικά με το πως αποκτήθηκαν), για την αναγνωριστική μνήμη (*recognition memory*, μνήμη που σχετίζεται με την ανάκληση πληροφοριών και την εξοικίωση) και για την χωρική μνήμη (*spatial memory*) και την πλοήγηση στο χώρο. Επιπλέον, φαίνεται να συνδράμει σημαντικά στην ανάκληση εικόνων ενός γεγονότος ή ακόμη και την αναπαραγωγή κάποιων «σκηνών» αυτού. Παράλληλα, συμβάλλει στη φαντασίωση/οραματισμό μελλοντικών γεγονότων και, έτσι, στη δημιουργικότητα καθώς και στη λήψη αποφάσεων, στη δημιουργία διαπροσωπικών σχέσεων και την προσαρμογή της κοινωνικής συμπεριφοράς. Τέλος, φαίνεται να αποθηκεύει προσωρινά πληροφορίες και μετατρέπει την βραχυπρόθεσμη μνήμη σε μακροπρόθεσμη μέχρι αυτή να μεταφερθεί σε ειδικές περιοχές του φλοιού για τη μόνιμη αποθήκευση της [91].

1.4.5. Επιπτώσεις της ΡΑΕ στον ιπποκάμπειο σχηματισμό

Είναι ευρέως γνωστό πως ο ιππόκαμπος του ανθρώπου και του επίμου συνιστά μια περιοχή του εγκεφάλου που είναι ιδιαίτερα ευάλωτη στις επιδράσεις της αιθανόλης κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Πειραματικές μελέτες διαφορετικών μοντέλων έκθεσης στην αιθανόλη καταλήγουν, ως επί το πλείστον, στο συμπέρασμα πως, όσον αφορά στον επίμου, η έκθεση στην αιθανόλη κατά τη διάρκεια της κύησης ή κατά τη μεταγεννητική περίοδο -ισοδύναμη του τρίτου τριμήνου κύησης στον άνθρωπο- συμβάλλει στη μείωση του πληθυσμού των νευρώνων που εντοπίζονται σε όλες τις περιοχές του ιππόκαμπου. Ειδικότερα, παρατηρείται σημαντική απώλεια πυραμιδικών και κοκκωδών κυττάρων στα CA1, CA3 πεδία και στην οδοντωτή έλικα, αντίστοιχα, η οποία είναι μόνιμη [92]. Οι συγκεκριμένες απώλειες νευρικών κυττάρων, σε μοντέλα οξείας χορήγησης αιθανόλης μέσω ακούσιας ενδογαστρικής χορήγησής της, φαίνεται να οφείλονται σε μεγαλύτερο βαθμό στη μεταγεννητική έκθεση των επίμυων στην αιθανόλη καθώς, όταν οι ερευνητές πραγματοποιούσαν τη χορήγηση της αιθανόλης αποκλειστικά κατά την προγεννητική περίοδο, δεν παρατηρούσαν σημαντικές διαφορές στον αριθμό των κυττάρων των περιοχών του ιππόκαμπου [93].

Παράλληλα, η νευρογένεση στην οδοντωτή έλικα του ιππόκαμπου η οποία εξακολουθεί να υφίσταται κατά την ενήλικη ζωή, επηρεάζεται από την έκθεση στην αιθανόλη κατά την προγεννητική και τη μεταγεννητική περίοδο. Ειδικότερα, έχει παρατηρηθεί πως ο πολλαπλασιασμός των νευρικών κυττάρων μειώνεται κάνοντας χρήση του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού βρωμοδεοξουριδίνη (*bromodeoxyuridine, BrdU*) [94].

Συνολικά, οι επιπτώσεις της έκθεσης στην αιθανόλη στον ιππόκαμπο αντικατοπτρίζονται από προβλήματα στη μνήμη και τη μάθηση σε ανθρώπους και επίμυες [22] ενώ, παράλληλα, συμβάλλουν στην εμφάνιση επιληπικών κρίσεων στα FAS παιδιά καθώς, όπως προαναφέρθηκε, ο ιππόκαμπος συνιστά μία εγκεφαλική περιοχή που σχετίζεται με τη γένεση ή/και την εξάπλωση της επιληπτικής δραστηριότητας στον εγκέφαλο [1].

1.5. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η διερεύνηση μακροχρόνιων αλλαγών στον ιππόκαμπο Sprague-Dawley επίμυων κατά την επιληπτογένεση με τον GABA_A ανταγωνιστή πεντυλενοτετραζόλη (*pentylene-tetrazol*, PTZ) επί εδάφους προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη (*Prenatal Alcohol Exposure*, PAE). Ειδικότερα, τέθηκαν υπό μελέτη πιθανές αλλαγές που επιφέρει τόσο η PAE και η πρόκληση ενός επεισοδίου status epilepticus κατά τον απογαλακτισμό όσο και ο συνδυασμός των δύο προσβολών στον αριθμό του συνόλου των κυττάρων αλλά και μεμονωμένα στον αριθμό των νευρικών κυττάρων και των αστροκυττάρων στις στιβάδες των CA1, CA3 πεδίων και της οδοντωτής έλικας ενώ, παράλληλα, διερευνήθηκαν πιθανές φλεγμονώδεις αποκρίσεις των αστροκυττάρων και των κυττάρων της μικρογλοίας. Για το λόγο αυτό, διενεργήθηκε χρώση των πυρήνων των κυττάρων με την 4',6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλη (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) σε συνδυασμό με ανοσοϊστοχημικές χρώσεις με αντισώματα έναντι του νευρικού πυρηνικού αντιγόνου (*Neuronal Nuclei antigen*, NeuN) το οποίο σημαίνει ώριμους νευρώνες και της όξινης πρωτεΐνης των ενδιάμεσων ινιδίων της γλοίας (*Glial Fibrillary Acidic Protein*, GFAP) η οποία εκφράζεται στα αστροκύτταρα. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κηλίδας (*Dot Blot Assay*) στον ιππόκαμπο των διάφορων ομάδων επίμυων προκειμένου να ποσοτικοποιηθεί η έκφραση τόσο της GFAP όσο και της πρωτεΐνης προσαρμογής 1 που δεσμεύει ελεύθερο Ca²⁺ (*ionized calcium-binding adaptor molecule 1*, *Iba1*) και εκφράζεται στα κύτταρα της μικρογλοίας.

2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1. Πειραματόζωα

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

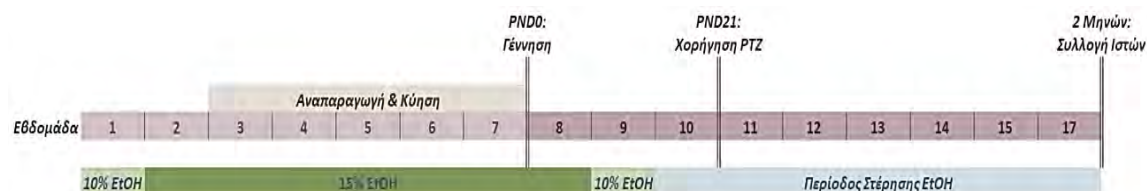
2.2. Πρωτόκολλο έκθεσης στην αιθανόλη

Στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, νεαροί, άτοκοι ενήλικες θηλυκοί Sprague-Dawley επίμυες έλαβαν διάλυμα αιθανόλης για δύο εβδομάδες ως την μοναδική πηγή νερού. Ειδικότερα, κατά την πρώτη εβδομάδα παρέχονταν σε αυτούς ως μοναδική πηγή νερού διάλυμα αιθανόλης (EtOH) 10% v/v, ενώ κατά τη δεύτερη εβδομάδα παρέχονταν ως μοναδική πηγή νερού διάλυμα αιθανόλης 15% v/v. Η έκθεση σε διάλυμα αιθανόλης 15% v/v συνεχίστηκε καθ' όλη τη διάρκεια της αναπαραγωγής και της κύησης. Παρελθοντικά πειράματα του προαναφερθέντος εργαστηρίου έχουν αποδείξει πως η χορηγούμενη συγκέντρωση 15% v/v αιθανόλης επαρκεί ώστε να προκύψουν ΡΑΕ απόγονοι, δίχως να υφίσταται κίνδυνος υψηλού ποσοστού θνησιμότητας και αδυναμίας σύλληψης, κάτι που παρατηρείται όταν στα ζώα χορηγείται διάλυμα μεγαλύτερης περιεκτικότητας σε αιθανόλη.

Κατά τη διάρκεια των πρώτων ημερών μετά τη γέννηση (η ημέρα γέννησης σημειώνεται ως PND0- *Postnatal Day 0*), συνεχίστηκε η χορήγηση διαλύματος αιθανόλης συγκέντρωσης 15% v/v για χρονικό διάστημα μίας εβδομάδας (PND 0-7). Τη δεύτερη εβδομάδα η συγκέντρωση αιθανόλης μειώθηκε στο 10% v/v, ενώ η χορήγηση διαλύματος αιθανόλης σταμάτησε στην αρχή της τρίτης εβδομάδας μετά τη γέννηση.

Την 21η ημέρα μετά τη γέννηση (PND21), σε νεαρούς θηλυκούς και αρσενικούς επίμυες χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά (*intraperitoneal, i.p.*) διάλυμα του GABA_A ανταγωνιστή πεντυλενοτετραζόλης (*pentylenetetrazol, PTZ, Sigma Chemical Co*),

διαλυμένου σε φυσιολογικό ορό (0,9% w/v NaCl, *Sigma-Aldrich*), με σκοπό την πρόκληση των επιληπτικών κρίσεων, καθώς οι ΡΑΕ επίμυες δεν εμφανίζουν αυθόρμητες επιληπτικές κρίσεις όπως συμβαίνει στην περίπτωση του ανθρώπου (Εικόνα 22). Η πρώτη χορηγούμενη δόση της PTZ ήταν 50mg/kg. Μετά την έγχυση του φαρμάκου, ακολουθούσε διάστημα παρατήρησης 30min και στην περίπτωση που το ζώο δεν εμφάνιζε συμπεριφορικά χαρακτηριστικά που αντιστοιχούσαν σε κρίση σταδίου > 5 της νέας κλίμακας που κατασκευάστηκε ειδικά για τις απαιτήσεις του συγκεκριμένου πειράματος από την κα Ψαρροπούλου Αικατερίνη, χορηγούνταν επιπροσθέτως 20mg/kg PTZ (συνολική δόση 70 mg/kg). Τα πειραματόζωα στα οποία χορηγούνταν επιπλέον δόση PTZ, παρατηρούνταν για διάστημα 30min και στην περίπτωση που κάποια από αυτά δεν εμφάνιζαν συμπεριφορικά χαρακτηριστικά που αντιστοιχούσαν σε κρίση σταδίου > 5 χορηγούνταν τρίτη δόση 10 mg/kg (τελική συνολική δόση 80 mg/kg). Μετά τη χορήγηση της τελευταίας δόσης, ακολουθούσε παρατήρηση της συμπεριφοράς για χρονικό διάστημα 3h.



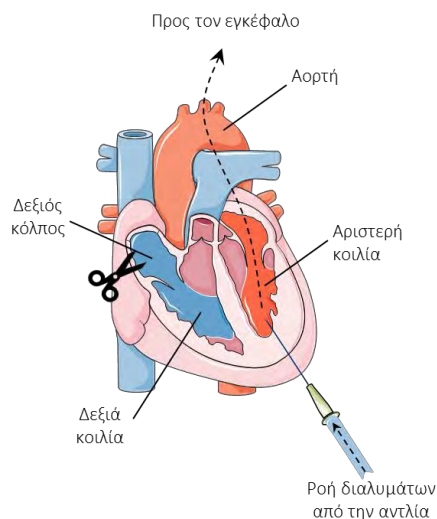
Εικόνα 22: Χρονοδιάγραμμα της προγεννητικής και μεταγεννητικής έκθεσης των επίμυων στα διαλύματα διαφορετικής συγκέντρωσης EtOH.

2.3. Ενδοκαρδιακή μονιμοποίηση επίμυος (transcardial perfusion)

Για να επιτευχθεί με ευκολία ο χειρισμός του πειραματόζωου, τοποθετείται σε γυάλινο δοχείο στο οποίο περιέχεται εμποτισμένο με αιθέρα βαμβάκι προκειμένου να του προκαλέσει ζάλη/αναισθησία. Για να αποφευχθεί η πρόκληση πόνου στο ζώο χορηγούνται σε αυτό δύο αναισθητικές ενέσεις. Αρχικά, χορηγούνται 200 μl κεταμίνης (ketamine 100mg/ml, *Imalgene 1000*) ενδομυϊκά και έπειτα 2 mL προποφόλης (propofol 20mg/ml, *Propofol* - [®]*Lipuro, B. Braun Melsungen AG, Germany*) ενδοπεριτοναϊκά. Η επιτυχής αναισθησία του ζώου ελέγχεται με την απόσυρση του πέλματος ως απάντηση σε πίεση αυτού. Το πειραματόζωο ζυγίζεται και μεταφέρεται στον απαγωγό σε ύπτια θέση. Πραγματοποιείται τομή στο ύψος του διαφράγματος ενώ ακολουθούν τομές που βοηθούν στην έκθεση της καρδιάς. Στην αριστερή κοιλία της καρδιάς τοποθετείται μία βελόνα 19 Gauge, η οποία συνδέεται μέσω σωληνάριου με την περισταλτική αντλία, και γίνεται μία μικρή τομή στο δεξιό κόλπο που χρησιμεύει ως δίοδος απομάκρυνσης του αίματος (Εικόνα 23) [95].

Με τη βοήθεια περισταλτικής αντλίας Gilson MINIPULS 3, με ταχύτητα 48 στροφές ανά λεπτό, χορηγείται, αρχικά, διάλυμα φυσιολογικού ορού (0,9% NaCl, *Sigma-Aldrich*) για 15min με σκοπό την απομάκρυνση του αίματος από τα όργανα του ζώου και εν προκειμένω από τον εγκέφαλο. Ακολουθεί η χορήγηση κρύου διαλύματος 4% παραφορμαλδεΰδης [*Paraformaldehyde* – PFA (*Sigma – Aldrich*), **μονιμοποιητικό**

ιστών] σε διάλυμα φωσφορικών (*Phosphate Buffer, PB*) με σύσταση 0,2M Na_2PO_4 και K_2PO_4 για χρονικό διάστημα 20min.



Εικόνα 23: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας διαπότισης (*Προσαρμοσμένη από Belhadjhamida και συν., 2020 [95]*).

Αφότου η διαπότιση (*perfusion*) ολοκληρώνεται, το πειραματόζωο τοποθετείται σε πρηνή θέση και ακολουθεί κраниοτομή με οδηγό σημείο το λάμδα του κρανίου για την απελευθέρωση του εγκεφάλου. Ειδικότερα, η διαδικασία ξεκινά με την απομάκρυνση του δέρματος και των μυών που καλύπτουν το οστέινο τμήμα. Ακολουθεί η αφαίρεση του οστέινου τμήματος με τη βοήθεια ενός οστεοκόπτη και εν συνεχεία της μήνιγγας. Καταληκτικά, ο εγκέφαλος αφαιρείται με ιδιαίτερη προσοχή με τη βοήθεια σπάτουλας [96].

Ο εγκέφαλος στη συνέχεια τοποθετείται για 1h στους 4°C σε falcon που περιέχει το προαναφερθέν διάλυμα 4% PFA και έπειτα μεταφέρεται σε υπέρτονο διάλυμα σουκρόζης (*MP Biomedicals, LCC*) 30% w/v προκειμένου να επιτευχθεί η κρυοπροστασία του και αποθηκεύεται στους 4°C για 24 έως 48 ώρες. Αφότου ο εγκέφαλος έχει καταβυθιστεί, ακολουθεί η ταχεία ψύξη του μέσω εμβύθισής του σε διάλυμα ισοπεντανίου θερμοκρασίας -45°C για 1min. Τέλος, η διατήρηση των ιστών πραγματοποιείται στους -80°C.

Οι ιστοί κόβονται σε κρυστόμο τύπου Leica CM1850 σε τομές πάχους 10 μm και σε θερμοκρασία -20°C, αφού πρώτα προσανατολίζονται κατάλληλα σε στερεοποιητικό κρυοστάτη (*Compound embedding medium for criostate, Killik, Bio-Optica*). Οι τομές προσκολλώνται διαδοχικά σε ζελατινοποιημένες αντικειμενοφόρες πλάκες και αποθηκεύονται στους -20°C.

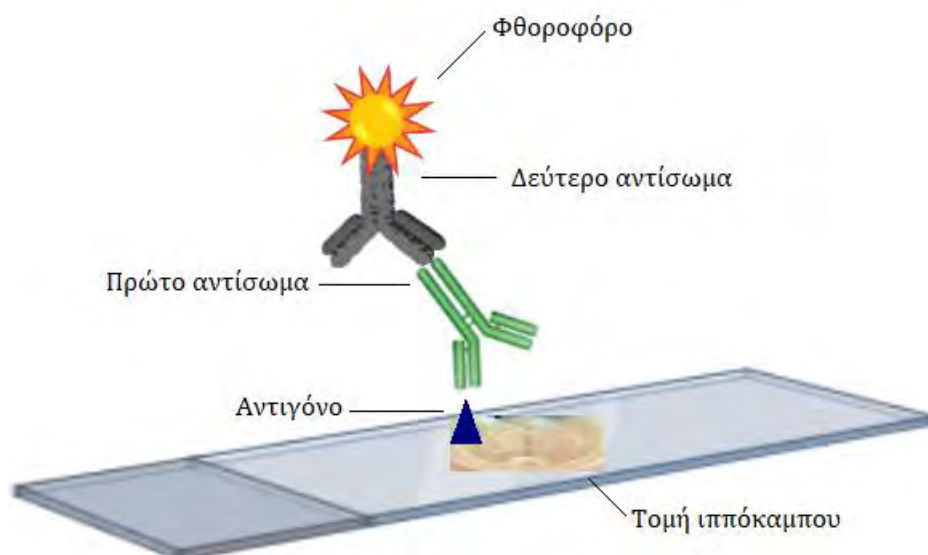
2.4. Ζελατινοποίηση αντικειμενοφόρων πλακών

Η ζελατινοποίηση των αντικειμενοφόρων πλακών πραγματοποιείται με την εμβύθιση τους σε φιλτραρισμένο διάλυμα 0,5% w/v ζελατίνης (300 bloom, *Sigma-Aldrich*) και 0,05% w/v δωδεκαϋδρικού θειϊκού χρωμιούχου καλίου $[\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot$

12H₂O, *Sigma-Aldrich*) θερμοκρασίας 45°C και αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 48 ώρες πριν τη χρήση τους.

2.5. Ανοσοφθορισμός

Ο ανοσοφθορισμός, όπως και οι υπόλοιποι μέθοδοι ανοσοανίχνευσης, στοχεύει στον εντοπισμό συγκεκριμένων αντιγόνων σε τομές ιστών και κυττάρων μέσω της χρήσης ειδικών αντισωμάτων τα οποία αναγνωρίζουν εκλεκτικά το εκάστοτε αντιγόνο. Το αντίσωμα προσδένεται με εξειδίκευση σε μία περιοχή του αντιγόνου, τον επίτοπο, και η αλληλεπίδραση αυτή μπορεί να ανιχνευθεί είτε άμεσα, όταν το αντίσωμα έχει συζευχθεί κατάλληλα με μία ετικέτα, παραδείγματος χάριν με ένα φθοροφόρο ή κάποιο ένζυμο, είτε έμμεσα όταν το φθοροφόρο είναι συζευγμένο με το δεύτερο αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει και αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο του πρώτου αντισώματος με το αντιγόνο-στόχο (Εικόνα 24) [97]. Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός παρέχει υψηλή ευαισθησία και ενίσχυση του σήματος, καθώς πολυκλωνικά δεύτερα αντισώματα είναι ικανά να αναγνωρίζουν πολλαπλούς επίτοπους του πρώτου αντισώματος [97].



Εικόνα 24: Σχηματική απεικόνιση του έμμεσου ανοσοφθορισμού (Συγγραφέας: Δήμητρα Τζίνη).

Τομές εγκεφάλου 10μm που βρίσκονται στο επίπεδο του ιππόκαμπου ($n=4$ ζώα ανά συνθήκη) εμποτίζονται με ρυθμιστικό διάλυμα PBS [*Phosphate Buffer Saline* (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,8mM KH₂PO₄)] συγκέντρωσης 0,1 M (pH=7,4) δύο φορές για 10min. Ακολουθεί επώαση με διάλυμα 0,1M TBS που περιέχει 3,3% φυσιολογικό ορό γαϊδουριού (NDS, *Normal Donkey Serum*) για 30min. Ο φυσιολογικός ορός προέρχεται από το ζώο-ξενιστή του δεύτερου αντισώματος και η προσθήκη του αποσκοπεί στην αποφυγή λήψης ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων εξαιτίας της μη ειδικής δέσμησης του δεύτερου αντισώματος. Εν συνεχεία, πραγματοποιούνται τρεις διαδοχικές πλύσεις των 5min με διάλυμα 0,1 M PBS και έπειτα, οι τομές αφήνονται για 16-18 ώρες (*overnight*) σε θερμοκρασία δωματίου με

το διάλυμα του πρώτου αντισώματος. Το πρώτο αντίσωμα περιέχεται σε διάλυμα 0,1M PBS με 3% NDS και 0,5% Triton X-100 (*Sigma-Aldrich*). Η προσθήκη του Triton X-100 αποσκοπεί στη δημιουργία πόρων στις μεμβράνες των κυττάρων για τη διέλευση των αντισωμάτων και την αναγνώριση των αντιγόνων-στόχων.

Πίνακας 2: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν.

ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
Μονοκλωνικό αντίσωμα ανεπτυγμένο σε ποντίκι ενάντια στην πρωτεΐνη GFAP (<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>) – MAB360 anti-GFAP, <i>Sigma-Aldrich</i>	1:250
Μονοκλωνικό αντίσωμα ανεπτυγμένο σε κουνέλι ενάντια στην πρωτεΐνη NeuN (<i>Neuronal nuclear protein</i>) –MABN140 anti-NeuN, <i>Sigma-Aldrich</i>	1:400
Πολυκλωνικό αντίσωμα ανεπτυγμένο σε γαϊδούρι έναντι των IgG (H+L) ανοσοσφαιρινών ποντικού συζευγμένο με κόκκινη φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 594, CAT#20115, <i>Biotium</i>	1:500
Πολυκλωνικό αντίσωμα ανεπτυγμένο σε γαϊδούρι έναντι των IgG (H+L) ανοσοσφαιρινών κουνελιού συζευγμένο με πράσινη φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 488A, CAT#20015, <i>Biotium</i>	1:500

Η δεύτερη ημέρα διεξαγωγής της μεθόδου ξεκινά με τρεις διαδοχικές πλύσεις των 5 min με 0,1 M PBS. Έπειτα, οι ιστοί επωάζονται για 1,5h με το δεύτερο αντίσωμα που φέρει τη φθορίζουσα χρωστική υπό χαμηλό φωτισμό και σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν τρεις πλύσεις χρονικής διάρκειας 5min με 0,1 M PBS προτού οι τομές καλυφθούν με υλικό κάλυψης που περιέχει 5mL 40mM PB (pH=8,5), 0,01gr υδροχλωρίδιο της π-φαινυλδιαμίνης (*p-Phenylenediamine hydrochloride*), 1μl χρωστικής 4',6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλης (*4',6-diamidino-2-phenylindole*, DAPI) και 5mL γλυκερόλης (*Pancreas Quimica SA*). Η χρωστική DAPI χρησιμοποιείται καθώς σημαίνει τους πυρήνες κυττάρων αφού αναγνωρίζει το δινουκλεοτίδιο Αδενίνη - Θυμίνη (AT) του δίκλωνου DNA. Μετά την κάλυψη τους, οι τομές που βρίσκονται στο επίπεδο του ιππόκαμπου, φωτογραφίζονται σε μικροσκόπιο φθορισμού Leica DM2000 (*Leica Microsystems*) το οποίο συνδέεται με κάμερα Leica DFC420C (*Leica Cameras, Solms, Germany*) και οι ληφθείσες εικόνες επεξεργάζονται με τη χρήση του προγράμματος ImageJ.

2.6. Ομογενοποίηση ιστών και εκχύλιση κυτταρικών πρωτεϊνών

Από $n=4-6$ ανά συνθήκη θηλυκούς και αρσενικούς επίμυες απομονώνεται ο ιππόκαμπος (δεξί και αριστερό ημισφαίριο). Η διαδικασία εκκινεί με την τοποθέτηση των πειραματόζων σε γυάλινο δοχείο, εντός του οποίου εισάγεται εμποτισμένο με αιθέρα βαμβάκι, το οποίο προκαλεί ζάλη/αναισθησία στο ζώο, προκειμένου να διευκολυνθεί ο χειρισμός του. Αφού το πειραματόζωο αναισθητοποιείται, το κεφάλι

του αποκόπτεται με τη βοήθεια λαιμητόμου. Οι διαδικασίες απομόνωσης των του ιππόκαμπου και άλλων εγκεφαλικών περιοχών διενεργούνται σε πάγο και τα βήματα που ακολουθούνται για την εξαγωγή του εγκεφάλου είναι όμοια με τα παραπάνω.

Οι ιστοί τοποθετούνται σε erpendorf με 500μl διαλύματος λύσης κυττάρων (*lysis buffer*) [20mM Tris-Cl pH=8, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 100μg/ml PMSF, 1mM DTT, 1mM Na₃VO₄, 10mM β-glycerolphosphate] και ομογενοποιούνται με τη βοήθεια μηχανικού ομογενοποιητή Reidolph Silent Crusher S. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 10.000g στροφές σε φυγόκεντρο Heraeus Biofuge Fresco για 10min στους 4°C. Το υπερκείμενο που προκύπτει χρησιμοποιείται για μέτρηση της ολικής πρωτεΐνης στο κάθε δείγμα και έπειτα στη διαδικασία ανοσοαποτύπωσης κηλίδας.

