

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΩΝ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΟΥ



«Μακροχρόνιες συνέπειες της προγεννητικής έκθεσης σε αιθανόλη στην
ανάπτυξη και λειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος, με
έμφαση σε χολινεργικούς μηχανισμούς»

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΕΥΑΓΓΕΛΑΚΗ ΜΑΡΙΑ-ΕΛΕΝΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2020

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

1. Αικατερίνη Ψαρροπούλου (Πρόεδρος Επιτροπής), Καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Επιβλέπουσα (cpsarrop@uoi.gr)
2. Ευτυχία Ασπροδίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής (easpro-at-med.uth.gr)
3. Κωνσταντίνο Παπαθεοδωρόπουλο, Αναπληρωτή Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστήμιο Πατρών, Μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής (ceparath@upatras.gr)

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

1. Αικατερίνη Ψαρροπούλου (Πρόεδρος Επιτροπής), Καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Επιβλέπουσα (cpsarrop@uoi.gr)
2. Ευτυχία Ασπροδίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής (easpro-at-med.uth.gr)
3. Κωνσταντίνο Παπαθεοδωρόπουλο, Αναπληρωτή Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστήμιο Πατρών, Μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής (ceparath@upatras.gr)
4. Χαράλαμπος Λαμπρακάκης, Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, (clabrak@uoi.gr, <http://users.uoi.gr/clabrak/>)
5. Μιχαέλα Φίλιου, Επίκουρη καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, (mfiliou@uoi.gr)
6. Θεολόγος Μιχαηλίδης, Αναπληρωτής καθηγητής του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, tmichael@uoi.gr
7. Ειρήνη Σκαλιόρα, Καθηγήτρια Γνωσιακής Επιστήμης, ΕΚΠΑ και Συνεργαζόμενη Ερευνήτρια, Εργαστήριο Νευροφυσιολογίας, ΙΙΒΕΑΑ (iskaliora@bioacademy.gr)

Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια/καθοδήγηση /επίβλεψη της επιβλέπουσας Καθηγήτριας Φυσιολογίας του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Αικατερίνης Ψαρροπούλου την οποία ευχαριστώ θερμά για την καθοδήγηση που μου προσέφερε και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε για την εκπόνηση της συγκεκριμένης εργασίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα όλα τα μέλη του εργαστηρίου φυσιολογίας ζώων και κυρίως τον Επικ. Καθ. Χαράλαμπο Λαμπρακάκη για τις εύστοχες παρατηρήσεις και συμβουλές καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης των πειραμάτων. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω το προσωπικό του εκτροφείου του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την παροχή των πειραματοζώων. Ακόμη, ευχαριστώ θερμά τα μέλη της τριμελούς και επταμελούς συμβουλευτικής επιτροπής. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους αγαπημένους μου φίλους για την εξαιρετικά πολύτιμη στήριξη και συμπαράσταση.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	3
Περίληψη	7
Εισαγωγή	9
Ιππόκαμπος	9
Τοποθεσία/ανατομία	9
Κυτταρικοί τύποι.....	10
Τρισυναπτικό κύκλωμα.....	11
Λειτουργία.....	12
Διαφορές κροταφικού και διαφραγματικού ιπποκάμπου.....	14
Διεγερτική νευροδιαβίβαση στα άκρα του ιπποκάμπου	15
Διαφορές στην ανασταλτική διαβίβαση.....	15
Διαφορές κροταφικού & διαφραγματικού άκρου με την ανάπτυξη	16
Μεσαίο τρίτο του ιπποκάμπου.....	17
Μεσαίο τρίτο και επιληψία	18
FAS (Fetal Alcohol Syndrome)	19
Συμπτώματα	20
FAS και επιληψία.....	22
Χολινεργική διαβίβαση.....	26
Νικοτινικοί υποδοχείς	27
Νικοτινικοί υποδοχείς και επιληψία.....	27
Προγεννητική έκθεση σε αιθανόλη και νικοτινικοί υποδοχείς.....	28
Μουσκαρινικοί υποδοχείς.....	29
Κανάλια καλίου και επιληψία.....	31
Inwardly Rectifying Potassium Channels και επιληψία.....	32
Αστροκύτταρα- kir channels- επιληψία	34
FAS και κανάλια καλίου	35
Kir channels και FAS.....	36
Πειραματικά μοντέλα μελέτης του FAS	37
BAC (Blood Alcohol Concentration).....	38
Περίοδος χορήγησης	39
Οδός χορήγησης	39
Μη παρεμβατική κατανάλωση αλκοόλ.....	40

Υλικά και μέθοδοι.....	41
In vivo πρωτόκολλο	42
Εθισμός στην αιθανόλη	42
In vitro πρωτόκολλο	44
Παρασκευή τομών ιπποκάμπου	44
Ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές.....	45
Εξωκυττάρια καταγραφές	46
Στατιστική ανάλυση	46
Αποτελέσματα.....	47
Δράση ανταγωνιστών αγωγιμοτήτων K^+ σε τομές μεσαίου τρίτου FAS και N πειραματοζώων	47
Μελέτη 1	49
Επίδραση της προγεννητικής έκθεσης σε αιθανόλη στις επιληπτικές εκφορτίσεις μεσοκριστικού τύπου στο μεσαίο τρίτο του ιπποκάμπου.....	49
Επίδραση της προγεννητικής έκθεσης σε αιθανόλη στους μουσκαρινικούς υποδοχείς	63
Συμπληρωματικά πειράματα χολινεργικών αγωνιστών και ανταγωνιστών σε τομές μεσαίου τρίτου νεαρών πειραματοζώων	64
Μελέτη 2.....	79
Δράση ανταγωνιστών αγωγιμοτήτων K^+ σε τομές μεσαίου τρίτου FAS και N πειραματοζώων	79
Αύξηση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης K^+ (7mM) σε φυσιολογικό aCSF	81
Προσθήκη του ειδικού αναστολέα K_{ir} καναλιών $BaCl_2$ (2mM) σε τENY Mg^{2+} -free	85
Μελέτη 3	86
Η προγεννητική έκθεση σε αιθανόλη επηρέασε τα gap junctions στο μεσαίο τρίτο του ιπποκάμπου	86
Μελέτη 4.....	87
Αυθόρμητες μεσοκριστικές εκφορτίσεις (interictal-like, IEDs) σε τENY με 4-AP (50μM) σε κροταφικές (temporal) και διαφραγματικές (septal) τομές νεαρών και ενήλικων πειραματοζώων	87
Κροταφο-διαφραγματική διεγερσιμότητα έπειτα από αύξηση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης K^+ (7mM) σε τENY Mg^{2+} -free σε N και FAS temporal και septal τομές νεαρών και ενήλικων πειραματοζώων	99
Μελέτη 5	101

Μελέτη ηλεκτροφυσιολογικών ιδιοτήτων του μεσαίου τρίτου του ιπποκάμπου σε σχέση με το κροταφικό και το διαφραγματικό άκρο	101
Συμπεράσματα	113
Αναφορές	124

Περίληψη

Η προγεννητική έκθεση σε αιθανόλη που οφείλεται σε εθισμό της μητέρας και σχετίζεται με σημαντικές αναπτυξιακές διαταραχές του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ), οριζόμενες ως «εμβρυικό αλκοολικό σύνδρομο» (Fetal Alcohol Syndrome, FAS), που περιλαμβάνουν αυξημένη προδιάθεση στην εμφάνιση επιληπτικών κρίσεων, χωρίς να είναι γνωστό ποιοι κυτταρικοί μηχανισμοί τις διαμεσολαβούν. **Σκοπός** αυτής της μελέτης ήταν η διερεύνηση του ρόλου συγκεκριμένων μηχανισμών στην τροποποίηση επιληπτοειδών εκφορτίσεων σε επίμυς που εκτέθηκαν προγεννητικά στην αιθανόλη (ήπιο μοντέλο). Οι επιμέρους μηχανισμοί που επιλέχθηκαν προς διερεύνηση ενέχονται στην πρόκληση ή τροποποίηση παροξυσμικών εκφορτίσεων αλλά ταυτόχρονα αποτελούν και στόχο της αιθανόλης, όπως γνωρίζουμε από την βιβλιογραφία. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στην χολινεργική διαβίβαση, για την οποία γνωρίζουμε ότι τροποποιείται σαν συνέπεια επιληπτικών κρίσεων της πρώιμης ζωής.

Έγιναν εξωκυττάρειες ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές από το πυραμιδικό στρώμα CA1 τομών ιπποκάμπου (κροταφικές, διαφραγματικές και μεσαίου τρίτου) που προήλθαν από πειραματόζωα ηλικίας 21-35 ημερών («νεαρά») και >90 ημερών («ενήλικα») για να εξεταστούν τυχόν πρώιμες και μακροχρόνιες αλλαγές, (N= normal, μάρτυρες και FAS τομές). Ακολούθησε στατιστική ανάλυση της συχνότητας και της διάρκειας αυθόρμητων επιληπτοειδών εκφορτίσεων μεσοκρυστικού τύπου (IEDs) σε δύο *in vitro* μοντέλα, ένα που ενεργοποιεί υποδοχείς NMDA (“Mg²⁺-free medium”) και άλλο που αναστέλλει αγωγιμότητες K⁺ (4-αμινοπυριδίνη, 4-AP).

Τα **αποτελέσματά** μας έδειξαν ανιχνεύσιμες *in vitro* διαφορές μεταξύ τομών N και FAS σε όλες τις ηλικίες, επιβεβαιώνοντας τα μακροπρόθεσμα αποτελέσματα της προγεννητικής έκθεσης σε αιθανόλη.

-Οι συχνότητες των IEDs των FAS τομών μεσαίου τρίτου ιπποκάμπου ήταν σημαντικά χαμηλότερες στο Mg²⁺-free medium σε σχέση με N και σημαντικά υψηλότερες σε 4-AP, υποδεικνύοντας πιθανή δράση της αιθανόλης σε αγωγιμότητες K⁺ αλλά και συγκεκριμένες περιοχές στόχο.

-Το χολινεργικό ανάλογο καρβαχόλη (carbachol, 1μM) παρουσία BMI προκάλεσε μικρότερη αύξηση της συχνότητας των IEDs στις FAS τομές σε σχέση με τις N και στα δύο μοντέλα (Mg²⁺-free medium, 4-AP) σε κροταφικές τομές.

-Ο μουσκαρινικός αγωνιστής oxotremorine (1μM, σε Mg²⁺-free medium) αύξησε την συχνότητα των IEDs παρόμοια σε N και FAS τομές μεσαίου τρίτου νεαρών αλλά η προσθήκη ειδικών μουσκαρινικών ανταγωνιστών (M1, M2, M3) φανέρωσαν N και FAS διαφορές.

-Ο νικοτινικός ανταγωνιστής Hexamethonium (50μM, σε Mg²⁺-free medium) αύξησε την συχνότητα IED παρόμοια σε N και FAS τομές, αλλά παρουσία BMI (20μM) αύξησε την συχνότητα IED μόνο στις N τομές, υποδηλώνοντας N και FAS διαφορές στον έλεγχο ανασταλτικών νευρώνων από νικοτινικούς υποδοχείς.

-Ο αναστολέας καναλιών kir, BaCl₂ (2mM, σε Mg²⁺-free medium) προκάλεσε αύξηση των συχνότητων IED επηρεαζόμενη από την ομάδα (ναι στις N, όχι στις FAS) αλλά και την ηλικία.

- Ο blocker των χασμοσυνδέσμων, carbenoxolone (300μM) προκάλεσε σημαντικά μεγαλύτερη μείωση της συχνότητας IED στις FAS τομές μεσαίου τρίτου από ότι στις N, και η δράση εξαρτάτο και από την ηλικία.

Συμπερασματικά το ήπιο μοντέλο προγεννητικής έκθεσης στην αιθανόλη που χρησιμοποιήθηκε προκάλεσε αλλαγές ανιχνεύσιμες *in vitro*, που δείχνουν διαφοροποίηση ανάλογα με την εξεταζόμενη περιοχή του υποκάμπου και την ηλικία. Όλες διαφοροποιούν τον τρόπο συγχρονισμού των νευρωνικών δικτύων του υποκάμπου, κάποιες φαίνεται να συνεισφέρουν σε διεγερτικούς μηχανισμούς, ενώ άλλες φαίνεται να εστιάζονται στην αποφυγή υπερδιέγερσης.

Εισαγωγή

Ιππόκαμπος

Τοποθεσία/ανατομία

Ο ιππόκαμπος ή ιπποκάμπειος σχηματισμός του επιμύος αποτελεί μια επιμήκη δομή σχήματος C συμμετρική ως προς την μέση γραμμή του εγκεφάλου, που εκτείνεται προσθιοραχιαία από το διαφραγματικό πυρήνα του πρόσθιου εγκεφάλου περνώντας πάνω και πίσω από το διεγκέφαλο μέχρι την αρχή του κροταφικού λοβού οπισθοκοιλιακά (εικόνα 1). Το τμήμα του ιπποκάμπου πλησιέστερα προς τους πυρήνες του διαφράγματος αποτελεί τον διαφραγματικό (septal) ιππόκαμπο στον αρουραίο και αντιστοιχεί στον οπίσθιο του ανθρώπου, ενώ το τμήμα προς τον κροταφικό (temporal) ιππόκαμπο αντιστοιχεί στον πρόσθιο του ανθρώπου. Το κροταφικό άκρο του (temporal) είναι φαρδύτερο από το διαφραγματικό (septal). Η δομή του είναι ξεχωριστή και αναγνωρίσιμη τόσο σε ανατομικό όσο και σε ιστολογικό επίπεδο. Το ασυνήθιστο σχήμα του τον κάνει να μοιάζει με το θαλάσσιο ιππόκαμπο, από όπου και το όνομά του (Hippocampus). Ο ιππόκαμπος ονομάζεται και κέρασ του Άμμωνος (cornu Ammonis, Ammon's horn από όπου και ο συμβολισμός CA1, CA2 κλπ).



Εικόνα 1: εγκεφάλου αρουραίου και τοποθεσία ιπποκάμπου.

Ο ιπποκάμπειος σχηματισμός συγκροτείται από 6 διακριτές περιοχές που περιλαμβάνουν την οδοντωτή έλικα (Dentate Gyrus), τον ιππόκαμπο (Hippocampus) ο οποίος υποδιαιρείται σε τρεις κύριες υποπεριοχές (CA1, CA2, CA3), το υπόθεμα (Subiculum), το προϋπόθεμα (Presubiculum), το παραϋπόθεμα (Parasubiculum) και τον ενδορινικό φλοιό (Entorhinal Cortex) που έχει δύο ή περισσότερες υποδιαιρέσεις (εικόνα 2). Το υπόθεμα, το προϋπόθεμα και το παραϋπόθεμα αναφέρονται συνήθως μαζί και ως υποθεματικό σύμπλοκο (Amaral και Witter, 1989). Η άνω περιοχή του ιπποκάμπου ονομάζεται CA1 και η κάτω περιοχή CA3. Η CA2 είναι μια μικρή περιοχή μεταξύ CA1 και CA3. Η περιοχή C4 θεωρείται περιοχή της οδοντωτής έλικας που καλείται Hilus και είναι μια ελαχίστων διαστάσεων μεταβατική περιοχή μεταξύ ιπποκάμπου και οδοντωτής έλικας. Οι περιοχές αυτές διαφέρουν ως προς το μέγεθος των πυραμιδικών κυττάρων και τη συνδεσμολογία. Επίσης, οι περιοχές CA2

και CA3 περιλαμβάνουν μεγαλύτερα πυραμιδικά κύτταρα από ότι την περιοχή CA1. Σε αντίθεση με τα πυραμιδικά κύτταρα τη CA1 περιοχής, τα πυραμιδικά κύτταρα της CA3 περιοχής δέχονται εισερχόμενη δικτύωση από τις βρυώδεις ίνες της οδοντωτής έλικας. Η CA2 περιοχή έχει μεγάλα κυτταρικά σώματα, όπως αυτά της CA3 περιοχής, αλλά δεν δέχεται νεύρωση από τις βρυώδεις ίνες, όπως συμβαίνει και στη CA1 περιοχή. Η CA2 περιοχή διαφέρει τόσο στις συνδέσεις, όσο και στη λειτουργία, σε σχέση με τις άλλες περιοχές του ιππόκαμπου.

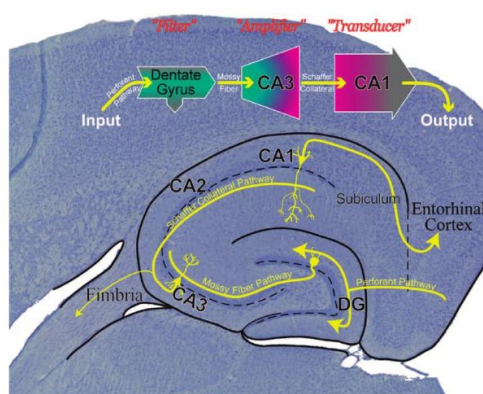
Κυτταρικοί τύποι

Ο κυριότερος τύπος κυττάρων που κυριαρχεί στον ιππόκαμπο είναι τα **πυραμιδικά κύτταρα**, τα οποία είναι απαγωγοί νευρώνες που προβάλλουν σε διάφορες δομές. Οργανώνονται στην πυραμιδική στοιβάδα (pyramidal cell layer) η οποία διακρίνεται σε CA1, CA2, CA3 υποπεριοχές, ανάλογα με το μέγεθος των νευρώνων της όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη παράγραφο. Αντίθετα, στην οδοντωτή έλικα κυριαρχούν τα κοκκιώδη κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, η οδοντωτή έλικα, ο ιππόκαμπος και το υπόθεμα αποτελούνται το κάθε ένα από τρία ευδιάκριτα στρώματα. Ο ιππόκαμπος και το υπόθεμα έχουν από ένα πυραμιδικό στρώμα, ένα μοριώδες στρώμα και ένα πολύμορφο στρώμα κυττάρων. Το πυραμιδικό στρώμα περιέχει τα κυτταρικά σώματα των πυραμιδικών κυττάρων. Το μοριώδες στρώμα αποτελείται από τους ακραίους δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων μαζί με τους δενδρίτες που προέρχονται από πολλές διάφορες άλλες πηγές. Το πολύμορφο στρώμα περιέχει διάφορους διάμεσους νευρώνες συμπεριλαμβανομένου και των καλαθοειδών κυττάρων (Basket cells). Η οδοντωτή έλικα έχει μια κοκκιώδη στιβάδα κυττάρων, μια μοριώδη στιβάδα που αποτελείται από τους ακραίους δενδρίτες των κοκκιωδών κυττάρων και ένα πολύμορφο στρώμα.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, τα πυραμιδικά κύτταρα είναι απαγωγοί νευρώνες ενώ τα κοκκιώδη κύτταρα είναι διάμεσοι νευρώνες. Τα καλαθοειδή κύτταρα είναι ανασταλτικοί διάμεσοι νευρώνες των πυραμιδικών κυττάρων. Έτσι το μεγαλύτερο μέρος των διανευρώνων στον ιππόκαμπο και στην οδοντωτή έλικα είναι ανασταλτικοί νευρώνες με GABAεργική δράση. Μια άλλη τάξη διανευρώνων που έχουν διεγερτική δράση είναι τα βρυώδη κύτταρα και προβάλλουν μόνο στην μοριακή στοιβάδα της οδοντωτής έλικας. Στο ιππόκαμπο ανασταλτικοί διανευρώνες με GABAεργική δράση εντοπίζονται στην ακτινωτή στοιβάδα (stratum radiatum) και στη βοθριώδη-μοριώδη στοιβάδα (stratum lacunosummoleculare) οι οποίοι δέχονται διεγερτική εισαγωγή σήματος από ίνες της παράπλευρης οδού Schaffer και μέσω της διαπιτραίνουσας οδού, όπως θα δούμε παρακάτω. Τέλος, υπάρχουν διεγερτικοί διανευρώνες στην περιοχή της διαυγής ζώνης (stratum lucidum) οι οποίοι νευρώνονται από τις βρυώδεις ίνες και συνάπτονται στους πυραμιδικούς νευρώνες της CA3 περιοχής του ιππόκαμπου.

Τρισυναπτικό κύκλωμα

Το κύκλωμα των διεγερτικών μονοπατιών στον ιππόκαμπο δημιουργείται μέσω τριών κύριων οδών ακολουθώντας συγκεκριμένη κατεύθυνση και ονομάζεται τρισυναπτικό κύκλωμα (εικόνα 2). Οι οδοί είναι: (α) Η διατριταίνουσα οδός (perforant pathway), που ξεκινά από τον ενδορινικό φλοιό και καταλήγει στην οδοντωτή έλικα, (β) η οδός των βρυωδών ινών (mossy fibers), η οποία αρχίζει από τα κοκκιώδη κύτταρα της οδοντωτής έλικας και απολήγει στους κορυφαίους δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων της CA3 περιοχής και (γ) η οδός των παράπλευρων ινών Schaffer, η οποία ξεκινά από τα πυραμιδικά κύτταρα της CA3 περιοχής και καταλήγει στα πυραμιδικά κύτταρα της CA1 περιοχής. Από τη CA1 περιοχή αρχίζουν απαγωγές ίνες που φθάνουν αρχικά στον ενδορινικό φλοιό.



Εικόνα 2: Το ιπποκάμπειο ενδογενές τρισυναπτικό κύκλωμα

Χαρακτηριστικά οδών:

1. Διατριταίνουσα πορεία: είναι η κύρια είσοδος του ιπποκάμπου. Οι νευράξονες της διατριταίνουσας πορείας ξεκινούν από τα στρώματα II και III του ενδορινικού φλοιού με συνεισφορά και από τα βαθύτερα στρώματα IV και V. Νευράξονες από τα στρώματα II/IV προβάλλουν στα κοκκιώδη κύτταρα της οδοντωτής έλικας και στα πυραμιδικά κύτταρα της CA3 περιοχής, ενώ παράλληλα νεαυράξονες από τα στρώματα III/V προβάλλουν στα πυραμιδικά κύτταρα της CA1 περιοχής και στο υπόθεμα. Η διατριταίνουσα πορεία μπορεί να διαχωριστεί σε έξω (πλευρικό) και ένδο (ενδιάμεσο) μονοπάτι, (LPP και MPP, αντιστοίχως), ανάλογα με την περιοχή από την οποία πηγάζουν οι ίνες, την πλευρική ή την ενδιάμεση περιοχή του ενδορινικού φλοιού (LEC και MEC αντιστοίχως).
2. Οδός των βρυωδών ινών: Οι βρυώδης ίνες είναι οι νευράξονες των κοκκιωδών κυττάρων της οδοντωτής έλικας. Επεκτείνονται από την οδοντωτή

έλικα ως τα πυραμιδικά κύτταρα της CA3 περιοχής σχηματίζοντας την κύρια είσοδό της. Οι συνάψεις των βρυωδών ιών και των νευρώνων της CA3 είναι μεγάλες συναθροίσεις απολήξεων. Μεγάλος αριθμός κοκκιωδών κυττάρων μπορούν να κάνουν σύναψη σε ένα μοναδικό πυραμιδικό κύτταρο της CA3.

3. Οδός παράπλευρων ιών Schaffer: προέρχεται από νευράξονες που προβάλλουν από τη CA3 περιοχή του ιπποκάμπου στη CA1 περιοχή. Κάθε νευράξονας προέρχεται από νευρώνες της CA3 στον ομόπλευρο ιππόκαμπο (Ipsilateral) ή σχηματίζει μια ισοδύναμη δομή στο αντίπλευρο ημισφαίριο (Contralateral). Αυτές οι ίνες ορίζονται ως συναθροισμένες ίνες, καθώς διασταυρώνονται από το ένα ημισφαίριο του εγκεφάλου στο άλλο.
4. CA1-Υπόθεμα-Ενδορινικός φλοιός: Το μονοπάτι από τη CA1 περιοχή στο υπόθεμα και στον ενδορινικό φλοιό διαμορφώνει την κυρίως έξοδο από τον ιππόκαμπο. Παρόλα αυτά δεν είναι μια εντελώς μονοκατευθυνόμενη πορεία. Η CA1 περιοχή συνδέεται με περιοχές του υποθέματος και με τις βαθιές στοιβάδες του ενδορινικού φλοιού. Τέλος, αυτές οι συνδέσεις του ενδορινικού φλοιού προβάλλουν σε περιοχές του ίδιου που στο πρώτο βήμα συνδέονταν με την οδοντωτή έλικα.

Λειτουργία

Ο ιππόκαμπος είναι μια από τις πιο μελετημένες δομές του εγκεφάλου και αποτελεί μέρος του μεταιχμιακού συστήματος (εικόνα 3). Το μεταιχμιακό σύστημα αναφέρεται σε ένα σύνολο ανατομικών δομών που βρίσκονται μεταξύ του φλοιού και του υποθαλάμου και περιλαμβάνει την αμυγδαλή, τον ιππόκαμπο, την ψαλίδα, τα μαστοειδή σωμάτια, την υπόφυση, τον υποθάλαμο, την έλικα προσαγωγίου, τον προμετωπιαίο φλοιό, το νησιδιακό φλοιό και τα βασικά γάγγλια. Το σύστημα αυτό έχει σημαντικές λειτουργίες καθώς σχετίζεται με το έλεγχο των συναισθημάτων, της συμπεριφοράς και τους σκοπούς ενός ατόμου και φαίνεται να παίζει ένα σημαντικό ρόλο στη μνήμη και τη μάθηση. Ακόμη, μέσω του υποθαλάμου και των ορμονών που αυτός εκκρίνει επηρεάζει με πολλούς τρόπους τη συμπεριφορά ενός ατόμου (π.χ. αντιδράσεις φόβου).

Ο ρόλος του ιπποκάμπου στο μεταιχμιακό σύστημα σχετίζεται με τη **μνήμη και τη μάθηση** καθώς μεσολαβεί την παγίωση των μνημονικών πληροφοριών και σχετίζεται με τη βραχυπρόθεσμη μνήμη σε σχέση με τα συναισθήματα. Ο ιππόκαμπος συνδέεται και με την όσφρηση, ενώ παράλληλα είναι εκείνος που θα “αποφασίσει” ποια πληροφορία και πώς θα καταχωρηθεί στη μακροπρόθεσμη μνήμη, ως εμπειρία εμπεδωμένη μετά από επανάληψη. Σε νευρωνικό επίπεδο, η μνήμη και η μάθηση χαρακτηρίζονται από μακροχρόνιες προσαρμοστικές μεταβολές των νευρωνικών κυκλωμάτων του εγκεφάλου ως απόκριση στο περιβάλλον. Οι προσαρμοστικές αυτές μεταβολές δίνουν τη δυνατότητα στον οργανισμό να μπορεί να αντιδρά κατάλληλα σε αλλαγές του περιβάλλοντός του με βάση προηγούμενες εμπειρίες που έχουν αποθηκευτεί στον εγκέφαλο ως μνήμη (Bear, et al., 2001).

Από καιρό ήταν γνωστό, ότι ο ιππόκαμπος και οι σχετιζόμενες με αυτόν περιοχές του κροταφικού λοβού είναι σημαντικές για τη διαμόρφωση της μνήμης. Οι

μελέτες της εμπλοκής του κροταφικού λοβού στις διαδικασίες της μνήμης ξεκίνησαν από την περίπτωση του ασθενούς H.M., ο οποίος υπέφερε από επιληπτικές κρίσεις. Μετά την αμφοτερόπλευρη αφαίρεση της έσω μοίρας του κροταφικού λοβού (συμπεριλαμβανομένου του ιπποκάμπου), οι επιληπτικές κρίσεις του ασθενούς H.M. μειώθηκαν σημαντικά, αλλά διαπιστώθηκε μεγάλη απώλεια μνήμης, καθώς ο ασθενής έχασε την ικανότητα να σχηματίζει νέες μακροχρόνιες μνήμες (Scoville & Milner, 1957). Ενώ η βραχύχρονη μνήμη του ήταν άθικτη, εκείνο που έλειπε σε σημαντικό βαθμό από τον ασθενή ήταν η ικανότητα να μεταφέρει τους περισσότερους τύπους μάθησης από τη βραχύχρονη μνήμη, που διαρκεί μερικά δευτερόλεπτα ή λεπτά, στη μακρόχρονη μνήμη που διαρκεί ημέρες, μήνες ή και περισσότερο (Kandel, et al., 2000). Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάστηκαν αργότερα από μελέτες σε ασθενείς με βλάβες περιορισμένες αποκλειστικά στον ιππόκαμπο (Zola-Morgan & Squire, 1986), (Rempel-Clower, et al., 1996), υποδηλώνοντας ότι αυτή η εγκεφαλική περιοχή είναι υπεύθυνη για πολλές από τις διαδικασίες της μνήμης και ότι είναι απολύτως απαραίτητη για τη λειτουργία της βραχυπρόθεσμης λειτουργικής μνήμης και για την εδραίωση μακροχρόνιων μνημών στο φλοιό. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι είναι από τις κύριες δομές που επηρεάζονται στην νόσο του Alzheimer στην οποία υπάρχουν βλάβες στον ιππόκαμπο νωρίτερα από άλλα μέρη του φλοιού (μετωπιαίοι λοβοί) και η μνήμη είναι η πρώτη λειτουργία που διαταράσσεται στη νόσο.

Η σημαντικότητα του ιπποκάμπου περιλαμβάνεται και σε άλλες διανοητικές ασθένειες. Βλάβες του κοιλιακού ιπποκάμπου σε πειραματόζωα (το ανάλογο του προσθίου τμήματος του ιπποκάμπου στον άνθρωπο) προκαλούν συμπεριφορικές αλλαγές ανάλογες των συμπτωμάτων της σχιζοφρένειας (Daenen, et al., 2003), ενώ άλλες εργασίες αναφέρουν πως ο όγκος του πρόσθιου ιπποκάμπου σε ασθενείς με σχιζοφρένεια είναι συχνά ελαττωμένος (Pegues, et al., 2003). Ακόμα, φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με εγκεφαλική ισχαιμία και ανοξία καθώς και στην **επιληψία**, όπου παρουσιάζει τον χαμηλότερο επιληπτικό ουδό από οποιαδήποτε άλλη εγκεφαλική περιοχή. Πολλές μελέτες υποστηρίζουν ότι δυσλειτουργία του ιππόκαμπου αποτελεί την πηγή για την εμφάνιση επιληψίας κροταφικού λοβού (temporal lobe epilepsy – TLE) (Ang, et al., 2006). Πιθανός μηχανισμός είναι η απορρύθμιση του κυκλώματος του ιπποκάμπου μέσω της μείωσης της μεταγωγής σήματος από την CA3 στην CA1 περιοχή ή/και η μειωμένη διεγερσιμότητα της περιοχής CA3 (Avoli, 2007). Επιπλέον, παθολογοανατομικές μελέτες ιππόκαμπου που προέρχονταν από ασθενείς οι οποίοι έπασχαν από κροταφική επιληψία, ενισχύουν την άποψη ότι η νευρωνική απώλεια του ιππόκαμπου συνδέεται άμεσα με τη σύνθετη εστιακή επιληψία. Από τις περιοχές που υπέστησαν νευρωνική καταστροφή φαίνεται ότι η CA1 είναι η πιο επηρεασμένη και ακολουθείται από τη CA3 και τη CA2 (Mouritzen Dam, 1982).

Η συμμετοχή του ιπποκάμπου στις λειτουργίες της μνήμης (κωδικοποίηση-ανάκτηση) φαίνεται καλύτερα σε πειράματα στα οποία ζώα χρησιμοποιούν την χωρική μνήμη για πλοήγηση (Jarrard, 1978), (Olton, 1978). Σε αυτή την περίπτωση, οι νευρώνες του ιπποκάμπου πυροδοτούν με διαφορετικά πρότυπα ανάλογα του ερεθίσματος που δέχονται από το περιβάλλον και την τοποθεσία του ζώου. Τα

κύτταρα που ενεργοποιούνται σε μια συγκεκριμένη θέση του περιβάλλοντος, ονομάζονται κύτταρα θέσης (place cells) και παρέχουν στο πειραματόζωο έναν χωρικό χάρτη του περιβάλλοντος (O'Keefe & Dostrovsky, 1971), (O'Keefe & Burgess, 2005). Επιπλέον, ο ιππόκαμπος χαρακτηρίζεται από EEG πρότυπα κυμάτων τα οποία σχετίζονται με λειτουργίες μνήμης και μάθησης. Ειδικότερα, ο ρυθμός θήτα (5-10Hz), καταγράφεται όταν το πειραματόζωο εξερευνά το περιβάλλον του (Buzsáki, 1989) και αντικαθίσταται από οξύαιχμα κύματα υψηλού ύψους κατά τη διάρκεια της εγρήγορσης. Κατά τη διάρκεια του ρυθμού θήτα ο ιππόκαμπος δέχεται αναπαράσταση του περιβάλλοντος ενώ στην περίπτωση των οξύαιχμων κυμάτων, ο ιππόκαμπος μεσολαβεί την εδραίωση της πληροφορίας σε μακροχρόνια μνήμη. Κατά συνέπεια, οποιαδήποτε διαταραχή (π.χ. επιληπτική δραστηριότητα) σε αυτό το μοντέλο 2 σταδίων τόσο στο εξερευνητικό στάδιο (θήτα) όσο και στα οξύαιχμα κύματα, δύναται να δημιουργήσει διαταραχές μνήμης.

Όσον αφορά στον άνθρωπο έχει παρατηρηθεί ότι ο ιππόκαμπος ενεργοποιείται σε καταστάσεις που σχετίζονται με εικονική πλοήγηση στο περιβάλλον. Έτσι, μόλις τα άτομα μάθουν το εικονικό περιβάλλον, καταγράφεται η εγκεφαλική τους δραστηριότητα με τη βοήθεια της τεχνικής PET, καθώς μετακινούνται νοερά από ένα αρχικό σημείο σε ένα άλλο τελικό σημείο του περιβάλλοντος. Έχει παρατηρηθεί αυξημένη ενεργοποίηση του δεξιού ιπποκάμπου όταν το άτομο πρέπει να ερευνησει το περιβάλλον (Burgess, et al., 2002). Άρα καταλαβαίνουμε ότι ο ιππόκαμπος είναι άμεσα συνδεδεμένος με την **χωρική μνήμη και μάθηση**.

Διαφορές κροταφικού και διαφραγματικού ιπποκάμπου

Τα άκρα του ιπποκάμπου είναι περιοχές που παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της μάθησης και την επεξεργασία του συναισθήματος. Διαφορετικές ερευνητικές προσεγγίσεις έχουν αποκαλύψει μεγάλη ετερογένεια στα μοριακά και δομικά χαρακτηριστικά των άκρων του ιπποκάμπου που σχετίζονται με διαφορετική λειτουργία. Πιο συγκεκριμένα, ο διαφραγματικός ιππόκαμπος έχει αναφερθεί ότι είναι υπεύθυνος για την **χωρική μνήμη και μάθηση** (Kim & Fanselow, 1992), (Moser, et al., 1993), (Moser, et al., 1995), (McHugh, et al., 2011), (Bannerman, et al., 2003), (Bannerman, et al., 2014), ενώ ο κροταφικός εμπλέκεται μεταξύ άλλων στην απόκριση στο **στρες και στην επεξεργασία του συναισθήματος** (Bannerman, et al., 2003), (Bannerman, et al., 2004), (Bannerman, et al., 2014), (McHugh, et al., 2011) ενώ χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερα χαμηλή ουδό πρόκλησης επιληπτικών κρίσεων (Gilbert, et al., 1985), (Papatheodoropoulos, et al., 2005), (Fancelow & Dong, 2010), (Toyoda, et al., 2013). Στους ανθρώπους, ο πρόσθιος (ή κροταφικός) ιππόκαμπος, ο οποίος αντιστοιχεί στον κροταφικό ιππόκαμπο στα τρωκτικά, φαίνεται να αποτελεί τη πιο συχνή θέση δημιουργίας επιληπτικών κρίσεων (McDonald, et al., 1991).

Οι ενδογενείς και εξωγενείς συνδέσεις είναι πολύ διαφορετικές για το κροταφικό και το διαφραγματικό άκρο και συνδέονται με διαφορετικές δομές εκτός

ιπποκάμπου (Ruth, et al., 1982), (Roberts, et al., 1984), (Van Groen & Lopes da Silva, 1985), (Witter, 1986), (Bannerman, et al., 2014). Ενώ ο διαφραγματικός ιππόκαμπος λαμβάνει αισθητηριακές πληροφορίες από περιοχές του φλοιού, ο κροταφικός ιππόκαμπος συνδέεται πιο στενά, με υποφλοιώδεις δομές, όπως η αμυγδαλή και ο άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (Bannerman, et al., 2014).

Διεγερτική νευροδιαβίβαση στα άκρα του ιπποκάμπου

Η διεγερτική νευροδιαβίβαση στον ιππόκαμπο μεσολαβείται από το γλουταμικό που ενεργεί σε ιονοτροπικούς NMDA και non-NMDA υποδοχείς, καθώς και σε μεταβοτροπικούς υποδοχείς (Hollmann & Heinemann, 1994). Οι υποδοχείς γλουταμικού εμπλέκονται σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις όπως η νευρωνική πλαστικότητα, η μνήμη, η μάθηση και η επιληψία (Chapman, 1998), (Rogawski & Donevan, 1999), (Ekonomou, et al., 2001) (Ekonomou & Angelatou, 1999), (Kullmann, et al., 2000), (Lynch, 2004). Οι υποδοχείς NMDA και non-NMDA διακρίνονται από τη διαφορετική κινητική των ρευμάτων τους (Monyer, et al., 1994), (Flint, et al., 1997), (Vicini, et al., 1998). Έτσι, ενώ οι υποδοχείς AMPA (AMPA) μεσολαβούν τα γρήγορα διεγερτικά μετασυναπτικά ρεύματα, τα αργά μεσολαβούνται από κανάλια του υποδοχέα NMDA (NMDAR) (Sprengel and Single, 1999) (παραμένουν ωστόσο πιο γρήγοροι από τους μεταβοτροπικούς υποδοχείς). Τόσο οι NMDA όσο και οι AMPAR εμπλέκονται στην επαγωγή Long-term potentiation (LTP), το οποίο πιστεύεται ότι είναι ένα συναπτικό μοντέλο μνήμης (Kullmann, et al., 2000), (Williams, et al., 2003), (Lynch, 2004) καθώς και στην επιληπτογένεση (Chapman, 1998), (Ekonomou, et al., 2001), (Ekonomou & Angelatou, 1999), (Rogawski & Donevan, 1999), (Kullmann, et al., 2000).

Πρόσφατα, έχουν αποκαλυφθεί διαφορές στη συναπτική πλαστικότητα (Papatheodoropoulos & Kostopoulos, 2000), (Maruki, et al., 2001) και στην επιληπτογένεση (Papatheodoropoulos, et al., 2005) υποδηλώνοντας μια διακριτή λειτουργική συμβολή των υποδοχέων στους δύο πόλους του ιπποκάμπου. Ειδικότερα, το κροταφικό άκρο χαρακτηρίζεται από ισχυρότερη διεγερσιμότητα διαμεσολαβούμενη από ιονοτροπικούς γλουταματεργικούς υποδοχείς (AMPA, NMDAR) καθώς και υψηλότερη αναλογία AMPA/NMDA συγκριτικά με το διαφραγματικό άκρο (Papatheodoropoulos, et al., 2005). Ακόμη, η αναλογία υπομονάδων NR2A/NR2B είναι χαμηλότερη στο κροταφικό άκρο, γεγονός που το καθιστά λιγότερο επιρρεπές στο μπλοκάρισμα υποδοχέων NMDA από το μαγνήσιο (Pandis, et al., 2006).

Διαφορές στην ανασταλτική διαβίβαση

Ο κύριος ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής στον ιππόκαμπο είναι το GABA το οποίο δρα μέσω των ιονοτροπικών ($GABA_A$) και των μεταβοτροπικών ($GABA_B$) υποδοχέων. Οι ενδονευρώνες συνάπτονται τόσο με πυραμιδικούς όσο και με άλλους ενδονευρώνες, σχηματίζοντας νευρικά δίκτυα τα οποία συμμετέχουν σε διάφορους

ρυθμούς στον ιππόκαμπο. Οι ανασταλτικές συνάψεις γίνονται συνήθως στα σώματα των πυραμιδικών κυττάρων αλλά και στους δενδρίτες τους.

Πειραματικές μελέτες σε αρουραίους έχουν δείξει ότι, το διαφραγματικό άκρο χαρακτηρίζεται από εντονότερη συναπτική αναστολή εξαιτίας της έκφρασης διαφορετικών υπομονάδων των ιονοτροπικών υποδοχέων GABA_A (Sotiriou, et al., 2019) (Sotiriou, et al., 2005). Επίσης, έχουν βρεθεί σημαντικές διαφορές στην μοριακή πλαστικότητα οι οποίες συμβάλλουν στην διαφορετική δυναμική του νευρωνικού δικτύου μεταξύ διαφορετικών υποπεριοχών (Sotiriou, et al., 2019). Μια ιδιαίτερα σημαντική έκφραση της δυνατότητας ενός νευρικού δικτύου για πλαστικές αλλαγές είναι η ικανότητα αυθόρμητης δημιουργίας φυσιολογικών προτύπων συλλογικής δραστηριότητας απουσία εξωτερικού προκλητού ερεθίσματος (Tsukamoto-Yasui, et al., 2007). Τέτοιου είδους δραστηριότητα έχει βρεθεί στον ιππόκαμπο και αποτελείται από τα λεγόμενα σύμπλοκα οξύαιχμων κυματισμών (SPWs) (Buzsaki, 2015). Τα SPWs είναι ένα από τα κυρίαρχα πρότυπα φυσιολογικών συλλογικών δραστηριοτήτων του ιππόκαμπου (Colgin, 2016) και έχει βρεθεί ότι οργανώνονται φυσιολογικά *in vitro* στην CA1 περιοχή κροταφικών και όχι διαφραγματικών τομών. Πιο συγκεκριμένα, εμφανίστηκαν αυξημένα επίπεδα mRNA για τις υπομονάδες α1, β2, γ2 του GABA_A υποδοχέα στην περιοχή CA1 κροταφικών τομών κατά τη διάρκεια δημιουργίας των SPWs. Αυτές οι μεταβολές στα επίπεδα mRNA ακολουθήθηκαν από αύξηση του αριθμού των υποδοχέων GABA_A στον κροταφικό ιππόκαμπο. Όσον αφορά στις διαφραγματικές τομές παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων mRNA για τις υπομονάδες α2 και β5 χωρίς ωστόσο να συνοδεύεται με ποσοτική αλλαγή των υποδοχέων GABA_A (Sotiriou, et al., 2019). Όλες οι παραπάνω διαφορές καθιστούν το κροταφικό άκρο του ιπποκάμπου πιο διεγέρσιμο και κατά συνέπεια πιο επιρρεπές σε επιληπτοειδείς εκφορτίσεις συγκριτικά με το διαφραγματικό.

Διαφορές κροταφικού & διαφραγματικού άκρου με την ανάπτυξη

Καθώς ο εγκέφαλος αναπτύσσεται στα πρώτα στάδια της ζωής, ο βαθμός πλαστικότητας και ωρίμανσης διαφέρουν μεταξύ των περιοχών του εγκεφάλου (Heim & Binder, 2012). Συνεπώς, η ευαισθησία των διαφορετικών περιοχών και των λειτουργικών διεργασιών σε περιβαλλοντικές προσβολές, ποικίλλει και εξαρτάται από τον δεδομένο χρόνο ανάπτυξης (Brydges, et al., 2014). Κατά την μεταγεννητική περίοδο P0-P21 παρατηρείται αυξημένη ανάπτυξη της αμυγδαλής και του ιπποκάμπου ενώ την περίοδο P21-P30 οι περιοχές του φλοιού και το μεταιχμιακό σύστημα, συμπεριλαμβανομένου του ιππόκαμπου και της αμυγδαλής, υφίστανται δομική και λειτουργική ωρίμανση. Αυτές οι περιοχές συνεχίζουν να ωριμάζουν μέχρι και την P60 και συμμετέχουν ενεργά στη ρύθμιση της δραστηριότητας του ορμονικού στρες στην ενηλικίωση (Ulrich-Lai & Herman, 2009).

Μια άλλη μελέτη αναφέρει ότι γονίδια που σχετίζονται με LTP καθώς και την μακροπρόθεσμη μνήμη εκφράζονται στο διαφραγματικό άκρο την P14 και P28, ενώ γονίδια που σχετίζονται με την χολινεργική συναπτική διαβίβαση (καθώς και με

GABAεργικές συνάψεις) εκφράζονται την P14, P28, και P45 στο κροταφικό άκρο (Lee, et al., 2017).

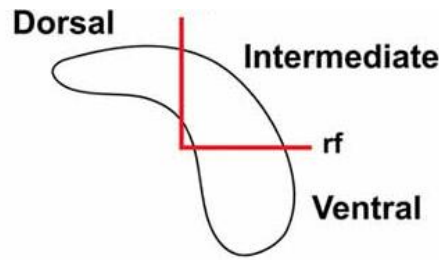
Δεδομένου του ότι ο ιππόκαμπος παίζει καθοριστικό ρόλο στη μνήμη, τη μάθηση και την συναισθηματική συμπεριφορά κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, οποιοσδήποτε εξωγενής τοξικός παράγοντας (π.χ. αιθανόλη) τη συγκεκριμένη περίοδο, είναι επιζήμιος για τις παραπάνω διεργασίες.

Μεσαίο τρίτο του ιπποκάμπου

Αρκετά ευρήματα δείχνουν ότι το μεσαίο τρίτο (intermediate) του ιπποκάμπου αποτελεί λειτουργικά **διακριτή** περιοχή (Fanselow & Dong, 2010) και εξυπηρετεί συγκεκριμένο ρόλο στην επεξεργασία χωρικών πληροφοριών στον ιππόκαμπο (Kenney & Manahan-Vaughan, 2013). Μια συμπεριφορική έρευνα των (Bast, et al., 2009) σε λαβύρινθο water maze αποκάλυψε ότι αρουραίοι με βλάβες στο μεσαίο τρίτο του ιπποκάμπου έχουν διαταραχές που σχετίζονται με τη γρήγορη εκμάθηση περιβάλλοντος (rapid place learning) σε αντίθεση με τον κροταφικό ιππόκαμπο ο οποίος δεν σχετίζεται με αυτού του είδους την επεξεργασία πληροφοριών. Επί προσθέτως, οι (Kenney & Manahan-Vaughan, 2013) αποκάλυψαν σημαντικές διαφορές στη συναπτική πλαστικότητα μεταξύ διαφραγματικού, μεσαίου και κροταφικού ιπποκάμπου. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι ήταν πιο εύκολη η εμφάνιση LTP σε τομές μεσαίου τρίτου σε σχέση με τα άκρα του ιπποκάμπου.

Ηλεκτροφυσιολογικά ευρήματα υποστηρίζουν επίσης αυτήν την υπόθεση. Ειδικότερα, βρέθηκε ότι οι νευρώνες CA1 σε κροταφικό, μεσαίο και διαφραγματικό ιππόκαμπο έχουν ξεχωριστές ηλεκτροφυσιολογικές και μορφολογικές ιδιότητες και ότι η διαφοροποίησή τους από το ένα άκρο στο άλλο είναι σταδιακή (Ruchi, et al., 2016).

Συνοψίζοντας, είναι σαφές ότι το μεσαίο τρίτου του ιπποκάμπου συμμετέχει ενεργά στην επεξεργασία χωρικών πληροφοριών. Ταυτόχρονα, προβλήματα σε αυτού του είδους την επεξεργασία πληροφοριών έχουν αναφερθεί σε FAS πειραματόζωα. Συνεπώς, είναι πιθανό ο ενδιάμεσος ιππόκαμπος να αποτελεί στόχο της προγεννητικής έκθεσης σε αιθανόλη. Ένας από τους στόχους της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της επίδρασης της η προγεννητικής έκθεσης σε αιθανόλη σε αυτό το μέρος του ιπποκάμπου καθώς και η διευκρίνηση πιθανών μηχανισμών μέσω των οποίων προκαλούνται τα ελλείμματα στο σύνδρομο FAS και η αυξημένη τάση για επιληπτικές κρίσεις.



Εικόνα 3: απεικόνιση του μεσαίου τρίτου του ιπποκάμπου σε σχέση με τα άκρα

Μεσαίο τρίτο και επιληψία

Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ότι ο ενδιάμεσος ιππόκαμπος πιθανόν να παίζει ρόλο στην ισορροπία διέγερσης-αναστολής και την επιληπτογένεση. Συγκεκριμένα, σε πειράματα από μοντέλα επιληψίας κροταφικού λοβού (TLE) έχουν βρεθεί αλλαγές στη διασπορά των κοκκιωδών κυττάρων (granule cell dispersion), διαφορετική ευαισθησία των ενδονευρώνων (Marx, et al., 2013) καθώς και μεταβολές στη δυνατότητα νευρογένεσης στον ενδιάμεσο ιππόκαμπο (Häussler, et al., 2012).

Μια οπτογενετική (fMRI) μελέτη αναφέρει ότι διέγερση του διαφραγματικού και του ενδιάμεσου ιπποκάμπου ενεργοποιεί διακριτά νευρωνικά δίκτυα (σε όλο τον εγκέφαλο) και πιθανόν η διευκρίνιση του βαθμού συμμετοχής της κάθε περιοχής και η χαρτογράφηση των δικτύων που ενεργοποιούνται, να δώσει απαντήσεις για τους διαφορετικούς φαινοτύπους που υπάρχουν στην επιληψία (Weitz, et al., 2015). Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, είναι σαφές ότι το μεσαίο τρίτο του ιπποκάμπου συμμετέχει στην επιληψία και απαιτείται περαιτέρω μελέτη για τη διευκρίνιση του ρόλου του στην αυξημένη τάση εμφάνισης επιληπτικών κρίσεων στο σύνδρομο FAS.

