



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΩΝ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Χολινεργικές δράσεις στον ιππόκαμπο επίμυος
μετά από προκλητούς σπασμούς κατά την ανάπτυξη.

Διδακτορική διατριβή

Απόστολος Β. Μικρούλης

Ιωάννινα 2013





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΩΝ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Χολινεργικές δράσεις στον ιππόκαμπο επίμυος
μετά από προκλητούς σπασμούς κατά την ανάπτυξη.

Διδακτορική διατριβή

Απόστολος Β. Μικρούλης

Ιωάννινα 2013



Τριμελής επιτροπή (αλφαβητικά):

1. Αικατερίνη Αντωνίου, Επίκουρη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
2. Γεώργιος Κωστόπουλος, Καθηγητής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Πατρών.
3. Αικατερίνη Ψαρροπούλου, Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ζώων του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών της Σχολής Επιστημών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (επιβλέπουσα).

Επταμελής επιτροπή (αλφαβητικά):

1. Αικατερίνη Αντωνίου, Επίκουρη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
2. Σπυρίδων Κονιτσιώτης, Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
3. Αθανάσιος Κυρίτσης, Καθηγητής Νευρολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
4. Ευάγγελος Κωλέττας, Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Μοριακή Φυσιολογία της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
5. Γεώργιος Κωστόπουλος, Καθηγητής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Πατρών.
6. Χαράλαμπος Λαμπρακάκης, Λέκτορας Νευροφυσιολογίας του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών της Σχολής Επιστημών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
7. Αικατερίνη Ψαρροπούλου, Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ζώων του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών της Σχολής Επιστημών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (επιβλέπουσα).



Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω:

- την τριμελή επιτροπή και την επιβλέπουσα καθηγήτρια, Αικατερίνη Ψαρροπούλου, για την καθοδήγηση,
- την Δρ. Αικατερίνη Αντωνίου για την διευκόλυνση που μας παρείχε ως προς την παροχή πειραματοζώων,
- την Δρ. Ευγενία Παπαλέξη για την αρχική καθοδήγηση στις in vivo διαδικασίες (ενέσεις, συμπεριφορική αξιολόγηση κρίσεων),
- τον Δρ. Ρομάν Λιάσκο για την τεχνική υποστήριξη και τις μετακινήσεις των πειραματοζώων προς/από το εργαστήριο,
- τον Δρ. Χαράλαμπο Λαμπρακάκη για τις εύστοχες και χρήσιμες προτάσεις του για τον πειραματικό σχεδιασμό,
- την Δρ. Ευθυμία Ασπροδίνη (Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας) που μας παρείχε το δικό της καταγραφικό μηχάνημα θερμικού χαρτιού για ένα εκτεταμένο διάστημα,
- την Δρ. Χριστίνα Μπάτση που και τον πτυχιακό φοιτητή του εργαστηρίου του Δρ. Λαμπρακάκη, Χρήστο Γαλάνη, που επίσης βοηθούσαν στην μεταφορά των πειραματοζώων,
- τον Δρ. Κώστα Παπαθεοδωρόπουλο (Πανεπιστήμιο Πατρών) για τις χρήσιμες συμβουλές του σχετικά με το τεχνικό τμήμα των εξωκυττάριων καταγραφών,
- τον Δρ. Χαράλαμπο Σταμάτη, το προσωπικό και τους πτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές του εργαστηρίου του, που μας δάνειζαν εξοπλισμό και μας παρείχαν μεταξύ άλλων απαραίτητα υλικά (απιονισμένο νερό, πάγο),
- το προσωπικό της πειραματικής μονάδας ζώων της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την εξυπηρέτηση,
- το εργαστήριο του Δρ. Ευσταθίου Χατζηλουκά που μας παρείχε υπερκάθαρο νερό,
- τους διδάσκοντες του τμήματος Β.Ε.Τ. για το γενικό υπόβαθρο που μου παρείχαν κατά τις βασικές σπουδές μου,
- τον Δρ. Νικόλαο Π. Ευμοιρίδη (Καθηγητή Τμήματος Χημείας του Π.Ι.), για την χρησιμότητα των συγγραμμάτων του περί ηλεκτροχημείας που μου δώρισε,
- το Ίδρυμα Μποδοσάκη, για την υποτροφία που μου παρείχε κατά το μεγαλύτερο τμήμα του πειραματικού έργου της διατριβής,
- τους γονείς μου, για την οικονομική στήριξη καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.



Περιεχόμενα

<i>Abstract - Περίληψη</i>	1
<i>Εισαγωγή</i>	5
1.1. Επιληψία	6
1.1.1 Status Epilepticus (Wasterlain and Treiman, 2006)	6
Status epilepticus κατά την ανάπτυξη	6
Επιπτώσεις του Status epilepticus	7
Πειραματικά μοντέλα Status epilepticus	7
1.1.2 Εκφορτίσεις κρισικού και μεσοκρισικού τύπου	7
Επιληπτοειδείς εκφορτίσεις in vitro	8
1.2. Ιππόκαμπος-Ενδορρινικός φλοιός	9
1.2.1 Γενικά	9
1.2.2 Μορφολογία-Ανατομία	9
Ιππόκαμπος	9
Διαφορές κροταφικού-διαφραγματικού ιπποκάμπου	10
Ενδορρινικός φλοιός	11
1.2.3 Λειτουργία	11
1.3. Ακετυλοχολίνη και μουςκαρινικοί υποδοχείς	13
1.3.1 Γενικά	13
1.3.2 Μουςκαρινικοί υποδοχείς	13
1.4. Σκοπός της εργασίας	16
<i>Μέθοδοι</i>	17
2.1. Υλικά	18
2.1.1 Πειραματόζωα	18
2.1.2 Διαλύματα, φάρμακα, χημικά	18
2.2. Διαδικασία	19
2.2.1 In vivo διαδικασία	19
2.2.2 Προετοιμασία της in vitro διαδικασίας	19

2.2.3	Προετοιμασία του ιστού και καταγραφή	20
2.3.	Χειρισμός δεδομένων - Στατιστική	21
2.3.1	Ελεγχόμενες μεταβλητές	21
2.3.2	Ανάλυση και εξαγωγή αποτελεσμάτων	21
	Αποτελέσματα	23
3.0.1	Περιγραφή της παρουσίασης των αποτελεσμάτων σε πίνακες	24
3.0.2	Γενικά σχόλια για τις μεταβλητές που ελέγχθηκαν	24
3.0.3	Έλεγχος κανονικότητας συνεχών μεταβλητών	25
3.0.4	Περιγραφή του αποτελέσματος των φαρμάκων	25
1.	Εσερίνη (10μM)	26
2.	Ατροπίνη (1μM)	31
3.	Εσερίνη (10μM) και Ατροπίνη (1μM)	34
4.	Καρβαχόλη (1μM)	36
5.	Σύγκριση κροταφικών-διαφραγματικών τομών ως προς τη συχνότητα εκφορτίσεων	39
6.	Σύγκριση κροταφικών-διαφραγματικών τομών παρουσία εσερίνης (10μM) ως προς τη συχνότητα εκφορτίσεων	41
7.	Σύγκριση κροταφικών-διαφραγματικών τομών παρουσία ατροπίνης (1μM) ως προς τη συχνότητα εκφορτίσεων	44
8.	Σύγκριση κροταφικών-διαφραγματικών τομών παρουσία καρβαχόλης (1μM) ως προς τη συχνότητα εκφορτίσεων	46
9.	Σύγκριση τομών φυσιολογικών-PTZ πειραματοζώων ως προς τη συχνότητα εκφορτίσεων	48
10.	Σύγκριση τομών φυσιολογικών και PTZ ζώων παρουσία εσερίνης (10μM) ως προς τη συχνότητα εκφορτίσεων	49
11.	Σύγκριση τομών φυσιολογικών και PTZ ζώων παρουσία ατροπίνης (1μM) ως προς τη συχνότητα εκφορτίσεων	52
12.	Σύγκριση τομών φυσιολογικών και PTZ ζώων παρουσία καρβαχόλης (1μM) ως προς τη συχνότητα εκφορτίσεων	54
13.	Σύγκριση μοντέλου tENY άνευ Mg^{2+} και αμινοπυριδίνης (50μM) ως προς τη συχνότητα εκφορτίσεων	56
14.	Σύγκριση του μοντέλου με tENY άνευ μαγνησίου κα του μοντέλου της αμινοπυριδίνης παρουσία εσερίνης (10μM) ως προς τη συχνότητα εκφορτίσεων	57

Περιεχόμενα	
15.	Σύγκριση του μοντέλου με τΕΝΥ άνευ μαγνησίου κα του μοντέλου της αμινοπυριδίνης παρουσία ατροπίνης (1μM) ως προς τη συχνότητα εκφορτίσεων
	60
16.	Σύγκριση του μοντέλου με τΕΝΥ άνευ μαγνησίου κα του μοντέλου της αμινοπυριδίνης παρουσία καρβαχόλης (1μM) ως προς τη συχνότητα εκφορτίσεων
	62
17.	Σύγκριση τομών αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων ως προς τη συχνότητα εκφορτίσεων
	64
3.0.5	Συνδυασμένες τομές ιπποκάμπου-ενδορρινικού φλοιού
	66
3.0.6	Δραστηριότητα του ενδορρινικού φλοιού
	66
18.	Σύνδεση μεταξύ CA3 και ενδορρινικού φλοιού
	67
Συζήτηση	
	73
4.1.	Γενικές αρχικές τάσεις
	74
4.2.	Ενδογενής ακετυλοχολίνη
	74
4.3.	Πιθανή εξήγηση της μουσκαρινικής ρύθμισης επί της συχνότητας των επιληπτοειδών εκφορτίσεων μεσοκρινικού τύπου.
	75
4.4.	Συνδυασμένες τομές ιπποκάμπου-ενδορρινικού φλοιού
	75
4.5.	Πιθανή εξήγηση των διαφορών σε σχέση με το μοντέλο πρόκλησης επιληπτοειδών εκφορτίσεων in vitro (τΕΝΥ άνευ μαγνησίου και τΕΝΥ με 4-αμινοπυριδίνη)
	76
4.6.	Τεχνικά σχόλια
	77
4.6.1	Επιλογή στατιστικών και αριθμητικών μεθόδων
	77
4.6.2	Σχετικά με την συμπερίληψη θηλυκών πειραματοζώων στο πείραμα
	77
4.7.	Μελλοντικές κατευθύνσεις
	78
Παράρτημα	
	81
5.1.	Τμήμα 1. Αναλυτικός υπολογισμός απόκλισης Jensen-Shannon
	82
5.2.	Τμήμα 2. Εξέταση κανονικότητας μεταβλητών
	83
5.3.	Τμήμα 3. Συγκρίσεις αρσενικών-θηλυκών
	89
Σύγκριση τομών αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων παρουσία εσερίνης (10μM)	
	89
Σύγκριση τομών αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων παρουσία ατροπίνης (1μM)	
	92
Σύγκριση τομών αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων παρουσία καρβαχόλης (1μM)	
	95
Αναφορές	
	99



Abstract - Περίληψη

An early-life Status Epilepticus occurrence may be linked to enhanced long-term seizure recurrence facilitation and cognitive impairment. In this study an in vivo model of sustained generalized seizures is applied to immature rats and the long-term cholinergic/muscarinic –a neuromodulatory system implicated both in seizure generation and physiological cognitive function- effects are evaluated in in vitro preparations of septal and temporal hippocampus –a structure associated both with the most common form generalized epilepsy, temporal lobe epilepsy, and crucial processes for memory and learning- under interictal-like epileptiform activity induction –since interictal spiking may be facilitating seizure generation and is linked to transient cognitive impairment- to account for the increased neuronal excitability or synchronization, resembling similar manifestations in humans.

A total of 149 (using no more than 2 slices per animal) transverse septal or temporal hippocampal slices from adult Sprague-Dawley rats, normal (n=58) or pentylenetetrazole (PTZ)-treated (n=41) (where a >20 min generalized convulsion had been provoked at postnatal day 20 by a 60-90mg/kg PTZ i.p. injection) were perfused with aCSF (i) with nominally 0-Mg²⁺ or (ii) containing 50μM 4-aminopyridine (4-AP). CA3 area interictal like epileptiform discharges (IEDs) were recorded extracellularly and their rates of occurrence were quantified in Hz. In a subset of the temporal slices (n=17) the entorhinal cortex was preserved, and simultaneous recordings were made in the CA3a pyramidal field and the MECV-VI layers, during perfusion with the Mg-free aCSF. The rates of IED occurrence as well as the duration of the MEC discharges were measured. Results are presented as average ± s.d. All datasets were checked for normality compliance before performing statistical hypotheses tests.

An initial comparison between slices of male and female rats showed no significant difference and these two subsets were subsequently used as a single pooled set. The septal slices displayed a lower baseline discharge rate in comparison to the temporal slices, in both media and in all subgroups, in accordance to previous literature findings (Gilbert et al., 1985; Papatheodoropoulos et al., 2005). Perfusion with the anticholinesterase eserine (10μM) provoked an increase in discharge rates by 67% to 90% in N (temporal and septal) and PTZ temporal slices and by 199% in PTZ septal slices, in the Mg-free aCSF (N-T: 167±79% n=25, N-S: 174±66% n=12, PTZ-T: 190±92% n=20, PTZ-S: 298±177% n=15), though similar increments in all groups in the 4-AP aCSF (N-T: 237±158 n=15, N-S: 249±140% n=10, PTZ-T: 261±198% n=9, PTZ-S: 221±50% n=5). The effect of eserine was reversible by the muscarinic antagonist atropine (1μM).

Extrinsic stimulation with 1μM carbachol provoked greater increases but also more variable and with less decipherable between slice groups, possibly because of the smaller sample sizes (in Mg-free, N-T: 302±258% n=7, N-S: 443±356% n=6, PTZ-T: 244±146% n=6, PTZ-S: 221±43% n=4, and in 4-AP, N-T: 257±102% n=8, N-S: 197±122 n=3, PTZ-T: 258±81% n=6, PTZ-S: 254±334 n=6).

Muscarinic antagonism by perfusion of 1μM atropine (perfused alone) induced a different pattern of frequency decreases between slice groups (in Mg-free, N-T: 80±26% n=19, N-S: 86±31% n=6, PTZ-T: 92±18% n=7, PTZ-S: 75±18% n=4, and in 4-A-P, N-T: 35±36% n=5, N-S: 91±5% n=6, PTZ-T: 67±32% n=5, PTZ-S: 49±34% n=5), indicating a shift in baseline muscarinic contribution to the excitability in the 4-AP model in the PTZ group, viewed as an increased effect in the septal slices vs. temporal ones instead of the enhanced response in temporal vs. septal slices from normal rats. A similar tendency may be present in the Mg-free model but is less pronounced, perhaps due to the more limited frequency decrements.

The experiment with the combined slices showed a distinct difference in MECV-VI discharge rate between normal (0.29±0.29Hz, n=8) and PTZ rat slices (0.42±0.29Hz, n=6). The difference disappeared after cutting the Schaffer collaterals in CA1 (in PTZ slices a drop to 0.18±0.29Hz occurred; no difference in normal rat slices 0.27±0.29Hz). The CA3 discharge rate remained unaffected across cuts (0.65±0.29Hz, n=8 with differences between cuts of a <0.03Hz range, in normal rat slices, and 0.47±0.29Hz, n=6 with differences between cuts of a <0.05Hz range, in PTZ rat slices). Furthermore, cutting the SC caused a visible increase in the duration of PTZ MEC discharges vs. a less pronounced change in normal slices. The duration had a shorter and a longer duration component. The short duration component doubled from 446 to 823msec and the longer increased by 20% from 1022 to 1238msec in N slices. In PTZ rat slices, the fast component increased by 50% from 446 to 665msec and the slower one by 25 percent from 918 to 1152msec.

Our results demonstrate that a generalized and sustained early-life seizure (as an equivalent to generalized convulsive SE) enhances the response of the hippocampus to ACh availability increases in generating epileptiform discharges. The effect is more specific to animals of epileptic history in a model of concurrent NMDAR activation and more so in the septal hippocampus. This may indicate an increased probability of seizure generation or propagation -in individuals having suffered even no more than one single SE event in childhood- under a variety of physiological or pathological conditions in which cholinergic/muscarinic neuromodulation and NMDAR-mediated glutamatergic components are combined, and possibly explains certain aspects of long-term cognitive deficits. Hippocampal output, also seems to be enhanced in the same conditions and after the early-life seizure, possibly leading to robust synchronization in adjacent cortical areas, converging to seizure spreading facilitation and partially substantiating the cognitive impairment outcome, at least in the case of interictal spiking (Kleen et al., 2010).

Abstract - Περίληψη

Εμφάνιση του *Status epilepticus* σε νεαρή ηλικία μπορεί να συνδέεται με μακροπρόθεσμη διευκόλυνση παραγωγής επιληπτικών κρίσεων. Στην παρούσα μελέτη ένα *in vivo* μοντέλο παρατεταμένων γενικευμένων κρίσεων εφαρμόζεται σε ανώριμους αρουραίους και τα μακροπρόθεσμα χολινεργικά/μουςκαρινικά αποτελέσματα –καθώς πρόκειται για ένα νευρορρυθμιστικό σύστημα εμπλεκόμενο και στην παραγωγή κρίσεων και στη φυσιολογική γνωσιακή λειτουργία- αξιολογούνται σε *in vitro* παρασκευάσμα διαφραγματικού και κροταφικού ιπποκάμπου –μιας δομής που σχετίζεται με τη συνηθέστερη μορφή γενικευμένης επιληψίας, την επιληψία κροταφικού λοβού, και που κατέχει σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες μνήμης και μάθησης- υπό την επαγωγή επιληπτοειδούς δραστηριότητας μεσοκρυσικού τύπου –καθώς οι μεσοκρυσικές εκφορτίσεις ενδέχεται να διευκολύνουν την παραγωγή επιληπτικών κρίσεων, και συνδέονται επίσης με παροδικές γνωσιακές διαταραχές- ώστε να επιτύχουμε παρόμοιες συνθήκες αυξημένου συγχρονισμού και διέγερσης με αυτές που πραγματοποιούνται σε ανάλογες συνθήκες στον άνθρωπο. 149 εγκάρσιες κροταφικές ή διαφραγματικές τομές ιπποκάμπου (με μέγιστο όριο χρήσης 2 τομών ανά πειραματόζωο) παρασκευάστηκαν από ενήλικους (>2μηνών) αρουραίους *Sprague-Dawley*, φυσιολογικούς (n=58) ή που είχαν υποστεί μια παρατεταμένη (>20λεπτά) γενικευμένη κρίση με 60-90mg/kg *pentylentetrazole* (“PTZ”) και διαβράχθηκαν είτε με tENY άνευ μαγνησίου είτε με tENY με 50μM 4-αμινοπυριδίνης. Οι επιληπτοειδείς εκφορτίσεις μεσοκρυσικού τύπου της περιοχής CA3 καταγράφηκαν εξωκυττάρια, και ο ρυθμός επανεμφάνισής τους μετρήθηκε ως συχνότητα (Hz). Σε μέρος των τομών (n=17) διατηρήθηκε και ο μέσος ενδορρινικός φλοιός και πραγματοποιήθηκαν ταυτόχρονες καταγραφές από την CA3a και τις στιβάδες V-VI του μέσου ενδορρινικού φλοιού (“MEC V-VI”). Η συχνότητα και η διάρκεια των εκφορτίσεων του ενδορρινικού φλοιού μετρήθηκαν. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± τ.α.. Όλα τα σύνολα δεδομένων ελέγχθηκαν για τη συμμόρφωση προς την κανονικότητα πριν την πραγματοποίηση στατιστικών ελέγχων υποθέσεων.