2.7. Ανίχνευση ολικής πρωτεΐνης δείγματος

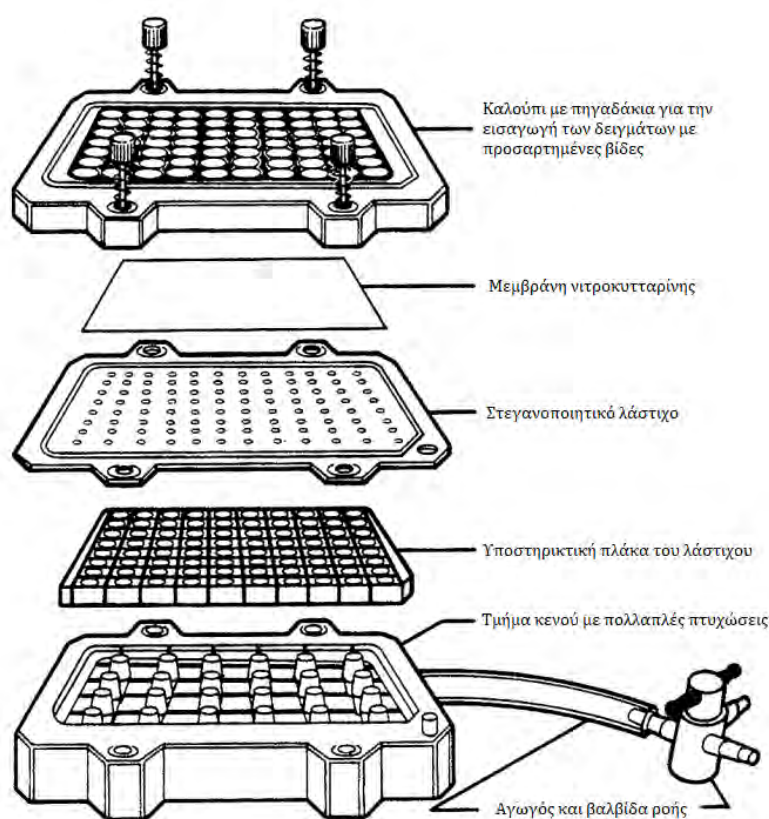
Η συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης ενός δείγματος υπολογίζεται χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Bradford. Η μέθοδος Bradford βασίζεται στην αντίδραση της κοκκινωπής/καφέ χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G250 (CBB) με πλευρικές αλυσίδες αμινοξικών καταλοίπων των πρωτεϊνών του δείγματος η οποία οδηγεί σε αλλαγή του χρώματος της χρωστικής. Ειδικότερα, υπό όξινες συνθήκες, η αλλαγή του χρώματος της χρωστικής σε μπλε είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασής της με τις πλευρικές αλυσίδες του αμινοξέος Αργινίνη (*Arginine, Arg, R*) και σε μικρότερο βαθμό με τις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων Λυσίνη (*Lysine, Lys, K*), Ιστιδίνη (*Histidine, His, H*), Τυροσίνη (*Tyrosine, Tyr, Y*) Τρυπτοφάνη (*Tryptophan, Trp, W*) και Φαινυλαλανίνη (*Phenylalanine, Phe, F*). Επιπλέον, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις λαμβάνουν χώρα. Οι αλληλεπιδράσεις χρωστικής – αμινοξικών καταλοίπων μεταβάλλουν το μέγιστο απορρόφησης της χρωστικής από τα 465nm στα 595nm ενώ το εύρος απορρόφησης κυμαίνεται από τα 575nm έως τα 615nm. Με τη μέθοδο Bradford μπορούν να ανιχνευτούν από 0,2 έως 20μg πρωτεΐνης ενός δείγματος [98].

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία η χρωστική εμπεριέχονταν σε διάλυμα φωσφορικού οξέος και μεθανόλης (*BioRad*) και χρησιμοποιήθηκαν 5μl από το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης του ομογενοποιημένου τα οποία αναμείχθηκαν με 795μl απιονισμένο νερό και 200μl από το διάλυμα της χρωστικής και η απορρόφηση του σχηματιζόμενου συμπλόκου μετρήθηκε σε φωτόμετρο στα 630nm. Οι τιμές απορρόφησης μετατράπηκαν σε συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης του δείγματος με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης αναφοράς με βόεια αλβουμίνη ορού (*Bovine Serum Albumin, BSA*). Η ολική πρωτεΐνη του κάθε δείγματος χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της ποσότητας του υπερκείμενου που χρειάζονταν για τη διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης κηλίδας προκειμένου όλα τα δείγματα να έχουν ίση μεταξύ τους και επαρκή για ανίχνευση ποσότητα πρωτεΐνης.

2.8. Ανοσοαποτύπωση κηλίδας (*Dot Blot Assay, DBA*)

Η ανοσοαποτύπωση κηλίδας αποτελεί μία τεχνική η οποία χαρακτηρίζεται από ευκολία χειρισμού, ταχεία ανάλυση, εκλεκτικότητα και χαμηλό κόστος, παράγοντες που μας ώθησαν στην επιλογή της αντί του κλασσικού Western Blot. Κατά τη συγκεκριμένη διαδικασία, ποσότητα του προς μελέτη δείγματος -στην περίπτωση μας του υπερκείμενου του πρωτεϊνικού λύματος που προέκυψε από την ομογενοποίηση- προσροφάται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σχηματίζοντας μία κηλίδα. Η μεμβράνη περιέχει πόρους οι οποίοι επιτρέπουν στα μόρια (πρωτεΐνες) να τη διαπερνούν και να «καθλώνονται» σε αυτή μέσω της δημιουργίας μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων (υδρόφοβες, ηλεκτροστατικές) [99]. Η διαδικασία ανίχνευσης των μορίων πραγματοποιείται με αντισώματα, όπως συμβαίνει και στο Western Blot. Να τονιστεί πως με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κηλίδας μπορεί να προσδιοριστεί η ποσότητα μιας πρωτεΐνης σε ένα δείγμα αλλά δεν μπορεί να εξαχθεί πληροφορία σχετικά με το μέγεθος αυτής.

Η πειραματική διαδικασία ξεκινά με τη διαπότιση της συσκευής με απιονισμένο νερό ενώ η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης κόβεται σε συγκεκριμένες διαστάσεις για να εφαρμόζει κατάλληλα στη συσκευή (εν προκειμένω 11,5*8 εκατοστά) και επωάζεται για 20-30min σε διάλυμα 0,1M TBS (pH=7,4). Αφότου ολοκληρωθεί η επώαση της μεμβράνης, η συσκευή συναρμολογείται τοποθετώντας τα τμήματα αυτής όπως απεικονίζονται στην Εικόνα 25.



Εικόνα 25: Σχηματική απεικόνιση της σωστής σειράς τοποθέτησης των τμημάτων της συσκευής (Προσαρμοσμένη από το εγχειρίδιο *Bio-Dot Microinfiltration Apparatus* της Bio-Rad).

Η βαλβίδα ροής ενώνεται με μία γυάλινη φιάλη παγίδευσης (*waste trap*) και κατ' επέκταση με την αντλία κενού. Η βαλβίδα ροής τοποθετείται στην ένδειξη που αντιστοιχεί στην έκθεση της μεμβράνης με το κενό προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια του διαλύματος 0,1M TBS και για να επιτευχθεί όσο το δυνατόν μεγαλύτερη στεγανοποίηση. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης εκτίθεται στον αέρα με την βαλβίδα να τοποθετείται στην αντίστοιχη ένδειξη, ενυδατώνεται δύο φορές με την προσθήκη 100μl διαλύματος 0,1M TBS και παρατηρείται η αποτελεσματικότητα της απομάκρυνσης του TBS μέσω της έκθεσης στο κενό προτού προστεθούν τα δείγματα [100]. Αφού απομακρυνθεί η ποσότητα του TBS, ακολουθεί η προσθήκη των δειγμάτων σε προκαθορισμένες θέσεις με το κάθε δείγμα να περιέχει 4μg συνολικής πρωτεΐνης ανά 50 μl. Η βαλβίδα ροής είναι τοποθετημένη στην ένδειξη που αντιστοιχεί στην έκθεση της μεμβράνης στον αέρα. Η μεμβράνη αφήνεται για χρονικό διάστημα 1-1,5h προκειμένου οι πρωτεΐνες να προσροφηθούν σε αυτή. Την καθήλωση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη ακολουθεί η απομάκρυνσή της από τη συσκευή και η τοποθέτησή της σε χρωστική roseau προκειμένου να βεβαιωθούμε ότι επετεύχθη η προσρόφηση. Η χρωστική απομακρύνεται με διαδοχικές πλύσεις της μεμβράνης με 0,1M TBS.

2.9. Ανοσοανίχνευση των υπό μελέτη πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες καθηλωμένες στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης δρουν ως αντιγόνα και μπορούν να αναγνωριστούν από ειδικά για αυτές αντισώματα. Η σύνδεση αντιγόνου – αντισώματος μπορεί να ανιχνευτεί είτε άμεσα με τη σύζευξη του πρώτου αντισώματος με ένζυμο όπως η υπεροξειδάση του ραπανιού (*Horseradish Peroxidase, HRP*) και η αλκαλική φωσφατάση (*Alkaline Phosphatase, AP*), είτε έμμεσα με την προσθήκη δεύτερου αντισώματος το οποίο αναγνωρίζει και συνδέεται με την ανοσοσφαιρίνη IgG του πρώτου και παράλληλα είναι συζευγμένο με κάποιο από τα προαναφερθέντα ένζυμα. Η εξωγενής προσθήκη του υποστρώματος του εκάστοτε ενζύμου συνεπάγεται την έκλυση φωταύγειας ή δίνει χαρακτηριστική αντίδραση χρώματος [99].

Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με τις καθηλωμένες πρωτεΐνες επωάζεται με διάλυμα blocking 5% BSA σε 0,1M TBS - 0,05% Tween20 (30min) και έπειτα με διάλυμα blocking 5% γάλακτος *Regilait* σε 0,1M TBS - 0,05% Tween20 (30min) σε θερμοκρασία δωματίου. Το blocking στοχεύει στον κορεσμό των θέσεων δέσμευσης των πρωτεϊνών της μεμβράνης από τη BSA και τις πρωτεΐνες του γάλακτος ώστε να αποφεύγεται οποιαδήποτε μη ειδική σύνδεση του αντισώματος που θα προστεθεί για την ανίχνευση της υπό μελέτη πρωτεΐνης. Το blocking ακολουθούν δύο διαδοχικές πλύσεις των 10min με διάλυμα 0,1M TBS - 0,05% Tween20 υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Η διαδικασία για την πρώτη μέρα διεξαγωγής του πειράματος ολοκληρώνεται με την προσθήκη του διαλύματος του πρώτου αντισώματος (*Antibody-I Solution, Ab-I solution*) το οποίο περιέχει 0,1% BSA σε 0,1M

TBS – 0,05% Tween20. Η μεμβράνη επωάζεται με το συγκεκριμένο διάλυμα για χρονικό διάστημα 16-18h (*overnight*) υπό ανάδευση στους 4°C.

Η δεύτερη ημέρα διεξαγωγής της πειραματικής διαδικασίας ξεκινά με τρεις διαδοχικές πλύσεις (5min έκαστη) της μεμβράνης με διάλυμα 0,1M TBS – 0,05% Tween20. Ακολουθεί η επώαση της μεμβράνης για 1h με το δεύτερο αντίσωμα το οποίο είναι συζευγμένο με την υπεροξειδάση του ραπανιού (*Horseradish Peroxidase, HRP*) και διαλυμένο σε 0,1M TBS – 0,05% Tween20. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται τρεις διαδοχικές πλύσεις της μεμβράνης υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου ως εξής: 1. με διάλυμα 0,1M TBS – 0,05% Tween20 (15min), 2. με διάλυμα 0,1M TBS – 0,05% Tween20 (5min) και 3. με διάλυμα 0,1M TBS (5min).

Πίνακας 3: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν.

ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
Μονοκλωνικό αντίσωμα ανεπτυγμένο σε ποντίκι ενάντια στην πρωτεΐνη <i>GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein)</i> – MAB360 anti-GFAP, <i>Sigma-Aldrich</i>	1:1000
Μονοκλωνικό αντίσωμα ανεπτυγμένο σε ποντίκι ενάντια στην πρωτεΐνη <i>Iba1 (Ionized calcium-binding adapter molecule 1)</i> – MABN923 anti-Iba1, <i>Sigma-Aldrich</i>	1:1000
Μονοκλωνικό αντίσωμα ανεπτυγμένο σε ποντίκι ενάντια στην πρωτεΐνη β-ακτίνη (<i>β-actin</i>) – sc-47778 anti-β-actin, <i>Santa Cruz Biotechnology</i>	1:3000
Δεύτερο αντίσωμα ανεπτυγμένο σε άλογο έναντι των IgG (H+L) ανοσοσφαιρινών ποντικού και συζευγμένο με την HRP (<i>secondary horse anti-mouse IgG, HRP-linked antibody</i>) – CAT#7076, <i>Cell Signaling</i>	1:2000

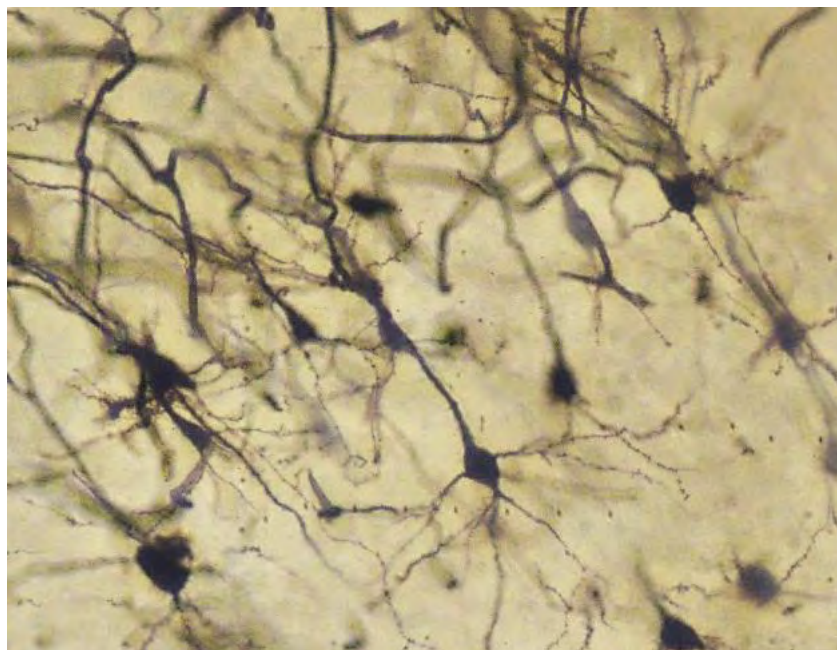
Η διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης των πρωτεϊνών ολοκληρώνεται με την ανίχνευση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη μέσω της αντίδρασης χημειοφωταύγειας από την υπεροξειδάση του ραπανιού (*Horseradish Peroxidase, HRP*). Ειδικότερα, η HRP καταλύει την οξείδωση ενός οργανικού υποστρώματος (εν προκειμένο του κουμαρικού) χρησιμοποιώντας το H_2O_2 ως οξειδωτικό μέσο και εκπέμπεται φως όταν αντιδρά με τη λουμινόλη [99]. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αντίδραση, η μεμβράνη επωάζεται με διάλυμα 10ml λουμινόλης, που περιέχει 10μl 3% H_2O_2 και 100μl κουμαρικού οξέος (6,8mM σε DMSO) για 5min σε θερμοκρασία δωματίου και στο σκοτάδι. Τέλος, ακολούθησε έκθεση της μεμβράνης σε μηχανήμα Unitec Cambridge. Οι φωτογραφίες που λαμβάνονται από την έκθεση της μεμβράνης αναλύονται στο πρόγραμμα ImageJ.

2.10. Μέθοδος χρώσης Golgi – Cox (Golgi-Cox Staining Method)

Η χρώση Golgi, η οποία αναφέρεται και ως «μελανή αντίδραση» (“black reaction”), ανακαλύφθηκε τυχαία από τον Ιταλό ιατρό Camillo Golgi (1843 –1926) το 1873. Η συγκεκριμένη μέθοδος επιτρέπει την οπτικοποίηση ολόκληρης της

αρχιτεκτονικής ενός νευρώνα, συμπεριλαμβανομένου του κυτταρικού σώματος, των αξόνων, των δενδριτών και των ακανθών [101] και βασίζεται στον εμποτισμό του εγκεφάλου με μέταλλα. Ειδικότερα, στοχεύει στη σύνδεση αλάτων χρωμίου με τις πρωτεΐνες του κυττάρου ώστε να σχηματιστεί ένα μελανό στρώμα (*black deposit*), έπειτα από προσθήκη αλκαλικών ουσιών, το οποίο εισχωρεί στο κυτταρόπλασμα και μπορεί να ανιχνευθεί στο μικροσκόπιο [102]. Ωστόσο, μόνο το ,προσεγγιστικά, 5% των νευρώνων της κάθε περιοχής του εγκεφάλου σημαίνεται με τη συγκεκριμένη χρώση για λόγους οι οποίοι δεν έχουν ακόμη αποσαφηνιστεί [103].

Από την ανακάλυψη της μεθόδου, διάφορες παραλλαγές έχουν ενσωματωθεί στο αρχικό πρωτόκολλο προκειμένου να επιτευχθεί μεγαλύτερη αξιοπιστία, ομοιόμορφος χρωματισμός και επιλεκτικότητα αποκλειστικά των νευρώνων και μείωση του χρόνου που απαιτείται για τη χρώση [102]. Η κλασσική μέθοδος Golgi μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε δύο σημαντικά βήματα εκ των οποίων το πρώτο είναι η εμφάνιση του ιστού σε διάλυμα χρωμιούχου καλίου (*Potassium Chromate, K_2CrO_4*) και διχρωμικού καλίου (*Potassium Dichromate, $K_2Cr_2O_7$*) ακολουθούμενο από εμφάνιση του ιστού σε διάλυμα νιτρικού αργύρου (*Silver Nitrate, $AgNO_3$*) για το σχηματισμό κρυστάλλων χρωμιούχου αργύρου. Μια παραλλαγή αυτού του σταδίου ήταν η ενσωμάτωση του χλωριδίου του υδραργύρου (*Mercury Chloride, $HgCl_2$* , μέταλλο) στο διάλυμα του διχρωμικού καλίου πριν από την επεξεργασία με αραιό διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου ή ανθρακικού άλατος για την ενίσχυση του προϊόντος της αντίδρασης. Άλλες παραλλαγές που εισήχθησαν στην τεχνική ήταν η χρήση θειώδους νατρίου και αραιωμένης αμμωνίας αντί του σταδίου του υδροξειδίου ή ανθρακικού νατρίου. Ωστόσο, ο Cox εισήγαγε μια σημαντική τροποποίηση στη μέθοδο του Golgi εμποτίζοντας τον ιστό με διάλυμα χλωριδίου του υδραργύρου και διχρωμικού καλίου αναμειγμένο με χρωμιούχο κάλιο, αλλαγή που βοήθησε στη βελτίωση του εμποτισμού μειώνοντας την οξύτητα του διαλύματος [102].



Εικόνα 26: Παραδείγματα χρώσης των πυραμιδικών νευρώνων υποκάμπου με τη μέθοδο Golgi-Cox (Πηγή: παρούσα διπλωματική εργασία).

Η συγκεκριμένη παραλλαγή της μεθόδου του Golgi, γνωστή και ως αντίδραση "Golgi-Cox" είναι η πλέον διαδεδομένη και, σε αντίθεση με την μέθοδο του Golgi όπου σχηματίζεται αποκλειστικά ένα στρώμα χρωμιούχου αργύρου, σε αυτή αρχικά σχηματίζεται ένα λευκού χρώματος στρώμα (*whitish deposit*) χλωριούχου υδραργύρου το οποίο όταν έλθει σε επαφή με μία αλκαλική ουσία όπως η αμμωνία, μετατρέπεται σε μελανό σουλφίδιο του υδραργύρου. Η αλλαγή στο χρώμα του στρώματος που εναποτίθεται στους νευρώνες συμβαίνει πιθανώς εξαιτίας του σχηματισμού οξειδίου του υδράργυρου [103]. Τέλος, συγκριτικά με τις υπόλοιπες παραλλαγές της μεθόδου του Golgi, η μέθοδος Golgi-Cox θεωρείται πως είναι η πιο αξιόπιστη για την οπτικοποίηση των δενδριτικών διακλαδώσεων με χαμηλό το ανεπιθύμητο σήμα του φόντου (Εικόνα 26) [104, 105].

Από $n=3$ ανά συνθήκη αρσενικούς επίμυες και $n=3$ αρσενικούς Wistar επίμυες εξάγεται ο εγκέφαλος και χρησιμοποιείται είτε το δεξί είτε το αριστερό ημισφαίριο. Επειδή η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόζονταν για πρώτη φορά στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, τα εγκεφαλικά ημισφαίρια των Wistar επίμυων παρελήφθησαν με σκοπό να δοκιμαστούν παραλλαγές της μεθόδου όσον αφορά στους χρόνους και στις τομές των ιστών. Παράλληλα, είναι σημαντικό να τονιστεί πως τα εγκεφαλικά ημισφαίρια των Wistar επίμυων παρελήφθησαν την ημέρα που θα ξεκινούσε η επώασή τους με το διάλυμα των μετάλλων, δίχως να προηγηθεί ψύξη τους για μεγάλο χρονικό διάστημα. Αντιθέτως, οι ιστοί των υπό μελέτη συνθηκών ήταν αποθηκευμένοι στους -80°C και ακολούθησε διαδοχική απόψυξή τους από τους -80°C στους -20°C , στους 4°C και, τέλος, σε θερμοκρασία δωματίου προτού επωαστούν στο διάλυμα των μετάλλων.

Η διαδικασία εκκινεί με την τοποθέτηση των πειραματόζων σε γυάλινο δοχείο, εντός του οποίου εισάγεται εμποτισμένο με αιθέρα βαμβάκι, το οποίο προκαλεί ζάλη/αναισθησία στο ζώο, προκειμένου να διευκολυνθεί ο χειρισμός του. Αφού το πειραματόζωο αναισθητοποιείται, το κεφάλι του αποκόπτεται με τη βοήθεια λαϊμητόμου. Οι διαδικασίες απομόνωσης των εγκεφαλικών ημισφαιρίων διενεργούνται σε πάγο και τα βήματα που ακολουθούνται για την εξαγωγή του εγκέφαλου είναι όμοια με τα παραπάνω. Τα εγκεφαλικά ημισφαίρια φυλάσσονται σε κατάλληλα erpendorfs στους -80°C έως τη χρήση.

Τα εγκεφαλικά ημισφαίρια τοποθετούνται σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες στους οποίους έχει εισαχθεί το διάλυμα εμποτισμού (*impregnation solution*) και το οποίο περιέχει σε αναλογία **5 : 5 : 4 : 10**, αντίστοιχα, τα εξής:

- διάλυμα 5% διχρωμικού καλίου [5 gr $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (MERCK) σε 100mL dH_2O]
- διάλυμα 5% χλωριδίου του υδράργυρου [5 gr HgCl_2 (Chemlab) σε 100mL dH_2O , 60°C]
- διάλυμα 5% χρωμιούχου καλίου [4 gr K_2CrO_4 (MERCK) σε 80mL dH_2O]

■ dH₂O

Να τονιστεί ότι το διάλυμα εμποτισμού, μετά την παρασκευή του, αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό μέρος για 48h πριν τη χρήση του [104]. Επιπρόσθετα, προτού προστεθεί στα falcon με τα εγκεφαλικά ημισφαίρια, φιλτράρεται προκειμένου να απομακρυνθούν τα κόκκινου χρώματος ιζήματα που δημιουργούνται [101]. Ακολουθεί η επώαση των ιστών για 15 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνθήκες σκότους καθώς το διάλυμα εμποτισμού είναι φωτοευαίσθητο.

Μετά το πέρας των 15 ημερών, το διάλυμα εμποτισμού απορρίπτεται και η περίσσεια του διαλύματος απομακρύνεται από το εγκεφαλικό ημισφαίριο με τη βοήθεια διηθητικού χαρτιού. Εν συνεχεία, οι ιστοί μεταφέρονται σε κρυοπροστατευτικό διάλυμα το οποίο είναι απαραίτητο για την προστασία των μετέπειτα τομών και τη διατήρηση της μορφολογίας του ιστού [101]. Το κρυοπροστατευτικό διάλυμα περιέχει 20% σουκρόζη (*MP Biomedicals, LCC*) και 15% γλυκερόλη (*Pancreac Quimica SA*) σε 0,1M διάλυμα φωσφορικών PB [1,59gr NaH₂PO₄ · H₂O (*Sigma-Aldrich*), 5,47gr Na₂HPO₄ (*Sigma-Aldrich*), 4,5gr NaCl (*MERCK*) διαλυμένα σε dH₂O έως V_F=500mL].

Οι ιστοί αφήνονται να καταβυθιστούν στο κρυοπροστατευτικό διάλυμα και έπειτα κόβονται σε τομές πάχους 60μm (Levine, N., και συν., 2013) σε κρυοτόμο τύπου Leica CM1850 και σε θερμοκρασία από -20°C έως -25°C, αφού πρώτα προσανατολίζονται κατάλληλα σε μικρή ποσότητα στερεοποιητικού κρυοστάτη (*Compound embedding medium for criostate, Killik, Bio-Optica*). Οι τομές προσκολλώνται με τη βοήθεια ενός λεπτού πινέλου διαδοχικά σε ζελατινοποιημένες αντικειμενοφόρες πλάκες στις οποίες έχουμε προσθέσει με πιπέτα ποσότητα του διαλύματος κρυοπροστασίας που βοηθάει τις τομές να «απλώσουν». Ακολούθως, αφήνονται να «στεγνώσουν» για τουλάχιστον 24h σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό μέρος.

Την επόμενη ημέρα οι τομές ενυδατώνονται και εμβυθίζονται σε διαλύματα χρώσης (*staining solutions*). Ειδικότερα, πραγματοποιούνται δύο πλύσεις των 5min με dH₂O και επώαση για 10min με το πρώτο διάλυμα χρώσης 20% αμμωνίας [25-28% NH₃ (*MERCK*) αραιωμένη με dH₂O]. Ακολούθως, οι τομές ξεπλένονται με δύο διαδοχικές πλύσεις των 5min με dH₂O και, εν συνεχεία, επώάζονται για 10min με το δεύτερο διάλυμα χρώσης 1% ένυδρου θειοθειικού νατρίου (0,785gr Na₂S₂O₃ · 5H₂O (*MERCK*) σε 50mL dH₂O). Έπειτα, ξεπλένονται με δύο διαδοχικές πλύσεις των 5min με dH₂O.

Η διαδικασία συνεχίζεται με την εμβύθιση των αντικειμενοφόρων πλακών σε διαλύματα αιθανόλης (EtOH, *Fluka*) αυξανόμενης συγκέντρωσης και σε ξυλένιο [50% (5min) → 75% (5min) → 95% (5min) → 100% (2 x 5min) → xylene (*Pancreac Quimica SA*) (2 x 5min)] προκειμένου οι ιστοί να αφυδατωθούν και να μονιμοποιηθούν. Τέλος, καλύπτονται με καστορέλαιο ως ιστολογικό υλικό κάλυψης. Το καστορέλαιο επιλέχθηκε καθώς είναι ένα άχρωμο, κολλώδες έλαιο με εξαιρετική ικανότητα διατήρησης των ιστών. Έχει διαθλαστικό δείκτη ίσο με 1,477–1,481 που προσεγγίζει

αυτόν του γυαλιού και έτσι προσφέρει υψηλής καθαρότητας εικόνες με αποτέλεσμα να μπορεί να χρησιμοποιηθεί αντί του ιστολογικού υλικού κάλυψης DPX [106,107].

Η οπτική απεικόνιση των τομών στο επίπεδο του ιππόκαμπου έγινε με τη χρήση κλινικού οπτικού μικροσκοπίου Nikon eclipse 50i (*Nikon Corporation, Tokyo, Japan*) το οποίο συνδέεται με κάμερα Basler acA1920-40uc (*Basler AG, Ahrensburg, Germany*) σε μεγέθυνση 4x, 20x και 40x. Η λήψη των εικόνων πραγματοποιήθηκε μέσω του προγράμματος MICROVISIONEER και οι ληφθείσες εικόνες επεξεργάζονται με τη χρήση του προγράμματος *ImageJ*.