***Granule cell dispersion** is one of the abnormal structural changes that has been shown in brains of patients with temporal lobe epilepsy

FAS (Fetal Alcohol Syndrome)

Το αλκοόλ έχει εμβρυοτοξική και τερατογόνο δράση, με ιδιαίτερη επίδραση στο έμβρυο κατά το τρίτο τρίμηνο της κύησης. Το 1899 έγινε η πρώτη συσχέτιση της αυξημένης συχνότητας θανάτων εμβρύων και αλκοολικών μητέρων. Αργότερα, στη δεκαετία του 60, περιγράφηκε το σύνδρομο FAS ύστερα από παρατήρηση των νεογνών αλκοολικών μητέρων τα οποία είχαν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά προσώπου και έγινε ομαδοποίηση των αλλοιώσεων υπό τον γενικότερο όρο Fetal Alcohol Spectrum Disorders (FASD). Έτσι οι διαταραχές FASD, περιλαμβάνουν μια ομάδα παθήσεων που εμφανίζονται σε ένα άτομο που έχει εκτεθεί σε αιθανόλη προγεννητικά. Σύμφωνα με ψυχολογικές αξιολογήσεις, τα παιδιά με FAS χαρακτηρίζονται από επίμονα και διακριτά μοτίβα γνωστικών δυσλειτουργιών (Mattson, et al., 1998), (Jacobson, 1998), (Roebuck, et al., 1999). Υπάρχουν πολλοί όροι για να περιγράψουν FASD ανάλογα με το είδος των συμπτωμάτων:

1. Εμβρυϊκό αλκοολικό σύνδρομο (FAS): είναι η πιο ακραία μορφή του FASD και μπορεί να προκαλέσει ακόμα και τον θάνατο του εμβρύου. Οι άνθρωποι με FAS μπορεί να έχουν μη φυσιολογικά χαρακτηριστικά του προσώπου, προβλήματα ανάπτυξης, και προβλήματα στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ). Επίσης περιλαμβάνει προβλήματα στη μνήμη και στη μάθηση, το εύρος προσοχής, την επικοινωνία, την όραση, ή της ακοής. Άτομα με FAS μπορεί να έχουν ένα συνδυασμό των παραπάνω συμπτωμάτων.
2. Alcohol-Related Neurodevelopmental Disorder (ARND): Άτομα με ARND μπορεί να έχουν νοητικά, μαθησιακά και συμπεριφορικά προβλήματα.
3. Alcohol-Related Birth Defects (ARBD): Άτομα με ARBD μπορεί να έχουν προβλήματα με την καρδιά, τα νεφρά, τα οστά ή με την ακοή ή και συνδυασμό αυτών.

Το σύνδρομο FAS, έχει ποσοστό εμφάνισης 2-5% σε παιδιά και προγεννητικά μπορεί να οδηγήσει ακόμη και στον θάνατο του εμβρύου (May, et al., 2011), (May, et al., 2014). Άνθρωποι που υποφέρουν από FAS χαρακτηρίζονται από υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης επιληπτικών κρίσεων συγκριτικά με τον γενικό πληθυσμό (έως 21%) (Francesco Nicita, 2014). Είναι ήδη γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι η έκθεση του αναπτυσσόμενου εγκεφάλου στο αλκοόλ μπορεί να μειώσει μόνιμα τον ουδό των επιληπτικών κρίσεων και να καταστρέψει επιλεκτικά τα πυραμιδικά κύτταρα της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου, αυξάνοντας την ευαισθησία του ιπποκάμπου στην δημιουργία επιληπτικών κρίσεων (Bonthius, et al., 2001). Ωστόσο ο ακριβής μηχανισμός που επηρεάζει τα επιμέρους νευροδιαβιβαστικά συστήματα παραμένει ασαφής.

Brain Growth Spurt

Η έκθεση σε αιθανόλη σε οποιαδήποτε στιγμή κατά τη διάρκεια της κύησης μπορεί να είναι επιζήμια για την ανάπτυξη του εγκεφάλου του μωρού. Ωστόσο, όπως ήδη αναφέρθηκε, η χορήγηση αιθανόλης προγεννητικά κατά την περίοδο που συμβαίνει ταχεία ανάπτυξη του εγκεφάλου (BGS) είναι η πλέον επιβαρυντική και αποτελεί τις συνήθεις συνθήκες εμφάνισης του FAS (Bonthius, et al., 2001) (Bonthius, et al., 2001).

Η περίοδος αυτή, κατά την οποία πραγματοποιείται συναπτογένεση, έντονος κυτταρικός πολλαπλασιασμός, αξονική ανάπτυξη, μετανάστευση, διαφοροποίηση, έντονος σχηματισμός και βελτιστοποίηση των γλουταματεργικών συνάψεων στον ιππόκαμπο, αντιστοιχεί στο τρίτο τρίμηνο της κύησης στον άνθρωπο, ενώ στον αρουραίο στην 1-10^η μέρα μετά την γέννηση (Puglia & Valenzuela, 2010). Έτσι καταλαβαίνουμε ότι πολλές νευροαναπτυξιακές διαταραχές που σχετίζονται με το αλκοόλ αποτελούν, τουλάχιστον εν μέρει, το αποτέλεσμα της παρεμβολής της αιθανόλης σε αυτές τις δραστικές αναπτυξιακές διαδικασίες. Η αιθανόλη και οι μεταβολίτες της μεταφέρονται από το κυκλοφορικό της μητέρας σε αυτό του εμβρύου μέσω του πλακούντα και προκαλούν τις διαταραχές που παρατηρούνται στο σύνδρομο FAS (μειωμένο βάρος νεογνού, παρεμπόδιση της φυσιολογικής ανάπτυξης, εμφάνιση χαρακτηριστικών δυσμορφιών στο πρόσωπο και στα άκρα, καταστροφή νευρώνων και εγκεφαλικών δομών, διαταραχή εγκεφαλικών κυκλωμάτων κ.λ.π.). Συχνά εμφανίζονται και ψυχολογικά ή συμπεριφορικά προβλήματα στον απόγονο, τα οποία δύναται να μονιμοποιηθούν.

Συμπτώματα

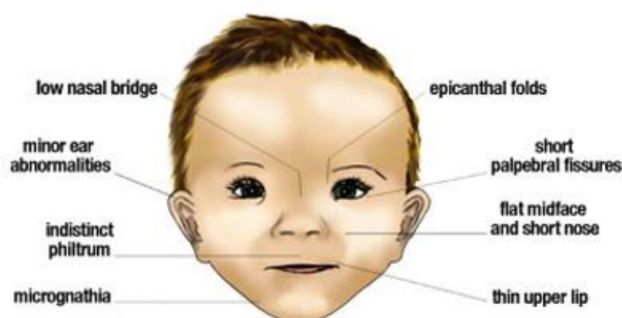
1. Αναπτυξιακά Προβλήματα

Οι άνθρωποι που υποφέρουν από FAS χαρακτηρίζονται από ύψος και βάρος χαμηλότερα από το μέσο όρο, κάτι που εξακολουθεί να ισχύει σε όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Παρουσιάζονται μυοσκελετικές δυσμορφίες με ιδιαίτερη έμφαση στα άκρα (υπο- ή υπερπλασίες δακτύλων, κλπ).

2. Δυσμορφίες Προσώπου

Συγκεκριμένες κρανιοπροσωπικές αλλοιώσεις σχετίζονται με το FAS και αποτελούν ισχυρή ένδειξη για παράλληλη εγκεφαλική βλάβη. Πιστεύεται ότι αυτές οι αλλαγές γίνονται ανάμεσα στην 10^η και 20^η εβδομάδα της κύησης και είναι κυρίως τρεις: (1) επίπεδο φίλτρο (εσοχή δέρματος κάτω από τη μύτη), (2) λεπτό άνω χείλος και (3) μικρές μεσοβλεφάρειες σχισμές (εικόνα 4). Ανάλογα με το εάν εμφανίζεται ένα ή τρία από τα χαρακτηριστικά, και ανάλογα με την έντασή τους, το σύνδρομο FAS χαρακτηρίζεται από ήπιο έως και σοβαρό.

FETAL ALCOHOL SYNDROME



Εικόνα 4: κρανιοπροσωπικές αλλοιώσεις που παρατηρούνται στο FAS.

3. Αλλοιώσεις Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ)

Βασικό χαρακτηριστικό κάθε διάγνωσης FASD είναι οι διαταραχές του ΚΝΣ. Η τερατογόνος δράση της αιθανόλης μπορεί να βλάψει τον εγκέφαλο ανάλογα με το ποσό, το χρόνο έκθεσης σε αλκοόλ και το στάδιο ανάπτυξης του ΚΝΣ, τη συχνότητα της έκθεσης, καθώς και τη γενετική προδιάθεση του εμβρύου και της μητέρας. Ανάλογα με την ισχύ της έκθεσης οι επιδράσεις μπορεί να είναι από ήπια ανιχνεύσιμες έως και να φθάσουν ακόμη και σε αποβολή και θνησιγένεια. Η καταστροφή του ΚΝΣ εκφράζεται μέσω συμπεριφορικών και νοητικών αλλοιώσεων και πραγματοποιείται σε τρία επίπεδα:

- (1) δομικό
- (2) νευρολογικό
- (3) λειτουργικό επίπεδο

Δομικό επίπεδο

Παρατηρούνται αισθητές δομικές ανωμαλίες του εγκεφάλου ή διάφορων εγκεφαλικών δομών. Διαρθρωτικά προβλήματα μπορεί να περιλαμβάνουν μικροκεφαλία (μικρό μέγεθος του κεφαλιού) από δύο ή περισσότερες τυπικές αποκλίσεις κάτω από το μέσο όρο, ή άλλες ανωμαλίες στη δομή του εγκεφάλου (π.χ., αγενεσία του μεσολοβίου, υποπλασία της παρεγκεφαλίδας και του ιπποκάμπου). Όπως αναφέρθηκε, κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου της κύησης το αλκοόλ παρεμβαίνει στην μετανάστευση και την οργάνωση των κυττάρων του εγκεφάλου με αποτέλεσμα τη δημιουργία δομικών παραμορφώσεων και ελλειμμάτων στον εγκέφαλο. Ακόμη, κατά τη διάρκεια του τρίτου τριμήνου, βλάβη μπορεί να προκληθεί στον ιππόκαμπο και συνεπώς να επηρεαστεί η μνήμη και η μάθηση του ατόμου καθώς και η ικανότητα κωδικοποίησης οπτικών και ακουστικών πληροφοριών με αποτέλεσμα τη δημιουργία νευρολογικών και λειτουργικών διαταραχών του ΚΝΣ.

Νευρολογικό επίπεδο

Στο πλαίσιο της FASD, οι νευρολογικές βλάβες που προκαλούνται από προγεννητική έκθεση αλκοόλ μπορεί να αφορούν γενική νευρολογική βλάβη του ΚΝΣ, του ΠΝΣ, ή του ΑΝΣ. Οι αλλοιώσεις σε νευρολογικό επίπεδο γίνονται αντιληπτές διαμέσου είτε εμφάνισης διαταραχών (όπως επιληψία ή διαταραχές κρίσεων) είτε μέσω νευρολογικών αλλοιώσεων όπως ελλειμματικός έλεγχος των λεπτών κινήσεων, απώλεια ακοής, ελαττωματικό βάδισμα και συγχρονισμός κινήσεων ματιών-χεριών. Συνήθως οι ασθενείς που παρουσιάζουν νευρολογικά προβλήματα τέτοιας φύσεως εμφανίζουν και κάποιο βαθμό νοητικής στέρησης.

Λειτουργικό επίπεδο

Παρατηρούνται διαταραχές στην μάθηση, στον έλεγχο των παρορμήσεων, στην κοινωνική συνείδηση, στην επικοινωνία, στην ικανότητα αντίληψης/κατανόησης των μαθηματικών, στην μνήμη, στην κρίση, στην προσοχή και την ικανότητα συγκέντρωσης, στο επίπεδο IQ, στην εμφάνιση υπερδραστηριότητας (Slaweck, et al., 2004). Παρουσιάζονται βλάβες στην μάθηση και την μνήμη, στην φυσιολογική λειτουργία και αντίληψη του συναισθήματος αλλά και στην κωδικοποίηση οπτικών και ακουστικών πληροφοριών.

Εκτός από τις παραπάνω διαταραχές έχει διαπιστωθεί ότι κι άλλες καταστάσεις μπορεί συχνά να συνυπάρχουν με το σύνδρομο FAS και να απορρέουν από την προγεννητική έκθεση στο αλκοόλ. Τέτοιες διαταραχές μπορεί να είναι καρδιακές, σκελετικές (π.χ. ελαττωματική τοποθέτηση και λειτουργία αρθρώσεων, διαφορετικά μοτίβα των αναδιπλώσεων της παλάμης), νεφρικές (απλαστικοί, δυσπλαστικοί ή υποπλαστικοί νεφροί), οπτικές (π.χ. στραβισμός, υποπλασία οπτικού νεύρου) και άτυπες διαταραχές όπως πτώση βλεφάρου, μικρό-οφθαλμία, λαγωχειλία με ή χωρίς λυκόστομα, κοντός λαιμός, δισχιδή ράχη και υδροκεφαλία κ.λ.π.

FAS και επιληψία

Η επιληψία αποτελεί σημάδι της δυσλειτουργίας του εγκεφάλου και αιτία μεγάλου μέρους των δυσλειτουργιών σε μερικά παιδιά με εμβρυϊκό αλκοολικό σύνδρομο. Ο σχηματισμός του ιπποκάμπου είναι ευάλωτος σε επαγόμενες από το αλκοόλ παθολογικές αλλαγές και είναι η πηγή της επιληπτικής δραστηριότητας σε μια ποικιλία από επιληπτικές καταστάσεις (Bonthius, et al., 2001).

Οι περιοχές του αναπτυσσόμενου εγκεφάλου που είναι υπεύθυνες για την επιληψία που επάγεται από την έκθεση σε αιθανόλη και οι μηχανισμοί με τους οποίους αυτές οι προσβεβλημένες θέσεις προκαλούν επιληπτικές κρίσεις είναι **άγνωστες**. Ωστόσο, πληθώρα στοιχείων υποδηλώνουν ότι εμπλέκεται ο σχηματισμός ιπποκάμπου. Ο ιπποκάμπος είναι ικανός να συγχρονίζει τον μεγάλο πληθυσμό των νευρώνων σε ένα πλήθος συνεκτικών προτύπων δραστηριότητας δικτύου

(Klausberger & Somogyi, 2008), (Battaglia, et al., 2011) και αποτελεί μια ιδιαίτερα επιληπτογενή περιοχή καθώς είναι σημαντική εστία επιληπτικής δραστηριότητας σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις τόσο σε ανθρώπους όσο και σε πειραματόζωα όπως είδαμε παραπάνω (Germano & Sperber, 1998), (Stringer & Lothman, 1992), (Van Paesschen, et al., 1997).

Κλινικές μελέτες

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, επιληπτικές κρίσεις παρατηρούνται με συχνότητα 3-21% σε παιδιά με διαταραχές FASD. Πρόσφατες κλινικές μελέτες επιβεβαιώνουν την αυξημένη τάση εμφάνισης επιληπτικών κρίσεων σε άτομα που πάσχουν από FASD (Boronat, et al., 2017), (Nicita, et al., 2014), (Bell, et al., 2010). Ειδικότερα, τα κλινικά δεδομένα αποκαλύπτουν ότι ένα σημαντικό ποσοστό παιδιών με FAS παρουσιάζουν εστιακές επιληπτικές κρίσεις (*partial seizures*) και ανώμαλο EEG με διαταραχές του κροταφικού λοβού (Boronat, et al., 2017). Οι γενικευμένες τονικοκλονικές κρίσεις είναι ο επικρατέστερος τύπος επιληπτικών κρίσεων μεταξύ των ασθενών με FASD (Bell, et al., 2010), (Nicita, et al., 2014), (Sun, et al., 2009), (Vestergaard, et al., 2005).

Αξίζει να αναφερθεί μια πρόσφατη κλινική μελέτη στην οποία συμμετείχαν 13 ασθενείς με FASD και επιληψία ή μεμονωμένες κρίσεις. Τα 11 από τα 13 παιδιά εμφάνισαν επιληψία και τα 2 παρουσίασαν ένα μεμονωμένο επιληπτικό επεισόδιο. Παρατηρήθηκαν τόσο γενικευμένες (*generalized seizures*), όσο και εστιακές κρίσεις (*partial seizures*) μέσω EEG. Ένας ασθενής παρουσίασε φαρμακοανθεκτική επιληψία (Nicita, et al., 2014).

Η αιθανόλη έχει την μέγιστη τοξικότητα όταν καταναλώνεται σε μεγάλες ποσότητες και σε μικρό χρονικό διάστημα (*binge drinking*). Αυτό συμβαίνει γιατί ο οργανισμός μπορεί να μεταβολίσει σε συγκεκριμένο ρυθμό την αιθανόλη που κυκλοφορεί στο αίμα, κι όταν ο ρυθμός κατανάλωσης υπερβεί αυτόν τον ενδογενή ρυθμό, όλο το επιπλέον αλκοόλ διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και επιδρά στα κύτταρα του εγκεφάλου. Κλινικές μελέτες αναφέρουν ότι ακόμα και η μεμονωμένη, απότομη κατανάλωση αλκοόλ (*binge drinking*) από την μητέρα σε συγκεκριμένη περίοδο της εγκυμοσύνης είναι πιθανό να σχετίζεται με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης επιληπτικών διαταραχών στους απογόνους (Sun, et al., 2009). Ωστόσο, πρόσφατες κλινικές μελέτες αναφέρουν ότι ακόμη και προγεννητική έκθεση σε χαμηλά έως μέτρια επίπεδα αιθανόλης αυξάνουν τον κίνδυνο το έμβρυο να εμφανίσει FAS (Kesmodel, et al., 2019). Επί προσθέτως, πειραματικές μελέτες αναφέρουν μακροχρόνια ελλείμματα νευρο-συμπεριφοράς σε απογόνους αρουραίων που εκτίθενται σε μέτρια επίπεδα αιθανόλης κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Σε αυτά τα ζώα έχουν βρεθεί προβλήματα στη μάθηση, τη μνήμη, τον κινητικό συντονισμό, την κοινωνική συμπεριφορά και τις αποκρίσεις στο άγχος. Αποδείχθηκε επίσης αυξημένη ευπάθεια στην κατάχρηση ουσιών. Αυτές οι αλλαγές συμπεριφοράς έχουν συσχετιστεί με βλάβες στα συστήματα νευροδιαβιβαστών ή/ και στη συναπτική πλαστικότητα σε αρκετές περιοχές του εγκεφάλου (Valenzuel, et al., 2012).

Μελέτες σε πειραματόζωα

Μελέτες σε πειραματόζωα έχουν αποκαλύψει ότι ο ιππόκαμπος είναι ευάλωτος στον νευρωνικό θάνατο που προκαλείται από το αλκοόλ, σε διαταραχές κυκλωμάτων, διαταραχές στη δημιουργία νευρώνων καθώς και μεταβολή της λειτουργίας των υποδοχέων γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA) (Bonthius & West, 1990), (Miller, 1995), (West, et al., 1986) (Wafford, et al., 1991). Πιο συγκεκριμένα, η αιθανόλη επάγει τη GABAεργική νευροδιαβίβαση, ενισχύοντας τα ρεύματα που έχουν προκληθεί από το GABA (Wafford et al., 1991). Σε χαμηλές ή μέτριες δόσεις η αιθανόλη ενισχύει τους GABA υποδοχείς μέσω αλλοστερικής τροποποίησης. Κάθε μία από αυτές τις παθολογικές μεταβολές εντός του αναπτυσσόμενου ιπποκάμπιου σχηματισμού, μπορεί να μειώσει τον ουδό για την πρόκληση κρίσεων και να αυξήσει την πιθανότητα έκλυσης επιληπτικών κρίσεων (Armstrong & Mizrahi, 1998), (Lothman & Bertram, 1993), (Moshé, 1987).

Η μελέτη των Zucca και Valenzuela (2010) χαρακτήρισε την επίδραση της αιθανόλης στην απελευθέρωση τροφικών παραγόντων στην ιπποκαμπική περιοχή CA3. Η διέγερση των πυραμιδικών νευρώνων στην περιοχή αυτή προκαλεί την απελευθέρωση μιας πρωτεΐνης γνωστή ως νευροτροφικός παράγοντας που προέρχεται από τον εγκέφαλο (BDNF), η οποία προκαλεί μία μακροχρόνια ενίσχυση της GABAεργικής διαβίβασης που θεωρείται ότι είναι ουσιώδης για την ωρίμανση των εισροών GABA σε αυτούς τους νευρώνες. Οι ερευνητές βρήκαν ότι οξεία έκθεση σε αιθανόλη αναστέλλει αυτή την BDNF-διαμεσολαβούμενη ενίσχυση της GABAεργικής διαβίβασης σε τομές ιπποκάμπου. Η αναστολή αυτής της συναπτικής ενίσχυσης είναι πιθανόν να έχει επιβλαβή επίδραση στην ωρίμανση των ανασταλτικών κυκλωμάτων στην περιοχή CA3, προκαλώντας μια ανισορροπία μεταξύ διεγερτικών και ανασταλτικών φαινομένων, και τελικά να οδηγεί σε μεταβολές στη μάθηση, τη μνήμη, και σε άλλες γνωστικές διεργασίες (Valenzuela & Zucca, 2010).

Σε μία μελέτη ινδικών χοιριδίων τα οποία εκτέθηκαν επανειλημμένα σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης σε όλη την εγκυμοσύνη, οι ερευνητές βρήκαν σημαντικές αλλοιώσεις στην GABAεργική διαβίβαση και παρατήρησαν αυξημένα επίπεδα ορισμένων υπομονάδων του υποδοχέα GABA_A (A1 ή/και B2/3) στον εγκεφαλικό φλοιό και τον ιππόκαμπο των ενηλίκων απογόνων (Bailey, et al., 2004) (Noronha, et al., 2014). Αυτή η αλλαγή θα μπορούσε να έχει συμβεί ως απόκριση στη μείωση του αριθμού των νευρώνων GABA ή στη μείωση των ενζύμων που είναι απαραίτητα για τη σύνθεση GABA (Bailey, et al., 2004). Ακόμη, σε εγκεφάλους ενήλικων επιμύων οι οποίοι εκτέθηκαν σε μία μοναδική δόση αιθανόλης κατά τη διάρκεια της κύησης (0,5 g/dl), βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα της υπομονάδας α5 του GABA_A υποδοχέα. Οι υποδοχείς GABA_A που περιέχουν την υπομονάδα α5 εκφράζονται έξω από την συναπτική περιοχή και ασκούν επίμονο ανασταλτικό έλεγχο σε νευρώνες του ιπποκάμπου και του φλοιού.

Επίσης, είναι γνωστό ότι η έκθεση του αναπτυσσόμενου εγκεφάλου του αρουραίου στο αλκοόλ μειώνει μόνιμα τον ουδό έκλυσης των κρίσεων που προκαλούνται από πεντυλενοτετραζόλη (PTZ). Έχει βρεθεί ότι η τροποποίηση του

αυτή του κατωφλιού επιληπτικών κρίσεων συσχετίζεται με την απώλεια πυραμιδικών κυττάρων της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου (Bonthius, et al., 2001). Επιπλέον, πολλαπλές μελέτες έχουν διαπιστώσει ότι η έκθεση στο αλκοόλ κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης μπορεί να προκαλέσει προσωρινές (Krahl, et al., 1999) αλλά και μόνιμες ανωμαλίες (Bellinger, et al., 1999), (Cortese, et al., 1997) στις ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες των νευρώνων του ιπποκάμπου. Πρόσφατα οι Brady et al. (2013) έδειξαν ότι σε ποντίκια που είχαν εκτεθεί σε αιθανόλη προγεννητικά η NMDAR-εξαρτώμενη συναπτική πλαστικότητα (LTP) ήταν μειωμένη στην περιοχή της οδοντωτής έλικας, η οποία είχε συσχετιστεί με αλλοιωμένη έκφραση των υπομονάδων των υποδοχέων NMDA (μειωμένη έκφραση των υπομονάδων GluN2B και αυξημένη έκφραση των GluN1 και GluN3A (Brady, et al., 2013).

Μια πρόσφατη μελέτη που αξίζει να αναφερθεί, είναι αυτή των (Krawczyk, et al., 2016), η οποία προτείνει ότι η υπερευαισθησία του ιπποκάμπου στο FASD σχετίζεται με την δραστηριότητα των Sharp Waves (SPW) και την μεταβολή της ισορροπίας διέγερσης/αναστολής. Η CA3 περιοχή του ιπποκάμπου παράγει διεγερτική δραστηριότητα που ονομάζεται SPW, και αποτελεί ένα ιδανικό μοντέλο για τη μελέτη διαταραχών στη νευρωνική διεγερσιμότητα σε επίπεδο δικτύου καθώς και σε κυτταρικό επίπεδο (Ellender, et al., 2010), (Ylinen, et al., 1995), (Schönberger, et al., 2014) (Schlingloff, et al., 2014), (Hájos, et al., 2013). Στην μελέτη αυτή, χρησιμοποιήθηκε ένα μοντέλο ποντικού που είχε εκτεθεί σε αιθανόλη προγεννητικά και πραγματοποιήθηκαν διπλές εξωκυττάρειες καταγραφές καθώς και whole-cell patch-clamp από τα πυραμιδικά κύτταρα της CA3 περιοχής του ιπποκάμπου προκειμένου να αξιολογηθεί η επίδραση της προγεννητικής έκθεσης σε αιθανόλη κατά τη διάρκεια του 1^{ου} αντίστοιχου τριμήνου (10% v/v) στην δραστηριότητα SPW και στην ισορροπία διέγερσης/αναστολής. Παρατηρήθηκε ότι η προγεννητική έκθεση σε αιθανόλη (PAE) μεταβάλλει σημαντικά τις SPW κυματομορφές, και συγκεκριμένα αυξάνει τη διάρκεια και το ύψος συγκριτικά με τους μάρτυρες. Επιπλέον, οι τομές PAE παρουσίασαν μειωμένη φαρμακολογική αναστολή από τον ανταγωνιστή των υποδοχέων GABA_A, bicuculline (BMI) στη δραστηριότητα των SPW. Ακόμη, η αξιολόγηση της δραστηριότητας των πυραμιδικών κυττάρων της CA3 από τομές PAE αποκάλυψε μια ανισορροπία στο ισοζύγιο διέγερσης/αναστολής, το οποίο μετατοπίζεται προς όφελος της διέγερσης. Συνεπώς, φαίνεται ξεκάθαρα να υπάρχει μια δυσλειτουργία στην ικανότητα του ιπποκάμπου να διατηρήσει την ομοιόσταση του δικτύου και την κυτταρική υπερδιεγερσιμότητα σε μοντέλα PAE. Αυτές οι μεταβολές σε επίπεδο δικτύου αλλά και σε κυτταρικό επίπεδο προτείνουν έναν πιθανό μηχανισμό για την αυξημένη τάση για επιληπτικές κρίσεις καθώς και τις νευροσυμπεριφορικές δυσλειτουργίες που παρατηρούνται σε ασθενείς που έχουν εκτεθεί σε αιθανόλη προγεννητικά.

Παρόλα αυτά κάποιες μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν μοντέλα PAE, παρουσιάζουν αντιφατικά αποτελέσματα. Για παράδειγμα, μια μεμονωμένη έκθεση σε αιθανόλη την μεταγεννητική ημέρα 4 (P4) ή επαναλαμβανόμενες εκθέσεις σε αλκοόλη (από P4-P9) μειώνουν το κατώφλι για επιληπτικές κρίσεις που προκαλούνται από πεντυλενοτετραζόλη (PTZ) σε νεαρούς αρουραίους, αλλά όχι σε ενήλικους αρουραίους (Bonthius, et al., 2001).

Μια πρόσφατη μελέτη σε αναπτυσσόμενους αρουραίους αναφέρει ότι η προγεννητική έκθεση σε αιθανόλη ενισχύει την ευαισθησία σε NMDA-επαγόμενες γενικευμένες τονικοκλονικές κρίσεις και αυτή η αύξηση της ευαισθησίας διαφέρει ανάλογα με την ηλικία και το φύλο των αρουραίων (Cho, et al., 2017).

Είναι προφανές λοιπόν, ότι η έκθεση σε αιθανόλη πριν από τη γέννηση προκαλεί ανατομικά και λειτουργικά ελλείμματα τα οποία οδηγούν σε μακροχρόνια λανθασμένη σύνδεση των κυκλωμάτων του ιππόκαμπου, γεγονός που προκαλεί δυσλειτουργία και υπερευαισθησία. Συνεπώς, είναι πλέον σαφές ότι ο ιπποκάμπιος σχηματισμός εμπλέκεται σε επιληπτικές κρίσεις που προκαλούνται από το αλκοόλ αλλά ο ακριβής μηχανισμός για την αυξημένη τάση έκλυσης επιληπτικών κρίσεων παραμένει άγνωστος και χρειάζεται περαιτέρω μελέτη.

Χολινεργική διαβίβαση

Η ακετυλοχολίνη είναι ένας εστέρας οξικού οξέος και χολίνης, με χημικό τύπο $\text{CH}_3\text{COO}(\text{CH}_2)_2\text{N}+(\text{CH}_3)_3$ και αποτελεί διεγερτικό νευροδιαβιβαστή. Παράγεται στο κυτταρόπλασμα των νευρικών κυττάρων από χολίνη, η οποία εισάγεται στο κύτταρο μέσω ενός ειδικού μεταφορέα και το ακετυλοσυνένζυμο Α (CoA), το οποίο χρησιμεύει ως δότης της ακετυλικής ομάδας. Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση είναι η ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης. Η παραγόμενη ακετυλοχολίνη αποθηκεύεται στις νευρικές απολήξεις σε κυστίδια, από τα οποία απελευθερώνεται στη συναπτική σχισμή, παρουσία δυναμικού ενέργειας. Μετά τη σύνδεσή της με τους χολινεργικούς υποδοχείς που βρίσκονται στη μετασυναπτική μεμβράνη, η ελεύθερη ακετυλοχολίνη υδρολύεται ταχύτατα από την ακετυλοχολινεστεράση των χολινεργικών νεύρων και γαγγλίων του ΑΝΣ καθώς και των νευρομυϊκών συνάψεων (κινητικές πλάκες) του σωματικού νευρικού συστήματος.

Στο περιφερικό νευρικό σύστημα (ΠΝΣ) η ακετυλοχολίνη παίζει ρόλο στην κίνηση των σκελετικών μυών, καθώς επίσης και στη ρύθμιση των λείων και καρδιακών μυών. Στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) εμπλέκεται στη μάθηση, τη μνήμη καθώς και τη ρύθμιση διάθεσης (Whittaker, 1990). Στο ΚΝΣ η ACh έχει μια ποικιλία επιδράσεων ως νευροτροποποιητής και παίζει σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση της αισθητηριακής αντίληψης όταν ξυπνάμε, καθώς και στην διατήρηση της προσοχής. Βλάβη στο χολινεργικό σύστημα στον εγκέφαλο έχει αποδειχθεί ότι συνδέεται με ελλείμματα μνήμης και με τη νόσο του Alzheimer. Η ACh έχει επίσης δειχθεί ότι προάγει τον ύπνο REM (Watson, et al., 2010).

Αξίζει να αναφερθεί ότι αποτελέσματα από προηγούμενη δουλειά του εργαστηρίου αναφέρουν ότι επιληπτικές κρίσεις στον ανώριμο εγκέφαλο μπορεί να έχουν μακροπρόθεσμες συνέπειες στη χολινεργική νευροδιαβίβαση, μετατρέποντας την αύξηση της ενδογενούς ACh σε επιληπτογόνο ερέθισμα, το οποίο με τη σειρά του πιθανώς να διευκολύνει την εμφάνιση επιληπτικών κρίσεων εκ νέου (Meilleur, et al., 2000).

Νικοτινικοί υποδοχείς

Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι χολινεργικών υποδοχέων, οι ιοντικοί και οι μεταβοτροπικοί υποδοχείς. Οι ιοντικοί ονομάζονται νικοτινικοί (δρα σαν αγωνιστής η νικοτίνη) ενώ οι μεταβοτροπικοί ονομάζονται μουσκαρινικοί (δρα σαν αγωνιστής η μουσκαρίνη). Στο ΚΝΣ, οι νικοτινικοί υποδοχείς (nAChRs) βρίσκονται κυρίως στο προσυναπτικό άκρο χολινεργικών νευρώνων αλλά και μη χολινεργικών, π.χ. ντοπαμινεργικών, γλουταμινεργικών και GABA (προσυναπτικοί ετερόλογοι υποδοχείς), όπου αυξάνοντας τη συγκέντρωση Ca^{2+} σύναψη, αυξάνουν την απελευθέρωση του νευροδιαβιβαστή. Στη συνέχεια, ανάλογα με το είδος του νευροδιαβιβαστή που απελευθερώνεται προκαλείται ενίσχυση της διέγερσης ή της αναστολής. Αυτός ο μηχανισμός δράσης έχει επιβεβαιωθεί και στον ανώριμο εγκέφαλο (BessAramakis & Metherate, 1998).

Βρίσκονται επίσης και μετασυναπτικά, σε σώματα και δενδρίτες, όπου ενεργοποιούν τη διέγερση των νευρώνων. Οι nAChRs στο ΚΝΣ συμμετέχουν σε λειτουργίες, όπως η μνήμη και η μάθηση (μέσω της αύξησης της απελευθέρωσης του γλουταμινικού) (Granon, et al., 1995), (Levin & Simon, 1998), η ευχαρίστηση (μέσω της αύξησης της απελευθέρωσης της ντοπαμίνης), το άγχος και ο κεντρικός έλεγχος του πόνου (μέσω της ενεργοποίησης των μετασυναπτικών nAChRs). Επομένως, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι εμπλέκονται επίσης στη δημιουργία επιληπτικών κρίσεων (Aceto, et al., 1969), (Miner & Collins, 1989), (Picard, et al., 1999) Ακόμη, οι νικοτινικοί υποδοχείς έχουν συσχετιστεί με ελλείμματα χωρικής μάθησης (Terry Jr, et al., 2000). Πιο συγκεκριμένα, έχει προταθεί ότι απουσία της $\beta 2$ υπομονάδας των νικοτινικών υποδοχέων επιταχύνει τον δομικό και γνωστικό εκφυλισμό (συμπεριλαμβανομένων και των ελλειμμάτων στην χωρική μάθηση) που συμβαίνει με την πάροδο της ηλικίας (Terry Jr, et al., 2000).

Νικοτινικοί υποδοχείς και επιληψία

Η Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy (ADNFLE), είναι η πρώτη ιδιοπαθής επιληψία της οποίας η μοριακή παθογένεια προκαλείται από μεταλλάξεις σε νικοτινικούς υποδοχείς. Οι μεταλλάξεις αυτές έχουν σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας των υποδοχέων στην ακετυλοχολίνη με αποτέλεσμα να προκαλείται ADNFLE. Επίσης, έχει βρεθεί ότι επιταχύνεται η απευαισθητοποίηση των υποδοχέων με αποτέλεσμα μειωμένη διαπερατότητα στο Ca^{2+} . Επί προσθέτως, έχει προταθεί ότι μεταλλάξεις που γίνονται σε nAChRs οι οποίοι βρίσκονται σε GABAεργικούς ενδονευρώνες πιθανός να είναι η αιτία δημιουργίας της υπερδραστηριότητας στην ADNFLE.

Κατά συνέπεια, είναι σαφές ότι μεταβολές στη λειτουργία των nAChRs (όπως αυτές που προκαλούνται από μεταλλάξεις ADNFLE), μπορεί να διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην αυξημένη τάση για επιληπτικές κρίσεις που παρατηρείται στο FAS.

Προγεννητική έκθεση σε αιθανόλη και νικοτινικοί υποδοχείς

Αρκετές μελέτες υποδεικνύουν ότι οι nAChRs είναι ένας από τους στόχους της αιθανόλης καθώς έχουν συνδεθεί με μοριακούς μηχανισμούς σχετικούς με την κατάχρηση αλκοόλ και την εξάρτηση. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι μεσολαβούν τους μηχανισμούς επιβράβευσης που ενεργοποιεί η αιθανόλη καθώς και την σταδιακά αναπτυσσόμενη εξάρτηση μέσω του μεσοκορτικομεταιχμιακού ντοπαμινεργικού συστήματος (Rahman, et al., 2016), (Rahman, et al., 2015), (Volkow & Baler, 2014), (Wise & Koob, 2014), (Koob & Volkow, 2010), (Ericson, et al., 2009).

Ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες επιβεβαιώνουν την ύπαρξη άμεσης συσχέτισης μεταξύ αιθανόλης και nAChRs. Ειδικότερα, οξεία έκθεση σε αιθανόλη αυξάνει την αποτελεσματικότητα της ACh στους $\alpha 4\beta 2$ nAChRs στον φλοιό αρουραίων (Aistrup, et al., 1999), (Zuo, et al., 2004) ενώ χρόνια έκθεση σε αιθανόλη μειώνει την πυκνότητα των $\alpha 4\beta 2$ nAChR (Robles & Sabriá, 2008), (Hillmer, et al., 2014) και πιθανόν επίσης να μειώνει την λειτουργία των νικοτινικών υποδοχέων *in vivo* (Majchrzak & Dilsaver, 1992).

Μια άλλη μελέτη αναφέρει ότι έκθεση σε νικοτίνη (ταυτόχρονα με την προγεννητική έκθεση σε αιθανόλη), μετριάζει τις αρνητικές επιδράσεις του αλκοόλ στην παραγωγή ROS (reactive oxygen species) καθώς και τα ελλείμματα που προκλήθηκαν στη χωρική μνήμη (Bhattacharya, et al., 2020). Επίσης κλινικές μελέτες αναφέρουν ότι το κάπνισμα μειώνει τα μέγιστα επίπεδα του BAC στους ανθρώπους καθώς καθυστερεί την γαστρική απορρόφηση του αλκοόλ (Chabenne, et al., 2014), (Johnson, et al., 1991). Κατά συνέπεια, η νικοτίνη φαίνεται να έχει μια νευροπροστατευτική δράση ενάντια σε τοξικούς παράγοντες όπως η αιθανόλη (Bhattacharya, et al., 2020). Ωστόσο, η μελέτη των Robles N and Sabria J (2008) υποδεικνύει ότι χρόνια κατανάλωση αιθανόλης, σε μέτρια επίπεδα, προκαλεί αλλαγές στους νικοτινικούς υποδοχείς του ιπποκάμπου αλλά δεν επιβαρύνει την εκμάθηση και πραγματοποίηση νέων γνώσεων, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις βελτιώνει τα αποτελέσματα (Robles & Sabriá, 2008).

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, είναι σαφές ότι υπάρχει μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των nAChRs και της έκθεσης σε αιθανόλη, άλλα χρειάζεται να γίνει περεταίρω έρευνα όσον αφορά στην επίδραση της προγεννητικής έκθεσης σε αιθανόλη στους νικοτινικούς υποδοχείς και στην τάση για επιληπτικές κρίσεις.

Μουσκαρινικοί υποδοχείς

Ο ιππόκαμπος χαρακτηρίζεται από την παρουσία πολλών χολινεργικών τερματικών και έχει μεγάλη πυκνότητα μουσκαρινικών χολινεργικών υποδοχέων. Στο ΚΝΣ οι μουσκαρινικοί υποδοχείς υπερτερούν των νικοτινικών (100:1). Επίσης έχει βρεθεί ότι όλοι οι μουσκαρινικοί υπότυποι εμφανίζονται στον ιππόκαμπο από νωρίς μετά την γέννηση και ότι η χολινεργική νεύρωση ωριμάζει κατά την 10^η μέρα μετά την γέννηση (Matthews, et al., 1974). Οι μουσκαρινικοί υποδοχείς (mACh) εντοπίζονται προ- και μετασυναπτικά στον ιππόκαμπο και χωρίζονται στους υπότυπους M1, M2, M3, M4 και M5. Η προσυναπτική τους επίδραση μειώνει την απελευθέρωση γλουταμινικού οξέος και έτσι θεωρούνται ανασταλτικοί. Αντίθετα, όταν βρίσκονται μετασυναπτικά, μειώνουν την αγωγιμότητα του καλίου με αποτέλεσμα να προκαλείται εκπόλωση του μετασυναπτικού νευρώνα και έτσι μπορούμε να πούμε ότι έχουν διεγερτική δράση. Οι μετασυναπτικές δράσεις της ACh στο ΚΝΣ διαμεσολαβούνται από τον υπότυπο M1, ενώ οι M2 είναι προσυναπτικοί αυτοϋποδοχείς. Οι M1, M3 και M5 προκαλούν κλείσιμο καναλιών K⁺ και άρα εκπόλωση του κυττάρου, ενώ οι M2 και M4 καταλήγουν σε άνοιγμα των καναλιών K⁺ και υπερπόλωση του κυττάρου. Στον ανθρώπινο εγκέφαλο οι M1 μουσκαρινικοί υποδοχείς είναι επικρατέστεροι (60% περίπου), ενώ οι M2 και M4 είναι λιγότερο άφθονοι (περίπου 20%) (Flynn, et al., 1995). Σε πειράματα που έγιναν σε ιππόκαμπο αρουραίου έχει βρεθεί ότι οι M1 μουσκαρινικοί υποδοχείς εκφράζονται στα πυραμιδικά κύτταρα ενώ οι M2 βρίσκονται σε χολινεργικά και μη χολινεργικά προσυναπτικά τερματικά που συγκεντρώνονται στα πυραμιδικά κύτταρα (Levely et al., 1991). Επίσης, οι M2 υποδοχείς έχουν βρεθεί και σε GABAεργικούς ενδονευρώνες (Hájos, et al., 1998).

Το χολινεργικό σύστημα είναι στενά συνδεδεμένο με τη GABAεργική και τη γλουταμινική νευροδιαβίβαση. Σε πολλές περιοχές του ΚΝΣ όπως στον ιππόκαμπο, την αμυγδαλή και τον φλοιό, χολινεργικοί νευρώνες καταλήγουν συχνά σε GABAεργικά κύτταρα υποδεικνύοντας μια εκτεταμένη συνδεσιμότητα μεταξύ του χολινεργικού και του GABAεργικού συστήματος. Ακόμη έχουν βρεθεί πολλά στοιχεία για την έκφραση του GABA σε χολινεργικά σώματα και τερματικά (Beaulieu & Somogyi, 1991). Εκτός αυτού έχει προταθεί ότι πρόσληψη GABA από τερματικά ACh, ενισχύει την απελευθέρωση ACh στον ιππόκαμπο (Bonanno & Raiteri, 1986). Οποιαδήποτε διαταραχή στην σύνδεση μεταξύ χολινεργικού συστήματος και της GABAεργικής διαβίβασης μπορεί να διαδραματίσει καίριο ρόλο στη γήρανση και σε δυσλειτουργίες της μνήμης (Araki, et al., 1996).

Επίδραση της αιθανόλης στην χολινεργική διαβίβαση

Πρόσφατες μελέτες, δείχνουν ότι το χολινεργικό σύστημα του ιπποκάμπου επηρεάζεται επίσης σημαντικά υπό συνθήκες φαρμακολογικών χειρισμών σε ζώα που είχαν υποστεί προγεννητική έκθεση σε αιθανόλη.

Αρχικά, είναι γνωστό ότι η αιθανόλη αναστέλλει τον μεταβολισμό του φολικού οξέος, της χολίνης και της βιταμίνης Α σε πολλαπλά στάδια. Έχει αποδειχθεί ότι η χορήγηση χολίνης (η οποία μεταβολίζεται σε ακετυλοχολίνη) ως συμπλήρωμα διατροφής σε αρουραίους που είχαν υποστεί προγεννητική έκθεση σε αιθανόλη μετριάξει πλήρως τις εκφυλιστικές επιδράσεις της αιθανόλης στην ανάπτυξη και την συμπεριφορά (Ballard, et al., 2012). Ακόμη, τα αναπτυξιακά αποτελέσματα του αλκοόλ φαίνεται επίσης να σχετίζονται, εν μέρη, με την τροποποίηση των microRNAs (miRNAs) που χρησιμεύουν ως αρνητικοί ρυθμιστές της γονιδιακής μετάφρασης. Μια πρόσφατη μελέτη αποδεικνύει ότι η χορήγηση χολίνης ομαλοποιεί τις διαταραχές στην έκφραση των miRNAs του ιπποκάμπου, που προκλήθηκαν από την έκθεση σε αιθανόλη κατά την ανάπτυξη και πιθανόν να προστατεύει συγκεκριμένα miRNAs από την αιθανόλη (Balaraman, et al., 2017). Επίσης, οι Montgomery et al. (2018), χρησιμοποιώντας ένα binge-drinking μοντέλο FASD σε αρουραίους, έδειξαν ότι η βαρενικλίνη (νικοτινικός αγωνιστής) ελαχιστοποιεί τις μεταβολές στη συχνότητα των αυθόρμητων μετασυναπτικών ρευμάτων που προκάλεσε η έκθεση σε αιθανόλη καθώς και τα συμπεριφορικά ελλείματα, υποδεικνύοντας άμεση σχέση αιθανόλης και χολινεργικής διαβίβασης (Montgomery, et al., 2018).

Συμπληρωματικά, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ανιούσα ρύθμιση στην ChAT (ένζυμο υπεύθυνο για την σύνθεση της ακετυλοχολίνης) στα ίδια ζώα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για συμπεριφορικά πειράματα εκτέλεσης εργασιών και προτάθηκε ότι η έκθεση σε αλκοόλ κατά την ανάπτυξη, μπορεί να διαταράξει τη μνήμη και την μάθηση μέσω των χολινεργικών μηχανισμών (Perkins, 2014). Η αλκοόλη δεν φαίνεται να επηρεάζει την συγκέντρωση της ενδογενούς ακετυλοχολίνης αλλά μειώνει σημαντικά την απελευθέρωση της. Ωστόσο σε αυτά τα πειράματα δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στην ChAT ή στα vAChT (vesicular achetylcholine receptor) και nAChT ($\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor) στην CA1 περιοχή του ιπποκάμπου παρόλο που παρατηρήθηκε αλλαγή στην απελευθέρωσή της ακετυλοχολίνης όπως αναφέρθηκε. Μία υπόθεση που προτάθηκε για να εξηγήσει αυτά τα αποτελέσματα είναι ότι η έκθεση σε αλκοόλ μειώνει την έκφραση του CHT (high-affinity choline uptake transporter) στον ιππόκαμπο (μεταφορέας της χολίνης που είναι υπεύθυνος για την μεταφορά της στο τερματικό και για την σύνθεσή της ακετυλοχολίνης), διαταράσσοντας την σύνθεση ακετυλοχολίνης και συμβάλλοντας έτσι στην μειωμένη απελευθέρωση της (Perkins, 2014). Ακόμη, έκθεση στο αλκοόλ κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης μπορεί επίσης να επηρεάσει την σύνθεση της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE), το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την διάσπαση της ακετυλοχολίνης στην σύναψη. Έκθεση στο αλκοόλ μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική κατιούσα ρύθμιση του ενζύμου αυτού. Μείωση της AChE έχει ως αποτέλεσμα

αύξηση της ακετυλοχολίνης εξωκυττάρια. Επιπλέον, άλλα ευρήματα δείχνουν ότι έκθεση σε αλκοόλ κατά την διάρκεια του τρίτου τριμήνου της κύησης (ισοδύναμο με PD 4-10) προκαλεί σημαντική αύξηση των μουσκαρινικών υποδοχέων στον ιππόκαμπο, (Deitrich & Erwin, 1996), (Nio, et al., 1991). Μια πιο πρόσφατη μελέτη έδειξε επίσης ότι η έκθεση σε αλκοόλη (PD 4-9) είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση των M1 υποδοχέων και μια σημαντική αύξηση των M2/4 υποδοχέων στο ραχιαίο ιππόκαμπο (Monk et al., 2012). Επί προσθέτως, είναι γνωστό ότι η αιθανόλη αναστέλλει τον μεταβολισμό του φολικού οξέος, της χολίνης, και της βιταμίνης Α σε πολλαπλά στάδια. Η χορήγηση χολίνης (η οποία μεταβολίζεται σε ακετυλοχολίνη) ως συμπλήρωμα διατροφής σε αρουραίους που είχαν υποστεί προγεννητική έκθεση σε αιθανόλη μετριάζει σχεδόν πλήρως τις εκφυλιστικές επιδράσεις της αιθανόλης στην ανάπτυξη και την συμπεριφορά (Ballard, et al., 2012). Συμπερασματικά, καταλαβαίνουμε ότι το χολινεργικό σύστημα στον ιππόκαμπο είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στην χορήγηση αιθανόλης κατά την ανάπτυξη και η διαταραχή του εμπλέκεται σε πολλά από τα συμπτώματα του FAS.