Μια αρχική σύγκριση των τομών αρσενικών και θηλυκών δεν έδειξε σημαντικές διαφορές, και τα δύο αυτά υποσύνολα στο εξής χρησιμοποιήθηκαν ως ένα ενιαίο σύνολο. Οι διαφραγματικές τομές έδειξαν χαμηλότερη βασική συχνότητα εκφορτίσεων σε σύγκριση με τις διαφραγματικές, και στα δύο μέσα διαβροχής, και σε όλες τις ομάδες τομών, σε συμφωνία με προηγούμενα ευρήματα στη βιβλιογραφία (Gilbert *et al.*, 1985; Papatheodoropoulos *et al.*, 2005). Η διαβροχή με την αντιχολινεστεράση εσερίνη (10μM) προκάλεσε αύξηση του ρυθμού εκφορτίσεων από 67 ως 90% σε τομές φυσιολογικών ζώων (κροταφικές και διαφραγματικές) και σε 199% σε κροταφικές τομές PTZ ζώων στο tENY άνευ μαγνησίου (N-T: 167±79% n=25, N-S: 174±66% n=12, PTZ-T: 190±92% n=20, PTZ-S: 298±177% n=15), αλλά παρεμφερείς αυξήσεις στο tENY με αμινοπυριδίνη (N-T: 237±158 n=15, N-S: 249±140% n=10, PTZ-T: 261±198% n=9, PTZ-S: 221±50% n=5). Το αποτέλεσμα της εσερίνης ήταν αναστρέψιμο από την ατροπίνη (1μM). Εξωγενής χολινεργική διέγερση από 1μM καρβαχόλης προκάλεσε μεγαλύτερες αυξήσεις αλλά και με υψηλότερη μεταβλητότητα και λιγότερο σαφείς διαφορές μεταξύ των υπο-ομάδων, πιθανώς λόγω μικρών αριθμών δειγμάτων (σε tENY άνευ Mg²⁺, N-T: 302±258% n=7, N-S: 443±356% n=6, PTZ-T: 244±146% n=6, PTZ-S: 221±43% n=4, και σε tENY με 4-AP, N-T: 257±102% n=8, N-S: 197±122 n=3, PTZ-T: 258±81% n=6, PTZ-S: 254±334 n=6). Ο μουςκαρινικός ανταγωνιστής ατροπίνη (1μM) επήγαγε ένα διαφορετικό πρότυπο μειώσεων της συχνότητας μεταξύ ομάδων τομών (σε tENY άνευ Mg²⁺, N-T: 80±26% n=19, N-S: 86±31% n=6, PTZ-T: 92±18% n=7, PTZ-S: 75±18% n=4, σε tENY με 4-AP, N-T: 35±36% n=5, N-S: 91±5% n=6, PTZ-T: 67±32% n=5, PTZ-S: 49±34% n=5), υποδεικνύοντας μια μεταβολή στην συνεισφορά των μουςκαρινικών υποδοχέων στην βασική κατάσταση στο μοντέλο της αμινοπυριδίνης, στην ομάδα των τομών PTZ πειραματοζώων, που εμφανίστηκε ως αυξημένο αποτέλεσμα στις διαφραγματικές τομές έναντι των κροταφικών, αντί της ενισχυμένης απόκρισης στις κροταφικές έναντι των διαφραγματικών τομών φυσιολογικών πειραματοζώων. Μια παρόμοια τάση ίσως υπάρχει στο μοντέλο με tENY άνευ μαγνησίου αλλά είναι λιγότερο έντονο, πιθανώς λόγω των λιγότερο εκτεταμένων μειώσεων.

Το πείραμα με τις συνδυασμένες τομές έδειξε μια ευδιάκριτη διαφορά στον ρυθμό εκφορτίσεων των στιβάδων V-VI του μέσου ενδορρινικού φλοιού μεταξύ τομών φυσιολογικών (0.29±0.29Hz, n=8) και PTZ πειραματοζώων (0.42±0.29Hz, n=6). Η διαφορά αυτή μειώθηκε μετά την διακοπή των παραπλεύρων ινών Schaffer στην περιοχή CA1 (στις τομές των PTZ πειραματοζώων μειώθηκε η συχνότητα σε 0.18±0.29Hz, χωρίς καμμία μεταβολή της συχνότητας των τομών φυσιολογικών πειραματοζώων). Ο ρυθμός εκφορτίσεων της CA3 παρέμεινε ανεπηρέαστος από τις τομές (0.65±0.29Hz, n=8 με εύρος διαφορών μεταξύ τομών <0.03Hz σε τομές φυσιολογικών πειραματοζώων, και 0.47±0.29Hz, n=6 με εύρος διαφορών μεταξύ τομών <0.05Hz σε τομές PTZ πειραματοζώων). Επιπλέον, η διακοπή των ινών Schaffer προκάλεσε μια ορατή αύξηση της διάρκειας των εκφορτίσεων στον ενδορρινικό φλοιό των PTZ πειραματοζώων έναντι μικρότερης μεταβολής στις τομές των φυσιολογικών. Η διάρκεια των εκφορτίσεων είχε μια σύντομη και μια πιο παρατεταμένη συνιστώσα. Στις τομές των φυσιολογικών πειραματοζώων η σύντομη συνιστώσα διπλασιάστηκε από 446 σε 823msec και η παρατεταμένη αυξήθηκε κατά 20% από 1022 σε 1238msec. Στις τομές των PTZ πειραματοζώων η σύντομη συνιστώσα αυξήθηκε κατά 50% από 446 σε 665msec και η παρατεταμένη αυξήθηκε κατά 25% από 918 σε 1152msec.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι μια παρατεταμένη γενικευμένη κρίση κατά την ανάπτυξη (ως ανάλογο του γενικευμένου SE με σπασμούς) ενισχύει την απόκριση του ιπποκάμπου σε αυξήσεις της διαθέσιμης ακετυλοχολίνης προς την παραγωγή επιληπτοειδών εκφορτίσεων. Το φαινόμενο είναι πιο αυξημένο σε πειραματόζωα επιληπτικού ιστορικού, με ένα μοντέλο ταυτόχρονης ενεργοποίησης των υποδοχέων NMDA, και σε μεγαλύτερο βαθμό στον διαφραγματικό ιπποκάμπο. Το εύρημα αυτό μπορεί να δείχνει μια αυξημένη πιθανότητα παραγωγής ή εξάπλωσης κρίσεων –σε άτομα που έχουν υποστεί έστω ένα μοναδικό επεισόδιο SE στην παιδική ηλικία- κάτω από ποικίλες συνθήκες συνδυασμένης χολινεργικής/μουςκαρινικής νευρορρύθμισης και γλουταματεργικής NMDAR μεσολαβούμενης διαβίβασης, και ενδεχομένως κάποιες όψεις των μακροπρόθεσμων

Abstract - Περίληψη

γνωσιακών δυσλειτουργιών. Η έξοδος του ιπποκάμπου επίσης φαίνεται ενισχυμένη στις ίδιες συνθήκες και μετά από μια επιληπτική κρίση σε νεαρή ηλικία, πιθανώς οδηγώντας σε ισχυρότερο/σταθερότερο συγχρονισμό παρακείμενων φλοιικών περιοχών, συγκλίνοντας έτσι στην διευκόλυνση της εξάπλωσης επιληπτικών κρίσεων και μερικώς αιτιολογώντας το αποτέλεσμα της γνωσιακής διαταραχής, τουλάχιστον στην περίπτωση των μεσοκρισικών εκφορτίσεων (Kleen *et al.*, 2010).



Εισαγωγή

1.1. Επιληψία

Ο όρος “επιληψία” χαρακτηρίζει μια συμπτωματολογικά ετερογενή ομάδα διαταραχών του εγκεφάλου με κοινό σημείο αυτών την μακροπρόθεσμη προδιάθεση εκδήλωσης περιοδικών και απρόβλεπτων κρίσεων. Η επιληψία φέρει, επίσης, νευροβιολογικές, γνωσιακές, ψυχολογικές και κοινωνικές συνέπειες αυτής της κατάστασης. Είναι μια διαταραχή γνωστή από την αρχαιότητα που έχει βοηθήσει σε πολλές περιπτώσεις τη διευκρίνιση και την κατανόηση των λειτουργιών τμημάτων του εγκεφάλου.

Η επιληπτική κρίση είναι μία μεταβατική εκδήλωση σημάτων (καταγεγραμμένων στο ηλεκτροεγκεφαλογράφημα ή σε εξω-/ενδοκυττάρια καταγραφές) ή/και συμπτωμάτων, που προκαλείται από μη κανονική, υπερβολική ή συγχρονισμένη νευρωνική δραστηριότητα και αυξημένη διεγερσιμότητα περιοχών του εγκεφάλου. Η αναγνώριση των επιληπτικών κρίσεων μπορεί να γίνεται από την συμπεριφορική παρατήρηση αλλά ο χαρακτηρισμός τους είναι πιο ευκρινής στο εγκεφαλογράφημα.

Οι επιληψίες διακρίνονται σε εστιασμένες/εντοπισμένες (όπου η εστία -focus- της επιληπτικής δραστηριότητας είναι προσδιορισμένη), σε γενικευμένες επιληψίες και σύνδρομα (όπου φαίνεται να υπάρχουν διάχυτες και μη προσδιορίσιμες εστίες), και σε ειδικά επιληπτικά σύνδρομα (για παράδειγμα, πυρετικοί σπασμοί σε άτομα μικρής ηλικίας). Οι μεμονωμένες επιληπτικές κρίσεις διακρίνονται, επίσης, σε μερικές/τμηματικές (partial), σε γενικευμένες (generalized). Οι πρώτες ξεκινούν εστιασμένα και μπορούν να γενικευθούν στην συνέχεια, ενώ οι δεύτερες δεν έχουν εντοπισμένη εστία και εκδηλώνονται διάχυτα και στα δύο ημισφαίρια. (Kandel et al., 2000) Η διαδικασία με την οποία ένα φυσιολογικό νευρωνικό δίκτυο μετατρέπεται σε επιληπτικό, καλείται επιληπτογένεση και μπορεί να περιλαμβάνει εξάρσεις κρίσιμου (κατά τη διάρκεια της επιληπτικής κρίσης) ή μεσοκρίσιμου τύπου εκφορτίσεων (μεταξύ επιληπτικών κρίσεων) από αυξημένη διέγερση ή μειωμένη αναστολή ή από αποκλίσεις στην λειτουργία διαύλων από το φυσιολογικό, μεταβολές σε νευρορρυθμιστικά συστήματα (πχ. χολινεργικό, πουρινεργικό), ή μεταβολές στην ιοντική ομοιόσταση. (Kandel et al., 2000; Lothman et al., 1991).

Η βαρύτητα μιας επιληπτικής κρίσης κρίνεται τόσο με βάση τα συμπτώματα, όσο και με την διάρκειά της, με ακραία περίπτωση το γενικευμένο Status epilepticus με σπασμούς, στο οποίο εστιάζουμε.

1.1.1 Status Epilepticus (Wasterlain and Treiman, 2006)

Το status epilepticus αναφέρεται σε επιληπτικές κρίσεις που μπορεί να διαφέρουν στην περιγραφή των συμπτωμάτων ή των σπασμών ή στην παρακολουθούμενη δραστηριότητα του EEG αλλά χαρακτηρίζονται από μεγάλη διάρκεια. Το κριτήριο για να ταυτοποιηθεί το Status epilepticus δεν είναι σταθερό (5 έως 30 λεπτά συνεχόμενων σπασμών) κι εξαρτάται από την χρησιμοποιούμενη βιβλιογραφία. Η διάκριση σε κατηγορίες του status epilepticus γίνεται σε πρωτογενές, δευτερογενές (τονικούς, τονικούς-κλονικούς, μυοκλωνικούς σπασμούς), απλό μερικό status (μερικές/τμηματικές και μονόπλευρες κρίσεις) και μη-καταληκτικές κρίσεις (σύνθετες μερικές/τμηματικές κρίσεις, status κρίσεων αφαίρεσης). Επίσης, ανάλογα με τα συμπτώματα που εμφανίζονται το Status Epilepticus διακρίνεται σε γενικευμένο, σε status χωρίς σπασμούς, με μερική ή ολική απώλεια του συνειδητού, και σε μερικό/τμηματικό (με ή χωρίς σπασμούς). Οι κρίσεις του μπορεί να είναι κινητικές, αισθητηριακές, γνωσιακές, του αυτόνομου νευρικού, ή διάλειψης -μερικής ή ολικής απώλειας συνειδητότητας.

Η πιθανότητα εμφάνισης του Status epilepticus αυξάνεται σημαντικά με προηγούμενο ιστορικό Status epilepticus αλλά υπάρχουν και περιπτώσεις εμφάνισης σε άτομα που δεν είχαν ποτέ επιληπτικό ιστορικό και απλώς πάσχουν από άλλες οξείες νευρολογικές ή/και συστηματικές ασθένειες.

Ο μηχανισμός με τον οποίο προκύπτει το Status epilepticus δεν είναι διευκρινισμένος αλλά η πιθανότερη εξήγηση που προτείνεται είναι η αδυναμία τερματισμού των επιληπτικών κρίσεων που πιθανώς οφείλεται σε δυσλειτουργίες ομοιοστατικών μηχανισμών (ρεύματα καλίου, ATPάση Na^+/K^+ , αλλαγές του εξωκυτταρικού pH, διαταραχή της αναστολής των υποδοχέων NMDA), ή διαταραχές νευροδιαβιβαστικών συστημάτων (πχ. αδενοσίνης, οπιοειδών).

Status epilepticus κατά την ανάπτυξη

Τα άτομα μικρής ηλικίας είναι πιο ευπαθή στο Status epilepticus (Coppola and Moshé, 2009) το οποίο εκδηλώνεται πιο συχνά γενικευμένο και με σπασμούς. Αν και τα ποσοστά θνησιμότητας είναι μικρότερα σε σχέση με περιστατικά σε ενήλικες (DeLorenzo et al., 1992; Nickels et al., 2012) και η πιθανότητα επανεμφάνισης status είναι μειωμένη (Shinnar et al., 1996), μία στις τρεις περιπτώσεις εμφανίζει νοητικά προβλήματα που μπορεί να προκαλούνται μερικώς από μόνιμες βλάβες στον ιππόκαμπο ή στον μετωπιαίο/προμετωπιαίο λοβό (Jambaqué et al., 2006; Shorvon, 1994).

Μια σημαντική διαφορά στην εμφάνιση του status epilepticus μεταξύ παιδιών και ενηλίκων έχει διαπιστωθεί κλινικά να είναι το αίτιο πρόκλησής του: στους ενήλικες κυριαρχούν υπάρχουσες προσβολές (για παράδειγμα τραύματα, μολύνσεις, μεταβολικές διαταραχές) ή μια έξαρση επιληπτικών κρίσεων (για επιληπτικούς

Εισαγωγή

ασθενείς), ενώ σε παιδιά η κυριότερη αιτία είναι ο πυρετός ή εξωτερικές μολύνσεις και η ιδιοπαθής επιληψία (Aicardi and Chevrie, 1970), ακολουθούμενη από εξάρσεις από διακοπή της φαρμακευτικής αγωγής –για άτομα που εμφανίζουν ήδη επιληψία (DeLorenzo et al., 1996; 1993, 1993).

Επιπτώσεις του Status epilepticus

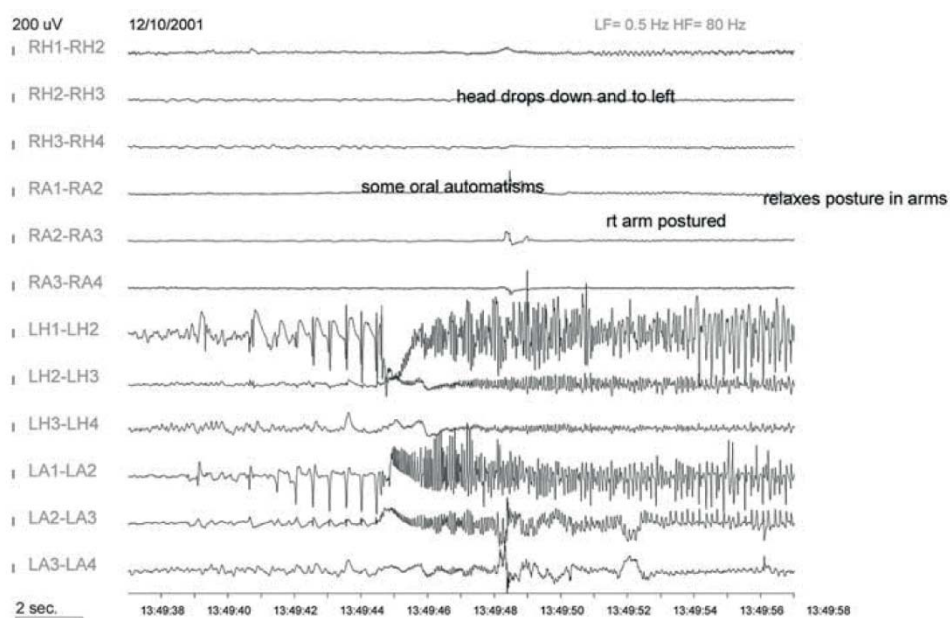
Το Status epilepticus με την εκδήλωσή του διαταράσσει την λειτουργία του εγκεφάλου και άμεσα και μακροπρόθεσμα, αλλοιώνοντας είτε ομοιοστατικούς μηχανισμούς είτε ιδιότητες νευρωνικών δικτύων. (Barmashenko et al., 2011; Cavarsan et al., 2011; Cross and Cavazos, 2007; Dudek et al., 2010; Heverin et al., 2012; Jung et al., 2008; Kang et al., 2006; Kim et al.). Μερικές από τις αλλαγές που προκαλεί λειτουργούν ενισχυτικά στην επιληπτογένεση ή στην επανεμφάνιση κρίσεων, αυξάνοντας τη διεγερσιμότητα είτε άμεσα είτε μειώνοντας την αναστολή. (Blanco et al., 2008; Bumanglag and Sloviter, 2008; Rice et al., 1998). Ειδικά στην περίπτωση που εμπλέκονται στο status epilepticus ο κροταφικός λοβός και οι παρακείμενες στεφανιαίες δομές –και κυρίως ο ιππόκαμπος- μπορεί να προκύπτουν άμεσα διαταραχές στην μνήμη και την μάθηση (Chauviere et al., 2009; Cross and Cavazos, 2007; Hesdorffer et al., 1998; Jambaqué et al., 2006; Tyler et al., 2012).

Πειραματικά μοντέλα Status epilepticus

Για την επαγωγή επιληπτοειδών κρίσεων σε πειραματόζωα χρησιμοποιούνται χημικά σπασμογόνα, διαγονιδιακά πειραματόζωα που παράγουν αυθόρμητα κρίσεις, ή ηλεκτρικός ερεθισμός. Στην πρώτη και τρίτη περίπτωση, όπου υπάρχει ένα κατώφλι για την επαγωγή της επιληπτοειδούς κρίσης, μπορεί να επιλέγονται είτε δόσεις μεγαλύτερες του κατωφλίου για την άμεση επαγωγή είτε επαναλαμβανόμενες υποκατωφλίες δόσεις (“kindling”), που τείνουν να προκαλούν επαναλαμβανόμενες αυθόρμητες κρίσεις με κάποια καθυστέρηση. Ειδικά για την περίπτωση του γενικευμένου τονικών-κλονικών σπασμών status epilepticus -που μας ενδιαφέρει στην παρούσα εργασία για να προσεγγίζει την περιγραφή του status που εμφανίζεται σε παιδιά-, χρησιμοποιούνται συχνά χημικά σπασμογόνα, που είτε ενισχύουν την διεγερτική διαβίβαση (για παράδειγμα, πιλοκαρπίνη, καϊνικό οξύ), είτε καταστέλλουν την ανασταλτική (για παράδειγμα bicuculline, πεντυλενετετραζόλη). (Fisher, 1989; Sloviter, 2009).

1.1.2 Εκφορτίσεις κρισικού και μεσοκρισικού τύπου

Οι εκφορτίσεις που φαίνονται στο ηλεκτροεγκεφαλογράφημα κατά τη διάρκεια επιληπτικών κρίσεων (κρισικού τύπου – “ictal”), εμφανίζουν κατά κανόνα υψηλής συχνότητας κυματισμούς παρατεταμένους σε διάρκεια, όπως φαίνεται στην εικόνα 1. Στα χρονικά διαστήματα μεταξύ των επιληπτικών κρίσεων μπορούν να εμφανίζονται μεσοκρισικές εκφορτίσεις (“interictal”) προερχόμενες από ταυτόχρονη πυροδότηση ομάδων νευρώνων. Για τα μοντέλα in vitro επιληπτοειδείς εκφορτίσεις συνήθως αποτελούν συγχρονισμένες ριπές εκφορτίσεων είτε αυθόρμητες (λόγω τοπολογίας και ενδογενών ιδιοτήτων του δικτύου) είτε προκλητές και μπορούν να παράγονται με τους τρόπους που περιγράφηκαν παραπάνω. (Dingledine, 1984)



Εικόνα 1: έναρξη επιληπτικής κρίσης σε άνθρωπο όπως καταγράφεται με ηλεκτροεγκεφαλογράφημα (Anderson et. al. 2007)

Οι εκφορτίσεις μεσοκρισικού τύπου δεν έχουν αποσαφηνισμένο ρόλο στην επιληψία: στη βιβλιογραφία

Εισαγωγή

εμφανίζεται ότι (1) τείνουν να αποτρέπουν την εκδήλωση των επιληπτικών κρίσεων, τουλάχιστον στο σύστημα ιπποκάμπου-ενδορρινικού φλοιού (Avoli et al., 2002; Calcagnotto et al., 2000; Panuccio et al., 2010), αν και προκαλούν επίσης παροδικές γνωσιακές διαταραχές (Nicolai and Kasteleijn-Nolst Trenite, 2011; Pressler et al., 2005), επίσης ότι (2) διευκολύνουν την εμφάνιση επιληπτικών κρίσεων (Dyhrfeld-Johnsen et al., 2010; Mazarati et al., 2002; Staley et al., 2005) και ότι (3) παράγονται από ανεξάρτητους μηχανισμούς από αυτούς που παράγουν τις επιληπτικές κρίσεις (Gotman, 1984). Παρά την έλλειψη σύγκλισης, η παρουσία των μεσοκρυσικών εκφορτίσεων αξιοποιείται προγνωστικά ή για ορισμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις (Krendl et al., 2008; Miller and Gotman, 2008; Rosati et al., 2003).