2.11. Ανάλυση εικόνας και στατιστική ανάλυση δεδομένων

Οι ψηφιακές εικόνες αποτελούνται από εικονοστοιχεία (*pixel*) τα οποία αποτελούν τα μικρότερα στοιχεία της εικόνας εκ των οποίων εξάγονται πληροφορίες που αφορούν τη θέση και τη φωτεινότητα του κάθε εικονοστοιχείου. Κατά συνέπεια, οι πληροφορίες που μπορούμε να εξάγουμε για μια περιοχή της εικόνας που μας ενδιαφέρει αφορούν τον αριθμό και τη μέση φωτεινότητα των εικονοστοιχείων στην περιοχή αυτή.

2.11.1. Αριθμός κυττάρων στις στιβάδες των CA1, CA3 και DG περιοχών του ιππόκαμπου

Σε κάθε φωτογραφία ορίζεται και προστίθεται η κλίμακα από το μικροσκόπιο και το φακό με τα οποία έχουν ληφθεί οι προς ανάλυση φωτογραφίες. Η κλίμακα φωτογραφίζεται και ανοίγεται στο *ImageJ* όπου με το εργαλείο ευθείας γραμμής (*Straight*) μετράται μία ορισμένη απόσταση πάνω σε αυτή. Το αποτέλεσμα της μέτρησης εισάγεται αυτόματα στο παράθυρο Ορισμού Κλίμακας (*Set Scale*) πατώντας *Analyze>Set Scale*. Στο ίδιο παράθυρο συμπληρώνονται και τα στοιχεία της απόστασης που μετρήθηκε (*Known distance*) (π.χ. φωτογραφήθηκε κλίμακα 0,01 mm ή 1000 μm άρα στην απόσταση που μετρήθηκε βάζουμε 1000) και η μονάδα μέτρησης μήκους (*Unit of length*) (π.χ. μm) και επιλέγεται το *Global*.

Αφότου έχει οριστεί η κλίμακα, επιλέγεται και διατηρείται σταθερή μία περιοχή για την εκάστοτε στιβάδα και περιοχή του ιππόκαμπου στην οποία θα μετράται κάθε φορά ο αριθμός των κυττάρων. Η μέτρηση των κυττάρων τα οποία είναι σημασμένα με την χρωστική DAPI πραγματοποιείται ως εξής:

1. αφαίρεση του ανεπιθύμητου σήματος – θορύβου της εικόνας μετρώντας το αρχικά με *Ctrl + h*, επιλέγοντας την τιμή *Mean* και πατώντας *Process>Math>Subtract background* όπου εισάγουμε την τιμή *Mean*
2. επιλογή της επιθυμητής περιοχής με το εργαλείο περιστρεφόμενου πλαισίου (*Rotated Rectangle*), προσθήκη της στον *ROI Manager* πατώντας *Ctrl + t* και μέτρηση της έκτασης που καταλαμβάνει πατώντας *Ctrl + m*. Στο παράθυρο που εμφανίζεται μας ενδιαφέρει η τιμή της *Area*.

3. μέτρηση του αριθμού των κυττάρων πατώντας *Process>Find Maxima>Preview Point Selection*. Η τιμή του *Prominence* μπορεί να αλλάξει εάν παρατηρηθεί ότι στην περιοχή κάποια κύτταρα δεν προμετρώνται (μείωση του *Prominence*) ή προσμετρώνται στοιχεία τα οποία δεν είναι κύτταρα (αύξηση του *Prominence*).

Σε υπολογιστικά φύλλα διαιρείται ο αριθμός των κυττάρων ανά την περιοχή που μετρήθηκε και η τιμή που προκύπτει κάθε φορά εισάγεται στο πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης GraphPad Prism (έκδοση 9.0.0.121). Στο πρόγραμμα, οι τιμές ομαδοποιούνται σε στήλες όσες και οι συνθήκες που εξετάζονται (CTR – CTR στήλη, PAE – CTR στήλη, CTR – PTZ στήλη και PAE – PTZ στήλη) και πραγματοποιείται One - way ANOVA και Turkey's Multiple Comparison τεστ προκειμένου να βρεθούν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των συνθηκών και να προκύψουν τα διαγράμματα που απεικονίζονται στα αποτελέσματα.

2.11.2. Έκταση που καταλαμβάνουν τα αστροκύτταρα στις στιβάδες των CA1, CA3 και DG περιοχών του ιππόκαμπου

1. αφαίρεση του σήματος του φόντου μετρώντας το αρχικά με *Ctrl + h*, επιλέγοντας την τιμή *Mean* και πατώντας *Process>Math>Subtract background* όπου εισάγουμε την τιμή *Mean*
2. εισαγωγή επιπλέον στις μετρήσεις πατώντας *Analyze>Set Measurements* και επιλογή των *Integrated Intensity* και *Area Fraction*
3. μετατροπή της εικόνας σε δυαδική (μαύρο – άσπρο) πατώντας *Process>Binary>Make binary*
4. επιλογή της επιθυμητής περιοχής με το εργαλείο περιστρεφόμενου πλαισίου (*Rotated Rectangle*), προσθήκη της στον *ROI Manager* πατώντας *Ctrl + t* και μέτρησή της πατώντας *Ctrl + m*. Στο παράθυρο που εμφανίζεται μας ενδιαφέρει η τιμή της *%Area* η οποία μας δείχνει πόσο της % της περιοχής που επιλέξαμε καταλαμβάνεται από αστροκύτταρα.

Οι τιμές εισάγονται στο πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης GraphPad Prism (έκδοση 9.0.0.121), ομαδοποιούνται σε στήλες (CTR – CTR στήλη, PAE – CTR στήλη, CTR – PTZ στήλη και PAE – PTZ στήλη) και πραγματοποιείται One - way ANOVA και Turkey's Multiple Comparison τεστ προκειμένου να βρεθούν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των συνθηκών.

2.11.3. Αριθμός νευρώνων στις στιβάδες των CA1, CA3 και DG περιοχών του ιππόκαμπου

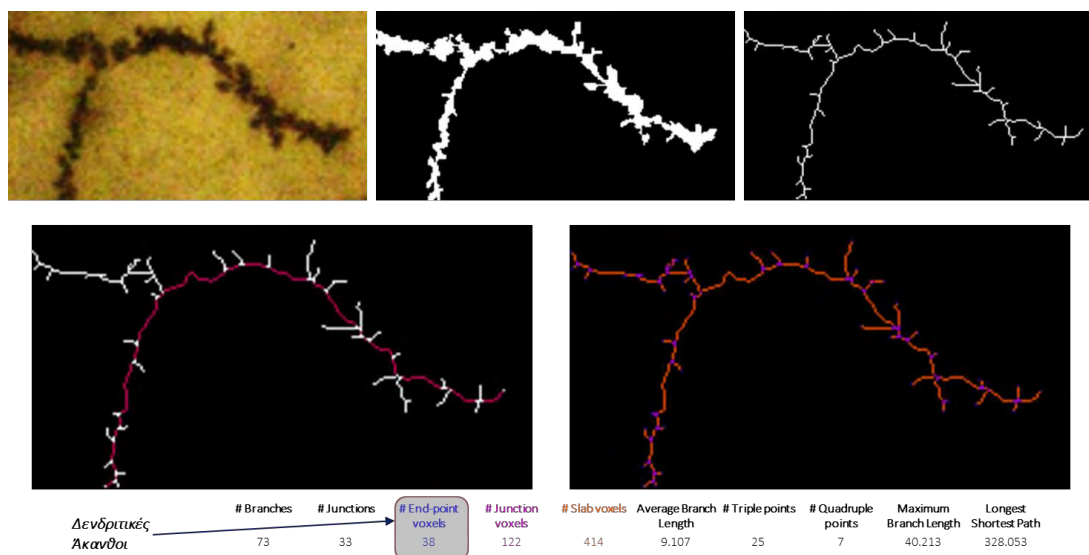
1. αφαίρεση του ανεπιθύμητου σήματος της εικόνας μετρώντας το αρχικά με *Ctrl + h*, επιλέγοντας την τιμή *Mean* και πατώντας *Process>Math>Subtract background* όπου εισάγουμε την τιμή *Mean*

2. επιλογή της επιθυμητής περιοχής με το εργαλείο περιστρεφόμενου πλαισίου (*Rotated Rectangle*), προσθήκη της στον *ROI Manager* πατώντας *Ctrl + t* και μέτρηση της έκτασης που καταλαμβάνει πατώντας *Ctrl + m*. Στο παράθυρο που εμφανίζεται μας ενδιαφέρει η τιμή της *Area*.
3. το πλαίσιο εισάγεται στην εικόνα πατώντας *Image>Overlay>From ROI Manager* και σε αυτό οι νευρώνες μετρούνται χειροκίνητα με το εργαλείο επιλογής πολλών σημείων (*Multi-point*)

Σε υπολογιστικά φύλλα διαιρείται ο αριθμός των νευρώνων ανά την περιοχή που μετρήθηκε και η τιμή που προκύπτει κάθε φορά εισάγεται στο πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης GraphPad Prism (έκδοση 9.0.0.121). Οι τιμές ομαδοποιούνται σε στήλες (CTR – CTR στήλη, PAE – CTR στήλη, CTR – PTZ στήλη και PAE – PTZ στήλη) και πραγματοποιείται One - way ANOVA και Turkey's Multiple Comparison τεστ προκειμένου να βρεθούν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των συνθηκών.

2.11.4. Αριθμός διακλαδώσεων και δενδριτικών ακανθών των νευρώνων

1. μετατροπή της εικόνας σε 8-bit
2. *Image>Adjust>Threshold* για να ενώσω τυχόν κενά μεταξύ των διακλαδώσεων των δενδριτών
3. μετατροπή του δενδρίτη σε μορφή σκελετού πατώντας *Process>Binary>Skeletonize*
4. ανάλυση του σχήματος που προκύπτει πατώντας *Analyze>Skeleton>Analyze Skeleton (2D/3D)*



Εικόνα 27: Στάδια για τη μέτρηση των δενδριτικών ακανθών ενός πυραμιδικού νευρώνα (Πηγή: παρούσα διπλωματική εργασία).

2.11.5. Συγχώνευση φθορισμών

Η συγχώνευση του φθορισμού της DAPI με της GFAP ή με του NeuN στις φωτογραφίες του ανοσοφθορισμού πραγματοποιείται μέσω διαχωρισμού των καναλιών του χρώματος πατώντας: *Image>Color>Split Channels*. Ανοίγουν τρία παράθυρα τα οποία αντιπροσωπεύουν το κόκκινο κανάλι, το μπλε κανάλι και το πράσινο κανάλι χρώματος. Στις φωτογραφίες της DAPI το κανάλι που χρησιμοποιείται είναι το μπλε, στις φωτογραφίες της GFAP το κόκκινο κανάλι και στις φωτογραφίες του NeuN το πράσινο κανάλι. Η συγχώνευση του μπλε καναλιού της DAPI και του εκάστοτε καναλιού γίνεται πατώντας: *Image>Color>Merge Channels*.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Επίδραση της προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη και της επιληπτογένεσης στον αριθμό των κυττάρων στον ιππόκαμπο

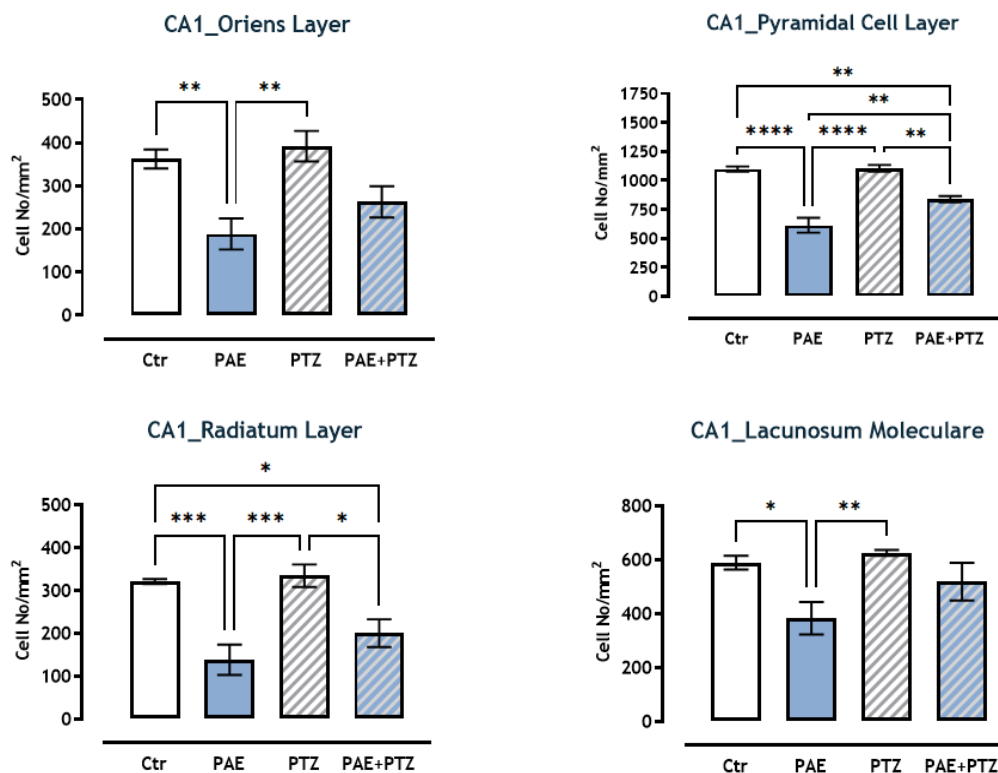
Αρχικά, διερευνήθηκε η επίδραση της προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη και της επιληπτογένεσης, μεμονωμένα και σε συνδυασμό, στον αριθμό των κυττάρων στις στιβάδες των CA1 και CA3 πεδίων και της οδοντωτής έλικας. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε χρώση των πυρήνων των κυττάρων με την 4',6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλη (4',6-diamidino-2-phenylindole – DAPI) και ο αριθμός των κυττάρων μετρήθηκε, με τη βοήθεια του προγράμματος ImageJ, σε όλες τις στιβάδες των υπό μελέτη περιοχών.

3.1.1. CA1 πεδίο

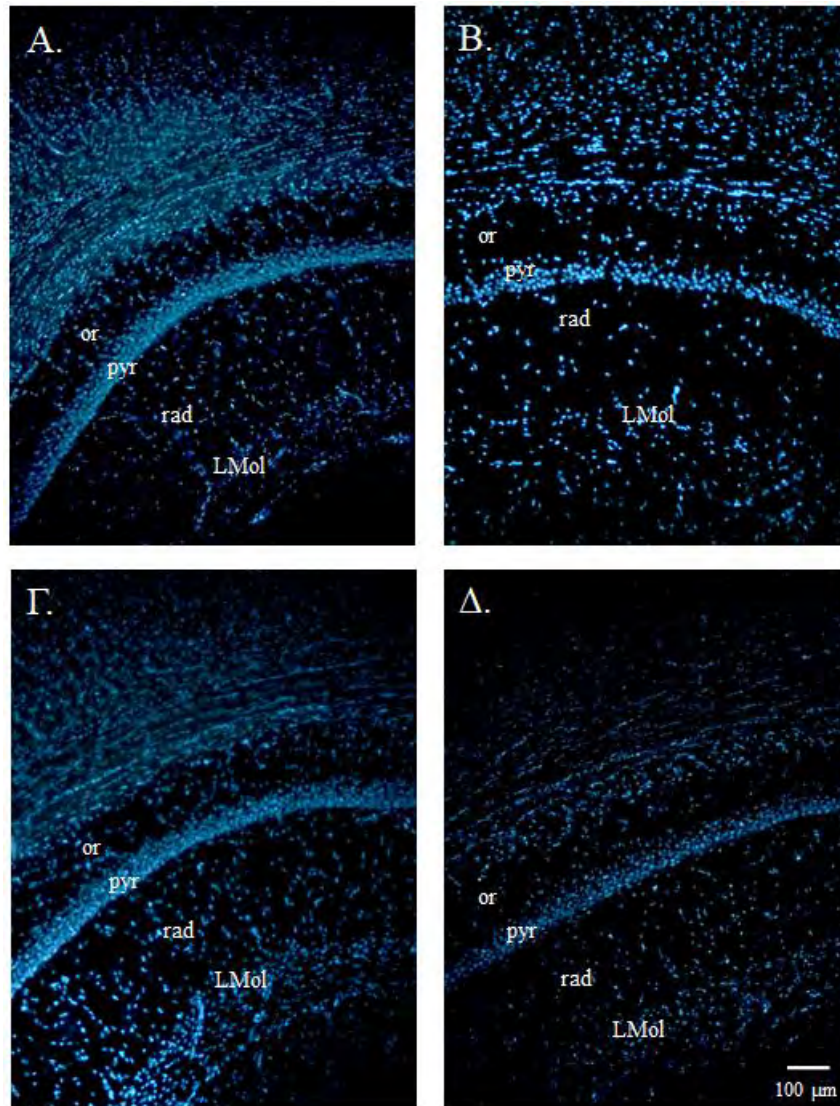
Τα αποτελέσματα των μετρήσεων που αφορούν τις στιβάδες του CA1 πεδίου παρουσιάζονται στον πίνακα 3. Η διενέργεια One - way ANOVA και Turkey's Multiple Comparison τεστ ανέδειξε στατιστικώς σημαντική μείωση στον αριθμό των κυττάρων σε όλες τις στιβάδες του CA1 πεδίου των PAE επίμυων και στατιστικώς σημαντική μείωση στην πυραμιδική και την ακτινωτή στιβάδα των PAE – PTZ επίμυων συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου. Παράλληλα, η σύγκριση μεταξύ των PAE και PAE – PTZ επίμυων ανέδειξε στατιστικώς σημαντική αύξηση ($p_{value} < 0.01$) στον αριθμό των κυττάρων στην πυραμιδική στιβάδα στους PAE – PTZ επίμυες συγκριτικά με τους PAE επίμυες. Τέλος, στην περίπτωση των PTZ επίμυων, ο αριθμός των κυττάρων σε όλες τις στιβάδες προσέγγιζε τον αντίστοιχο των επίμυων ελέγχου (Εικόνες 28,29).

Πίνακας 4: Μέσος όρος ($\pm$ Std. Error of Mean, SEM) του αριθμού των κυττάρων ανά mm² στις στιβάδες του CA1 πεδίου για τις συνθήκες που εξετάστηκαν ($n = 3 - 5$ ζώα/συνθήκη, 4-7 τομές/ζώο).

	Ctr	PAE	PTZ	PAE + PTZ
Στιβάδες	Αριθμός κυττάρων/mm ²			
Πολύμορφη στιβάδα (oriens layer, or)	363 $\pm$ 22	189 $\pm$ 36	392 $\pm$ 35	263 $\pm$ 36
Πυραμιδική στιβάδα (pyramidal layer, pyr)	1098 $\pm$ 23	614 $\pm$ 64	1104 $\pm$ 29	838 $\pm$ 27
Ακτινωτή στιβάδα (radiatum layer, rad)	322 $\pm$ 6	139 $\pm$ 36	335 $\pm$ 26	201 $\pm$ 32
Βοθριώδης-Μοριακή στιβάδα (lacunosum moleculare, LMol)	589 $\pm$ 25	383 $\pm$ 60	626 $\pm$ 11	519 $\pm$ 70



Εικόνα 28: Διαγράμματα των μέσων όρων ($\pm$ Std. Error of Mean, SEM) του αριθμού των κυττάρων ανά mm² στις στιβάδες του CA1 πεδίου στα ζώα των υπό μελέτη συνθηκών ($n = 3 - 5$ ζώα/συνθήκη, 4-7 τομές/ζώο). * $p_{value} < 0.05$, ** $p_{value} < 0.01$, *** $p_{value} < 0.001$, **** $p_{value} < 0.0001$



Εικόνα 29: Χρώση των πυρήνων των κυττάρων με DAPI στις στιβάδες του CA1 πεδίου σε **A.** επίμυες της ομάδας ελέγχου, **B.** PAE επίμυες, **Γ.** PTZ επίμυες, **Δ.** PAE – PTZ επίμυες ($n = 3 - 5$ ζώα/συνθήκη, 4-7 τομές/ζώο). Συντμήσεις: *or*: oriens layer (πολύμορφη στιβάδα), *pyr*: pyramidal layer (πυραμιδική στιβάδα), *rad*: radiatum layer (ακτινωτή στιβάδα), *LMol*: lacunosum moleculare (βοθριώδης – μοριακή στιβάδα). Μεγέθυνση: $\times 10$, Κλίμακα = $100\mu\text{m}$.

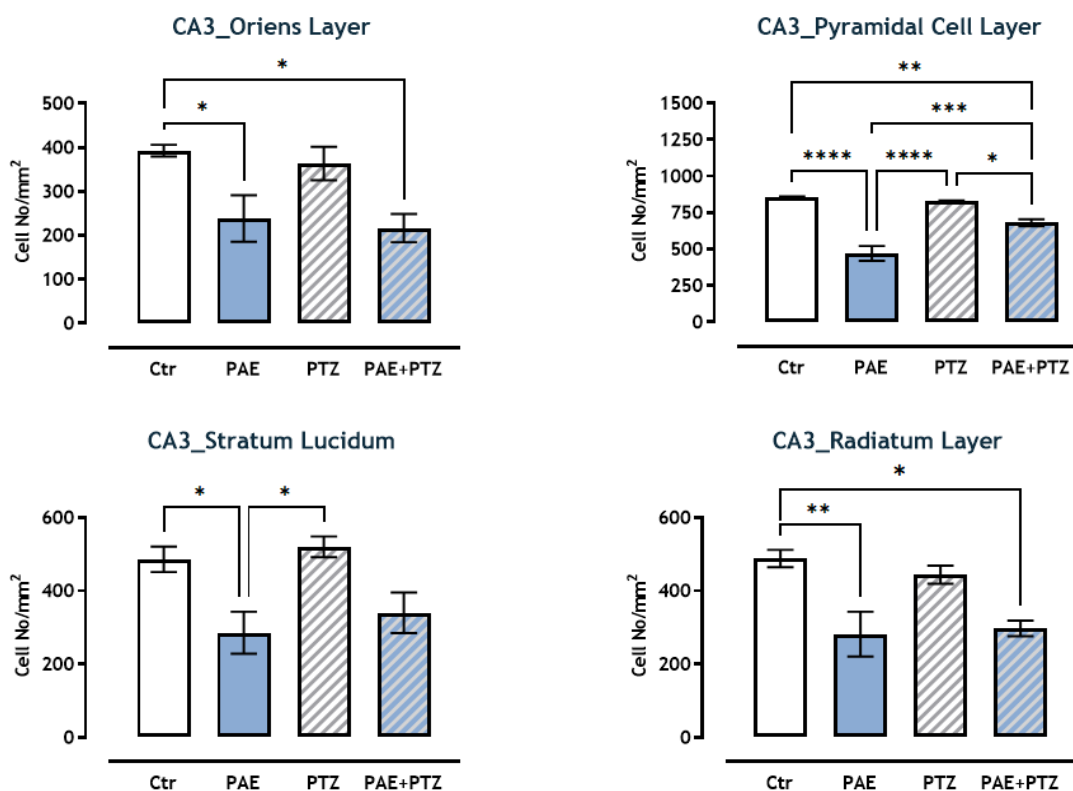
3.1.2. CA3 πεδίο

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων του αριθμού των κυττάρων που αφορούν τις στιβάδες του CA3 πεδίου παρουσιάζονται στον **πίνακα 4**. Στους PAE επίμυες παρατηρείται στατιστικώς σημαντική μείωση στον αριθμό των κυττάρων σε όλες τις στιβάδες του CA3 πεδίου συγκριτικά με τους επίμυες της ομάδας ελέγχου ενώ, στην περίπτωση των PAE – PTZ επίμυων, η στατιστικώς σημαντική μείωση στον αριθμό των κυττάρων συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου παρατηρείται στην πολύμορφη, στην πυραμιδική και στην ακτινωτή στιβάδα. Ομοίως με το CA1 πεδίο, στην πυραμιδική στιβάδα των PAE – PTZ επίμυων παρατηρείται στατιστικώς σημαντική αύξηση ($p_{\text{value}} < 0.001$) του αριθμού των κυττάρων συγκριτικά με τους PAE επίμυες. Ο αριθμός των

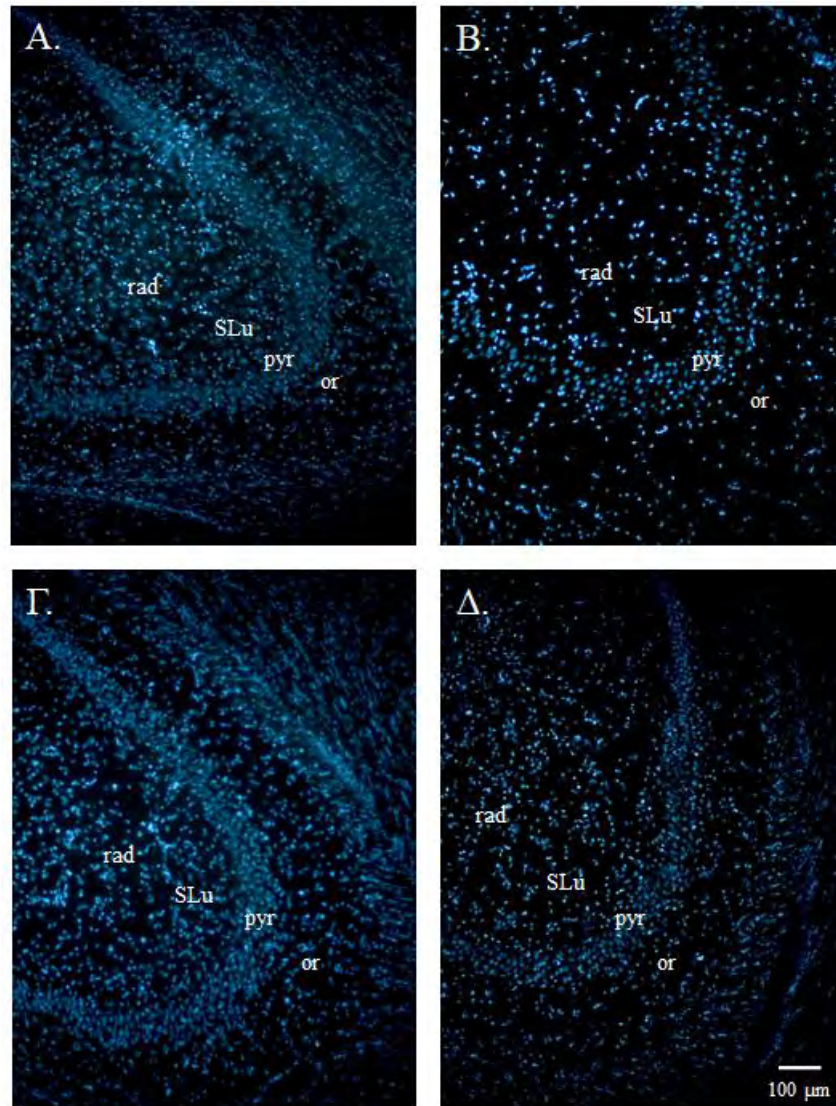
κυττάρων στην περίπτωση των PTZ επίμυων σε όλες τις στιβάδες του CA3 πεδίου προσέγγισε τον αντίστοιχο των επίμυων ελέγχου όπως και στο CA1 πεδίο (Εικόνες 30, 31).