Κανάλια καλίου και επιληψία

Επειδή τα κανάλια K^+ συμβάλλουν σχεδόν σε όλες τις πτυχές της κυτταρικής ηλεκτρικής σηματοδότησης, αποτελούν πρωταρχικό ερευνητικό στόχο από όταν ξεκίνησε η μελέτη μοριακών αιτιών της επιληψίας. Το ανθρώπινο γονιδίωμα περιλαμβάνει περίπου 100 υπομονάδες καναλιών καλίου και οι περισσότερες εκφράζονται στον εγκέφαλο (Yu & Catterall, 2004) (Jegla, et al., 2009). Κατά τις δύο τελευταίες δεκαετίες, εντοπίστηκαν γονιδιακές ανωμαλίες στις οποίες βασίζονται διάφορες μορφές επιληψίας και τα περισσότερα από αυτά τα γονίδια κωδικοποιούν κανάλια ιόντων, τα οποία φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της ιδιοπαθούς επιληψίας. Πράγματι, αρκετοί επιληπτικοί φαινότυποι έχουν συσχετιστεί με δυσλειτουργίες των καναλιών καλίου (K^+) (Brenner & Wilcox, 2012). Αυτά τα κανάλια παίζουν σημαντικό ρόλο στη νευρωνική διέγερση και η σημασία τους σχετίζεται με το επίπεδο έκφρασης τους σε υποκυτταρικές περιοχές, σε μεμονωμένα κύτταρα ή σε επίπεδο κυκλώματος (Cooper, 2012). Τα κανάλια K^+ εμπλέκονται επίσης στον καθορισμό του εσωτερικού-αρνητικού δυναμικού ηρεμίας. Με βάση τις δομές τους, τα βιοφυσικά χαρακτηριστικά, τις φαρμακολογικές ευαισθησίες και τη φυσιολογία, αυτά τα κανάλια ταξινομούνται ως voltage-gated (K_v), inwardly rectifying (K_{ir}), sodium (Na)-activated channels ή Ca^{2+} -activated channels.

Inwardly Rectifying Potassium Channels και επιληψία

Τα κανάλια Kir εκφράζονται ευρέως σε πολλούς διεγερμένους και μη διεγερμένους ιστούς που παίζουν βασικό ρόλο στη διατήρηση του δυναμικού ηρεμίας και συνεπώς στη ρύθμιση της κυτταρικής διέγερσης. Περίπου 15 κλώνοι Kir που σχηματίζουν είτε ομοτετραμερή είτε ετεροτετραμερή έχουν ταυτοποιηθεί και ομαδοποιηθεί σε επτά διαφορετικές οικογένειες με βάση την ομοιότητα των αλληλουχιών τους καθώς και τις λειτουργικές ιδιότητές τους: Kir1-Kir7 (Hibino, et al., 2010). Διάφορα κανάλια Kir έχουν συσχετιστεί με επιληπτικούς φαινοτύπους και, συγκεκριμένα, τα Kir2.1, Kir3, Kir4 και Kir6.

Kir2.1

Το κανάλι Kir2.1 κωδικοποιείται από το γονίδιο KCNJ2 το οποίο εκφράζεται σε αρκετές περιοχές του εγκεφάλου (Karschin, et al., 1996), καθώς και σε αστροκύτταρα τα οποία ελέγχουν την προσωρινή αποθήκευση K^+ (σε συνδυασμό με το Kir4.1) (Jabs, et al., 2008) (Chever, et al., 2010). Αρκετές μεταλλάξεις που βλάπτουν τη λειτουργικότητα του καναλιού έχουν αναφερθεί και σχετίζονται με σύνδρομο εκτός της επιληψίας. Πρόσφατα, ορισμένοι συγγραφείς εντόπισαν μια νέα μετάλλαξη (p.Lys346Thr) στο KCNJ2 σε μονοζυγωτικά δίδυμα που εμφανίζουν φαινότυπο αυτισμού-επιληψίας, υποδεικνύοντας τον ρόλο των Kir2.1 σε νευροψυχιατρικές διαταραχές και στην επιληψία. Λειτουργικές μελέτες αποκάλυψαν ότι αυτή η μετάλλαξη προκαλεί αύξηση της έκφρασης και σταθερότητας της επιφάνειας του καναλιού στη μεμβράνη του πλάσματος, μείωση της πρωτεϊνικής αποδόμησης και μεταβολή της διαμερισματοποίησης των πρωτεϊνών (Ambrosini, et al., 2014).

Kir3-GIRK

Τα κανάλια Kir (GIRK) που συνδέονται με την πρωτεΐνη G ανήκουν στην υποοικογένεια του Kir3 που είναι σημαντικοί ρυθμιστές της ηλεκτρικής διέγερσης τόσο στα καρδιομυοκύτταρα όσο και στους νευρώνες (Slesinger, et al., 1995). Διαφορετικοί τύποι νευροδιαβιβαστών, όπως ακετυλοχολίνη (μέσω M2 και M4) ντοπαμίνη, οπιοειδή, σεροτονίνη, σωματοστατίνη, αδενosίνη και GABA, ενεργοποιούν αυτά τα κανάλια διεγείροντας τους συζευγμένους με G-πρωτεΐνες υποδοχείς τους (GPCRs). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα υπερπόλωση και επομένως αναστολή της κυτταρικής διέγερσης λόγω της ενεργοποίησης μιας εξωτερικής ροής ιόντων K^+ (Krapivinsky, et al., 1995) (Slesinger, et al., 1995).

Οι μεταβολές στη λειτουργία των καναλιών GIRK έχουν συσχετιστεί με την παθοφυσιολογία σοβαρών εγκεφαλικών διαταραχών, συμπεριλαμβανομένης της επιληψίας. Για παράδειγμα, ένα μοντέλο ποντικού knock-out GIRK2 κατέληξε να είναι πιο ευαίσθητο στην ανάπτυξη τόσο αυθόρμητων είτε επαγόμενων επιληπτικών κρίσεων σε σχέση με ποντίκια άγριου τύπου (Signorini, et al., 1997). Συγκεκριμένα, ποντίκια που φέρουν μετάλλαξη p.Gly156Ser εμφάνισαν επιληπτικό φαινότυπο (Patil, et al., 1995). Πράγματι, έχει βρεθεί ότι η αυτή μετάλλαξη μεταβάλλει την πιθανή διαπερατή από ιόντα περιοχή σχηματισμού πόρων του καναλιού, προκαλώντας υπερφόρτωση Ca^{2+} στα κύτταρα και

μειώνει τη διαθεσιμότητα των καναλιών, οδηγώντας έτσι σε νευροεκφυλισμό και ευαισθησία στις επιληπτικές κρίσεις (Slesinger, et al., 1996).

Μια άλλη απόδειξη για την υποστήριξη ενός ρόλου των καναλιών GIRK στην επιληψία δόθηκε από το γεγονός ότι ο ML297, ένας ισχυρός και επιλεκτικός ενεργοποιητής των καναλιών GIRK, έδειξε επιληπτογενείς ιδιότητες σε ποντίκια (Kaufmann, et al., 2013). Από την άλλη πλευρά, η αναστολή της δραστηριότητας του καναλιού GIRK από φάρμακα προκαλεί επιληπτικές κρίσεις (Mazarati, et al., 2006). Όλες αυτές οι εκτιμήσεις υποδεικνύουν ότι αλλαγές στη δραστηριότητα του καναλιού Kir3 είναι πιθανό να μεταβάλλουν την ευαισθησία σε επιληπτικές κρίσεις.

Kir4

Μεταξύ των καναλιών Kir4, το Kir4.1, που κωδικοποιείται από το γονίδιο KCNJ10, είναι το μόνο που έχει συσχετιστεί με την επιληψία. Αυτή η υπομονάδα μπορεί να αποτελείται από ομομερή κανάλια ή μπορεί να αποτελεί ετεροτετραμερή σε συνδυασμό με Kir5.1 (KCNJ16) (Pessia, et al., 2001). Τα κανάλια Kir4.1 εκφράζονται κυρίως στον θαλάμο, στον φλοιό, στον εγκέφαλο και στον ιππόκαμπο (Higashi, et al., 2001) και παίζουν βασικό ρόλο στη διατήρηση του δυναμικού ηρεμίας μεταφέροντας το K^+ από τον εξωκυτταρικό χώρο σε γλοιακά κύτταρα στο ΚΝΣ (Nishida & MacKinnon, 2002).

Αλλοιώσεις των καναλιών Kir4.1 συνδέονται με την αυξημένη ευαισθησία σε κρίσεις τόσο σε ποντίκια (Ferraro, et al., 2004) όσο και σε ανθρώπους (Buono, et al., 2004). Ειδικότερα, ποντίκια knock-out Kir4.1 στα αστροκύτταρα, βρέθηκαν να εμφανίζουν πρόωρη θνησιμότητα και σοβαρές κρίσεις πριν από το θάνατο (Djukic, et al., 2007), υποστηρίζοντας την ιδέα μιας παθοφυσιολογικής σχέσης της δυσλειτουργίας των Kir4.1 και της επιληψίας. Επιπλέον, έχουν ανιχνευθεί μεταβολές στην αλληλουχία DNA των Kir4.1 σε ασθενείς με temporal lobe epilepsy υποστηρίζοντας τη σημασία του KCNJ10 ως υποψήφιου γονιδίου για ευαισθησία στις κρίσεις (Heuser, et al., 2010).

Kir6-KATP

Τα adenosine triphosphate (ATP)-sensitive K^+ (KATP) κατανέμονται ευρέως σε διάφορους ιστούς όπου συνδυάζουν τον μεταβολισμό των κυττάρων με την κυτταρική διέγερση. Μεταλλάξεις σε αυτά τα κανάλια ευθύνονται για την αναπτυξιακή καθυστέρηση, την επιληψία και τον νεογνό διαβήτη (DEND). Ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός που οδηγεί σε επιληψία παραμένει αδιευκρίνιστος. Πιθανώς, τα αυξημένα επίπεδα εξωκυτταρικής γλυκόζης και ενδοκυττάρου ATP να εξασθενούν τα κανάλια KATP, παράγοντας μια πιο διεγερτική κατάσταση (Huang, et al., 2007). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι ποντίκια που δεν έχουν Kir6.2 είναι ευάλωτα στην υποξία και παρουσιάζουν χαμηλότερο κατώφλι για γενικευμένη κρίση (Yamada, et al., 2001).

Αστροκύτταρα- kir channels- επιληψία

Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι τα αστροκύτταρα εμπλέκονται σε σημαντικούς φυσιολογικούς μηχανισμούς στο ΚΝΣ, όπως είναι ο συγχρονισμός της νευρωνικής δραστηριότητας, η ομοιόσταση ιόντων, η πρόσληψη νευροδιαβιβαστών κ.λ.π. (Seifert, et al., 2010) Τα αστροκύτταρα συζευγνύονται μέσω gap junctions (ενδοκυττάρια μεμβρανικά κανάλια) και ελέγχουν/εξισσοροπούν την εξωκυττάρια συγκέντρωση K^+ . Συγκεκριμένα, αναδιανέμουν τα αυξημένα ιόντα K^+ από θέσεις υπερβολικής νευρωνικής δραστηριότητας σε θέσεις χαμηλότερης εξωκυττάριας συγκέντρωσης K^+ . Κύριοι ρυθμιστές αυτής της διαδικασίας αποτελούν τα κανάλια inwardly rectifying K^+ (Kir) (Seifert, et al., 2010). Δυσλειτουργία των αστροκυττάρων, των gap junctions αλλά και των καναλιών Kir σχετίζεται άμεσα με επιληπτικές κρίσεις (Seifert, et al., 2010) (Wallraff, et al., 2006).

Η νευρωνική δραστηριότητα, ο πολλαπλασιασμός των δυναμικών ενέργειας και η συναπτική δραστηριότητα μετά από τοπική εκπόλωση, οδηγούν σε γρήγορες διακυμάνσεις της εξωκυττάριας συγκέντρωσης K^+ [K^+] λόγω του περιορισμένου όγκου εξωκυττάριας χώρου (Nicholson & Syková, 1998). Εάν οι αυξήσεις του [K^+] παραμείνουν μη διορθωμένες, το δυναμικό ηρεμίας γίνεται πιο θετικό με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση διαμεμβρανικών καναλιών ιόντων, υποδοχέων και μεταφορέων. Κατά τη διάρκεια της νευρωνικής υπερδιεγερσιμότητας *in vivo*, τη εξωκυττάρια συγκέντρωση K^+ , μπορεί να αυξηθεί από 3 mM σε ανώτατο όριο 10-12 mM (Heinemann & Lux, 1977). Τέτοια υψηλά επίπεδα [K^+] μπορούν να προκαλέσουν επιληπτική δραστηριότητα σε εγκεφαλικές τομές. Δύο διαφορετικοί μηχανισμοί πιστεύεται ότι ισορροπούν το [K^+] κατά τη διάρκεια της νευρωνικής δραστηριότητας:

1. K^+ uptake: μεσολαβείται από Na, K-ATPase ή Na-K-Cl συμμεταφορείς και συνοδεύεται από διόγκωση των κυττάρων και τοπική εκπόλωση των αστροκυττάρων.
2. spatial K^+ buffering (χωρική εξισορρόπηση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης καλίου): εξαρτάται από το τοπικό K^+ δυναμικό ισορροπίας Αυτό επιτρέπει τη μεταφορά του K^+ από περιοχές με αυξημένο [K^+], μέσω του συγκυτίου, σε περιοχές με χαμηλότερο [K^+]. Η χωρική αποθήκευση εξαρτάται από τη σωστή κατανομή και λειτουργία των αστροκυττάριας καναλιών K^+ , των καναλιών νερού και των gap junctions. Στα αστροκύτταρα, το κανάλι Kir4.1, το οποίο ενεργοποιείται από ενδοκυττάρια ATP, πιστεύεται ότι επιτρέπει την εισροή K^+ σε αρνητικά δυναμικά μεμβράνης

Λόγω του ρόλου του στην ομοιόσταση K^+ , οι ιδιότητες των αστρογλοϊκών καναλιών Kir έχουν διερευνηθεί εκτενώς για την εξακρίβωση του ρόλου τους στην επιληψία. Μετρήσεις του [K^+] με ιόντο-ευαίσθητα μικροηλεκτρόδια και μελέτες patch-clamp έδειξαν ότι η εξασθενημένη ρύθμιση του της κατανομής των ιόντων K^+ στο σκληρωτικό ανθρώπινο ιπόκαμπο οφείλεται σε αλλοιωμένη έκφραση των καναλιών Kir. Παρατηρήθηκαν διαφορές στην επίδραση του Ba^{2+} στις μεταβολές που προκαλούνται από το ερέθισμα στο [K^+] στην περιοχή CA1 των φετών του εγκεφάλου του ιπόκαμπου που ελήφθησαν από ασθενείς με MTLT με σκλήρυνση

του ιππόκαμπου (MTLE-HS) ή χωρίς σκλήρυνση (μη-HS). Σε μη-HS ιστούς, η εφαρμογή Ba^{2+} βελτίωσε σημαντικά το $[K^+]$ ενώ αυτό το φαινόμενο δεν παρατηρήθηκε σε δείγματα HS. Δεδομένου ότι το Ba^{2+} είναι αναστολέας των καναλιών Kir στα αστροκύτταρα του ιππόκαμπου (Seifert, et al., 2009). Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν μειωμένη λειτουργία αυτών των καναλιών στον σκληρωτικό ιστό (Kivini, et al., 2000) (Jauch, et al., 2002). Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματα των (Bordey & Sontheimer, 1998) και (Hinterkeuser, et al., 2000) που έδειξαν κατιούσα ρύθμιση των ρευμάτων Kir στην CA1 περιοχή από σκληρωτικό ανθρώπινο ιππόκαμπο (από ασθενείς με MTLE). Κατά συνέπεια, ασθενείς με σκλήρυνση ιπποκάμπου εμφανίζουν ελλείμματα στο K^+ buffering και αυξημένη ευαισθησία στις κρίσεις, που οφείλονται σε μειωμένη έκφραση των καναλιών kir. Ωστόσο, δεν είναι ακόμη σαφές εάν αυτές οι αλλαγές είναι αιτία ή συνέπεια της πάθησης.

FAS και κανάλια καλίου

Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η προγεννητική έκθεση σε αιθανόλη επηρεάζει πολλούς τύπους καναλιών καλίου.

1. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε αυξημένη έκφραση του KCNN2 (potassium intermediate/small calcium-activated channel) σε νευρώνες αρουραίων που είχαν εκτεθεί σε αιθανόλη προγεννητικά. Μετά τη γέννηση, δοκιμάστηκε σε αυτούς τους αρουραίους, η προσθήκη ενός KCNN2 blocker και είχε ως αποτέλεσμα βελτίωση των ελλειμμάτων στον έλεγχο των κινήσεων. Συνεπώς, είναι προφανές ότι τα KCNN2 κανάλια σχετίζονται άμεσα με μαθησιακές δυσκολίες που παρατηρούνται στο FAS και κυρίως με την μάθηση των κινήσεων (Mohammad, et al., 2020)
2. Επίσης, έχει βρεθεί ότι η αιθανόλη ενεργοποιεί τη δραστηριότητα της πλειοψηφίας των καναλιών big-conductance-K channels (BK) σε διάφορους ιστούς (Brodie, et al., 2007). Ακόμη έχει προταθεί ότι η αιθανόλη μειώνει τα ρεύματα I_A σε τομές που εκτίθενται άμεσα σε αιθανόλη (Lefebvre, et al., 2009). Όμως, δεν είναι γνωστό πως μπορεί να επηρεάσει η χρόνια έκθεση σε αιθανόλη και δη η προγεννητική τα ρεύματα αυτά.
3. Επί προσθέτως, αξίζει να αναφερθεί ότι τα small-conductance calcium-activated potassium type 2 channels (SK2) τα οποία ρυθμίζουν τη νευρωνική διέγερση και συμβάλλουν στην πλαστικότητα μειώνοντας τα διεγερτικά μετασυναπτικά δυναμικά πιθανόν να επηρεάζονται από το αλκοόλ. Τα κανάλια SK2 σχηματίζουν έναν ασβεστιοεξαρτώμενο βρόγχο μαζί με τους NMDA υποδοχείς. Συνεπώς, αλλαγές στις γλουταματεργικές συνάψεις επηρεάζουν εμμέσως και αυτού του είδους τα κανάλια καλίου. Η μελέτη των Mulholland και Becker

προτείνει ότι χρόνια έκθεση σε αιθανόλη διαταράσσει τον βρόγχο των SK καναλιών με τους υποδοχείς NMDA. Στο συγκεκριμένο πείραμα, παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση των SK2 καναλιών και αυξημένη έκφραση των NMDA στις συνάψεις. Τέλος παρατηρήθηκε ότι η αποκατάσταση των SK2 καναλιών μείωσε την υπερδιεγερσιμότητα και τις κρίσεις που παρατηρήθηκαν ύστερα από απόσυρση του αλκοόλ (Mulholland & Becker, 2010).

Kir channels και FAS

Είναι ενδιαφέρον ότι μεταλλάξεις στα Kir2.1, προκαλούν παρόμοιο φαινότυπο γενετικών ανωμαλιών όπως αυτοί που παρατηρούνται στο FASD. Με άλλα λόγια, το FASD αντιγράφει τα χαρακτηριστικά που προκαλούνται από τις μεταλλάξεις Kir2.1. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η αιθανόλη προκαλεί αναστολή της ροής ιόντων καλίου μέσω του Kir2.1 (Wang, et al., 2014). Επίσης, επηρεάζει τουλάχιστον δύο ομάδες καναλιών kir, τα G-protein gated (GIRK) και τα Kir2.1. Ειδικότερα, ενεργοποιεί τα GIRK και αναστέλλει τα Kir2.1 (Wang, et al., 2014) (Ho & Murrell-Lagnado, 1999). Η ενεργοποίηση των GIRK καναλιών προκαλεί υπερπόλωση του δυναμικού της μεμβράνης με αποτέλεσμα να προκαλείται αναστολή (Glaaser & Slesinger, 2017)

Επίσης, τα κανάλια GIRK είναι υπεύθυνα για τον έλεγχο της νευρωνικής διέγερσης στο κύκλωμα ανταμοιβής του εγκεφάλου. Η αιθανόλη, συνδέεται άμεσα με την υδρόφοβη περιοχή του συγκεκριμένου καναλιού και το ενεργοποιεί. Ωστόσο ο μοριακός μηχανισμός με τον οποίο η αιθανόλη ενεργοποιεί τα συγκεκριμένα κανάλια παραμένει άγνωστος. Ταυτόχρονα, έχει βρεθεί ότι εκτός από την άμεση ενεργοποίηση των καναλιών GIRK, η αιθανόλη ενισχύει το αργό ανασταλτικό μετασυναπτικό δυναμικό των ντοπαμινεργικών νευρώνων του μεσεγκεφάλου, το οποίο παράγεται από την ενεργοποίηση των GIRK μέσω GABA_B (Cruz, 2004) (Padgett, 2012). Συνεπώς είναι κατανοητό ότι τα κανάλια GIRK εμπλέκονται στην αιτιολογία της εξάρτησης και του εθισμού μέσω της αιθανόλης (Bodhinathan & Slesinger, 2013).

Ακόμη, οι FAS-like-δυσμορφίες έχουν μόνο παρατηρηθεί ύστερα από μεταλλάξεις στα Kir2.1 και όχι στα GIRK, υποδηλώνοντας ότι τα Kir2.1 είναι υπεύθυνα για τα μορφολογικά χαρακτηριστικά (Bates, 2013).

Επιπλέον, αξίζει να αναφερθεί ότι βαριά προγεννητική έκθεση αλκοόλ μεταβάλλει τη νευρωνική μετανάστευση και προκαλεί γλοιακή ετεροτοπία. Οι ακτινωτές γλοιές αποτελούν της αιθανόλης και είναι σημαντικές για τη σωστή μετανάστευση των νευρώνων (Vallés, et al., 1997). Επιπλέον, η έκθεση σε αιθανόλη έχει βρεθεί ότι εμποδίζει την ανάπτυξη και ωρίμανση των ακτινωτών κυττάρων γλοίας καθώς και την διαφοροποίηση (Rubert, et al., 2006). Ακόμη, έκθεση σε αιθανόλη καταστρέφει τα νευρωνικά προγονικά κύτταρα, περιορίζοντας την επιβίωσή τους και την διαφοροποίησή τους σε αστροκύτταρα (Taléns-Visconti, et al., 2011). Συνεπώς, η αιθανόλη επηρεάζει σημαντικά το σύστημα των αστροκυττάρων και πιθανόν τη διαδικασία εξισορρόπησης των ιόντων K⁺.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε BaCl₂ προκειμένου να στοχεύσουμε τα κανάλια Kir για να είναι εφικτή η διερεύνηση πιθανών μεταβολών λόγω της προγεννητικής έκθεσης σε αιθανόλη επίπεδο δικτύου. Επίσης, σε δεύτερο κύκλο πειραμάτων χρησιμοποιήσαμε gap junction blocker, cbx προκειμένου να δούμε αν επηρεάστηκε η λειτουργία των gap junctions στο FAS. Η εύρεση πιθανών μεταβολών στα παραπάνω συστήματα θα δώσει απαντήσεις για την αυξημένη τάση για επιληπτικές κρίσεις που παρατηρείται στο FAS.

Πειραματικά μοντέλα μελέτης του FAS

Η προγεννητική έκθεση σε αιθανόλη (ΠΕΑ) έχει συνδεθεί με εκτεταμένες διαταραχές της δομής και της λειτουργίας του εγκεφάλου του εμβρύου. Υπάρχουν διάφορα ζωικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη των δομικών και λειτουργικών ελλειμμάτων που προκαλούνται από τη ΠΕΑ, συμπεριλαμβανομένων, μεταξύ άλλων, ασπόνδυλων, ψαριών, τρωκτικών και πρωτευόντων πλην του ανθρώπου. Τα ζωικά μοντέλα επιτρέπουν σε έναν ερευνητή να ελέγχει σημαντικές μεταβλητές όπως: την οδό χορήγησης αιθανόλης, το χρόνο, τη συχνότητα και την ποσότητα της έκθεσης στην αιθανόλη. Κάθε μοντέλο ζώων και σύστημα έκθεσης έχει τη θέση του, ανάλογα με το ερευνητικό ερώτημα που τίθεται.

Η χρήση ζωικών πειραματικών μοντέλων για τη μελέτη του τρόπου με τον οποίο η αιθανόλη επηρεάζει την ανάπτυξη των απογόνων ξεκίνησε από τα τέλη της δεκαετίας του 1970 όταν ερευνητικές ομάδες άρχισαν να μελετούν τις επιδράσεις της αιθανόλης στην ανάπτυξη εργαστηριακών αρουραίων (Jones & Smith, 1973), (Jones, 1975). Η επιλογή του ζώου που θα χρησιμοποιηθεί μπορεί να είναι κρίσιμη, καθώς η γενετική ευαισθησία μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό των αποτελεσμάτων της αιθανόλης. Για παράδειγμα, σε ορισμένα είδη μπορεί να προκληθούν τερατογόνες επιδράσεις με σχετικά χαμηλές δόσεις, ενώ άλλα είδη μπορεί να είναι πιο ανθεκτικά στις επιδράσεις της αιθανόλης. Επιπλέον, το αναπτυξιακό στάδιο του οργανισμού κατά τη στιγμή της έκθεσης μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στον τρόπο με τον οποίο η αιθανόλη διαταράσσει την ανάπτυξη. Άλλοι παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη στην επιλογή του πειραματικού μοντέλου είναι: το επίπεδο δηλητηρίασης που επιτυγχάνεται κατά την ανάπτυξη του εγκεφάλου, η περίοδος ανάπτυξης του εγκεφάλου στην οποία στοχεύει η έρευνα (πρώτο, δεύτερο ή τρίτο τρίμηνο), η μορφή χορήγησης (χρόνια ή οξεία) και ο τρόπος χορήγησης (κατάποση, ένεση ή εισπνοή).

Τα ζωικά μοντέλα που διατίθενται για την έρευνα του FASD ποικίλουν και κυμαίνονται από τα πιο απλά (Caenorhabditis elegans, Drosophila, zebrafish, Xenopus) στα πιο σύνθετα (τρωκτικά και μη ανθρώπινα πρωτεύοντα). Τα τρωκτικά είναι μακράν το πιο κοινό μοντέλο που χρησιμοποιείται καθώς τα μοντέλα των αρουραίων, των ποντικών και των ινδικών χοιριδίων χρησιμοποιούνται σε εργαστήρια σε όλο τον Καναδά και τις ΗΠΑ. Όλα αυτά τα μοντέλα έχουν αποδειχθεί ότι μιμούνται τουλάχιστον ορισμένες πτυχές της ανθρώπινης κατάστασης,

συμπεριλαμβανομένων των κρανιοπροσωπικών ανωμαλιών (Sulik, 2005), (Sulik, et al., 1981) της επιβράδυνσης της ανάπτυξης (Marrs, et al., 2010), (Abel & Dintcheff, 1978), (Chernoff, 1977) των φυσιολογικών βλαβών (Weinberg & Gallo, 1982), (Sliwowska, et al., 2008), (Zhang, et al., 2005) και των γνωστικών ελλειμμάτων (Driscoll, et al., 1990), (Thomas, et al., 2010), (Fernandes, et al., 2014), (Christie, et al., 2005), (Cudd , 2005). Ωστόσο, παρόμοια με τη μεταβλητότητα που παρατηρείται στους ανθρώπους, δεν υπάρχει ένα απλό ζωικό μοντέλο που μιμείται όλα τα χαρακτηριστικά του FAS και/ή του FASD.

BAC (Blood Alcohol Concentration)

Πολύ σημαντικοί δείκτες του επιπέδου της μέθης αποτελούν το BAC (Blood Alcohol Concentration) που αντιπροσωπεύει την συγκέντρωση της αιθανόλης στο αίμα. Το BAC πρόκειται για ποσοστιαίο μέτρο της αιθανόλης στο αίμα (αναφερόμενο στον όγκο του αίματος) και χρησιμοποιείται σαν μέτρο κατανάλωσης αλκοόλης από νομικές και ιατρικές υπηρεσίες. Ο προσδιορισμός του BAC είναι ιδιαίτερα χρήσιμος στον σχεδιασμό των πειραμάτων, καθώς μέσω αυτού μπορεί να ελεγχθεί και το μοντέλο του αλκοολισμού που επιθυμείται.

Στον Καναδά και τις ΗΠΑ, ένα άτομο με συγκέντρωση αλκοόλης αίματος (BAC) 80mg/dl θεωρείται νόμιμα μεθυσμένο. Αν μια έγκυος γυναίκα 150 lb καταναλώνει έξι αλκοολούχα ποτά ή ένα μπουκάλι κρασί σε περίοδο 2 ωρών, θα φτάσει ένα BAC των 200 mg/dl. Σε μελέτες σε ανθρώπους, τα δεδομένα BAC από τις μητέρες γενικά δεν είναι διαθέσιμα, ωστόσο, οι εκτιμήσεις υποδηλώνουν ότι τα BAC άνω των 200 mg/dl μπορεί να είναι υπεύθυνα για τον σοβαρό φαινότυπο FAS (Maier & West, 2001), ενώ τα χαμηλότερα BACs μπορεί να παράγουν ήπιες μορφές FASD. Παρά την έλλειψη δεδομένων BAC σε ανθρώπους, αυτό το μέτρο χρησιμοποιείται συχνά για τη σύγκριση των επιπέδων έκθεσης μεταξύ των ειδών. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η απόλυτη δόση αιθανόλης που χορηγείται (σε γραμμάρια αιθανόλης/kg) μπορεί να ποικίλει σημαντικά από είδος σε είδος (Driscoll, et al., 1990), οπότε το BAC είναι ένα πιο αξιόπιστο μέτρο δηλητηρίασης.

Οι περισσότερες μελέτες σε ζώα χρησιμοποιούν δοσολογία έκθεσης σε αλκοόλ που παράγει BAC στην περιοχή 100-400 mg/dl (δηλ., μέτρια έως binge-like επίπεδα έκθεσης). Για να επιτευχθεί ένα χαμηλό έως μέτριο BAC (80-150 mg / dl), οι πειραματιστές συνήθως χρησιμοποιούν υγρές δίαιτες, εθελοντικά πρότυπα κατανάλωσης οινοπνεύματος ή εισπνοές ατμών. Υψηλότερα BAC-like BAC (>200mg/dl) επιτυγχάνονται κανονικά χρησιμοποιώντας είτε στοματική διασωλήνωση (καθετηριασμό) είτε άμεσες ενέσεις. Τα υψηλότερα BAC γενικά συσχετίζονται με αυξημένη νευροτοξικότητα και ακόμη και η χορήγηση μίας μόνο υψηλής δόσης αιθανόλης κατά την περίοδο ανάπτυξης του εγκεφάλου μπορεί να προκαλέσει σημαντικές διαρθρωτικές διαταραχές εάν το BAC που επιτυγχάνεται είναι αρκετά υψηλό (Ieraci & Herrera, 2007), (Parnell , et al., 2009).

Τα χαμηλά έως μέτρια BACs μπορούν επίσης να προκαλέσουν σημαντική νευρωνική βλάβη και ενώ οι πιο μακροχρόνιες περιόδους έκθεσης (π.χ. καθ' όλη τη

διάρκεια της κύησης) χρησιμοποιούν συνήθως αυτά τα μοντέλα (Choi, et al., 2005), (Redila, et al., 2006), (Wigal & Amsel, 1990). Η βραχύτερη έκθεση μπορεί επίσης να προκαλέσει σημαντικά ελλείμματα (Miller, 1996). Συνεπώς, η συνεχής έκθεση σε χαμηλή στάθμη αιθανόλης μπορεί να είναι εξίσου επιζήμια με μια μοναδική υψηλού-επιπέδου έκθεση, αν και οι τύποι ελλειμμάτων που προκύπτουν μπορεί να διαφέρουν. Τα ελλείμματα που παρατηρούνται με κάθε τρόπο χορήγησης μπορούν να επηρεαστούν από τον χρόνο έκθεσης στην αιθανόλη.

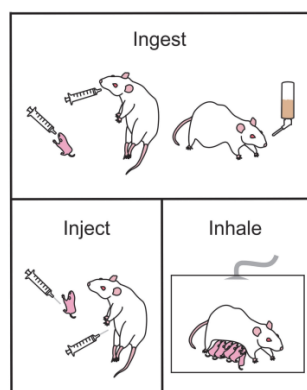
Περίοδος χορήγησης

Τα τρωκτικά είναι το πιο συνηθισμένο ζωικό μοντέλο που χρησιμοποιείται για την έρευνα FASD ωστόσο, η περίοδος κύησης τους είναι πολύ μικρότερη από αυτή των ανθρώπων (18-23 ημέρες για ποντικούς/αρουραίους, 68 ημέρες για ινδικά χοιρίδια) (Cronise, et al., 2001), (Tran, et al., 2000).

Η περίοδος ανάπτυξης του εγκεφάλου των τρωκτικών χωρίζεται επίσης σε τρίμηνα. Σε επίμυες και ποντίκια, όπως ήδη έχει αναφερθεί, το πρώτο τρίμηνο ισοδυναμεί με την 1-10^η προγεννητική μέρα (GD 1-10), το δεύτερο τρίμηνο αντιστοιχεί στο GD 10-20 (λίγο πριν τη γέννηση) και το τρίτο τρίμηνο ή αλλιώς περίοδος ταχείας ανάπτυξης του εγκεφάλου (BGS) αντιστοιχεί στην μεταγεννητική ημέρα (PND) 1 έως 10) (West, 1987).

Οδός χορήγησης

Υπάρχουν αρκετές διαφορετικές μέθοδοι που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη χορήγηση αιθανόλης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Στα ασπόνδυλα και στα απλά σπονδυλωτά (*C. elegans*, *Xenopus*, *zebrafish*), η έκθεση σε αλκοόλ συνήθως γίνεται με εφαρμογή σε λουτρό (βλ. Simple Systems). Σε πιο σύνθετα μοντέλα όπως εκείνα που χρησιμοποιούν τρωκτικά και πρωτεύοντα θηλαστικά, υπάρχουν τρεις κύριες μέθοδοι χορήγησης αιθανόλης που χρησιμοποιούνται: μέθοδος έγχυσης εις τον στόμαχο (διαμέσου διατροφής, νερού ή διασωλήνωση), ένεση ή εισπνοή.



Εικόνα 5: απεικόνιση μεθόδων χορήγησης αιθανόλης σε αρουραίους

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή η μέθοδος χορήγησης αιθανόλης ήταν αυτή της έγχυσης εις τον στόμαχο και συγκεκριμένα μέσω **μη παρεμβατικής κατανάλωσης αλκοόλ**.

Μη παρεμβατική κατανάλωση αλκοόλ

Στην μοντέλο μη παρεμβατικής κατανάλωσης αλκοόλ η αιθανόλη χορηγείται μέσω πόσιμου νερού. Συγκεκριμένα, πραγματοποιείται εθισμός των θηλυκών αρουραίων με την χρήση διαλύματος 10% αιθανόλης πριν από την εγκυμοσύνη (Choi, et al., 2005), (Allan, et al., 2003). Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης τα τρωκτικά έχουν απεριόριστη πρόσβαση στο διάλυμα νερού. Μετά τη γέννηση, η αιθανόλη απομακρύνεται σταδιακά από το νερό, έτσι ώστε να αποφευχθούν τα φαινόμενα απόσυρσης (ethanol withdrawal effects), καθώς και το stress στους απογόνους. Χρησιμοποιώντας αυτό το παράδειγμα, τρωκτικά τείνουν να καταναλώνουν 14g αιθανόλης/kg /ημέρα και το BAC που επιτυγχάνεται είναι 120 mg / dl (Choi, et al., 2005), (Allan, et al., 2003). (Gil-Mohapel , et al., 2010).

Υλικά και μέθοδοι

Πειραματόζωα

Για την εκτέλεση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν ενήλικοι Sprague Dawley επίμυες. Οι αποικίες προήλθαν από το Ινστιτούτο Παστέρ Αθηνών και στεγάστηκαν στο εκτροφείο του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η αναπαραγωγή, η φροντίδα καθώς και η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν σύμφωνη με τις Ευρωπαϊκές οδηγίες (2010/63/EE). Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκαν όλοι οι δυνατοί χειρισμοί και σχεδιασμοί προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί ο αριθμός και η ταλαιπωρία των πειραματόζωων.

Για την εκτέλεση των πειραμάτων της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν 202 N και 145 FAS επίμυες (βλ. αναλυτικά παρακάτω/ in vivo διαδικασία) του στελέχους Sprague-Dawley. Όλα τα πειραματόζωα διατηρούνταν σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (20-24°C) και 12 ωρών φωτός/σκοτάδι.

Διαλύματα

Τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό (τENY)

Κατά την διάρκεια της απομόνωσης του υποκάμπτου ο εκτεθειμένος εγκέφαλος διαβρεχόταν συνεχώς με οξυγονωμένο τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό (τENY, σύστασης NaCl 124mM, KCl 2mM, CaCl₂ 2mM, KH₂PO₄ 1.25mM, Glucose 10mM, Phenol Red 0.03mM, NaHCO₃ 26mM, MgSO₄ 2mM) προκειμένου να συνεχίσει ο εγκεφαλικός ιστός να προσλαμβάνει τα απαραίτητα θρεπτικά και οξυγόνο (95% O₂ 5% CO₂) και να διατηρηθεί η βιολογική ακεραιότητά του. Κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας του ιστού το διάλυμα διατηρήθηκε σε θερμοκρασία 2-3C° και το pH του διαλύματος ήταν~7.4.

Το τENY που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια των καταγραφών είχε:

- 4-αμινοπυριδίνη (4-AP) σε συγκέντρωση 50μM
- Ή περιείχε υψηλό κάλιο (7mM)
- Ή δεν περιείχε πρόσθετο μαγνήσιο (Mg²⁺-free)

Ανάλογα με το πείραμα που θέλαμε να πραγματοποιήσουμε κάθε φορά.

Φάρμακα

Τα φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, ήταν:

Φάρμακα	Συγκέντρωση	Δράση
Bicuculline (BMI)	20μM	Ανταγωνιστής GABA _A υποδοχέων
Carbacol (CCh)	1μM	Μη-υδρολύμενο ανάλογο της ακετυλοχολίνης
Oxotremorine (oxo)	1μM	Μουσκαρινικός αγωνιστής
Eserine	10μM	Αναστολέας του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση
Hexamethonium (HXM)	50μM	Ανταγωνιστής νικοτινικών υποδοχέων
2-hydroxysaclofen (2OH)	400μM	Ανταγωνιστής GABA _B υποδοχέων
CGP-52432	400μM	Ειδικός ανταγωνιστής GABA _B
4-aminopyridine (4-AP)	50μM	Μπλόκερ του ρεύματος καλίου (κυρίως I _A)
Pirenzepine (pir)	1μM	M1 μουσκαρινικός ανταγωνιστής
VU 0255035	10μM	M1 μουσκαρινικός ανταγωνιστής
Gallamine triethiodite	1μM	M2 μουσκαρινικός ανταγωνιστής
4-Damp	1μM	M3 μουσκαρινικός ανταγωνιστής
Carbenoxolone (cbx)	300μM	Gap junction blocker
BaCl ₂	2mM	Αναστολέας καναλιών Kir

Διάλυμα ηλεκτροδίων

Το διάλυμα πλήρωσης του ηλεκτροδίου καταγραφής ήταν αγώγιμο ιοντικό διάλυμα NaCl (4mM) το οποίο περιείχε μικρή ποσότητα κυανής χρωστικής (rotamine sky blue 6BX, Gurr Microscopy Materials)

In vivo πρωτόκολλο

Εθισμός στην αιθανόλη

Για τον εθισμό των μητέρων ακολουθήθηκε πρωτόκολλο κατά το οποίο οι άτοκοι ενήλικοι θηλυκοί επίμυες ηλικίας περίπου 3 μηνών έλαβαν δύο προοδευτικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης για διάστημα 2 βδομάδων σαν την μόνη πηγή νερού (10% διάλυμα αιθανόλης-νερού την 1^η εβδομάδα, 15% διάλυμα αιθανόλης-νερού την 2^η εβδομάδα). Ο αρχικός εθισμός των θηλυκών επίμυων στην αιθανόλη έγινε για την πιστή αναπαράσταση των συνθηκών υπό τις οποίες μια μητέρα δίνει FAS απογόνους.

Προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη

Στην συνέχεια τοποθετήθηκαν ενήλικοι αρσενικοί Sprague-Dawley επίμυες ηλικίας 3-6 μηνών στα κλουβιά των εθισμένων θηλυκών για διάστημα 10 ημερών ώστε να επιτευχθεί η αναπαραγωγή. Μετά το διάστημα των 10 ημερών οι αρσενικοί επίμυες απομακρύνθηκαν από τα κλουβιά και οι θηλυκοί τοποθετήθηκαν σε ατομικά κλουβιά. Στο διάστημα της διαδικασίας αναπαραγωγής η συγκέντρωση της αιθανόλης ήταν σταθερή 15%. Η συγκέντρωση αυτή διατηρήθηκε για όλο το διάστημα της κύησης (τρεις εβδομάδες). Χρησιμοποιήθηκε η συγκεκριμένη

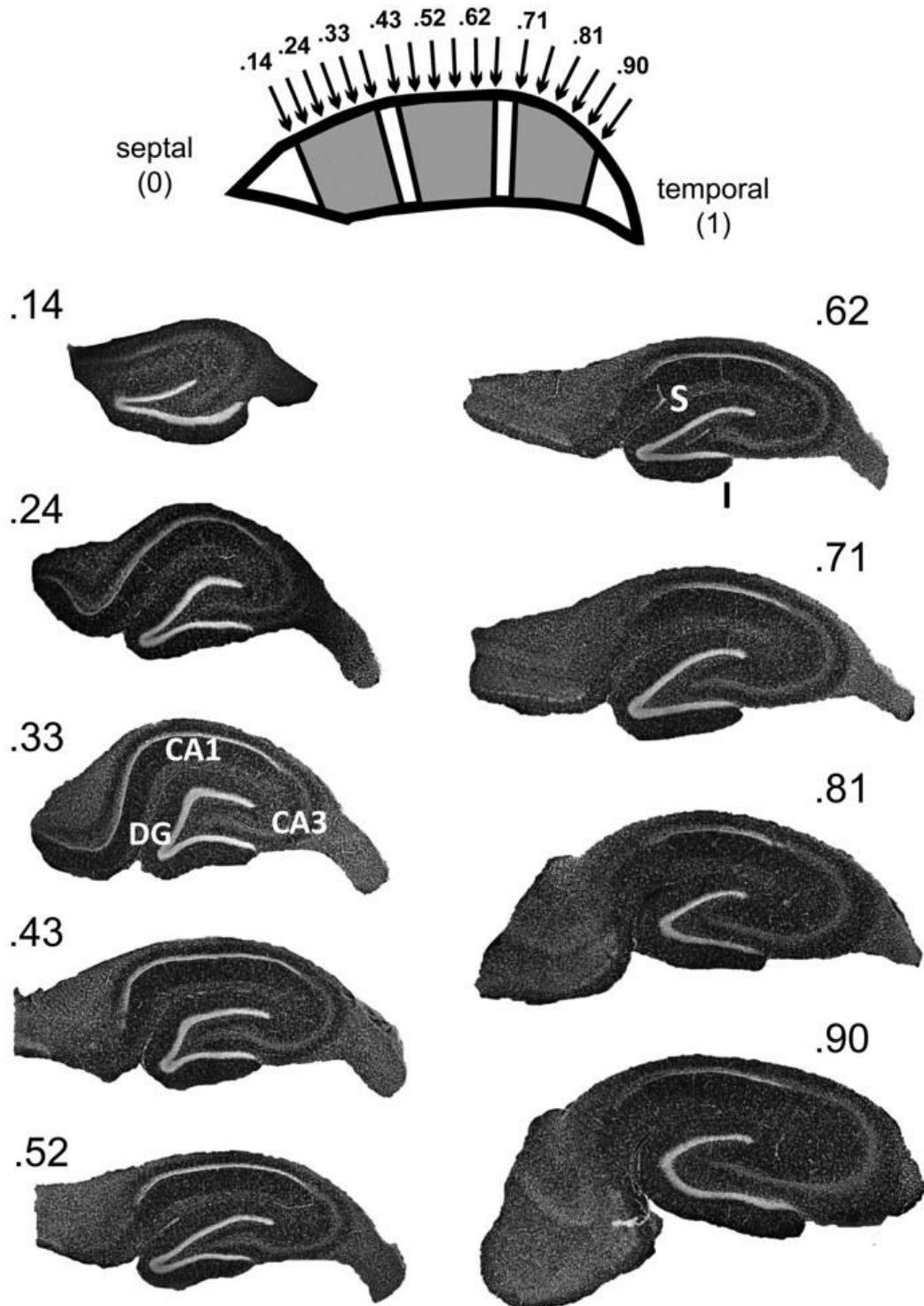
συγκέντρωση διότι σύμφωνα με προηγούμενα πειράματα αποδείχθηκε ότι είναι αρκετά υψηλή ώστε να δώσει απογόνους FAS και αρκετά χαμηλή ώστε να μην υπάρχει έντονη θνησιμότητα και αδυναμία σύλληψης που παρατηρείται σε χορήγηση υψηλότερης συγκέντρωσης. Η συγκέντρωση αυτή διατηρήθηκε και μετά την γέννηση των απογόνων προκειμένου να προκύψουν "FAS" απόγονοι καθώς η χορήγηση αιθανόλης κατά την διάρκεια του πρώτου δεκαπενθήμερου της ζωής των απογόνων αντιστοιχεί στο Brain Growth Spurt (John Dobbing and J. Sands, 1973). Την 10^η μεταγεννητική μέρα (PD 10) η συγκέντρωση της αιθανόλης μειώθηκε σε 10% και διατηρήθηκε αυτή η συγκέντρωση μέχρι και την PD 15. Στη συνέχεια, το διάλυμα αιθανόλης αντικαταστάθηκε με καθαρό νερό. Οι απόγονοι που προέκυψαν χαρακτηρίστηκαν "FAS". Στη συνέχεια οι απόγονοι χωρίστηκαν σε 2 ηλικιακές ομάδες προκειμένου να θυσιαστούν στην κατάλληλη ηλικία για το κάθε πείραμα:

- Age group 1: PD 21-35 (young)
- Age group 2: PD>90 (adult)

Ακολούθησαν ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές σε τομές ιπποκάμπου. Ταυτόχρονα, χρησιμοποιήθηκαν ενήλικοι θηλυκοί άτοκοι Sprague-Dawley επίμυες στους οποίους χορηγήθηκε καθαρό νερό αντί για διάλυμα αιθανόλης-νερού για την δημιουργία των φυσιολογικών απογόνων (N).

In vitro πρωτόκολλο

Παρασκευή τομών ιπποκάμπου



Εικόνα 6: Παρασκευή εγκάρσιων τομών ιπποκάμπου

Για την παρασκευή εγκεφαλικών τομών, τα πειραματόζωα αναισθητοποιήθηκαν με 1-3ml διεθλαιθέρα (Sigma-Aldrich) και θυσιάστηκαν αμέσως σε λαιμητόμο. Ακολούθησε μικροχειρουργική διαδικασία απομόνωσης του εγκεφάλου κατά την οποία το μεγαλύτερο μέρος του κρανίου αφαιρέθηκε. Η εξαγωγή του εγκεφάλου ξεκινά με μία τομή κατά μήκος της μέσης οβελιαίας γραμμής (μεταξύ των δύο ημισφαιρίων) και δύο τομές κατά μήκος των δύο έσω καρωτίδων. Στη συνέχεια, με λαβίδα απομακρύνονται τα άνω τμήματα του κρανίου μέχρι να αποκαλυφθεί ολόκληρος ο εγκέφαλος. Έπειτα με την χρήση μικρής λαβίδας ακολουθεί προσεκτική αφαίρεση της μεμβράνης που καλύπτει τον εγκέφαλο και διαχωρισμός των συνδέσεων του εγκεφάλου με το κρανίο και τους οφθαλμούς. Κατά την διάρκεια της απομόνωσης του ιπποκάμπου ο εκτεθειμένος εγκέφαλος διαβρεχόταν συνεχώς με οξυγονωμένο (95% O₂ 5% CO₂) τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό (τΕΝΥ, σύστασης NaCl 124mM, KCl 2mM, CaCl₂ 2mM, KH₂PO₄ 1.25mM, Glucose 10mM, Phenol Red 0.03mM, NaHCO₃ 26mM, MgSO₄ 2mM) προκειμένου να συνεχίσει ο εγκεφαλικός ιστός να προσλαμβάνει τα απαραίτητα θρεπτικά και οξυγόνο και να διατηρηθεί η βιολογική ακεραιότητά του. Στη συνέχεια ακολούθησε απομάκρυνση του εγκεφάλου από το κρανίο και τοποθέτησή του σε δοχείο με τΕΝΥ το οποίο βρισκόταν σε λεκάνη με πάγο έτσι ώστε η θερμοκρασία του να φτάσει τους 4° C. Η εξαγωγή του εγκεφάλου με αυτή την τεχνική έδωσε ακέραιες τις δομές των δύο ημισφαιρίων και της παρεγκεφαλίδας. Το εγκεφαλικό στέλεχος διαχωρίστηκε κατά τον αποκεφαλισμό. Ακολούθησε απομάκρυνση της παρεγκεφαλίδας με εγκάρσια τομή, με νυστέρι ώστε να παραμείνουν μόνο τα δύο ημισφαίρια. Τα ημισφαίρια διαχωρίστηκαν μεταξύ τους μέσω οριζόντιας τομής πάνω στην γραμμή ένωσής τους. Ακολούθησε εξαγωγή ιπποκάμπου και στα δύο ημισφαίρια. Το ένα ημισφαίριο επανατοποθετήθηκε στο τΕΝΥ μέχρι το πέρας της εξαγωγής του ιπποκάμπου του άλλου. Στη συνέχεια έγινε διαχωρισμός του ιπποκάμπου από το φλοιό με απαλές κινήσεις και τοποθέτησή του στο δοχείο με τΕΝΥ. Σε όλη την διάρκεια της εξαγωγής του ιπποκάμπου ο εγκεφαλικός ιστός διαβρεχόταν συνεχώς με κρύο τΕΝΥ για την διατήρηση της βιολογικής ακεραιότητάς του. Στην συνέχεια έγινε εξαγωγή του ιπποκάμπου του άλλου ημισφαιρίου, και τοποθέτησή του μαζί με τον πρώτο, στο δοχείο με το κρύο τΕΝΥ. Για τον τεμαχισμό του ιπποκάμπου χρησιμοποιήθηκε ο μικροτεμαχιστής Mcllwain Chopper και προέκυπταν τομές πάχους 450μm. Από κάθε ιπποκάμπο απομονώθηκε είτε το κροταφικό είτε το μεσαίο είτε το διαφραγματικό τμήμα ανάλογα με το πείραμα που επρόκειτο να πραγματοποιηθεί.

Ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές

Πραγματοποιήθηκαν εξωκυττάρειες ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές σε θάλαμο καταγραφής ο οποίος περιείχε δύο μικρούς θαλάμους μέσα στους οποίους τοποθετήθηκαν οι τομές ιπποκάμπου επάνω σε ένα κομμένο διηθητικό χαρτί για την στερέωσή τους. Οι θάλαμοι αυτοί από την μια μεριά τροφοδοτούνταν με οξυγονωμένο τΕΝΥ και από την άλλη, με την χρήση διηθητικού χαρτιού ρυθμιζόταν

η ταχύτητα ροής του tENY. Η καταγραφή των τομών ήταν καταγραφή διεπιφάνειας (δηλαδή οι τομές του ιππόκαμπου δεν ήταν βυθισμένες αλλά καλύπτονταν μόνο από ένα λεπτό στρώμα tENY). Η μέθοδος αυτή υπερτερεί της άλλης καθώς γίνεται καλύτερη οξυγόνωση των τομών και η εκάστοτε τομή διατηρείται ζωντανή για περισσότερη ώρα. Οι τομές επώαστηκαν στο θάλαμο καταγραφής σε tENY ελεύθερο μαγνησίου για μια ώρα τουλάχιστον πριν από κάθε καταγραφή προκειμένου να αποκατασταθούν σταθερές συνθήκες.

Εξωκυττάρια καταγραφές

Πραγματοποιήθηκαν εξωκυττάρια καταγραφές με μικροπιπέτες γυαλιού (4M NaCl) στη πυραμιδική στοιβάδα της CA1 περιοχής κροταφικών, μεσαίων και διαφραγματικών τομών ιπποκάμπου. Τα σήματα ενισχύθηκαν και ψηφιοποιήθηκαν (Axon Digidata 1440A, molecular devices).

Στη συνέχεια μετρήθηκε η συχνότητα (Hz) και διάρκεια (ms) των καταγεγραμμένων κυματομορφών των μεσοκριστικών εκφορτίσεων με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος Clampfit (Axon/Molecular Devices). Κάθε μέτρηση της συχνότητας και της διάρκειας πραγματοποιήθηκε αφού κάθε τομή έδινε σταθερή απάντηση (περίπου 30 λεπτά μετά την τοποθέτηση του ηλεκτροδίου) και 15-20 λεπτά πριν την έναρξη διάχυσης φαρμάκου. Οι μετρήσεις των ηλεκτροφυσιολογικών χαρακτηριστικών λήφθηκαν από τα τέλος κάθε καταγραφής και από σταθερό διάστημα 5 λεπτών τουλάχιστον, με σταθερή συχνότητα/διάρκεια εκφορτίσεων.

Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέσοι όροι \pm μέσο τυπικό σφάλμα (\pm S.E.M.), με το $p < 0.05$ να θεωρείται στατιστικά σημαντικό. Για τις στατιστικές συγκρίσεις που αφορούσαν εξαρτημένες ομάδες τιμών, χρησιμοποιήθηκε το paired Student's t-test ενώ για ανεξάρτητες τιμές το unpaired Student's t-test. Μια ομάδα δεδομένων αναλύθηκε με το τεστ two-way ANOVA. Για τις στατιστικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το Prism (Graph Pad). Το «n» αντιπροσωπεύει τον αριθμό των τομών κάθε ομάδας.

Αποτελέσματα

Μελέτη 1

Επίδραση της προγεννητικής έκθεσης σε αιθανόλη στις επιληπτικές εκφορτίσεις μεσοκρυσικού τύπου στο μεσαίο τρίτο του ιπποκάμπου.

- Διαβροχή με τ ENY Mg^{2+} -free τομών νεαρών πειραματοζώων
- Διαβροχή με τ ENY με 4-AP τομών νεαρών πειραματοζώων
- Αναπτυξιακή μελέτη σε τομές μεσαίου τρίτου του ιπποκάμπου από N και FAS πειραματοζώα σε τ ENY Mg^{2+} -free
- Προσθήκη του $GABA_A$ ανταγωνιστή, BMI
- Προσθήκη των ανταγωνιστών $GABA_B$, 2-hydroxysaclofen και CGP-52432
- Επίδραση της προγεννητικής έκθεσης σε αιθανόλη στους νικοτινικούς υποδοχείς παρουσία ή απουσία $GABA_A$ εργικού ελέγχου
- Επίδραση της προγεννητικής έκθεσης σε αιθανόλη στους μουσκαρινικούς υποδοχείς
- Συμπληρωματικά πειράματα χολινεργικών αγωνιστών και ανταγωνιστών σε τομές μεσαίου τρίτου νεαρών πειραματοζώων (δράσεις VU 0255035, δράσεις εσερίνης, δράσεις M2 και M3 μουσκαρινικών ανταγωνιστών, δράσεις carbachol

Μελέτη 2

Δράση ανταγωνιστών αγωγιμοτήτων K^+ σε τομές μεσαίου τρίτου FAS και N πειραματοζώων

- Αύξηση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης K^+ (7mM) σε τ ENY Mg^{2+} -free
- Αύξηση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης K^+ (7mM) σε φυσιολογικό aCSF
- Προσθήκη του ειδικού αναστολέα Kir καναλιών $BaCl_2$ σε τ ENY Mg^{2+} -free

Μελέτη 3

Η προγεννητική έκθεση σε αιθανόλη επηρέασε τα gap junctions στο μεσαίο τρίτο του ιπποκάμπου

Μελέτη 4

Μελέτη της επίδρασης της προγεννητικής έκθεσης σε αιθανόλη σε temporal και septal τομές

- Αυθόρμητες μεσοκρισικές εκφορτίσεις (interictal-like, IEDs) σε τENY με 4-AP (50μM) σε τομές κροταφικές και διαφραγματικές νεαρών και ενήλικων πειραματοζώων
- Προσθήκη του ανταγωνιστή των υποδοχέων GABA_A, BMI (20μM) σε τENY 4-AP
- Προσθήκη CCh (1μM) παρουσία BMI σε τENY 4-AP
- Αυθόρμητες εκφορτίσεις μεσοκρισικού τύπου (IEDs) σε τENY Mg²⁺-free - (διαμόρφωση της συχνότητας τους από BMI και CCh)
- Κροταφο-διαφραγματική διεγερσιμότητα έπειτα από αύξηση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης K⁺(7mM) σε τENY Mg²⁺-free σε N και FAS τομές νεαρών και ενήλικων πειραματοζώων

Μελέτη 5

Μελέτη ηλεκτροφυσιολογικών ιδιοτήτων του μεσαίου τρίτου του ιπποκάμπου σε σχέση με το κροταφικό και το διαφραγματικό άκρο

Μελέτη 1

Επίδραση της προγεννητικής έκθεσης σε αιθανόλη στις επιληπτικές εκφορτίσεις μεσοκρυσικού τύπου στο μεσαίο τρίτο του ιπποκάμπου

Αυθόρμητες εκφορτίσεις μεσοκρυσικού τύπου (IEDs) σε τ ENY Mg^{2+} -free στο μεσαίο τρίτο (intermediate) του ιπποκάμπου σε N και FAS τομές νεαρών πειραματοζώων

Επώαση των τομών με τ ENY Mg^{2+} -free προκάλεσε την εμφάνιση αυθόρμητων εκφορτίσεων IEDs σε όλες τις τομές.

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι από τις **FAS** τομές νεαρών πειραματοζώων καταγράφηκαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές συχνοτήτων των IEDs στο μεσαίο μέρος του ιπποκάμπου ($p=0.01$) (fig. 1, A), ενώ οι τιμές διάρκειών των IEDs ήταν παρόμοιες σε N και FAS (fig. 1, B).

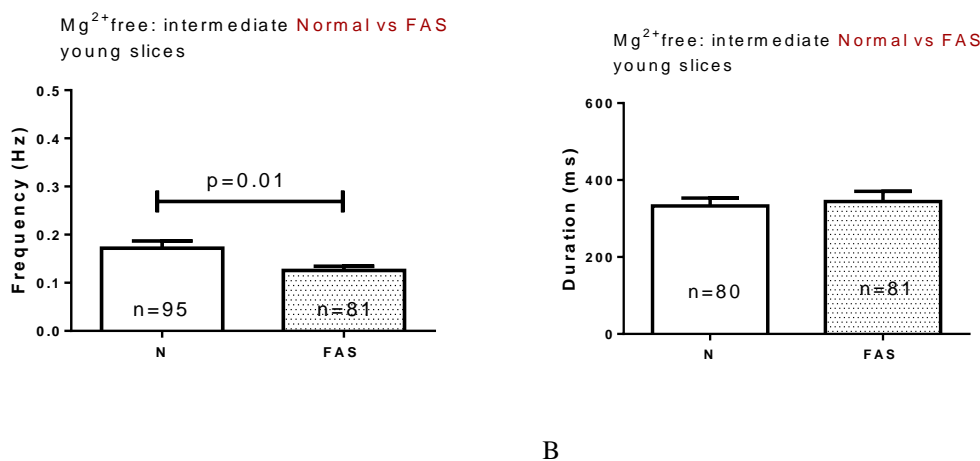
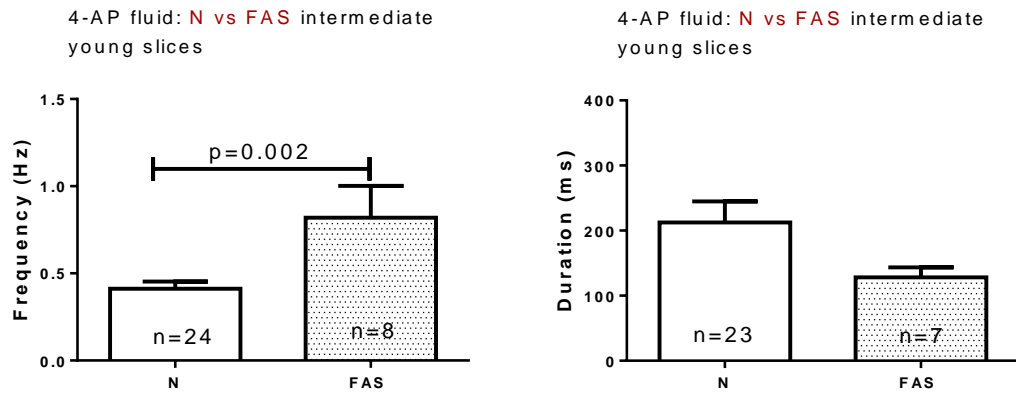


Figure 1 (A, B): A) IED frequency comparison in Mg^{2+} -free fluid, between intermediate N and FAS young slices. B) comparison of duration values between intermediate N and FAS young.

Αυθόρμητες εκφορτίσεις μεσοκρυσικού τύπου (IEDs) σε τ ENY 4-AP (50 μ M) στο μεσαίο τρίτο (intermediate) του ιπποκάμπου σε N και FAS τομές νεαρών πειραματοζώων

Η διαβροχή των τομών με 4-AP (50 μ M) προκάλεσε την εμφάνιση αυθόρμητων επιληπτοειδών εκφορτίσεων (IEDs) σε όλες τις τομές. Η σύγκριση συχνοτήτων των IEDs μεταξύ N και FAS, έδειξε ότι οι **FAS τομές μεσαίου τρίτου** παρουσίασαν δύο φορές υψηλότερες τιμές συγκριτικά με τις N τομές μεσαίου τρίτου νεαρών πειραματοζώων ($p=0.002$) (fig. 2, A). Συνεπώς, είναι σαφές ότι η προγεννητική έκθεση σε αιθανόλη επηρέασε σημαντικά τη συχνότητα των IEDs σε τομές μεσαίου τρίτου από νεαρά πειραματόζωα.

Όσον αφορά στη διάρκεια των IEDs, κατεγράφησαν υψηλότερες τιμές στις N τομές συγκριτικά με τις FAS, παρόλο που η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική (fig. 2, B).



A

B

Figure 2 (A, B): A) IED frequency comparison in 4-AP fluid, between intermediate N and FAS young slices. B) comparison of duration values between intermediate N and FAS young.

4-AP (50 μ M) young intermediate slices



A

B

Εικόνα 7: Μεσοκρυσικού τύπου επιληπτοειδείς εκφορτίσεις (σε τΕΝΥ 4-AP) καταγραφόμενες εξωκυττάρια από την CA1 περιοχή μεσαίου τρίτου τομών ιπποκάμπου από A) N και B) FAS πειραματόζωα

Η προγεννητική έκθεση σε αιθανόλη επηρεάζει την συχνότητα των IED σε τομές μεσαίου τρίτου διαφορετικά σε τENY 4-AP και σε τENY Mg²⁺-free

Σύγκριση συχνοτήτων μεσοκρισικών εκφορτίσεων μεταξύ των 2 μοντέλων

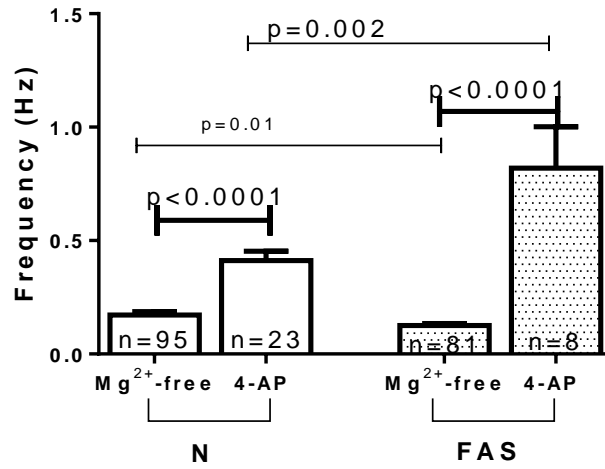
Τα παραπάνω αποτελέσματα σε τομές μεσαίου τρίτου έδειξαν ότι οι FAS τομές σε τENY με 4-AP (50μM) δίνουν διαφορετική εικόνα συγκριτικά με τα αποτελέσματα σε τENY Mg²⁺-free. Η διαβροχή με 4-AP προκάλεσε υψηλότερες τιμές συχνοτήτων σε σχέση με τις τιμές συχνοτήτων των IEDs που προκάλεσε διαβροχή με Mg²⁺-free σε τομές N και FAS (table 1, fig. 3, A). Συνεπώς, υπάρχει μια διαφορά ανάλογα με το μοντέλο που χρησιμοποιούμε κάθε φορά, καθώς ενεργοποιούνται διαφορετικά νευροδιαβιβαστικά συστήματα στην κάθε περίπτωση. Ωστόσο, τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ N και FAS και όταν χρησιμοποιούμε το ίδιο μοντέλο. Πιο συγκεκριμένα, σε τENY Mg²⁺-free καταγράφηκαν σημαντικά χαμηλότερες συχνότητες των IEDs στις FAS τομές, ενώ σε τENY 4-AP καταγράφηκαν σημαντικά χαμηλότερες συχνότητες στις N (fig.3.A).

Όσον αφορά στη διάρκεια των IEDs, καταγράφηκαν σημαντικά μεγαλύτερες τιμές σε τENY Mg²⁺-free συγκριτικά με τις τιμές που καταγράφηκαν υπό διαβροχή με 4-AP (fig.3, B) τόσο στις N (p=0.005) όσο και στις FAS (p=0.01) τομές.

Table 1: Comparison of spontaneous IED frequency values after perfusion with Mg²⁺-free fluid and after 4-AP fluid in N and FAS intermediate young slices

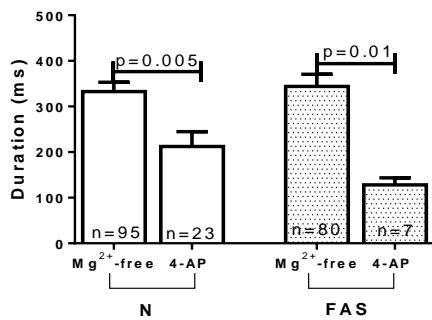
	N	FAS	Statistics**
Mg ²⁺ -free	0.17±0.015Hz, n=95	0.13±0.008Hz, n=81	P=0.01
4-AP	0.41±0.041Hz, n=24	0.82±0.18Hz, n=8	P=0.002
Statistics*	P<0.0001	P<0.0001	
*comparison in the same column			
** comparison in the same row			

Mg²⁺-free vs 4-AP: *intermediate* slices (young)



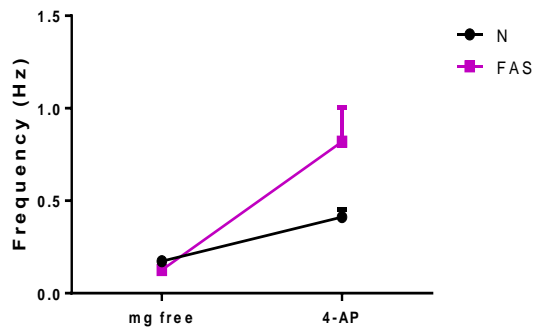
A

Mg²⁺-free vs 4-AP: *intermediate* slices (young)



B

Mg²⁺-free vs 4-AP: *intermediate* slices (young)



C

Fig.(3: A, B, C) Comparison of IED frequency values in Mg²⁺-free and 4-AP fluid in N and FAS intermediate young slices. B) Comparison of IED duration values in Mg²⁺-free and 4-AP fluid in N and FAS intermediate young slices. C) Comparison of the slopes of frequency lines of N and FAS slices, in two different fluids.

Αναπτυξιακή μελέτη σε τομές μεσαίου τρίτου του ιπποκάμπου από N και FAS πειραματόζωα σε τ ENY Mg^{2+} -free

Η επώαση με τ ENY Mg^{2+} -free σε τομές από ενήλικα πειραματόζωα προκάλεσε την εμφάνιση αυθόρμητων IEDs σε όλες τις τομές. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι τομές από ενήλικα πειραματόζωα εμφάνισαν υψηλότερες τιμές συχνοτήτων συγκριτικά με τιμές συχνοτήτων από τομές νεαρών πειραματοζώων. Η τάση για υψηλότερες συχνότητες στην ενήλικη ζωή παρατηρήθηκε και στις N και στις FAS τομές (fig. 4). Παρακάτω παρουσιάζεται ειδικότερη αναπτυξιακή μελέτη για την διερεύνηση τυχόν διαφορών σε τομές μεσαίου τρίτου λόγω της προγεννητικής έκθεσης σε αιθανόλη.

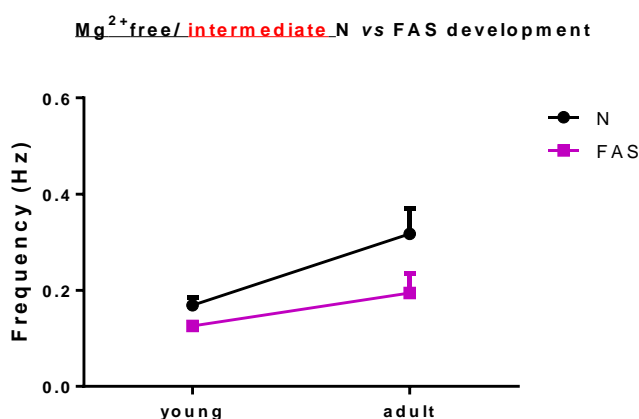


Fig. 4: Comparison of the slopes of frequency evolution with age for intermediate slices.

Σύγκριση συχνοτήτων και διαρκειών μεσοκρισικών εκφορτίσεων N και FAS τομών με την πάροδο της ηλικίας

Οι FAS τομές παρουσίασαν χαμηλότερες τιμές συχνοτήτων στο μεσαίο τρίτο του ιπποκάμπου, ανεξάρτητα από την ηλικία

Πιο συγκεκριμένα, σημαντικά χαμηλότερες τιμές συχνοτήτων IED κατεγράφησαν από τομές μεσαίου τρίτου FAS_{young} πειραματοζώων ($p=0.01$) (βλ. παραπάνω), ένα αποτέλεσμα που φαίνεται να παραμένει και στην ενήλικη ζωή ($p=0.03$, 1tl) (table 2) (fig 5, A).

Όσον αφορά στις τιμές διαρκειών, δεν βρέθηκαν διαφορές μεταξύ N_{adult} και FAS_{adult} τομών (fig 5, B).

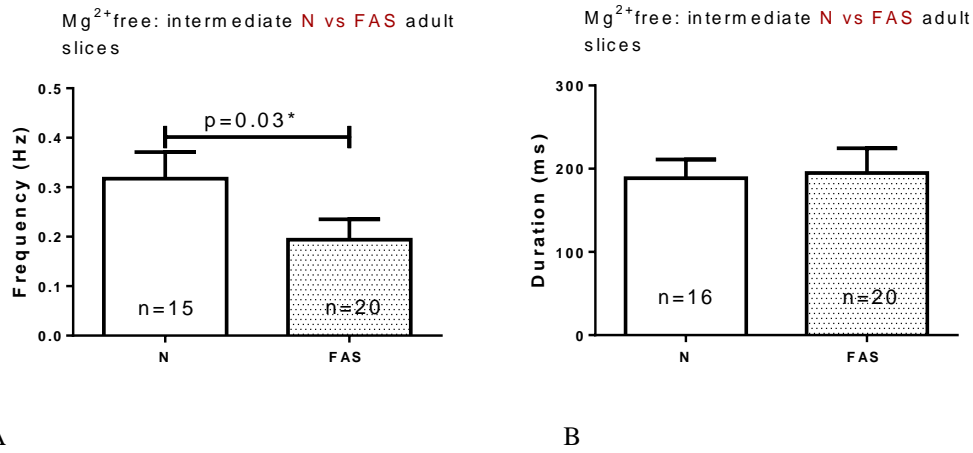


Figure 5 (A, B): A) IED frequency comparison between intermediate N and FAS adult slices. B) comparison of duration values between intermediate N and FAS adult slices.

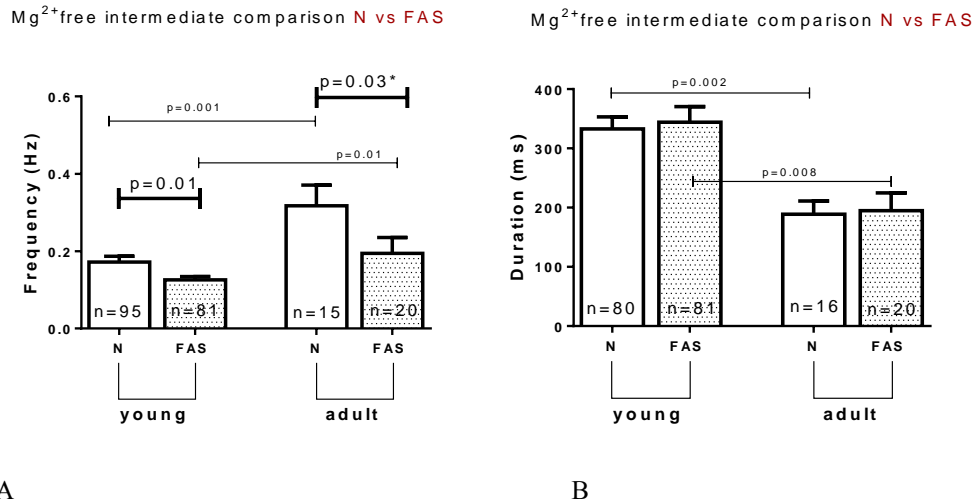


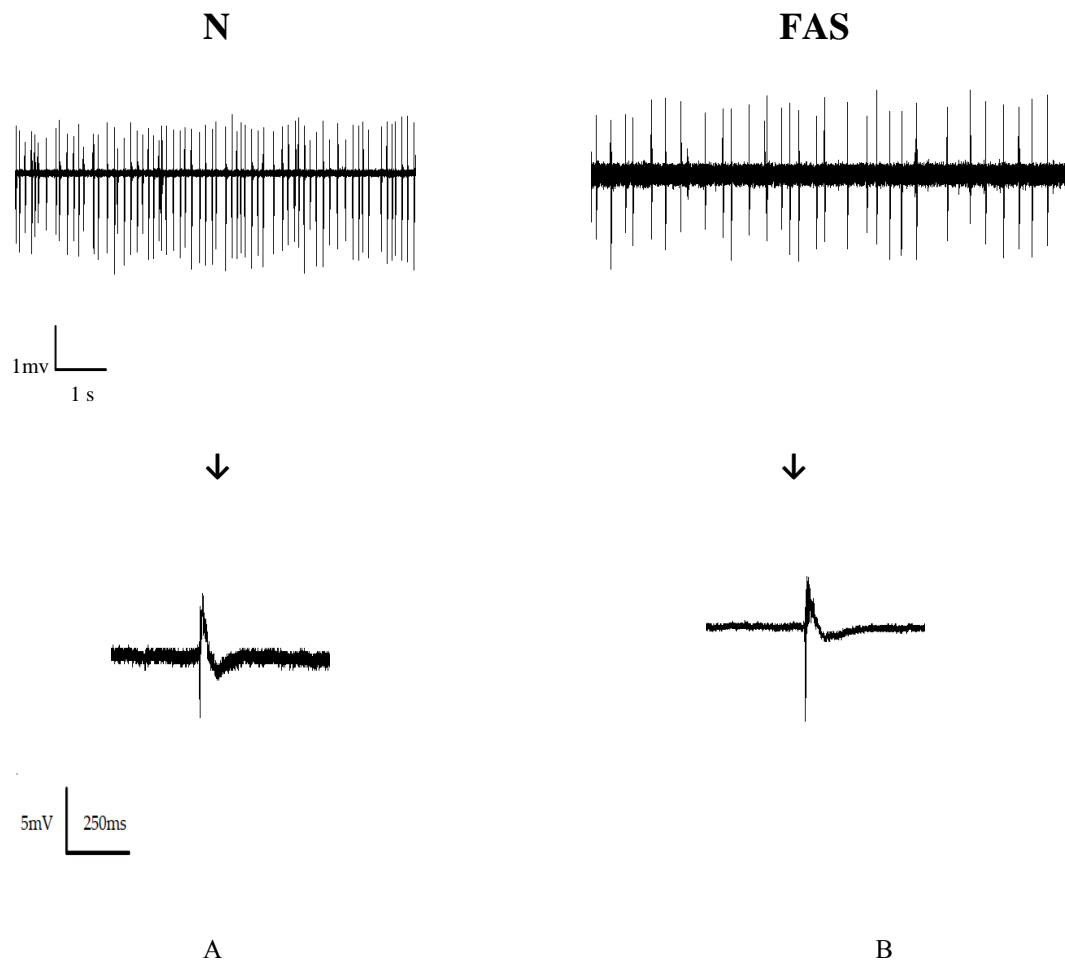
Figure 6 (A, B): A) IED frequency comparison between intermediate N and FAS young and adult slices. B) comparison of duration values between intermediate N and FAS young and adult slices.

Table 2: Comparison of spontaneous IED frequency values after perfusion with Mg²⁺-free fluid in N (A) and FAS (B) intermediate young and adult slices

Mg ²⁺ -free	N	FAS	Statistics** (N vs FAS)
Young	0.17±0.01Hz, n=95	0.13±0.008Hz, n=81	P=0.01
Adult	0.3 ± 0.05Hz, n=16	0.2±0.04Hz, n=20	P=0.03*
Statistics*	P=0.0039	P=0.01	

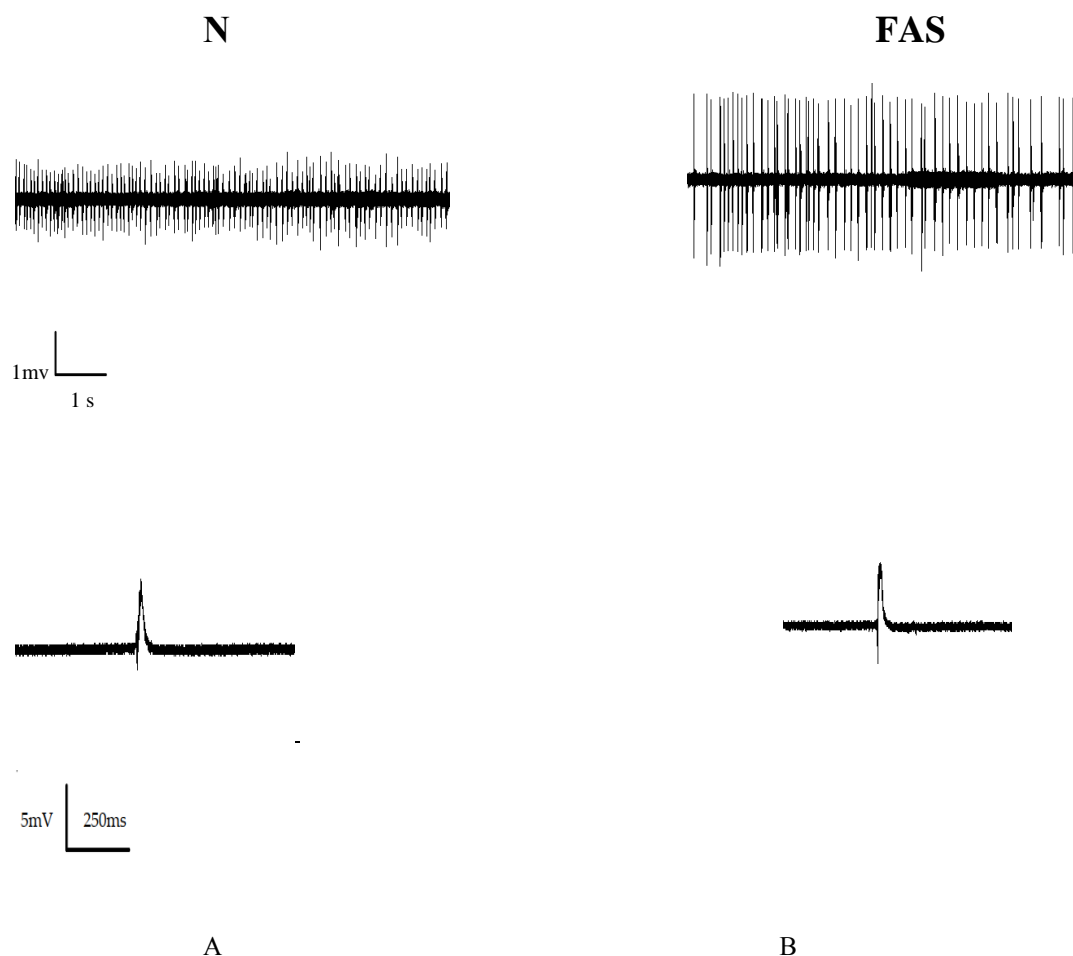
*comparison in the same column
 ** comparison in the same row

Intermediate young slices



Εικόνα 8: Μεσοκρισικού τύπου επιληπτοειδείς εκφορτίσεις (σε τ ENY Mg^{2+} -free) καταγραφόμενες εξωκυττάρια από την CA1 περιοχή μεσαίου τρίτου τομών ιπποκάμπου από Α) N και Β) FAS νεαρά πειραματόζωα

Intermediate adult slices



Εικόνα 9: Μεσοκριστικού τύπου επιληπτοειδείς εκφορτίσεις (σε tENY Mg^{2+} -free) καταγραφόμενες εξωκυττάρια από την CA1 περιοχή μεσαίου τρίτου τομών ιπποκάμπου από A) N και B) FAS ενήλικα πειραματόζωα

Διαμόρφωση συχνοτήτων και διαρκειών των αυθόρμητων IEDs(Mg^{2+} -free ACSF) από τον ανταγωνιστή $GABA_A$, BMI (20 μ M) σε N και FAS τομές μεσαίου τρίτου

Η προσθήκη BMI (20 μ M) μείωσε τη συχνότητα σε 3/7 N τομές μεσαίου τρίτου, δεν επηρέασε 2/7, ενώ αύξησε την συχνότητα των IEDs σε 2/7 τομές. Στις FAS τομές ίδιας ανατομικής προέλευσης, το BMI μείωσε τη συχνότητα σε 3/5, δεν επηρέασε 1/5 και αύξησε την συχνότητα σε 1/5 τομές (table 3). Όσον αφορά στη διάρκεια των εκφορτίσεων, το BMI προκάλεσε αύξηση στις N ($p=0.04^*$) και στις FAS ($p=0.03^*$) τομές (table 4). Συνεπώς, η προσθήκη BMI φαίνεται πως είχε παρόμοια αποτελέσματα σε N και FAS τομές μεσαίου τρίτου.

Table 3: Effects of BMI (20μM) in IED frequency recorded in Mg²⁺-free (intermediate slices)

Frequency (Hz)	N	FAS	Statistics**
Mg ²⁺ -free	0.15 ± 0.035, n=7	0.15 ± 0.07, n=5	P=ns
BMI	0.16 ± 0.04, n=7	0.1 ± 0.05, n=5	P=ns
Statistics*	P=ns	P=ns	
Statistics* (paired t-test): comparison in the same column			
Statistics** (unpaired t-test): comparison in the same row			

Table 4: Effects of BMI (20μM) in IED duration recorded in Mg²⁺-free (intermediate slices)

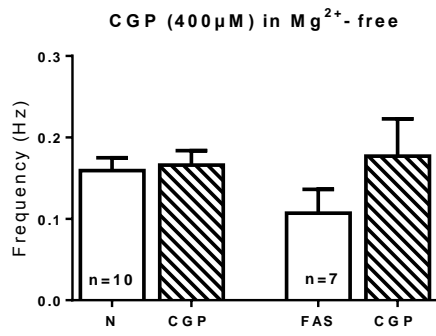
Duration (ms)	N	FAS	Statistics **
Mg ²⁺ -free	285.1 ± 48.83	207.2 ± 38.27	P=ns
BMI	434.4 ± 113.2, n=7	329.4 ± 65.69, n=5	P=ns
Statistics*	P=0.04 (1tl)	P=0.03 (1tl)	
Statistics* (paired t-test): comparison in the same column			
Statistics** (unpaired t-test): comparison in the same row			

Διαμόρφωση συχνοτήτων των αυθόρμητων IEDs(Mg²⁺-free ACSF) από τον ανταγωνιστή GABA_B, 2-hydroxysaclofen (400μM) and CGP-52432 (400μM) σεN και FAS τομές μεσαίου τρίτου(young)

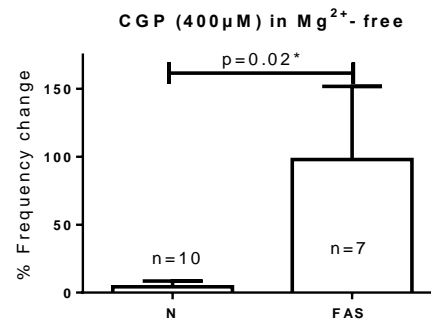
Η προσθήκη του 2-hydroxysaclofen (400μM) σε τENY in Mg²⁺-free αύξησε την συχνότητα σε 3/7 N τομές και μείωσε σε 4/7. Όσον αφορά στις FAS τομές, το 2-hydroxysaclofen αύξησε σε 1/4 και μείωσε σε 3/4 τομές. Αναφορικά με την διάρκεια των IEDs, υπήρξε αύξηση στις 3/6 και μείωση στις 3/6 N τομές, ενώ στις FAS υπήρξε αύξηση στις 3/4 και μείωση της διάρκειας σε 1 τομή. Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, μπορούμε να πούμε ότι η δράση του 2-hydroxysaclofen ήταν παρόμοια στις 2 ομάδες τομών.

Η προσθήκη του ειδικού ανταγωνιστή GABA_B, CGP-52432 (400μM) σε τENY Mg²⁺-free, αύξησε την συχνότητα των IEDs σε όλες τις τομές, αλλά η αύξηση ήταν μεγαλύτερη στις FAS τομές (97.87 ± 53.8%, n=7) συγκριτικά με τις N (4.272 ± 4.2%, n=10) (p=0.02*) (fig. 7, B). Παρ' όλα αυτά, φαίνεται στο fig. 7 ότι οι FAS τομές είχαν από την αρχή χαμηλότερες τιμές συχνοτήτων (δηλαδή πριν την προσθήκη του φαρμάκου; στο τENY Mg²⁺-free) και γι αυτό το λόγο φαίνεται να είναι μεγαλύτερη η % αλλαγή συχνοτήτων (fig. 7, B).

Το CGP-52432 αύξησε την διάρκεια των IEDs και η % αύξηση ήταν παρόμοια στις 2 ομάδες τομών.



A



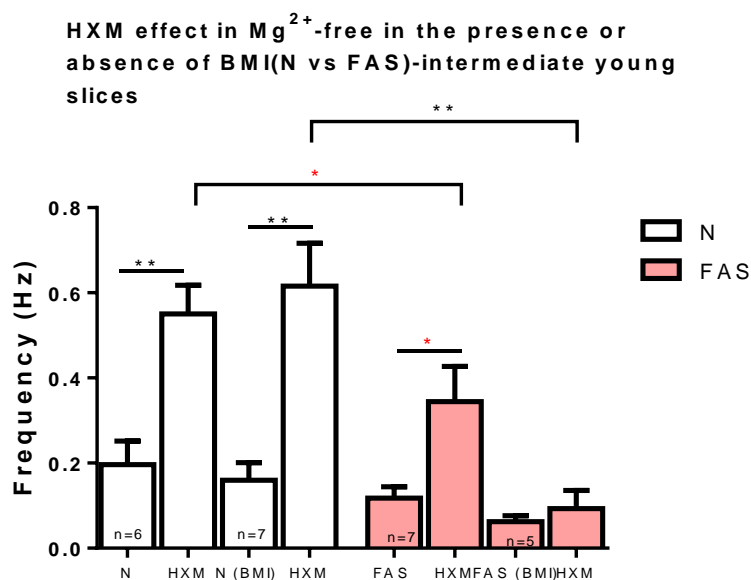
B

Figure 7 (A, B): A) IED frequency comparison between intermediate N and FAS young slices before and after the action of CGP-52432. B) Comparison of CGP-52432s percentage frequency change

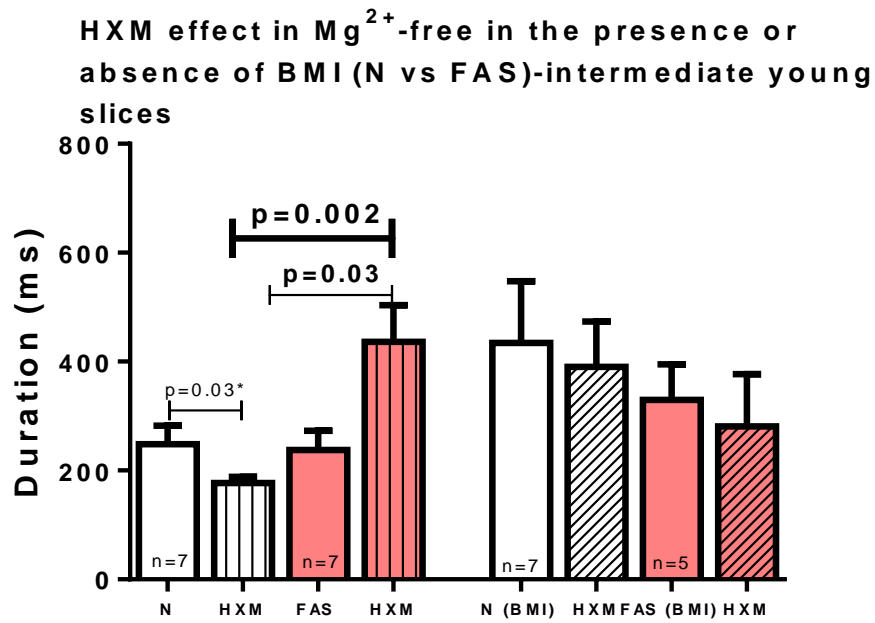
Επίδραση της προγεννητικής έκθεσης σε αιθανόλη στους νικοτινικούς υποδοχείς παρουσία ή απουσία GABA_Aεργικού ελέγχου

Η προσθήκη του ανταγωνιστή νικοτινικών υποδοχέων, Hexamethonium (HXM, 50μM) σε tENY Mg²⁺-free, αύξησε τη συχνότητα των IEDs σε όλες τις τομές μεσαίου τρίτου από N και FAS νεαρά πειραματόζωα. Ωστόσο, οι τελικές τιμές συχνότητων ήταν μεγαλύτερες στις N τομές (p=0.04.1t1)(fig.8, A). Η % αύξηση ήταν παρόμοια και εξίσου στατιστικά σημαντική στις 2 ομάδες τομών. Ωστόσο, οι αρχικές και τελικές τιμές συχνότητων σε N και FAS διέφεραν σημαντικά (table).

Προσθήκη του HXM (50μM) παρουσία BMI (20μM) προκάλεσε αύξηση της συχνότητας των IEDs στις N τομές αλλά όχι στις FAS. Στο fig.8, A φαίνεται να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στις τελικές τιμές συχνότητων μεταξύ N και FAS τομών (p=0.02).



A



B

Figure 8 (A,B): A) comparison of HXM action at IED frequency in N and FAS intermediate young slices (Mg^{2+} -fluid) at the presence or absence of BMI. B) Comparison of HXM action at IED duration in N and FAS intermediate young slices (Mg^{2+} -fluid) at the presence or absence of BMI.

Frequency (Hz)	N		Paired t-test	FAS		Paired t-test
	Mg ²⁺ -free	HXM		Mg ²⁺ -free	HXM	
	(1) 0.2 ± 0.05	(2) 0.55 ± 0.07, n=6		P=0.002	(1) 0.1 ± 0.03	
Unpaired t-test (N vs FAS)	(1) Vs (1) p=ns		(2) Vs (2) p=0.04 (1tl)			
Duration (ms)	N		Paired t-test	FAS		Paired t-test
	Mg ²⁺ -free	HXM		Mg ²⁺ -free	HXM	
	(3) 248.3 ± 34.03	(4) 176.9 ± 11.8, n=7		P=0.03 (1tl)	(3) 237.6 ± 35.37	
Unpaired t-test (N vs FAS)	(3) Vs (3) p=ns		(4) Vs (4) p=0.002			

Table 6: HXM effect at the presence of BMI (in Mg²⁺-free fluid)-frequency and duration values

Frequency (Hz)	N		Paired t-test	FAS		Paired t-test
	BMI	HXM		BMI	HXM	
	(1) 0.16 ± 0.04	(2) 0.6 ± 0.1, n=7		p=0.006	(1) 0.1 ± 0.04	
Unpaired t-test (N vs FAS)	(1) Vs (1) p=ns		(2) Vs (2) p=0.02			
Duration (ms)	N		Paired t-test	FAS		Paired t-test
	BMI	HXM		BMI	HXM	
	(3) 434.4 ± 113.2	(4) 390 ± 83.54, n=7		P=ns	(3) 329.4 ± 65.69	
Unpaired t-test (N vs FAS)	(3) Vs (3) p=ns		(4) vs (4) p=ns			

Η % αλλαγή συχνότητων που παρουσιάζεται στο παρακάτω διάγραμμα, δείχνει τη δράση του HXM (σε τ ENY Mg^{2+} -free) απουσία και παρουσία BMI. Είναι σαφές ότι το HXM είχε ίδιο αποτέλεσμα (αύξηση συχνότητων) στις N τομές και στις δύο περιπτώσεις. Όσον αφορά στις FAS τομές, η προσθήκη HXM αύξησε τη συχνότητα σε τ ENY Mg^{2+} -free, αλλά δεν επηρέασε καθόλου την συχνότητα των IEDs όταν υπήρχε BMI στο εγκεφαλονωτιαίο υγρο.

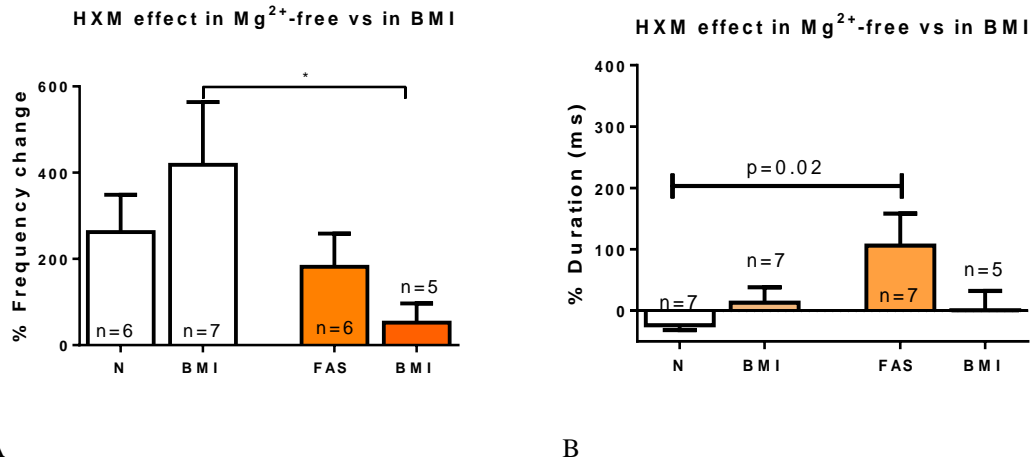


Figure 9 (A, B): A) Comparison of HXM's percentage frequency change in the presence or absence of BMI B) Comparison of HXM's percentage duration change in the presence or absence of BMI.

Επίδραση της προγεννητικής έκθεσης σε αιθανόλη στους μουσκαρινικούς υποδοχείς

Δράσεις του μουσκαρινικού αγωνιστή, oxotremorine (1 μ M) (σε τENY Mg^{2+} -free) σε τομές μεσαίου τρίτου από N και FAS νεαρά πειραματόζωα

Η προσθήκη του μουσκαρινικού αγωνιστή, oxotremorine (1 μ M) αύξησε τη συχνότητα των IEDs σε όλες τις ομάδες τομών. Η γραφική παράσταση της % αλλαγής συχνοτήτων δείχνει ότι η αύξηση ήταν παρόμοια σε N και FAS τομές (fig. 10).

Η προσθήκη του M1 μουσκαρινικού ανταγωνιστή, pirenzerpine (1 μ M) (παρουσία oxotremorine) μείωσε τη συχνότητα των IEDs στις N τομές, αλλά αύξησε τη συχνότητα στις FAS (fig. 11).

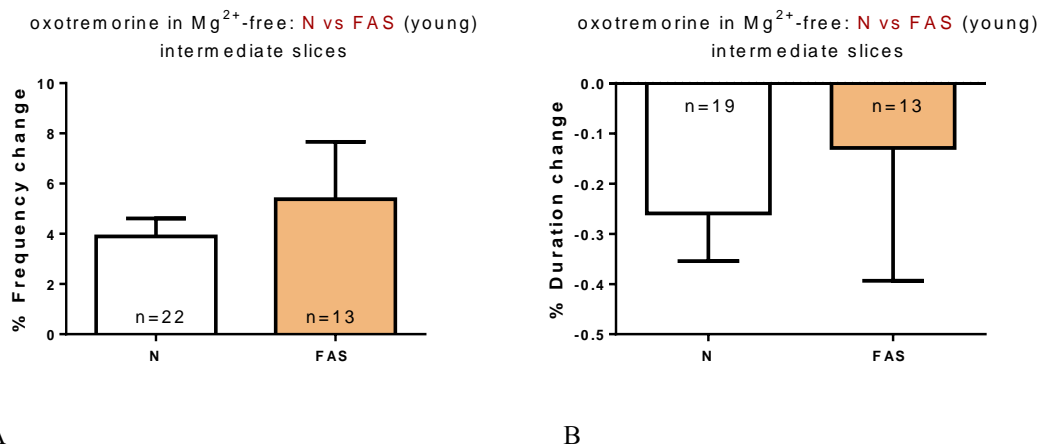
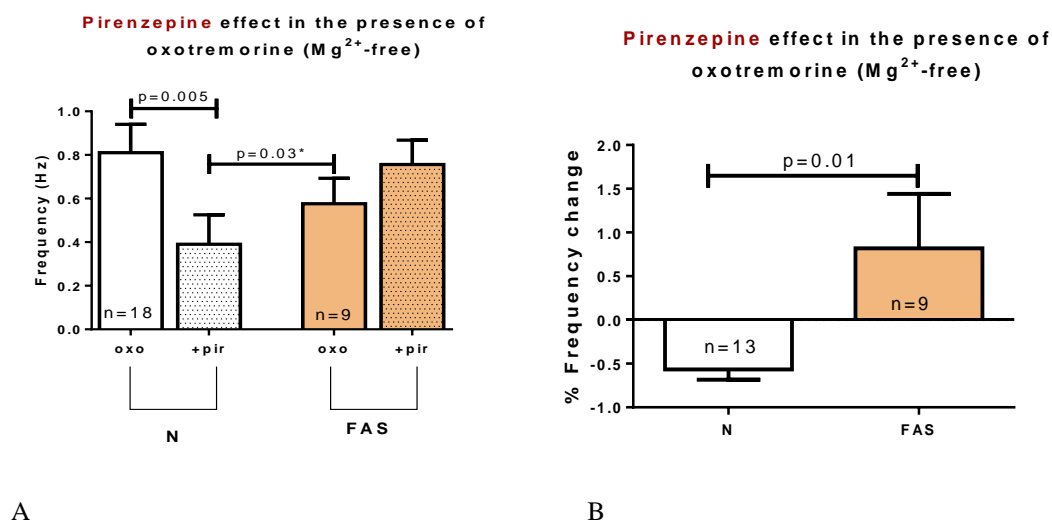
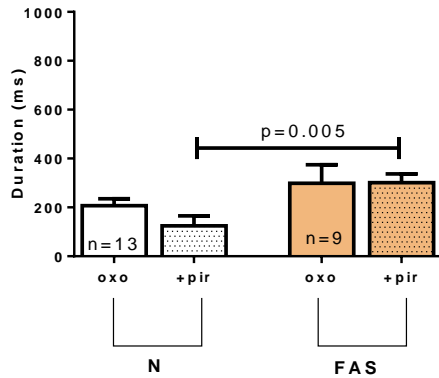


Fig. 10 (A, B): A) Comparison of oxotremorine's percentage frequency change in Mg^{2+} -free aCSF, between N and FAS slices. B) Comparison of oxotremorine's percentage duration change in Mg^{2+} -free aCSF, between N and FAS slices

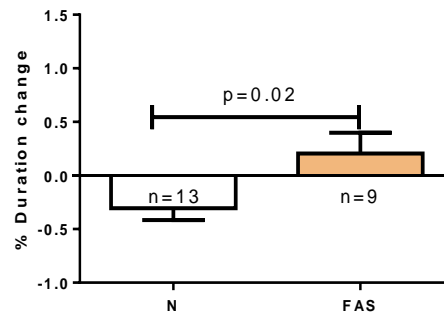


Pirenzepine effect in the presence of oxotremorine (Mg^{2+} -free)



C

Pirenzepine effect in the presence of oxotremorine (Mg^{2+} -free)



D

Fig. 11 (A, B, C, D): A, B) Comparison of pirenzepine's percentage frequency change in the presence of oxotremorine, between N and FAS slices. C, D) Comparison of pirenzepine's percentage duration change in the presence of oxotremorine, between N and FAS slices

Συμπληρωματικά πειράματα χολινεργικών αγωνιστών και ανταγωνιστών σε τομές μεσαίου τρίτου νεαρών πειραματοζώων

Σε επόμενο κύκλο πειραμάτων, έγινε δοκιμή του VU 0255035 (10 μ M):

Η προσθήκη του M1 μουσκαρινικού ανταγωνιστή VU 0255035 (10 μ M), παρουσία oxotremorine (1 μ M), δεν επηρέασε τη μεσοκρισική συχνότητα και διάρκεια των IEDs σε N και FAS τομές (fig. 12).