Εκτός των επιληψιών, μεσοκρυσικού τύπου εκφορτίσεις έχουν, επίσης, σχετιστεί με ψυχιατρικές παθολογίες (ψυχώσεις), αλλά και διαταραχές της προσοχής (σύνδρομο ελλειμματικής προσοχής). (Barkmeier and Loeb, 2009; Becker et al., 2004; Inui et al., 1998; Richer et al., 2002; Silvestri et al., 2007).

Επιληπτοειδείς εκφορτίσεις in vitro

Για την εξέταση των επιληπτικών κρίσεων, πέραν των κλινικών παρατηρήσεων και των πειραματικών μοντέλων που αξιοποιούν πειραματοζώα για in vivo μετρήσεις και καταγραφές, είναι συχνά ευκολότερο να μελετηθούν σε πιο περιορισμένη κλίμακα επιληπτοειδείς εκφορτίσεις σε απομονωμένο ιστό πειραματοζώων, καθώς εξαιρείται από τις πειραματικές συνθήκες η πλειονότητα των εξωτερικών επιδράσεων. Για την επαγωγή επιληπτοειδούς δραστηριότητας σ' αυτήν την περίπτωση μπορούν να αξιοποιούνται τόσο οι φαρμακολογικές και ηλεκτροφυσιολογικές μέθοδοι που αναφέρθηκαν προηγουμένως όσο και ειδικές ιδιότητες επιμέρους δικτύων.

Δύο από τα συνηθέστερα μοντέλα in vitro πρόκλησης κρυσικού τύπου εκφορτίσεων, και τα οποία χρησιμοποιούνται στην παρούσα εργασία για την παραγωγή μεσοκρυσικού τύπου εκφορτίσεων στις πειραματικές συνθήκες του εργαστηρίου, είναι η αφαίρεση ή η μείωση του Mg^{2+} στο μέσο διαβροχής για την ενίσχυση των ρευμάτων των NMDA υποδοχέων, και η διαβροχή με 4-αμινοπυριδίνη για την αύξηση της συνολικής διεγερσιμότητας των μεμβρανών, μειώνοντας κυρίως το ρεύμα I_A καλίου ($Kv2/3$). (Kojima et al., 1991; Lewis et al., 1990; Perreault and Avoli, 1991). (Ανασκόπηση και ταξινόμηση των διαύλων καλίου στο Judge and Bever Jr., 2006).

Ένα συχνά χρησιμοποιούμενο παράδειγμα δικτύου-μοντέλου επιληπτικών εκφορτίσεων, και με ειδικό ενδιαφέρον, καθώς εμπλέκεται στην συνηθέστερη μορφή επιληψίας (μέσου κροταφικού λοβού), αποτελεί ο ιππόκαμπος (Fisher, 1989; 2007), στον οποίο εστιάζουμε στην παρούσα μελέτη.

1.2. Ιππόκαμπος-Ενδορρινικός φλοιός

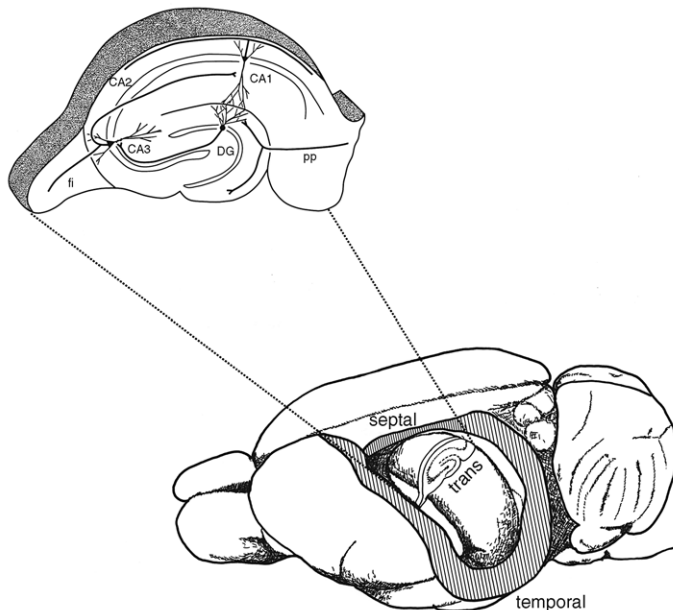
1.2.1 Γενικά

Ο ιππόκαμπος αποτελεί διαδεδομένο μοντέλο για την μελέτη νευρωνικών δικτύων σε διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές συνθήκες χάρη στην εκτενώς μελετημένη λειτουργία και νευροανατομία του, στη συμμετοχή του σε διαδικασίες επεισοδικής και χωρικής μνήμης, πλοήγησης και ρύθμισης του συναισθήματος (Fanselow and Dong, 2010), καθώς και στην εμπλοκή του σε επιληπτικές διαταραχές (Lothman et al., 1991). Η ευκρινής μορφολογία του καθιστά τεχνικά εύκολη τη μελέτη τομών in vitro χωρίς σημαντική ποιοτική υποβάθμιση της ακεραιότητας των τοπικών δικτύων. (Andersen et al., 2007)

Το λειτουργικό φάσμα του ιπποκάμπου εκτείνεται κατά μήκος του κροταφικού (κοιλιακού)-διαφραγματικού (ραχιαίου/νωτιαίου) άξονα, που συνοδεύεται από διαφορές τόσο στην έκφραση νευροδιαβιβαστικών συστημάτων και ρύθμιση της διεγερσιμότητας όσο και στην δικτυακή τοπολογία (Moser and Moser, 1998; Fanselow and Dong, 2010).

1.2.2 Μορφολογία-Ανατομία

Ιππόκαμπος



Εικόνα 2: Θέση του ιπποκάμπου στον εγκέφαλο αρουραίου και εγκάρσια τομή του. (από Andersen et al. 2007)

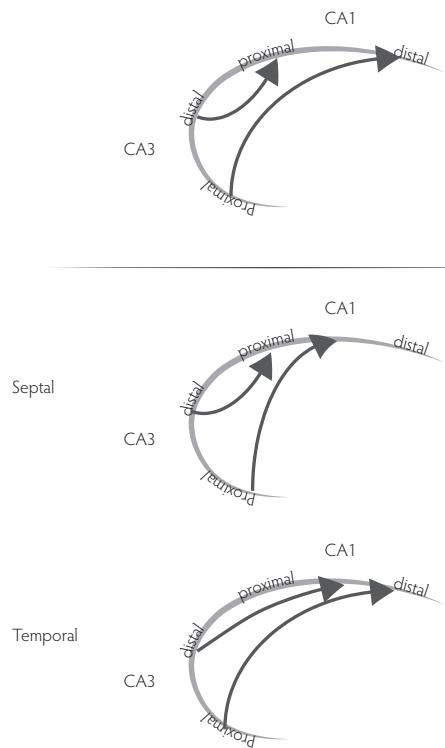
Ο σχηματισμός του ιπποκάμπου εντοπίζεται κάτω από τον κροταφικό λοβό και στα δύο ημισφαίρια, όπως φαίνεται στην εικόνα 3. Σχεδόν καθ' όλο το μήκος από το κροταφικό (κοιλιακό) έως το διαφραγματικό (νωτιαίο) άκρο περιλαμβάνει τον κυρίως ιππόκαμπο (περιοχές CA -εκ του Cornu Ammonis) την οδοντωτή έλικα (Dentate Gyrus) και το υπόθεμα (Subiculum) -το υπόθεμα ελαχιστοποιείται στην ακραία διαφραγματική περιοχή. Η πρώτη πρόταση για την σύνδεση μεταξύ αυτών των περιοχών έγινε με βάση μικροσκοπικές παρατηρήσεις στηριζόμενες σε μεγάλο βαθμό στα ευρήματα των Cajal, Golgi και Schaffer, καθώς και από ηλεκτροφυσιολογικά δεδομένα, κι έγινε γνωστή ως "τρिसυναπτική οδός" (διατιτρούσα οδός-οδοντωτή έλικα, οδοντωτή έλικα-CA3, CA3-CA1) (Andersen et al., 1971), η οποία με κάποιες προσθήκες περιγράφει την ροή πληροφορίας στον ιππόκαμπο. (Amaral and Witter, 1989; Andersen et al., 2007; Witter, 2007)

Κατά σύμβαση οι περιοχές θεωρούνται σε έναν άξονα αυξούμενης απόστασης (proximal)-DG-CA3-CA1-υπόθεμα-(distal).

Μια εγκάρσια τομή του ιπποκάμπου (όπως φαίνεται στην εικόνα 2) περιγράφεται ως εξής: οι περιοχές CA1-CA3 περιλαμβάνουν 4 διαδοχικές κυτταρικές στιβάδες -καθοδικά, stratum lacunosum/moleculare, stratum radiatum, stratum pyramidale, stratum oriens-, το υπόθεμα (subiculum) ακολουθεί την δομή της CA1 και η οδοντωτή έλικα περιλαμβάνει 3 κυτταρικά στρώματα -καθοδικά, stratum moleculare, stratum granulosum, και ένα πολυμορφικό στρώμα, από το οποίο ξεκινούν οι βρυώδεις ίνες προς την CA3. Στην περιοχή CA3 διακρίνεται, επίσης, ανοδικά της πυραμιδικής στιβάδας ένα διαυγές στρώμα (stratum lucidum) λόγω των βρυωδών ινών που καταλήγουν στην υποπυραμιδική περιοχή της CA3. Παρ' ότι η περιοχή CA1 είναι η καλύτερα μελετημένη, λόγω της άμεσης σχέσης της με την έκφραση των διαδικασιών μνήμης του ιπποκάμπου, η περιοχή CA3 είναι καταλληλότερη για τη μελέτη συγχρονισμένων υποσυνόλων νευρώνων, εξ αιτίας της ενδογενούς διακυτταρικής συνδεσμολογίας της μεταξύ κυρίων νευρώνων (πυραμιδικών). Η περιοχή CA3 διακρίνεται σε 3 υποπεδία a, b, c με το a (απώτερο)

Εισαγωγή

να βρίσκεται δίπλα στην CA2 (στο τέλος του stratum lucidum), το c (εγγύτερο) προς την οδοντωτή έλικα (το υποπεδίο CA3c επικαλύπτεται με την περιοχή "CA4" που συναντάται σε παλαιότερη βιβλιογραφία) και ενδιάμεσα το b. Οι άξονες των πυραμιδικών της CA3 είτε ακολουθούν τις παράπλευρες ίνες Schaffer, που καταλήγουν πριν το πυραμιδικό στρώμα της CA1 είτε εννευρώνουν τον ιππόκαμπο του άλλου ημισφαιρίου διαμέσου της παρυφής (fimbria) του ιπποκάμπου. (Amaral and Witter, 1989; Andersen et al., 2007) Από όλα τα υποπεδία της CA3 ξεκινούν επίσης παράπλευρες ίνες που στοχεύουν προς την οδοντωτή έλικα. Μεταξύ των υποπεδίων, τα πυραμιδικά κύτταρα που βρίσκονται προς το υποπεδίο CA3a συνδέονται σε μεγαλύτερο βαθμό με κύτταρα στην CA3 μετέχοντας περισσότερο στο ανατροφοδοτούμενο δίκτυο της περιοχής ενώ πυραμιδικά κύτταρα που βρίσκονται προς την CA3c προβάλλουν περισσότερο εκτός της CA3. (Li et al., 1994) Η προβολή των πυραμιδικών της CA3 προς την CA1, (στο ίδιο κροταφο-διαφραγματικό επίπεδο) μετατοπίζεται από την εγγύτερη (προς CA3c) προς την απώτερη (προς CA3a), στην απώτερη (προς υπόθεμα) προς εγγύτερη (προς CA3) CA1. Επίσης οι προβολές της CA3 στην CA1 μετατοπίζονται βαθμιαία από το εγγύτερο άκρο της CA1 στο απώτερο (προς το υπόθεμα), κατά την κατεύθυνση διαφραγματικού προς κροταφικό άκρο του ιπποκάμπου (Amaral and Witter, 1989; Amaral, 1993) (εικόνα 3)



Εικόνα 3 Σχηματική προβολή της περιοχής CA3 προς τη CA1. Γενική τάση (άνω σχήμα) και μετατόπιση των προβολών από το διαφραγματικό (μεσαίο σχήμα) προς το κροταφικό άκρο (κάτω σχήμα).

Οι κύριες εισόδους του ιπποκάμπου είναι η κροταφο-αμμονική γωνιώδης δέσμη (γλουταματεργική, κύρια λειτουργική είσοδος) και η οδός της παρυφής-ψαλίδας, που περιλαμβάνει τη διαγώνια δέσμη Broca, καθώς και συνδεσμικές ίνες του ιπποκάμπου του αντίπλευρου ημισφαιρίου (χολινεργική και GABA-εργική, κυρίως με ρυθμιστικό ρόλο). Η έξοδος του ιπποκάμπου προέρχεται από την πυραμιδική στιβάδα της περιοχής CA1 και του υποθέματος και τροφοδοτεί κατά κανόνα τον μέσο ενδορρινικό φλοιό, λιγότερο τον πλευρικό ενδορρινικό φλοιό και σε μικρότερο βαθμό απώτερες περιοχές. Από τις εισόδους, η κυριότερη, η κροταφο-αμμονική οδός αποτελείται από άξονες των πυραμιδικών και αστεροειδών κυττάρων των στιβάδων II-III του ενδορρινικού φλοιού, διερχόμενους είτε από το stratum lacunosum (διατιτρούσα οδός -περισσότερο προς το κροταφικό άκρο) είτε από το stratum oriens (περισσότερο προς το διαφραγματικό άκρο), που καταλήγουν στις περιοχές CA1-3 και DG. (Amaral, 1993; Andersen et al., 2007; Witter, 2007)

Η διαγώνια δέσμη Broca με προέλευση το μέσο διάφραγμα καταλήγει στο stratum oriens της CA3 και στην περιοχή CA3c (ή CA4/"hilus"). Οι συνδεσμικές ίνες του αντίπλευρου ιπποκάμπου σχηματίζουν ένα εκτενές δίκτυο τερματικών, ασύμμετρο μεταξύ των δύο ημισφαιρίων -ισχυρότερη ετερόπλευρη είσοδος προς το κροταφικό άκρο του ιπποκάμπου του δεξιού ημισφαιρίου και το διαφραγματικό του αριστερού-, τόσο στις στιβάδες oriens και radiatum των περιοχών CA όσο και ανοδικά των κοκκιωδών κυττάρων της οδοντωτής έλικας. (Kohl et al., 2011).

Διαφορές κροταφικού-διαφραγματικού ιπποκάμπου

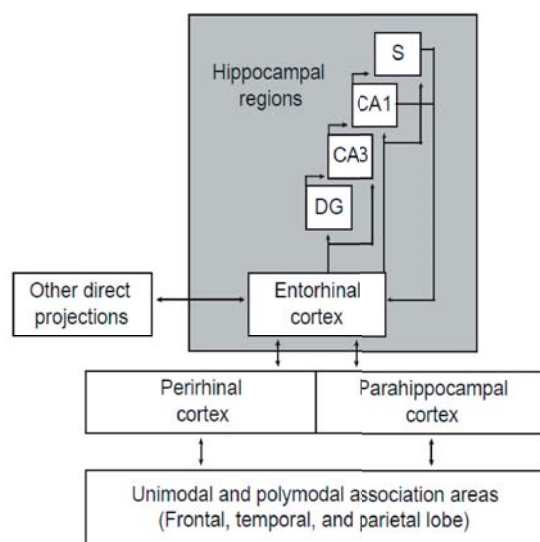
Οι διαφορές στα συστήματα νευροδιαβιβαστών μεταξύ των δύο άκρων του ιπποκάμπου (κροταφικού-διαφραγματικού) περιλαμβάνουν ισχυρότερη χολινεργική είσοδο δια μέσου της παρυφής-ψαλίδας (fimbria-fornix) στο διαφραγματικό άκρο σε σύγκριση με το κροταφικό (Nicoll, 1985; Joyce et al., 1989; Wall et al., 2008), και αντι-στρόφως, εντονότερη σεροτονεργική και κατεχολαμινεργική εννεύρωση στο κροταφικό άκρο σε σύγκριση με

Εισαγωγή

το διαφραγματικό (Gage and Thompson, 1980; Verney et al., 1985). Επίσης, έχει διαπιστωθεί στη βιβλιογραφία ισχυρότερη διεγερσιμότητα μεσολαβούμενη από ιονοτροπικούς υποδοχείς του γλουταμικού (AMPA, NMDA), και με μεγαλύτερη αναλογία AMPA:NMDA υποδοχέων στο κροταφικό άκρο σε σχέση με το διαφραγματικό, και αντιστρόφως, αποτελεσματικότερη αναστολή στο διαφραγματικό άκρο σε σύγκριση με το κροταφικό (Pandis et al., 2006; Papatheodoropoulos et al., 2005; Sotiriou et al., 2005). Οι διαφορές αυτές τείνουν να καθιστούν το κροταφικό άκρο πιο διεγέρσιμο και πιο επιρρεπές σε επιληπτικές εκφορτίσεις σε σχέση με το διαφραγματικό.

Ενδορρινικός φλοιός

Ο ενδορρινικός φλοιός ακολουθεί την δομή των 6 κυτταρικών στιβάδων και είναι επιφορτισμένος τόσο με την χαρτογράφηση του χώρου (σε συνδυασμό με την περιοχή CA1), όσο και με την μεσολάβηση στην διαβίβαση πληροφοριών από και προς άλλες φλοιικές περιοχές (εικόνα 4). (Hafting et al., 2005; Insausti et al., 1997; Leutgeb et al., 2005; Witter and Moser, 2006) Σε μια συνδυασμένη εγκάρσια τομή ιπποκάμπου-ενδορρινικού φλοιού, και ανάλογα με το κροταφικό-διαφραγματικό επίπεδο χαρακτηρίζονται δύο περιοχές του ενδορρινικού φλοιού: μέση και πλευρική ενδορρινική, οι οποίες σε εγκάρσιες τομές διαφραγματικού άκρου δεν υφίστανται κι αυξάνουν σταδιακά προς το κροταφικό άκρο. Προς το διαφραγματικό άκρο η είσοδος και έξοδος των περιοχών CA1-υποθέματος εξυπηρετούνται από τμήματα του ενδορρινικού φλοιού και κατευθύνονται προς εκείνα, που εντοπίζονται πλησιέστερα στο κροταφικό άκρο σε σχέση με το επίπεδο της εγκάρσιας τομής. Διακρίνονται, επίσης 3 ενδορρινικές δέσμες, μέση, ενδιάμεση και πλευρική, οι οποίες συνδέονται αντίστοιχα με το ακραίο κροταφικό τέταρτο, το αμέσως επόμενο ενδιάμεσο τέταρτο, και το ραχιαίο μισό του ιπποκάμπου (Dolorfo and Amaral, 1998a). Η κυριότερη έξοδος προς τον ιππόκαμπο προέρχεται από την μέση ενδορρινική περιοχή (MEA) (Kerr et al., 2007) και αθροίζει σήματα ενδογενή (στιβάδων V, II-III ενδορρινικού φλοιού) και εξωγενή (CA1, υποθέματος, μεταρρινικού και περιρρινικού φλοιού)(Dolorfo and Amaral, 1998b; Kerr et al., 2007). Από την μέση ενδορρινική περιοχή τα κύτταρα της 2ης στιβάδας στοχεύουν στην CA3 και την οδοντωτή έλικα και τα κύτταρα της 3ης στιβάδας στην CA1. Οι πυραμιδικοί νευρώνες της 5ης στιβάδας του ενδορρινικού φλοιού έχουν παρόμοιες ιδιότητες με τους πυραμιδικούς της CA3 και παράγουν αυθόρμητες εκφορτίσεις και συγχρονισμένες ριπές εκφορτίσεων. (Andersen et al., 2007; Witter et al., 1989)



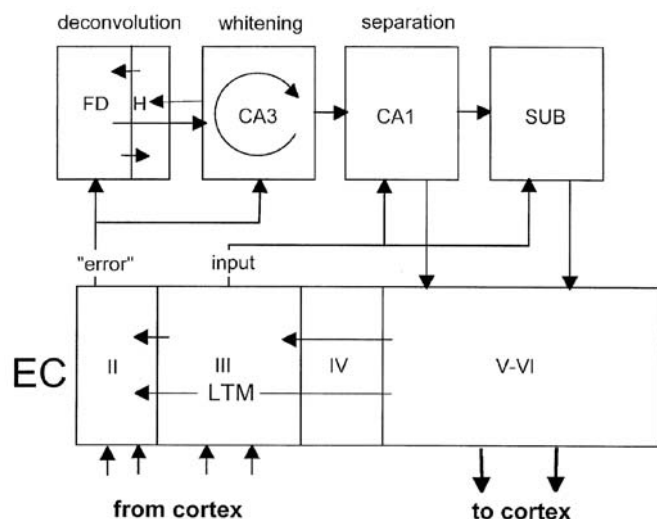
Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση των οδών διαβίβασης σήματος σε ιππόκαμπο και ενδορρινικό φλοιό (Amaral et al., 2007)

1.2.3 Λειτουργία

Ο σημαντικότερος ρόλος του σχηματισμού του ιπποκάμπου είναι η μέσω του ενδορρινικού φλοιού τροποποίηση της ισχύος συνάψεων φλοιικών περιοχών, ως αποθήκευση και ανάκτηση πληροφορίας (μνήμη). Η μνήμη στον ιππόκαμπο εξειδικεύεται σε δηλωτική μνήμη -γεγονότα και δεδομένα- κυρίως στο διαφραγματικό τμήμα. (de Hoz et al., 2003; Leutgeb et al., 2005; Morris and Frey, 1997; Moser et al., 1995; Squire, 2004; Teyler and DiScenna, 1986) Ο κροταφικός ιππόκαμπος καθώς επικοινωνεί άμεσα με στεφανιαίες περιοχές, παρακείμενες του κροταφικού λοβού σχετίζεται επίσης, εκτός της μνήμης, με ρύθμιση του συναισθήματος, της διάθεσης, του stress/άγχους και της κινητοποίησης του ζώου.(Adhikari et al., 2010; Fanselow and Dong, 2010; Frey et al., 2007; Heckers and Konradi,

Εισαγωγή

2002; Moser and Moser, 1998; Sala et al., 2004)



Εικόνα 5: Πρόταση εξήγησης της λειτουργίας του ιπποκάμ-
που από τον Buzsáki (Lorincz & Buzsaki, 2000). Η είσοδος
στον ιππόκαμπο μοιράζεται στην CA3-οδοντωτή έλικά και
στην CA1-υπόθεμα. Η οδοντωτή έλικά παρουσιάζει μια πιο
λεπτομερή έκφραση του εισερχόμενου σήματος στην CA3, η
οποία συμπληρώνει το εξερχόμενο φάσμα προς την CA1 με
μια συγκεκριμένη αποθηκευμένη κατανομή εκφορτίσεων.
Η CA1 συγκρίνει το άμεσο σήμα από τον ενδορρινικό φλοιό
με την επεξεργασμένη κατάσταση της CA3, και προωθεί τις
εκφορτίσεις προς το υπόθεμα και τον ενδορρινικό φλοιό.