Πίνακας 5: Μέσος όρος ($\pm$ Std. Error of Mean, SEM) του αριθμού των κυττάρων ανά mm^2 στις στιβάδες του CA3 πεδίου για τις συνθήκες που εξετάστηκαν ($n = 3 - 5$ ζώα/συνθήκη, 4-7 τομές/ζώο).

Στιβάδες	Ctr	PAE	PTZ	PAE + PTZ
Αριθμός κυττάρων/ mm^2				
Πολύμορφη στιβάδα (oriens layer, or)	393 $\pm$ 14	239 $\pm$ 53	364 $\pm$ 38	217 $\pm$ 32
Πυραμιδική στιβάδα (pyramidal layer, pyr)	853 $\pm$ 9	470 $\pm$ 51	828 $\pm$ 5	681 $\pm$ 24
Διαυγής στιβάδα (stratum lucidum, SLu)	486 $\pm$ 35	286 $\pm$ 58	520 $\pm$ 28	340 $\pm$ 55
Ακτινωτή στιβάδα (radiatum layer, rad)	488 $\pm$ 23	282 $\pm$ 61	445 $\pm$ 25	297 $\pm$ 21



Εικόνα 30: Διαγράμματα των μέσων όρων ($\pm$ Std. Error of Mean, SEM) του αριθμού των κυττάρων ανά mm^2 στις στιβάδες του CA3 πεδίου στα ζώα των υπό μελέτη συνθηκών ($n = 3 - 5$ ζώα/συνθήκη, 4-7 τομές/ζώο). * $p_{\text{value}} < 0.05$, ** $p_{\text{value}} < 0.01$, *** $p_{\text{value}} < 0.001$, **** $p_{\text{value}} < 0.0001$



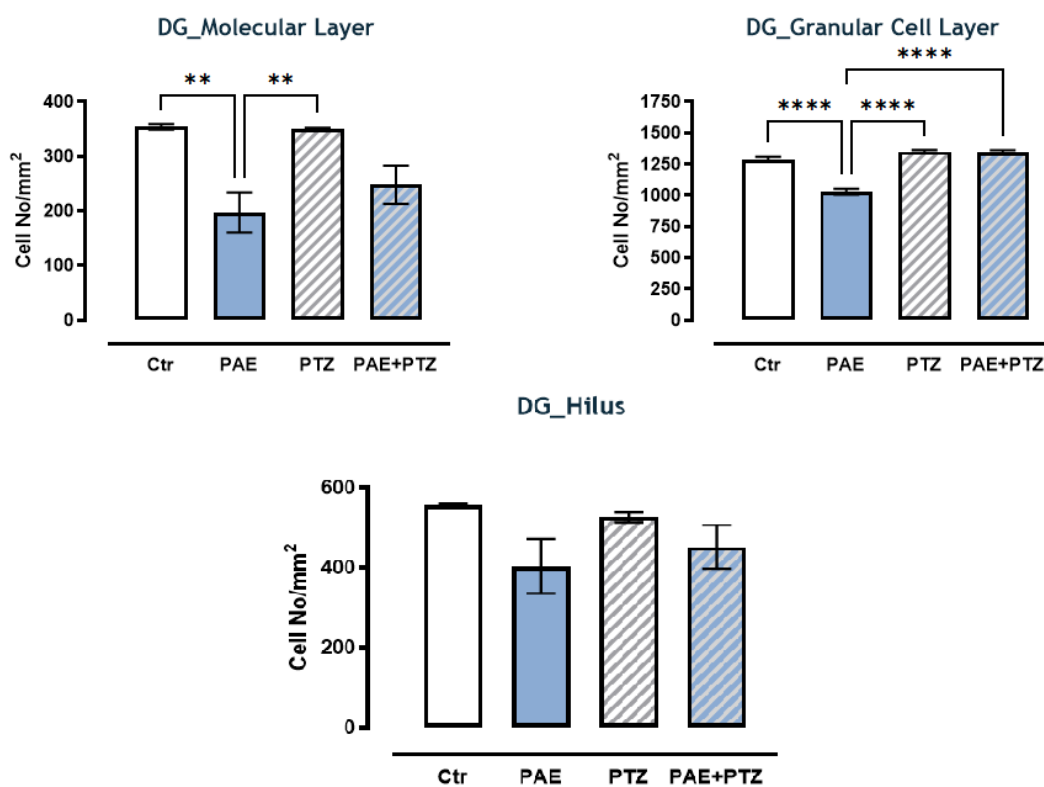
Εικόνα 31: Χρώση των πυρήνων των κυττάρων με DAPI στις στιβάδες του CA3 πεδίου σε **A.** επίμυες της ομάδας ελέγχου, **B.** PAE επίμυες, **Γ.** PTZ επίμυες, **Δ.** PAE – PTZ επίμυες ($n = 3 - 5$ ζώα/συνθήκη, 4-7 τομές/ζώο). Συντμήσεις: *or*: oriens layer (πολύμορφη στιβάδα), *pyr*: pyramidal layer (πυραμιδική στιβάδα), *SLu*: stratum lucidum (διαυγής στιβάδα), *rad*: radiatum layer (ακτινωτή στιβάδα). Μεγέθυνση: $\times 10$, Κλίμακα = $100\mu\text{m}$.

3.1.3. Οδοντωτή έλικα

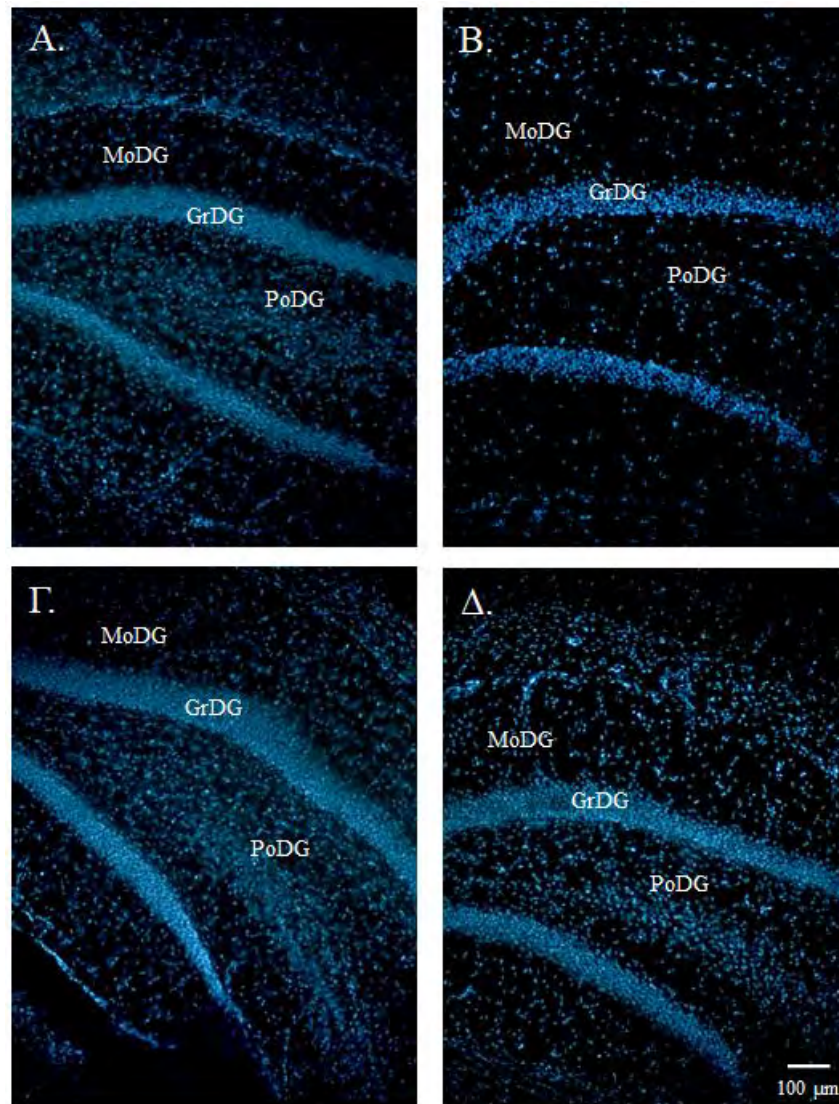
Τα αποτελέσματα των μετρήσεων που αφορούν τις στιβάδες της οδοντωτής έλικας παρουσιάζονται στον πίνακα 5. Η διενέργεια One - way ANOVA και Turkey's Multiple Comparison τεστ ανέδειξε στατιστικώς σημαντική μείωση στον αριθμό των κυττάρων στη μοριακή και την κοκκώδη στιβάδα της οδοντωτής έλικας στους PAE επίμυες συγκριτικά με τους επίμυες της ομάδας ελέγχου ενώ στατιστικώς σημαντική αύξηση ($p_{value} < 0.0001$) παρατηρήθηκε στην κοκκώδη στιβάδα στους PAE – PTZ επίμυες συγκριτικά με τους PAE επίμυες. Τέλος, και στην οδοντωτή έλικα ο αριθμός των κυττάρων σε όλες τις στιβάδες στους PTZ επίμυες προσέγγιζε τον αντίστοιχο των επίμυων της ομάδας ελέγχου (Εικόνες 32, 33).

Πίνακας 6: Μέσος όρος ($\pm$ Std. Error of Mean, SEM) του αριθμού των κυττάρων ανά mm² στις στιβάδες της οδοντωτής έλικας για τις συνθήκες που εξετάστηκαν ($n = 3 - 5$ ζώα/συνθήκη, 4-7 τομές/ζώο).

Στιβάδες	Ctr	PAE	PTZ	PAE + PTZ
Αριθμός κυττάρων/mm ²				
Μοριακή στιβάδα (Molecular layer, MoDG)	354 $\pm$ 5	197 $\pm$ 37	350 $\pm$ 3	248 $\pm$ 35
Κοκκώδης στιβάδα (Granular layer, GrDG)	1291 $\pm$ 19	1031 $\pm$ 23	1351 $\pm$ 11	1344 $\pm$ 18
Πολύμορφη στιβάδα (Polymorph layer, PoDG ή hilus)	556 $\pm$ 3	403 $\pm$ 68	526 $\pm$ 13	452 $\pm$ 54



Εικόνα 32: Διαγράμματα των μέσων όρων ($\pm$ Std. Error of Mean, SEM) του αριθμού των κυττάρων ανά mm² στις στιβάδες της οδοντωτής έλικας στα ζώα των υπό μελέτη συνθηκών ($n = 3 - 5$ ζώα/συνθήκη, 4-7 τομές/ζώο). ** $p_{value} < 0.01$, **** $p_{value} < 0.0001$



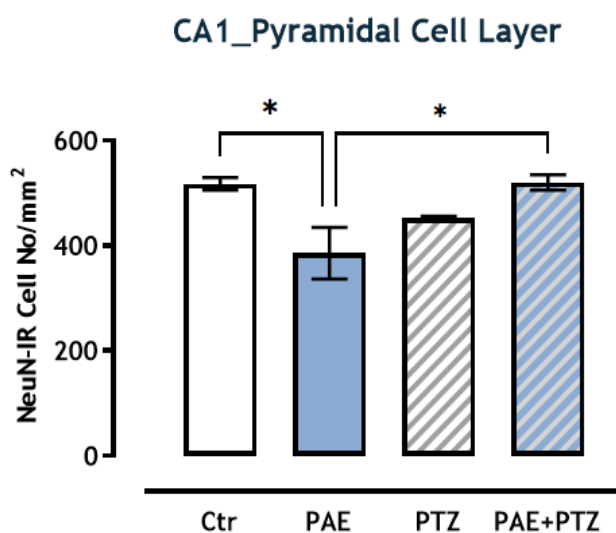
Εικόνα 33: Χρώση των πυρήνων των κυττάρων με DAPI στις στιβάδες της οδοντωτής έλικας σε **A.** επίμυες της ομάδας ελέγχου, **B.** PAE επίμυες, **Γ.** PTZ επίμυες, **Δ.** PAE – PTZ επίμυες ($n = 3 - 5$ ζώα/συνθήκη, 4-7 τομές/ζώο). Συντμήσεις: GrDG: Granule cell layer Dentate Gyrus (κοκκώδης στιβάδα), MoDG: Molecular layer Dentate Gyrus (μοριακή στιβάδα), PoDG: Polymorph layer Dentate Gyrus (πολύμορφη στιβάδα). Μεγέθυνση: $\times 10$, Κλίμακα = $100\mu\text{m}$.

3.2. Επίδραση της προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη και της επιληπτογένεσης στον αριθμό και τη μορφολογία των νευρώνων στον ιππόκαμπο

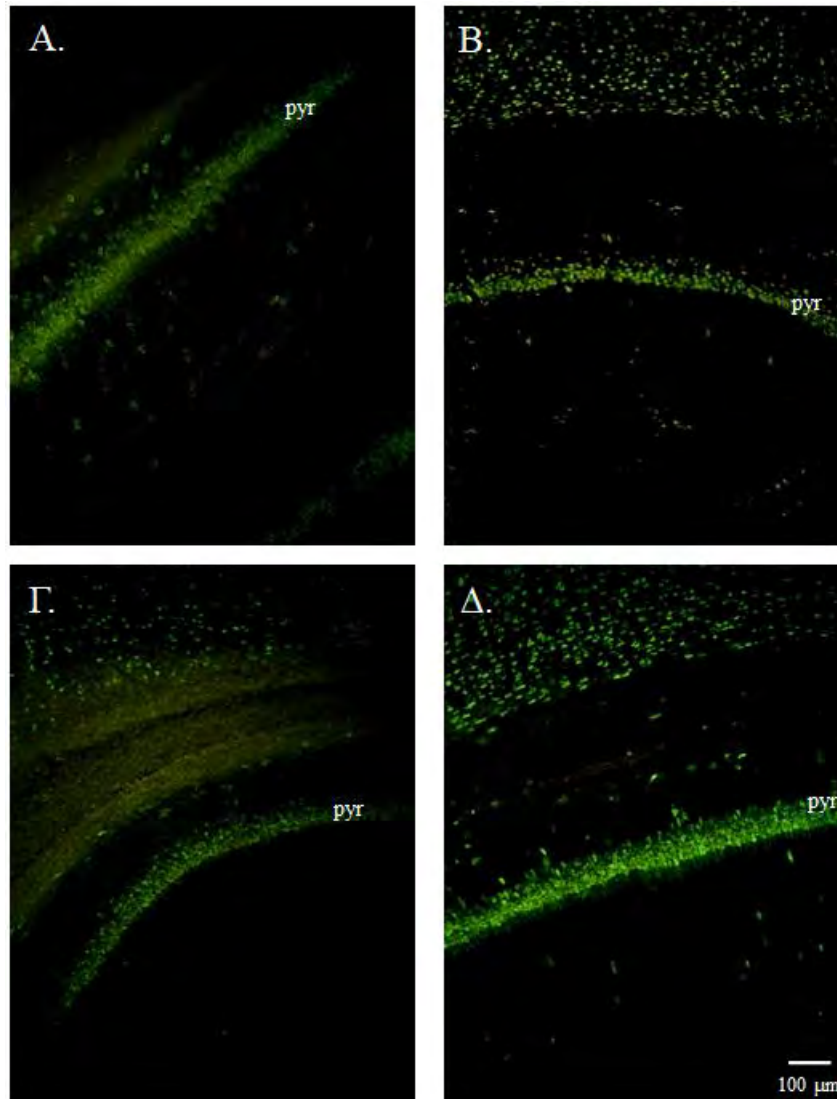
Προκειμένου να διαπιστωθεί ο πληθυσμός των κυττάρων που μειώνεται εξαιτίας της προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη, πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση του αριθμού των ώριμων νευρώνων έπειτα από ανοσοϊστοχημικό εντοπισμό τους, με τη χρήση του αντισώματος anti-NeuN, στην πυραμδική στιβάδα των CA1 και CA3 πεδίων και στην κοκκώδη στιβάδα της οδοντωτής έλικας.

3.2.1. CA1 πεδίο

Από την καταμέτρηση των ώριμων νευρώνων στην πυραμιδική στιβάδα του CA1 πεδίου προέκυψε πως στα ζώα ελέγχου οι ώριμοι νευρώνες ήταν, κατά μέσο όρο, 518 ± 12 , στους PAE επίμυες ήταν 386 ± 49 , στους PTZ επίμυες ήταν 452 ± 4 και στους PAE - PTZ επίμυες ήταν 521 ± 15 . Η διενέργεια One - way ANOVA και Turkey's Multiple Comparison τεστ ανέδειξε στατιστικώς σημαντική μείωση ($p_{value} < 0.05$) στον αριθμό των νευρώνων στην πυραμιδική στιβάδα του CA1 πεδίου των PAE επίμυων συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου ενώ, η σύγκριση μεταξύ των PAE και PAE - PTZ επίμυων, ανέδειξε στατιστικώς σημαντική αύξηση ($p_{value} < 0.05$) στον αριθμό των νευρώνων στους PAE - PTZ επίμυες συγκριτικά με τους PAE επίμυες (Εικόνες 34, 35).



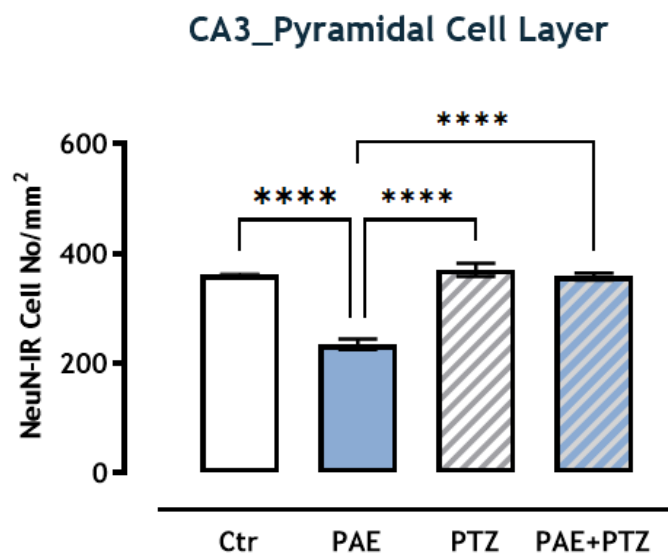
Εικόνα 34: Διάγραμμα των μέσων όρων ($\pm$ Std. Error of Mean, SEM) του αριθμού των νευρώνων ανά mm^2 στην πυραμιδική στιβάδα του CA1 πεδίου στα ζώα των υπό μελέτη συνθηκών ($n = 3 - 5$ ζώα/συνθήκη, 4-7 τομές/ζώο). * $p_{value} < 0.05$



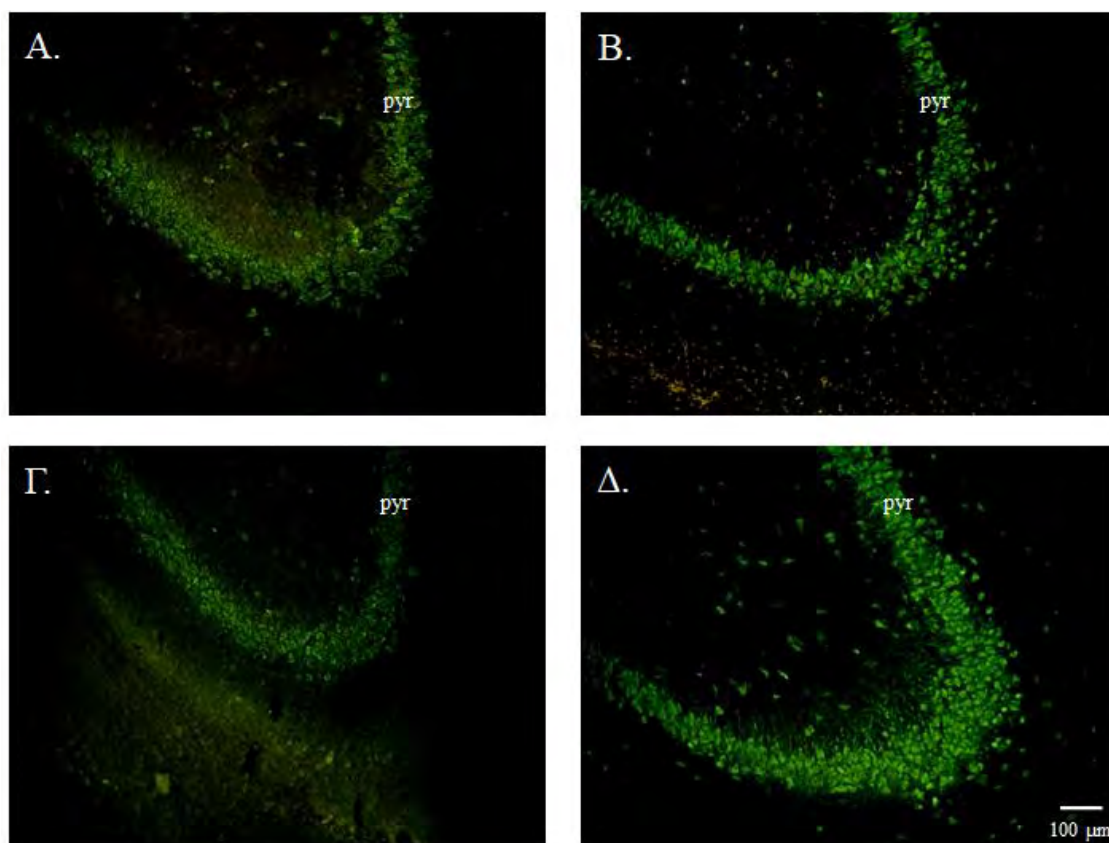
Εικόνα 35: Αποτύπωση των ώριμων νευρώνων της πυραμιδικής στιβάδας του CA1 πεδίου μέσω της ανοσοδραστικότητας του anti-NeuN αντισώματος σε **A.** επίμυες της ομάδας ελέγχου, **B.** PAE επίμυες, **Γ.** PTZ επίμυες, **Δ.** PAE – PTZ επίμυες ($n = 3 - 5$ ζώα/συνθήκη, 4-7 τομές/ζώο). Συντμήσεις: *pyr*: *pyramidal layer* (πυραμιδική στιβάδα). Μεγέθυνση: $\times 10$, Κλίμακα = $100\mu m$.

3.2.2. CA3 πεδίο

Από την καταμέτρηση των ώριμων νευρώνων στην πυραμιδική στιβάδα του CA3 πεδίου προέκυψε πως στα ζώα ελέγχου οι ώριμοι νευρώνες ήταν, κατά μέσο όρο, 361 ± 3 , στους PAE επίμυες ήταν 235 ± 9 , στους PTZ επίμυες ήταν 371 ± 12 και στους PAE - PTZ επίμυες ήταν 358 ± 6 . Η διενέργεια One - way ANOVA και Turkey's Multiple Comparison τεστ ανέδειξε στατιστικώς σημαντική μείωση ($p_{value} < 0.0001$) στον αριθμό των νευρώνων στην πυραμιδική στιβάδα του CA3 πεδίου των PAE επίμυων συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου ενώ, η σύγκριση μεταξύ των PAE και PAE – PTZ επίμυων, ανέδειξε στατιστικώς σημαντική αύξηση ($p_{value} < 0.0001$) στον αριθμό των νευρώνων στους PAE – PTZ επίμυες συγκριτικά με τους PAE επίμυες (Εικόνες 36, 37).



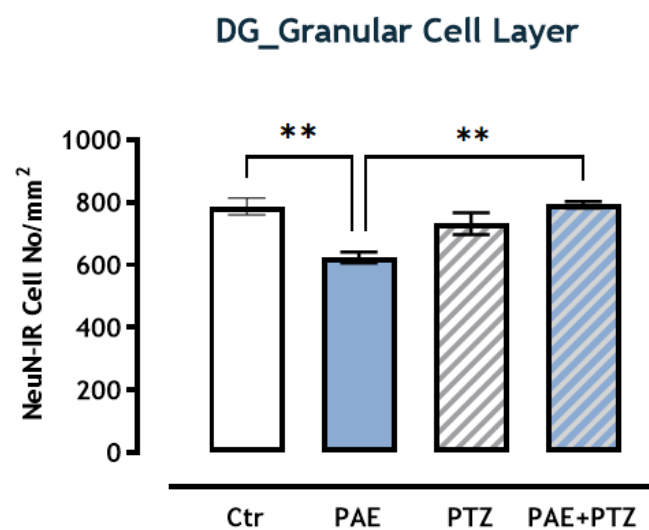
Εικόνα 36: Διάγραμμα των μέσων όρων ($\pm$ Std. Error of Mean, SEM) του αριθμού των νευρώνων ανά mm^2 στην πυραμιδική στιβάδα του CA3 πεδίου στα ζώα των υπό μελέτη συνθηκών ($n = 3 - 5$ ζώα/συνθήκη, 4-7 τομές/ζώο). **** $p_{\text{value}} < 0.0001$



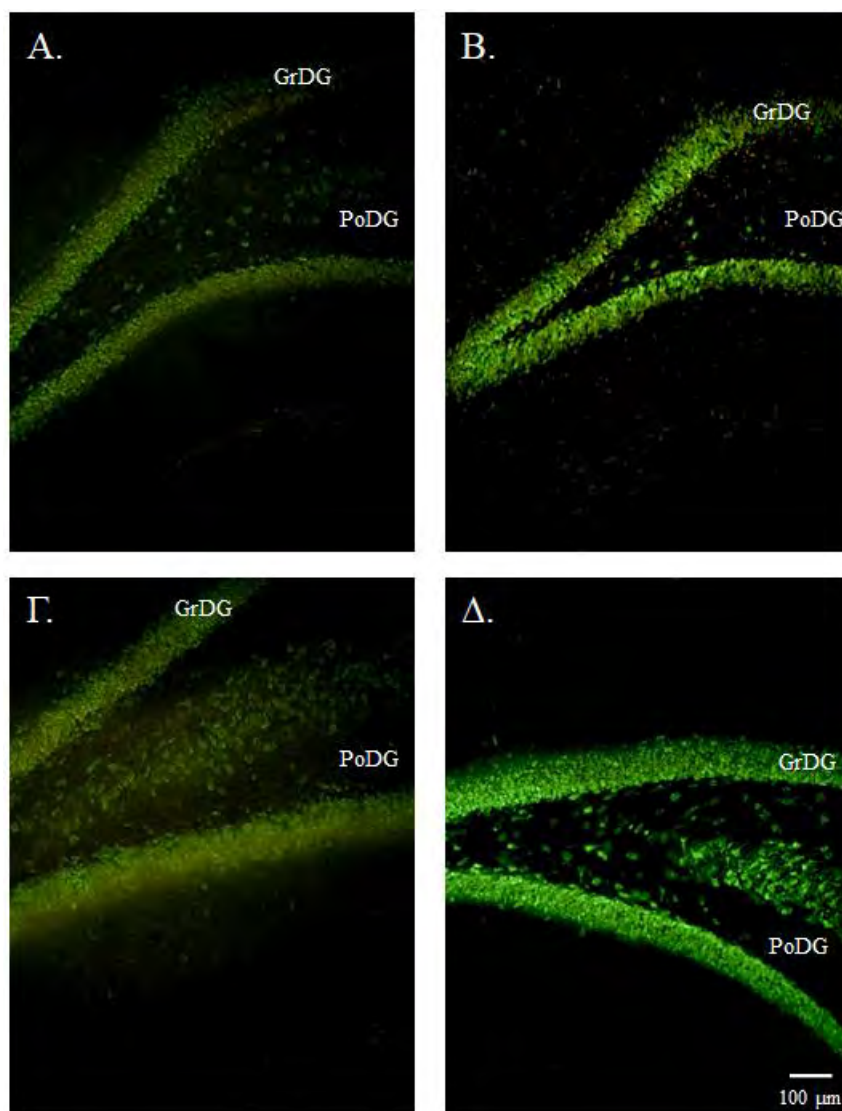
Εικόνα 37: Αποτύπωση των ώριμων νευρώνων της πυραμιδικής στιβάδας του CA3 πεδίου μέσω της ανοσοδραστικότητας του anti-NeuN αντισώματος σε **A.** επίμυες της ομάδας ελέγχου, **B.** PAE επίμυες, **Γ.** PTZ επίμυες, **Δ.** PAE – PTZ επίμυες ($n = 3 - 5$ ζώα/συνθήκη, 4-7 τομές/ζώο). Συντμήσεις: pyr: pyramidal layer (πυραμιδική στιβάδα). Μεγέθυνση: $\times 10$, Κλίμακα = $100\mu\text{m}$.