Table 7: VU 0255035 (10 μ M) effect in the presence of oxo (1 μ M)

VU 0255035	N	FAS	statistics
%frequency change	291.6 \pm 142.5% n=4	335.8 \pm 324%, n=4	P=ns
% duration change	-38.86 \pm 18.14%, n=4	-24.77 \pm 23.92%, n=4	P=ns

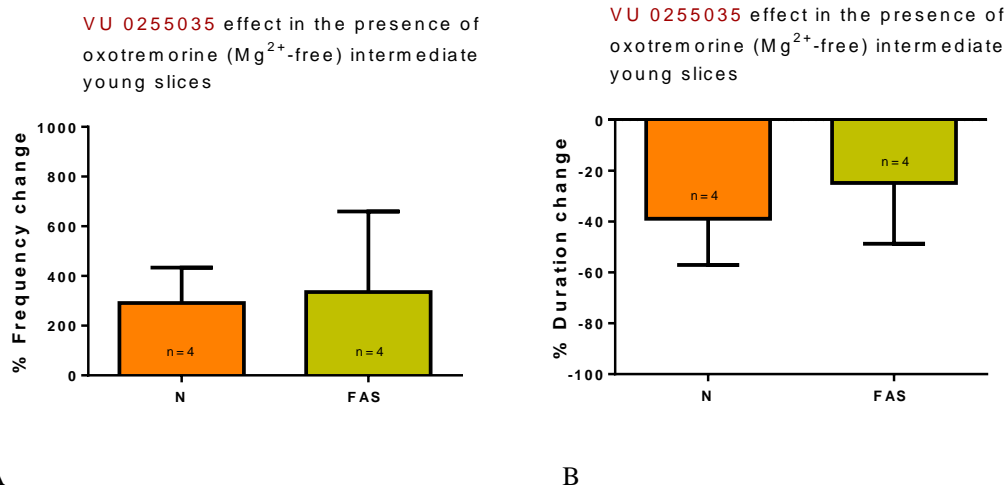


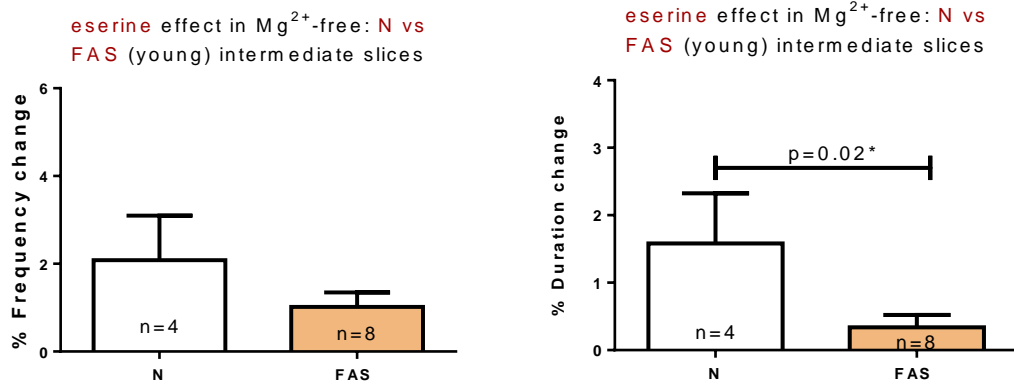
Fig. 12 (A, B): A) Comparison of VU 0255035 percentage frequency change in the presence of oxotremorine (Mg^{2+} -free ACSF), between N and FAS slices. B) Comparison of VU 0255035 percentage duration change in the presence of oxotremorine (Mg^{2+} -free ACSF), between N and FAS slices.

Δράσεις εσερίνης (10 μ M):

Η προσθήκη του αναστολέα του ενζύμου ακετυλοχολινστεράση, εσερίνη (10 μ M) σε τ ENY Mg^{2+} -free, προκάλεσε αύξηση της συχνότητας των IEDs και στις 2 ομάδες τομών και η % αύξηση ήταν παρόμοια (fig. 13, A). Όσον αφορά στη διάρκεια των IEDs, φαίνεται ότι η προσθήκη εσερίνης προκάλεσε αύξηση των διαρκειών, και η αύξηση ήταν ελαφρώς μεγαλύτερη στις N τομές ($p=0.02$, 1tl) (fig. 13, B). Συνεπώς, η προγεννητική έκθεση σε αιθανόλη δεν φαίνεται να επηρέασε σημαντικά την ενδογενή ακετυλοχολίνη.

Table 8: eserine effect in Mg^{2+} -free

eserine	N	FAS	statistics
% frequency change	208.5 \pm 101.5%, n=4	101.5 \pm 33.34%, n=8	P=ns
% duration change	158.2 \pm 74.29%, n=4	33.97 \pm 18.10%, n=8	P=0.02 (1 tl)



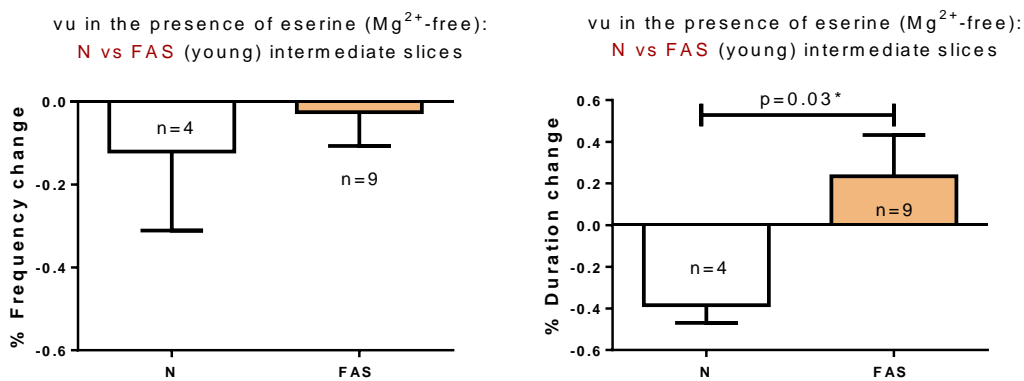
A

B

Fig. 13 (A, B): A) Comparison of eserine's percentage frequency change in Mg^{2+} -free ACSF, between N and FAS slices. B) Comparison of eserine's percentage duration change in Mg^{2+} -free ACSF, between N and FAS slices.

Προσθήκη VU 0255035 (10 μ M) παρουσία εσερίνης (10 μ M):

Στη συνέχεια έγινε προσθήκη του M1 μουσκαρινικού ανταγωνιστή VU 0255035 (10 μ M), παρουσία εσερίνης (10 μ M). Το VU 0255035 προκάλεσε μείωση της συχνότητας των IEDs και στις 2 ομάδες τομών. Η μείωση αυτή φαίνεται να ήταν μεγαλύτερη στις N τομές αλλά λόγω μεγάλης διακύμανσης η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική (fig. 14, A). Όσον αφορά στη μεσοκρυσική διάρκεια, ο μουσκαρινικός ανταγωνιστής προκάλεσε μείωση στις N τομές και αύξηση στις FAS (p=0.03, 1tl) (fig. 14, B).



A

B

Fig. 14 (A, B): A) Comparison of VU 0255035 percentage frequency change in the presence of eserine (Mg^{2+} -free ACSF), between N and FAS slices. B) Comparison of VU 0255035 percentage duration change in the presence of eserine (Mg^{2+} -free ACSF), between N and FAS slices.

Table 9: VU 0255035 (10 μ M) effect in the presence of eserine (10 μ M)

+ VU 0255035 (in the presence of serine)	N	FAS	statistics
% frequency change	-0.12 \pm 0.19, n=4	-0.025 \pm 0.081, n=9	P=ns
% duration change	-0.38 \pm 0.085, n=4	0.23 \pm 0.19, n=9	P=0.03 (1t)

Δράσεις μουσκαρινικών ανταγωνιστών:

Η προσθήκη του M2 μουσκαρινικού ανταγωνιστή, gallamine triethiodite (1 μ M) προκάλεσε παρόμοια αύξηση της μεσοκριστικής συχνότητας σε N (p=0.02) και FAS τομές (fig. 15, A, C). Όσον αφορά στη διάρκεια, προκάλεσε αύξηση των μεσοκριστικών διαρκειών και η αύξηση ήταν παρόμοια σε N και FAS (fig. 15, B, D).

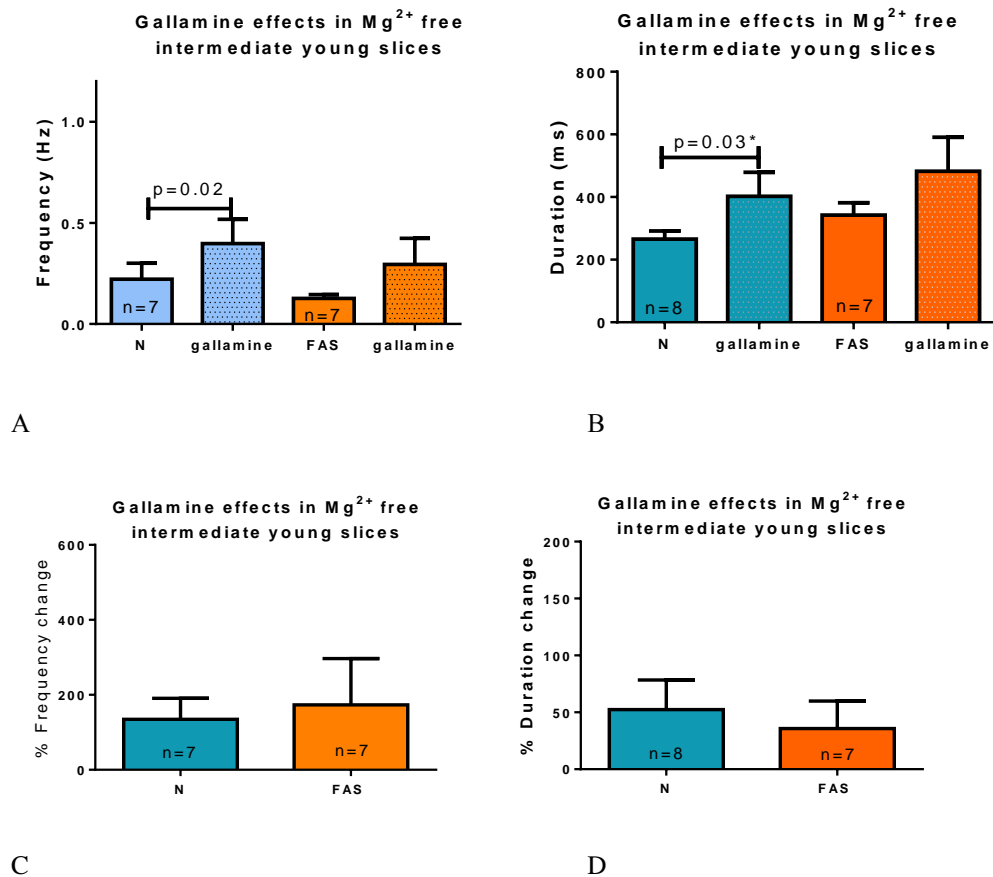


Fig. 15 (A, B, C, D): A) Comparison of the frequency values before and after the addition of gallamine triethiodite (Mg²⁺-free) between N and FAS slices. B) Comparison of the duration values before and after the addition of gallamine triethiodite (Mg²⁺-free) between N and FAS slices. C) Comparison of the percentage frequency change after the addition of gallamine triethiodite. D) Comparison of the percentage duration change after the addition of gallamine triethiodite

Frequency (Hz)	N		Paired t-test	FAS		Paired t-test
	Mg²⁺-free	gallamine		Mg²⁺-free	gallamine	
	(1) 0.22 ±0.08, n=7	(2) 0.4± 0.12, n=7	P=0.02	(1) 0.12 ± 0.018, n=8	(2) 0.3 ± 0.12, n=7	P=ns
Unpaired t-test (N vs FAS)	(1) Vs (1) p=ns		(2) Vs (2) p=ns			
Duration (ms)	N		Paired t-test	FAS		Paired t-test
	Mg²⁺-free	gallamine		Mg²⁺-free	gallamine	
	(3) 265.5±26.28, n=8	(4) 402.6 ±76.22, n=8	P=0.03 (1tl)	(3) 342.6±39.09, n=7	(4) 482.4±108.8, n=7	P=ns
Unpaired t-test (N vs FAS)	(3) Vs (3) p=ns		(4) vs (4) p=ns			

Η προσθήκη του M3 μουσκαρινικού ανταγωνιστή, 4-DAMP (1 μ M) σε tENY Mg²⁺-free, δεν επηρέασε τη μεσοκρισική συχνότητα των N τομών μεσαίου τρίτου νεαρών πειραματοζώων (fig.). Αντίθετα, προκάλεσε αύξηση της μεσοκρισικής συχνότητας στις FAS τομές ίδιας ανατομικής προέλευσης (p=0.007). Παρ' όλα αυτά, η % αλλαγή συχνοτήτων δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά (fig.). Όσον αφορά στη διάρκεια των εκφορτίσεων, δεν φαίνεται να επηρέασε η προσθήκη του φαρμάκου.

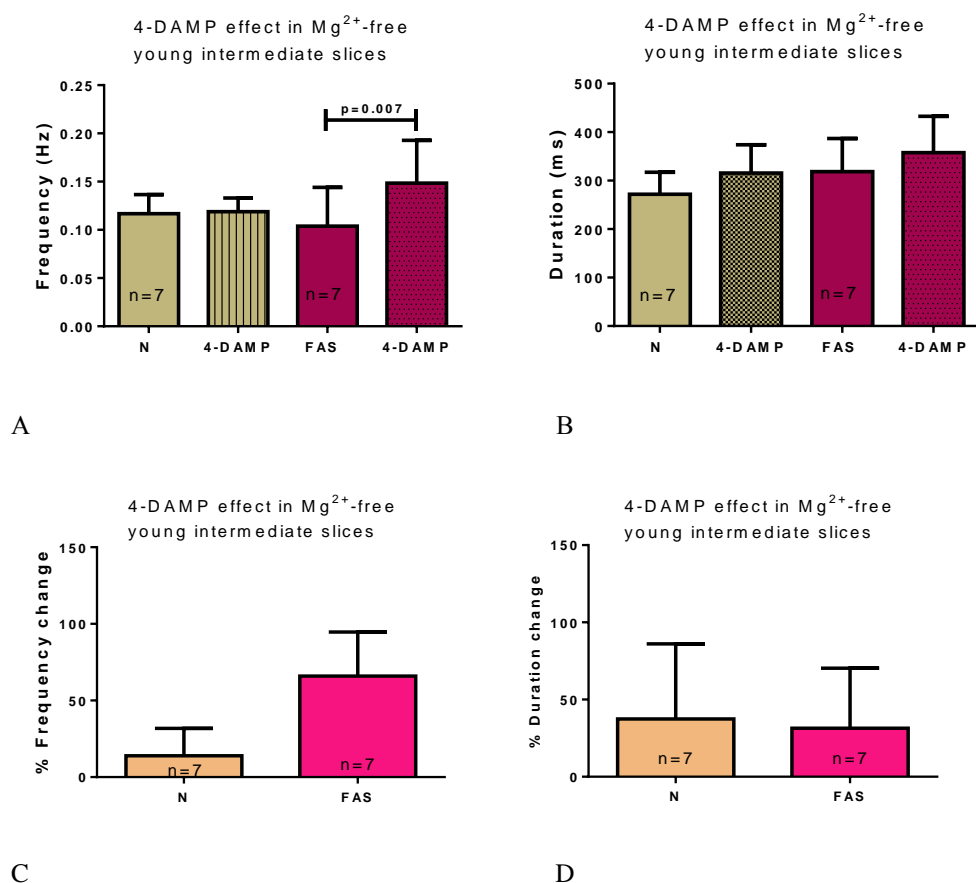


Fig. 16 (A, B, C, D): A) Comparison of the frequency values before and after the addition of 4-DAMP (Mg²⁺-free aCSf) between N and FAS slices. B) Comparison of the duration values before and after the addition of 4-DAMP (Mg²⁺-free aCSf) between N and FAS slices. C) Comparison of the percentage frequency change after the addition of 4-DAMP. D) Comparison of the percentage duration change after the addition of 4-DAMP.

Table 11: frequency and duration values before and after the addition of 4-DAMP (N and FAS intermediate slices)

Frequency (Hz)	N		Paired t-test	FAS		Paired t-test
	Mg ²⁺ -free	4-DAMP		Mg ²⁺ -free	4-DAMP	
	(1) 0.11±0.019, n=7	(2) 0.12±0.014, n=7	P=ns	(1) 0.10±0.040, n=7	(2) 0.15 ± 0.04, n=7	P=0.007
Unpaired t-test (N vs FAS)	(1) Vs (1) p=ns		(2) Vs (2) p=ns			
Duration (ms)	N		Paired t-test	FAS		Paired t-test
	Mg ²⁺ -free	4-DAMP		Mg ²⁺ -free	4-DAMP	
	(3) 272.0 ±45.12, n=5	(4) 315.6 ± 58.28, n=5	P=ns	(3) 318.5±68.50, n=7	(4) 357.5±75.09, n=7	P=ns
Unpaired t-test (N vs FAS)	(3) Vs (3) p=ns		(4) vs (4) p=ns			

Δράσεις carbachol (CCh, 1μM) σε φυσιολογικό aCSF:

Στη συνέχεια δοκιμάστηκε η προσθήκη του μη υδρολύμενου ανάλογου ακετυλοχολίνης, carbachol σε φυσιολογικό εγκεφαλονωτιαίο υγρό σε τομές μεσαίου τρίτου από N και FAS νεαρά πειραματόζωα. Η CCh προκάλεσε την εμφάνιση αυθόρμητων εκφορτίσεων μεσοκρυσικού τύπου (IEDs) και στις 2 ομάδες τομών. Οι τιμές συχνότητας και διάρκειών των IEDs ήταν παρόμοιες μεταξύ N και FAS (fig. 17 A, B). Παρουσία carbachol προστέθηκε ο M1 μουσκαρινικός ανταγωνιστής VU 0255035 (10μM) μείωσε τη συχνότητα των IEDs και στις 2 ομάδες τομών. Όσον αφορά στη διάρκεια, το VU 0255035 προκάλεσε αύξηση στις N τομές, ενώ δεν επηρέασε τις FAS (fig. 17, D).

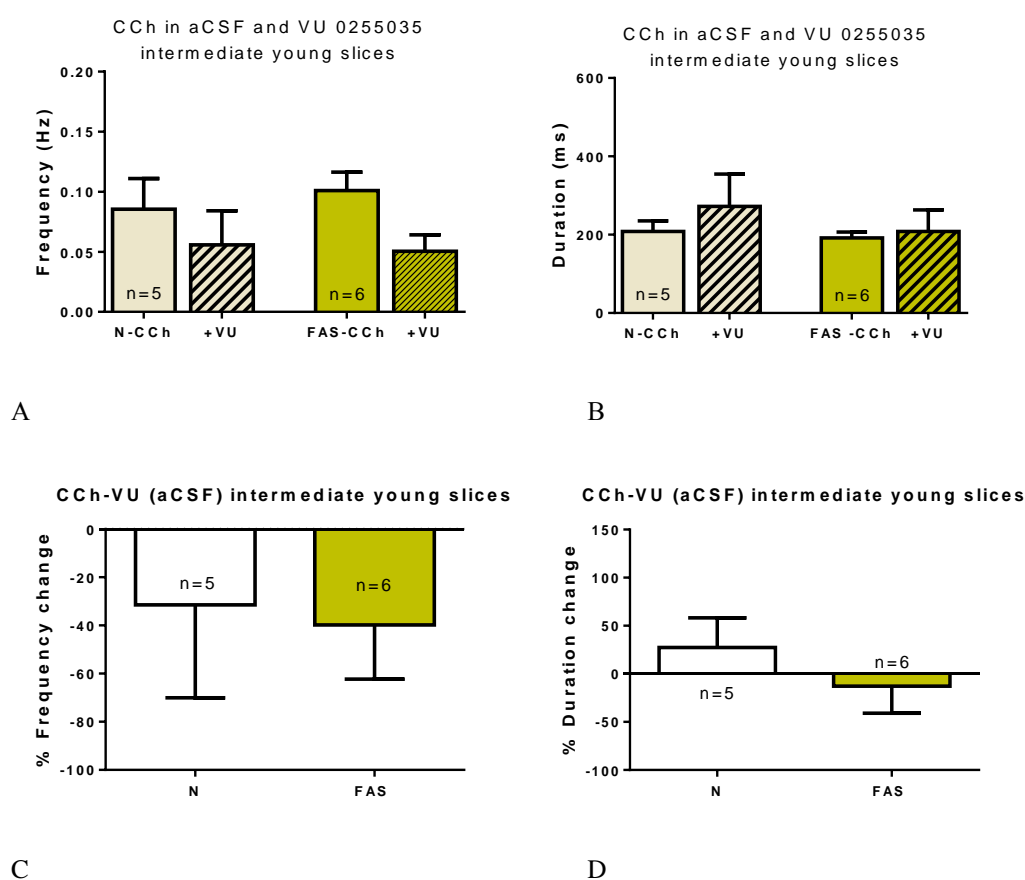


Fig. 17 (A, B, C, D): A) Comparison of the frequency values of IEDs induced by carbachol and their modulation by VU 0255035. B) Comparison of the duration values of IEDs. C) Comparison of percentage frequency change after the addition of VU 0255035. D) Comparison of the percentage duration change after the addition of VU 0255035.

Table 12: frequency and duration values before and after the addition of VU 0255035 (N and FAS intermediate slices)

Frequency (Hz)	N		Paired t-test	FAS		Paired t-test
	CCh	VU 0255035		CCh	VU 0255035	
	(1) 0.08±0.025, n=5	(2) 0.05±0.028, n=5	P=ns	(1) 0.10±0.015, n=6	(2) 0.05±0.013, n=6	P=ns
Unpaired t-test (N vs FAS)	(1) Vs (1) p=ns		(2) Vs (2) p=ns			
Duration (ms)	N		Paired t-test	FAS		Paired t-test
	CCh	VU 0255035		CCh	VU 0255035	
	(3) 208.0±27.10, n=5	(4) 272.0±82.95, n=5	P=ns	(3) 191.6±15.42, n=6	(4) 208.2±54.86, n=6	P=ns
Unpaired t-test (N vs FAS)	(3) Vs (3) p=ns		(4) vs (4) p=ns			

Μελέτη 2

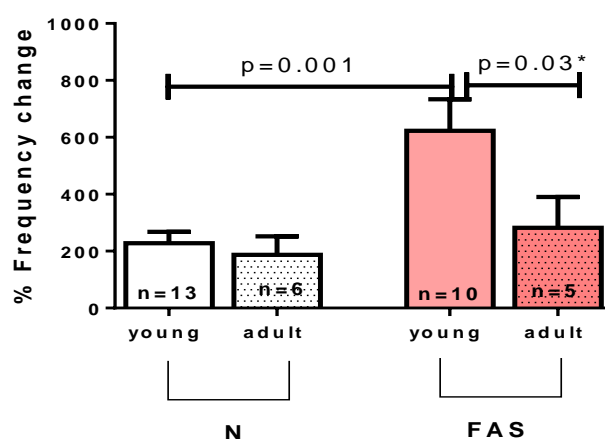
Δράση ανταγωνιστών αγωγιμοτήτων K^+ σε τομές μεσαίου τρίτου FAS και N πειραματοζώων

Η αύξηση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης K^+ (7mM) σε τENY Mg^{2+} -free επηρέασε διαφορετικά τις N και FAS τομές μεσαίου τρίτου

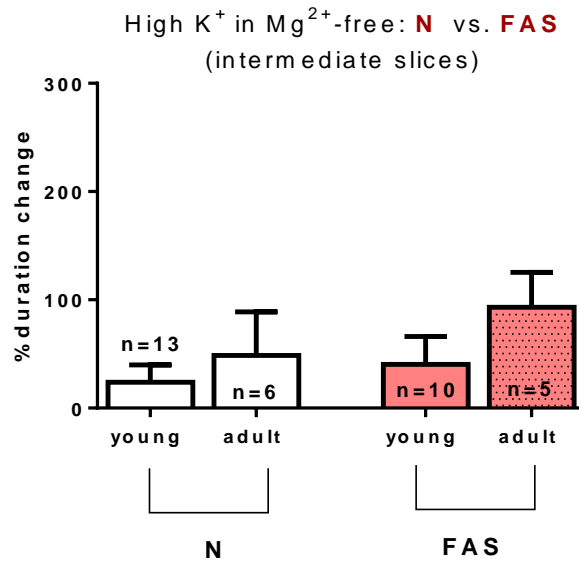
Η αύξηση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης K^+ σε 7mM προκάλεσε αύξηση των συχνοτήτων των IEDs σε N και FAS σε όλες τις ηλικίες.

Η σύγκριση της % αλλαγής συχνοτήτων των IEDs αποκάλυψε σημαντικές διαφορές μεταξύ N και FAS. Ειδικότερα, αναφορικά με τις τομές από νεαρά πειραματόζωα, η αύξηση των ιόντων K^+ προκάλεσε σημαντική αύξηση ($p=0.001$) στις FAS τομές συγκριτικά με τις N (fig. 18, A). Με την πάροδο της ηλικίας εξαφανίστηκε αυτή η διαφορά καθώς η αύξηση των συχνοτήτων των IEDs (λόγω της αύξηση των ιόντων K^+) ήταν παρόμοια σε τομές από ενήλικα N και FAS (fig. 18, A). Φαίνεται δηλαδή, πως η προγεννητική έκθεση σε αιθανόλη επηρέασε περισσότερο τις τομές από νεαρά πειραματόζωα. Όσον αφορά στη διάρκεια των IEDs δεν φαίνεται να υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ N και FAS σε καμία ηλικία (fig.18, B).

High K^+ in Mg^{2+} -free: **N** vs. **FAS**
(intermediate slices)



A



B

Fig. 18 (A, B) : A) graph of percentage frequency change after the increase of potassium concentration at N and FAS slices B) graph of percentage duration change after the increase of potassium concentration at N and FAS slices

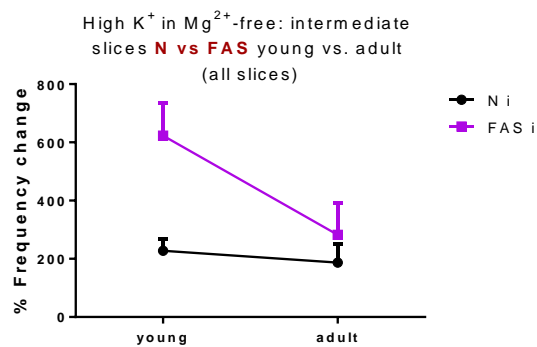


Fig. 19: Comparison of the slopes of frequency evolution with age, after the increase of potassium concentration (7mM).

Table 13: values of percentage frequency change after the increase of potassium concentration at N and FAS slices

% frequency change	N	FAS	Statistics**
Young	227.6±39.98%,n=13	622.8±110.7%,n=10	P=0.001
Adult	186.8±64.90%,n=6	282.2±108.5%,n=5	P=ns
Statistics*	P=ns	P=0.03 (1 tl)	
*comparison in the same column ** comparison in the same row			

Table 14: values of percentage duration change after the increase of potassium concentration at N and FAS slices

% duration change	N	FAS	Statistics**
Young	24.00±15.81%,n=13	40.33±25.73%,n=9	P=ns
adult	48.63±40.21%,n=6	93.10±32.34%,n=5	P=ns
Statistics**	P=ns	P=ns	

*comparison in the same column
 ** comparison in the same row

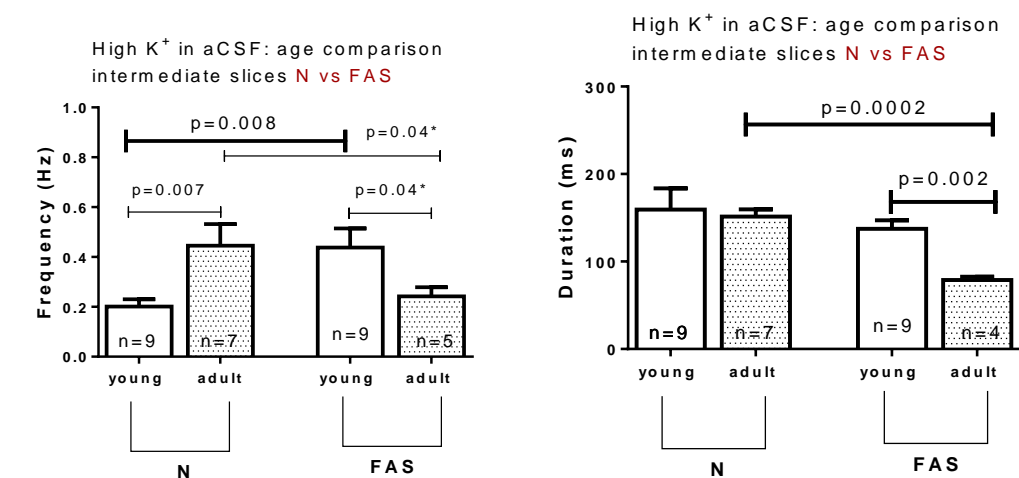
Αύξηση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης K⁺(7mM) σε φυσιολογικό aCSF

Η διαβροχή των τομών με φυσιολογικό aCSF (με Mg²⁺) δεν έδωσε αυθόρμητη δραστηριότητα. Στη συνέχεια ακολούθησε αύξηση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης των ιόντων καλίου σε 7 mM, η οποία προκάλεσε την εμφάνιση επιληπτοειδών εκφορτίσεων μεσοκρισικού τύπου μέσα στα πρώτα 10 λεπτά σε όλες τις τομές.

Από τη σύγκριση συχνοτήτων των IEDs προέκυψε ότι οι τομές από νεαρά N πειραματόζωα παρουσίασαν σημαντικά χαμηλότερες συχνότητες συγκριτικά με τις FAS (p=0.008).

Με την ενηλικίωση, παρατηρήθηκε διαφορετική εικόνα στις 2 ομάδες τομών. Συγκεκριμένα, οι N τομές παρουσίασαν υψηλότερες τιμές συχνοτήτων στην ενήλικη ζωή συγκριτικά με τις αντίστοιχες των νεαρών τομών (p=0.007). Αντίθετα, στις FAS τομές παρατηρήθηκε η ακριβώς αντίθετη εικόνα, δηλαδή οι τομές από ενήλικα ζώα είχαν σημαντικά χαμηλότερες συχνότητες (p=0.04, 1tl). Στο fig. 20, C φαίνεται καθαρά η αντίθετη κλίση των ευθειών των 2 ομάδων (N και FAS) που σχηματίζουν οι τιμές συχνοτήτων με την πάροδο της ηλικίας.

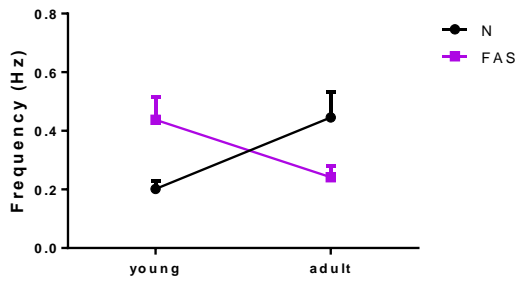
Όσον αφορά στη μεσοκρισική διάρκεια των IEDs, οι N τομές παρουσίασαν παρόμοιες τιμές στις 2 ηλικίες. Αντίθετα, οι FAS τομές παρουσίασαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές διαρκειών στη ενήλικη ζωή (p=0.002) (fig. 20, B).



A

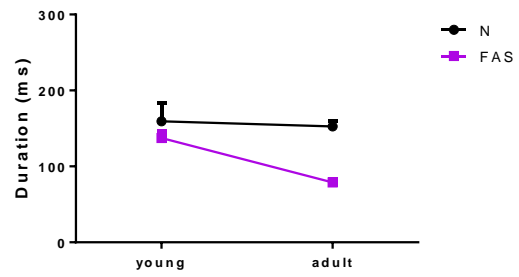
B

High K⁺ in aCSF: frequency evolution with age



C

High K⁺ in aCSF: duration evolution with age



D

Fig. 20 (A, B): A) Comparison of the frequency IED values induced by the increase of potassium concentration in normal aCSf between N and FAS, young and adult slices. B) Comparison of the duration IED values induced by the increase of potassium concentration in normal aCSf between N and FAS, young and adult slices. C) Comparison of the slopes of frequency evolution with age, after the increase of potassium concentration (7mM). D) Comparison of the slopes of duration evolution with age, after the increase of potassium concentration (7mM).

Table 15: frequency and duration values of IEDs after the increase of potassium concentration (7mM) in aCSF:

Frequency (Hz)	N		Unpaired t-test (young vs. adult)	FAS		Unpaired t-test (young vs. adult)
	young	adult		young	adult	
		(1) 0.20±0.028, n=9	(2) 0.44±0.08, n=7	P=0.007	(1) 0.44±0.077, n=9	(2) 0.24±0.036, n=5
Unpaired t-test (N vs FAS)	(1) Vs (1) p=0.008		(2) Vs (2) p=0.04, 1tl			
Duration (ms)	N		Unpaired t-test (young vs. adult)	FAS		Unpaired t-test (young vs. adult)
	young	adult		young	adult	
		(3) 159.4±24.12, n=9	(4) 151.3±8.33, n=7	P=ns	(3) 137.4±9.62, n=9	(4) 78.75±3.77, n=4
Unpaired t-test (N vs FAS)	(3) Vs (3) p=ns		(4) vs (4) p=0.0002			

Προσθήκη του ειδικού αναστολέα Kir καναλιών BaCl₂ (2mM) σε τENY Mg²⁺-free

Σε επόμενο κύκλο πειραμάτων δοκιμάστηκε η δράση του ειδικού αναστολέα των καναλιών Kir, BaCl₂ (2mM) με στόχο τη διερεύνηση τυχόν μεταβολών στις ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες αυτών των καναλιών λόγω της αιθανόλης. Η προσθήκη του BaCl₂ αύξησε τη συχνότητα των IEDs στις N και N τομές από νεαρά και ενήλικα πειραματόζωα. Όσον αφορά στις FAS τομές, το BaCl₂ αύξησε τη συχνότητα των IEDs μόνο στις FAS τομές νεαρών πειραματόζωων ενώ δεν είχε δράση στις FAS τομές ενήλικων πειραματόζωων (fig. 21, A).

Η προσθήκη BaCl₂ επηρέασε επίσης και τη διάρκεια των IEDs. Συγκεκριμένα, προκάλεσε αύξηση των διαρκειών σε όλες τις ομάδες τομών. Η % αύξηση ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στις FAS τομές, ένα αποτέλεσμα που διατηρήθηκε με την πάροδο της ηλικίας (fig. 21, B).

Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω, συμπεραίνουμε ότι το BaCl₂ είχε παρόμοια δράση στις συχνότητες των IEDs (αύξηση) στις τομές N και FAS νεαρών πειραματόζωων, ενώ επηρέασε περισσότερο τη διάρκεια των IEDs, των FAS τομών. Στην στην ενήλικη ζωή το BaCl₂ αύξησε τη συχνότητα των IEDs μόνο στις N τομές, ενώ δεν επηρέασε τις FAS. Όσον αφορά στη διάρκεια, προκάλεσε αύξηση στις FAS και όχι στις N τομές ενήλικων πειραματόζωων.

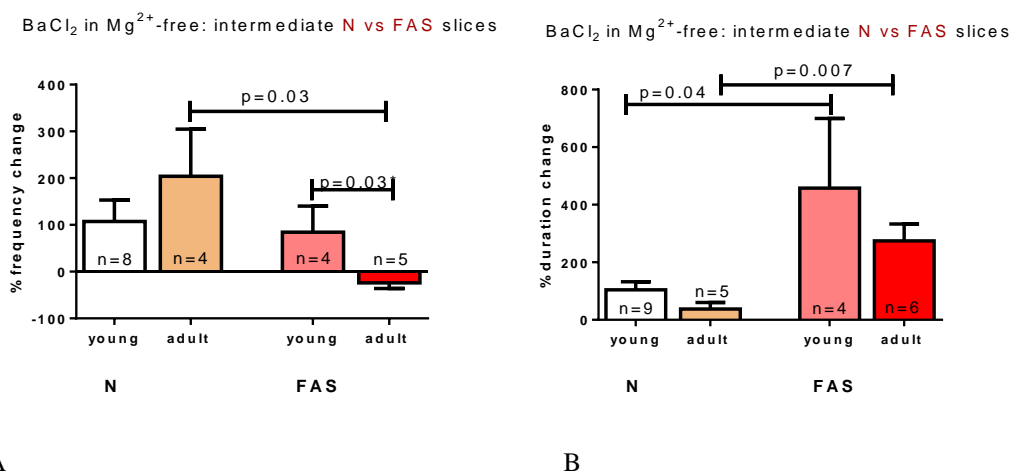


Fig. 21: A) graph of percentage frequency change because of BaCl₂ action at N and FAS slices B) graph of percentage duration change because of BaCl₂ action at N and FAS slices

Μελέτη 3

Η προγεννητική έκθεση σε αιθανόλη επηρέασε τα gap junctions στο μεσαίο τρίτο του ιπποκάμπου

Προσθήκη Cbx (300μM) σε τENY Mg²⁺-free

Η προσθήκη του gap junction blocker, carbenoxolone (300μM), μείωσε τη συχνότητα των IEDs σε όλες τις τομές όλων των ηλικιών (fig. 22, A), ενώ δεν είχε δράση στη διάρκεια (fig. 22, B). Η % μείωση της συχνότητας ήταν μεγαλύτερη στις FAS συγκριτικά με τις N (p=0.01) τομές νεαρών πειραματοζώων (fig. 22, A). Σε τομές από ενήλικα πειραματοζώα η carbenoxolone προκάλεσε παρόμοια μείωση των συχνοτήτων και αύξηση των διαρκειών των IEDs σε N και FAS.

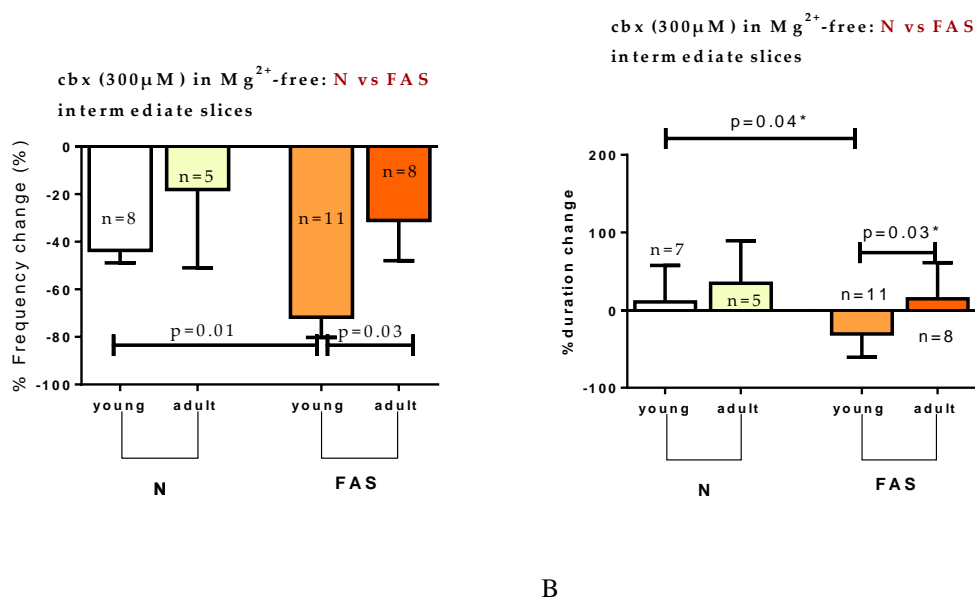


Fig. 22: A) graph of percentage frequency change because of cbx action at N and FAS slices B) graph of percentage duration change of cbx action at N and FAS slices

Μελέτη 4

Αυθόρμητες μεσοκρισικές εκφορτίσεις (interictal-like, IEDs) σε τΕΝΥ με 4-ΑΡ (50μΜ) σε κροταφικές (temporal) και διαφραγματικές (septal) τομές νεαρών και ενήλικων πειραματοζώων

Διαβροχή των τομών (διαφραγματικών και κροταφικών) με 4-Aminopyridine (4-AP, 50 μΜ) aCSF προκάλεσε την εμφάνιση αυθόρμητων IEDs σε όλες τις τομές.

Normal τομές

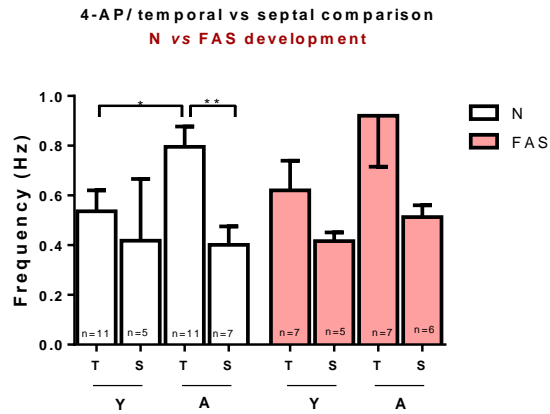
Οι τιμές συχνότητας των IEDs ήταν παρόμοιες σε κροταφικές και διαφραγματικές τομές νεαρών φυσιολογικών πειραματοζώων (fig. 23, A). Οι τιμές συχνότητας από κροταφικές τομές ενήλικων πειραματοζώων ήταν μεγαλύτερες από τις κροταφικές τομές νεαρών πειραματοζώων ($p=0.03$), υποδεικνύοντας ότι η ηλικία είναι ένας παράγοντας που πρέπει να ληφθεί υπόψη για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Αντίθετα, οι τιμές συχνότητας από διαφραγματικές τομές παρέμειναν σε παρόμοια επίπεδα με την πάροδο της ηλικίας.

Όσον αφορά στη διάρκεια των IEDs, οι κροταφικές τομές νεαρών πειραματοζώων παρουσίασαν χαμηλότερες τιμές συγκριτικά με τις διαφραγματικές ($p=0.03$). Ωστόσο, λόγω μεγάλου standard error το αποτέλεσμα δεν θα ληφθεί υπόψη. Με την πάροδο της ηλικίας δεν διέφεραν οι τιμές στη διάρκεια των IEDs μεταξύ κροταφικών και διαφραγματικών τομών.

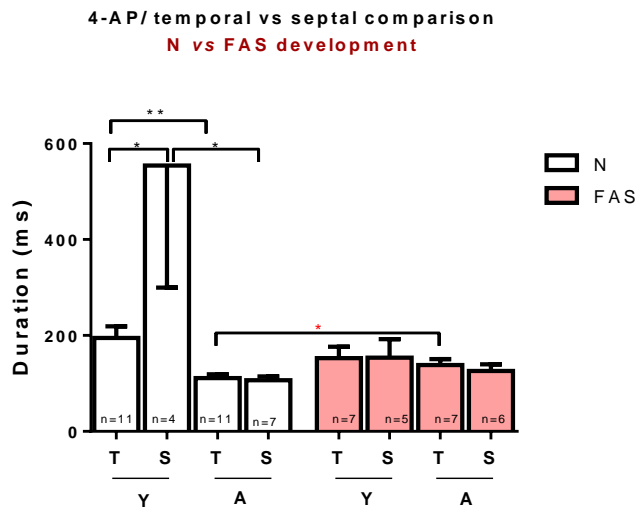
FAS τομές

Οι τιμές συχνότητας των IEDs ήταν υψηλότερες στις κροταφικές συγκριτικά με τις διαφραγματικές FAS τομές νεαρών πειραματοζώων, χωρίς όμως η διάφορα τους να είναι στατιστικά σημαντική. Με την πάροδο της ηλικίας, οι κροταφικές τομές παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερες τιμές συχνότητας σε σχέση με τις τιμές των διαφραγματικών τομών ($p=0.04$) (fig. 23, A).

Στο fig. 24, A φαίνεται ότι με την ενηλικίωση οι κροταφικές FAS τομές παρουσίασαν υψηλότερες τιμές συχνότητας συγκριτικά με τις τιμές που παρουσίασαν οι κροταφικές τομές νεαρών πειραματοζώων (παρόμοια αποτελέσματα με το μοτίβο που παρουσίασαν οι N τομές). Οι διαφραγματικές τομές παρουσίασαν παρόμοιες τιμές σε νεαρά και ενήλικα πειραματοζώα (fig. 24, B).

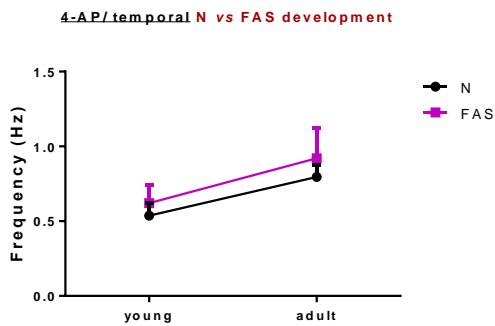


A

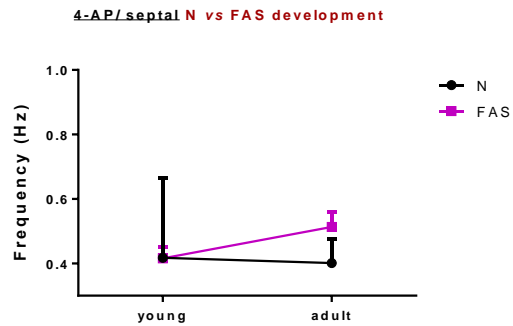


B

Fig 23 (A, B): A) Comparison of IED frequency values in 4-AP fluid between N and FAS temporal and septal slices from young and adult rats. B) Comparison of IED duration values in 4-AP fluid between N and FAS temporal and septal slices from young and adult rats.



A



B

Fig 24 (A, B): A) Comparison of the slopes of frequency evolution with age between N and FAS temporal slices. B) Comparison of the slopes of frequency evolution with age between N and FAS septal slices

Η προσθήκη του ανταγωνιστή των υποδοχέων GABA_A, BMI (20μM) σε τENY 4-AP

N τομές

Η προσθήκη BMI μείωσε την συχνότητα των IEDs σε όλες τις κροταφικές τομές των N πειραματοζώων (νεαρά και ενήλικα). Όσον αφορά στις διαφραγματικές τομές δεν επηρέασε τη συχνότητα των IEDs από τομές νεαρών και ενήλικων πειραματοζώων. Το BMI προκάλεσε αύξηση των διαρκειών των IEDs (χωρίς η αύξηση να είναι στατιστικά σημαντική) σε όλες τις κροταφικές και διαφραγματικές τομές.

FAS τομές

Η προσθήκη BMI μείωσε συχνότητα των IEDs σε όλες τις κροταφικές τομές FAS πειραματοζώων (νεαρά και ενήλικα). Το BMI δεν επηρέασε τη συχνότητα στις διαφραγματικές τομές νεαρών πειραματοζώων, ενώ την μείωσε σε διαφραγματικές τομές ενήλικων πειραματοζώων ($p=0.04$) (table 16, fig. 25 A). Η προσθήκη BMI προκάλεσε αύξηση των διαρκειών των IEDs στις κροταφικές ($p=0.02$) και διαφραγματικές τομές ($p=ns$) νεαρών πειραματοζώων ενώ δεν επηρέασε σημαντικά τη διάρκεια των IEDs από ενήλικα πειραματοζώα (table 16, fig. 25, B).