Η φυσιολογική δραστηριότητα του ιπποκάμπου περιλαμβάνει συχνότητες έως γ (Leung, 1998), οξέα κύματα (sharp waves-σύντομες κυμάνσεις με μια υψίσυχη συνιστώσα "ripple" 150-300 Hz) (Colgin et al., 2004; Draguhn et al., 2000; O'Neill et al., 2006; Wilson and McNaughton, 1994) και έναν πιο αργό θ ρυθμό (Kocsis et al., 1999; Leung, 1998; O'Keefe, 1976). Οι ρυθμοί που εμφανίζονται στον ιππόκαμπο, εξαρτώνται είτε από τους κύριους (πυραμδικούς) νευρώνες είτε από ανασταλτικούς διανευρώνες. Ειδικά στην περίπτωση του ρυθμού θ εμφανίζεται επίσης εκλεκτικότητα στην φάση κατά την οποία πυροδοτούν διαφορετικές ομάδες νευρώνων. (Buzsáki, 2002; Gillies et al., 2002; Gloveli et al., 2005a; Hájos et al., 2004; Klausberger et al., 2003; Pike et al., 2000; Tort et al., 2007)

Η φαρμακολογική εξάρτηση διαφορετικών συχνοτήτων στον ιππόκαμπο, έχει μελετηθεί με μοντέλα in vitro και αφορά σε μεγάλο βαθμό χολινεργικές και γλουταματεργικές δράσεις. Συγκεκριμένα, τόσο στην περιοχή CA3 όσο και στη CA1, ρυθμοί θ έχουν επιτευχθεί in vitro με μουσκαρινική και γλουταματεργική διέγερση (Cobb et al., 2000; Gillies et al., 2002; Gloveli et al., 2005a; Konopacki et al., 1992) και ρυθμοί γ επίσης με μουσκαρινική ή γλουταματεργική διέγερση, αλλά και «παθολογικά» με μίμηση ομοιοστατικών ανισορροπιών (πχ. μετά από αύξηση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης καλίου) (LeBeau et al., 2002; Towers et al., 2002; Fisahn et al., 2004; Hájos et al., 2004; Pálhalmi et al., 2004; Gloveli, Dugladze, Rotstein, et al., 2005; Gloveli, Dugladze, Saha, et al., 2005).

Σε φυσιολογικές συνθήκες, για την ανάκληση μνήμης, η περιοχή CA3 λειτουργεί ως αυτοσχετιστικό¹ νευρωνικό δίκτυο, που παρέχει την προεπεξεργασία της μίας συνιστώσας του σήματος (η άλλη συνιστώσα διαβιβάζεται άμεσα από τον ενδορρινικό φλοιό) προς την CA1, εξομαλύνοντας («ανακαλεί»/ανασυνθέτει) την συντρέχουσα κατάσταση του ιπποκάμπου για τις συνθήκες όπου ζητείται η αποθηκευμένη πληροφορία (Treves and Rolls, 1994; Lorincz and Buzsáki, 2000; Mizuseki et al., 2009) (εικόνα 5). Ο ρόλος της περιοχής CA3 και ειδικά του υποπεδίου CA3a είναι σημαντικός για την ροή πληροφορίας στον υπόλοιπο ιππόκαμπο, αφού, λόγω των αυξημένων παράπλευρων ανατροφοδοτούμενων συνδέσεων στην πυραμδική στιβάδα, έχει τη δυνατότητα να παράγει ενισχυμένης έντασης υψίσυχνους κυματισμούς, που διαδίδονται και στις δύο κατευθύνσεις (CA1, CA3c) (Chrobak and Buzsáki, 1996; Csicsvari et al., 2003; Wittner et al., 2007). Η ιδιότητα αυτή καθιστά την περιοχή CA3 ιδιαίτερα επιρρεπή σε αυξημένη και υπερ-συγχρονισμένη δραστηριότητα, γεγονός εκμεταλλεύσιμο για τη μελέτη επιληπτοειδών εκφορτίσεων και που αξιοποιείται στην παρούσα εργασία για την μελέτη εκφορτίσεων μεσοκρυσικού τύπου.

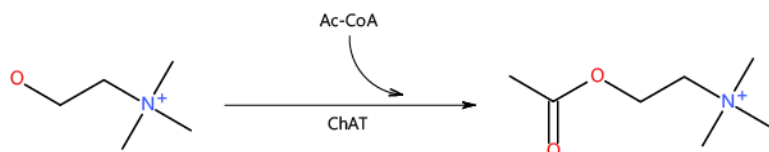
¹ Συμπληρώνει για το ερέθισμα που δέχεται ενδογενώς παραγόμενες εκφορτίσεις από προ-αποθηκευμένες κατανομές εκφορτίσεων, ανάλογα με την κατάσταση του δικτύου.

1.3. Ακετυλοχολίνη και μουςκαρινικοί υποδοχείς

1.3.1 Γενικά

Η ακετυλοχολίνη ((2-ακετοξυ-αιθυλ)-τριμεθυλαμμώνιο) είναι ένας εξαιρετικά διαδεδομένος νευροδιαβιβαστής ή νευρορρυθμιστής στο ΚΝΣ. Η θεώρησή της ως νευροδιαβιβαστή προτάθηκε και εδραιώθηκε, διαδοχικά, από τους Hunt, Dale και Loewi στο πρώτο τέταρτο του 20^{ου} αιώνα. Σχετίζεται λειτουργικά με βασικές γνωσιακές λειτουργίες (μνήμη, προσοχή) και την εγρήγορση του ζώου (Hasselmo, 2006; Jones, 2004; Sarter et al., 2005).

Η ακετυλοχολίνη συντίθεται με την εστεροποίηση χολίνης και οξικού (η ακετυλ-ομάδα παρέχεται από το ακετυλο-συνένζυμο Α), που καταλύεται από την ακετυλ-τρανσφεράση της χολίνης (ChAT). (εικόνα 6)



Εικόνα 6: στοιχειομετρική σύνθεση της ακετυλοχολίνης

Μετά την απελευθέρωση από τα κυστίδια η ακετυλ-χολινεστεράση υδrolύει την ακετυλοχολίνη προς χολίνη, που επαναπροσλαμβάνεται από τον μεταφορέα της χολίνης -ChT. Η μεταφορά της ακετυλοχολίνης στα κυστίδια εξυπηρετείται από τον κυστιδιακό μεταφορέα της ακετυλοχολίνης -VAChT-, γεγονός που αξιοποιείται εκτενώς για τον ανοσοχημικό εντοπισμό χολινεργικών τερματικών.

Οι υποδοχείς της ακετυλοχολίνης διακρίνονται σε μεταβοτροπικούς (μουςκαρινικούς -γλυκοπρωτεΐνες 7 διαμεμβρανικών περιοχών, που αλληλεπιδρούν με G-πρωτεΐνες) και ιονοτροπικούς (νικοτινικούς - πενταμερείς διαύλους ιόντων νατρίου-καλίου-καλσίου).

Η διάκριση υποτύπων μουςκαρινικών υποδοχέων παρατίθεται αναλυτικότερα παρακάτω. Η διάκριση μεταξύ υποτύπων των νικοτινικών υποδοχέων γίνεται φαρμακολογικά: από τους νικοτινικούς υποδοχείς οι N1 (νευρομυϊκοί) ενεργοποιούνται εκλεκτικά από το φαινυλ-τριμεθυλαμμώνιο και αναστέλλονται από την d-τουμποκουραρίνη και τις α-τοξίνες, ενώ οι N2 (στο ΚΝΣ) ενεργοποιούνται εκλεκτικά από το 1,1-διμεθυλ-4-φαινυλ-πιπεραζίνιο και αναστέλλονται με την τριμεθαφάνη.

Η χολινεργική εννεύρωση στον εγκέφαλο αρουραίου αποτελείται από 6 ομάδες νευρώνων από τις οποίες οι 2 (μέσο διάφραγμα και κάθετο σκέλος της διαγώνιας δέσμης Broca) στοχεύουν στον ιππόκαμπο (Eckenstein et al., 1988; Mesulam et al., 1983; Woolf, 1991), κυρίως καθοδικά της πυραμιδικής στιβάδας, μεταξύ πυραμιδικών και oriens (Schäfer et al., 1998).

1.3.2 Μουςκαρινικοί υποδοχείς

Η διάκριση μεταξύ υποτύπων των μουςκαρινικών υποδοχέων (M1-M5) έγινε επίσης με φαρμακολογικά κριτήρια, ξεκινώντας από την πιρενζεπίνη για τους M1 και επεκτάθηκε σταδιακά με την ανακάλυψη σχετικά εκλεκτικών αγωνιστών και ανταγωνιστών για τους διάφορους υποτύπους (βλ. πίνακα 1), και με την εύρεση των αλληλουχιών αμινοξέων (Caulfield, 1993; Caulfield and Birdsall, 1998).

Εισαγωγή

Antagonist	M1	M2	M3	M4	M5
Atropine	9.0–9.7	9.0–9.3	8.9–9.8	9.1–9.6	8.9–9.7
Pirenzepine	7.8–8.5	6.3–6.7	6.7–7.1	7.1–8.1	6.2–7.1
Methoctramine	7.1–7.8	7.8–8.3	6.3–6.9	7.4–8.1	6.9–7.2
4-DAMP	8.6–9.2	7.8–8.4	8.9–9.3	8.4–9.4	8.9–9.0
Himbacine	7.0–7.2	8.0–8.3	6.9–7.4	8.0–8.8	6.1–6.3
AF-DX 384	7.3–7.5	8.2–9.0	7.2–7.8	8.0–8.7	6.3
Triptiramine	8.4–8.8	9.4–9.6	7.1–7.4	7.8–8.2	7.3–7.5
Darifenacin	7.5–7.8	7.0–7.4	8.4–8.9	7.7–8.0	8.0–8.1
Guanylpirenzepine	7.7	5.5	6.5	6.5	6.8
PD 102807	5.3	5.7	6.2	7.3	5.2
MT3	7.1	<6	<6	8.7	<6
MT7	9.8	<6	<6	<6	<6

Πίνακας 1: Σταθερές συγγένειας ($-\log KB$) μερικών μουςκαρινικών ανταγωνιστών ανά υποτύπο μουςκαρινικών υποδοχέων. Μεγαλύτερες τιμές δείχνουν μεγαλύτερη συγγένεια. (Caulfield and Birdsall, 1998)

Στον ιππόκαμπο αρουραίου έχουν εντοπιστεί όλοι οι υποτύποι μουςκαρινικών υποδοχέων, με τους M_1 να κυριαρχούν (Flynn et al., 1997). Οι $M_{1,3}$ (M_1 και M_3) εκφράζονται κατά κανόνα σε κύριους νευρώνες (λ.χ. πυραμιδικούς) ενώ οι $M_{2,4}$ (M_2 και M_4) σε διανευρώνες (Levey et al., 1995a). Εντοπίζονται είτε προσυναπτικά είτε μετασυναπτικά, ανάλογα με τον τύπο του νευρώνα και η δράση τους διαφέρει αναλόγως του φέροντος νευρώνα και του προσυναπτικού ή μετασυναπτικού εντοπισμού (Levey et al., 1994, 1995a, 1995b; Rouse et al., 1998): μετασυναπτικά σε πυραμιδικούς νευρώνες ($M_{1,3}$) εκπολώνουν το κύτταρο και μειώνουν την προσαρμογή εκφορτίσεων-συχνότητας (“spike-frequency adaptation” - δηλαδή την σταδιακή μείωση της συχνότητας των εκφορτίσεων με την αύξηση του αριθμού των επαναλαμβανόμενων εκφορτίσεων), αυξάνουν τα ρεύματα I_h και I_{cat} ενώ μειώνουν τα I_M , I_{Kleak} και I_{AHP} , μετασυναπτικά σε διανευρώνες εκπολώνουν το κύτταρο, και προσυναπτικά ελαττώνουν την απελευθέρωση γλουταμικού ή GABA, αναλόγως με τον τύπο του κυττάρου που τους φέρει (πυραμιδικό ή διανευρώνας, αντίστοιχα).

Ο ρόλος των μουςκαρινικών υποδοχέων σε γνωσιακές λειτουργίες έχει επαληθευτεί στον άνθρωπο, με χορήγηση μη-ειδικών μουςκαρινικών αγωνιστών και ανταγωνιστών σε υγιή άτομα ή άτομα με άνοιες (Bodick NC, 1997; Cummings, 2003; Drachman DA, 1974; Rusted and Warburton, 1988; Sunderland et al., 1986). Ειδικά για τον ιππόκαμπο, παρ’ότι οι νικοτινικοί υποδοχείς είναι πιθανό να ενισχύουν τη διεγερσιμότητα άμεσα – και ίσως εξωσυναπτικά- (Tricoire and Rio, 2007) ή έμμεσα μέσω GABA-εργικών διανευρώνων (Wanaverbecq et al., 2007), δεν εκφέρουν άμεσα αποτελέσματα στα πυραμιδικά κύτταρα (Reece and Schwartzkroin, 1991), αφήνοντας τις πιο έντονες δράσεις στην ενεργοποίηση μουςκαρινικών υποτύπων. Η δράση των μουςκαρινικών υποδοχέων εξαρτάται –όπως αναφέρθηκε νωρίτερα– από τον εντοπισμό του υποδοχέα. Έτσι, οι μετασυναπτικοί μουςκαρινικοί υποδοχείς έχουν διεγερτικό ρόλο και οι προσυναπτικοί έχουν ανασταλτική δράση στις γλουταματεργικές συνάψεις του ιπποκάμπου (πιο έντονα στις παράπλευρες ίνες Schaffer), αλλά και στην ενίσχυση της GABAεργικής αναστολής (στην περίπτωση των βρυωδών ινών) (Kremin and Hasselmo, 2007; Seeger et al., 2004; Valentino and Dingleline, 1981; Vogt and Regehr, 2001). Παράλληλα, στην περίπτωση των ινών Schaffer, οι M_2 υποδοχείς σε συνδυασμό με M_1 μετασυναπτικούς, παρέχουν τη δυνατότητα μακροπρόθεσμης ενίσχυσης ή καταστολής συνάψεων (LTP/LTD), αναλόγως της συγκέντρωσης της ακετυλοχολίνης ή άλλων χολινεργικών αναλόγων και χωρίς την εξάρτηση από υποδοχείς NMDA (Auerbach and Segal, 1996; Shinoe et al., 2005). Επίσης, και σε παθολογικό (επιληπτικό) ιστό (Gigout et al., 2012) αλλά και σε in vivo πειράματα (Morimoto et al., 2004; Wasterlain et al., 1985), η ενεργοποίηση των μουςκαρινικών υποδοχέων ενισχύει την υπερδιεγερσιμότητα και παράγει επιληπτοειδείς κρίσεις, αντίστοιχα.

Η λειτουργία των μουςκαρινικών υποδοχέων μεσολαβείται από G-πρωτεΐνες, με τους M_1 , M_3 και M_5 να αλληλεπιδρούν με τις G_q και G_{11} , και τους M_2 και M_4 με τις G_i και G_o . Σε γενικές γραμμές, οι $M_{1,3,5}$ διευκολύνουν την εκπόλωση, ενώ οι $M_{2,4}$ δρουν αντιθέτως. (Lanzafame et al., 2003; Wess, 2004). Οι οδοί ενδοκυττάριας μεταγωγής σήματος που ακολουθούν, κυρίως μέσω φωσφολιπασών A2/C/D, αδενυλικής κυκλάσης και φωσφοδιεστεράσης, επηρεάζουν και μακροπρόθεσμα την συμπεριφορά του κυττάρου -για παράδειγμα, η ενίσχυση του LTP σε τομές ιπποκάμπου από ένα τελικό προϊόν του καταρράκτη μεταγωγής σήματος (ERK1/2 - Extracellular signal Regulated Kinase), που προκαλεί η ενεργοποίηση των $M1$ υποδοχέων (English and Sweatt, 1997) - και πιο άμεσα την ρύθμιση διαύλων ιόντων καλίου (υπερπολωτικοί), ασβεστίου (εκπολωτικοί), μη-ειδικών κατιόντων (εκπολωτικοί), και εμμέσως χλωρίου (υπερπολωτικοί).

Πιθανώς λόγω της ευκολίας μελέτης τους σε επαρκώς απομονωμένα συστήματα, οι περισσότερες από τις δράσεις μουςκαρινικών υποδοχέων επί διαύλων έχουν διευκρινιστεί σε περιφερικούς ιστούς ή σε κυτταροκαλλιέργιες ή σε τροποποιημένα ωκύτταρα, με εξαίρεση ορισμένους διαύλους καλίου κι ένα

Εισαγωγή

ασβεστιοεξαρτώμενο ρεύμα I_{cat} (Lanzafame et al., 2003). Πιο συγκεκριμένα, από τις αγωγιμότητες καλίου, τα ρεύματα I_M , I_{AHP} , I_{leak} μειώνονται από μουσκαρινικούς αγωνιστές (Fisahn et al., 2002; Rouse et al., 2000). Εκτός ιπποκάμπου, υπερπολωτικά ρεύματα των διαύλων Kir3 ενισχύονται από υποδοχείς $M_{2/4}$ (M_2 ή M_4) και αναστέλλονται από $M_{1/3}$ (M_1 ή M_3), με βάση τις συζευγμένες G-πρωτεΐνες (Hill and Peralta, 2001), κι επίσης, το ρεύμα I_M αναστέλλεται από $M1$ υποδοχείς (Bernheim et al., 1992; Marrion et al., 1989). Επίσης, εκτός ιπποκάμπου, από τους διαύλους ασβεστίου, είναι γνωστό ότι ρυθμίζονται από μουσκαρινικούς υποδοχείς οι τύποι N, L, T, και R: οι δίαυλοι τύπου L διευκολύνονται από μουσκαρινικούς υποδοχείς $M_{1/3}$ σε διάφορους ιστούς (Valenzuela et al., 1997; Wang et al., 1998; Wu et al., 2002), οι δίαυλοι N αναστέλλονται από μουσκαρινικούς υποδοχείς M_2 (άμεσα) και M_1 (έμμεσα) (Hille et al., 1995), οι δίαυλοι T ενισχύονται από M_3 και αναστέλλονται από $M_{2/4}$ υποδοχείς (Pemberton et al., 2000), και οι δίαυλοι R ενισχύονται από M_1 υποδοχείς και είτε ενισχύονται είτε αναστέλλονται από M_2 , πιθανώς ανάλογα με τη συγκέντρωση του χολινεργικού αγωνιστή (Melliti et al., 2000; Meza et al., 1999). Το ασβεστιοεξαρτώμενο μη-ειδικό ρεύμα κατιόντων I_{cat} , καθώς και το μικτό ρεύμα καλίου/νατρίου I_H έχει δειχθεί ότι ενεργοποιείται από τους M_1 υποδοχείς στον ιππόκαμπο μυός. (Fisahn et al., 2002) Τέλος, αναφέρονται στη βιβλιογραφία (ανασκόπηση από (Lanzafame et al., 2003)) διάφοροι τύποι μη χαρακτηρισμένων ασβεστιοεξαρτώμενων υπερπολωτικών διαύλων χλωρίου, που ρυθμίζονται από μουσκαρινικούς υποδοχείς (ενισχύονται από M_2).