3.2.3. Οδοντωτή έλικα

Από την καταμέτρηση των ώριμων νευρώνων στην κοκκώδη στιβάδα της οδοντωτής έλικας προέκυψε πως στα ζώα ελέγχου οι ώριμοι νευρώνες ήταν, κατά μέσο όρο, 787 ± 26 , στους PAE επίμυες ήταν 624 ± 17 , στους PTZ επίμυες ήταν 732 ± 35 και στους PAE - PTZ επίμυες ήταν 793 ± 10 . Η διενέργεια One - way ANOVA και Turkey's Multiple Comparison τεστ ανέδειξε στατιστικώς σημαντική μείωση ($p_{value} < 0.01$) στον αριθμό των νευρώνων στην κοκκώδη στιβάδα της οδοντωτής έλικας των PAE επίμυων συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου ενώ, η σύγκριση μεταξύ των PAE και PAE - PTZ επίμυων, ανέδειξε στατιστικώς σημαντική αύξηση ($p_{value} < 0.01$) στον αριθμό των νευρώνων στους PAE - PTZ επίμυες συγκριτικά με τους PAE επίμυες (Εικόνες 38, 39).



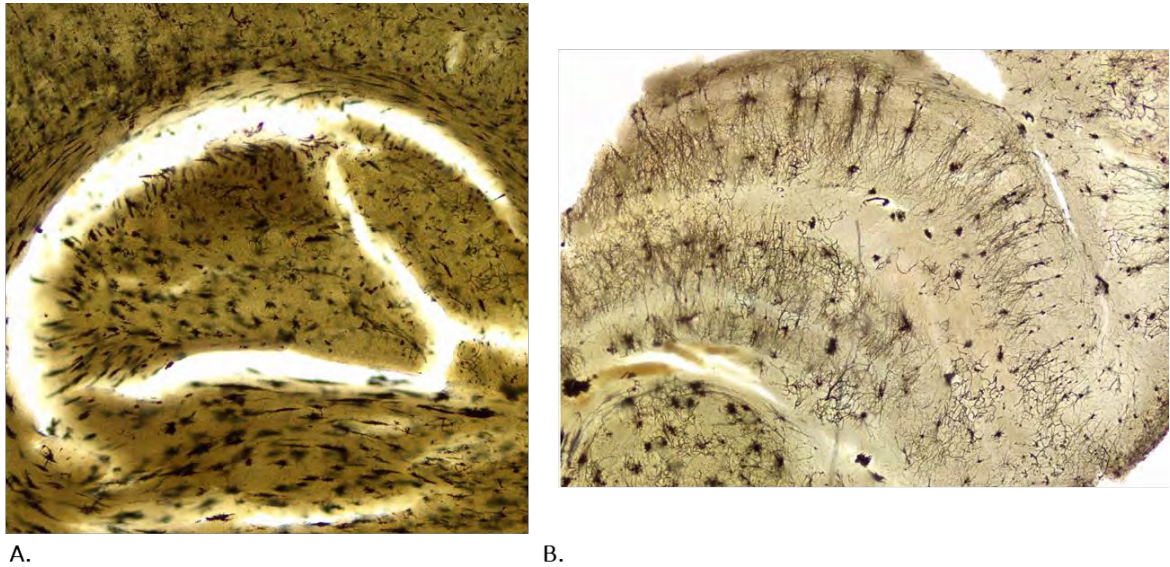
Εικόνα 38: Διάγραμμα των μέσων όρων ($\pm$ Std. Error of Mean, SEM) του αριθμού των νευρώνων ανά mm^2 στην κοκκώδη στιβάδα της οδοντωτής έλικας στα ζώα των υπό μελέτη συνθηκών ($n = 3 - 5$ ζώα/συνθήκη, 4-7 τομές/ζώο). ** $p_{value} < 0.01$



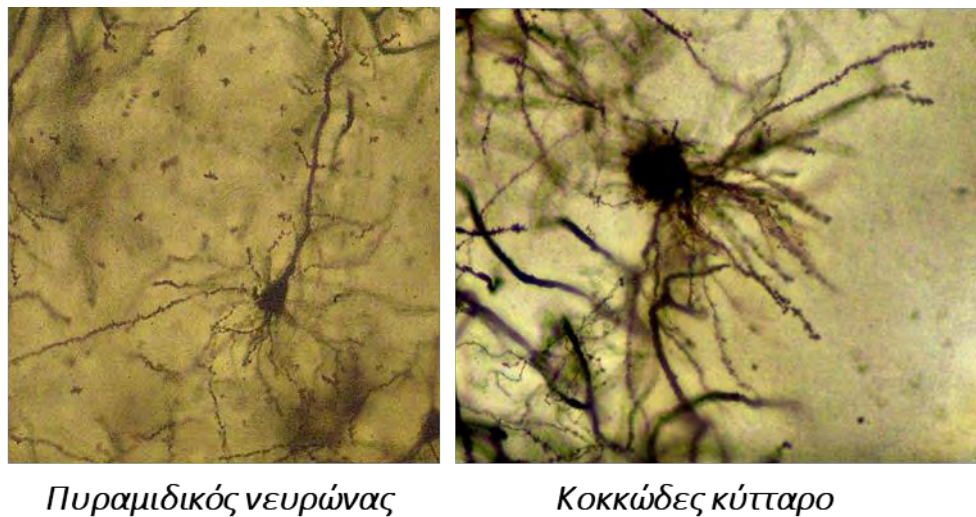
Εικόνα 39: Αποτύπωση των ώριμων νευρώνων της κοκκώδους και πολύμορφης στιβάδας μέσω της ανοσοδραστικότητας του anti-NeuN αντισώματος σε **A.** επίμυες της ομάδας ελέγχου, **B.** PAE επίμυες, **Γ.** PTZ επίμυες, **Δ.** PAE – PTZ επίμυες ($n = 3 - 5$ ζώα/συνθήκη, 4-7 τομές/ζώο). Συντμήσεις GrDG: Granule cell layer Dentate Gyrus (κοκκώδης στιβάδα), PoDG: Polymorph layer Dentate Gyrus (πολύμορφη στιβάδα). Μεγέθυνση: $\times 10$, Κλίμακα = $100\mu\text{m}$.

3.2.4. Μορφολογία νευρώνων

Οι εικόνες (Εικόνα 40Α) που ελήφθησαν από τους ιστούς των υπό μελέτη συνθηκών δεν ήταν οι αναμενόμενες, όπως προκύπτει από τις εικόνες της βιβλιογραφίας, γεγονός που πιθανώς αποδίδεται στην ψύξη των ιστών. Αντιθέτως, οι εικόνες που ελήφθησαν από τους ιστούς των Wistar επίμυων ήταν αντιπροσωπευτικές της μεθόδου “Golgi – Cox” (Εικόνα 40Β). Στην Εικόνα 41 παρατηρούμε τη χαρακτηριστική μορφολογία ενός πυραμιδικού νευρώνα και ενός κοκκώδους κυττάρου σε μεγέθυνση.



Εικόνα 40: Νευρώνες ραχιαίου ιππόκαμπου σε Α. Ctr και Β. Wistar επίμυες έπειτα από χρώση Golgi – Cox.



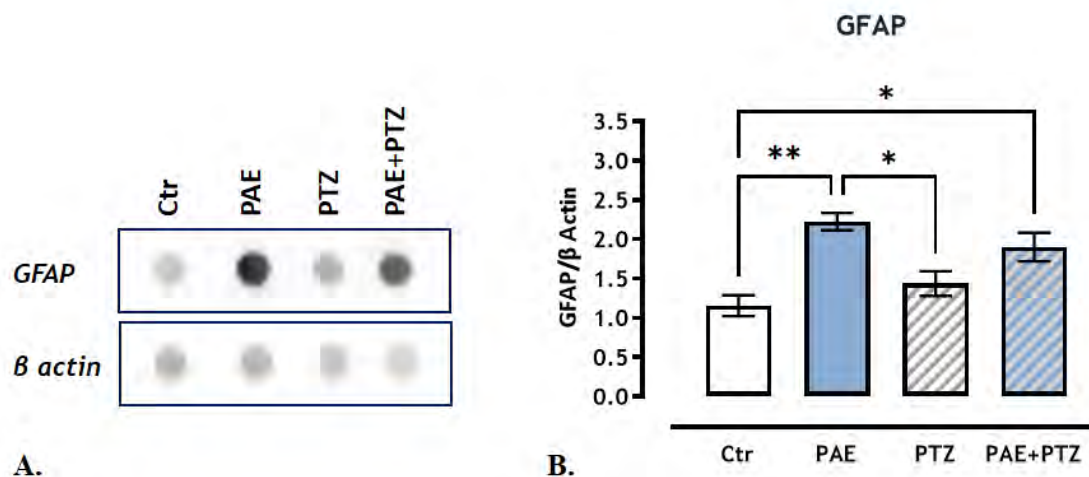
Εικόνα 41: Χαρακτηριστική μορφολογία ενός πυραμιδικού νευρώνα του CA1 πεδίου και ενός κοκκώδους κυττάρου της οδοντωτής έλικας σε μεγέθυνση.

3.3. Επίδραση της προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη και της επιληπτογένεσης στην έκφραση και στην ανοσοδραστικότητα της GFAP των αστροκυττάρων στον ιππόκαμπο

3.3.1. Ανοσοαποτύπωση κηλίδας για την πρωτεΐνη GFAP

Η ανοσοαποτύπωση κηλίδας με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης GFAP των αστροκυττάρων πραγματοποιήθηκε με στόχο τη διερεύνηση πιθανών αλλαγών στην έκφρασή της μεταξύ των υπό μελέτη συνθηκών. Στους επίμυες της ομάδας ελέγχου η έκφραση της GFAP ήταν $1,16 \pm 0,13$, στους PAE επίμυες ήταν $2,22 \pm 0,10$, στους PTZ επίμυες ήταν $1,44 \pm 0,15$ και στους PAE – PTZ επίμυες ήταν $1,90 \pm 0,18$. Η ανάλυση

των αποτελεσμάτων, έπειτα από κανονικοποίηση με το housekeeping gene⁶ β-ακτίνη, ανέδειξε στατιστικώς σημαντική αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της GFAP στους PAE ($p_{value} < 0.01$) και στους PAE – PTZ ($p_{value} < 0.05$) επίμυες συγκριτικά με τους επίμυες της ομάδας ελέγχου (Εικόνα 42).



Εικόνα 42: **A.** Αντιπροσωπευτικές κηλίδες της έκφρασης της GFAP και της β-ακτίνης στις τέσσερις ομάδες επίμυων. **B.** Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της GFAP ως προς τη β-ακτίνη. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ SEM (Std. Error of Mean) από μετρήσεις σε 4 - 6 ζώα ανά συνθήκη.

3.3.2. Ανοσοδραστικότητα της GFAP στο CA1 πεδίο

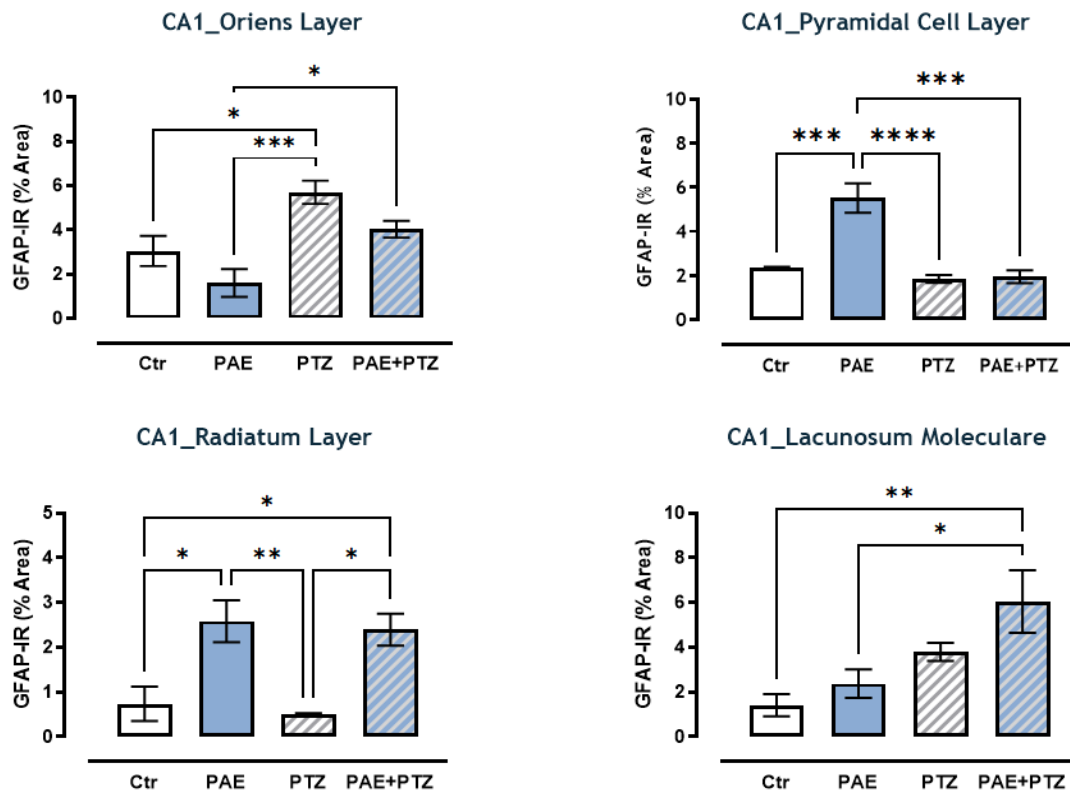
Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κηλίδας για την GFAP μας ώθησαν στη διενέργεια έμμεσου ανοσοφθορισμού με αντίσωμα έναντι της GFAP (Εικόνα 49, 50, 52) προκειμένου να εντοπιστούν πιθανές αλλαγές στην ανοσοδραστικότητα της GFAP και κατ'επέκταση, στη μορφολογία των αστροκυττάρων (αντιδραστικά αστροκύτταρα) μεταξύ των τεσσάρων συνθηκών. Ειδικότερα, προσδιορίστηκε το ποσοστό που καταλαμβάνουν τα αστροκύτταρα στις διάφορες στιβάδες των CA1, CA3 πεδίων και της οδοντωτής έλικας.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων που αφορούν τις στιβάδες του CA1 πεδίου παρουσιάζονται στον πίνακα 6. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων ανέδειξε στατιστικώς σημαντική αύξηση του ποσοστού των αστροκυττάρων που καταλαμβάνουν την πυραμιδική στιβάδα του CA1 πεδίου στους PAE επίμυες ($p_{value} < 0.001$) συγκριτικά με τους επίμυες της ομάδας ελέγχου, φαινόμενο το οποίο δεν παρατηρήθηκε στην περίπτωση των PAE – PTZ επίμυων (Εικόνες 43, 44).

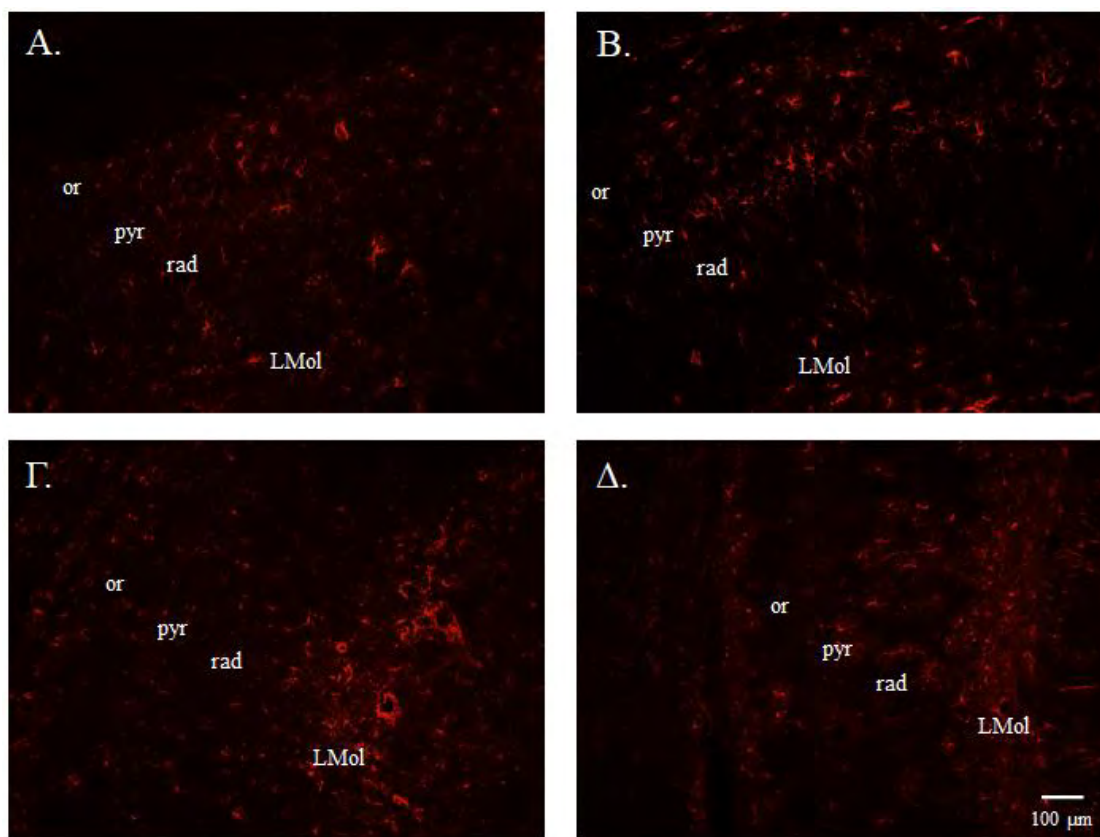
⁶ **Housekeeping genes:** συντηρημένα γονίδια που απαιτούνται για τη διατήρηση της βασικής κυτταρικής λειτουργίας και εκφράζονται σε όλα τα κύτταρα ενός οργανισμού υπό φυσιολογικές και παθολογικές συνθήκες

Πίνακας 7: Μέσος όρος ($\pm$ Std. Error of Mean, SEM) του ποσοστού που καταλαμβάνουν τα αστροκύτταρα στις στιβάδες του CA1 πεδίου για τις συνθήκες που εξετάστηκαν ($n = 3 - 5$ ζώα/συνθήκη, 4-7 τομές/ζώο).

Στιβάδες	Ctr	PAE	PTZ	PAE + PTZ
% περιοχής με GFAP-IR				
Πολύμορφη στιβάδα (oriens layer, or)	3,04 $\pm$ 0,68	1,60 $\pm$ 0,62	5,70 $\pm$ 0,51	4,03 $\pm$ 0,37
Πυραμιδική στιβάδα (pyramidal layer, pyr)	2,33 $\pm$ 0,07	5,52 $\pm$ 0,66	1,85 $\pm$ 0,18	1,95 $\pm$ 0,28
Ακτινωτή στιβάδα (radiatum layer, rad)	0,73 $\pm$ 0,38	2,58 $\pm$ 0,47	0,49 $\pm$ 0,02	2,39 $\pm$ 0,35
Βοθριώδης - Μοριακή στιβάδα (lacunosum moleculare, LMol)	1,41 $\pm$ 0,50	2,37 $\pm$ 0,63	3,79 $\pm$ 0,40	6,04 $\pm$ 1,39



Εικόνα 43: Διαγράμματα των μέσων όρων ($\pm$ Std. Error of Mean, SEM) του ποσοστού που καταλαμβάνουν τα αστροκύτταρα στις στιβάδες του CA1 πεδίου στα ζώα των υπό μελέτη συνθηκών ($n = 3 - 5$ ζώα/συνθήκη, 4-7 τομές/ζώο). * $p_{value} < 0.05$, ** $p_{value} < 0.01$, *** $p_{value} < 0.001$, **** $p_{value} < 0.0001$



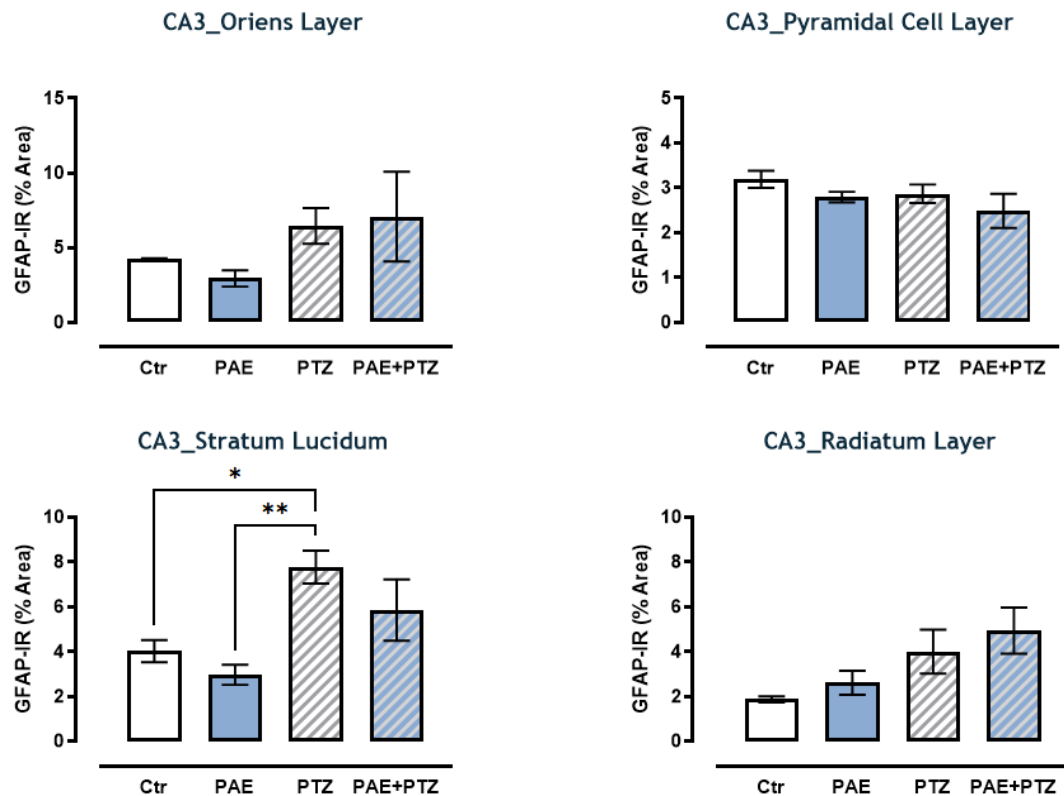
Εικόνα 44: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της GFAP στις στιβάδες του CA1 πεδίου σε **A.** επίμυες της ομάδας ελέγχου, **B.** PAE επίμυες, **Γ.** PTZ επίμυες, **Δ.** PAE – PTZ επίμυες ($n = 3 - 5$ ζώα/συνθήκη, 4-7 τομές/ζώο). Συντμήσεις: *or*: *oriens layer* (πολύμορφη στιβάδα), *pyr*: *pyramidal layer* (πυραμιδική στιβάδα), *rad*: *radiatum layer* (ακτινωτή στιβάδα), *LMol*: *lacunosum moleculare* (βοθριώδης – μοριακή στιβάδα). Μεγέθυνση: $\times 10$, Κλίμακα = $100\mu\text{m}$.

3.3.3. Ανοσοδραστικότητα της GFAP στο CA3 πεδίο

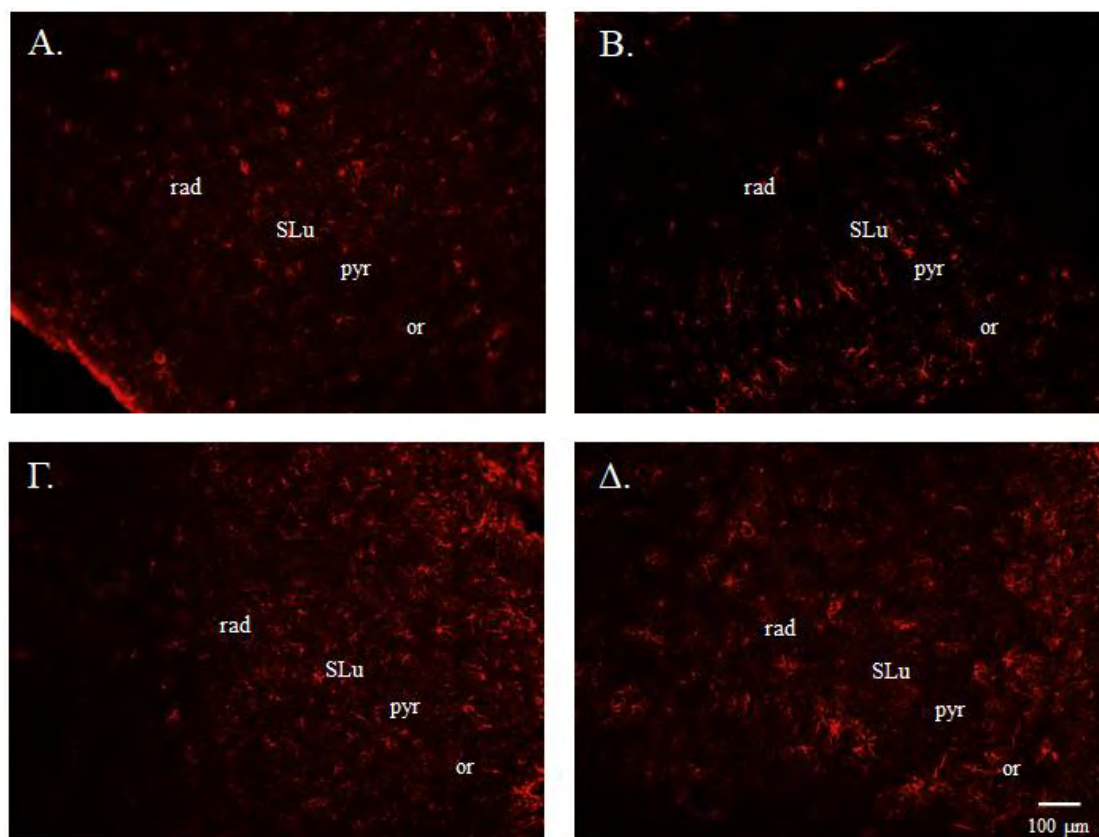
Τα αποτελέσματα των μετρήσεων που αφορούν τις στιβάδες του CA3 πεδίου παρουσιάζονται στον πίνακα 7. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων ανέδειξε στατιστικώς σημαντική αύξηση του ποσοστού των αστροκυττάρων που καταλαμβάνουν τη διαυγή στιβάδα του CA3 πεδίου στους PTZ επίμυες ($p_{\text{value}} < 0.05$) συγκριτικά με τους επίμυες της ομάδας ελέγχου (Εικόνες 45, 46).