Table 16: Frequency and duration values before and after the addition of BMI (4-AP aCSF) at temporal and septal slices

BMI effect in 4-AP			
Frequency (Hz)			
Normal	4-AP	BMI	Paired t-test
Temporal/young	0.53±0.075	0.4±0.075 (n=11)	P=0.046 (1-t)
Temporal/adult	0.8±0.14	0.8±0.14 (n=11)	P=0.93
Septal/young	0.4±0.04	0.36±0.042 (n=5)	P=0.3
Septal/adult	0.4±0.03	0.5±0.03 (n=7)	P=0.2
FAS			
Temporal/young	0.6±0.09	0.5±0.09 (n=7)	P=0.2
Temporal/adult	0.9±0.09	0.68±0.09 (n=7)	P=0.03

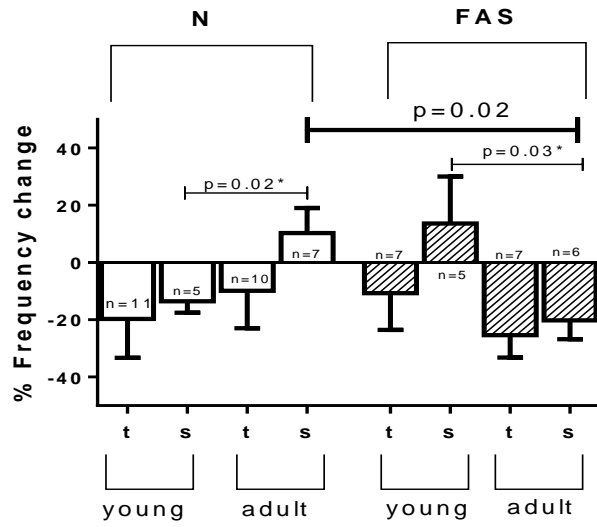
Septal/young	0.41±0.07	0.47±0.07 (n=5)	P=0.44
Septal/adult	0.5±0.03	0.42±0.03 (n=6)	P=0.04

BMI effect in 4-AP

duration (ms)

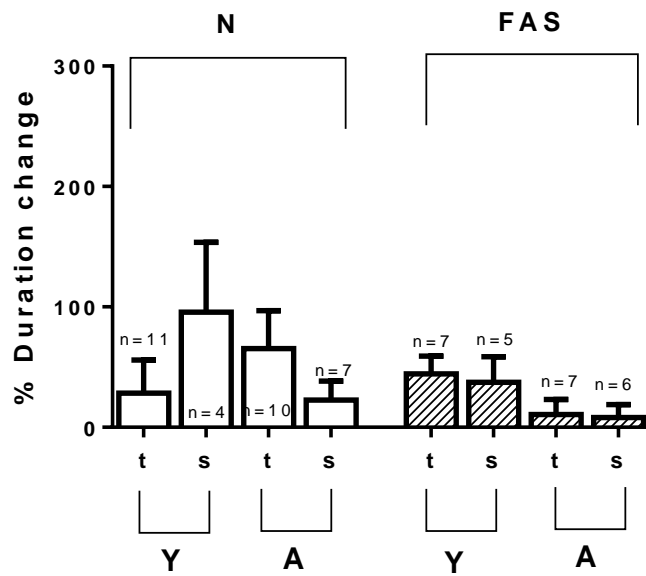
Normal	4-AP	BMI	Paired t-test
Temporal/young	195.0±23.88	230.8±50.29, n=11	P=ns
Temporal/adult	110.0±8.83	181.7± 41.50, n=10	P=ns
Septal/young	554.0 ± 254.3	874.8 ± 312.4, n=4	P=ns
Septal/adult	106.7 ± 7.6	126.0 ± 12.27, n=7	P=ns
FAS			
Temporal/young	152.9 ± 23.73	216.6 ± 34.61, n=7	P=0.02
Temporal/adult	138.3 ± 12.50	148.7 ± 15.02, n=7	P=ns
Septal/young	153.6 ± 38.55	211.4 ± 54.98, n=5	P=ns
Septal/adult	126.2 ± 13.74	130.8 ± 8.24, n=6	P=ns

**BMI effect in 4-AP/ comparison temporal vs. septal
in N and FAS development**



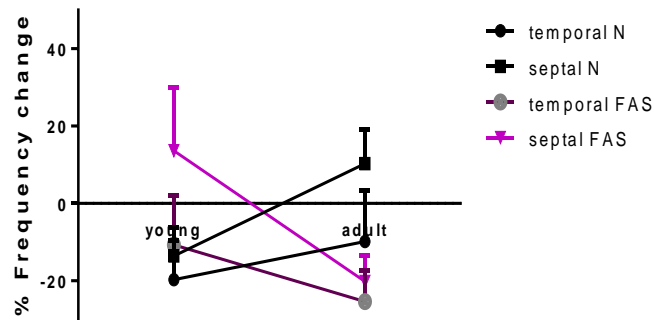
A

**BMI effect in 4-AP/ comparison temporal vs. septal
in N and FAS development**



B

**BMI effect in 4-AP/ comparison temporal vs. septal
in N and FAS development**



C

Fig 25 (A, B, C): A) Percentage frequency change after the addition of BMI B) Percentage duration change after the addition of BMI C) Comparison of the slopes of frequency changes (%) due to BMI addition in young and adult N and FAS slice groups.

Προσθήκη CCh (1 μ M) παρουσία BMI σε τENY 4-AP

N τομές

Η CCh προκάλεσε αύξηση της συχνότητας των IEDs στις κροταφικές τομές νεαρών πειραματοζώων ($164.3 \pm 78.29\%$, $n=11$) ενώ δεν είχε αποτέλεσμα στις διαφραγματικές τομές ($-13.58 \pm 3.97\%$, $n=5$) (fig. 26, A). Με την ενηλικίωση, η CCh επηρέασε λιγότερο (προκαλώντας μικρή αύξηση) τις τιμές συχνότητας των IEDs όλων των τομών (κροταφικές: $54.92 \pm 14.41\%$, $n=11$ και διαφραγματικές: $32.00 \pm 33.12\%$, $n=7$).

FAS τομές

Η προσθήκη CCh δεν επηρέασε τις κροταφικές ($-17.13 \pm 14.77\%$, $n=7$) και διαφραγματικές τομές ($-16.24 \pm 20.01\%$, $n=5$).FAS νεαρών πειραματοζώων (fig. 26 B). Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι στην ενήλικη ζωή οι temporal FAS τομές φαίνεται να είναι πιο επιρρεπείς στον χολινεργικό αγωνιστή ($70.55 \pm 37.19\%$, $n=6$). Ειδικότερα, η CCh αύξησε σημαντικά την συχνότητα των IEDs στις κροταφικές τομές ενήλικων πειραματοζώων συγκριτικά με τις κροταφικές τομές νεαρών FAS πειραματοζώων ($p=0.04$) (fig 26, B).

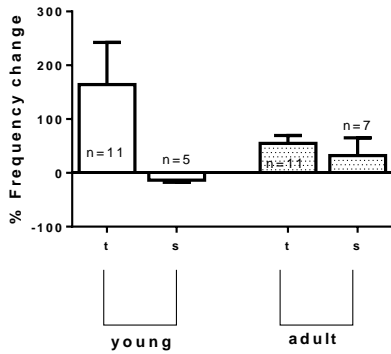
Στο Fig. 27 φαίνεται ότι οι N και FAS **κροταφικές τομές**, παρουσιάζουν ένα διαφορετικό μοτίβο με την πάροδο της ηλικίας. Πιο συγκεκριμένα, όπως περιγράφηκε παραπάνω, ενώ η CCh αύξησε τη συχνότητα των IEDs των N_{young} τομών, τη μείωσε στις FAS_{young}. Στη συνέχεια, στην ενήλικη ζωή, οι FAS κροταφικές τομές φαίνεται να εξισορροπούν/εξαλείφουν αυτή τη διαφορά (fig. 27).

Όσον αφορά στις διαφραγματικές τομές, φαίνεται να μην υπάρχει σημαντική διαφορά στις συχνότητες των IEDs με την αύξηση της ηλικίας και παρουσίασαν παρόμοια εικόνα σε N και FAS (Fig. 28).

N

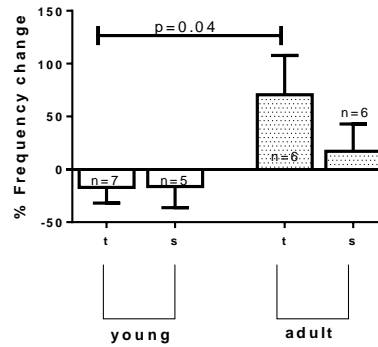
FAS

CCh effect in the presence of BMI (4-AP)/comparison temporal vs septal **Normal development**



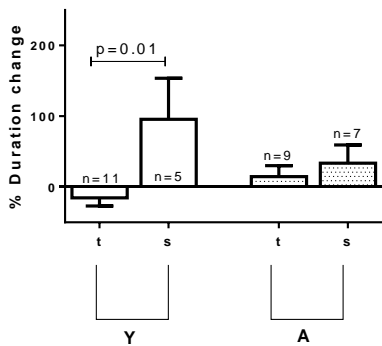
A

CCh effect in the presence of BMI (4-AP)/comparison temporal vs septal **FAS development**



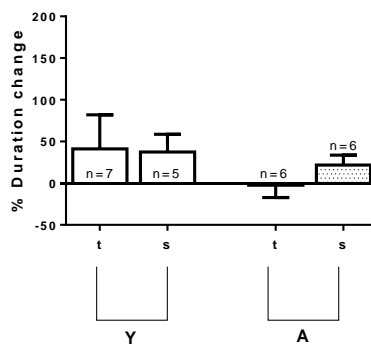
B

CCh effect in the presence of BMI (4-AP)/comparison temporal vs septal **Normal development**



C

CCh effect in the presence of BMI (4-AP)/comparison temporal vs septal **FAS development**



D

Fig 26 (A, B): A) Percentage frequency change due to the addition of CCh in N slices B) Percentage frequency change due to the addition of CCh in FAS slices

Temporal-development (comparison N vs FAS):

CCh in the presence of BMI (4-AP fluid) temporal **N vs FAS**

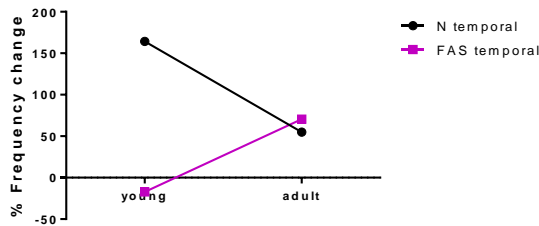


Fig 27: Comparison of the slopes of frequency changes (%) due to CCh addition in young and adult N and FAS temporal slices

Septal-development (comparison N vs FAS):

CCh in the presence of BMI (4-AP fluid) septal **N vs FAS**

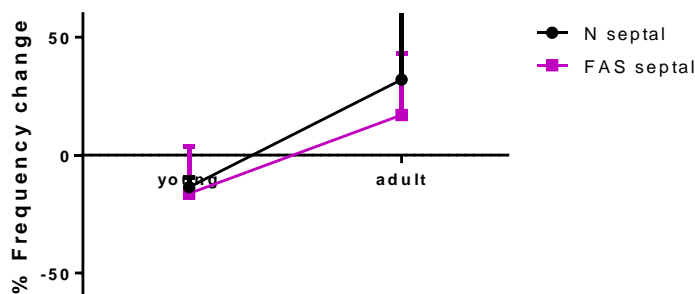
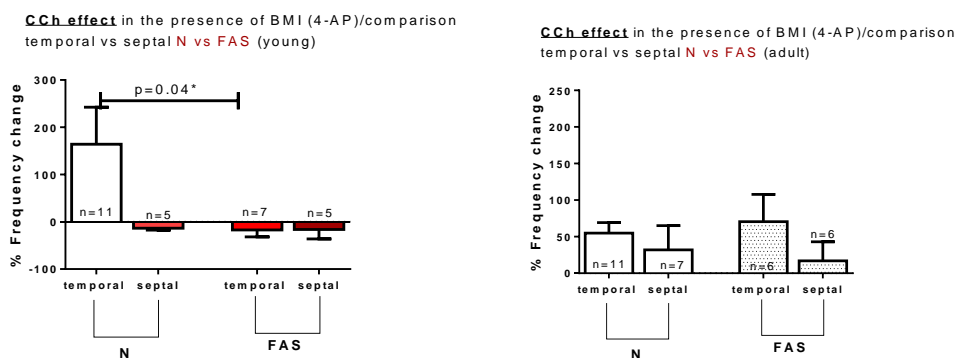


Fig 28: Comparison of the slopes of frequency changes (%) due to CCh addition in young and adult N and FAS septal slices



A

B

Fig. 29 (A, B): A) Comparison of percentage frequency change due to the addition of CCh between N and FAS temporal and septal young slices. B) Comparison of percentage frequency change due to the addition of CCh between N and FAS temporal and septal adult slices.

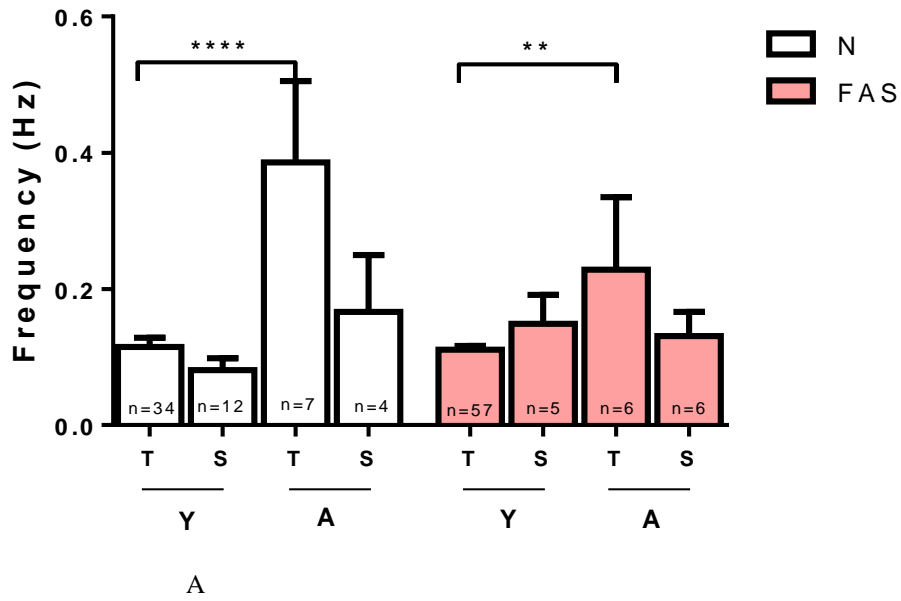
Αυθόρμητες εκφορτίσεις μεσοκρισικού τύπου (IEDs) σε τENY Mg²⁺-free - (διαμόρφωση της συχνότητας τους από BMI και CCh)

Τα παραπάνω αποτελέσματα έδειξαν ότι οι διαφορές στις τιμές συχνοτήτων μεταξύ N και FAS εντοπίζονται κυρίως στις κροταφικές τομές. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι η χολινεργική διαβίβαση είναι στενά συνδεδεμένη με τη γλουταματεργική, πραγματοποιήσαμε το παραπάνω πείραμα σε τENY Mg²⁺-free.

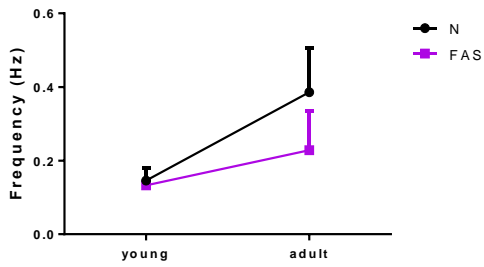
Η επώαση με Mg²⁺-free προκάλεσε την εμφάνιση αυθόρμητων IEDs σε όλες τις ομάδες τομών. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι, οι τομές από νεαρά πειραματόζωα εμφάνισαν χαμηλότερες τιμές συχνοτήτων συγκριτικά με τομές από ενήλικα πειραματόζωα σε όλες τις ομάδες τομών (N και FAS) (fig. 30, A). Η σύγκριση των τιμών συχνοτήτων από N και FAS δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ κροταφικών και διαφραγματικών τομών.

Το Fig (30, B) δείχνει πως αλλάζουν οι τιμές συχνοτήτων των κροταφικών τομών με την ανάπτυξη. Συγκεκριμένα, η κλίση της ευθείας που δημιουργείται από τις τελικές τιμές συχνοτήτων με την ανάπτυξη φαίνεται να είναι μικρότερη στις FAS τομές (p=ns).

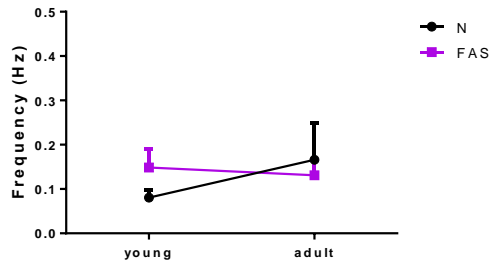
Mg²⁺ free/ temporal vs septal comparison
N vs FAS development



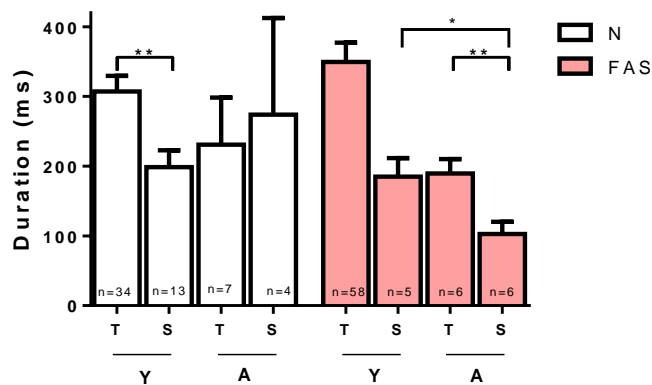
Mg²⁺ free/ temporal N vs FAS development



Mg²⁺ free/ septal N vs FAS development



Mg²⁺ free/ temporal vs septal comparison
N vs FAS development



D

E

Fig. 30 (A, B, C, D, E): A) Comparison of IED frequency values in Mg²⁺-free ACSF between N and FAS temporal and septal slices B) Comparison of the slopes of frequency evolution with age between

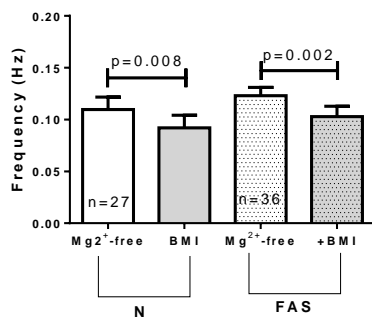
N and FAS temporal slices. C) Comparison of the slopes of frequency evolution with age between N and FAS septal slices. D) Comparison of IED duration values in Mg^{2+} -free ACSF between temporal and septal N slices. E) Comparison of IED duration values in Mg^{2+} -free ACSF between temporal and septal FAS slices

Στη συνέχεια προσθέσαμε BMI στις κροταφικές τομές με σκοπό την διευκρίνιση του βαθμού συμμετοχής της $GABA_A$ -εργικής νευροδιαβίβασης στην αυθόρμητη δραστηριότητα.

Προσθήκη BMI (σε $\tau ENY Mg^{2+}$ -free):

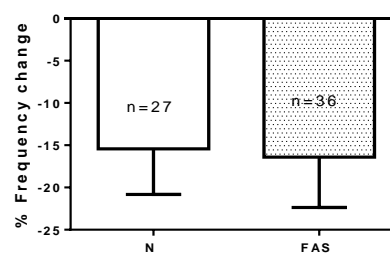
Το BMI μείωσε τη συχνότητα των IEDs σε όλες τις τομές (N και FAS) νεαρών πειραματοζώων και το ποσοστό μείωσης (%) ήταν παρόμοιο (fig. 31, B)(N: $-15.42 \pm 5.40\%$, $n=27$ vs. FAS: $-16.40 \pm 5.97\%$, $n=36$ _ns). Η προσθήκη BMI προκάλεσε αύξηση των διαρκειών των IEDs σε N ($p=0.01$) και FAS τομές και η αύξηση ήταν παρόμοια (fig. 31, C, D).

BMI effect in Mg^{2+} -free: temporal slices Normal vs FAS (young)



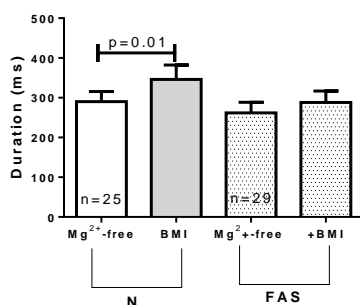
A

BMI effect in Mg^{2+} -free: temporal slices Normal vs FAS (young)



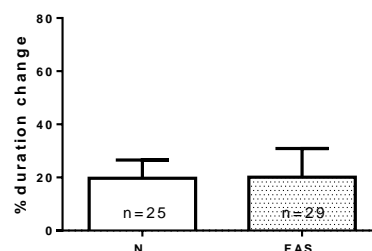
B

BMI effect in Mg^{2+} -free: temporal slices Normal vs FAS (young)



C

BMI effect in Mg^{2+} -free: temporal slices Normal vs FAS (young)



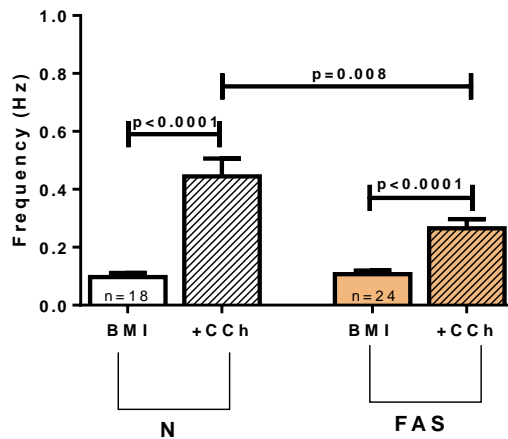
D

Fig. 31 (A, B): A) Comparison of IED frequency values before and after BMI addition in Mg^{2+} -free ACSF. B) Comparison of percentage frequency change due to BMI addition between N and FAS temporal slices. C) Comparison of IED duration values before and after BMI addition in Mg^{2+} -free ACSF. D) Comparison of percentage duration change due to BMI addition between N and FAS temporal slices

Προσθήκη CCh (1 μ M) (παρουσία BMI):

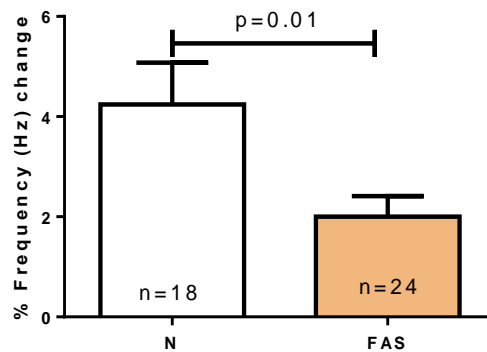
Η CCh αύξησε τη συχνότητα των IEDs σε όλες τις N ($p < 0.0001$) και FAS ($p < 0.0001$) τομές. Επίσης, οι τελικές τιμές συχνότητας ήταν υψηλότερες στις N τομές συγκριτικά με τις FAS ($p = 0.008$) (fig. 32, A). Στο fig. 32, B παρουσιάζεται η % αλλαγή της συχνότητας αποδεικνύοντας ότι η αύξηση ήταν μεγαλύτερη στις N τομές ($p = 0.01$). Η CCh προκάλεσε μείωση των διαρκειών των IEDs σε N ($p = 0.02$) και FAS τομές ($p = 0.0006$) και η μείωση ήταν παρόμοια (fig. 32 C, D).

Carbahol effect at the presence of BMI (Mg^{2+} -free)
N vs FAS temporal (young)



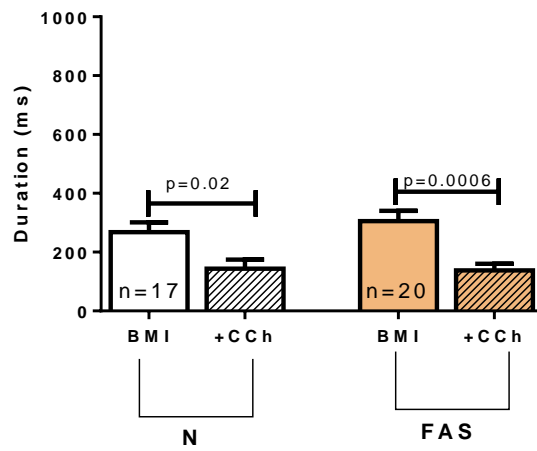
A

Carbahol effect at the presence of BMI (Mg^{2+} -free)
N vs FAS temporal (young)



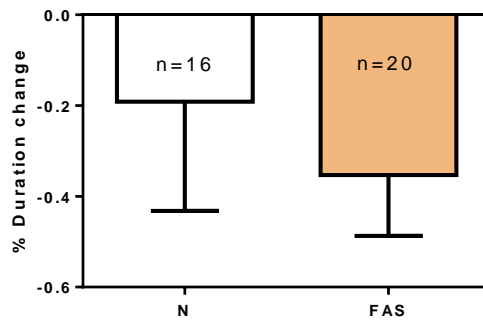
B

Carbahol effect at the presence of BMI (Mg^{2+} -free)
 N vs FAS temporal (young)



C

Carbahol effect at the presence of BMI (Mg^{2+} -free)
 N vs FAS temporal (young)



D

Fig 32 (A,B): A) Comparison of IED frequency values due to CCh addition. B) Comparison of the percentage frequency change due to CCh addition between N and FAS. C) Comparison of IED duration values due to CCh addition between N and FAS. D) Comparison of the percentage duration change due to CCh addition between N and FAS.

Κροταφο-διαφραγματική διεγερσιμότητα έπειτα από αύξηση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης K^+ (7mM) σε τENY Mg^{2+} -free σε N και FAS temporal και septal τομές νεαρών και ενήλικων πειραματοζώων

Normal τομές

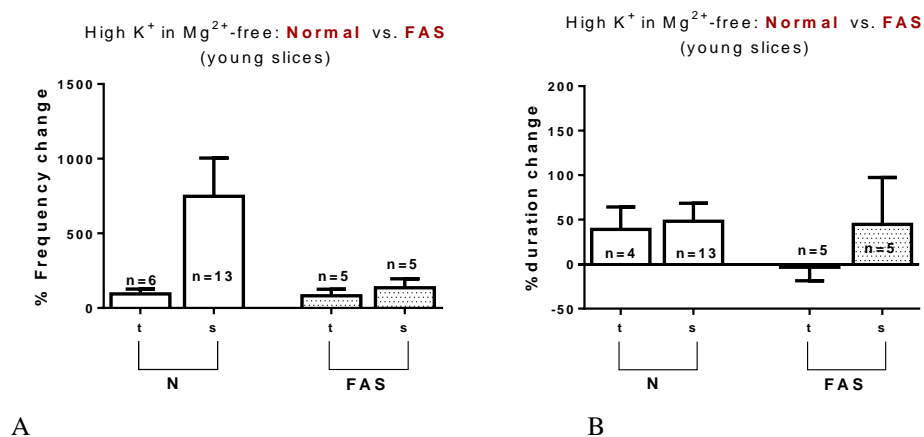
Η αύξηση της συγκέντρωσης καλίου (7mM) στο τENY Mg^{2+} -free προκάλεσε αύξηση των συχνοτήτων και των διαρκειών των IEDs σε όλες τις N τομές νεαρών πειραματοζώων. Η αύξηση στη συχνότητα των IEDs ήταν μεγαλύτερη στις διαφραγματικές τομές συγκριτικά με τις κροταφικές, παρόλο που η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική (fig. 33, A) ενώ η αύξηση στη διάρκεια ήταν παρόμοια. Με την πάροδο της ηλικίας, η αύξηση της συγκέντρωσης K^+ αύξησε τη συχνότητα (λιγότερο απ' ότι στη νεαρή ηλικία) και διάρκεια των IEDs παρόμοια σε όλες τις τομές (fig. 33, C).

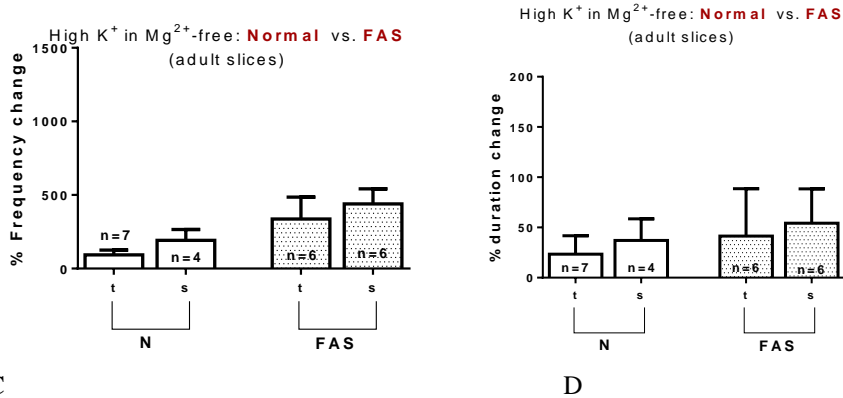
FAS τομές

Η αύξηση της συγκέντρωσης καλίου (7mM) στο τENY Mg^{2+} -free προκάλεσε αύξηση των συχνοτήτων των IEDs σε όλες τις FAS τομές νεαρών πειραματοζώων (fig. 33, A) ενώ δεν επηρέασε σημαντικά τη διάρκεια των IEDs (fig. 33, B).

Με την πάροδο της ηλικίας η υψηλή συγκέντρωση k^+ προκάλεσε αύξηση των συχνοτήτων των IEDs σε όλες τις τομές (κροταφικές και διαφραγματικές). Όσον αφορά στις διαφραγματικές τομές ενήλικων πειραματοζώων, η αύξηση ήταν μεγαλύτερη συγκριτικά με τις αντίστοιχες τομές νεαρών πειραματοζώων (fig. 33, C). Η υψηλή συγκέντρωση k^+ προκάλεσε αύξηση της διάρκειας των IEDs σε κροταφικές και διαφραγματικές τομές ενήλικων πειραματοζώων και η αύξηση ήταν παρόμοια (fig.33, D).

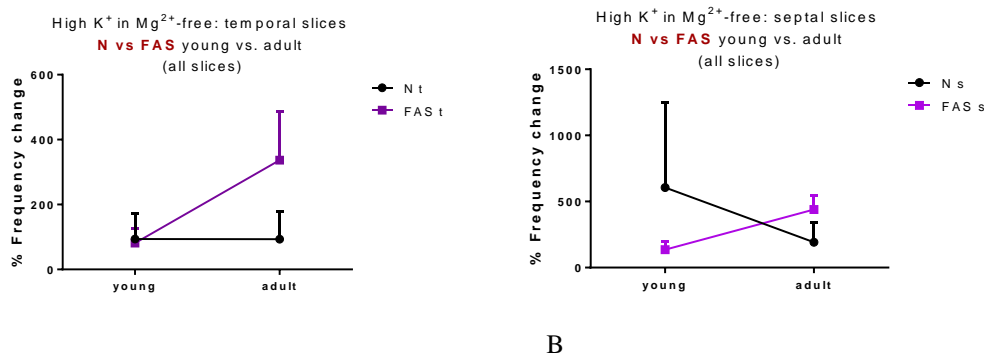
Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω, μπορούμε να πούμε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης K^+ προκάλεσε παρόμοια αποτελέσματα στα άκρα του ιπποκάμπου (temporal, septal) των N και FAS τομών.





C
D
Fig 33 (A,B): A) Comparison of the percentage frequency change due to potassium increase in temporal and septal slices of young rats. B) Comparison of the percentage duration change due to potassium increase in temporal and septal slices of young rats. C) Comparison of the percentage frequency change due to potassium increase in temporal and septal slices of adult rats. D) Comparison of the percentage duration change due to potassium increase in temporal and septal slices of adult rats.

Στο Fig 34 παρουσιάζεται η % αύξηση της συχνότητας που προκλήθηκε από την αύξηση της συγκέντρωσης του εξωκυττάριου K^+ . Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η αύξηση ήταν μεγαλύτερη στις κροταφικές τομές ενήλικων FAS. Όσον αφορά στις N τομές, η αύξηση ήταν παρόμοια στις κροταφικές τομές ενήλικων πειραματοζώων συγκριτικά με τις τομές νεαρών αρουραίων. Συμπερασματικά, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η προγεννητική έκθεση σε αιθανόλη επηρέασε αγωγιμότητες καλίου σε τομές κροταφικές, περισσότερο στα ενήλικα πειραματόζωα (fig 34, A). Όσον αφορά στις διαφραγματικές τομές, λόγω μεγάλου standard error δεν μπορούμε να βγάλουμε συμπέρασμα για τις τομές από νεαρά πειραματόζωα. Με την πάροδο της ηλικίας φαίνεται η αύξηση να ήταν μεγαλύτερη στις FAS τομές, χωρίς όμως η διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική (fig. 34, B).



A B
Fig. 34 (A, B): Comparison of the slopes of high potassium's action in frequency evolution with age for A) temporal and B) septal slices.

Μελέτη 5

Μελέτη ηλεκτροφυσιολογικών ιδιοτήτων του μεσαίου τρίτου του ιπποκάμπου σε σχέση με το κροταφικό και το διαφραγματικό άκρο

Αυθόρμητες εκφορτίσεις μεσοκρυσικού τύπου (IEDs) σε τENY Mg²⁺-free σε τομές temporal, intermediate και septal N και FAS

Η διαβροχή με τENY Mg²⁺-free προκάλεσε την εμφάνιση αυθόρμητων εκφορτίσεων μεσοκρυσικού τύπου σε όλες τις ομάδες τομών.

N τομές

Οι μέσες τιμές συχνοτήτων των IEDs στις N τομές ήταν σημαντικά υψηλότερες στις τομές μεσαίου τρίτου (p=0.03) συγκριτικά με τα άκρα του ιπποκάμπου. Οι κροταφικές και διαφραγματικές τομές δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά (table 17).

Με την πάροδο της ηλικίας, οι τιμές συχνοτήτων στις κροταφικές τομές (p<0.0001) και στις τομές μεσαίου τρίτου (p=0.0039) ήταν υψηλότερες συγκριτικά με τις τομές αντίστοιχης ανατομικής προέλευσης νεαρών πειραματοζώων (table 17). Στο Fig. 35, A φαίνεται ότι στην ενήλικη ζωή οι κροταφικές τομές εμφάνισαν υψηλότερες συχνότητες, οι τομές μεσαίου τρίτου ελαφρώς χαμηλότερες και χαμηλότερες οι διαφραγματικές δημιουργώντας ένα σχεδόν γραμμικό καθοδικό μοτίβο.

FAS τομές

Οι μέσες τιμές συχνοτήτων των IEDs στις τομές μεσαίου τρίτου νεαρών πειραματοζώων κυμαίνονται μεταξύ των τιμών που έδωσαν οι κροταφικές και οι διαφραγματικές (table 17, fig. 35, B).

Με την πάροδο της ηλικίας, οι κροταφικές (p=0.001) και οι τομές μεσαίου τρίτου (p=0.01) εμφάνισαν σημαντικά μεγαλύτερες τιμές συχνοτήτων συγκριτικά με τις τιμές των νεαρών τομών αντίστοιχης ανατομικής προέλευσης, παρουσιάζοντας ένα παρόμοιο μοτίβο με αυτό των ενήλικων N τομών (figure 35. B).

Σύγκριση συχνοτήτων των IEDs μεταξύ N και FAS

Οι FAS τομές παρουσίασαν χαμηλότερες τιμές συχνοτήτων (συγκριτικά με τις N) στο μεσαίο τρίτο του ιπποκάμπου, σε αντίθεση με τα άκρα (temporal vs septal) στα οποία δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές, ένα φαινόμενο που παρατηρείται και στην ενήλικη ζωή.

Κροταφικές τομές N vs. FAS

Η σύγκριση των μέσων τιμών συχνοτήτων μεταξύ των κροταφικών N και FAS τομών δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές, ένα αποτέλεσμα που δεν αλλάζει με την πάροδο της ηλικίας (table 18).

Μεσαίου τρίτου τομές N vs. FAS

Από τις τομές μεσαίου τρίτου καταγράφηκαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές συχνοτήτων των IEDs στις FAS τομές νεαρών πειραματοζώων ($p=0.01$), ένα αποτέλεσμα που φαίνεται να ισχύει και στην ενήλικη ζωή ($p=0.03$, 1tl) (table 18) (fig 36, A).

Διαφραγματικές τομές N vs. FAS

Οι τιμές συχνοτήτων των IEDs δεν διέφεραν στις διαφραγματικές τομές μεταξύ N και FAS, ένα αποτέλεσμα που δεν άλλαξε με την πάροδο της ηλικίας (table 18).

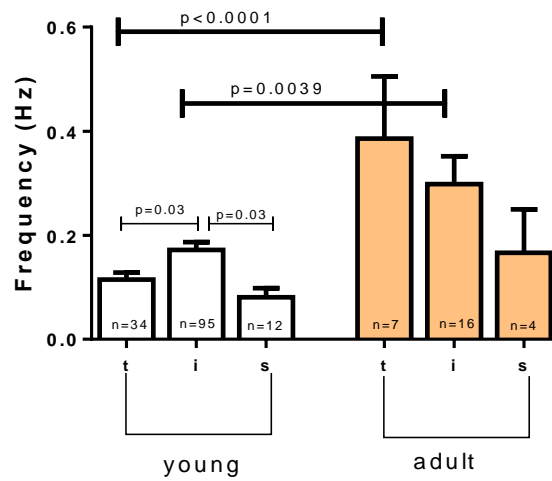
Table 17: Comparison of spontaneous IED frequency values after perfusion with Mg²⁺-free fluid in N (A) and FAS (B) (temporal, intermediate and septal) immature and adult slices

Mg ²⁺ -free	N				FAS			
	temporal	intermediate	septal	N statistics**	temporal	Intermediate	septal	FAS Statistics**
immature	(1) 0.11±0.01Hz, n=34	(2) 0.17±0.01Hz, n=95	(3) 0.08±0.02Hz, n=12	(1) vs(2) p=0.03	(1)0.11±0.005Hz, n=57	(2)0.13±0.008Hz, n=82	(3)0.15±0.04Hz, n=5	(1) vs (2)p=ns
adult	(4) 0.39±0.12Hz, n=7	(5) 0.3 ± 0.05Hz, n=16	(6)0.17± 0.08Hz, n=4	(2) vs (3) p=0.03	(4)0.23±0.10Hz, n=6	(5)0.2±0.04Hz, n=20	(6)0.17±0.08Hz, n=4	(2) vs (3)p=ns
				(1) vs (3) p=ns				(1)vs(3) p=0.04*
				(4) vs (5) p= ns				(4) vs (5) p=ns
				(5) vs (6) p=ns				(5) vs (6) p=ns
				(4) vs (6) p=ns				(4) vs (6) p=ns
Statistics*	(1)Vs(4) p<0.0001	(1)Vs(5) p=0.0039	(3) vs (6) p=ns		(1)vs(4) p=0.001	(2)vs(5) p=0.01	(3)vs(6) p=ns	
*comparison in the same column								
** comparison in the same row								

Table 18: Comparison of IED mean frequencies values between N and FAS slices taken from table 1

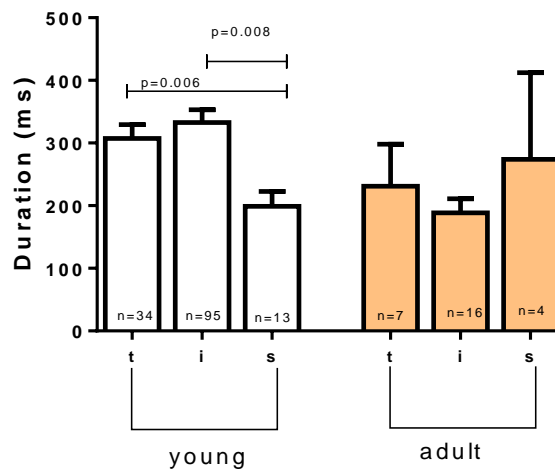
immature	N vs FAS	statistics
Temporal	(1) Vs (1)	P=ns
Intermediate	(2) Vs (2)	P=0.01
septal	(3) Vs (3)	P=ns
adult		
Temporal	(4)Vs (4)	P=ns
Intermediate	(5) vs (5)	P=0.03*
septal	(6)vs (6)	P=ns

Mg²⁺ free all slices: development **Normal**



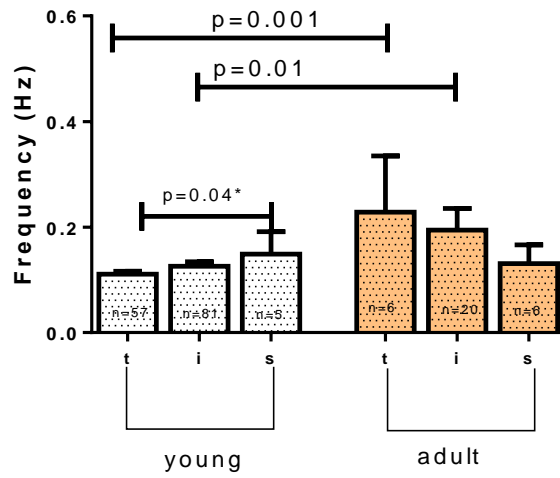
A

Mg²⁺ free all slices: development **Normal**



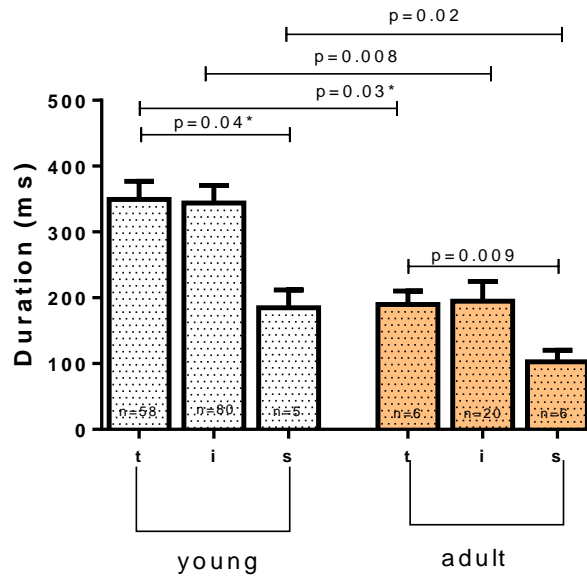
B

Mg²⁺ free all slices: development FAS



C

Mg²⁺ free all slices: development FAS



D

Figure 35 (A, B, C, D): **Comparison of spontaneous IED frequency and duration values after perfusion with Mg²⁺-free fluid in N (A) and FAS (B) temporal, intermediate and septal slices:** A) Graph of mean frequency values of N young and adult slices. B) Graph of duration values of N young and adult slices. C) Graph of mean frequency values of FAS young and adult slices. D) Graph of duration values of FAS young and adult slices. The number (n) of slices is shown at the base of each column. Each column represents slices of the same anatomical origin, derived from the same group of animals (N, FAS).

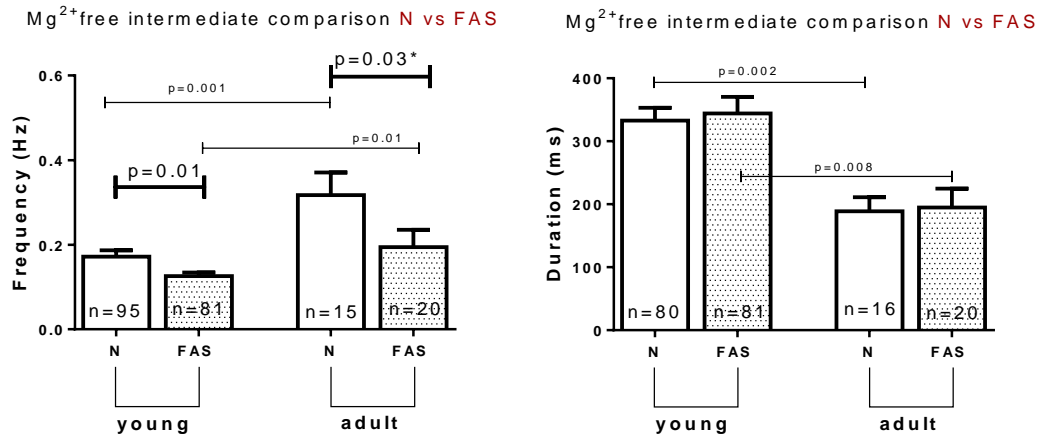
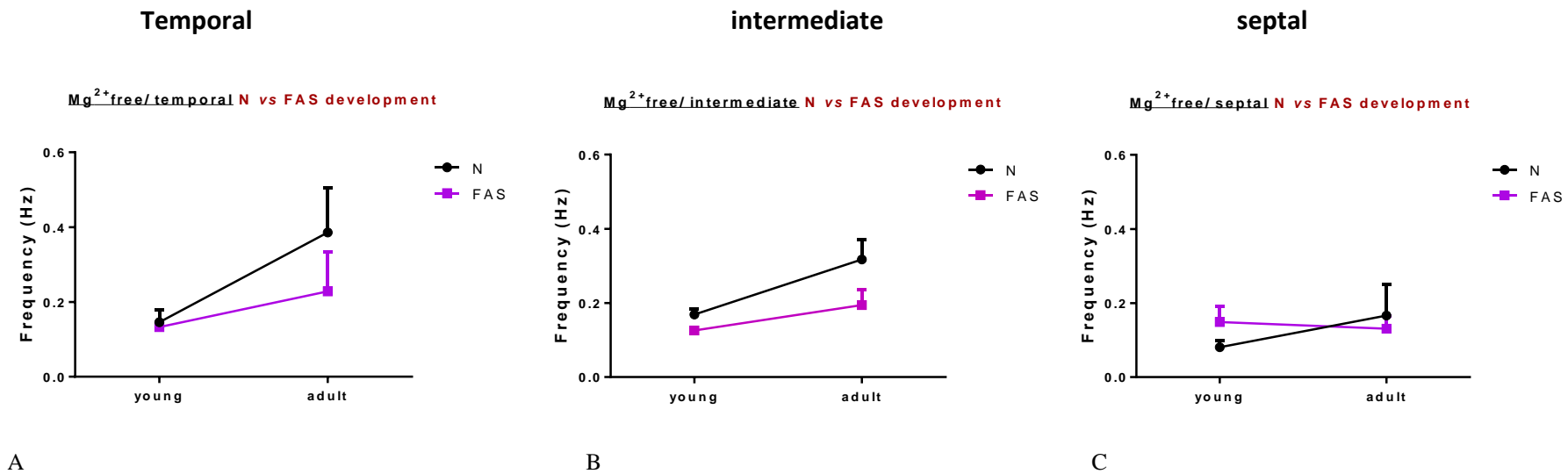


Figure 36 (A, B): A) IED frequency comparison between intermediate N and FAS young and adult slices. B) Comparison of duration values between intermediate N and FAS young and adult slices.

Στο Figs. 37 (A,B,C) παρουσιάζεται η εξέλιξη και μεταβολή των συχνοτήτων με την πάροδο της ηλικίας για κάθε μία ομάδα τομών ξεχωριστά. Οι κλίσεις των ευθειών που σχηματίζουν οι τιμές από τις τομές μεσαίου τρίτου και τις κροταφικές τομές, δείχνουν ότι κλίση των FAS τομών είναι μικρότερη συγκριτικά με των N (Fig. 37, A, B). Επίσης φαίνεται ότι οι τομές μεσαίου τρίτου παρουσίασαν παρόμοια εικόνα με τις κροταφικές και αυτό το αποτέλεσμα είναι σύμφωνο με τη βιβλιογραφία που αναφέρει ότι οι τομές μεσαίου τρίτου είναι λειτουργικά όμοιες με το κροταφικό άκρο (Kenney & Manahan-Vaughan, 2013).



Figures 37 (A,B,C): Comparison of the slopes of frequency evolution with age for temporal, intermediate and septal slices.

Αυθόρμητες εκφορτίσεις μεσοκρισικού τύπου (IEDs) σε τENY με 4-AP (50μM) σε τομές κροταφικές, διαφραγματικές και μεσαίου τρίτου τομές N και FAS

Το 4-AP προκάλεσε την εμφάνιση αυθόρμητων IEDs σε όλες τις ομάδες τομών.

N τομές

Οι τιμές συχνότητας των IEDs ήταν παρόμοιες κατά μήκος του ιπποκάμπου. Ειδικότερα, οι τομές μεσαίου τρίτου παρουσίασαν παρόμοιες τιμές συχνότητας με τα άκρα του ιπποκάμπου (fig. 38, A, table 19).

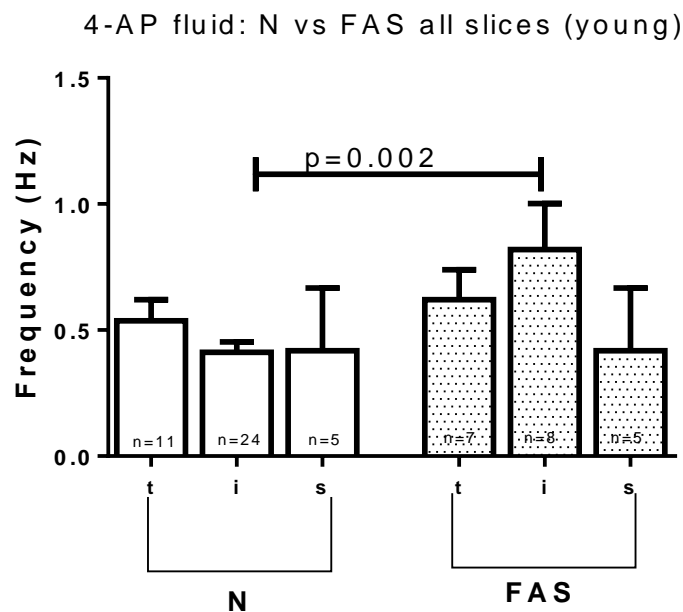
FAS τομές

Οι τιμές συχνότητας των IEDs στο μεσαίο τρίτο του ιπποκάμπου των FAS νεαρών τομών ήταν ελαφρώς μεγαλύτερες συγκριτικά με τις αντίστοιχες των άκρων (παρ' όλα αυτά η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική (fig. 38, A)).