Από τους υποδοχείς γλουταμικού, σημαντική ειδικά για λειτουργίες που σχετίζονται με τη μνήμη (και με πιθανή εμπλοκή σε ένα από τα μοντέλα που χρησιμοποιούμε, με μηδενική ονομαστική εξωκυττάρια συγκέντρωση μαγνησίου), είναι η συνεργιστική δράση μουσκαρινικών υποδοχέων με NMDA υποδοχείς του γλουταμικού –η ενεργοποίηση μουσκαρινικών υποδοχέων ενισχύει την ενεργοποίηση των NMDA υποδοχέων. (Kozhemyakin et al., 2010; Marino et al., 1998; Markram and Segal, 1990)

Στα πλαίσια του παρόντος ενδιαφέρει η συμμετοχή των μουσκαρινικών υποδοχέων στη μεταβολή της διεγερσιμότητας που προκαλεί μια επιληπτοειδής κρίση σε μικρή ηλικία στον ιππόκαμπο πειραματοζώων, καθώς από κλινικές και πειραματικές παρατηρήσεις γνωρίζουμε ότι μετά από παρατεταμένες κρίσεις σε μικρή ηλικία παρατηρούνται γνωσιακές διαταραχές (Liu et al., 2003; Rice et al., 1998), σε διαδικασίες που σχετίζονται λειτουργικά με την ακετυλοχολίνη και ειδικά τους μουσκαρινικούς υποδοχείς (Seeger et al., 2004; Wess, 2004), καθώς και διευκόλυνση επόμενων κρίσεων (Hesdorffer et al., 1998). Επιπλέον, από προηγούμενη έρευνα του εργαστηρίου έχει παρατηρηθεί ότι το επιληπτικό ιστορικό πειραματοζώων συνοδεύεται από αυξήσεις της χολινεργικής διεγερσιμότητας (Meilleur et al., 2000, 2003), και αντιστρόφως, η ενδογενής ακετυλοχολίνη διευκολύνει την εμφάνιση επιληπτοειδών εκφορτίσεων και πιθανώς κρίσεων (Potier and Psarropoulou, 2001, 2004).

1.4. Σκοπός της εργασίας

Το status epilepticus σε νεαρή ηλικία σχετίζεται με επιβάρυνση της νοητικής λειτουργίας καθώς και με πιθανή διευκόλυνση επανεμφάνισης επιληπτικών κρίσεων (κεφ. 1.1). Οι γνωσιακές λειτουργίες που επηρεάζονται από την εμφάνιση του status epilepticus σε παιδιά και παρατηρούνται ευκολότερα είναι διαταραχές της μνήμης και μάθησης (κεφ. 1.1), δηλαδή διαδικασίες που εξαρτώνται από το νευρορρυθμιστικό ρόλο της ακετυλοχολίνης (κεφ. 1.3) και συνδέονται στενά με τον λειτουργικό ρόλο του ιπποκάμπου (κεφ. 1.2).

Από προηγούμενα ευρήματα του εργαστηρίου, μια παρατεταμένη γενικευμένη επιληπτική κρίση κατά την ανάπτυξη αυξορρυθμίζει την απόκριση του ενήλικου εγκεφάλου σε χολινεργικά ερεθίσματα διαμεσολαβούμενα από μουσκαρινικούς υποδοχείς. Παράλληλα, η ενδογενής ακετυλοχολίνη διευκολύνει την εμφάνιση επιληπτοειδών εκφορτίσεων (κεφ. 1.3).

Ο ιππόκαμπος συνδέεται επίσης με την συνηθέστερη επιληψία που παράγει γενικευμένες κρίσεις, την επιληψία κροταφικού λοβού.

Με αυτή τη βάση εξετάζουμε την σχέση μιας επιληπτικής κρίσης κατά την ανάπτυξη (ηλικία 20 ημερών) με την δυνατότητα ρύθμισης *in vitro* επιληπτοειδών εκφορτίσεων από χολινεργική (μουσκαρινική) διέγερση και αναστολή, χρησιμοποιώντας τον ιππόκαμπο, λόγω λειτουργικής συνάφειας, και διακρίνοντας μεταξύ κροταφικού και διαφραγματικού ιπποκάμπου, αφού γνωρίζουμε από την βιβλιογραφία την διαφορά διεγερσιμότητας των δύο άκρων (κεφ. 1.2).

Για την μελέτη επιληπτοειδούς δραστηριότητας *in vitro* επιλέξαμε ένα μοντέλο ενίσχυσης των ρευμάτων NMDA από το ενδογενές γλουταμικό (τΕΝΥ άνευ μαγνησίου) κι ένα μοντέλο συνολικής αύξησης της διεγερσιμότητας των μεμβρανών, που μεσολαβείται από μείωση των ρευμάτων καλίου και περισσότερο του ρεύματος I_A (4-αμινοπυριδίνη).

Μέθοδοι

2.1. Υλικά

2.1.1 Πειραματόζωα

Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν, με βάση τον αρχικό σχεδιασμό του εργαστηρίου είναι αρσενικοί επίμυες στελέχους Sprague-Dawley (Meilleur et al., 2000, 2003). Χρησιμοποιήθηκαν επίσης και θηλυκά πειραματόζωα. Τα πειραματόζωα προήλθαν είτε από το Ινστιτούτο Παστέρ Αθηνών είτε από αναπαραγωγές της πειραματικής μονάδας ζώων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Χρησιμοποιήθηκαν 117 (+11) άτομα των οποίων 64 (+6) ενέθηκαν με PTZ και από τα οποία αξιοποιήσιμα ήταν τα 35 (+6) και 53 (+5) φυσιολογικά ζώα-μάρτυρες. Οι τομές ιπποκάμπου που προέκυψαν ήταν 132 (+17), με χρήση 1 ή 2 τομών από κάθε ζώο.

Όλα τα πειραματόζωα συντηρήθηκαν στην πειραματική μονάδα ζώων του Πανεπιστημίου, σε συνθήκες 12 ωρών φωτός/σκότους ανά 24ωρο, με ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό. Η θερμοκρασία ρυθμιζόταν μεταξύ 12-28 °C. Για την υγρασία δεν απαιτήθηκε ρύθμιση. Κατά τους θερινούς και χειμερινούς μήνες αποφευγόταν αναπαραγωγές και *in vivo* διαδικασίες, εφ' όσον ήταν εφικτό.

Τα πειραματόζωα που επιβίωσαν από τις *in vivo* διαδικασίες καθώς και οι μάρτυρες σημάνθηκαν με μικρά κοψίματα στα αυτιά, με μια μέθοδο αρίθμησης (ένας αριθμός για κάθε ένα από 255 πειραματόζωα), έτσι ώστε να αποφεύγονται σφάλματα και παρατοποθετήσεις.

2.1.2 Διαλύματα, φάρμακα, χημικά

Για την επαγωγή των σπασμών σε αρουραίους 20 ημερών χρησιμοποιήθηκαν 60-90mg/kg πεντυλενετετραζόλης (Sigma, P6500) διαλυμένης σε φυσιολογικό ορό (0.9% NaCl).

Το διάλυμα ετοιμάστηκε την ίδια μέρα ή την αμέσως προηγούμενη (<12h) και συντηρήθηκε στους -20C. Αποψύχθηκε 1 (μία) φορά και χρησιμοποιήθηκε αμέσως μετά την απόψυξη. Η ένεση έγινε με σύριγγα ινσουλίνης (1mL – διαβαθμίσεις ανά 10μL)

Το τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό ("tENY" στο εξής) παρασκευάστηκε με ζύγιση των ακολούθων και διάλυσή τους σε 10-πλάσια συγκέντρωση της τελικής (stock solution): NaCl 124mM, KCl 2mM, MgSO₄ 2mM CaCl₂ 2mM KH₂PO₄ 1.25mM NaHCO₃ 26mM D-γλυκόζη 10mM και σε μικρή συγκέντρωση η χρωστική-δείκτης pH phenol red 0.03mM. (άλατα από Merck, D-γλυκόζη από Merck, phenol red από Sigma). Ο δείκτης pH προστέθηκε, αν και δεν εξυπηρετούσε στον προσδιορισμό του pH του tENY (δεν προβλεπόταν επαρκείς, τακτικές φωτομετρήσεις στο πρωτόκολλο), γιατί επέτρεπε τον χονδρικό έλεγχο του διοξειδίου του άνθρακα στο διάλυμα –δεδομένου ότι το αέριο μίγμα που χρησιμοποιήθηκε περιείχε 95% οξυγόνο και 5% διοξείδιο άνθρακα– και υπό όρους του οξυγόνου.

Για τις καταγραφές το tENY παραλλάχθηκε ως εξής: (α) αφαιρέθηκε (δεν προστέθηκε) το θειικό μαγνήσιο για να καταργείται το μπλοκάρισμα από Mg²⁺ των υποδοχέων NMDA και να προκύπτει αύξηση της χρονικής άθροισης εκφορτίσεων ή (β) προστέθηκε 4-αμινοπυριδίνη (Sigma-Aldrich) σε τελική συγκέντρωση 50μM για να μπλοκάρονται κανάλια καλίου (κυρίως το A-current) και να αυξάνεται συνολικά η διεγερσιμότητα.

Το συμπυκνωμένο διάλυμα tENY αποθηκεύτηκε σε τρία τμήματα (όξινο ανθρακικό, θειικό μαγνήσιο, όλα τα υπόλοιπα), το καθένα 10x της τελικής συγκέντρωσης, σε γυάλινα δοχεία και σε ψυγείο (2-5C) και αραιώθηκε ως την τελική συγκέντρωση με απιονισμένο νερό λίγες ώρες πριν τη χρήση του, την ίδια ημέρα του πειράματος.

Τα φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν είναι η εσερίνη (ή φυσοστιγμίνη), αναστολέας του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση, που υδρολύει την ακετυλοχολίνη σε χολίνη (αδρανές παράγωγο/υπόστρωμα) επιτρέποντας την παράταση της δράσης του νευρορρυθμιστή χωρίς περαιτέρω αύξηση της διαθεσιμότητάς του σε σχέση με την ενδογενή του ιστού, η καρβαχόλη (καρβαμοϋλοχολίνη), μη υδρολυόμενο ανάλογο της ακετυλοχολίνης, και η ατροπίνη, που είναι ένας μη-εκλεκτικός μεταξύ υποτύπων μουσκαρινικός ανταγωνιστής. Επίσης χρησιμοποιήθηκε και ο ανταγωνιστής των NMDA υποδοχέων AP-5.

Τα φάρμακα προετοιμάστηκαν ως υδατικά διαλύματα εσερίνης (Sigma), ατροπίνης (Sigma), καρβαχόλης (Tocris) σε εκατονταπλάσια συγκέντρωση της τελικής. Οι τελικές συγκεντρώσεις είναι, αντίστοιχα 10, 1, 2 μM. Επίσης, για κάποια πειράματα χρησιμοποιήθηκε AP-5 (Tocris, 50 μM) για να ελέγξουμε αν οι εκφορτίσεις, που προκύπτουν από την 4-αμινοπυριδίνη, εξαρτώνται από τους υποδοχείς NMDA.

Όλα τα διαλύματα φαρμάκων διαιρέθηκαν σε μικρές ποσότητες (για 3-5 χρήσεις, ανάλογα με το σχεδιασμένο πείραμα), και διατηρήθηκαν σε κατάψυξη (-20C). Κάθε σωληνάριο χρησιμοποιήθηκε αυθημερόν.

2.2. Διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία διαιρείται στην *in vivo* πρόκληση των σπασμών σε νεαρή ηλικία -20 ημέρες μετά τη γέννηση- και στις *in vitro* δοκιμασίες (ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές), αφού τα ζώα ωριμάσουν, σε ηλικία 60 ημερών, τουλάχιστον.

2.2.1 *In vivo* διαδικασία

Η αξιολόγηση των κρίσεων έγινε με την κλίμακα του Racine, που περιγράφει 5 στάδια σπασμών κατά την ηλεκτρική διέγερση της αμυγδαλής αρουραίου. Το 1^ο στάδιο περιλαμβάνει κινήσεις του προσώπου, το 2^ο επαναλαμβανόμενη κατακόρυφη κίνηση (στρέψη) της κεφαλής, το 3^ο κλονικές κινήσεις των πρόσθιων άκρων, το 4^ο τονικούς σπασμούς, ανασήκωμα των πρόσθιων άκρων και κίνηση προς τα πίσω, και το 5^ο απώλεια ισορροπίας, αδυναμία στήριξης και τονικούς-κλονικούς σπασμούς (Racine, 1972). Οι διαφορές μεταξύ των μοντέλων (χρήση χημικού σπασμογόνου έναντι προκλητής ηλεκτρικής σπασμογένεσης) αλλοιώνουν μερικώς τις συμπεριφορικές παρατηρήσεις ειδικά στα τελευταία στάδια (4-5) -η πεντυλενετετραζόλη παράγει από ηπιότερες έως εκτός περιγραφής του Racine κρίσεις, με χαρακτηριστικά διαστήματα ακινησίας και τονικών σπασμών ή γρήγορο ανεξέλεγκτο τρέξιμο- οπότε όπου υπάρχει αμφιβολία αντιπαραβάλλεται η κλίμακα των Lüttjohann et al. για κρίσεις με πεντυλενετετραζόλη (τα στάδια 1 έως 5 ανταποκρίνονται επακριβώς στις παρατηρούμενες συμπεριφορές, αλλά το 6^ο στάδιο και υπο-στάδια, που προτείνονται, ενσωματώνονται στο 5^ο καθώς δεν χρησιμοποιήθηκε ηλεκτροεγκεφαλογράφημα για την παρακολούθηση των κρίσεων). Η παρακολούθηση γινόταν συνεχώς και καταγραφόταν το ελάχιστο στάδιο του αμέσως προηγούμενου χρονικού διαστήματος ανά 3 (κατά την πρώτη ώρα), 5 (κατά την 2^η ώρα) ή 10 λεπτά (αργότερα).

Για να θεωρείται ότι η κρίση που προκλήθηκε προσεγγίζει το status epilepticus, πρέπει να χαρακτηρίζεται από συνέχεια (χωρίς διαλείψεις) και παρατεταμένη διάρκεια, οπότε επιλέχθηκαν μόνο τα πειραματόζωα που παρέμειναν στο 5^ο στάδιο της κλίμακας για τουλάχιστον 20 συνεχόμενα λεπτά.

Εάν η δόση που χορηγήθηκε δεν επαρκούσε για να παράγει τουλάχιστον σπασμούς του 3^{ου} σταδίου (επειδή είναι πιο εύκολα διακριτό από τα στάδια 1-2) εντός 5-10 λεπτών, συμπληρώθηκαν, το αργότερο 15 λεπτά μετά την τελευταία ένεση, 10 mg/kg.

Από τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν ένα μεγάλο ποσοστό (αθροιστικά, περίπου 40%) δεν μπορούσαν να αξιοποιηθούν είτε γιατί δεν εμφάνισαν κρίσεις (~20%) είτε γιατί μετά από παρατεταμένη παραμονή στο 5^ο στάδιο (κάποια για διαστήματα άνω των 3 ωρών) δεν επιβίωσαν (χρήση αντιεπιληπτικών/ηρεμιστικών φαρμάκων για τον τερματισμό των κρίσεων δεν έγινε, προς αποφυγή περαιτέρω αλληλεπιδράσεων).

2.2.2 Προετοιμασία της *in vitro* διαδικασίας

Για τη μελέτη της διεγερσιμότητας χρησιμοποιήσαμε τον ιππόκαμπο αρουραίου, λόγω της εμπλοκής του ομολόγου του στην επιληψία μέσου κροταφικού λοβού στον άνθρωπο και λόγω ευκολίας παρασκευής τομών και καταγραφής από αυτές και εστίασαμε στα πυραμιδικά κύτταρα της περιοχής CA3, επειδή αποτελούν ένα καλά μελετημένο δίκτυο με υψηλή ενδογενή διεγερσιμότητα ή χαμηλή ουδό παραγωγής επιληπτοειδών εκφορτίσεων.

Για την *in vitro* διαδικασία ετοιμάστηκαν, πριν το πείραμα, το τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό, τα διαλύματα των φαρμάκων που προστέθηκαν, τα γυάλινα ηλεκτρόδια, το διάλυμα πλήρωσης των ηλεκτροδίων, και χλωρώθηκαν οι διεπαφές του διαλύματος ηλεκτροδίων (ή χρησιμοποιήθηκαν έτοιμες προ-χλωρωμένες παρόμοιες με το ηλεκτρόδιο αναφοράς).

Τα φάρμακα προστέθηκαν ανά 20mL τΕΝΥ (που ισοδυναμεί σε χρόνο από 8 ως 13 λεπτά), και οι μετρήσεις έγιναν κατά προτίμηση στα τελευταία 5 λεπτά για να μετράμε το καθαρό αποτέλεσμα, χωρίς υπολείμματα της προηγούμενης διαβροχής. Από τα φάρμακα, η ατροπίνη προστέθηκε είτε μόνη της στο τΕΝΥ διαβροχής είτε σε συνδυασμό με χολινεργικούς αγωνιστές.

Ο χρόνος ροής των 20mL διέφερε από πείραμα σε πείραμα, γιατί η διαφορά πίεσης καθορίζεται τυχαία από το βάρος του υγρού και πιθανώς από μη-ελεγχόμενες στρεβλώσεις του σωλήνα που συνδέει την έξοδο της ογκομετρικής σύριγγας με την είσοδο του θαλάμου διαβροχής. Ωστόσο, στον δεύτερο θάλαμο διαβροχής που χρησιμοποιήθηκε (σχεδιασμός διεπιφάνειας “interface chamber”), η ταχύτητα ροής ήταν πιο σταθερή (20mL/8-10 min). Σε κάθε περίπτωση, η ταχύτητα ροής διατηρήθηκε επαρκώς χαμηλή, ώστε οι τομές να διατηρούνται υγιείς και να μην προκύπτουν φαινόμενα υπεरोξίας (Hájos et al., 2009).

Τα ηλεκτρόδια που χρησιμοποιούνται για την καταγραφή είναι μικροπιπέτες βοροπυριτικής υάλου λεπτού τοιχώματος (WPI thinwall OD=1.5mm), που προετοιμάζονται με οριζόντιο puller Narishige PD-5 ή Sutter P97

Μέθοδοι

Flamming-Brown, με ρυθμίσεις heat=6, main magnet=5.5, magnet=4.75 στο Narishige (διάρκεια ~3min) και heat=730, pressure=500, pull=0, velocity=75, delay=180 σε ramp value=757 για θερμαινόμενο νήμα τύπου box (ομοιόμορφη θέρμανση από 4 πλευρές) πλευράς 2.5mm, με ανανεωμένο Drierite και σε χώρο ελεγχόμενης θερμοκρασίας και υγρασίας κατά τη δοκιμή ramp (διάρκεια 40-60sec).

Τα ηλεκτρόδια πληρώθηκαν με διάλυμα χλωριούχου νατρίου 4M σε απιονισμένο νερό, το οποίο αποθηκεύτηκε σε πλαστικό δοχείο, και διατηρείται σε ψυγείο σε θερμοκρασία 2-8C. Η αντίσταση των ηλεκτροδίων μετρήθηκε με το κύκλωμα Wheatstone Bridge του ενισχυτή σε τιμές 1-12MΩ.

2.2.3 Προετοιμασία του ιστού και καταγραφή

Ωριμα πειραματόζωα (ηλικίας 60 ημερών τουλάχιστον) αναισθητοποιήθηκαν σε πλαστικό κουτί όγκου 14 λίτρων περίπου είτε με ισοφλουράνιο (σκεύασμα "Forenium", Abbott, 1-2 mL για 2-3 λεπτά) είτε με διαιθυλαιθέρα (Sigma-Aldrich, 4-6 mL για 20-25 λεπτά). Ακολούθως το κάθε ζώο αποκεφαλίστηκε με λαμμητόμο μικρών ζώων και αφαιρέθηκε γρήγορα (< 1.5 λεπτό) ο εγκέφαλος, υπό συνεχή διαβροχή με πλήρες (με θεικό μαγνήσιο), οξυγονωμένο τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό.