Πίνακας 8: Μέσος όρος ($\pm$ Std. Error of Mean, SEM) του ποσοστού που καταλαμβάνουν τα αστροκύτταρα στις στιβάδες του CA3 πεδίου για τις συνθήκες που εξετάστηκαν ($n = 3 - 5$ ζώα/συνθήκη, 4-7 τομές/ζώο).

Στιβάδες	Ctr	PAE	PTZ	PAE + PTZ
% περιοχής με GFAP-IR				
Πολύμορφη στιβάδα (oriens layer, or)	4,25 $\pm$ 0,03	2,94 $\pm$ 0,54	6,45 $\pm$ 1,18	7,08 $\pm$ 3,00
Πυραμιδική στιβάδα (pyramidal layer, pyr)	3,19 $\pm$ 0,19	2,79 $\pm$ 0,11	2,87 $\pm$ 0,20	2,48 $\pm$ 0,38
Διαυγής στιβάδα (stratum lucidum, SLu)	4,02 $\pm$ 0,48	2,96 $\pm$ 0,44	7,78 $\pm$ 0,73	5,85 $\pm$ 1,36
Ακτινωτή στιβάδα (radiatum layer, rad)	1,87 $\pm$ 0,12	2,62 $\pm$ 0,53	4,00 $\pm$ 0,98	4,94 $\pm$ 1,03



Εικόνα 45: Διαγράμματα των μέσων όρων ($\pm$ Std. Error of Mean, SEM) του ποσοστού που καταλαμβάνουν τα αστροκύτταρα στις στιβάδες του CA3 πεδίου στα ζώα των υπό μελέτη συνθηκών ($n = 3 - 5$ ζώα/συνθήκη, 4-7 τομές/ζώο). * $p_{value} < 0.05$, ** $p_{value} < 0.01$



Εικόνα 46: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της GFAP στις στιβάδες του CA3 πεδίου σε **A.** επίμυες της ομάδας ελέγχου, **B.** PAE επίμυες, **Γ.** PTZ επίμυες, **Δ.** PAE – PTZ επίμυες ($n = 3 - 5$ ζώα/συνθήκη, 4-7 τομές/ζώο). Συντμήσεις: or: oriens layer (πολύμορφη στιβάδα), pyr: pyramidal layer (πυραμιδική στιβάδα), SLu: stratum lucidum (διαυγής στιβάδα), rad: radiatum layer (ακτινωτή στιβάδα). Μεγέθυνση: $\times 10$, Κλίμακα = $100\mu m$.

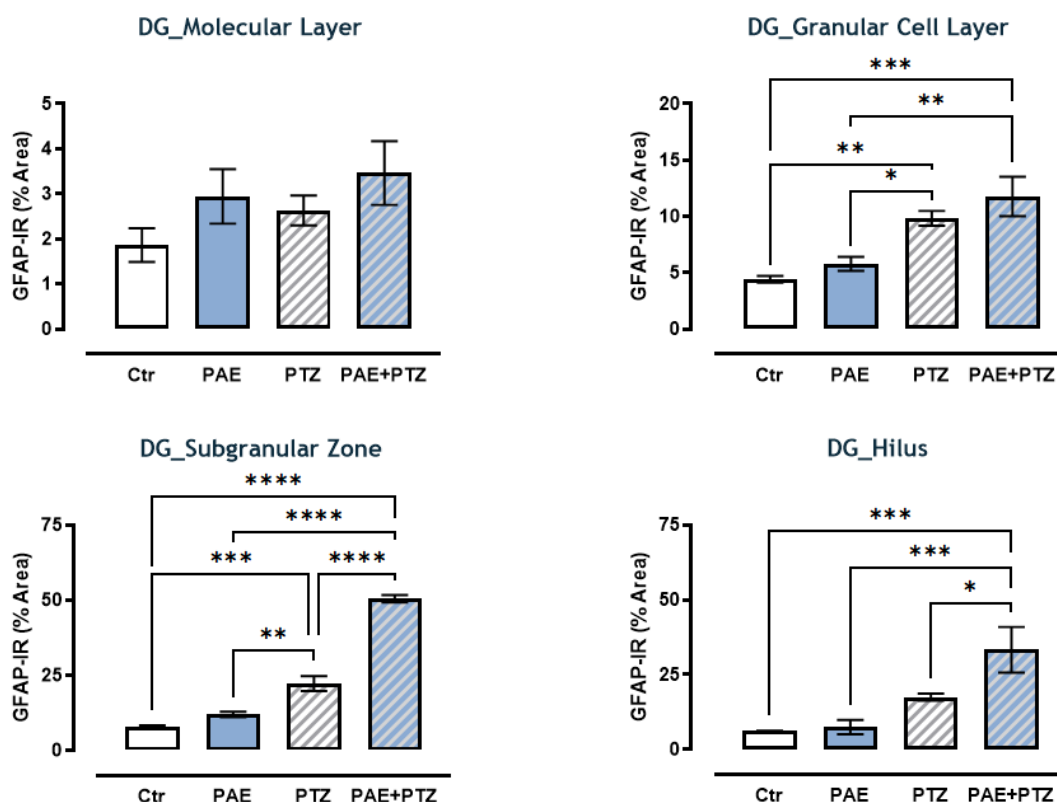
3.3.4. Ανοσοδραστικότητα της GFAP στην οδοντωτή έλικα

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων που αφορούν τις στιβάδες της οδοντωτής έλικας παρουσιάζονται στον **πίνακα 8**. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων ανέδειξε στατιστικώς σημαντική αύξηση του ποσοστού των αστροκυττάρων που καταλαμβάνουν την κοκκώδη στιβάδα της οδοντωτής έλικας στους PTZ ($p_{value} < 0.01$) και στους PAE – PTZ επίμυες ($p_{value} < 0.001$) συγκριτικά με τους επίμυες της ομάδας ελέγχου. Παράλληλα, το ποσοστό των αστροκυττάρων που καταλαμβάνουν την υποκοκκώδη ζώνη βρέθηκε στατιστικώς σημαντικά αυξημένο στους PTZ ($p_{value} < 0.001$) και στους PAE – PTZ επίμυες ($p_{value} < 0.0001$) συγκριτικά με τους επίμυες της ομάδας ελέγχου ενώ η σύγκριση μεταξύ των PAE και PAE – PTZ επίμυων ανέδειξε στατιστικώς σημαντική αύξηση του ποσοστού αυτού στους PAE – PTZ επίμυες συγκριτικά με τους PAE επίμυες τόσο στην υποκοκκώδη ζώνη ($p_{value} < 0.0001$) όσο και στην κοκκώδη στιβάδα ($p_{value} < 0.01$). Τέλος, στατιστικώς σημαντική αύξηση στο ποσοστό που καταλαμβάνουν τα αστροκύτταρα στη στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων ή hilus παρατηρήθηκε στους PAE – PTZ επίμυες συγκριτικά με τους επίμυες

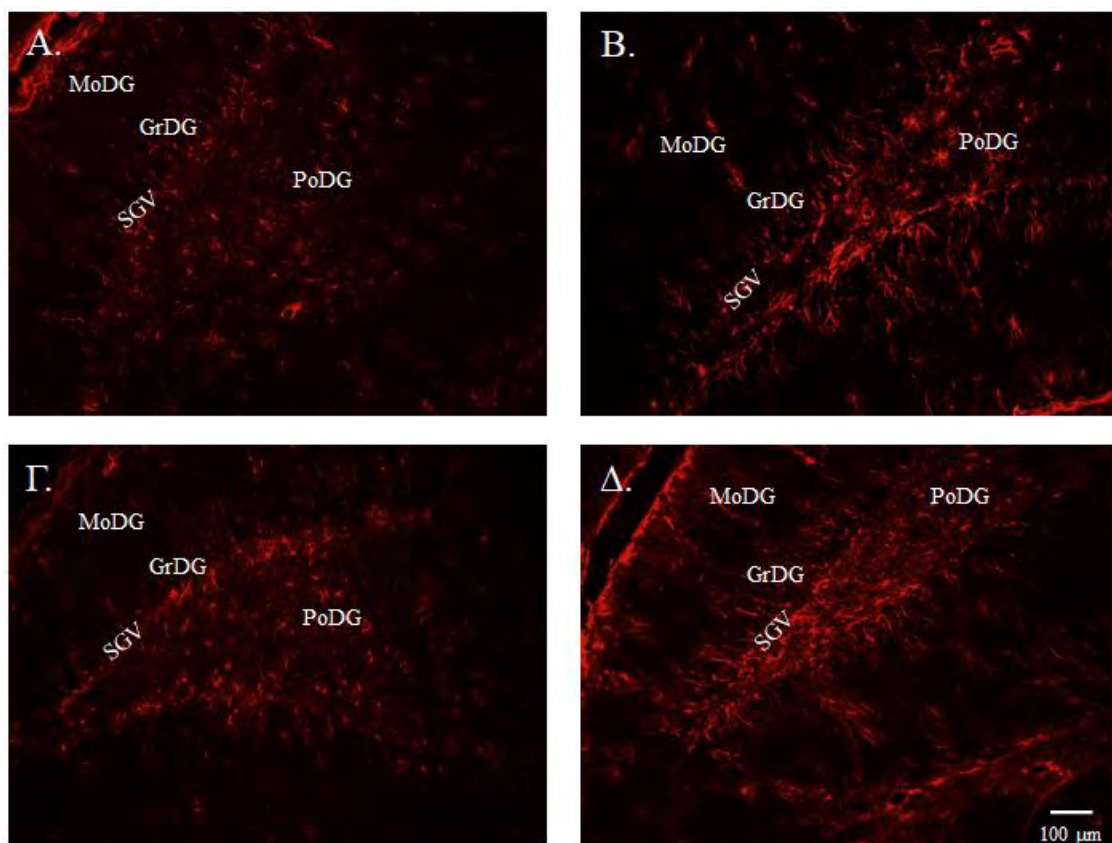
της ομάδας ελέγχου ($p_{value} < 0.001$) αλλά και συγκριτικά με τους PAE επίμυες ($p_{value} < 0.001$) (Εικόνες 47,48).

Πίνακας 9: Μέσος όρος ($\pm$ Std. Error of Mean, SEM) του ποσοστού που καταλαμβάνουν τα αστροκύτταρα στις στιβάδες της οδοντωτής έλικας για τις συνθήκες που εξετάστηκαν ($n = 3 - 5$ ζώα/συνθήκη, 4-7 τομές/ζώο).

Στιβάδες	Ctr	PAE	PTZ	PAE + PTZ
% περιοχής με GFAP-IR				
Μοριακή στιβάδα (Molecular layer, MoDG)	1,86 $\pm$ 0,37	2,94 $\pm$ 0,60	2,63 $\pm$ 0,32	3,46 $\pm$ 0,70
Κοκκώδης στιβάδα (Granular layer, GrDG)	4,41 $\pm$ 0,30	5,80 $\pm$ 0,61	9,82 $\pm$ 0,65	11,77 $\pm$ 1,75
Υποκοκκώδης ζώνη (SubGranular Zone, SGV)	8,00 $\pm$ 0,33	11,98 $\pm$ 0,90	22,27 $\pm$ 2,48	50,52 $\pm$ 1,28
Πολύμορφη στιβάδα (Polymorph layer, PoDG ή hilus)	6,20 $\pm$ 0,13	7,49 $\pm$ 2,39	17,54 $\pm$ 1,17	33,32 $\pm$ 7,60



Εικόνα 47: Διαγράμματα των μέσων όρων ($\pm$ Std. Error of Mean, SEM) του ποσοστού που καταλαμβάνουν τα αστροκύτταρα στις στιβάδες της οδοντωτής έλικας στα ζώα των υπό μελέτη συνθηκών ($n = 3 - 5$ ζώα/συνθήκη, 4-7 τομές/ζώο). * $p_{value} < 0.05$, ** $p_{value} < 0.01$, *** $p_{value} < 0.001$, **** $p_{value} < 0.0001$

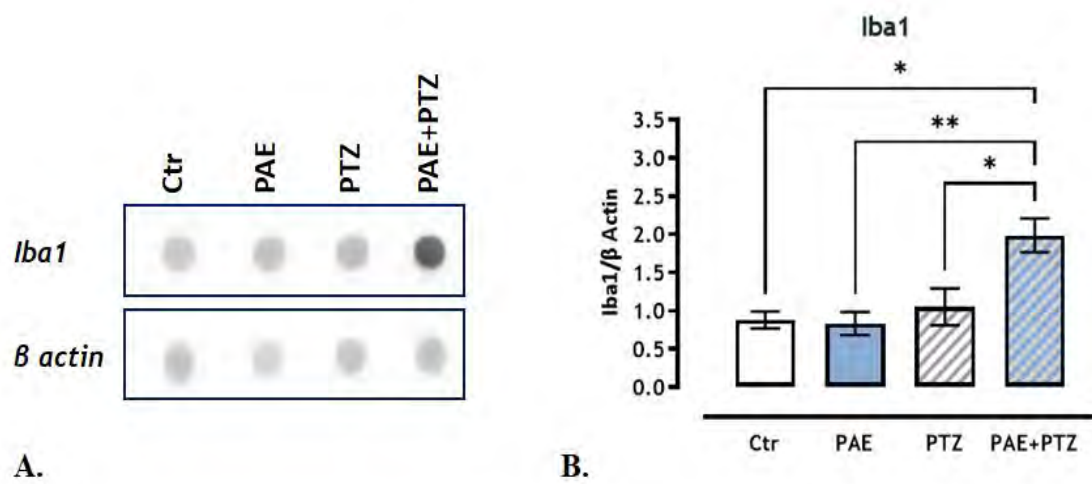


Εικόνα 48: Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της GFAP στις στιβάδες της οδοντωτής έλικας σε **A.** επίμυες της ομάδας ελέγχου, **B.** PAE επίμυες, **Γ.** PTZ επίμυες, **Δ.** PAE – PTZ επίμυες ($n = 3 - 5$ ζώα/συνθήκη, 4-7 τομές/ζώο). Συντμήσεις: GrDG: Granule cell layer Dentate Gyrus (κοκκώδης στιβάδα), SGV: SubGranular Zone (υποκοκκώδης ζώνη), MoDG: Molecular layer Dentate Gyrus (μοριακή στιβάδα), PoDG: Polymorph layer Dentate Gyrus (πολύμορφη στιβάδα). Μεγέθυνση: $\times 10$, Κλίμακα = $100\mu\text{m}$.

3.4. Επίδραση της προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη και της επιληπτογένεσης στην έκφραση της πρωτεΐνης Iba1 των κυττάρων της μικρογλοίας στον υπόκαμφο

3.4.1. Ανοσοαποτύπωση κηλίδας για την πρωτεΐνη Iba1

Η ανοσοαποτύπωση κηλίδας με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης Iba1 των κυττάρων της μικρογλοίας πραγματοποιήθηκε με στόχο τη διερεύνηση πιθανών αλλαγών στην έκφρασή της μεταξύ των υπό μελέτη συνθηκών. Στους επίμυες της ομάδας ελέγχου η έκφραση της Iba1 ήταν $0,88 \pm 0,11$, στους PAE επίμυες ήταν $0,83 \pm 0,15$, στους PTZ επίμυες ήταν $1,05 \pm 0,24$ και στους PAE – PTZ επίμυες ήταν $1,98 \pm 0,22$. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων ανέδειξε στατιστικώς σημαντική αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Iba1 στους PAE – PTZ επίμυες συγκριτικά με τους επίμυες της ομάδας ελέγχου ($p_{\text{value}} < 0.05$) αλλά και τους PAE επίμυες ($p_{\text{value}} < 0.01$) (Εικόνα 49).



Εικόνα 49: **A.** Αντιπροσωπευτικές κηλίδες της έκφρασης της Iba1 και της β -ακτίνης στις τέσσερις ομάδες επίμυων. **B.** Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της Iba1 ως προς τη β -ακτίνη. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ SEM (*Std. Error of Mean*) από μετρήσεις σε 4 - 6 ζώα ανά συνθήκη.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη (*Prenatal Alcohol Exposure, PAE*) δύναται να επιφέρει πλήθος κυτταρικών και μορφολογικών επιπτώσεων στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο, οι οποίες στον άνθρωπο εντάσσονται στο Φάσμα Διαταραχών της Εμβρυικής Ανάπτυξης οφειλόμενη στην κατάχρηση του αλκοόλ (*Fetal Alcohol Spectrum Disorders, FASD*) [22]. Μία εξέχουσα συννοσηρότητα που παρατηρείται σε ποσοστό 3-21% των παιδιών με εμβρυικό αλκοολικό σύνδρομο, τη σοβαρότερη εκδήλωση του FASD, είναι η επιληψία η οποία, ωστόσο, δεν παρατηρείται σε επίμυες με το συγκεκριμένο σύνδρομο [49]. Προκειμένου, λοιπόν, να προσομοιωθεί όσο το δυνατόν καλύτερα το ανθρώπινο εμβρυικό αλκοολικό σύνδρομο ώστε να διερευνηθεί το σύνολο των επιδράσεών του, το Εργαστήριο Φυσιολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων ανέπτυξε μοντέλο μακροχρόνιας PAE [130] (έκθεση Sprague-Dawley επίμυων σε αιθανόλη σε διάστημα ισοδύναμο με την τελειόμηνη ανθρώπινη κύηση και ανάπτυξη του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος) ενώ για την πρόκληση επιληπτικών κρίσεων χρησιμοποιήθηκε ο GABA_A ανταγωνιστής πεντυλενοετραζόλη (*pentylenetetrazol, PTZ*) [131]. Αναλογιζόμενοι τις διαφορετικές χρονικές περιόδους κατά τις οποίες πραγματοποιούνται οι βασικές αναπτυξιακές διαδικασίες στον επίμυ και στον άνθρωπο, η έκθεση των επίμυων στην αιθανόλη πραγματοποιήθηκε καθ' όλη τη διάρκεια της κύησης ενώ συνεχίστηκε μέχρι τον απογαλακτισμό [4].

Τόσο η PAE όσο και η επαγόμενη από την PTZ επιληπτική δραστηριότητα επιδρούν ποικιλοτρόπως σε διάφορες περιοχές του εγκέφαλου του επίμυ, συμπεριλαμβανομένου και του υπόκαμπου στον οποίο εστιάστηκε η προσοχή μας στην παρούσα διπλωματική εργασία. Συνολικά, οι επιπτώσεις της έκθεσης στην αιθανόλη στον υπόκαμπο αντικατοπτρίζονται από προβλήματα στη μνήμη και τη μάθηση σε ανθρώπους και επίμυες [22] ενώ, παράλληλα, συμβάλλουν στην εμφάνιση επιληπτικών κρίσεων στα παιδιά με εμβρυικό αλκοολικό σύνδρομο καθώς ο υπόκαμπος συνιστά μία εγκεφαλική περιοχή που σχετίζεται με τη γένεση ή/και την εξάπλωση της επιληπτικής δραστηριότητας στον εγκέφαλο [1].

Η χρώση των πυρήνων των κυττάρων με την 4',6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλη (4',6-*diamidino-2-phenylindole – DAPI*) και η καταμέτρησή τους στα CA1, CA3 πεδία και στην οδοντωτή έλικα του υπόκαμπου, ανέδειξε στατιστικώς σημαντική μείωση στον αριθμό των κυττάρων στο σύνολο των στιβάδων των περιοχών αυτών στους επίμυες οι οποίοι είχαν εκτεθεί προγεννητικά στην αιθανόλη (PAE επίμυες) συγκριτικά με τους επίμυες ελέγχου. Μείωση στον αριθμό των κυττάρων στη στιβάδα των πυραμιδικών και των κοκκωδών κυττάρων έχει παρατηρηθεί από τον Livy και τους

συνεργάτες του [93] σε Sprague - Dawley επίμυες οι οποίοι είχαν εκτεθεί στην αιθανόλη σε διάστημα ισοδύναμο με το τρίτο τρίμηνο κύησης του ανθρώπου. Η συγκεκριμένη μείωση οφείλεται πιθανώς στην έντονη ενεργοποίηση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου έπειτα από ΡΑΕ και παρατηρείται σε μια ποικιλία κυττάρων σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου [108] συμπεριλαμβανομένου του ιππόκαμπου [109].

Στους επίμυες με τον συνδυασμό των δύο προσβολών (ΡΑΕ – ΡΤΖ επίμυες) παρατηρήθηκε, όπως και στους ΡΑΕ επίμυες, στατιστικώς σημαντική μείωση στον αριθμό των κυττάρων στην πυραμιδική και ακτινωτή στιβάδα των CA1 και CA3 πεδίων καθώς και στην στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων του CA3 πεδίου. Εντούτοις, η σύγκριση μεταξύ των ΡΑΕ – ΡΤΖ και ΡΑΕ επίμυων ανέδειξε στατιστικώς σημαντική αύξηση στον αριθμό των κυττάρων στις κύριες στιβάδες των CA1, CA3 πεδίων και της οδοντωτής έλικας (πυραμιδική και κοκκώδη, αντίστοιχα) στους ΡΑΕ – ΡΤΖ επίμυες. Αντισταθμιστικά, επομένως, πως η μείωση στον πληθυσμό των κυττάρων που παρατηρείται στους ΡΑΕ – ΡΤΖ επίμυες συγκριτικά με τους επίμυες ελέγχου πιθανώς αποδίδεται στην τοξική δράση της αιθανόλης ενώ η αύξηση στον πληθυσμό των κυττάρων που παρατηρείται στους ΡΑΕ – ΡΤΖ επίμυες συγκριτικά με τους ΡΑΕ επίμυες οφείλεται, ενδεχομένως, στη χορήγηση της ΡΤΖ.

Όπως προαναφέρθηκε, η χρωστική DAPI σημαίνει τους πυρήνες των κυττάρων καθώς αναγνωρίζει το δινοκλεοτίδιο Αδενίνη - Θυμίνη (ΑΤ) του δίκλωνου DNA. Συνεπώς, η χρώση DAPI δε μας δίνει τη δυνατότητα να αξιολογήσουμε ποιος κυτταρικός πληθυσμός υφίσταται μείωση ή αύξηση στην εκάστοτε περίπτωση. Έτσι, οι ανοσοϊστοχημικές χρώσεις που ακολούθησαν με αντισώματα έναντι του νευρωνικού πυρηνικού αντιγόνου (*Neuronal Nuclei antigen, NeuN*) και της όξινης πρωτεΐνης των ενδιάμεσων ινιδίων της γλοίας (*Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP*) τα οποία σημαίνουν ώριμους νευρώνες και αστροκύτταρα, αντίστοιχα, αποσκοπούσαν στο να διαπιστωθεί ο κυτταρικός πληθυσμός που επηρεάζεται από την προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη, την επιληπτογένεση και το συνδυασμό των δύο αυτών προσβολών.

Η καταμέτρηση του αριθμού των ώριμων νευρώνων πραγματοποιήθηκε στην πυραμιδική στιβάδα των CA1 και CA3 πεδίων και στην κοκκώδη στιβάδα της οδοντωτής έλικας όπου είχε παρατηρηθεί η αύξηση του αριθμού των κυττάρων στους ΡΑΕ – ΡΤΖ επίμυες συγκριτικά με τους ΡΑΕ επίμυες. Ειδικότερα, τα αποτελέσματα της καταμέτρησης του αριθμού των ώριμων νευρώνων ανέδειξαν στατιστικώς σημαντική μείωση στον αριθμό των νευρώνων στην πυραμιδική στιβάδα του CA1 και CA3 πεδίου και στην κοκκώδη στιβάδα της οδοντωτής έλικας στους ΡΑΕ επίμυες συγκριτικά με τους επίμυες ελέγχου. Τα αποτελέσματα μας είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες όπου παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση στον αριθμό των πυραμιδικών νευρώνων του CA1 πεδίου έπειτα από έκθεση επίμυων σε αιθανόλη σε διαστήματα ισοδύναμα με το δεύτερο και τρίτο τρίμηνο της ανθρώπινης κύησης [92]. Η μείωση αυτή του αριθμού των ώριμων νευρώνων

οφείλεται πιθανώς στη νευροτοξική δράση της αιθανόλης μια και παρόμοια μείωση της NeuN-ανοσοδραστικότητας έχει διαπιστωθεί μετά από οξεία χορήγηση αιθανόλης σε ενήλικους επίμυες [34,37].

Ωστόσο, οι νευρώνες που υφίσταται μείωση δεν είναι απαραίτητα πυραμιδικοί αλλά μπορεί να αποτελούν και διανευρώνες των υπό μελέτη περιοχών καθώς το anti-NeuN αντίσωμα έχει βρεθεί ότι σημαίνει και διανευρώνες [110]. Ειδικότερα, σε πειράματα προγεννητικής και μεταγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη έχει παρατηρηθεί μείωση στους GABAεργικούς διανευρώνες του ραχιαίου ιππόκαμπου τόσο στα CA1 και CA3 πεδία όσο και στην οδοντωτή έλικα, μείωση η οποία έχει αποδοθεί σε αποπτωτικό θάνατο των διανευρώνων όπως αυτός αντικατοπτρίζεται από την αύξηση της έκφρασης της κασπάσης-3, ενός δείκτη της απόπτωσης, στα κύτταρα αυτά [111-113].