Σύγκριση μεσοκρισικής συχνότητας μεταξύ N και FAS

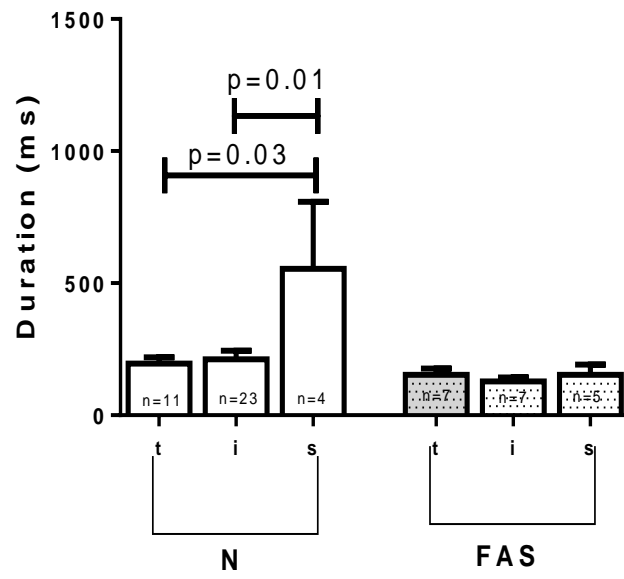
Η προγεννητική έκθεση σε αιθανόλη φαίνεται πως επηρέασε το μεσαίο μέρος του ιπποκάμπου περισσότερο απ' ότι τα άκρα σε τENY 4-AP (50μM).

Η σύγκριση συχνότητας των IEDs έδειξε ότι οι FAS τομές μεσαίου τρίτου παρουσίασαν δύο φορές υψηλότερες τιμές συγκριτικά με τις N ίδιας ανατομικής προέλευσης ($p=0.002$) (fig. 38, A).



A

4-AP fluid: N vs FAS all slices (young)



B

Figure 38 (A, B): A) Comparison of IED frequency values in 4-AP fluid in N and FAS slices. B) comparison of IED duration values in 4-AP fluid in N and FAS slices

Table 19: Comparison of spontaneous IED frequency values in 4-AP fluid in N (A) and FAS (B) (temporal, intermediate and septal) immature slices

4-AP	N				FAS			
	temporal	intermediate	septal	N statistics**	temporal	Intermediate	septal	FAS Statistics**
immature	(1)0.54±0.083, n=11	(2) 0.41± 0.041, n=24	(3) 0.42 ± 0.25, n=5	(1) vs(2) p=ns	(1)0.62 ±0.12, n=7	(2)0.41±0.041, n=24	(3)0.42±0.25, n=5	(1) vs (2) p=ns
				(2)vs (3) p=ns				(2)vs (3) p=ns
				(1)vs(3) p=ns				(1)vs(3) p=ns
N vs FAS	(1) Vs (1) p=ns	(2) Vs (2) p=0.002	(3) Vs (3) p=ns					
** comparison in the same row								

Συμπεράσματα

Διαφορές στη συχνότητα μεσοκρισικών εκφορτίσεων N και FAS τομών μεσαίου τρίτου

τENY Mg²⁺-free

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η διαβροχή των τομών με τENY Mg²⁺-free προκάλεσε την εμφάνιση επιληπτοειδών εκφορτίσεων μεσοκρισικού τύπου τόσο στις N όσο και στις FAS τομές όλων των ηλικιακών ομάδων, γεγονός που υποδεικνύει ότι η ενεργοποίηση των NMDA υποδοχέων ήταν ικανή για τον σχηματισμό τους.

Παρατηρήθηκε ότι οι τομές μεσαίου τρίτου N πειραματοζώων παρουσίασαν υψηλότερες τιμές συχνότητας συγκριτικά με τα άκρα του ιπποκάμπου. Αντίθετα, αυτή η διαφοροποίηση του μεσαίου τρίτου σε σχέση με τα άκρα, δεν παρατηρήθηκε σε τομές από FAS πειραματοζώα. Συνεπώς, φαίνεται ότι η αιθανόλη επηρέασε περισσότερο το μεσαίο τρίτο του ιπποκάμπου. Είναι λοιπόν πιθανό, η αιθανόλη να έχει μεταβάλλει πολλαπλούς παράγοντες όπως τον αριθμό, την σύνθεση υπομονάδων, τον τρόπο ελέγχου των καναλιών καθώς και την δυνατότητα συγχρονισμού μέσω αυτών. Ακόμη, μπορεί να έχει επηρεάσει την δενδριτική μορφολογία όπου βρίσκονται οι υποδοχείς NMDA.

Από τη σύγκριση συχνότητας μεταξύ N και FAS τομών προέκυψε ότι οι FAS τομές νεαρών πειραματοζώων παρουσίασαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές στο μεσαίο τρίτο του ιπποκάμπου. Συνεπώς, είναι πιθανό η έκθεση σε αιθανόλη προγεννητικά να προκάλεσε νευρωνικές βλάβες και πιθανές αλλαγές στην πυκνότητα και την συνδεσιμότητα των NMDA υποδοχέων. Ένας πιθανός μηχανισμός που να εξηγεί τις χαμηλότερες τιμές συχνότητας στις FAS τομές, είναι ότι πιθανόν η αιθανόλη να ενίσχυσε υπερπολωτικές αγωγιμότητες με αποτέλεσμα την αύξηση του μεσοδιαστήματος μεταξύ των εκφορτίσεων.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η έκθεση σε αιθανόλη προγεννητικά προκάλεσε χαμηλότερες τιμές αυθόρμητων επιληπτοειδών εκφορτίσεων στο μεσαίο τρίτο του ιπποκάμπου και όχι στα άκρα, ένα εύρημα που παρατηρήθηκε και σε καταγραφές από ώριμα πειραματοζώα. Υπάρχουν ενδείξεις ότι το μεσαίο τρίτο αποτελεί μια λειτουργικά διακριτή περιοχή του ιπποκάμπου η οποία παρουσιάζει διαφορές σε σχέση με τα άκρα (π.χ. στους μηχανισμούς LTP, στα ηλεκτροφυσιολογικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά της CA1 περιοχής κλπ) και είναι υπεύθυνο για την ομαλή επεξεργασία χωρικών πληροφοριών (Kenney & Manahan-Vaughan, 2013). Συνεπώς, το γεγονός ότι η αιθανόλη επηρέασε τον συγχρονισμό μέσω NMDA μόνο στο μεσαίο τρίτο του ιπποκάμπου, πιθανόν να εξηγεί κάποια από τα συμπεριφορικά και μαθησιακά ελλείμματα σε άτομα με FAS. Είναι ενδιαφέρον ότι οι μειωμένες συχνότητες επιληπτοειδών εκφορτίσεων σε FAS πειραματοζώα (σε σχέση με N) δεν παρατηρήθηκαν σε τομές διαφραγματικού και κροταφικού ιπποκάμπου. Αυτό προκαλεί την υποψία ότι ίσως αυτό το εύρημα να είναι δευτερογενές, δηλαδή να είναι η εκδήλωση (manifestation) κάποιας άλλης αρχικής αλλαγής, σχετικής ίσως με την

συνδεδεσμολογία του μεσαίου τρίτου (είσοδος, έξοδος, ανασταλτικοί νευρώνες, υποδοχείς νευροδιαβιβαστών κλπ).

τENY 4-AP

Η διαβροχή των τομών με 4-AP (50μM) προκάλεσε την εμφάνιση αυθόρμητων εκφορτίσεων IEDs σε όλες τις τομές νεαρών πειραματοζώων. Οι FAS τομές μεσαίου τρίτου ιπποκάμπου παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερες τιμές συχνότητας συγκριτικά με τις N τομές ίδιας ανατομικής προέλευσης. Αυτό οδηγεί στο έμμεσο συμπέρασμα ότι οι στόχοι της 4-AP, δηλαδή κατηγορίες καναλιών K^+ ήταν αυξημένα (και/ή είχαν διαφορετικές ιδιότητες) στις τομές αυτές. Η 4-AP μπλοκάρει ρεύματα K^+ και κυρίως ρεύματα I_A (Κν. κανάλια), επομένως η προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη προκάλεσε προσαρμοστική αύξηση των αγωγιμοτήτων καλίου. Έχει προταθεί η υπόθεση ότι η αιθανόλη μειώνει τα ρεύματα I_A (Lefebvre, et al., 2009) χωρίς ωστόσο να είναι γνωστό το πώς επηρεάζει η προγεννητική έκθεση σε αιθανόλη τον ιππόκαμπο. Επίσης λόγω της 4-AP προκαλείται αύξηση της απελευθέρωσης όλων των νευροδιαβιβαστών (Perreault & Avoli, 1991), μαζί και της ακετυλοχολίνης (Fredholm, 1990). Άρα η απελευθέρωση γλουταμικού μπορεί να αυξηθεί και από την ακετυλοχολίνη (De Sevilla & Buno, 2010). Συνεπώς καταλαβαίνουμε ότι οι υψηλότερες συχνότητες που καταγράφονται στο FAS πιθανόν να αντικατοπτρίζουν και το έμμεσο αποτέλεσμα της συνέργειας των NMDA και χολινεργικών (μουσκαρινικών) υποδοχέων σε αυτή την περιοχή.

Σύγκριση συχνότητας μεσοκρισικών εκφορτίσεων μεταξύ των 2 μοντέλων

Όπως είδαμε παραπάνω η διαβροχή με τENY Mg^{2+} -free προκάλεσε σημαντικά χαμηλότερες συχνότητες των IEDs στις FAS τομές μεσαίου τρίτου, ενώ με τENY 4-AP σημαντικά χαμηλότερες συχνότητες στις N. όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη παράγραφο, η 4-AP προκαλεί αύξηση της απελευθέρωσης όλων των νευροδιαβιβαστών (Perreault & Avoli, 1991), μαζί και της ακετυλοχολίνης (Fredholm, 1990). Άρα η απελευθέρωση γλουταμικού μπορεί να αυξηθεί και από την ακετυλοχολίνη (De Sevilla & Buno, 2010). Συνεπώς καταλαβαίνουμε ότι οι υψηλότερες συχνότητες που καταγράφονται στο FAS πιθανόν να αντικατοπτρίζουν και το έμμεσο αποτέλεσμα της συνέργειας των NMDA και χολινεργικών (μουσκαρινικών) υποδοχέων σε αυτή την περιοχή.

Η αιθανόλη δρα ως ανταγωνιστής NMDA-R, οπότε θα αναμενόταν ίσως η χρόνια και διαρκής έκθεση στην αιθανόλη κατά την ανάπτυξη ΚΝΣ να προκαλέσει αυξημένο αριθμό αυτών των υποδοχέων σε τομές FAS. Όμως το έρημα ήταν ακριβώς αντίθετο. Η μειωμένη συχνότητα στις FAS τομές σε τENY Mg^{2+} -free πιθανόν να υποδηλώνει απώλεια νευρώνων ή κάποια αλλαγή στο νευρωνικό κύκλωμα του ιππόκαμπου των FAS επίμυων. Η βιβλιογραφία αναφέρει πολλαπλές περιπτώσεις όπου υπάρχει καταστροφή πυραμιδικών νευρώνων ιππόκαμπου μετά από προγεννητική έκθεση στην αιθανόλη, ειδικά στην CA1 περιοχή από την οποία έχουν

γίνει όλες οι καταγραφές της παρούσας εργασίας (Barnes & Walker, 1981) (Diaz Perez, et al., 1991)

Χολινεργικές δράσεις

Για λόγους που προαναφέρθηκαν εστίασαμε στο μεσαίο τρίτο του ιπποκάμπου, όπου έγιναν τα παρακάτω φαρμακολογικά πειράματα.

Δράσεις εσερίνης

Η προσθήκη του αναστολέα του ενζύμου ακετυλοχολινστεράση, εσερίνη (10μM) σε tENY Mg²⁺-free, προκάλεσε αύξηση της συχνότητας των IEDs στις N και FAS τομές, και η % αύξηση ήταν παρόμοια στις 2 ομάδες τομών. Η εσερίνη προκάλεσε αύξηση της διάρκειας των IEDs σε N και FAS και η αύξηση ήταν ελαφρώς μεγαλύτερη στις N τομές (p=0.02, 1tl) (λόγω μεγάλου standard error δεν λαμβάνουμε υπόψη το παραπάνω αποτέλεσμα στη διάρκεια). Συνεπώς, τα παραπάνω αποτελέσματα αποτελούν ένδειξη ότι τα ποσά της ενδογενούς ακετυλοχολίνης δεν έχουν αλλάξει ύστερα από προγεννητική έκθεση σε αιθανόλη. Ωστόσο, το συμπέρασμά αυτό δεν είναι απόλυτο καθώς τα πειράματά μας πραγματοποιήθηκαν σε τομές ιπποκάμπου, κάτω δηλαδή από μια ειδική τεχνική συνθήκη που δεν μας επιτρέπει να μελετήσουμε τυχόν μεταβολές λόγω της αιθανόλης στα ποσά της ακετυλοχολίνης που απελευθερώνεται σε διάφορες συμπεριφορές (π.χ. μάθηση, άγχος, φόβος κ.λ.π.).

➤ Προσθήκη VU 0255035 (10μM), παρουσία εσερίνης (10μM)

Η προσθήκη του M1 μουσκαρινικού ανταγωνιστή VU 0255035 (10μM), παρουσία εσερίνης (10μM) προκάλεσε μείωση της συχνότητας των IEDs σε N και FAS τομές και η μείωση ήταν παρόμοια στις δύο ομάδες τομών. Όσον αφορά στη διάρκεια των IEDs, προκάλεσε μείωση στις N και αύξηση στις FAS (p=0.03, 1tl). Το αποτέλεσμα αυτό πιθανώς να αποτελεί ένδειξη ότι κάποια αποτελέσματα οφείλονται σε μουσκαρινικούς υποδοχείς.

Δράσεις carbachol (CCh, 1μM)

Προκειμένου να μελετήσουμε αν η αύξηση της ακετυλοχολίνης είναι ικανή να προκαλέσει επιληπτοειδή δραστηριότητα στις τομές ιπποκάμπου, προσθέσαμε έναν εξωγενή αγωνιστή και πιο συγκεκριμένα το μη υδρολυόμενο ανάλογο της ακετυλοχολίνης, carbachol (CCh, 1μM) σε φυσιολογικό εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Η CCh προκάλεσε την εμφάνιση IEDs σε όλες τις N και FAS τομές. Οι τιμές συχνότητων και διαρκειών των IEDs δεν διέφεραν μεταξύ N και FAS. Συνεπώς, η αύξηση της ακετυλοχολίνης ήταν ικανή να προκαλέσει επιληπτοειδή δραστηριότητα και στις FAS τομές. Ακόμη, η CCh ενεργοποιεί όλους τους χολινεργικούς υποδοχείς (μουσκαρινικούς και νικοτινικούς). Προκειμένου να δούμε αν η αιθανόλη επηρέασε

μουσκαρινικούς ή/και νικοτινικούς υποδοχείς, χρησιμοποιήσαμε ειδικούς ανταγωνιστές.

➤ Προσθήκη VU 0255035 (10μM) παρουσία CCh, 1μM

Η προσθήκη του M1 μουσκαρινικού ανταγωνιστή VU 0255035 (10μM) παρουσία CCh, 1μM, μείωσε τη συχνότητα των IEDs στις N και FAS τομές και η μείωση ήταν παρόμοια στις δύο ομάδες τομών. Όσον αφορά στη διάρκεια των IEDs, προκάλεσε αύξηση στις N τομές ενώ δεν επηρέασε τις FAS, χωρίς όμως η διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική.

Δράσεις oxotremorine (1μM)

Η προσθήκη του μουσκαρινικού αγωνιστή, oxotremorine (1μM) σε τENY Mg²⁺-free προκάλεσε αύξηση της συχνότητας των IEDs στις N και FAS τομές και η αύξηση ήταν παρόμοια στις δύο ομάδες τομών. Ακόμη, η oxotremorine μείωσε τη διάρκεια στις N και FAS τομές και η μείωση ήταν παρόμοια στις δύο ομάδες τομών. Συνεπώς, είναι πιθανό η αιθανόλη να μην επηρέασε την δυνατότητα συγχρονισμού μέσω μουσκαρινικών υποδοχέων. Προκειμένου να ελεγχθεί αυτή η υπόθεση προσθέσαμε παρουσία oxotremorine (1μM)

1. τον M1 συναγωνιστικό (Fakahany, et al., 1986) μουσκαρινικό ανταγωνιστή, pirenzepine (1μM).
2. Τον M1 συναγωνιστικό (Sheffler, et al., 2009) μουσκαρινικό ανταγωνιστή VU 0255035 (10μM)

{Στον εγκέφαλο οι M1 μουσκαρινικοί υποδοχείς είναι επικρατέστεροι (60% περίπου), ενώ οι M2 και M4 είναι λιγότερο άφθονοι (περίπου 20%) (Levey, et al., 1991) (Oki, et al., 2005). Επίσης, οι M1 μουσκαρινικοί υποδοχείς σχετίζονται άμεσα με την δημιουργία κρίσεων στον αρουραίο (Cruickshank, et al., 1994) και γι αυτό το λόγο εστίασαμε αρχικά σε αυτούς τους υποδοχείς.}

➤ Προσθήκη pirenzepine (1μM) παρουσία oxotremorine (1μM)

Η προσθήκη του M1 συναγωνιστικού μουσκαρινικού ανταγωνιστή, pirenzepine (1μM) μείωσε τη συχνότητα των IEDs στις N τομές (όπως ήταν αναμενόμενο) ενώ την αύξησε στις FAS (p=0.01). Όσον αφορά στη διάρκεια των IEDs, προκάλεσε μικρή μείωση στις N τομές, ενώ δεν επηρέασε τις FAS.

➤ Προσθήκη VU 0255035 (10μM) παρουσία oxotremorine (1μM)

Η προσθήκη του M1 μουσκαρινικού ανταγωνιστή VU 0255035 (10μM), παρουσία oxotremorine (1μM), προκάλεσε αύξηση των συχνοτήτων των IEDs σε N και FAS τομές και η αύξηση ήταν παρόμοια στις δύο ομάδες τομών. Επίσης, δεν επηρέασε τη διάρκεια των IEDs ούτε στις N ούτε στις FAS τομές.

Συνοψίζοντας, παρόλο που προσθέσαμε M1 ανταγωνιστές παρουσία oxotremorine, τα αποτελέσματα δεν ήταν ίδια στις δύο περιπτώσεις. Το αποτέλεσμα αυτό πιθανώς να εξηγείται από τη συγγένεια που έχει ο κάθε ανταγωνιστής με τους M1 υποδοχείς. Ειδικότερα, ο VU 0255035 έχει 75 φορές μεγαλύτερη επιλεκτικότητα για τους M1 υποδοχείς (σε σχέση με τους M2-M5) και γι αυτό θεωρείται ότι έχει

μεγαλύτερη συγγένεια με αυτούς τους υποδοχείς σε σχέση με άλλους ανταγωνιστές (Sheffler, et al., 2009). Η pirenzepine χρησιμοποιείται για τον ορισμό των φαρμακολογικών υποδοχέων M1, αλλά εμφανίζει διαφορά μόνο 10 φορές στη συγγένεια μεταξύ των υποδοχέων M1 και M4 (Dötje, et al., 1991) (Toyohara, et al., 2014). Συνεπώς η αύξηση της συχνότητας των IEDs που παρατηρήθηκε στις FAS τομές παρουσία pirenzepine πιθανόν να οφείλεται σε δράσεις και των M4 υποδοχέων.

Δράσεις gallamine triethiodite (1μM) σε τENY Mg²⁺-free

Η προσθήκη του μη συναγωνιστικού M2 μουσκαρινικού ανταγωνιστή gallamine triethiodite (1μM) σε τENY Mg²⁺-free προκάλεσε αύξηση της συχνότητας και της διάρκειας των IEDs στις N και FAS τομές και η αύξηση ήταν παρόμοια σε όλες τις περιπτώσεις (Gregory, et al., 2007).

Δράσεις 4-DAMP (1μM) σε τENY Mg²⁺-free.

Η προσθήκη του M3 μουσκαρινικού ανταγωνιστή, 4-DAMP (1μM) σε τENY Mg²⁺-free, δεν επηρέασε τη συχνότητα των IEDs N τομών μεσαίου τρίτου νεαρών πειραματοζώων ενώ, προκάλεσε αύξηση της συχνότητας στις FAS τομές (p=0.007). Η % αύξηση της συχνότητας φαίνεται να είναι μεγαλύτερη στις FAS τομές χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική η διαφορά. Το 4-DAMP δεν είχε καμία επίδραση στη διάρκεια των IEDs στις N και FAS τομές.

Το 4-DAMP έχει αναφερθεί ως ένας ισχυρός ανταγωνιστής των M3 μουσκαρινικών υποδοχέων αλλά επίσης μπλοκάρει και τους M2 (Collins, et al., 1993). Ακόμη, έχει μια μικρή συγγένεια και με τους M1 υποδοχείς (Collins, et al., 1993). Συνεπώς το αποτέλεσμα που βλέπουμε παραπάνω σχετίζεται με τη δράση των M3 αλλά και των M1 και M2 υποδοχέων. Ωστόσο, σε προηγούμενο πείραμα η προσθήκη του M2 ανταγωνιστή gallamine triethiodite (1μM) σε τENY Mg²⁺-free δεν φανέρωσε διαφορές μεταξύ N και FAS. Άρα μπορούμε να αποκλείσουμε τη συμμετοχή των M2 υποδοχέων στο παραπάνω αποτέλεσμα. Συμπερασματικά, είναι πιθανό η αιθανόλη να επηρέασε τον αριθμό ή την κατανομή ή/και την λειτουργία των υποτύπων των μουσκαρινικών υποδοχέων.

Επίδραση της προγεννητικής έκθεσης σε αιθανόλη στους νικοτινικούς υποδοχείς

Δράσεις Hexamethonium (HXM, 50μM) σε τENY Mg²⁺-free

Η προσθήκη του ανταγωνιστή νικοτινικών υποδοχέων Hexamethonium (HXM, 50μM) σε τENY Mg²⁺-free, προκάλεσε αύξηση των συχνότητων των IEDs σε όλες τις τομές N και FAS πειραματοζώων. Οι τιμές συχνότητων παρουσία HXM ήταν μεγαλύτερες στις N τομές συγκριτικά με τις FAS (p=0.04, 1tl). Όμως, η % αύξηση ήταν παρόμοια στις δύο ομάδες τομών. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι οι FAS τομές παρουσίασαν χαμηλότερες συχνότητες από την αρχή (δηλαδή στο τENY Mg²⁺-free). Όσον αφορά στη διάρκεια, η προσθήκη HXM προκάλεσε μικρή μείωση στις N και αύξηση στις FAS (p=0.002). Αυτή η διαφορά πιθανόν να εξηγείται από τις χαμηλότερες συχνότητες που καταγράφηκαν στις FAS τομές παρουσία HXM.

Το γεγονός ότι η προσθήκη HXM προκάλεσε αύξηση των συχνοτήτων των IEDs αποτελεί ένδειξη ότι οι νικοτινικοί υποδοχείς εντοπίζονται σε GABAεργικούς ενδονευρώνες, οι οποίοι πριν μπλοκαριστούν από το HXM προκαλούσαν αναστολή. Στη συνέχεια θελήσαμε να απενεργοποιήσουμε τη δράση των υποδοχέων GABA_A με τη χρήση BMI. Η προσθήκη του HXM (50μM) παρουσία BMI (20μM) προκάλεσε αύξηση της συχνότητας των IEDs στις N τομές αλλά όχι στις FAS (p=0.03), ενώ δεν είχε καμία δράση στη διάρκεια. Συνεπώς παρατηρήθηκε περισσότερη διέγερση στις N συγκριτικά με τις FAS τομές όταν έχει απενεργοποιηθεί η GABA_A μεσολαβούμενη αναστολή. Άρα μπλοκαρίστηκαν νικοτινικοί υποδοχείς που βρίσκονταν σε ενδονευρώνες που ενεργοποιούσαν και GABA_B υποδοχείς. Άρα φαίνεται πως η δράση του HXM παρουσία BMI ανέστειλε έμμεσα την υπόλοιπη GABAεργική διαβίβαση (εκτός GABA_A που ήταν ήδη μπλοκαρισμένη), δηλαδή την GABA_B. Συμπερασματικά, η διαφορά στη δράση του HXM μεταξύ N και FAS πιθανόν να σημαίνει πιο αξιόλογο GABA_B component στις N και όχι στις FAS τομές.

Αύξηση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης K⁺ σε tENY Mg²⁺-free

Η αύξηση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης K⁺ προκάλεσε αύξηση των συχνοτήτων των IEDs σε N και FAS τομές νεαρών πειραματοζώων. Η % αύξηση ήταν μεγαλύτερη στις FAS τομές συγκριτικά με τις N (p=0.001). Η αύξηση της συγκέντρωσης K⁺ δεν είχε επίδραση στη διάρκεια των IEDs στις N και FAS τομές. Το παραπάνω αποτέλεσμα πιθανόν να αποτελεί ένδειξη για την ύπαρξη περισσότερων καναλιών K⁺ στο FAS.

Η αύξηση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης K⁺ προκάλεσε αύξηση των συχνοτήτων και των διαρκειών των IEDs σε N και FAS τομές ενήλικων πειραματοζώων και η % αύξηση ήταν παρόμοια. Συνεπώς με την πάροδο της ηλικίας εξαφανίστηκε η διαφορά που παρατηρήσαμε στις FAS τομές από νεαρά πειραματοζώα. Είναι πιθανό λοιπόν να υπάρχει κάποιος μηχανισμός προσαρμογής που μειώνει τις αγωγιμότητες K⁺ που πιθανώς να είχε αυξήσει η αιθανόλη σε νεαρή ηλικία.

Αύξηση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης K⁺ (7mM) σε φυσιολογικό aCSF

Η αύξηση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης K⁺ (7mM) σε φυσιολογικό aCSF προκάλεσε την εμφάνιση επιληπτοειδών εκφορτίσεων σε N και FAS τομές νεαρών πειραματοζώων. Οι N τομές παρουσίασαν σημαντικά **χαμηλότερες** τιμές συχνοτήτων των IEDs συγκριτικά με τις FAS (p=0.008) επιβεβαιώνοντας την υπόθεση για περισσότερα κανάλια K⁺ στο FAS. Η αύξηση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης K⁺ δεν επηρέασε τη διάρκεια των IEDs.

Η αύξηση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης K⁺ σε φυσιολογικό aCSF προκάλεσε την εμφάνιση επιληπτοειδών εκφορτίσεων σε N και FAS τομές ενήλικων πειραματοζώων. Οι N τομές παρουσίασαν σημαντικά **μεγαλύτερες** τιμές συχνοτήτων των IEDs συγκριτικά με τις FAS (p=0.04, 1tl). Επίσης οι FAS τομές παρουσίασαν χαμηλότερη διάρκεια των IEDs συγκριτικά με τις N τομές (p=0.0002). Συνεπώς, είναι

πιθανή η ύπαρξη προσαρμοστικού μηχανισμού στα ενήλικα FAS, ικανού να μειώνει τις αγωγιμότητες K^+ που είχαν αυξηθεί από την αιθανόλη.

Δράσεις $BaCl_2$ σε $tENY Mg^{2+}$ -free

Το $BaCl_2$ αποτελεί χρήσιμο φαρμακολογικό εργαλείο για τον έλεγχο του φυσιολογικού ρόλου των καναλιών Kir, καθώς, τα κανάλια Kir είναι έως και 1000 φορές πιο ευαίσθητα στο $BaCl_2$ από άλλα κανάλια ιόντων K^+ (Leung, et al., 2000).

Η προσθήκη του μη ειδικού ανταγωνιστή των καναλιών kir $BaCl_2$ σε $tENY Mg^{2+}$ -free προκάλεσε αύξηση της συχνότητας των IEDs στις N και FAS τομές νεαρών πειραματοζώων, και η % αύξηση ήταν παρόμοια στις δύο ομάδες τομών. Η % αύξηση στη διάρκεια των IEDs ήταν μεγαλύτερη στις FAS τομές ($p=0.04$).

Η προσθήκη του $BaCl_2$ σε $tENY Mg^{2+}$ -free σε τομές από ενήλικα πειραματόζωα προκάλεσε **αύξηση των συχνότητων των IEDs στις N ενώ δεν επηρέασε τις FAS** ($p=0.03$). Επίσης, δεν επηρέασε τη διάρκεια των IEDs στις N αλλά την αύξησε στις FAS τομές ($p=0.007$). Φαίνεται λοιπόν, πως η προγεννητική έκθεση σε αιθανόλη δεν επηρέασε τα κανάλια Kir των νεαρών πειραματοζώων, αλλά είναι πιθανό να έχουμε λιγότερα κανάλια Kir στις FAS τομές ενήλικων πειραματοζώων. Δυσλειτουργία των καναλιών Kir έχει συσχετιστεί με πολλές μορφές επιληψίας καθώς αποτελούν ρυθμιστές σημαντικών διεργασιών (π.χ. spatial K^+ buffering). Συνεπώς είναι πιθανό η αυξημένη τάση για επιληψία που παρατηρείται στο FAS να οφείλεται στην ύπαρξη λιγότερων καναλιών K^+ .

Gap junctions – Χασματικές συνδέσεις

Η προσθήκη του ανταγωνιστή των χασμοσυνδέσμων (gap junctions), carbenoxolone (cbx, 300 μ M) σε $tENY Mg^{2+}$ -free, προκάλεσε μείωση της συχνότητας των IEDs σε N και FAS τομές νεαρών πειραματοζώων. Η % μείωση ήταν σημαντικά **μεγαλύτερη** στις FAS τομές συγκριτικά με τις N. Η cbx δεν επηρέασε τη διάρκεια των IEDs στις N τομές ενώ τη μείωσε στις FAS ($p=0.04$, 1tl). Αστροκύτταρα συνδεόμενα μέσω χασμοσυνδέσμων αναδιανέμουν στον χώρο το εξωκυττάριο K^+ με αποτέλεσμα την εξισορρόπηση της συγκέντρωσης του. Το εξωκυττάριο K^+ αυξάνεται σε περιοχές και περιόδους με έντονη νευρωνική δραστηριότητα όπως για παράδειγμα συμβαίνει κατά την διάρκεια υπερσυγχρονισμένων εκφορτίσεων και επιληπτικών κρίσεων. Δυσλειτουργία των αστροκυττάρων όσον αφορά την ανακατανομή του K^+ έχει συνδεθεί με αυξημένο δυναμικό για κρίσεις (Seifert, et al., 2010) (Wallraff, et al., 2006). Η παρουσία αυξημένων χασματικών συνδέσεων σε άλλα κύτταρα (πυραμιδικούς νευρώνες, ενδονευρώνες) αυξάνει την τάση συγχρονισμού τους και άρα συμβάλλει στις επιληπτοειδείς εκφορτίσεις. Τα αποτελέσματα μας υποδεικνύουν τον αυξημένο ρόλο χασμοσυνδέσμων στον συγχρονισμό στις FAS τομές, εφόσον αναστολή τους μειώνει και συχνότητα και διάρκεια των IEDs. Δεν γνωρίζουμε την ακριβή τοποθεσία τους, μάλλον όμως βρίσκονται σε νευρώνες που συμβάλλουν στον συγχρονισμό. Άρα αυξημένοι χασμοσύνδεσμοι σε τομές από νεαρά FAS ζώα μπορεί να αυξάνουν την πιθανότητα έκλυσης υπερσυγχρονισμένων εκφορτίσεων.

Ο ρόλος τους επομένως μπορεί να είναι διπλός: είτε να συνεισφέρουν στην έκλυση παροξυσμικών εκφορτίσεων είτε να τις μειώνουν.

Η προσθήκη cbx (ίδια συγκέντρωση και συνθήκες) σε τομές ενήλικων πειραματοζώων, προκάλεσε μείωση της συχνότητας ($p=ns$) των IEDs και στις δύο ομάδες, η οποία ωστόσο ήταν παρόμοια. Επίσης, αύξησε ελαφρώς τη διάρκεια των IEDs ($p=ns$) και η % αύξηση ήταν παρόμοια σε N και FAS. Η αναπτυξιακή μείωση των χασματικών συνδέσεων είναι αναμενόμενη και έχει περιγραφεί πολλαπλώς (Llinas, 1985) (Chang, et al., 1999). Το εύρημα μας δείχνει ότι οι όποιες διαφορές στον αριθμό των χασματικών συνδέσεων που παρατηρούνται νωρίς στην ανάπτυξη μεταξύ N και FAS τομών εξισορροπούνται με την πάροδο της ηλικίας και δεν ανιχνεύονται μετά το πέρας της ανάπτυξης. Η τοποθεσία τους παραμένει ένα ερώτημα που δεν απαντάται από αυτά τα πειράματα.

Διαφορές διεγερσιμότητας μεταξύ κροταφικών (temporal) και διαφραγματικών (septal) τομών από N και FAS πειραματόζωα

Η διαβροχή με tENY 4-AP (50μM) προκάλεσε την εμφάνιση IEDs σε N και FAS διαφραγματικές και κροταφικές τομές νεαρών και ενήλικων πειραματοζώων. Η συχνότητα των IEDs δεν διέφερε μεταξύ διαφραγματικών και κροταφικών τομών ούτε στα νεαρά ούτε στα ενήλικα N και FAS πειραματόζωα. Αν και βιβλιογραφικά υπάρχουν διαφορές διεγερσιμότητας μεταξύ κροταφικών και διαφραγματικών τομών (Lee, et al., 1990) (Mikroulis, et al., 2018) δεν εντοπίστηκαν ωστόσο με το συγκεκριμένο μοντέλο. Ακόμη, οι τιμές συχνότητων των IEDs στο μεσαίο τρίτο του ιπποκάμπου των N τομών, ήταν παρόμοιες με τις τιμές συχνότητων που καταγράφηκαν από τα άκρα του ιπποκάμπου. Όσον αφορά στις FAS τομές, οι τιμές συχνότητων στο μεσαίο τρίτο του ιπποκάμπου ήταν ελαφρώς μεγαλύτερες συγκριτικά με τις αντίστοιχες των άκρων (παρ' όλα αυτά η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική).

Ένα εύρημα που σχετίζεται με αναπτυξιακές διαδικασίες ήταν ότι οι κροταφικές τομές από ενήλικα (N και FAS) πειραματόζωα παρουσίασαν σημαντικά μεγαλύτερες τιμές συχνότητας IEDs σε σχέση με τομές από νεαρά ζώα και αυτό ήταν αναμενόμενο σύμφωνα με την βιβλιογραφία (Psarroroulou & Avoli, 1996). Αντίθετα οι διαφραγματικές τομές από ενήλικα N και FAS πειραματόζωα παρουσίασαν παρόμοιες τιμές συχνότητων με τις ανάλογες τομές από νεαρά, κάτι που δεν ήταν αναμενόμενο. Πιθανόν να σχετίζεται με διαφορετικό «χρονοδιάγραμμα ωρίμανσης» ανάμεσα στις δύο περιοχές, και πιθανόν να αντανάκλα έμμεσα τις διαφορές στην διεγερσιμότητα των άκρων του ώριμου ιπποκάμπου που έχουν εντοπιστεί σε διάφορες εργασίες (Mikroulis, et al., 2018).

Δράσεις BMI(20μM) σε τENY με 4-AP σε κροταφικές και διαφραγματικές τομές

Κροταφικές. Η προσθήκη του ανταγωνιστή των GABA_A υποδοχέων, BMI (20μM, σε τENY με 4-AP) **μείωσε** την συχνότητα των IEDs στις τομές N και FAS νεαρών και ενήλικων πειραματοζώων (χωρίς ωστόσο η μείωση να είναι στατιστικά σημαντική) χωρίς διαφορές. Όσον αφορά στη διάρκεια των IEDs, προκάλεσε αύξηση και η αύξηση ήταν παρόμοια σε N και FAS.

Διαφραγματικές: Σε τομές από νεαρά πειραματοζώα, το BMI προκάλεσε μείωση των συχνοτήτων IEDs στις N και **αύξηση** στις FAS τομές, χωρίς όμως η διαφορά τους να είναι στατιστικά σημαντική. Επίσης δεν επηρέασε σημαντικά την διάρκεια των IEDs σε N και FAS. Σε τομές από ενήλικα ζώα, το BMI προκάλεσε μικρή αύξηση των συχνοτήτων IEDs στις N αλλά μείωση στις FAS και η διαφορά τους ήταν στατιστικά σημαντική (p=0.02). Δεν επηρέασε σημαντικά τη διάρκεια των IEDs σε N και FAS.

Συνοψίζοντας, σε τομές από νεαρά πειραματοζώα, φαίνεται μια διαφορά στην δράση του BMI μεταξύ κροταφικών και διαφραγματικών FAS τομών (μείωση συχνότητας στις κροταφικές και αύξηση στις διαφραγματικές), ενώ δεν εντοπίστηκαν διαφορές στις N τομές, όπου το BMI προκάλεσε ομογενώς μείωση της συχνότητας των IEDs. Σε τομές από ενήλικα πειραματοζώα δεν εντοπίστηκαν διαφορές στην δράση του BMI αναφορικά με την συχνότητα των IEDs μεταξύ κροταφικών και διαφραγματικών τομών (N, FAS). Συμπερασματικά, όσον αφορά την συχνότητα των IEDs, εντοπίστηκε διαφορά στην δράση του BMI μεταξύ κροταφικών και διαφραγματικών FAS τομών **από νεαρά ζώα** όχι όμως μεταξύ κροταφικών και διαφραγματικών N τομών, και καμία διαφορά όσον αφορά τις τομές από ενήλικα ζώα. Η διαφοροποίηση των νεαρών FAS διαφραγματικών τομών φαίνεται να είναι το μόνο άξιο λόγου εύρημα από αυτές τις συγκρίσεις και πιθανόν να σχετίζεται με την ωρίμανση της συγκεκριμένης περιοχής.

Δράσεις Carbachol (1μM) παρουσία BMI σε τENY με 4-AP σε κροταφικές και διαφραγματικές τομές

Σκοπός αυτού του πειράματος ήταν ο προσδιορισμός των δράσεων του μη υδρολυόμενου αναλόγου της ACh, CCh στην διεγερτική νευροδιαβίβαση, ύστερα από μπλοκάρισμα των GABA_A υποδοχέων οι οποίοι φέρουν το μεγαλύτερο βάρος της συναπτικής αναστολής

Κροταφικές τομές.

Η προσθήκη CCh παρουσία BMI προκάλεσε αύξηση της συχνότητας των IEDs μόνο στις N και όχι στις FAS τομές νεαρών πειραματοζώων (η διαφορά μεταξύ N και FAS ήταν στατιστικά σημαντική με p=0.04, 1tl) υποδηλώνοντας μειωμένες χολινεργικές δράσεις στις δεύτερες, όσον αφορά τον συγχρονισμό των επιληπτοειδών εκφορτίσεων. Σε τομές ενήλικων πειραματοζώων, η CCh σε αυτές τις συνθήκες προκάλεσε **παρόμοια αύξηση** της συχνότητας των IEDs στις N και FAS τομές.

Διαφραγματικές τομές:

Η CCh σε αυτές τις συνθήκες δεν επηρέασε τη συχνότητα των IEDs σε καμία ομάδα (N και FAS τομές από νεαρά και ενήλικα πειραματόζωα).

Συμπερασματικά, όσον αφορά τις **κροταφικές** τομές φαίνεται μια υστέρηση στις FAS που καλύπτεται με την ανάπτυξη, ενώ όσον αφορά τις **διαφραγματικές** τομές δεν φαίνεται ενεργοποίηση των χολινεργικών υποδοχέων (συνολικά μουσκαρινικών, νικοτινικών) που βρίσκονται σε διεγερτικούς νευρώνες να επηρεάζει θετικά (να αυξάνει) την συχνότητα των IEDs σε καμία ομάδα (N, FAS) και ηλικία (νεαρά, ώριμα). Με άλλα λόγια υπάρχει μια διαφορά μεταξύ κροταφικού και διαφραγματικού ιπποκάμπου σε ώριμες τομές, ανεξαρτήτως ομάδας (N, FAS) όσον αφορά την χολινεργική συμβολή στον συγχρονισμό, ενώ στα νεαρά ζώα η διαφορά (μεταξύ κροταφικών και διαφραγματικών τομών) περιορίζεται στα N. Κατά συνέπεια, μια «φυσιολογική» (N) διαφορά μεταξύ των δυο ιπποκάμπειων άκρων δεν υφίσταται στις νεαρές FAS τομές, υποδηλώνοντας μάλλον προσαρμογή (μείωση πιθανότητας έκλυσης υπερσύγχρονων εκφορτίσεων) παρά το αντίθετο.

Επανάληψη του πειράματος σε tENY Mg²⁺-free, μόνο σε κροταφικές τομές από νεαρά ζώα

Δεδομένου ότι οι διαφορές στην δράση της Carbachol (1μM) παρουσία BMI εντοπίστηκαν μόνο σε κροταφικές τομές, και δεδομένης της βιβλιογραφίας που δείχνει συνέργεια μουσκαρινικών και NMDA υποδοχέων (Marchi, et al., 1988) (Scanziani, et al., 1995) (Grishin, et al., 2005) (Dennis, et al., 2016), το πείραμα επαναλήφθηκε στο μοντέλο Mg²⁺-free.

[Η επώαση με tENY Mg²⁺-free προκάλεσε την εμφάνιση αυθόρμητων IEDs σε όλες τις N και FAS τομές, χωρίς διαφορά στις συχνότητες IEDs. Η προσθήκη BMI, μείωσε τις συχνότητες IEDs χωρίς διαφορές (N, FAS).]

Η CCh αύξησε τη συχνότητα των IEDs σε όλες τις N (p<0.0001) και FAS (p<0.0001) τομές και η % αύξηση ήταν μεγαλύτερη στις N τομές (p=0.01). Στην ίδια κατεύθυνση είναι το εύρημα ότι οι τιμές συχνότητων IEDs παρουσία CCh ήταν σημαντικά υψηλότερες στις N τομές συγκριτικά με τις FAS (p=0.008). Τα ευρήματα αυτά είναι στην ίδια κατεύθυνση με αυτά στο μοντέλο της 4-AP (προηγούμενη παράγραφος), και δείχνουν επίσης πιο έντονη διεγερτική δράση της CCh, πράγμα που πιθανόν να σχετίζεται με τους μηχανισμούς διεγερσιμότητας του μοντέλου Mg²⁺-free (έντονη ενεργοποίηση NMDA υποδοχέων και συνέργεια με μουσκαρινικούς υποδοχείς) και επιβεβαιώνουν την αρχική μας υπόθεση.

Τα ευρήματα αυτά πού δείχνουν μειωμένη χολινεργική δράση στον συγχρονισμό σε FAS τομές (νεαρές, κροταφικές) είναι στην ίδια κατεύθυνση με αποτελέσματα προηγούμενων εργασιών που έδειξαν **μειωμένες χολινεργικές δράσεις** στον φλοιό ώριμων (ενήλικων) επίμυων που είχαν εκτεθεί προγεννητικά σε αιθανόλη (Janiri, et al., 1994) (παρόλο που οι ερευνητές αυτοί ακολούθησαν διαφορετικό πρωτόκολλο από το δικό μας). Τα ευρήματα αυτά μπορεί επιπλέον να εξηγούνται από μειωμένη απελευθέρωση ACh. Έχει βρεθεί ότι η έκθεση σε αλκοόλ μειώνει την έκφραση του μεταφορέα χολίνης υψηλής συγγένειας (CHT, high-affinity

choline uptake transporter), που είναι υπεύθυνος για την μεταφορά της στο τερματικό διαταράσσοντας την σύνθεση ακετυλοχολίνης στον ιππόκαμπο και συμβάλλοντας έτσι στην μειωμένη απελευθέρωση της (Perkins, A. E., 2014).

Αύξηση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης K^+ σε τ ENY Mg^{2+} -free σε κροταφικές και διαφραγματικές τομές

Η εξωκυττάρια συγκέντρωση K^+ αυξάνεται κατά την διάρκεια έντονης νευρωνικής δραστηριότητας και το ζητούμενο ήταν να διερευνηθεί τι επιφέρει αυτό σε FAS ιππόκαμπο σε σχέση με N, ώστε να εξηγηθεί το αυξημένο δυναμικό του FAS εγκεφάλου προς έκλυση επιληπτικών κρίσεων. Το παρόν πείραμα δεν έγινε στο μοντέλο της 4-AP, δεδομένου ότι η τελευταία είναι αναστολέας ρευμάτων K^+ .

Κροταφικές τομές:

Η αύξηση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης K^+ σε τελική συγκέντρωση 7mM στο τ ENY Mg^{2+} -free αύξησε τις συχνότητες των IEDs στις N και FAS τομές νεαρών πειραματοζώων χωρίς η αύξηση να είναι στατιστικά σημαντική και χωρίς ποσοτική διαφοροποίηση. Παρομοίως και σε τομές από ενήλικα πειραματόζωα, το υψηλό K^+ αύξησε τις συχνότητες IEDs στον ίδιο βαθμό στις δύο ομάδες (N, FAS)

Διαφραγματικές τομές:

Το υψηλό K^+ αύξησε τις συχνότητες των IEDs στις N και FAS τομές νεαρών πειραματοζώων χωρίς η αύξηση να είναι στατιστικά σημαντική και χωρίς ποσοτική διαφοροποίηση. Παρομοίως και σε τομές από ενήλικα πειραματόζωα, το υψηλό K^+ αύξησε τις συχνότητες IED στον ίδιο βαθμό στις δύο ομάδες (N, FAS)

Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω, μπορούμε να πούμε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης K^+ αύξησε την συχνότητα των IEDs χωρίς διαφοροποίηση μεταξύ ομάδων (N, FAS), ανατομικής τοποθεσίας (κροταφικές, διαφραγματικές τομές) ή ωρίμανσης ΚΝΣ (νεαρά, ώριμα ζώα). Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνουν εκείνα με την 4-AP, δεδομένου ότι ούτε τότε εντοπίστηκε διαφορετική αντίδραση στα δύο άκρα του ιπποκάμπου (κροταφικές, διαφραγματικές τομές). Συνεπώς η προγεννητική έκθεση σε αιθανόλη δεν επηρέασε κανάλια καλίου στα άκρα του ιπποκάμπου σε αντίθεση με τα αποτελέσματα στο μεσαίο τρίτο (όπως περιγράφηκε σε προηγούμενη παράγραφο).

Αναφορές

- Lee, A.-R. et al., 2017. Dorsal and Ventral Hippocampus Differentiate in Functional Pathways and Differentially Associate with Neurological Disease-Related Genes during Postnatal Development. *Frontiers in Molecular Neuroscience*.
- Abel, E. L. & Dintcheff, B. A., 1978. Effects of Prenatal Alcohol Exposure on Growth and Development in Rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 207(3), pp. 916-21.
- Aceto, M., Bentley, H. & Dembinski, J., 1969. Effects of ganglion blocking agents on nicotine extensor convulsions and lethality in mice. *British Journal of Pharmacology*, Issue 37, p. 104–111.
- Aistrup, G. L., Marszalec, W. & Nara, T., 1999. Ethanol Modulation of Nicotinic Acetylcholine Receptor Currents in Cultured Cortical Neurons. *Molecular Pharmacology*, 1(55), pp. 39-49.
- Allan, A. M., Chynoweth, J., Tyler, L. A. & Caldwell, K. K., 2003. A mouse model of prenatal ethanol exposure using a voluntary drinking paradigm. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 12(27), pp. 2009-1610.
- Ambrosini, E. και συν., 2014. Genetically induced dysfunctions of Kir2.1 channels: implications for short QT3 syndrome and autism-epilepsy phenotype.. *Hum. Mol. Genet.*, Τόμος 23, p. 4875–4886..
- Ang, C. W., Carlson, G. C. & Coulter, A. D., 2006. Massive and Specific Dysregulation of Direct Cortical Input to the Hippocampus in Temporal Lobe Epilepsy. *The Journal of Neuroscience*, 46(26), p. 11850–11856.
- Anon., n.d. Allosteric Modulation of Muscarinic Acetylcholine Receptors.
- Anon., n.d. Muscarinic inhibition of endogenous glutamate release from rat hippocampus synaptosomes.
- Araki, T., Kato, H., Fujiwara, T. & Itoyama, Y., 1996. Regional age-related alterations in cholinergic and GABAergic receptors in the rat brain. *Mechanisms of Ageing and Development*, 1-2(88), pp. 49-60.
- Armstrong, D. D. & Mizrahi, E. M., 1998. Pathologic basis of the symptomatic epilepsies in childhood. *Journal of child neurology*, 8(13), pp. 361-71.
- Avoli, M., 2007. The Epileptic Hippocampus Revisited: Back to the Future. *Epilepsy Currents*, 7(4), pp. 116-118.
- Bailey, C., Brien, J. & Reynolds, J., 2004. Chronic prenatal ethanol exposure alters the proportion of GABAergic neurons in layers II/III of the adult guinea pig somatosensory cortex.. *Neurotoxicol Teratol*, 26(1), pp. 59-63.