Από το κάθε ημισφαίριο απομονώθηκε είτε το κροταφικό είτε το διαφραγματικό ακραίο τρίτο του ιπποκάμπου με τις παρακείμενες φλοιικές περιοχές. Το απομονωμένο τμήμα στερεώθηκε σε κύβο άγαρ με απλή αιθυλοκυανοακρυλική κόλλα, έτσι ώστε να μην εκτίθεται ο ιπποκάμπος στο πολυμεριζόμενο μέσο. Ο κύβος άγαρ τοποθετήθηκε στη συνέχεια σε πλαστικό δοχείο με οξυγονωμένο tENY, που στηρίζεται στην μικροτόμο Vibratome (Pelco101 series). Η λεπίδα του Vibratome στρεφόταν πριν το πείραμα κατά 20 μοίρες καθοδικά, ώστε να μην συμπιέζεται ο ιστός κατά την επεξεργασία του. Οι κύβοι άγαρ με τον ιστό τοποθετήθηκαν έτσι ώστε ο τοπικά διαμήκης άξονας του ιπποκάμπου να είναι κάθετος στο επίπεδο κίνησης της λεπίδας. Από τον κάθε ιπποκάμπο παρασκευάστηκαν το πολύ 3 εγκάρσιες τομές στα πρώτα 0.5-3 χιλιοστά από το άκρο του, με πάχος 500 μm όπως ακριβώς ρυθμίζεται από το Vibratome.

Όλη η διαδικασία μέχρι αυτό το σημείο πραγματοποιήθηκε σε χαμηλή θερμοκρασία (0-4C) με αποθέσεις πάγου, ώστε να αποφευχθούν μεταβολικές/βιοχημικές αλλοιώσεις του ιστού.

Από τις τομές αποκόπηκε με νυστέρι ο ενδορρινικός φλοιός (μετά το υπόθεμα) για το πείραμα των τομών ιπποκάμπου ή αφεθήκε ως είχε για το πείραμα των συνδυασμένων τομών ιπποκάμπου-ενδορρινικού φλοιού. Για το πείραμα των συνδυασμένων τομών ιπποκάμπου-ενδορρινικού φλοιού προτιμήθηκαν τομές του κροταφικού άκρου, καθώς φέρουν μεγαλύτερο τμήμα του μέσου ενδορρινικού τμήματος, απ' όπου γίνονται οι καταγραφές.

Οι τομές αποθηκεύτηκαν σε οξυγονούμενο δοχείο με tENY και για κάθε δοκιμή μέρος αυτών (2-3) μεταφέρθηκε στον θάλαμο καταγραφής. Όλες οι μεταφορές τομών πραγματοποιήθηκαν με τροποποιημένο σταγονόμετρο με φαρδύ λειασμένο στόμιο για να αποφεύγονται τραυματισμοί του ιστού.

Ο θάλαμος διαβροχής και καταγραφής που χρησιμοποιήθηκε είναι είτε τύπου submerged (όπως προκύπτει από τροποποίηση του Haas interface) είτε τύπου Haas interface. Από τις δύο επιλογές η πρώτη διασφαλίζει την διαβροχή και την οξυγόνωση του ιστού με την ροή tENY και από τις δύο πλευρές αν και το σχήμα είναι ακατάλληλο για ομαλή ροή -ορθογώνια εγκάρσια τομή- με αδρές επιφάνειες, ενώ η δεύτερη διασφαλίζει καλύτερη οξυγόνωση στην άνω επιφάνεια του ιστού (υδροφίλμ οξυγονωμένου tENY και πρόσθετη παροχή οξυγονωμένων υδρατμών) και παρέχει περισσότερο χώρο για άμεσες τροποποιήσεις του παρασκευάσματος. Τα αποτελέσματα, επίσης, ήταν συγκρίσιμα, μεταξύ των 2 επιλογών. Στην πρώτη περίπτωση ο ιστός αποτίθεται πάνω σε πλέγμα πλαστικών ινών, ενώ στην δεύτερη πάνω σε λεπτό διηθητικό χαρτί που διαβρέχεται από το tENY.

Το ηλεκτρόδιο αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε έχει σύσταση Ag/AgCl (WPI) κι έρχεται σε άμεση επαφή με το tENY στον θάλαμο διαβροχής.

Η καταγραφή ξεκίνησε μία ώρα μετά την τοποθέτηση των τομών στον θάλαμο διαβροχής, με το τροποποιημένο tENY για την καταγραφή.

Στην περίπτωση των πειραμάτων σε τομές ιπποκάμπου (κομμένου στο υπόθεμα) τα ηλεκτρόδια τοποθετήθηκαν στην περιοχή CA3a, στη στιβάδα των πυραμιδικών νευρώνων, ενώ στην περίπτωση των συνδυασμένων τομών ιπποκάμπου-ενδορρινικού φλοιού η καταγραφή έγινε ταυτόχρονα από τα πυραμιδικά της CA3a και από την 5^η-6^η στιβάδα του μέσου ενδορρινικού φλοιού (πυραμιδικοί νευρώνες που παράγουν αυθόρμητες ριπές συγχρονισμένων εκφορτίσεων στην 5^η στιβάδα).

Για την περίπτωση των συνδυασμένων τομών ιπποκάμπου-ενδορρινικού φλοιού, εκτός από το φαρμακολογικό τμήμα του πειράματος ενδιέφερε, επίσης, η μεταφορά πληροφορίας μεταξύ των δύο περιοχών, οπότε, για να αποκλείεται σταδιακά η δυνατότητα αγωγής δραστηριότητας από την μία περιοχή στην άλλη, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές τομές στην περιοχή CA1 για να διακοπεί η έξοδος της CA3 προς τον ενδορρι-

νικό φλοιό, και ακολούθως κάθετα στο παραυπόθεμα για να διακοπεί η είσοδος στην CA3 από τον ενδορρινικό φλοιό. Οι τομές αυτές έγιναν με θραύσμα λεπίδας ξυραφιού, για να περιοριστεί η επιφάνεια παρέμβασης στον ιστό. Πριν την τομή τα ηλεκτρόδια απομακρύνθηκαν και τοποθετήθηκαν ξανά μετά την τομή. Οι καταγραφές πριν και μετά την τομή μπορεί να διαφέρουν εξαιτίας της τυχαίας αλλαγής της θέσης του ηλεκτροδίου.

Τα ηλεκτρόδια που χρησιμοποιήθηκαν, είχαν αντίσταση μεταξύ 1MΩ και 12MΩ. Το σήμα (η διαφορά δυναμικού σε σύγκριση με το ηλεκτρόδιο αναφοράς) ενισχύθηκε από ενισχυτή Axoclamp 2B ή Axoclamp 900A και είτε τυπώθηκε σε θερμικό χαρτί με καταγραφικό DASH IV (Astromed), είτε αποθηκεύθηκε με ψηφιοποιητή Axon Digidata 1440A σε ψηφιακά αρχεία (ενισχυτές και ψηφιοποιητής από Axon Instruments/Molecular Devices). Στην πρώτη περίπτωση (άμεση εκτύπωση) το σήμα φιλτράρεται αναγκαστικά μεταξύ 0.1 και 100Hz (4-πολικό Bessel bandpass), λόγω αυξημένου θορύβου και διακυμάνσεων DC που αλλοιώνουν την κυματομορφή. Η συχνότητα δειγματοληψίας του καταγραφικού δεν είναι γνωστή, καθώς καθορίζεται σε mm χαρτιού ανά δευτερόλεπτο αντί δειγμάτων ανά δευτερόλεπτο, αλλά το σήμα φιλτράρεται επιπλέον στα 10Hz (high-cut) με σχετική ρύθμιση. Τα χαρακτηριστικά της αποτυπωμένης κυματομορφής αναμένεται να απέχουν από αυτά του εισερχόμενου σήματος (το εύρος και η ανάλυση του χαρτιού και της εκτύπωσης απαιτούν περαιτέρω αλλοιώσεις και παρεμβάσεις στο εισερχόμενο σήμα). Στην δεύτερη περίπτωση (ψηφιακή καταγραφή) το σήμα φιλτράρεται (8-πολικό Bessel low-pass στα 6kHz) και καταγράφεται στα 25kHz (συχνότητα αποκοπής Nyquist 12.5kHz), για να αποφεύγονται πιθανές αλλοιώσεις από συχνότητες >6kHz. Και στις δύο περιπτώσεις η πιστότητα της καταγραφής κρίθηκε επαρκής για τις μεταβλητές που εξετάστηκαν.

2.3. Χειρισμός δεδομένων - Στατιστική

2.3.1 Ελεγχόμενες μεταβλητές

Το πειραματικό σχέδιο όπως σχεδιάστηκε εξ αρχής, περιλαμβάνει σύγκριση των 2 άκρων του ιπποκάμπου μεταξύ φυσιολογικών και «επιληπτικών» αρσενικών πειραματοζώων, σε συνθήκες σύγχρονης αύξησης των ρευμάτων NMDA και χολινεργικής διέγερσης ή μουσκαρινικής αναστολής, και (ως επιπρόσθετος «μάρτυρας») σύγχρονης αναστολής ρευμάτων καλίου (A) με 4-αμινοπυριδίνη και χολινεργικής διέγερσης ή μουσκαρινικής αναστολής. Κατά την πορεία των πειραμάτων συμπεριλήφθηκε στον αρχικό σχεδιασμό και η χρήση θηλυκών πειραματοζώων με σκοπό να πραγματοποιηθούν οι συγκρίσεις μεταξύ αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων.

2.3.2 Ανάλυση και εξαγωγή αποτελεσμάτων

Από την παρατήρηση των καταγεγραμμένων κυματομορφών, οι μετρούμενες (εξαρτημένες) μεταβλητές που επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση είναι η συχνότητα (για όλα τα πειράματα) και η διάρκεια των εκφορτίσεων που καταγράφηκαν (για τις εκφορτίσεις του ενδορρινικού φλοιού). Η μέτρησή τους έγινε είτε με το χέρι (καταγραφές σε χαρτί) είτε με το υπολογιστικό πρόγραμμα Clampfit της Axon-Molecular Devices. Το λογισμικό παρέχει τη δυνατότητα ψηφιακών φίλτρων, που δεν αλλοιώνουν τα καταγεγραμμένα δεδομένα (αποθηκεύονται χωριστά). Το φιλτράρισμα που προτιμάται, είναι ένα low-pass φίλτρο (Bessel, 8-πολικό, για να περιορίζεται η ζώνη μετάβασης από τις συχνότητες που φιλτράρονται στις συχνότητες που περνούν) για συχνότητες μικρότερες των 40Hz, με στόχο την αφαίρεση των συνιστωσών της γραμμής AC του δικτύου τροφοδοσίας (κυρίως 50Hz, 100Hz, 150Hz) και ένα high-pass φίλτρο στα 0.1-0.5 Hz (παθητικό, μονοπολικό τύπου RC, για να μην εμφανίζονται ψευδείς κυματομορφές υψηλής συχνότητας κατά τις μεταβάσεις DC, όπως θα συνέβαινε με ένα φίλτρο Bessel ή Chebyshev), για την εξομάλυνση μεταβολών DC (συνήθως αλλαγές της στάθμης του υγρού στο θάλαμο διαβροχής ή αλλαγές από την εμφάνιση φυσαλίδων κοντά στο ηλεκτρόδιο αναφοράς). Για ορισμένες περιπτώσεις υπερβολικά "θορυβωδών" καταγραφών έχει χρησιμοποιηθεί απ' ευθείας συνέλιξη φίλτρου FIR (time-domain sinc filter με Hamming window) με μεγαλύτερη ακρίβεια.

Για την στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκαν αρχικά έλεγχοι κανονικότητας των μεταβλητών για να διασφαλιστεί η εγκυρότητα των παραμετρικών αποτελεσμάτων. Για τον έλεγχο κανονικότητας προτιμήθηκε το τεστ Kolmogorov-Smirnov (επειδή συνεκτιμά και το σχήμα και την διασπορά των τιμών), το οποίο εξάγει μια τιμή p-value. Εάν η τιμή p-value είναι μικρότερη του 0.05 θεωρούμε κατά σύμβαση ότι η κατανομή της μεταβλητής διαφέρει σημαντικά από την συγκρινόμενη κατανομή (εδώ, την κανονική). Αν η τιμή p-value είναι μεγαλύτερη του 0.05, η κατανομή της μεταβλητής δεν θεωρείται σημαντικά διαφορετική από την κανονική κατανομή, οπότε ακολουθούν είτε t-tests είτε γενικά γραμμικά μοντέλα για τον έλεγχο των υποθέσεων στην περίπτωση των κανονικών κατανομών. Για απλές συγκρίσεις μεταβλητών με μη κανονικές κατανομές προτιμήθηκαν μη-παραμετρικές μέθοδοι: μη-παραμετρικά tests (Mann-Whitney U test, Kolmogorov-Smirnov) χρησιμοποιούνται για την περίπτωση σύνθετων ή μη κανονικών κατανομών, όπως για παράδειγμα σε περιπτώσεις περισσοτέρων της μίας κανονικών επικαλυπτομένων κατανομών (μίγματα Gaussians). Το τεστ Kolmogorov-Smirnov προτιμάται σε περιπτώσεις όπου οι εμπειρικές κατανομές (το ιστόγραμμα ή το αθροιστικό ιστόγραμμα συχνότητων της μεταβλητής) απέχουν σε θέση ή/και σε διασπορά ή/και σε σχήμα (π.χ.

Μέθοδοι

ακραίες τιμές, ασυμμετρίες γύρω από την διάμεση τιμή).

Στην περίπτωση που οι εξισώσεις που περιγράφουν τις κατανομές είναι γνωστές (για παράδειγμα προσαρμοσμένες με απλή μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων ή με την μέθοδο *Levenberg-Marquardt* για πιο πολύπλοκες προσαρμογές) και τα αρχικά δεδομένα δεν είναι άμεσα αξιοποιήσιμα –για παράδειγμα, δεν μπορούμε να προσδιορίσουμε ποιά ακριβώς σημεία δεδομένων συμμετέχουν σε μια συγκεκριμένη περιοχή μιας μη κανονικής κατανομής–, χρησιμοποιείται η απόκλιση Jensen-Shannon (παίρνει τιμές μεταξύ 0 και 1) για να συγκρίνει την ομοιότητα 2 κατανομών από τις υπολογισμένες συναρτήσεις πυκνότητας πιθανότητας. Τα αποτελέσματα αυτής της μεθόδου δεν είναι ασφαλή με την κλασσική πιθανοτική έννοια των υπολοίπων στατιστικών μεθόδων, αλλά συγκρίνουν άμεσα την ποσότητα πληροφορίας που απεικονίζεται στις συγκρινόμενες κατανομές (και όπου υπεισέρχονται τα σφάλματα των στατιστικών τεχνικών –μέθοδος ελαχίστων τετραγώνων). Το τελικό αποτέλεσμα που υπολογίζεται έτσι, μπορεί να θεωρηθεί άμεσα (πιθανοτικά) ως το σφάλμα της μη-διάκρισης των 2 κατανομών από τον «μέσο όρο» τους, αν δεν γνωρίζουμε ποιες τιμές προέρχονται από ποια συνιστώσα, ή καλύτερα ως απόσταση των δύο κατανομών (γί'αυτήν την περίπτωση υπολογίζεται η δεύτερη ρίζα της απόκλισης, επίσης μεταξύ 0 και 1) : τιμές κοντά στο 1 δείχνουν ότι οι δύο κατανομές απέχουν λιγότερο σε σχέση με τιμές κοντά στο 0 (τιμή ακριβώς 0 σημαίνει ότι χωρίς καμμία άλλη πληροφορία μπορούμε να διακρίνουμε τη μια συνιστώσα από την άλλη σε ένα 1:1 μίγμα τους). Η φόρμα του υπολογισμού της απόκλισης παρατίθεται στο παράρτημα 1.

Για τις περισσότερες (παραμετρικές) συγκρίσεις παρουσιάζονται οι έλεγχοι υποθέσεων με τα t-tests (με την προϋπόθεση ότι η κανονικότητα δεν παραβιάζεται), αλλά παρατίθενται και διαγράμματα εύρους ελαχίστου-Q1-διαμέσου-Q3-μεγίστου (μεταξύ των Q1 και Q3 βρίσκεται το κεντρικό 50% των παρατηρήσεων), καθώς αποτυπώνουν τις μεταβολές του δείγματος χωρίς σφάλματα εξαιτίας ακραίων τιμών (outliers) και με μεγαλύτερη ακρίβεια σε σύγκριση με ένα διάγραμμα μέσου όρου-τυπικού σφάλματος. Τα t-tests παραμένουν έγκυρα και περιλαμβάνουν παντού (στα unpaired t-tests) και την διόρθωση Welch για διαφορετικές διακυμάνσεις μεταξύ των δειγμάτων.

Τα γενικά γραμμικά μοντέλα αποτελούν διάφορες μορφές ανάλυσης της διακύμανσης και ανάλυσης της συνδιακύμανσης, με την διαφορά ότι μπορούν να εξετάζονται παράλληλα -ανάλογα με τον σχεδιασμό του πειράματος- περισσότεροι από 1 παράγοντες (παράδειγμα συγκρίσεων κατά έναν μόνο παράγοντα είναι η κοινή “one-way ANOVA”) με την ίδια ακριβώς μέθοδο/επεξεργασία για την ελαχιστοποίηση σφαλμάτων τύπου I. Επίσης, σε αντίθεση με τις απλοποιημένες μορφές (σύγκριση μιας εξαρτημένης μεταβλητής για διαφορετικές τιμές μιας ανεξάρτητης μεταβλητής) παρέχεται η δυνατότητα να ελεγχθούν υποθέσεις αλληλεπιδράσεων μεταξύ ανεξαρτήτων (ελεγχόμενων) μεταβλητών (από 2-way ANOVA και άνω). Οι τιμές p-value που προκύπτουν είναι ισοδύναμες με τις τιμές p-value του απλού ή κατά ζεύγη t-test, για τις πιο απλές συγκρίσεις.

Για τις συγκρίσεις post-hoc προτιμάται το Scedf test σε σχέση με το Bonferroni ή το Fisher test, καθώς εμφανίζει μικρότερη αναλογία σφάλματος τύπου I προς τύπου II, δηλαδή προκύπτουν λιγότερα ψευδή θετικά αποτελέσματα σε σχέση με τα ψευδή αρνητικά, σε αντίθεση με τα άλλα 2 tests.

Για τις στατιστικές αναλύσεις χρησιμοποιείται το πρόγραμμα Statistica 9.1 και το Math Kernel Library 10.3 από Statsoft και Intel, αντίστοιχα. Το οπτικό υλικό προετοιμάστηκε με Adobe Illustrator CS6 για Windows.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται έχουν τη μορφή μέσος όρος $\pm$ τυπικό σφάλμα.

Για τα ενδιάμεσα αποτελέσματα έχουν διατηρηθεί αριθμοί διπλής ακριβείας (8-byte), αλλά παρουσιάζονται ακόμη και με κανένα σημαντικό ψηφίο -σε απεικόνιση ακίνητης υποδιαστολής (“fixed”). Έχει γίνει κάθε δυνατή προσπάθεια να ελαχιστοποιηθούν οι διαιρέσεις μεταξύ αριθμών για τον περιορισμό αριθμητικών σφαλμάτων. Καθ'όλη την διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν συμβατής αρχιτεκτονικής υπολογιστές Intel: Pentium D (καταγραφή), Core 2, Core i7 (χειρισμός δεδομένων – επεξεργασία – στατιστική).

Αποτελέσματα

Αποτελέσματα

3.0.1 Περιγραφή της παρουσίασης των αποτελεσμάτων σε πίνακες

Οι πίνακες που παρουσιάζονται στο κεφάλαιο αυτό, καθώς και στα παραρτήματα, όπου γίνεται αναφορά, αποτελούνται από 5 (πέντε) τμήματα Α, Β, Γ, Δ και Ε, όπως δείχνει το ακόλουθο σχήμα (Σχήμα 1). Το τμήμα Α περιέχει τα ονόματα των ανεξαρτήτων μεταβλητών, το τμήμα Β περιέχει τις τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών με τη μορφή κειμένου, το τμήμα Γ περιέχει την περιγραφή της ανεξάρτητης μεταβλητής, στην οποία γίνεται η σύγκριση των τιμών (για κάθε μία τιμή της, ή για κάθε μία σειρά διαδοχικών τιμών της για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις), το τμήμα Δ περιέχει τις τιμές, σε αριθμητική μορφή και ανά ανεξάρτητη μεταβλητή (του τμήματος Β, στην ίδια γραμμή του πίνακα) και ανά τιμή της υπό εξέταση ανεξάρτητης μεταβλητής, όπως αναγράφεται στο τμήμα Γ (στην ίδια στήλη του πίνακα), και το τμήμα Ε -που καταλαμβάνει την τελευταία στήλη του πίνακα- περιέχει τα στατιστικά αποτελέσματα των συγκρίσεων που γίνονται για κάθε γραμμή (στην ίδια γραμμή του πίνακα, με βάση τα δεδομένα από τα οποία προέκυψαν οι τιμές που παρουσιάζονται στο τμήμα Δ της ίδιας γραμμής του πίνακα) και την περιγραφή της στατιστικής ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκε, στην πρώτη γραμμή του πίνακα. Η πρώτη γραμμή του πίνακα περιέχει εξ ολοκλήρου τα τμήματα Α και Γ, και από το τμήμα Ε την περιγραφή της στατιστικής ανάλυσης που χρησιμοποιείται (στην τελευταία στήλη). Από την 2^η ως και την τελευταία γραμμή του πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές που αντιστοιχούν στις κεφαλίδες (πρώτη γραμμή) της ίδιας στήλης για κάθε στήλη του πίνακα.