Αναφορικά με την οδοντωτή έλικα, μία ακόμη εξήγηση που θα μπορούσε να δοθεί σχετικά με τον μειωμένο αριθμό των ώριμων NeuN-θετικών νευρώνων στους ΡΑΕ επίμυες είναι η καθυστέρηση της διαφοροποίησης των νευρικών προγονικών κυττάρων (NPCs)⁷ σε ώριμους νευρώνες εξαιτίας της προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη. Πράγματι, ο Singh και οι συνεργάτες του [114] διαπίστωσαν, μετά από απομόνωση και καλλιέργεια NPC κυττάρων ιπποκάμπου, ότι οι δείκτες νευρογένεσης β-κατενίνη, Wnt 3, 5a και 11 ήταν μειωμένοι στα NPC κύτταρα ΡΑΕ επίμυων σε σύγκριση με αντίστοιχα κύτταρα ζώων ελέγχου. Παράλληλα, οι ίδιοι ερευνητές διαπίστωσαν ότι, τα NPCs ΡΑΕ επίμυων δεν εξέφραζαν ακόμη και 17 ημέρες μετά την απομόνωσή τους δείκτες όπως η β-II τουμπουλίνη αποτελεί δείκτη διαφοροποίησης των NPCs σε ανώριμους, αρχικά, νευρώνες. Τέλος, οι ερευνητές αυτοί παρατήρησαν ότι 29 ημέρες μετά την απομόνωση τους, τα NPC κύτταρα των ΡΑΕ επίμυων διατηρούσαν την έκφραση δεικτών της γλοίας (π.χ. GFAP) γεγονός που ενισχύει την υπόθεση της αδυναμίας διαφοροποίησης των κυττάρων της ακτινωτής γλοίας σε νευρικά.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, πρόκληση επιληψίας σε ζώα που είχαν εκτεθεί προγεννητικά σε αιθανόλη, με χορήγηση PTZ την 21 ημέρα μετά τη γέννηση τους, οδήγησε σε στατιστικώς σημαντική αύξηση του αριθμού των νευρώνων στην πυραμιδική στιβάδα του CA1 και CA3 πεδίου και στην κοκκώδη στιβάδα της οδοντωτής έλικας συγκριτικά με τα ζώα που είχαν εκτεθεί προγεννητικά σε αιθανόλη. Η αύξηση αυτή, θα μπορούσε να οφείλεται σε αντίστοιχη αύξηση του ινσουλινόμορφου αυξητικού παράγοντα-1 (*Insulin-like Growth Factor-1, IGF-1*). Είναι γνωστό ότι ο IGF-1, υπό φυσιολογικές συνθήκες, συμμετέχει στη διαδικασία της νευρογένεσης, της διαφοροποίησης και της ωρίμανσης των νευρώνων ενώ αύξησή του έχει διαπιστωθεί τόσο σε ασθενείς με επιληψία κροταφικού λοβού (*Temporal*

⁷ Τα νευρικά προγονικά κύτταρα (*Neural Progenitor Cells, NPCs*), είναι τα προγονικά κύτταρα του ΚΝΣ από τα οποία προέρχονται πολλοί, αν όχι όλοι, οι τύποι των νευρογλοιακών και νευρικών κυττάρων του ΚΝΣ. Στον ώριμο ιππόκαμπο τα κύτταρα αυτά εντοπίζονται στην υποκοκκώδη ζώνη (*Subgranular zone, SGZ*), της οδοντωτής έλικας.

Lobe Epilepsy, TLE) όσο και σε ζωικά μοντέλα πρόκλησης επιληπτικών κρίσεων με πιλοκαρπίνη και PTZ [115, 118]. Βάση των παραπάνω, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι στην περίπτωση ύπαρξης ανώριμων νευρώνων στην πυραμιδική στιβάδα του CA1 και CA3 πεδίου, η αύξηση που προκαλεί η χορήγηση της PTZ στον IGF-1 συμβάλλει στην ωρίμανση των νευρώνων αυτών και έτσι παρατηρείται, στην περίπτωση των PAE – PTZ επίμυων, αύξηση στον αριθμό των NeuN-θετικών νευρώνων συγκριτικά με τους PAE επίμυες.

Η πιθανότητα ύπαρξης ανώριμων νευρώνων στο CA1 και CA3 πεδίο υπό φυσιολογικές συνθήκες υποστηρίζεται από πειράματα της La Rosa και των συνεργατών της [116] οι οποίοι πρόσφατα παρατήρησαν την ύπαρξη ανώριμων νευρώνων στον ενήλικο εγκεφαλικό φλοιό διάφορων θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένου και του επίμου. Οι συγκεκριμένοι νευρώνες πιθανώς εμπλέκονται στη νευρική πλαστικότητα και, αν και δημιουργούνται προγεννητικά, εξακολουθούν να εκφράζουν δείκτες ανώριμων νευρικών κυττάρων όπως η *doublecortin (DCX)* κατά την ενήλικη ζωή [116]. Η παρουσία ανώριμων νευρώνων στο CA1 πεδίου του ιπποκάμπου ενήλικων επίμυων ενισχύεται και από τη μελέτη του Lee και των συνεργατών του [117] οι οποίοι διαπίστωσαν ότι πρόκληση παροδικής εγκεφαλικής ισχαιμίας με απόφραξη των κοινών καροτιδικών αρτηριών για 5 λεπτά οδηγεί σε διαφοροποίηση προγονικών νευρικών κυττάρων σε νέους GABAεργικούς νευρώνες στο CA1 πεδίο του ιπποκάμπου μογγολικού χάμστερ (*gerbil*) η αύξηση των οποίων ήταν ορατή 3 μήνες μετά την ισχαιμική βλάβη.

Όσον αφορά στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου, τα πειράματα του Jiang και των συνεργατών του [118] απέδειξαν πως η χορήγηση μίας και μόνο δόσης 60mg/kg PTZ ενδοπεριτοναϊκά, εγείρει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στη στιβάδα των κοκκωδών κυττάρων. Με τη χρήση κατάλληλων βιοδεικτών επιβεβαιώθηκε ότι τα κύτταρα αυτά ήταν νευρικά, ενώ ελάχιστα από αυτά ήταν αστροκύτταρα [118]. Συμπεράναν, έτσι, ότι η χορήγηση της PTZ εγείρει τη νευρογένεση στη στιβάδα των κοκκωδών κυττάρων της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου. Συνεπώς, εύλογα θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η αύξηση των ώριμων νευρώνων στους PAE – PTZ επίμυες συγκριτικά με τους PAE επίμυες οφείλεται στον πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των νευρικών προγονικών κυττάρων της υποκοκκώδους ζώνης (*Subgranular zone, SGZ*), πολλαπλασιασμός ο οποίος πιθανώς εγείρεται από την αύξηση που προκαλεί η χορήγηση της PTZ στον IGF-1 [115, 119]. Τα συγκεκριμένα κύτταρα χαρακτηρίζονται από έκφραση της GFAP και φέρουν, γενικότερα, χαρακτηριστικά των αστροκυττάρων ενώ ο πολλαπλασιασμός τους οδηγεί στη δημιουργία νευροβλαστών οι οποίοι στη συνέχεια διαφοροποιούνται σε κοκκώδη κύτταρα που μεταναστεύουν στην κοκκώδη στιβάδα [120].

Ωστόσο, θα ήταν παράλειψη να μην αναφερθούμε στην πιθανότητα δημιουργίας αστροκυττάρων πέραν της δημιουργίας νευρικών κυττάρων στην οδοντωτή έλικα από τα προαναφερθέντα πολυδύναμα προγονικά κύτταρα. Ειδικότερα, η Sierra και οι συνεργάτες της [121] παρατήρησαν ότι χορήγηση υψηλών συγκεντρώσεων καϊνικού

οξέος σε ποντίκια, με σκοπό την προσομοίωση της επιληψίας έσω κροταφικού λοβού (*medial Temporal Lobe Epilepsy, MTL*), έχει ως αποτέλεσμα τη μετατροπή των ακτινωτών νευρικών βλαστοκυττάρων (*radial Neural Stem Cells, rNSCs*) της υποκοκκώδους ζώνης της οδοντωτής έλικας σε αντιδραστικά αστροκύτταρα. Συνεπώς, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι στους PAE - PTZ επίμυες πραγματοποιείται, πιθανώς, μετατροπή των rNSCs σε αντιδραστικά αστροκύτταρα και, επομένως, λαμβάνει χώρα αστρογλιογένεση. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται και από τα αποτελέσματα μας μια και διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση στην ανοσοδραστικότητα της GFAP τόσο στην στιβάδα των κοκκωδών κυττάρων όσο και στην SGZ στους επίμυες PTZ-PAE επίμυες συγκριτικά με τους επίμυες ελέγχου και τους PAE επίμυες.

Παρόμοια αύξηση στην ανοσοδραστικότητα της GFAP δεν παρατηρήθηκε στις κύριες στιβάδες των CA1 και CA3 πεδίων στους PAE – PTZ επίμυες. Αντιθέτως, στατιστικώς σημαντική αύξηση στην ανοσοδραστικότητα της GFAP, όσον αφορά στην πυραμιδική και την ακτινωτή στιβάδα του CA1 πεδίου, παρατηρήθηκε στους PAE επίμυες συγκριτικά με τους επίμυες ελέγχου. Όπως προαναφέρθηκε, *in vivo* μελέτες έκθεσης στην αιθανόλη έχουν αποδείξει ότι η αιθανόλη προκαλεί μορφολογικές αλλαγές στα αστροκύτταρα [30] τα οποία ενεργοποιούνται και γίνονται αντιδραστικά ως απόκριση στην προσβολή [42] με χαρακτηριστική την υπερτροφία του κυτταρικού σώματος και των αποφύσεων τους η οποία μεταφράζεται σε αύξηση των επιπέδων έκφρασης της GFAP [43]. Συνεπώς, η αύξηση στην ανοσοδραστικότητα της GFAP είναι ενδεικτική της ύπαρξης αντιδραστικών αστροκυττάρων και φλεγμονής στην πυραμιδική και ακτινωτή στιβάδα του CA1 πεδίου.

Η αύξηση της ανοσοδραστικότητας της GFAP (ύπαρξη αντιδραστικών αστροκυττάρων) στην πυραμιδική στιβάδα του CA1 πεδίου μετά από προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη θα μπορούσε να σχετίζεται με τη μείωση του αριθμού των ώριμων νευρώνων την οποία παρατηρήσαμε στη στιβάδα αυτή δεδομένου. Είναι γνωστό ότι τα αντιδραστικά αστροκύτταρα εκκρίνουν μία σειρά μορίων με νευροτοξική δράση. Συγκεκριμένα, ως απόκριση στην ενεργοποίηση του TLR-4 από την αιθανόλη τα αντιδραστικά αστροκύτταρα εκκρίνουν μεταξύ άλλων και δραστικές ρίζες οξυγόνου (*Reactive Oxygen Species, ROS*) [23,30] στις επιδράσεις των οποίων ο εγκέφαλος είναι επιρρεπής ως ένα όργανο με υψηλό μεταβολικό ρυθμό που εκτίθεται σε μεγάλες ποσότητες οξυγόνου και τα αντιοξειδωτικά ένζυμα που περιέχει χαρακτηρίζονται από χαμηλά επίπεδα κατάλυσης [122].

Η αστρογλίωση, ωστόσο, αποτελεί σημαντικό χαρακτηριστικό και των εστιών της επιληπτικής δραστηριότητας και είναι εμφανής σε ποσοστό έως και 90% σε ιππόκαμπους που έχουν αφαιρεθεί χειρουργικά από επιληπτικούς ασθενείς [123].

Από τη μελέτη επιληπτικών μοντέλων, προκύπτει πως τα αντιδραστικά αστροκύτταρα εκκρίνουν αυξημένη ποσότητα μορίων με συναπτογόνο δράση όπως η θρομβοσπονδίνη 1 (*thrombospondin 1, TSP-1*), η οποία επάγει το σχηματισμό διεγερτικών συνάψεων, και μπορούν, συνεπώς να υποστηρίξουν την παρατηρούμενη

νεο-συναπτογένεση που παρατηρείται κατά τη λανθάνουσα περίοδο σε μοντέλα επιληψίας [124]. Δεδομένης αυτής της παρατήρησης και αναλογιζόμενοι την, επαγόμενη από την επιληπτική δραστηριότητα, εκβλάστηση (*sprouting*) των βρυωδών ινών των κοκκωδών κυττάρων της οδοντωτής έλικας τα οποία καταλήγουν στη διαυγή στιβάδα για να δημιουργήσουν διεγερτικές συνάψεις με τα πυραμιδικά κύτταρα του CA3 πεδίου [125], θα μπορούσαμε να εξηγήσουμε την αύξηση στην ανοσοδραστικότητα της GFAP στη συγκεκριμένη στιβάδα στους PTZ επίμυες. Συγκεκριμένα, η αύξηση στην ανοσοδραστικότητα της GFAP στη διαυγή στιβάδα του CA3 πεδίου στους PTZ επίμυες οφείλεται στην ύπαρξη των αντιδραστικών αστροκυττάρων τα οποία, ενδεχομένως εκκρίνοντας μόρια που συμμετέχουν στη συναπτογένεση, πιθανώς συμβάλλουν στη δημιουργία διεγερτικών συνάψεων μεταξύ των βρυωδών ινών των κοκκωδών κυττάρων που εκβλαστάνουν με τα πυραμιδικά κύτταρα του CA3 πεδίου.

Στην προσπάθεια μας να διαπιστώσουμε αν η προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη, ένα επεισόδιο *status epilepticus* κατά τον απογαλακτισμό και ο συνδυασμός τους έχουν κάποια μακροχρόνια επίδραση στη συναπτογένεση στο ιππόκαμπο επίμυων αναπτύξαμε στο εργαστήριο την μέθοδο Golgi-Cox. Δυστυχώς, αν και με την τεχνική αυτή ήμασταν σε θέση να αναλύσουμε την συναπτική πυκνότητα των αποφύσεων μεμονωμένων νευρώνων σε όλες τις περιοχές του ιπποκάμπου φυσιολογικών Wistar επίμυων ηλικίας δύο μηνών⁸, δεν ήταν δυνατή η σήμανση των νευρώνων των εγκεφάλων Sprague-Dawley ζώων που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία. Το γεγονός αυτό πιθανά οφείλεται στην αναγκαστική ψύξη των ιστών για τη μεταφορά τους στο εργαστήριο από το Εργαστήριο Φυσιολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Τέλος, μετά από ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης προσαρμογής 1 που δεσμεύει ελεύθερο Ca^{2+} (*Ionized calcium-binding adapter molecule 1 - Iba1*) των μικρογλοιακών κυττάρων, με ανοσοαποτύπωση κηλίδας παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης αυτής στην περίπτωση των PAE – PTZ επίμυων οι οποίοι προκύπτουν από τον συνδυασμό των δύο προσβολών. Η αύξηση στα πρωτεϊνικά επίπεδα της Iba1 στους PAE – PTZ επίμυες είναι ενδεικτική της ενεργοποίησης των κυττάρων της μικρογλοίας και της έντονης φλεγμονής που πιθανώς προκαλεί ο συνδυασμός των δύο αυτών προσβολών και το γεγονός ότι εμμένει ακόμη και ένα μήνα μετά τη λήξη της έκθεσης των επίμυων στο αλκοόλ και της πρόκλησης επιληπτικών κρίσεων με την PTZ. Αντίστοιχη μακροχρόνια ενεργοποίηση των κυττάρων της μικρογλοίας έχει παρατηρηθεί και σε ποντίκια τα οποία είχαν εκτεθεί σε λιποπολυσακχαρίτες (*Lipopolysaccharide, LPS*) [126]. Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη μελέτη, η επαγόμενη από LPS οξεία

⁸ Ηλικία αντίστοιχη αυτής των Sprague-Dawley ζώων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

συστηματική φλεγμονή οδηγεί σε μικρογλοΐωση η οποία είναι εμφανής ακόμη και 50 ημέρες μετά την έκθεση των ζώων σε LPS. Παράλληλα, η αύξηση στα επίπεδα έκφρασης της Iba1 στους PAE – PTZ επίμυες συγκριτικά με τους επίμυες ελέγχου, ενδεχομένως να οφείλεται σε αύξηση του αριθμού των μικρογλοϊακών κυττάρων, η οποία πιθανώς προκύπτει είτε από αύξηση της μεταναστευτικής ροής μονοπύρηνων κυττάρων στον εγκέφαλο, είτε από τον πολλαπλασιασμό των μικρογλοϊακών κυττάρων τοπικά εξαιτίας της νευροφλεγμονής [127].

Αξίζει να σημειωθεί ότι ενώ τόσο η έκθεση στην αιθανόλη [30, 35, 37-40] όσο και η πρόκληση επιληπτικών κρίσεων με PTZ [133] είναι γνωστό ότι οδηγούν σε άμεση αύξηση των επιπέδων της Iba1, εντούτοις, σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, η αύξηση αυτή, εάν υπάρχει, είναι παροδική μια και δεν παρατηρήσαμε καμία μακροχρόνια αλλαγή στην έκφραση της πρωτεΐνης αυτής μετά από έκθεση των ζώων στις δύο αυτές προσβολές χωριστά.

Δεδομένου ότι, τα μικρογλοϊακά κύτταρα έχουν διττό ρόλο τόσο κατά την ανάπτυξη της φλεγμονής (*προ- και αντι- φλεγμονώδη δράση*) όσο και κατά τη νευρογένεση (*προ- και αντι- νευρογεννητική δράση*) [128], μία ακόμη εξήγηση που θα μπορούσε να δοθεί σχετικά με την αύξηση των επιπέδων έκφρασης της Iba1 στους PAE – PTZ επίμυες είναι η συμβολή των μικρογλοϊακών κυττάρων στην νευρογένεση στα ζώα αυτά. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από την παρατήρηση ότι καλλιέργεια νευρικών προγονικών κυττάρων (*Neural Progenitor Cells, NPCs*) της υποκοιλιακής ζώνης (*Subventricular Zone, SVZ*) τόσο ενήλικης όσο και εμβρυακής προέλευσης παρουσία μικρογλοϊακών κυττάρων οδηγεί στη διαφοροποίηση κυττάρων αυτών προς ώριμα νευρικά κύτταρα [128-130].

Συμπερασματικά, η παρούσα διπλωματική εργασία έρχεται να επιβεβαιώσει τα αποτελέσματα τόσο προκλινικών όσο και κλινικών μελετών σχετικά με την αρνητική επίδραση της προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη υποδεικνύοντας πιθανή διαταραχή της διαδικασίας της νευρογένεσης ή εκφυλισμό των νευρώνων και φλεγμονή στον εγκέφαλο PAE επίμυων. Ταυτόχρονα, αποτελεί έναυσμα ώστε να στραφεί το ενδιαφέρον των ερευνών στη διερεύνηση των αλλαγών που επιφέρει η επιληψία, ως συννοσηρότητα, στα παιδιά με εμβρυικό αλκοολικό σύνδρομο και σε μοντέλα έκθεσης στην αιθανόλη **σε κυτταρικό επίπεδο** μια και, σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, μια και μόνη επιληπτική κρίση επί εδάφους PAE πιθανώς εγείρει/επανεκκινεί (;) τη νευρογένεση.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Hashemi P, Roshan-Milani S, Saboory E, Ebrahimi L, Soltanineghad M, Interactive effects of prenatal exposure to restraint stress and alcohol on pentylenetetrazol-induced seizure behaviors in rat offspring, *Alcohol*, 2016; 56: 51-57
2. Sherwood L, Εισαγωγή στη Φυσιολογία του Ανθρώπου – Από τα κύτταρα στα συστήματα, Ακαδημαϊκές εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε., 2016; Όγδοη έκδοση: 174-176
3. Lenroot RK, Giedd JN, Brain development in children and adolescents: Insights from anatomical magnetic resonance imaging, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2006; 30: 718–729
4. Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, Ferriero DM, Noble-Haeusslein L, Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species, *Progress in Neurobiology*, 2013; 106-107: 1-16
5. Zeiss CJ, Comparative Milestones in Rodent and Human Postnatal Central Nervous System Development, *Toxicologic Pathology*, 2021; 49(8): 1368-1373
6. Reemst K, Noctor SC, Lucassenand PJ, Hol EM, The Indispensable Roles of Microglia and Astrocytes during Brain Development, *Frontiers in Human Neuroscience*, 2016; 10
7. Kandel E, Schwartz JH, Jessell TM, Νευροεπιστήμη και συμπεριφορά, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2020; Δεύτερη Έκδοση: 23-31
8. Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A, Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper, *Neuron*, 2013; 77: 10-18
9. Kane C, Drew P, Neuroinflammatory contribution of microglia and astrocytes in fetal alcohol spectrum disorders, *Journal of neuroscience research*, 2021; 99(8): 1973–1985
10. Mori T, Buffo A, Götz M, The Novel Roles of Glial Cells Revisited: The Contribution of Radial Glia and Astrocytes to Neurogenesis, *Current Topics in Developmental Biology*, 2005; 69: 67-99
11. Verkhratsky A, Parpura V, Li B, Scuderi C, Astrocytes: The Housekeepers and Guardians of the CNS, *Advances in Neurobiology*, 2021; 26: 21–53
12. Verkhratsky A, Nedergaard M, Physiology of Astroglia, *Physiological Reviews*, 2018; 98(1): 239–389
13. Cresto N, Pillet L-E, Billuart P, Rouach N, Do Astrocytes Play a Role in Intellectual Disabilities?, *Trends in Neurosciences*, 2019; 42(8): 518-527
14. Klaassen C, Watkis J, Casarett & Doul - Βασική Τοξικολογία, Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιανού, 2010; Δεύτερη έκδοση

15. Goullé J-P, Guerbet M, Pharmacokinetics, metabolism, and analytical methods of ethanol, *Annales pharmaceutiques francaises*, 2015; 73(5): 313-32
16. Paquot N, The metabolism of alcohol, *Revue medicale de Liege*, 2019; 74(5-6): 265-267
17. Gupta K, Gupta V, Shirasaka T, An Update on Fetal Alcohol Syndrome - Pathogenesis, Risks, and Treatment, *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 2016; 40(8): 1594–1602
18. Heier C, Xie H, Zimmermann R, Nonoxidative ethanol metabolism in humans - from biomarkers to bioactive lipids, *IUBMB Life*, 2016; 68(12): 916-923
19. Burd L, Blair J, Dropps K, Prenatal alcohol exposure, blood alcohol concentrations and alcohol elimination rates for the mother, fetus and newborn, *Journal of Perinatology*, 2012; 32(9): 652-659
20. Rice D, Barone S, Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System: Evidence from Humans and Animal Models, *Environmental Health Perspectives*, 2000; 108(3): 511–533
21. Almeida L, Andreu-Fernández V, Navarro-Tapia E, Aras-López R, Serra-Delgado M, Martínez L, García-Algar O, Gómez-Roig MD, Murine Models for the Study of Fetal Alcohol Spectrum Disorders: An Overview, *Frontiers in Pediatrics*, 2020; 8
22. Gil-Mohapel J, Boehme F, Kainer L, Christie B, Hippocampal cell loss and neurogenesis after fetal alcohol exposure: Insights from different rodent models, *Brain Research Reviews*, 2010; 64: 283 – 303
23. Alfonso-Loeches S, Guerri C, Molecular and behavioral aspects of the actions of alcohol on the adult and developing brain, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 2011; 48(1): 19-47
24. Drew P, Kane C, Fetal Alcohol Spectrum Disorders and Neuroimmune Changes, *International Review of Neurobiology*, 2014; 118: 41-80
25. Abbott C, Kozanian O, Kanaan J, Wendel K, Huffman K, The Impact of Prenatal Ethanol Exposure on Neuroanatomical and Behavioral Development in Mice, *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 2016; 40(1): 122-133
26. Saito M, Chakraborty G, Hui M, Masiello K, Saito M, Ethanol-Induced Neurodegeneration and Glial Activation in the Developing Brain, *Brain Sciences*, 2016; 6: 31
27. Fernandez-Lizarbe S, Montesinos J, Guerri C, Ethanol induces TLR4/TLR2 association, triggering an inflammatory response in microglial cells, *Journal of Neurochemistry*, 2013; 126(2): 261-273
28. Ciesielska A, Matyjek M, Kwiatkowska K, TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2021; 78(4): 1233-1261

29. Fernandez-Lizarbe S, Pascual M, Guerri C, Critical role of TLR4 response in the activation of microglia induced by ethanol, *Journal of Immunology*, 2009; 183(7): 4733-4744
30. Alfonso-Loeches S, Pascual-Lucas M, Blanco A, Sanchez-Vera I, Guerri C, Pivotal Role of TLR4 Receptors in Alcohol-Induced Neuroinflammation and Brain Damage, *The Journal of Neuroscience*, 2010; 30(24): 8285– 8295
31. Davis RL, Syapin PJ, Ethanol increases nuclear factor-kappa B activity in human astroglial cells, *Neuroscience Letters*, 2004; 371: 128-132
32. Qin L, Crews F, NADPH oxidase and reactive oxygen species contribute to alcohol-induced microglial activation and neurodegeneration, *Journal of Neuroinflammation*, 2012; 9: 5
33. Ikegami Y, Goodenough S, Inoue Y, Dodd PR, Wilce PA, Matsumoto I, Increased TUNEL positive cells in human alcoholic brains, *Neuroscience Letters*, 2003; 349: 201–205
34. Vilpoux C, Fouquet G, Deschamps C, Lefebvre E, Gosset P, Antol J, Zabijak L, Marcq I, Naassila M, Pierrefiche O, Astroglisis and compensatory neurogenesis after the first ethanol binge drinking-like exposure in the adolescent rat, *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 2021; 00: 1-14
35. West RK, Rodgers SP, Leasure JL, Neural perturbations associated with recurrent binge alcohol in male and female rats, *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 2021; 45: 365-374
36. Reynolds A, Saunders M, Berry J, Sharrett-Field L, Winchester S, Prendergast M, Broad-spectrum protein kinase inhibition by the staurosporine analog KT-5720 reverses ethanol withdrawal-associated loss of NeuN/Fox-3, *Alcohol*, 2017; 64: 37-43
37. Ji Z, Yuan L, Lu X, Ding H, Luo J, Ke Z-J, Binge Alcohol Exposure Causes Neurobehavioral Deficits and GSK3 β Activation in the Hippocampus of Adolescent Rats, *Scientific Reports*, 2018; 8: 3088
38. Bennett ML, Viaene AN, What are activated and reactive glia and what is their role in neurodegeneration?, *Neurobiology of Disease*, 2021; 148: 105172
39. Li Q, Liu D, Pan F, Ho C, Ho R, Ethanol Exposure Induces Microglia Activation and Neuroinflammation through TLR4 Activation and SENP6 Modulation in the Adolescent Rat Hippocampus, *Neural Plasticity*, 2019: 1648736
40. Marshall A, McClain J, Wooden J, Nixon K, Microglia Dystrophy Following Binge-Like Alcohol Exposure in Adolescent and Adult Male Rats, *Frontiers in Neuroanatomy*, 2020; 14
41. Gómez G, Falcon R, Maturana C, Labra V, Salgado N, Rojas C, Oyarzun J, Cerpa W, Quintanilla R, Orellana J, Heavy Alcohol Exposure Activates Astroglial Hemichannels and Pannexons in the Hippocampus of Adolescent Rats: Effects on Neuroinflammation and Astrocyte Arborization, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2018; 12: 472