- Balaraman, S., Idrus, N. M., Miranda, R. C. & Thomas, J. D., 2017. Postnatal Choline Supplementation Selectively Attenuates Hippocampal microRNA Alterations Associated With Developmental Alcohol Exposure. *Alcohol*, Issue 60, pp. 159-167.
- Ballard, M. S., Sun, M. & Ko, J., 2012. Vitamin A, folate, and choline as a possible preventive intervention to fetal alcohol syndrome. *Medical Hypotheses*, 4(78), pp. 489-93.
- Bannerman, D. M., Rawlins, J. N., McHugh, B. S. & Deac, 2004. Regional dissociations within the hippocampus—memory and anxiety. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, Issue 28, pp. 273-283.
- Bannerman, M. D., Grubb, M., Deacon, M. R. & Yee, K. B., 2003. Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. *Behavioural Brain Research*, Issue 139, pp. 197-213.
- Bannerman, M. D., Sprengel, R. & Sanderson, J. D., 2014. Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. *Nature Reviews Neuroscience*, Issue 15, pp. 181-192.
- Barnes, D. E. & Walker, D. W., 1981. Prenatal ethanol exposure permanently reduces the number of pyramidal neurons in rat hippocampus. *Brain Res.*, Τόμος 227, p. 333–340.
- Bast, T., Wilson, I. A., Witter, M. P. & Morris, R. G. M., 2009. From Rapid Place Learning to Behavioral Performance: A Key Role for the Intermediate Hippocampus. *PLoS Biology*, 7(4), p. 0730–0746.
- Bates, E. A., 2013. A potential molecular target for morphological defects of fetal alcohol syndrome: Kir2.1. *Epub*.
- Battaglia, P. F. et al., 2011. The hippocampus: hub of brain network communication for memory. *Trends in Cognitive Sciences*, Issue 15, pp. 310-318.
- Bear, M. F., Connors, B. W. & Paradiso, M. A., 2001. *NEUROSCIENCE, Exploring the Brain*. 4 ed. s.l.:s.n.
- Beaulieu, C. & Somogyi, P., 1991. Enrichment of cholinergic synaptic terminals on GABAergic neurons and coexistence of immunoreactive GABA and choline acetyltransferase in the same synaptic terminals in the striate cortex of the cat. *The Journal of Comparative Neurology*, 4(304), pp. 666-80.
- Bellinger, P. F., Bedi, S. K., Wilson, P. & Wilce, A. P., 1999. Ethanol exposure during the third trimester equivalent results in long-lasting decreased synaptic efficacy but not plasticity in the CA1 region of the rat hippocampus. *Synapse*, 31(1), pp. 51-8.

- Bell, S. H. et al., 2010. The remarkably high prevalence of epilepsy and seizure history in fetal alcohol spectrum disorders. *European Journal of Medical Genetics*, 6(34), pp. 1084-9..
- BessAramakis, V. & Metherate, R., 1998. Nicotine selectively enhances NMDA receptor-mediated synaptic transmission during postnatal development in sensory neocortex. *Journal of Neuroscience*, Issue 18, p. 8485–8495.
- Bhattacharya, D. et al., 2020. Concurrent nicotine exposure to prenatal alcohol consumption alters the hippocampal and cortical neurotoxicity. *Heliyon*, 1(6), p. 03045.
- Bhattacharya, D., Fujihashi, A., Majrashi, M. & Bloemer, J., 2020. Concurrent nicotine exposure to prenatal alcohol consumption alters the hippocampal and cortical neurotoxicity. *Heliyon*, 6(1).
- Bodhinathan, K. & Slesinger, P. A., 2013. Molecular mechanism underlying ethanol activation of G-protein-gated inwardly rectifying potassium channels. *PNAS*, Τόμος 45, pp. 18309-18314.
- Bonanno, G. & Raiteri, M., 1986. GABA enhances acetylcholine release from hippocampal nerve endings through a mechanism blocked by a GABA uptake inhibitor. *Neuroscience Letters*, 3(70), pp. 360-3.
- Bonthius, D. J. et al., 2001. Alcohol exposure during the brain growth spurt promotes hippocampal seizures, rapid kindling, and spreading depression.. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 25(5), pp. 734-745.
- Bonthius, J. D. et al., 2001.). Alcohol Exposure During the Brain Growth Spurt Promotes Hippocampal Seizures, Rapid Kindling, and Spreading Depression. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 25(5), pp. 734-745.
- Bonthius, J. D. & West, R. J., 1990. Alcohol-induced neuronal loss in developing rats: Increased brain damage with binge exposure. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 14(1), p. 107–118.
- Bonthius, J. W., NE, B. & DA, T., 2001. Reduced seizure threshold and hippocampal cell loss in rats exposed to alcohol during the brain growth spurt.. *Alcohol Clin Exp Res*, 1(25), pp. 70-82.
- Bordey, A. & Sontheimer, H., 1998. Properties of human glial cells associated with epileptic seizure foci.. *Epilepsy Res.*, Τόμος 32, p. 286–303.
- Boronat, S. et al., 2017. Seizures and electroencephalography findings in 61 patients with fetal alcohol spectrum disorders. *European Journal of Medical Genetics*, 60(1), pp. 72-78.

- Brady, M. L. et al., 2013. Moderate Prenatal Alcohol Exposure Reduces Plasticity and Alters NMDA Receptor Subunit Composition in the Dentate Gyrus. *The Journal of Neuroscience*, 33(3), pp. 1062-1067.
- Brenner, R. & Wilcox, K. S., 2012. “Potassium channelopathies of epilepsy,”. *Jasper’s Basic Mechanisms of the Epilepsies*.
- Brodie, S. M., Scholz, A., Weiger, M. T. & Dopico, A. M., 2007. Ethanol interactions with calcium-dependent potassium channels. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, Τόμος 31, p. 1625–1632.
- Brydges, M. N., Wood, R. E., Holmes, C. M. & Hall, J., 2014. Prepubertal stress and hippocampal function: sex-specific effects. *Hippocampus*, Issue 24, pp. 684-692.
- Buono, R. J., Lohoff, F. & Sander, T., 2004. Association between variation in the human KCNJ10 potassium ion channel gene and seizure susceptibility.. *Epilepsy Res.*, Τόμος 58, p. 175–183..
- Burgess, N., Maguire, E. A. & Keefe, J. O., 2002. The Human Hippocampus and Spatial and Episodic Memory. *Neuron*, 35(4), pp. 625-641.
- Buzsáki, G., 1989. Two-stage model of memory trace formation: a role for “noisy” brain states. *Neuroscience*, 31(3), pp. 551-570.
- Buzsaki, G., 2015. Hippocampal sharp wave-ripple: A cognitive biomarker for episodic memory and planning. *Hippocampus*, 25(10), pp. 1073-1188.
- Cenquizca, L. A. & Swanson, L. W., 2007. Spatial Organization of Direct Hippocampal Field CA1 Axonal Projections to the Rest of the Cerebral Cortex. *Brain Research Reviews*, Issue 1, pp. 1-26.
- Chabenne, A. et al., 2014. Biomarkers in fetal alcohol syndrome. *Biomarkers and Genomic Medicine*, 6(1), pp. 12-22.
- Chang, Q., Gonzalez, M., Pinter, M. J. & Balice-Gordon, R. J., 1999. Gap Junctional Coupling and Patterns of Connexin Expression among Neonatal Rat Lumbar Spinal Motor Neurons. *J Neurosci.*, 19(24), p. 10813–10828.
- Chapman, G. A., 1998. Glutamate receptors in epilepsy. *Progress in Brain Research* , Issue 116, pp. 371-383.
- Chernoff, G. F., 1977. The Fetal Alcohol Syndrome in Mice: An Animal Model. *Teratology*, 15(3), pp. 223-9.
- Chever, O., Djukic, B., McCarthy, K. D. & Amzica, F., 2010. Implication of Kir4.1 channel in excess potassium clearance: an in vivo study on anesthetized glial-conditional Kir4.1 knock-out mice.. *Neurosci.*, Τόμος 30, p. 15769–15777.

- Choi, I. Y., Allan, A. M. & Cunningham, L. A., 2005. Moderate fetal alcohol exposure impairs the neurogenic response to an enriched environment in adult mice. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 11(29), pp. 2053-6210.
- Cho, S. J., Lovinger, D. M. & Gouemo, P. N., 2017. Prenatal Alcohol Exposure Enhances the Susceptibility to NMDA-induced Generalized Tonic-Clonic Seizures in Developing Rats. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 23(10), pp. 808-817..
- Christie, B. R. et al., 2005. Voluntary exercise rescues deficits in spatial memory and long-term potentiation in prenatal ethanol-exposed male rats. *European Journal of Neuroscience*, 6(21), pp. 1719-2610.
- Chung, B. Y. T. και συν., 2016. Postsynaptic nicotinic acetylcholine receptors facilitate excitation of developing CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol.*, 116(5), p. 2043–2055.
- Colgin, L. L., 2016. Rhythms of the hippocampal network. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(4), pp. 239-249.
- Collins, D., Smith, D. A. & Messer, W. S., 1993. REGIONAL BINDING OF 4-DIPHENYLACETOXY-N-METHYLPIPERIDINE METHOBROMIDE (4-DAMP) TO MUSCARINIC RECEPTORS IN RAT BRAIN AND COMPARATIVE ANALYSIS OF MINIMUM ENERGY CONFORMATIONS. *Neurochem. Int*, 22(3), pp. 237-247.
- Cooper, E. C., 2012. Potassium channels (including KCNQ) and epilepsy. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*.
- Cortese, M. B., Krahl, E. S., Berman, F. R. & Hannigan, H. J., 1997. Effects of prenatal ethanol exposure on hippocampal theta activity in the rat. *Alcohol*, 3(14), pp. 231-5.
- Cronise, K., Marino, M. D., Tran, T. D. & Kelly, S. J., 2001. Critical periods for the effects of alcohol exposure on learning in rats. *Behavioral Neuroscience*, 1(115), pp. 138-4510.
- Cruickshank, J. W., Brudzynski, S. M. & McLachlan, R. S., 1994. Involvement of M1 muscarinic receptors in the initiation of cholinergically induced epileptic seizures in the rat brain. *Brain Res*, Τόμος 1-2, pp. 125-9.
- Cruz, H., 2004. Bi-directional effects of GABA(B) receptor agonists on the mesolimbic dopamine system.. *Nat Neurosci*, p. 153–159.
- Cudd , T. A., 2005. Animal model systems for the study of alcohol teratology. *Experimental Biology and Medicine*, 6(230), pp. 389-93.
- Daenen, E. W. et al., 2003. Neonatal lesions in the amygdala or ventral hippocampus disrupt prepulse inhibition of the acoustic startle response; implications for an animal

- model of neurodevelopmental disorders like schizophrenia. *European Neuropsychopharmacology*, 3(3), pp. 187-197.
- De Sevilla, F. D. & Buno, W., 2010. The muscarinic long-term enhancement of NMDA and AMPA receptor-mediated transmission at Schaffer collateral synapses develop through different intracellular mechanisms.. *J. Neurosci.*, Τόμος 30, p. 11032–11042.
- Deitrich, R. A. & Erwin, V., 1996. Pharmacological effects of ethanol on the nervous. *CRC Press*.
- Dennis, S. H. και συν., 2016. Activation of Muscarinic M1 Acetylcholine Receptors Induces Long-Term Potentiation in the Hippocampus. *Cereb Cortex*, 26(1), p. 414–426.
- Diaz Perez, . H., Espinosa Villanueva, J. & Machado, 1991. Behavioral and hippocampal morphological changes induced by ethanol administered to pregnant rats.. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, Τόμος 625, p. 300–304.
- Dildy-Mayfield, J. & Harris, R., 1992. Acute and chronic ethanol exposure alters the function of hippocampal kainate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J Neurochem.*, 58(4), pp. 1569-72.
- Djukic, B. και συν., 2007. Conditional knock-out of Kir4.1 leads to glial membrane depolarization, inhibition of potassium and glutamate uptake, and enhanced short-term synaptic potentiation.. *J. Neurosci.*, Τόμος 27, p. 11354–11365.
- Dörje, F. και συν., 1991. Antagonist binding profiles of five cloned human muscarinic receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther*, Τόμος 2, pp. 727-33.
- Driscoll, C. D., Streissguth, A. P. & Riley, E. P., 1990. Prenatal Alcohol Exposure: Comparability of Effects in Humans and Animal Models. *Neurotoxicology and Teratology*, 12(3), pp. 231-7.
- Ekonomou, A. & Angelatou, F., 1999. Upregulation of NMDA receptors in hippocampus and cortex in the pentylene-tetrazol-induced “kindling” model of epilepsy. *Neurochemical Research*, Issue 24, pp. 1515-1522.
- Ekonomou, A., Smith, L. A. & Angelatou, F., 2001. Changes in AMPA receptor binding and subunit messenger RNA expression in hippocampus and cortex in the pentylene-tetrazole-induced “kindling” model of epilepsy. *Brain Res Mol Brain Res*. Issue 95, pp. 27-35.
- Ellender, T. J. et al., 2010. Priming of Hippocampal Population Bursts by Individual Perisomatic-Targeting Interneurons. *The Journal of Neuroscience*, 30(17), pp. 5979-91.

- Ericson, M., Löf, E., Stomberg, R. & Söderpalm, B., 2009. The Smoking Cessation Medication Varenicline Attenuates Alcohol and Nicotine Interactions in the Rat Mesolimbic Dopamine System. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 329(1), pp. 225-30.
- Fakahany, E. E. e.-., Cioffi, C. L., Abdellatif, M. M. & Miller, M. M., 1986. Competitive interaction of pirenzepine with rat brain muscarinic acetylcholine receptors. *Eur J Pharmacol*, Τόμος 2-3, pp. 237-47.
- Fancelow, S. M. & Dong, W. H., 2010. Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures?. *Neuron*, 1(65), pp. 7-19.
- Fanselow, M. S. & Dong, H.-W., 2010. Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures?. *Neuron*, 65(1), pp. 7-19..
- Fernandes, Y., Tran, S., Abraham, E. & Gerlai, R., 2014. Embryonic Alcohol Exposure Impairs Associative Learning Performance in Adult Zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 15(265), pp. 181-7.
- Ferraro, T. N., Golden, G. T. & Smith, G. G., 2004. Fine mapping of a seizure susceptibility locus on mouse Chromosome 1: nomination of *Kcnj10* as a causative gene.. *Mamm. Genome*, Τόμος 15, p. 239–251.
- Flint, A. C., Maisch, S. U., Weishaupt, H. J. & Kriegstein, R. A., 1997. NR2A subunit expression shortens NMDA receptor synaptic currents in developing neocortex. *J Neurosci. Journal of Neuroscience*, pp. 2469-2476.
- Flynn, D. D., Ferrari-DiLeo, G., Mash, D. C. & Levey, A. I., 1995. Differential regulation of molecular subtypes of muscarinic receptors in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 4(64), pp. 1888-91.
- Francesco Nicita, A. V. D. P. P. S. G. C. S. S. M. V. S. P. P. G. P. L. T. a. A. S., 2014. Seizures in fetal alcohol spectrum disorders: Evaluation of clinical, electroencephalographic, and neuroradiologic features in pediatric case series.. *Epilepsia*, Τόμος 55, pp. 60-66.
- Fredholm, B. B., 1990. Differential Sensitivity to Blockade by 4-Aminopyridine of Presynaptic Receptors Regulating [3H]Acetylcholine Release from Rat Hippocampus. *Journal of Neurochemistry*.
- Germano, I. M. & Sperber, E. F., 1998. Transplacentally induced neuronal migration disorders: An animal model for the study of the epilepsies. *Journal of Neuroscience Research*, 51(4), pp. 473-488.
- Gilbert, M., Racine, J. R. & Smith, K. G., 1985. Epileptiform burst responses in ventral vs dorsal hippocampal slices. *Brain Research*, 1-2(361), pp. 389-391.

- Gil-Mohapel, J., Boehme, F., Kainer, L. & Christie, B. R., 2010. Hippocampal cell loss and neurogenesis after fetal alcohol exposure: insights from different rodent models. *Brain Research Reviews*, 2(64), pp. 283-303.
- Glaaser, I. W. & Slesinger, P. A., 2017. Dual activation of neuronal G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels by cholesterol and alcohol. *Scientific Reports*, Τόμος 7.
- Granon, S. et al., 1995. Nicotinic and muscarinic receptors in the rat prefrontal cortex: differential roles in working memory, response selection and effortful processing. *Psychopharmacology*, Issue 119, p. 139–144.
- Gregory, K. J., Sexton, P. M. & Christopoulos, A., 2007. Allosteric Modulation of Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Curr Neuropharmacol*, 5(3), p. 157–167.
- Grishin, A. A., Benquet, P. & Gerber, U., 2005. Muscarinic receptor stimulation reduces NMDA responses in CA3 hippocampal pyramidal cells via Ca²⁺-dependent activation of tyrosine phosphatase. *Neuropharmacology*, 49(3), pp. 328-37.
- Gustafsson, B., Gavlan, M., Grafe, P. & Wigstrom, H., 1982. A transient outward current in a mammalian central neurone blocked by 4-aminopyridine. *Nature*, Τόμος 299, pp. 252-254.
- Hájos, N. et al., 2013. *The Journal of Neuroscience*, 33(28), pp. 11677-91.
- Hájos, N. et al., 1998. Distinct interneuron types express m2 muscarinic receptor immunoreactivity on their dendrites or axon terminals in the hippocampus. *Neuroscience*, 2(82), pp. 355-76.
- Häussler, U. et al., 2012. Septotemporal Position in the Hippocampal Formation Determines Epileptic and Neurogenic Activity in Temporal Lobe Epilepsy. *Cerebral Cortex*, 22(1), pp. 26-36.
- Heim, C. & Binder, B. E., 2012. Current research trends in early life stress and depression: review of human studies on sensitive periods, gene-environment interactions, and epigenetics.. *Experimental Neurology*, Issue 233, pp. 102-111.
- Heinemann, U. & Lux, H., 1977. Ceiling of stimulus induced rises in extracellular potassium concentration in the cerebral cortex of cat.. *Brain Res.*, Τόμος 120, p. 231–249.
- Heuser, K., Nagelhus, E. A., Taubøll, E. & Indahl, U., 2010. Variants of the genes encoding AQP4 and Kir4.1 are associated with subgroups of patients with temporal lobe epilepsy.. *Epilepsy Res.*, Τόμος 88, p. 55–64.
- Hibino, H. και συν., 2010. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles.. *Physiol. Rev.*, Τόμος 90, p. 291–366.

- Higashi, K., Fujita, A. & Inanobe, A., 2001. An inwardly rectifying K(+) channel, Kir4.1, expressed in astrocytes surrounds synapses and blood vessels in brain.. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, Τόμος 281, p. C922–C931.
- Hillmer, A. T. et al., 2014. Changes in the $\alpha 4\beta 2^*$ nicotinic acetylcholine system during chronic controlled alcohol exposure in nonhuman primates. *Drug and Alcohol Dependence*, 138(1), pp. 216-219.
- Hinterkeuser, S., Schröder, W., Hager, G. & Seifert, G., 2000. Astrocytes in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy display changes in potassium conductances.. *Eur J Neurosci.*, Τόμος 12, p. 2087–2096.
- Ho, I. H. & Murrell-Lagnado, R. D., 1999. Molecular determinants for sodium-dependent activation of G protein-gated K⁺ channels.. *J Biol Chem*, Τόμος 274, p. 8639–48.
- Hollmann, M. & Heinemann, S., 1994. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci.* Issue 17, pp. 31-108.
- Huang, W. C. και συν., 2007. Glucose and hippocampal neuronal excitability: role of ATP-sensitive potassium channels.. *J. Neurosci. Res.*, Τόμος 85, p. 1468–1477.
- Ieraci, A. & Herrera, D. G., 2007. Single alcohol exposure in early life damages hippocampal stem/progenitor cells and reduces adult neurogenesis. *Neurobiol Dis* , 3(26), pp. 597-60510.
- Jabs, R., Seifert, G. & Steinhäuser, C., 2008. Astrocytic function and its alteration in the epileptic brain.. *Epilepsia*, Τόμος 49, pp. 3-12.
- Jacobson, W. S., 1998 . Specificity of neurobehavioral outcomes associated with prenatal alcohol exposure. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 22(2), pp. 313-20.
- Janiri, L. και συν., 1994. Alterations of neocortical neuronal responses to acetylcholine and GABA in rats born to alcohol-dependent mothers.
- Jarrard, E. L., 1978. Selective hippocampal lesions: Differential effects on performance by rats of a spatial task with preoperative versus postoperative training. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 6(92), p. 1119–1127.
- Jauch, R. και συν., 2002. Effects of barium, furosemide, ouabaine and 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) on ionophoretically-induced changes in extracellular potassium concentration in hippocampal slices from rats and from patients with epilepsy.. *Brain Res*, Τόμος 925, p. 18–27.
- Jegla, T., Zmasek, C., Batalov, S. & Nayak, S., 2009. Evolution of the human ion channel set.. *Comb Chem High Throughput Screen*, Τόμος 12, pp. 2-23.

- Johnson, D. R. et al., 1991. Cigarette smoking and rate of gastric emptying: effect on alcohol absorption. *The BMJ*, 302(6767), p. 20–23.
- Jones, L. K., 1975. The Fetal Alcohol Syndrome. *Journal of Addictive Diseases*, 2(1-2), pp. 79-88.
- Jones, L. K. & Smith, D. W., 1973. Recognition of the Fetal Alcohol Syndrome in Early Infancy. *Lancet*, 302(7836), pp. 999-1001.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H. & Jessell, T. M., 2000. *Principles of Neural Science*. 4 ed. s.l.:McGraw-Hill.
- Karschin, C., Dissmann, E., Stühmer, W. & Karschin, A., 1996. IRK(1-3) and GIRK(1-4) inwardly rectifying K⁺ channel mRNAs are differentially expressed in the adult rat brain.. *J. Neurosci.*, Τόμος 16, p. 3559–3570.
- Kaufmann, K. και συν., 2013. ML297 (VU0456810), the first potent and selective activator of the GIRK potassium channel, displays antiepileptic properties in mice.. *ACS Chem. Neurosci.*, Τόμος 4, p. 1278–1286.
- Kenney, J. & Manahan-Vaughan, D., 2013. Learning-facilitated synaptic plasticity occurs in the intermediate hippocampus in association with spatial learning. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, Issue 5, p. 10.
- Kesmodel, U. S. και συν., 2019. Are Low-to-Moderate Average Alcohol Consumption and Isolated Episodes of Binge Drinking in Early Pregnancy Associated with Facial Features Related to Fetal Alcohol Syndrome in 5-Year-Old Children?. *Alcohol Clin Exp Res.*, 43(6), p. 1199–1212..
- Kim, J. J. & Fanselow, S. M., 1992. Modality-specific retrograde amnesia of fear.. *Science*, Issue 256, p. 675–677.
- Kivi, A. και συν., 2000. Effects of barium on stimulus-induced rises of [K⁺]_o in human epileptic non-sclerotic and sclerotic hippocampal area CA1.. *Eur J Neurosci.*, Τόμος 12, p. 2039–2048..
- Klausberger, T. & Somogyi, P., 2008. Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science*, Issue 321, pp. 53-57.
- KL, J., 1975. *The fetal alcohol syndrome*.. s.l.:Addict Dis.
- Koob, G. F. & Volkow, N. D., 2010. Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacology volume*, Issue 35, p. 217–238.
- Krahl, E. S., Berman, F. R. & Hannigan, H. J., 1999. Electrophysiology of hippocampal CA1 neurons after prenatal ethanol exposure. *Alcohol*, 2(17), pp. 125-31.

- Krapivinsky, G., Gordon, E. A., Wickman, K. & Velimirović, B., 1995. The G-protein-gated atrial K⁺ channel IKACH is a heteromultimer of two inwardly rectifying K(+) channel proteins.. *Nature*, Τόμος 374, p. 135–141.
- Krawczyk, M. et al., 2016. Hippocampal hyperexcitability in fetal alcohol spectrum disorder: Pathological sharp waves and excitatory/inhibitory synaptic imbalance. *Experimental Neurology*, Issue 280, p. 70–79.
- Kullmann, M. D., Asztely, F. & Walker, C. M., 2000. The role of mammalian ionotropic receptors in synaptic plasticity: LTP, LTD and epilepsy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Issue 57, pp. 1551-1561.
- Lee, P. και συν., 1990. Opioid-induced epileptiform bursting in hippocampal slices: higher susceptibility in ventral and dorsal hippocampus.. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Τόμος 253, pp. 545-551.
- Lefebvre, T., Gonzalez, B. J., Vaudry, D. & Desrues, L., 2009. Paradoxical effect of ethanol on potassium channel currents and cell survival in cerebellar granule neurons. *J Neurochem.*, pp. 1471-4159.
- Leung, Y. M., Kwan, C. Y. & Daniel, E. E., 2000. Block of inwardly rectifying K⁺ currents by extracellular Mg²⁺ and Ba²⁺ in bovine pulmonary artery endothelial cells. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, Τόμος 78, p. 751–756.
- Levey, A. και συν., 1991. Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies.. *J. Neurosci.*, Τόμος 11, p. 3218–3226.
- Levin, D. E. & Simon, B. B., 1998. Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. *Psychopharmacology*, Issue 138, p. 217–230.
- Llinas, R., 1985. Electronic transmission in the mammalian central nervous system. In.. *Gap junctions.*, p. 337–353.
- Lothman, E. W. & Bertram, E. H., 1993. Epileptogenic Effects of Status Epilepticus. *Epilepsia*, 34(1), pp. 59-70.
- Lynch, A. M., 2004. Long-term potentiation and memory. *Physiological Reviews*, Issue 84, pp. 87-136.
- M., P. και συν., 2001. Differential pH sensitivity of Kir4.1 and Kir4.2 potassium channels and their modulation by heteropolymerisation with Kir5.1.. *J. Physiol.*, Τόμος 532, p. 359–367.
- Maier, S. E. & West, J. R., 2001. Drinking patterns and alcohol-related birth defects. *Alcohol research & health*, 3(25), pp. 168-74.

- Majchrzak, M. J. & Dilsaver, S. C., 1992. Chronic treatment with ethanol alters the physiological action of nicotine. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 16(1), pp. 107-115.
- Marchi, M., Bocchieri, P., Garbarino, L. & Raiteri, M., 1988. Muscarinic inhibition of endogenous glutamate release from rat hippocampus synaptosomes. *Neuroscience Letters*, Τόμος 96, pp. 229-234.
- Marrs, J. A. et al., 2010. Zebrafish Fetal Alcohol Syndrome Model: Effects of Ethanol Are Rescued by Retinoic Acid Supplement. *Alcohol*, 44(7-8), pp. 707-15.
- Maruki, K., Izaki, Y., Nomura, M. & Yamauchi, T., 2001. Differences in paired-pulse facilitation and long-term potentiation between dorsal and ventral CA1 regions in anesthetized rats. *Hippocampus*, Issue 11, pp. 655-661.
- Marx, M., Haas, C. A. & Häuss, U., 2013. Differential vulnerability of interneurons in the epileptic hippocampus. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, Issue 7, p. 167.
- Matthews, D. A., Nadler, J. V., Lynch, G. S. & Cotman, C. W., 1974. Development of cholinergic innervation in the hippocampal formation of the rat. I. Histochemical demonstration of acetylcholinesterase activity. *Developmental Biology*, 1(36), pp. 130-41.
- Mattson, N. S. et al., 1998 . Neuropsychological comparison of alcohol-exposed children with or without physical features of fetal alcohol syndrome. *Neuropsychology*, 12(1), pp. 146-53.
- May, P. A. et al., 2014 . Prevalence and Characteristics of Fetal Alcohol Spectrum Disorders. *Pediatrics*, 134(5), pp. 855-66.
- May, P. A. et al., 2011 . Prevalence of Children With Severe Fetal Alcohol Spectrum Disorders in Communities Near Rome, Italy: New Estimated Rates Are Higher Than Previous Estimates. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(6), pp. 2331-51.
- Mazarati, A., Lundström, L., Sollenberg, U. & Shin, D., 2006. Regulation of kindling epileptogenesis by hippocampal galanin type 1 and type 2 receptors: the effects of subtype-selective agonists and the role of G-protein-mediated signaling.. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Τόμος 318, p. 700–708.
- McDonald, W. J., Garofalo, A. E., Hood, T. & Sackellares, J. C., 1991. Altered excitatory and inhibitory amino acid receptor binding in hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *Annals of Neurology*, Issue 5, pp. 529-541.
- McHugh, B. S., Fillenz, M., Lowry, P. J. & Rawlins, J., 2011. Brain tissue oxygen amperometry in behaving rats demonstrates functional dissociation of dorsal and ventral hippocampus during spatial processing and anxiety. *European Journal of Neuroscience*, p. 322–337.

- Meilleur, S., Carmant, L. & Psarropoulou, C., 2000. Immature rat convulsions and long-term effects on hippocampal cholinergic neurotransmission. *Neuroreport*, 11(3), pp. 521-4.
- Mikroulis, A., Lisgaras, C. P. & Psarropoulou, C., 2018. Immature Status Epilepticus: In Vitro Models Reveal Differences in Cholinergic Control and HFO Properties of Adult CA3 Interictal Discharges in Temporal vs Septal Hippocampus. *Neuroscience*, Τόμος 369, pp. 386-398.
- Miller, M. W., 1996. Limited ethanol exposure selectively alters the proliferation of precursor cells in the cerebral cortex. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 1(20), pp. 139-4310.
- Miller, W. M., 1995. Generation of neurons in the rat dentate gyrus and hippocampus: effects of prenatal and postnatal treatment with ethanol. *Alcohol*, 6(19), pp. 1500-9.
- Miner, L. L. & Collins, C. A., 1989. Strain comparison of nicotine-induced seizure sensitivity and nicotinic receptors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, Issue 33, p. 469–475.
- Mohammad, S., Page, S. J. & Wang, L., 2020. Kcnn2 blockade reverses learning deficits in a mouse model of fetal alcohol spectrum disorders. *nature neuroscience*, Τόμος 23, p. 533–543.
- Monk, B., Leslie, F. & Thomas, J., 2012. The effects of perinatal choline supplementation on hippocampal cholinergic development in rats exposed to alcohol during Brain Growth Spurt. *Hippocampus*, Τόμος 8, pp. 1750-7.
- Montgomery, K. S. et al., 2018. Effects of Ethanol and Varenicline on Female Sprague-Dawley Rats in a Third Trimester Model of Fetal Alcohol Syndrome. *Alcohol*, Issue 71, pp. 75-87.
- Monyer, H. et al., 1994. Development and regional expression in the rat brain and fun. *Neuron*, 12(3), pp. 529-40.
- Moser, B. M., Moser, I. E., Forrest, E. & Andersen, P., 1995. Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Issue 92, p. 9697–9701.
- Moser, E., Moser, B. M. & Andersen, P., 1993. Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *Journal of Neuroscience*, Issue 13, p. 3916–3925.
- Moshé, S. L., 1987. Epileptogenesis and the Immature Brain. *Epilepsia*, 28(1), pp. 3-14.
- Mouritzen Dam, A., 1982. Hippocampal neuron loss in epilepsy and after experimental seizures. *Acta Neurologica Scandinavica*, 66(6), pp. 601-642.

- Mulholland, P. J. & Becker, H. C., 2010. Small Conductance Calcium-Activated Potassium Type 2 Channels Regulate Alcohol-Associated Plasticity of Glutamatergic Synapses. *Biological psychiatry*, 69(7), pp. 625-32.
- Nicholson, C. & Syková, E., 1998. Extracellular space structure revealed by diffusion analysis.. *Trends Neurosci.*, Τόμος 21, p. 207–215.
- Nicita, F. et al., 2014. Seizures in fetal alcohol spectrum disorders: Evaluation of clinical, electroencephalographic, and neuroradiologic features in a pediatric case series. *Epilepsia*, 6(55), p. 60–66.
- Nio, E., Kogure, K., Yae, T. & Onodera, H., 1991. The effects of maternal ethanol exposure on neurotransmission and second messenger systems:: a quantitative autoradiographic study in the rat brain. *Developmental Brain Research*, 1(62), pp. 51-60.
- Nishida, M. & MacKinnon, R., 2002. Structural basis of inward rectification: cytoplasmic pore of the G protein-gated inward rectifier GIRK1 at 1.8 Å resolution.. *Cell*, Τόμος 111, p. 957–965.
- Noronha, B., Harris, J. & Crabbe, 2014. Neubiology of alcohol dependence.
- O'Keefe, J. & Burgess, N., 2005. Dual Phase and Rate Coding in Hippocampal Place Cells, Theoretical Significance and Relationship to Entorhinal Grid Cells. *Hippocampus*, Issue 15, pp. 853-866.
- O'Keefe, J. & Dostrovsky, J., 1971. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research*, Issue 34, p. 171–175.
- Oki, T., Takagi, Y. & Inagaki, S., 2005. Quantitative analysis of binding parameters of [3H]N-methylscopolamine in central nervous system of muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Brain Res Mol Brain Res.*, Τόμος 133, pp. 6-11.
- Olton, D. S., 1978. *Cognitive Processes in Animal Behavior*. s.l.:s.n.
- Padgett, C., 2012. Methamphetamine-evoked depression of GABA(B) receptor signaling in GABA neurons of the VTA.. *Neuron*, Τόμος 73, p. 978–989.
- Pandis, C., Sotiriou, E., kouvaras, E. & Asprodini, E., 2006. Differential expression of NMDA and AMPA receptor subunits in rat dorsal and ventral hippocampus. *Neuroscience*, 140(1), pp. 163-175.
- Papathodoropoulos, C. & Kostopoulos, G., 2000. Decreased ability of rat temporal hippocampal CA1 region to produce long-term potentiation. *Neuroscience Letters*, Issue 279, pp. 177-180.

- Papathodoropoulos, C., Moschovos, C. & Kostopoulos, G., 2005. Greater contribution of N-methyl-D-aspartic acid receptors in ventral compared to dorsal hippocampal slices in the expression and long-term maintenance of epileptiform activity. *Neuroscience*, 3(135), pp. 765-779.
- Parnell, S. E., O'Leary-Moore, S. K., Godin, E. A. & Dehart, D., 2009. Magnetic resonance microscopy defines ethanol-induced brain abnormalities in prenatal mice: effects of acute insult on gestational day 8. *Alcohol Clin Exp Res*.
- Patil, N. και συν., 1995. A potassium channel mutation in weaver mice implicates membrane excitability in granule cell differentiation.. *Nat. Genet.*, Τόμος 11, p. 126–129.
- Pegues, M. P. et al., 2003. Anterior hippocampal volume reduction in male patients with schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 2-3(60), pp. 105-115.
- Perkins, A. E., 2014. Characterization of the Hippocampal Acetylcholine System in a Rodent Model of Fetal Alcohol Syndrome. In: University of South Carolina: s.n.
- Perreault, P. & Avoli, M., 1991. Physiology and pharmacology of epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat hippocampal slices.. *J Neurophysiol*, 65(4), pp. 771-785.
- Pessia, M., Imbrici, P., D'Adamo, M. C. & Salvatore, L., 2001. Differential pH sensitivity of Kir4.1 and Kir4.2 potassium channels and their modulation by heteropolymerisation with Kir5.1.. *J. Physiol.*, Τόμος 532, p. 359–367.
- Picard, F., Bertrand, S., Steinlein, K. O. & Bertrand, D., 1999. Mutated nicotinic receptors responsible for autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy are more sensitive to carbamazepine. *Epilepsia*, Issue 40, p. 1198–1209.
- Psarropoulou, C. & Avoli, M., 1996. Developmental features of 4-aminopyridine induced epileptogenesis. *Brain Res Dev Brain Res*, 94(1), pp. 52-9.
- Puglia, M. & Valenzuela, C., 2010. Repeated third trimester-equivalent ethanol exposure inhibits long-term potentiation in the hippocampal CA1 region of neonatal rats.. *Alcohol*, 3(44), pp. 283-90.
- Rahman, S., Engleman, E. A. & Bell, R. L., 2015. Nicotinic Receptor Modulation to Treat Alcohol and Drug Dependence. *Frontiers in Neuroscience*, 15(8), p. 426.
- Rahman, S., Engleman, E. A. & Bell, R. L., 2016. Chapter Six - Recent Advances in Nicotinic Receptor Signaling in Alcohol Abuse and Alcoholism. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Issue 137, pp. 183-201.
- Redila, V. A. και συν., 2006. Hippocampal cell proliferation is reduced following prenatal ethanol exposure but can be rescued with voluntary exercise. *Hippocampus*, 3(16), pp. 305-1110.

- Rempel-Clower, N. L., Zola, S. M., Larry, R. S. & Amaral, D. G., 1996. Three Cases of Enduring Memory Impairment after Bilateral Damage Limited to the Hippocampal Formation. *Journal of Neuroscience*, 16(16), pp. 5233-5255.
- Roberts, W. G., Woodhams, L. P., Polak, M. J. & Crow, T., 1984. Distribution of neuropeptides in the limbic system of the rat: the hippocampus. *Neuroscience*, pp. 35-77.
- Robles, N. & Sabriá, J., 2008. Effects of moderate chronic ethanol consumption on hippocampal nicotinic receptors and associative learning. 89(4), pp. 497-503.
- Roebuck, M. T., Mattson, N. S. & Riley, P. E., 1999. Behavioral and psychosocial profiles of alcohol-exposed children. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 23(6), pp. 1070-6.
- Rogawski, A. M. & Donevan, D. S., 1999. AMPA receptors in epilepsy and as targets for antiepileptic drugs. *Adv Neurol. Issue 79*, pp. 947-963.
- Rubert, G., Miñana, R., Pascual, M. & Guerri, C., 2006. Ethanol exposure during embryogenesis decreases the radial glial progenitor pool and affects the generation of neurons and astrocytes. *J. Neurosci.*, Τόμος 84, p. 483–496.
- Ruchi, M. et al., 2016. Mapping the electrophysiological and morphological properties of CA1 pyramidal neurons along the longitudinal hippocampal axis. *Hippocampus*, 26(3), p. 341–361..
- Ruth, E. R., Collier, J. T. & Routtenberg, A., 1982. Topography between the entorhinal cortex and the dentate septotemporal axis in rats: I. Medial and intermediate entorhinal projecting cells *J. Comp. Neurol.* 209, .. Issue 209, pp. 68-78.
- Sanderson, J., Donald, P. L. & Valenzuela, C., 2009. Modulation of GABAergic and glutamatergic transmission by ethanol in the developing neocortex: an in vitro test of the excessive inhibition hypothesis of fetal alcohol spectrum disorder.. *Neuropharmacology*, 56(2), pp. 541-55.
- Scanziani, M., Gahwiler, B. & Thompson, S., 1995. Presynaptic inhibition of excitatory synaptic transmission by muscarinic and metabotropic glutamate receptor activation in the hippocampus: are Ca²⁺ channels involved?. *Neuropharmacology*, 34(11), pp. 1549-1557.
- Schlingloff, D. et al., 2014. Mechanisms of Sharp Wave Initiation and Ripple Generation. *Journal of Neuroscience* , 34(34), pp. 11385-11398.
- Schönberger, J., Draguhn, A. & Both, M., 2014. Lamina-specific contribution of glutamatergic and GABAergic potentials to hippocampal sharp wave-ripple complexes. *Frontiers in Neural Circuits*, 103(8).

- Scoville, W. B. & Milner, B., 1957. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 1(20), p. 11–21..
- Seifert, G., Carmignoto, G. & Steinhäuser, C., 2010. Astrocyte dysfunction in epilepsy.. *Brain Res Rev.*
- Seifert, G. και συν., 2009. Analysis of astroglial K⁺ channel expression in the developing hippocampus reveals a predominant role of the Kir4.1. *J Neurosci.*, Τόμος 29, p. 7474–7488.
- Shaoyu, G. & Dani, J. A., 2005. Nicotinic Acetylcholine Receptors at Glutamate Synapses Facilitate Long-Term Depression or Potentiation. *J Neurosci*, Τόμος 26, pp. 6084-6091.
- Sheffler, D. J. και συν., 2009. A novel selective muscarinic acetylcholine receptor subtype 1 antagonist reduces seizures without impairing hippocampus-dependent learning. *Mol Pharmacol*, 76(2), pp. 356-68.
- Signorini, S. και συν., 1997. Normal cerebellar development but susceptibility to seizures in mice lacking G protein-coupled, inwardly rectifying K⁺ channel GIRK2.. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Τόμος 94, p. 923–927.
- Slawecki, J. C., Thomas, D. J., Riley, P. E. & Ehlers, L. C., 2004. Neurophysiologic consequences of neonatal ethanol exposure in the rat. *Alcohol*, 2-3(34), pp. 187-96.
- Slesinger, P. A. και συν., 1996. Functional effects of the mouse weaver mutation on G protein-gated inwardly rectifying K⁺ channels.. *Neuron*, Τόμος 16, p. 321–331.
- Slesinger, P. A., Reuveny, E. & Jan Y., .. N., 1995. Identification of structural elements involved in G protein gating of the GIRK1 potassium channel.. *Neuron*, Τόμος 15, p. 1145–1156.
- Slesinger, P. A., Reuveny, E., Jan Y., N. & Jan, L. Y., 1995. Identification of structural elements involved in G protein gating of the GIRK1 potassium channel.. *Neuron*, Τόμος 15, p. 1145–1156.
- Sliwowska, J. H. et al., 2008. Effects of Prenatal Ethanol Exposure on Regulation of Basal Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Activity and Hippocampal 5-HT1A Receptor mRNA Levels in Female Rats Across the Estrous Cycle. *Psychoneuroendocrinology*, 33(8), pp. 1111-23..
- Sotiriou , E., Papatheodoropoulos, C. & Angelatou, F., 2005. Differential Expression of Gamma-Aminobutyric Acid--A Receptor Subunits in Rat Dorsal and Ventral Hippocampus. *Journal of Neuroscience Research*, 5(82), pp. 690-700.

- Sotiriou, E., Angelatou, F. & Papatheodoropoulos, C., 2019. Increased molecular plasticity along the septotemporal axis of the hippocampus is associated with network functioning. *BioRxiv*.
- Stringer, J. L. & Lothman, E. W., 1992. Reverberatory seizure discharges in hippocampal-parahippocampal circuits. *Experimental Neurology*, 116(2), pp. 198-203.
- Sulik, K. K., 2005. Genesis of Alcohol-Induced Craniofacial Dysmorphism. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, 230(6), pp. 366-75.
- Sulik, K. K., Johnston, C. M. & Webb, A. M., 1981 . Fetal Alcohol Syndrome: Embryogenesis in a Mouse Model. *Science*, 214(4523), pp. 936-8.
- Sun, Y. et al., 2009. Binge drinking during pregnancy and risk of seizures in childhood: a study based on the Danish National Birth Cohort. *American Journal of Epidemiology*, Issue 169, pp. 313-322.
- Taléns-Visconti, R., Sanchez-Vera, I., Kostic, J. & Perez-Arago, M. A., 2011. Neural differentiation from human embryonic stem cells as a tool to study early brain development and the neuroteratogenic effects of ethanol.. *Stem Cells Dev.*, Τόμος 20, p. 327–339.
- Terry Jr, V. A., Hernandez, M. C., Buccafusco, J. J. & Gattu, M., 2000. Deficits in Spatial Learning and Nicotinic-Acetylcholine Receptors in Older, Spontaneously Hypertensive Rats. *Neuroscience*, 101(2), pp. 357-68.
- Thomas, J. D., Idrus, N. M., Monk, B. R. & Dominguez, H. D., 2010 . Prenatal Choline Supplementation Mitigates Behavioral Alterations Associated With Prenatal Alcohol Exposure in Rats. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 88(10), pp. 827-37.
- Toyoda, I., Bower, M. R., Leyva, F. & Buckmaster, S. P., 2013. Early Activation of Ventral Hippocampus and Subiculum during Spontaneous Seizures in a Rat Model of Temporal Lobe Epilepsy. 27(33), pp. 11100-11115.
- Toyohara, J., Sakata, M. & Ishiwata, K., 2014. *Chapter Six - Human Brain Imaging of Acetylcholine Receptors*. s.l.:s.n.
- Tran, T. D. et al., 2000. Critical periods for the effects of alcohol exposure on brain weight, body weight, activity and investigation. *Behavioural Brain Research*, 1(116), pp. 99-11010.
- Tsukamoto-Yasui, M. et al., 2007. Active hippocampal networks undergo spontaneous synaptic modification. *Plos One*, 11(2), p. 1250.

- Ulrich-Lai, M. Y. & Herman, P. J., 2009. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat. Rev. Neurosci.* *Nature Reviews Neuroscience*, Issue 10, pp. 397-409.
- Valenzuela, C. & Zucca, S., 2010. Low concentrations of alcohol inhibit BDNF-dependent GABAergic plasticity via L-type Ca²⁺ channel inhibition in developing CA3 hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci*.
- Valenzuel, C. F., Morton, R. A. & Diaz, M. R., 2012. Does moderate drinking harm the fetal brain? Insights from animal models. *Trends Neurosci*, 35(5), p. 284–292..
- Vallés, S., Pitarch, J., Renau-Piqueras, J. & Guerri, C., 1997. Ethanol exposure affects glial fibrillary acidic protein gene expression and transcription during rat brain development.. *J. Neurochem.*, Τόμος 69, p. 2484–2493..
- Van Groen, T. & Lopes da Silva, H. F., 1985. Septotemporal distribution of entorhinal projections to the hippocampus in the cat: electrophysiological evidence. *The Journal of Comparative Neurology*, Issue 238, pp. 1-9.
- Van Paesschen, W. et al., 1997. Quantitative neuropathology and quantitative magnetic resonance imaging of the hippocampus in temporal lobe epilepsy. *Annals of Neurology*, 42(5), pp. 756-766.
- Vestergaard, M. et al., 2005. Prenatal exposure to cigarettes, alcohol, and coffee and the risk for febrile seizures. *Pediatrics*, Issue 116, pp. 1089-1094.
- Vicini, S. και συν., 1998. Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *Journal of Neurophysiology*, Issue 79, pp. 555-566.
- Volkow, D. N. & Baler, D. R., 2014. Addiction Science: Uncovering Neurobiological Complexity. *Neuropharmacology*, Issue 76, pp. 235-49.
- Wafford, K. A., Burnett, D. M., Leidenheimer, N. J. & Burt, D. R., 1991. Ethanol sensitivity of the GABAA receptor expressed in xenopus oocytes requires 8 amino acids contained in the γ 2L subunit. *Neuron*, pp. 27-33.
- Wallraff, A., Kohling, R. & Theis M., M., 2006. The impact of Astrocytic Gap Junctional Coupling on Potassium Buffering in the Hippocampus.. *J Neurosci*..
- Wang, W., Whorton, M. R. & MacKinnon, R., 2014. Quantitative analysis of mammalian GIRK2 channel regulation by G proteins, the signaling lipid PIP2 and Na⁺ in a reconstituted system.. *Elife*, Τόμος 3.
- Watson, C. J., Baghdoyan, H. A. & Lydic, R., 2010. Neuropharmacology of Sleep and Wakefulness. *Sleep Med Clin*, 5(4), p. 513–528..

- Weinberg, J. & Gallo, P. V., 1982. Prenatal Ethanol Exposure: Pituitary-Adrenal Activity in Pregnant Dams and Offspring. *Neurobehavioral toxicology and teratology*, 4(5), pp. 515-20.
- Weitz, A. J. et al., 2015. Optogenetic fMRI Reveals Distinct, Frequency-Dependent Networks Recruited by Dorsal and Intermediate Hippocampus Stimulations. *Neuroimage*, Issue 107, pp. 229-241.
- West, J. R., 1987. Fetal alcohol-induced brain damage and the problem of determining temporal vulnerability: a review. *Alcohol Drug Res* , 5-6(7), pp. 423-41.
- West, R. J., Hamre, M. K. & Cassel, D. M., 1986. Effects of ethanol exposure during the third semester equivalent on neuron number in rat hippocampus and dentate gyrus. *Alcohol*, Issue 10, pp. 190-7.
- Whittaker, P. V., 1990. The Contribution of Drugs and Toxins to Understanding of Cholinergic Function. *Trends in Pharmacological Sciences*, 11(1), pp. 8-13..
- Wigal, T. & Amsel, A., 1990. Behavioral and neuroanatomical effects of prenatal, postnatal, or combined exposure to ethanol in weanling rats. *Behavioral Neuroscience*, 1(104), pp. 116-2610.
- Williams, J. M., Guevremont , D., Keennard , T. J. & Mason-Park, 2003. Long-term regulation of N-methyl-D-aspartate receptor subunits and associated synaptic proteins following hippocampal synaptic plasticity Neuroscience 118:. *Neuroscience* , Issue 118, pp. 1003-1013.
- Wise, R. A. & Koob, G. F., 2014. The Development and Maintenance of Drug Addiction. *Neuropsychopharmacology volume*, Issue 39, pp. 254-262.
- Wise, R. A. & Koob, G. F., 2014. The Development and Maintenance of Drug Addiction. *Neuropsychopharmacology*, Issue 39, pp. 254-262.
- Witter, P. M., 1986. A survey of the anatomy of the hippocampal formation, with emphasis on the septotemporal organization of its intrinsic and extrinsic connections. *Adv. Exp. Med. Biol.* 203,.. Issue 203, pp. 67-82.
- Yamada, K. και συν., 2001. Protective role of ATP-sensitive potassium channels in hypoxia-induced generalized seizure.. *Science*, Τόμος 292, p. 1543–1546.
- Ylinen, A. et al., 1995. Sharp Wave-Associated High-Frequency Oscillation (200 Hz) in the Intact Hippocampus: Network and Intracellular Mechanisms. *The Journal of Neuroscience*, 15(1), pp. 30-46.
- Yu, F. & Catterall, W., 2004. The VGL-chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis.. *Sci STKE*.

Zhang, X., Sliwowska, J. H. & Weinberg, J., 2005. Prenatal Alcohol Exposure and Fetal Programming: Effects on Neuroendocrine and Immune Function. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, 230(6), pp. 376-88.

Zola-Morgan, S. & Squire, L. R., 1986. Memory impairment in monkeys following lesions limited to the hippocampus. *Behavioral Neuroscience*, 2(100), p. 155–160.

Zuo, Y., Nagata, K., Yeh, J. Z. & Narahas, T., 2004. Single-Channel Analyses of Ethanol Modulation of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Alcoholism*, 28(5), pp. 688-696.