Οι συγκρίσεις που γίνονται και παρουσιάζονται στο τμήμα Ε σε κάθε πίνακα γίνονται μόνο για την κάθε γραμμή ξεχωριστά. Συγκρίσεις μεταξύ διαφορετικών γραμμών του πίνακα γίνονται -όταν έχουν νόημα- στο αντίστοιχο υπο-κεφάλαιο, και όχι στον ίδιο πίνακα, προς απλούστευση της παρουσίασης των αποτελεσμάτων. Επιπλέον, συγκρίσεις στον ίδιο πίνακα και μεταξύ διαφορετικών γραμμών του πίνακα δεν είναι δυνατόν να πραγματοποιηθούν, καθώς τα δεδομένα της κάθε γραμμής έχουν προκύψει από διαφορετικό πείραμα (όπου μπορούν να εμπλέκονται και διαφορετικοί μηχανισμοί, με τους οποίους προκύπτει η μετρούμενη μεταβλητή), ή/και διαφορετικό σύνολο πρωτογενών δεδομένων ή/και από διαφορετική προ-επεξεργασία της μετρούμενης μεταβλητής, όπως αναγράφονται στις ίδιες γραμμές του τμήματος Β, και για τον λόγο αυτό δεν παρουσιάζονται στον ίδιο πίνακα τα στατιστικά αποτελέσματα για συγκρίσεις μεταξύ διαφορετικών γραμμών, ούτε στην ίδια στήλη ούτε σε διαφορετικές. Σε περιπτώσεις που συγκρίνονται εκτός του παρόντος κειμένου οι τιμές μεταξύ διαφορετικών γραμμών του ίδιου πίνακα ή τιμών που αντλούνται από διαφορετικούς πίνακες ή/και εξωτερικές πηγές, δεν παρέχονται εγγυήσεις για την στατιστική ή λειτουργική ή λογική εγκυρότητα ή/και ορθότητα των συμπερασμάτων που θα προκύψουν (εάν και εφόσον προκύψουν) από τις συγκρίσεις αυτές.

A	Γ	Ε
Β	Δ	

Σχήμα 1 : διάταξη των τμημάτων των πινάκων όπως παρουσιάζονται.

3.0.2 Γενικά σχόλια για τις μεταβλητές που ελέγχθηκαν

Χρησιμοποιήθηκαν τομές (i) κροταφικού και (ii) διαφραγματικού ιπποκάμπου από (1) πειραματόζωα τα οποία είχαν υποστεί μια παρατεταμένη γενικευμένη κρίση σε ηλικία 20 ημερών με ένεση 70-90mg/kg πεντυλενετετραζόλης και (2) από φυσιολογικά πειραματόζωα/«μάρτυρες». Οι ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές έγιναν κατά την διαβροχή με (α) tENY άνευ μαγνησίου (για την διευκόλυνση της ενεργοποίησης των υποδοχέων NMDA από ενδογενές γλουταμικό), ή με (β) tENY με 50μM 4-αμινοπυριδίνης (για να αυξάνεται συνολικά η διεγερσιμότητα των μεμβρανών από την διακοπή ρευμάτων καλίου). Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκε ένας συνδυασμός των παραπάνω μεταβλητών ((i ∨ ii) ∧ (1 ∨ 2) ∧ (α ∨ β)) και προστέθηκαν επίσης (σε διαφορετικά πειράματα) στο tENY διαβροχής η αντιχολινεστεράση εσερίνη (10μM), που αυξάνει τη διαθέσιμη ακετυλοχολίνη αναστέλλοντας την διάσπασή της, ο μουσκαρινικός ανταγωνιστής ατροπίνη (1μM), η ατροπίνη (1μM) ταυτόχρονα με την εσερίνη (10μM), και το μη υδrolυόμενο ανάλογο της ακετυλοχολίνης καρβαχόλη (1μM) για να προκύψει πιθανώς εντονότερο αποτέλεσμα επί των υποδοχέων της ακετυλοχολίνης, σε σύγκριση με τις διαθέσιμες ποσότητες ακετυλοχολίνης στον ιστό.

Στις καταγραφές που προέκυψαν από την περιοχή CA3_{a,b} του ιπποκάμπου και από όλα τα πειράματα, παρατηρήθηκε η παρουσία εκφορτίσεων μεσοκρυστικού τύπου, και η εμφανέστερη και ασφαλέστερα μετρήσιμη ιδιότητά των, που ήταν μετρήσιμη στο χαρτί και διέφερε από πείραμα σε πείραμα, ήταν η συχνότητα εμφάνισής των, η οποία μετρήθηκε και αναλύθηκε στατιστικά.

Στα πειράματα που συμπεριλάμβαναν και δεύτερη παράλληλη καταγραφή από τον μέσο ενδορρινικό φλοιό (V-VI), πραγματοποιήθηκαν επίσης τομές στην CA1 για να διακοπεί η έξοδος της CA3 προς τον ενδορρινικό φλοιό και κάθετα στη διατιτρούσα οδό, για να διακοπεί η έξοδος του ενδορρινικού φλοιού προς την CA3. Στα πειρά-

Αποτελέσματα

ματα αυτά, παρατηρήθηκε εξ αρχής ότι οι διάρκειες των εκφορτίσεων, που καταγραφόταν από τον ενδορρινικό φλοιό, διέφεραν μεταξύ φυσιολογικών και PTZ πειραματοζών και η πρώτη τομή (στην CA1) προκαλούσε μεταβολή της διάρκειας των εκφορτίσεων, προστέθηκε στις αναλύσεις και η μέτρηση της διάρκειας των εκφορτίσεων του ενδορρινικού φλοιού.

Επειδή χρησιμοποιήθηκαν αρσενικά και θηλυκά πειραματόζωα και δεν εντοπίστηκαν διαφορές μεταξύ τους, για τις συγκρίσεις που μας ενδιαφέρουν, τα δεδομένα των δύο ομάδων χρησιμοποιήθηκαν μαζί για τις επιμέρους συγκρίσεις, και η σύγκριση αρσενικών και θηλυκών πειραματοζών γίνεται σε ξεχωριστή ενότητα παρακάτω.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην μορφή ποσοστιαίας μεταβολής σε σχέση με τις αρχικές συχνότητες, παρέχονται μόνο ως ενδεικτικά της ποιότητας της μεταβολής και όχι ως στατιστικά αξιοποιήσιμες τιμές, δεδομένου ότι η κανονικοποίηση ως προς την αρχική τιμή προκαλεί μηδενισμό της αρχικής διακύμανσης και μη γραμμική «μεταφορά» της στην τιμή του αποτελέσματος του φαρμάκου. Για την στατιστική σημασία των μεταβολών που προκάλεσαν τα φάρμακα, αξιοποιούνται τα δεδομένα της πρώτης ενότητας με βάση τις συζευγμένες παρατηρήσεις (paired t-tests, 2-way repeated measures ANOVA).

3.0.3 Έλεγχος κανονικότητας συνεχών μεταβλητών

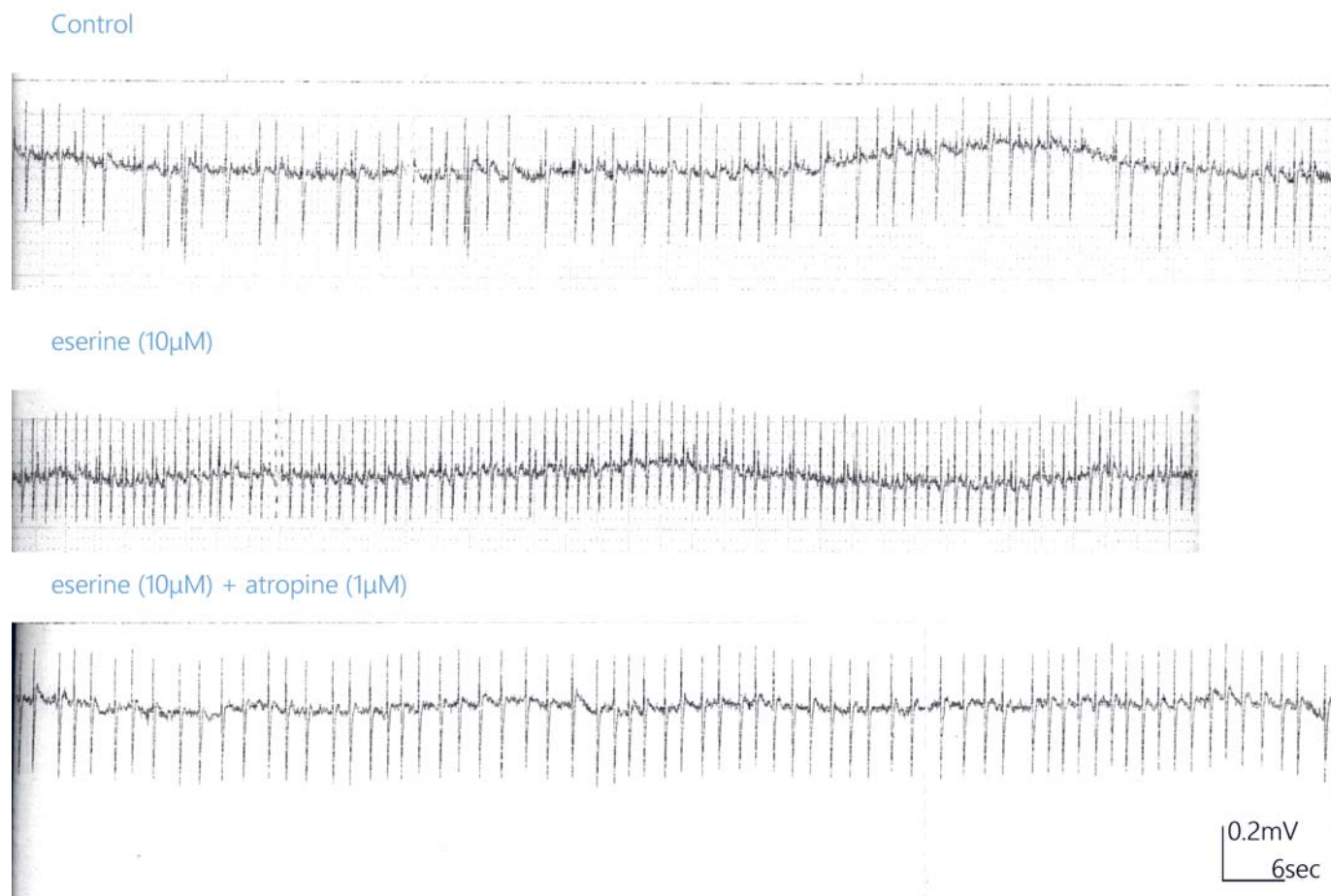
Για να ευσταθούν οι ζητούμενες συγκρίσεις (παραμετρικά στατιστικά, ANOVA, Student's t-tests) είναι απαραίτητο να τηρείται η κανονικότητα από τις μετρούμενες μεταβλητές. Ο έλεγχος της κανονικότητας γίνεται με το τεστ Kolmogorov-Smirnov. Τα αποτελέσματά του στο εξής παραλείπονται και παρουσιάζονται σε ξεχωριστή ενότητα (Παράρτημα 2)

3.0.4 Περιγραφή του αποτελέσματος των φαρμάκων

Ακολούθως παρατίθενται τα αποτελέσματα των φαρμάκων που χρησιμοποιήθηκαν, ανά μοντέλο επαγωγής επιληπτοειδών εκφορτίσεων (τΕΝΥ άνευ μαγνησίου, και τΕΝΥ με 50μM 4-αμινοπυριδίνης), ομάδας πειραματοζών (φυσιολογικά/»μάρτυρες» και πειραματόζωα που υπέστησαν μια γενικευμένη παρατεταμένη (>20min) κρίση με πεντυλενετετραζόλη – "PTZ" στο εξής) και ανατομικής προέλευσης των τομών (από κροταφικό ή διαφραγματικό ιππόκαμπο).

Αποτελέσματα

1. Εσερίνη (10 μ M)



Εικόνα καταγραφής 1: Αποτέλεσμα της εσερίνης στην δραστηριότητα του πυραμιδικού πεδίου CA3a διαφραγματικής τομής φν-σιολογικού πειραματοζώου. Η δραστηριότητα (επιληπτοειδείς εκφορτίσεις μεσοκρισικού τύπου) επάγονται από την διαβροχή με τΕΝΥ άνευ μαγνησίου. Η ατροπίνη αναστρέφει το προηγούμενο αποτέλεσμα της εσερίνης. (Σάρωση από χαρτί καταγραφικού).

Για να παρατηρήσουμε την εξάρτηση της συχνότητας εκφορτίσεων από την ενδογενή ακετυλοχολίνη, προσθέσαμε 10 μ M εσερίνης στο διάλυμα διαβροχής (είτε τΕΝΥ άνευ μαγνησίου είτε τΕΝΥ με 50 μ M 4-αμινοπυριδίνης).

Η εσερίνη προκάλεσε αύξηση της συχνότητας των εκφορτίσεων σε όλες τις κατηγορίες τομών (ομάδα πειραματοζώων, προέλευση τομής) και συνθήκες (τΕΝΥ άνευ μαγνησίου, τΕΝΥ με 50 μ M 4-αμινοπυριδίνη), όπως φαίνεται στους ακόλουθους πίνακες. Συγκρίσεις μεταξύ γραμμών (διαφορετικών συνθηκών και από διαφορετικές κατηγορίες τομών) γίνονται αναλυτικότερα παρακάτω.

Αποτελέσματα

Πίνακας 1α-β: Συχνότητες εκφορτίσεων τομών φυσιολογικών πειραματοζώων, αρχικά και παρουσία εσερίνης σε τΕΝΥ άνευ μαγνησίου.

(α) τομές φυσιολογικών πειραματοζώων			
Τομή	Συχνότητα εκφορτίσεων προ εσερίνης	Με εσερίνη (10μΜ)	Στατιστικό αποτέλεσμα (paired t-test p-value)
Κροταφική	0.447 ± 0.058 Hz, n = 25	0.635 ± 0.071 Hz, n = 25	0.00004
Διαφραγματική	0.635 ± 0.071 Hz, n = 25	0.269 ± 0.068 Hz, n = 12	0.37760

(β) τομές PTZ πειραματοζώων			
Τομή	Συχνότητα εκφορτίσεων προ εσερίνης	Με εσερίνη (10μΜ)	Στατιστικό αποτέλεσμα (paired t-test p-value)
Κροταφική	0.269 ± 0.068 Hz, n = 12	0.345 ± 0.06 Hz, n = 12	0.00116
Διαφραγματική	0.345 ± 0.06 Hz, n = 12	0.321 ± 0.046 Hz, n = 20	0.00028

Πίνακας 1γ-δ: Συχνότητες εκφορτίσεων τομών φυσιολογικών πειραματοζώων, αρχικά και παρουσία εσερίνης σε τΕΝΥ με 4-αμινοπυριδίνη.

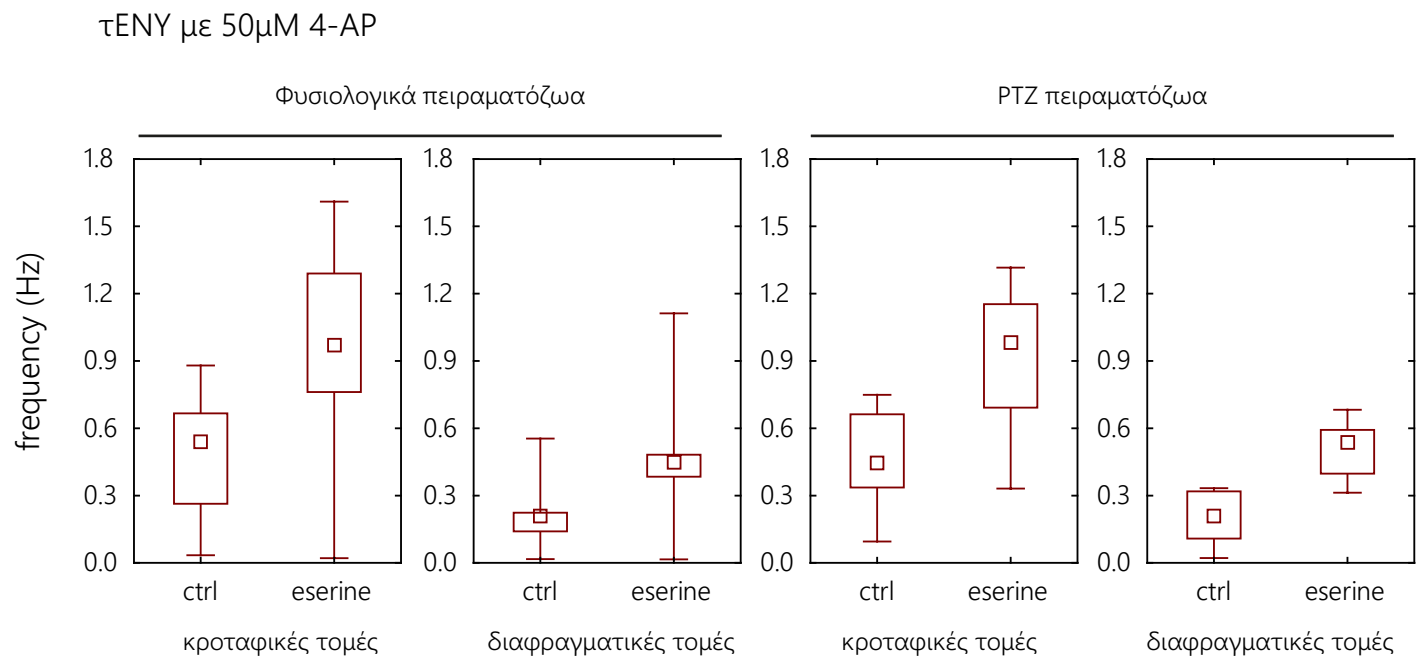
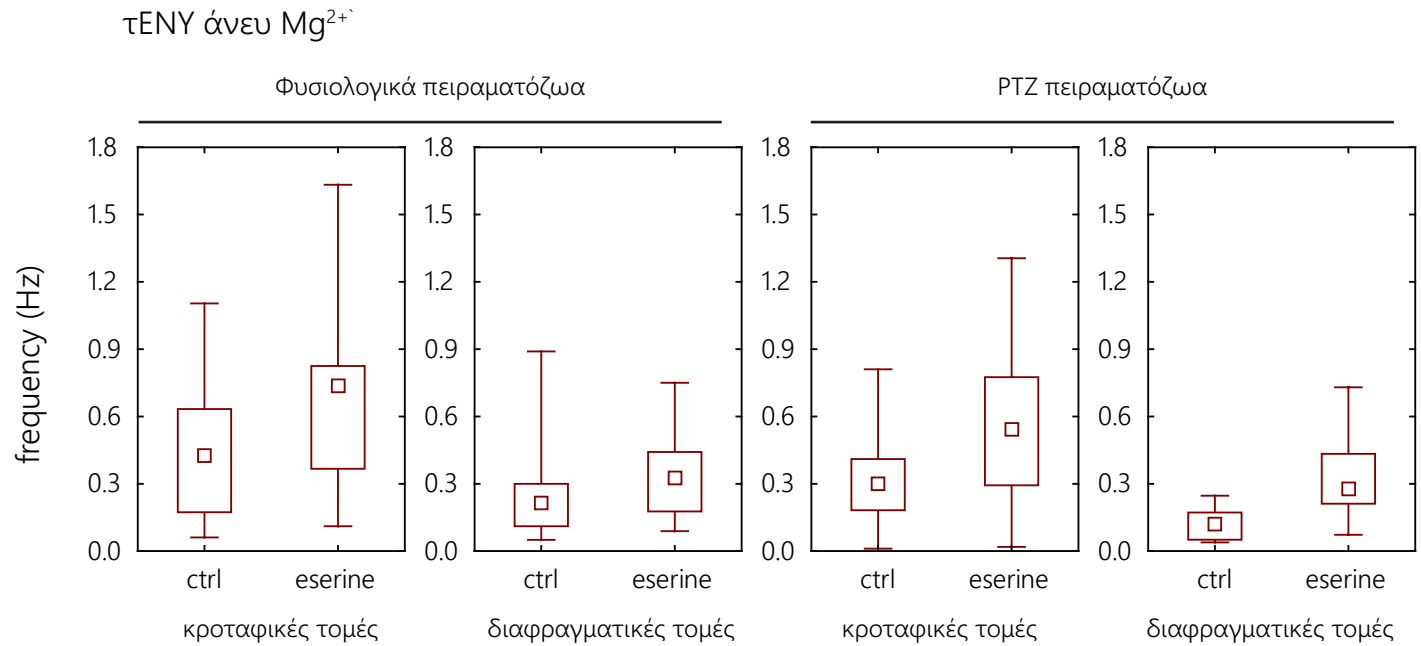
(γ) τομές φυσιολογικών πειραματοζώων			
Τομή	Συχνότητα εκφορτίσεων προ εσερίνης	Με εσερίνη (10μΜ)	Στατιστικό αποτέλεσμα (paired t-test p-value)
Κροταφική	0.321 ± 0.046 Hz, n = 20	0.56 ± 0.076 Hz, n = 20	0.00005
Διαφραγματική	0.56 ± 0.076 Hz, n = 20	0.124 ± 0.017 Hz, n = 15	0.00466

(δ) τομές PTZ πειραματοζώων			
Τομή	Συχνότητα εκφορτίσεων προ εσερίνης	Με εσερίνη (10μΜ)	Στατιστικό αποτέλεσμα (paired t-test p-value)
Κροταφική	0.124 ± 0.017 Hz, n = 15	0.318 ± 0.047 Hz, n = 15	0.00498
Διαφραγματική	0.318 ± 0.047 Hz, n = 15	0.479 ± 0.064 Hz, n = 15	0.00065

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η παράταση της δράσης της ενδογενούς ακετυλοχολίνης επαρκεί για την αύξηση της συχνότητας εκφορτίσεων σε κροταφικές και διαφραγματικές τομές, και σε φυσιολογικά και σε PTZ πειραματοζώα. Μεταξύ των δύο μοντέλων επαγωγής επιληπτοειδών εκφορτίσεων δεν υπάρχει ποιοτική διαφορά στο αποτέλεσμα της εσερίνης στην συχνότητα εκφορτίσεων. Παρ'όλα αυτά παρουσία εσερίνης προκύπτουν σημαντικά μεγαλύτερες αυξήσεις (μεγαλύτερες τελικές συχνότητες) στο μοντέλο της αμινοπυριδίνης έναντι του μοντέλου με τΕΝΥ άνευ μαγνησίου (2-way repeated measures ANOVA $p < 0.001$), καθώς και στις κροταφικές

Αποτελέσματα

τομές έναντι των διαφραγματικών τομών (2-way repeated measures ANOVA $p = 0.021$). Η επιλογή του μοντέλου δεν επηρεάζει περαιτέρω την μεταβολή της συχνότητας, λόγω εσερίνης, μεταξύ κροταφικών και διαφραγματικών τομών ($p > 0.40$).