42. Sofroniew M, Astrogliosis, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2015; 7: a020420
43. Anderson M, Ao Y, Sofroniew M, Heterogeneity of reactive astrocytes, Neuroscience Letters, 2014; 565: 23-29
44. Pekny M, Wilhelmsson U, Pekna M, The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis, Neuroscience Letters, 2014; 565: 30-38
45. Vainchtein I, Molofsky A, Astrocytes and Microglia: In Sickness and in Health, Trends in Neuroscience, 2020; 43(3): 144-154
46. Patten A, Fontaine C, Christie B, A comparison of the different animal models of fetal alcohol spectrum disorders and their use in studying complex behaviors, Frontiers in Pediatrics, 2014; 2: 93
47. Maier S, West J, Patterns and Alcohol-Related Birth Defects, National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism
48. Amborgini P, Torquato P, Bartolini D, Albertini MC, Lattanzi D, Di Palma M, Marinelli R, Betti M, Minelli A, Cuppini R, Galli F, Excitotoxicity, neuroinflammation and oxidant stress as molecular bases of epileptogenesis and epilepsy-derived neurodegeneration: The role of vitamin E, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2019; 1865(6): 1098-1112
49. Bell S, Stade B, Reynolds J, Rasmussen C, Andrew G, Hwang P, Carlen P, The Remarkably High Prevalence of Epilepsy and Seizure History in Fetal Alcohol Spectrum Disorders, Alcoholism: Clinical and Experimental Research, 2010; 34(6): 1084–1089
50. Shneker B, Fountain N, Epilepsy, Disease-a-Month, 2003; 49(7): 426-478
51. Prisco L, Ganau M, Aurangzeb S, Moswela O, Hallett C, Raby S, Fitzgibbon K, Kearns C, Sen A, A pragmatic approach to intravenous anaesthetics and electroencephalographic endpoints for the treatment of refractory and super-refractory status epilepticus in critical care, Seizure, 2020; 75: 153-164
52. Cho S, Lovinger D, N’Gouemo P, Prenatal alcohol exposure enhances the susceptibility to NMDA-induced generalized tonic-clonic seizures in developing rats, CNS Neuroscience & Therapeutics, 2017; 23(10): 808-817
53. Trinka E, Cock H, Hesdorffer D, Rossetti A, Scheffer I, Shinnar S, Shorvon S, Lowenstein D, A definition and classification of status epilepticus - Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus, Epilepsia, 2015; 56(10): 1515–1523
54. Wasterlain C, Chen J, Mechanistic and pharmacologic aspects of status epilepticus and its treatment with new antiepileptic drugs, Epilepsia, 2008; 49(9): 63-73
55. Armada-Moreira A, Gomes J, Pina C, Savchak O, Gonçalves-Ribeiro J, Rei N, Pinto S, Morais T, Martins RS, Ribeiro F, Sebastião A, Crunelli V, Vaz S, Going the Extra (Synaptic) Mile: Excitotoxicity as the Road Toward Neurodegenerative Diseases, Frontiers in Cellular Neuroscience, 2020; 14: 90

56. Hei Y, Chen R, Yi X, Long Q, Gao D, Liu W, HMGB1 Neutralization Attenuates Hippocampal Neuronal Death and Cognitive Impairment in Rats with Chronic Cerebral Hypoperfusion via Suppressing Inflammatory Responses and Oxidative Stress, *Neuroscience*, 2018; 383: 150-159
57. Zhao J, Wang Y, Xu C, Liu K, Wang Y, Chen L, Wu X, Gao F, Guo Y, Zhu J, Wang S, Nishibori M, Chen Z, Therapeutic potential of an anti-high mobility group box-1 monoclonal antibody in epilepsy, *Brain, behavior, and immunity*, 2017; 64: 308-319
58. Crews F, Qin L, Sheedy D, Vetreno R, Zou J, High mobility group box 1/Toll-like receptor danger signaling increases brain neuroimmune activation in alcohol dependence, *Biological Psychiatry*, 2013; 73(7): 602-612
59. Luo Z, Xu M, Zhang L, Zhang H, Xu Z, Xu Z, Glycyrrhizin regulates the HMGB1/P38MAPK signalling pathway in status epilepticus, *Molecular Medicine Reports*, 2023; 27(2): 45
60. Zhao J, et al., HMGB1 Is a Therapeutic Target and Biomarker in Diazepam-Refractory Status Epilepticus with Wide Time Window, *Neurotherapeutics*, 2020; 17: 710-721
61. Luan G, Gao Q, Zhai F, Chen Y, Li T, Upregulation of HMGB1, toll-like receptor and RAGE in human Rasmussen's encephalitis, *Epilepsy Research*, 2016; 123: 36-49
62. Zou J, Crews, F, Release of Neuronal HMGB1 by Ethanol through Decreased HDAC Activity Activates Brain Neuroimmune Signaling, *PLOS ONE*, 2014; 9(2): e87915
63. Maroso M, et al., Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures, *Nature Medicine*, 2010; 16: 413-419
64. Tanaka K, et al., Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1, *Science*, 1997; 276(5319): 1699-1702
65. Kong Q, Takahashi K, Schulte D, Stouffer N, Lin Y, Glenn Lin C-L, Increased glial glutamate transporter EAAT2 expression reduces epileptogenic processes following pilocarpine-induced status epilepticus, *Neurobiology of Disease*, 2012; 47(2): 145-154
66. Clarkson C, Smeal R, Hasenoehrl M, White J, Rubio M, Wilcox K, Ultrastructural and functional changes at the tripartite synapse during epileptogenesis in a model of temporal lobe epilepsy, *Experimental Neurology*, 2020; 326: 113196
67. Green JL, Dos Santos WF, Fontana ACK., Role of glutamate excitotoxicity and glutamate transporter EAAT2 in epilepsy: Opportunities for novel therapeutics development, *Biochemical Pharmacology*, 2021; 193: 114786
68. Peterson A, Garcia T, Cullion K, Tiwari-Woodruff S, Pedapati E, Binder D, Targeted overexpression of glutamate transporter-1 reduces seizures and

- attenuates pathological changes in a mouse model of epilepsy, *Neurobiology of Disease*, 2021; 157: 105443
69. Sarac S, Afzal S, Broholm H, Madsen F, Ploug T, Laursen H, Excitatory amino acid transporters EAAT-1 and EAAT-2 in temporal lobe and hippocampus in intractable temporal lobe epilepsy, 2009; 117: 291-301
70. R. Kryger and P. A. Wilce, The effects of alcoholism on the human basolateral amygdala, *Neuroscience*, 2010; 167: 361–371
71. Rajgopal Y, Vemuri M, Calpain activation and alpha-spectrin cleavage in rat brain by ethanol, *Neuroscience Letters*, 2002; 321(3): 187-91
72. Dwivedi DK, et al., Voluntary alcohol consumption exacerbated high fat diet-induced cognitive deficits by NF-κB-calpain dependent apoptotic cell death in rat hippocampus: Ameliorative effect of melatonin, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018; 108: 1393-1403
73. Fricker M, Tolkovsky A, Borutaite V, Coleman M, Brown G, Neuronal Cell Death, *Physiological Reviews*, 2018; 98(2): 813-880
74. Bonthius D, Woodhouse J, Bonthius N, Taggard D, Lothman E, Reduced Seizure Threshold and Hippocampal Cell Loss in Rats Exposed to Alcohol During the Brain Growth Spurt, *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 2001; 25(1): 70-82
75. Cho S, Newton J, Li T, Khandai P, Luta G, Lovinger D, N’Gouemo P, Prenatal alcohol exposure in the second trimester-equivalent increases the seizure susceptibility in developing rats, *Alcohol*, 2020; 85: 153-164
76. KandrataVICIUS L, et al., Animal models of epilepsy: use and limitations, *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 2014; 10: 1693-705
77. Cross D, Cavazos J, Synaptic reorganization in subiculum and CA3 after early-life status epilepticus in the kainic acid rat model, *Epilepsy Research*, 2007; 73(2): 156-165
78. Cilio MR, Sogawa Y, Cha B-H, Liu X, Huang L-T, Holmes G, Long-term effects of status epilepticus in the immature brain are specific for age and model, *Epilepsia*, 2003; 44(4): 518-528
79. Kubová H, et al., Status Epilepticus Causes Necrotic Damage in the Mediodorsal Nucleus of the Thalamus in Immature Rats, *The Journal of Neuroscience*, 2001; 21(10): 3593-3599
80. Sankar R, et al., Patterns of Status Epilepticus-Induced Neuronal Injury during Development and Long-Term Consequences, 1998; 18(20): 8382-8393
81. Ferris C, Tenney J, Chapter 3 - Functional Magnetic Resonance Imaging in Epilepsy: Methods and Applications Using Awake Animals, *Neuronal Networks in Brain Function, CNS Disorders, and Therapeutics*, 2014: 37-54
82. Zhvania M, Ksovreli M, Japaridze N, Lordkipanidz T, Ultrastructural changes to rat hippocampus in pentylenetetrazol- and kainic acid-induced status epilepticus: A study using electron microscopy, *Micron*, 2015; 74: 22-29

83. Viswanatha G, Shylaja H, Kishore D, Venkataranganna M, Bheema N, Prasad L, Acteoside Isolated from *Colebrookea oppositifolia* Smith Attenuates Epilepsy in Mice Via Modulation of Gamma-Aminobutyric Acid Pathways, *Neurotoxicity Research*, 2020
84. Schultz C, Engelhardt M, Anatomy of the Hippocampal Formation, *Frontiers in Neurology and Neuroscience*, 2014; 34: 6-17
85. Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, *The hippocampus book*, Oxford Univeristy Press, 2006: 47-81
86. Paxinos G, *The Rat Nervous System*, 4th edition, Elsevier, 2015: 511-573
87. Klausberger T, Somogyi P, Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations, *Science*, 2008; 321(5885): 53-7
88. Pelkey K, et al., Hippocampal GABAergic Inhibitory Interneurons, *Physiological Reviews*, 2017; 97(4): 1619-1747
89. Amaral D, Scharfman H, Lavenex P, The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies), *Progress in Brain Research*, 2007; 163: 3-22
90. Neves G, Cooke S, Bliss T, Synaptic plasticity, memory, and the hippocampus: a neural network approach to causality, *Nature Reviews*, 2008; 9: 65-75
91. Bird C, Burgess N, The hippocampus and memory: insights from spatial processing, *Nature Reviews*, 2008; 9: 182-194
92. Tran T, Kelly S, Critical periods for ethanol-induced cell loss in the hippocampal formation, *Neurotoxicology and Teratology*, 2003; 25: 519-528
93. Livy D, Miller K, Maier S, West J, Fetal alcohol exposure and temporal vulnerability: effects of binge-like alcohol exposure on the developing rat hippocampus, *Neurotoxicology and Teratology*, 2003; 25: 447-458
94. Klintsova A, Helfer J, Calizo L, Dong W, Goodlett C, Greenough W, Persistent Impairment of Hippocampal Neurogenesis in Young Adult Rats Following Early Postnatal Alcohol Exposure, *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 2007; 31(12): 2073-2082
95. Belhadjhamida R, Lea-Banks H, Hynynen K, Perfusion fixation methods for preclinical biodistribution studies: A comparative assessment using automated image processing, *Methods and Applications in Fluorescence*, 2021; 9(1)
96. Gage G, Kipke D, Shain W, Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents, *Journal of Visualised Experiments*, 2012; 65: 3564
97. Im K, Mareninov S, Diaz M, Yong W, An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining, *Biobanking*, 2018: 299-311
98. Goldring D, Measuring Protein Concentration with Absorbance, Lowry, Bradford Coomassie Blue, or the Smith Bicinchoninic Acid Assay Before Electrophoresis, *Methods in Molecular Biology*, 2019; 1855: 31-39

99. Surti PV, Kim MW, Phan LMT, et al., Progress on dot-blot assay as a promising analytical tool: Detection from molecules to cells, Trends in Analytical Chemistry, 2022; 157: 116736
100. Chlebowski A, Kisby G, Protocol for High-Throughput Screening of Neural Cell or Brain Tissue Protein Using a Dot-Blot Technique with Near-Infrared Imaging, STAR Protocols, 2020; 1(2): 100054
101. Zhong F, Liu L, Wei JL, Dai RP, Step by Step Golgi – Cox Staining for Cryosection, Frontiers in Neuroanatomy, 2019; 13
102. Das G, Reuhl K, Zhou R, The Golgi-Cox method, Methods in Molecular Biology, 2013; 1018: 313-321
103. Pedrazzoli M, et al., An improved and simplified protocol to combine Golgi-Cox staining with immunofluorescence and transmission electron microscopy techniques, Neurochemistry International, 2021; 142: 104922
104. Zaqout S, Kaendl A, Golgi – Cox Staining Step by Step, Frontiers in Neuroanatomy, 2016; 10
105. Gibb R, Kolb B, A method for vibratome sectioning of Golgi–Cox stained whole rat brain, Journal of Neuroscience Methods, 1998; 79(1): 1-4
106. Kannan U, et al., Comparing the Quality of Castor Oil with DPX as a Mounting Medium, International Journal of Orofacial Biology, 2017; 1(1): 21- 23
107. Shylaja S, et al., Natural Alternative to D.P.X (Mounting Medium) - Comparison between Honey and Castor Oil, International Journal of Contemporary Medical Research, 2019; 6(1)
108. Ikonomidou C, et al., Ethanol - Induced Apoptotic Neurodegeneration and Fetal Alcohol Syndrome, Science, 2000; 287(5455): 1056-60
109. Camargo Moreno M, Mooney SM, Middleton FA, Heterogeneity of p53 dependent genomic responses following ethanol exposure in a developmental mouse model of fetal alcohol spectrum disorder. PLoS ONE, 2017; 12(7): e0180873
110. Meyer H, Inhibitory interneurons in a cortical column form hot zones of inhibition in layers 2 and 5A, PNAS, 2011; 108(40): 16807-16812
111. Madden JT, Thompson SM, Magcalas CM, Wagner JL, Hamilton DA, Savage DD, Clark BJ, Pentkowski NS, Moderate prenatal alcohol exposure reduces parvalbumin expressing GABAergic interneurons in the dorsal hippocampus of adult male and female rat offspring, Neuroscience Letters, 2020;718: 134700
112. Bird CW, Taylor DH, Pinkowski NJ, Chavez GJ, Valenzuela CF, Long-term Reductions in the Population of GABAergic Interneurons in the Mouse Hippocampus following Developmental Ethanol Exposure, Neuroscience, 2018; 383: 60-73
113. Ogievetsky E, Lotfullina N, Minlebaeva A, et al., Ethanol-Induced Apoptosis of Interneurons in the Neonatal GAD67-GFP Mouse Hippocampus, BioNanoScience, 2017; 7: 151-154

114. Singh AK, Gupta S, Jiang Y, Younus M, Ramzan M, In vitro neurogenesis from neural progenitor cells isolated from the hippocampus region of the brain of adult rats exposed to ethanol during early development through their alcohol-drinking mothers. *Alcohol and Alcoholism*, 2009; 44(2): 185-98
115. Jiang G, Wang W, Cao Q, Gu J, Mi X, Wang K, Chen G, Wang X, Insulin growth factor-1 (IGF-1) enhances hippocampal excitatory and seizure activity through IGF-1 receptor-mediated mechanisms in the epileptic brain, *Clinical Science (Lond)*, 2015; 129(12): 1047-60
116. La Rosa C, Cavallo F, Pecora A, Chincarini M, Ala U, Faulkes CG, Nacher J, Cozzi B, Sherwood CC, Amrein I, Bonfanti L, Phylogenetic variation in cortical layer II immature neuron reservoir of mammals, *Elife*, 2020; 9: e55456
117. Jae-Chul Lee, Joon Ha Park, Ji Hyeon Ahn, In Hye Kim, Jeong Hwi Cho, Jung Hoon Choi, Ki-Yeon Yoo, Choong Hyun Lee, In Koo Hwang, Jun Hwi Cho, Young-Guen Kwon, Young-Myeong Kim, Il Jun Kang, Moo-Ho Won New GABAergic Neurogenesis in the Hippocampal CA1 Region of a Gerbil Model of Long-Term Survival after Transient Cerebral Ischemic Injury, *Brain Pathology*, 2016; 26(5): 581–592
118. Jiang W, Wan Q, Zhang ZJ, Wang WD, Huang YG, Rao ZR, Zhang X, Dentate granule cell neurogenesis after seizures induced by pentylenetetrazol in rats, *Brain Research*, 2003; 977: 141-148
119. Wu L, Qin Y, Yuan H, Zhu Y, Hu A, Anti-inflammatory and neuroprotective effects of insulin-like growth factor-1 overexpression in pentylenetetrazole (PTZ)-induced mouse model of chronic epilepsy, *Brain Research*, 2022; 1785: 147881
120. Siebzehrubl FA, Blumcke I, Neurogenesis in the human hippocampus and its relevance to temporal lobe epilepsies. *Epilepsia*, 2008; 49: 55-65
121. Sierra A, Martín-Suárez S, Valcárcel-Martín R, Pascual-Brazo J, Aelvoet SA, Abiega O, Deudero J, Brewster A, Bernales I, Anderson A, Baekelandt V, Maletić-Savatić M, Encinas J, Neuronal Hyperactivity Accelerates Depletion of Neural Stem Cells and Impairs Hippocampal Neurogenesis, *Cell Stem Cell*, 2015; 16(5): 488-503
122. Chen G, Ma C, Bower K, Shi X, Ke Z, Luo J, Ethanol Promotes Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Neuronal Death: Involvement of Oxidative Stress, *Journal of Neuroscience Research*, 2008; 86: 937-946
123. Cavarsan CF, Malheiros J, Hamani C, Najm I, Covolán L, Is Mossy Fiber Sprouting a Potential Therapeutic Target for Epilepsy?, *Frontiers in Neurology*, 2018; 9: 1023
124. Shen Y, et al., Postnatal activation of TLR4 in astrocytes promotes excitatory synaptogenesis in hippocampal neurons, *Journal of Cell Biology*, 2015; 215(5): 719-734

125. Sayin U, A Bio-Electrical Tornado in The Hippocampus: Mechanisms of Temporal Lobe Epilepsy, *NeuroQuantology*, 2017; 15(1)
126. Trzeciak A, Lerman YV, Kim TH, Kim MR, Mai N, Halterman MW, Kim M, Long-Term Microgliosis Driven by Acute Systemic Inflammation, *Journal of Immunology*, 2019; 203(11): 2979-2989
127. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M, Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages, *Science*, 2010; 330(6005): 841-845
128. Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O, Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia, *Neuroscience*, 2009; 158(3): 1021-1029
129. Aarum J, et al., Migration and differentiation of neural precursor cells can be directed by microglia, *PNAS*, 2003; 100 (26) 15983-15988
130. Walton N, et al., Microglia instruct subventricular zone neurogenesis, *Glia*, 2006; 54(8): 815-825
131. Evangelaki M-E & Psarropoulou C, Prenatal alcohol exposure affects developmental differentiation of interictal discharges in septal and temporal hippocampus, *Int J Dev Biol*, 2022; 66(1-2-3): 297-304
132. Meilleur S, Aznavour N, Descarries L, Carmant L, Mamer OA, Psarropoulou C, Pentylene-tetrazol-induced seizures in immature rats provoke long-term changes in adult hippocampal cholinergic excitability, *Epilepsia*, 2003; 44(4): 507-17
133. Riazi K, Galic MA, Kuzmiski JB, Ho W, Sharkey KA, Pittman QJ, Microglial activation and TNFalpha production mediate altered CNS excitability following peripheral inflammation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008; 105(44): 17151-6
134. Fulton T. Crews, Ryan P. Vetreno, Chapter Ten - Neuroimmune Basis of Alcoholic Brain Damage, *International Review of Neurobiology Volume 118*, 2014, Pages 315-357
135. Migliore R, Lupascu CA, Bologna LL, Romani A, Courcol JD, Antonel S, Van Geit WAH, Thomson AM, Mercer A, Lange S, Falck J, Rössert CA, Shi Y, Hagens O, Pezzoli M, Freund TF, Kali S, Muller EB, Schürmann F, Markram H, Migliore M, The physiological variability of channel density in hippocampal CA1 pyramidal cells and interneurons explored using a unified data-driven modeling workflow, *PLoS Computational Biology*, 2018; 14(9): e1006423

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ



Βιογραφικό σημείωμα Europass

Προσωπικές πληροφορίες

Επώνυμο (-α) / Όνομα (-τα)	ΤΖΙΝΗ ΔΗΜΗΤΡΑ		
Διεύθυνση (-εις)	Ηπείρου 32, 41222, Λάρισα, Ελλάδα		
Τηλέφωνο (-α)	2414001139	Κινητό:	6940636188
Ηλεκτρονικό ταχυδρομείο	dimitratzini1999@gmail.com		
Υπηκοότητα (ή υπηκοότητες)	Ελληνική		
Ημερομηνία γέννησης	02/03/1999		
Φύλο	Θήλυ		

Επαγγελματική πείρα

Χρονολογίες	07/2020-08/2020
Απασχόληση ή θέση που κατείχατε	Βιοχημικό Εργαστήριο
Κύριες δραστηριότητες και αρμοδιότητες	Προετοιμασία δειγμάτων βιολογικών υγρών, χειρισμός αυτόματου βιοχημικού αναλυτή
Όνομα και διεύθυνση εργοδότη	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας, Μεζούρλο, 41110

Εκπαίδευση και κατάρτιση

Χρονολογίες	11/2021 – έως σήμερα (υπολείπεται η ορκωμοσία)
Τίτλος του πιστοποιητικού ή διπλώματος	Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης στις Κλινικές Εφαρμογές της Μοριακής Ιατρικής
Κύρια θέματα / επαγγελματικές δεξιότητες	Τίτλος Διπλωματικής Εργασίας: «Προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη και επιληπτογένεση: Μακροχρόνιες αλλαγές στον ιππόκαμπο επίμυος»
Επωνυμία και είδος του οργανισμού που παρείχε την εκπαίδευση ή κατάρτιση	Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μεζούρλο, 41110
Χρονολογίες	10/2017 – 04/2022
Τίτλος του πιστοποιητικού ή διπλώματος	Πτυχίο Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Βαθμός: 7.46 (Λίαν Καλώς)
Κύρια θέματα / επαγγελματικές δεξιότητες	Τίτλος Διπλωματικής Εργασίας: «Μελέτη της φλεγμονώδους αντίδρασης στον εγκέφαλο ενήλικων επίμυων κατά την επιληπτογένεση με πεντυλενοτετραζόλη επί εδάφους εμβρυικού αλκοολικού συνδρόμου»

Επωνυμία και είδος του οργανισμού που παρείχε την εκπαίδευση ή κατάρτιση Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μεζούρλο, 41110

Χρονολογίες 2014 – 2017

Τίτλος του πιστοποιητικού ή διπλώματος Απολυτήριο Λυκείου, Βαθμός: 19^{3/10} (Άριστα)

Επωνυμία και είδος του οργανισμού που παρείχε την εκπαίδευση ή κατάρτιση 4^ο Γενικό Λύκειο Λάρισας, Λάρισα, 41222

Ατομικές δεξιότητες και ικανότητες

Μητρική γλώσσα **Ελληνικά**

Άλλη (-ες) γλώσσα (-ες) **Αγγλικά, Κάτοχος πτυχίου (επίπεδο C2), Examination for the Certificate of Proficiency in English, ECPE, University of Michigan 2014**

Αυτοαξιολόγηση
Ευρωπαϊκό επίπεδο (*)

Αγγλικά

Κατανόηση				Ομιλία				Γραπτή	
Προφορική		Ανάγνωση		Προφορική επικοινωνία		Προφορική έκφραση με συνεχή λόγο			
C2	Αυτάρκης χρήστης	C2	Αυτάρκης χρήστης	C1	Αυτάρκης χρήστης	B2	Ανεξάρτητος χρήστης	C2	Αυτάρκης χρήστης

(*) βαθμίδες του κοινού ευρωπαϊκού πλαισίου αναφοράς

Κοινωνικές δεξιότητες και ικανότητες Πνεύμα συνεργασίας και ομαδικότητας ως μέλος του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Οργανωτικές δεξιότητες και ικανότητες Οργανωτικές ικανότητες τόσο ως επικεφαλής ομάδας Προπτυχιακών φοιτητών του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας όσο και ως υπεύθυνη διαχείρισης έργου στην εταιρεία «Σιόντας Αστέριος, Χωματοουργικά – Τεχνικά Έργα», Καραθάνου 63, 41222, Λάρισα

Τεχνικές δεξιότητες και ικανότητες Ενδοκαρδιακή μονιμοποίηση επίμυος
Απομόνωση εγκεφαλικών περιοχών επίμυος
Αιμοληψία από την ουρά επίμυος
Ανάλυση πρωτεϊνών: ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών (Bradford), ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) και ανοσοαποτύπωση (Western Blot, Dot Blot)
Έμμεσος ανοσοφθορισμός
Ιστολογική Χρώση Nissl
Χρώση Golgi – Cox
Χειρισμός κρουστού & μηχανήματος κοπής φρέσκων ιστολογικών παρασκευασμάτων (McIlwain Tissue Chopper)
Χειρισμός οπτικού μικροσκοπίου και μικροσκοπίου φθορισμού

Δεξιότητες πληροφορικής Ανάλυση εικόνων μέσω της χρήσης του προγράμματος ImageJ
Επεξεργασία δεδομένων μέσω του προγράμματος στατιστικής ανάλυσης Graph Pad Prism
Κάτοχος πτυχίου Unicert (2019)
Λειτουργικά Συστήματα: Windows
Εφαρμογές Γραφείου: Microsoft Office (Access / Power Point / Word / Excel / Internet)

Άδεια οδήγησης	Άδεια οδήγησης Β' κατηγορίας
Πρόσθετες πληροφορίες	
Μονογραφίες	1. <u>Τζίνη Δ.</u>, (2023) Προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη και επιληπτογένεση: Μακροχρόνιες αλλαγές στον ιππόκαμπο επίμυος. <i>Διπλωματική εργασία, Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα: «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής»</i>, Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. 2. <u>Τζίνη Δ.</u>, (2021) Μελέτη της φλεγμονώδους αντίδρασης στον εγκέφαλο ενήλικων επίμυων κατά την επιληπτογένεση με πεντυλενοτετραζόλη επί εδάφους εμβρυικού αλκοολικού συνδρόμου. <i>Πτυχιακή Εργασία</i>, http://hdl.handle.net/11615/59155, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
Ανακοινώσεις σε Συνέδρια	1. Πράπτος Θ., Ορφανίδη Χ., <u>Τζίνη Δ.</u>, Κουκοβίνη Τ., Παλιάγκα Αικ., Ασπροδίνη Ε., Χατζηευθυμίου Α., Ψαρροπούλου Αικ., Βασιλάκη Α. Μακροχρόνιες αλλαγές στον ιππόκαμπο επίμυος μετά από status epilepticus σε μοντέλο εβρυϊκού αλκοολισμού, 16ο Πανελλήνιο Συνέδριο Επιληψίας, 23-25 Σεπτεμβρίου, 2022, Ιωάννινα, Ελλάδα 2. Korsketidis C., <u>Tzini D.</u>, Karagiannidou A., Rigga V., Lema E., Koukovini T., Paliagka A., Asproдини E., Hatziefthimiou A., Psarropoulou C., Vasilaki A., Prenatal alcohol exposure induces long-term alterations in the rat striatum complicated by experimentally-induced status epilepticus, 12ο Πανελλήνιο Συνέδριο Εταιρείας Βασικής και Κλινικής Φαρμακολογίας, 7-9 Οκτωβρίου 2022, Άρτα, Ελλάδα.
Διακρίσεις	1. Συμμετοχή στο Πρόγραμμα της Ευρωπαϊκής Ένωσης Euroscola, 2015
Παρακολούθηση Συνεδρίων και Σεμιναρίων	1. Μάιος 2021: 1η Πανελλήνια Διαδικτυακή Διημερίδα Νευροανατομίας με θέμα «Νευροανατομική Ερμηνεία Ασυνήθων Νευρολογικών Συνδρόμων» 2. Νοέμβριος 2018, Λάρισα: 69ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας 3. Μάιος 2018, Λάρισα: 2η Εαρινή Συνάντηση των Νέων Ερευνητών της Ελληνικής Κρυσταλλογραφικής Εταιρείας (ΕΚΕ) 4. Νοέμβριος 2017, Αθήνα: 68ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας
Συστάσεις	1. Βασιλάκη Άννα, Επίκουρη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μεζούρλο, 41110 2. Ασπροδίνη Ευτυχία, Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μεζούρλο, 41110 3. Ζίφα Αιμιλία, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας - Νευροβιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μεζούρλο, 41110 4. Χατζηευθυμίου Αποστολία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας, Εργαστήριο Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μεζούρλο, 41110