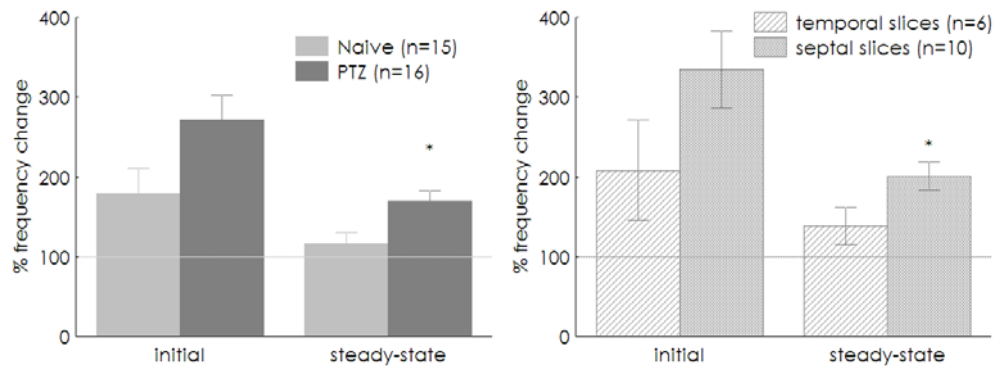
Γράφημα 1. Αποτύπωση του πλήρους συνόλου δεδομένων σε διαγράμματα ελαχίστου-25%-διαμέσου-75%-μεγίστου, για το αποτέλεσμα της προσθήκης εσερίνης (10μM) στο διάλυμα διαβροχής -τΕΝΥ άνευ μαγνησίου επάνω, τΕΝΥ με αμινοπυριδίνη κάτω. Η εσερίνη προκάλεσε την αύξηση των συχνοτήτων επιληπτοειδών εκφορτίσεων μεσοκρυσικού τύπου σε όλες τις ομάδες τομών.

Ειδική παρατήρηση για την διαβροχή με εσερίνη (10μM) στο τΕΝΥ άνευ μαγνησίου

Προσθέτοντας σε τΕΝΥ άνευ μαγνησίου εσερίνη 10μM για 10 λεπτά ή περισσότερο, σε μέρος των τομών ($n = 31$ από σύνολο 72: 37 φυσιολογικών ζώων και 35 PTZ) παρατηρήθηκε μεταβολή της συχνότητας σε δύο φάσεις: ταχεία αύξηση μέχρι τα πρώτα 3 λεπτά περίπου και ακολούθως σταθεροποίηση με σχετική μείωση –δηλαδή μικρότερη σχετική αύξηση σε σύγκριση με την αρχική συχνότητα προ εσερίνης- (την ονομάζουμε “steady state”, γιατί παρέμενε σταθερή μέχρι το τέλος της καταγραφής). Οι τομές που εμφάνισαν αυτό το χαρακτηριστικό, προερχόταν από φυσιολογικά ($n = 15$) και PTZ πειραματόζωα ($n = 16$). Σε σύγκριση με τα φυσιολογικά πειραματόζωα, οι % αυξήσεις των συχνοτήτων σε τομές των PTZ ήταν μεγαλύτερες και στις δύο φάσεις και παράλληλα

Αποτελέσματα

εμφάνιζαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της δεύτερης φάσης και της αρχικής (προ εσερίνης) περιόδου, σε αντίθεση με τις τομές των φυσιολογικών. Στην διαφορά αυτή συνεισέφεραν περισσότερο οι διαφραγματικές τομές των PTZ πειραματοζώων, οι οποίες διατηρούσαν τις μεγαλύτερες αυξήσεις στην δεύτερη φάση.



Γράφημα 2. Σταδιακή σχετική μεταβολή της συχνότητας σε μέρος των τομών κατά την προσθήκη εσερίνης σε τΕΝΥ άνευ μαγνησίου. Σύγκριση μεταξύ φυσιολογικών και PTZ πειραματοζώων (αριστερά) και κροταφικών-διαφραγματικών τομών των PTZ πειραματοζώων (δεξιά). Οι οριζόντιες διακεκομμένες γραμμές αντιστοιχούν στην κανονικοποιημένη (5) αρχική συχνότητα.

Η μεταβολή αυτή των δύο σταδίων δεν εντοπίστηκε σε άλλο μέσο διαβροχής (τΕΝΥ με αμινοπυριδίνη) ή κατά την διαβροχή με καρβαχόλη, όπου και υπήρχε μόνο μία αρχική αύξηση της συχνότητας εκφορτίσεων και σταθεροποίηση σε αυτό το επίπεδο.

Επίσης, παρατηρήσαμε ότι η μέγιστη αύξηση της συχνότητας παρουσία εσερίνης συσχετιζόταν αρνητικά με την αρχική συχνότητα (Pearson $r = -0.4697$, $p < 0.0001$). Για να εξακριβώσουμε το ενδεχόμενο η αρχική συχνότητα να επηρεάζει την σχετική αύξηση που προκαλεί η εσερίνη και το αποτέλεσμα αυτό να επικαλύπτει τις διαφορές που εντοπίζονται στις άλλες συγκρίσεις που ενδιαφέρουν (σε κροταφικές και διαφραγματικές τομές από τις δύο ομάδες πειραματοζώων –φυσιολογικά και PTZ), χρησιμοποιήθηκε ανάλυση συνδιακύμανσης (ANCOVA) με εξαρτημένη μεταβλητή (αποτέλεσμα) την σχετική αύξηση της συχνότητας παρουσία εσερίνης, συνεχή ανεξάρτητη μεταβλητή την αρχική συχνότητα (ctrl) και διακριτές μεταβλητές την προέλευση της τομής (κροταφικού/διαφραγματικού ιπποκάμπου και φυσιολογικό/PTZ πειραματοζώο). Όπως δείχνουν τα αποτελέσματα στον ακόλουθο πίνακα, η αρχική συχνότητα (“ctrl”) δεν επικαλύπτει τη στατιστική σημασία των διαφορών μεταξύ των άλλων συγκρίσεων, ούτε των αλληλεπιδράσεών τους (τιμές $p < 0.05$).

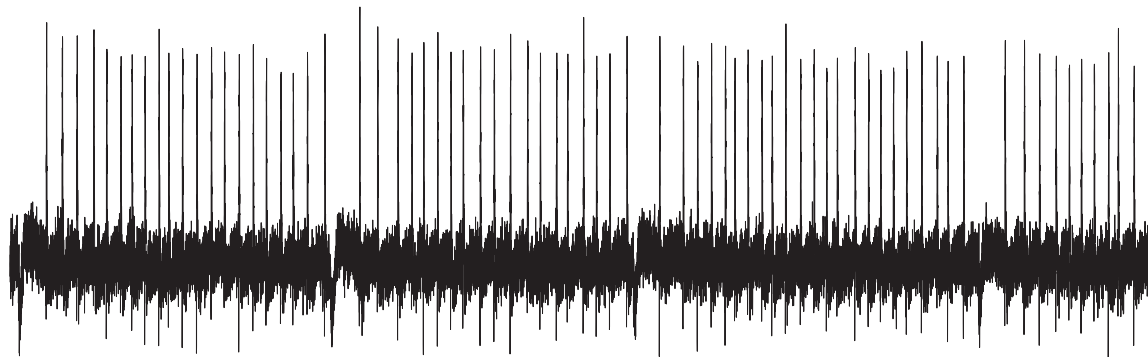
Πίνακας 2: Ανάλυση συνδιακύμανσης με ανεξάρτητες μεταβλητές την προέλευση της τομής (φυσιολογικό ή PTZ πειραματοζώο, κροταφική ή διαφραγματική τομή), μεταβλητή συμμεταβολής την αρχική συχνότητα εκφορτίσεων και εξαρτημένη μεταβλητή την αύξηση που προκαλεί η εσερίνη (10μM).

Παράγοντας ANCOVA	p-value
Intercept	<0.0001
treatment (N/PTZ)	0.0241
slice (T/S)	0.0214
ctrl ¹	0.0005
treatment (N/PTZ)*slice (T/S)	0.0246
treatment (N/PTZ)*ctrl	0.0308
slice (T/S)*ctrl	0.0136
treatment (N/PTZ)*slice (T/S)*ctrl	0.0265

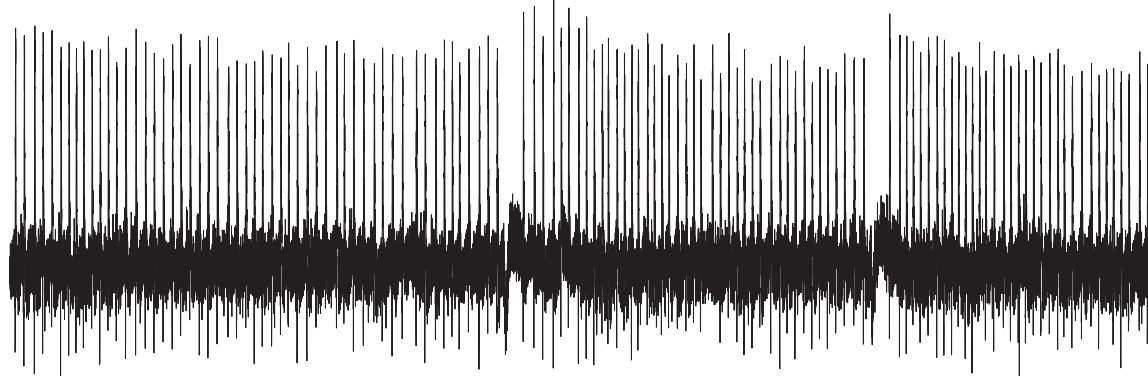
Τα αποτελέσματα (παραπάνω πίνακας) επιβεβαιώνουν την προαναφερθείσα συσχέτιση: η σχετική αύξηση της συχνότητας επηρεάζεται από την αρχική συχνότητα (ctrl). Παράλληλα, όμως, οι άλλοι παράγοντες όπου εμφανίζονται διαφορές -η προέλευση των τομών, η διάκριση φυσιολογικών-PTZ- επηρεάζουν σημαντικά ($p < 0.05$) την αύξηση της συχνότητας από την εσερίνη ανεξαρτήτως αρχικής συχνότητας και ρυθμίζουν διαφορετικά την επίδραση της αρχικής συχνότητας στις επιμέρους συγκρίσεις.

Αποτελέσματα

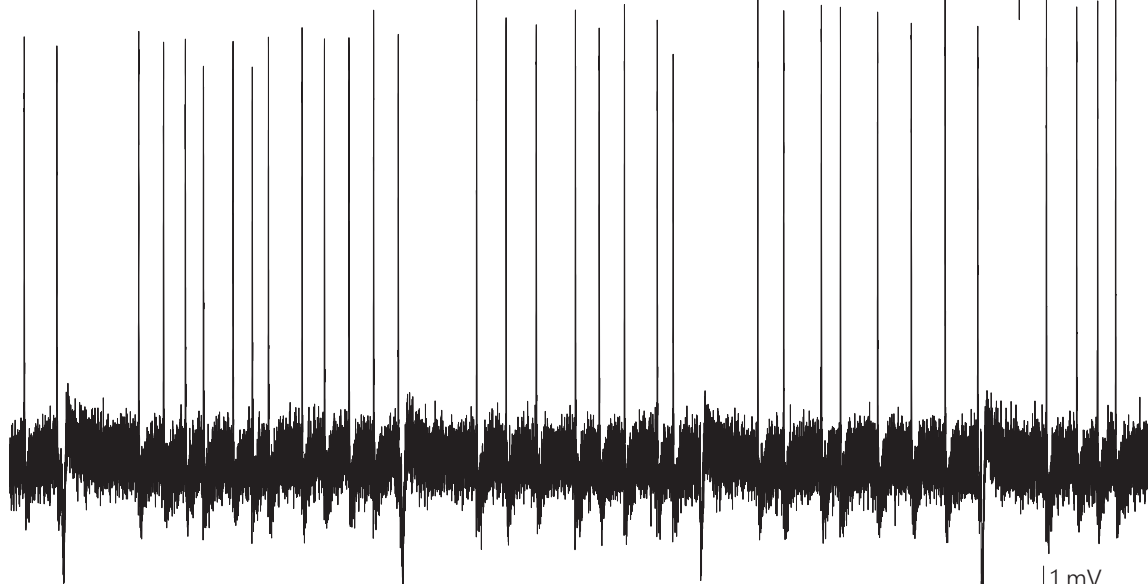
Control



Eserine (10 μ M)



Eserine + atropine (1 μ M)

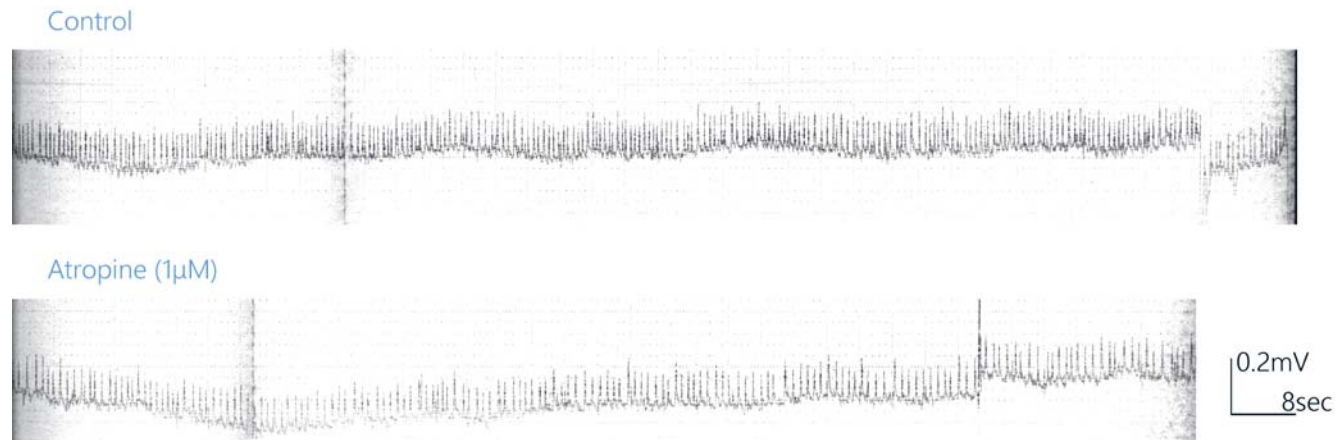


1 mV
10 s

Εικόνα καταγραφής 2: Αποτέλεσμα της εσερίνης στην δραστηριότητα του πυραμιδικού πεδίου CA3a κροταφικής τομής φυσιολογικού πειραματοζώου. Η δραστηριότητα (επιληπτοειδείς εκφορτίσεις μεσοκρυσικού τύπου) επάγεται από την διαβροχή με τΕΝΥ με 50 μ M 4-αμινοπυριδίνη. Η εικόνα είναι παρόμοια με αυτήν στο τΕΝΥ άνευ μαγνησίου, με την διαφορά στα GABA-εξαρτώμενα δυναμικά, που εμφανίζονται στο μοντέλο αυτό, ανεξαρτήτως του φαρμακολογικού πειράματος.

Αποτελέσματα

2. Ατροπίνη (1μM)



Εικόνα καταγραφής 3: Αποτέλεσμα της ατροπίνης στην δραστηριότητα του πυραμιδικού πεδίου CA3a κροταφικής τομής φυσιολογικού πειραματοζώου. Η δραστηριότητα (επιληπτοειδείς εκφορτίσεις μεσολκρυσικού τύπου) επάγονται από την διαβροχή με τΕΝΥ άνευ μαγνησίου. (Σάρωση από χαρτί καταγραφικού).

Για να ελέγξουμε τη συμμετοχή των μουςκαρινικών υποδοχέων στη διαμόρφωση της συχνότητας των εκφορτίσεων, προσθέσαμε 1μM ατροπίνης στο τΕΝΥ (είτε τΕΝΥ άνευ μαγνησίου είτε τΕΝΥ με 50 μM 4-αμινοπυριδίνης).

Στην συγκέντρωση αυτή η ατροπίνη εκτιμάται ότι θα έχει σχεδόν το μέγιστο δυνατό αποτέλεσμα, αφού οι τιμές IC50 που δίνονται από την pubChem είναι για όλους τους υποτύπους μουςκαρινικών υποδοχέων $<0.01\mu\text{M}$ (στοιχεία από <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/assay/assay.cgi?q=da&acfilter=IC50&&cid=174174&ocfilter=act>).

Η ατροπίνη μείωσε τη συχνότητα σε όλες τις υποομάδες τομών, όπως φαίνεται στους ακόλουθους πίνακες.

Πίνακας 3α-β: Συχνότητα εκφορτίσεων τομών φυσιολογικών πειραματοζώων προ και κατά την διαβροχή με ατροπίνη σε τΕΝΥ άνευ μαγνησίου.

(α) τομές φυσιολογικών πειραματοζώων			
Τομή	Συχνότητα εκφορτίσεων προ ατροπίνης	Με ατροπίνη (1μM)	Στατιστικό αποτέλεσμα (paired t-test p-value)
Κροταφική	$0.585 \pm 0.055 \text{ Hz}$, n = 19	$0.448 \pm 0.048 \text{ Hz}$, n = 19	0.00967
Διαφραγματική	$0.162 \pm 0.04 \text{ Hz}$, n = 6	$0.159 \pm 0.065 \text{ Hz}$, n = 6	0.93203
(β) τομές PTZ πειραματοζώων			
Τομή	Συχνότητα εκφορτίσεων προ ατροπίνης	Με ατροπίνη (1μM)	Στατιστικό αποτέλεσμα (paired t-test p-value)
Κροταφική	$0.426 \pm 0.067 \text{ Hz}$, n = 7	$0.407 \pm 0.075 \text{ Hz}$, n = 7	0.4176
Διαφραγματική	$0.195 \pm 0.115 \text{ Hz}$, n = 4	$0.143 \pm 0.083 \text{ Hz}$, n = 4	0.21343

Αποτελέσματα

Πίνακας 3γ-δ: Συχνότητα εκφορτίσεων τομών φυσιολογικών πειραματοζώων προ και κατά την διαβροχή με ατροπίνη σε τΕΝΥ με 50μM 4-αμινοπυριδίνης.

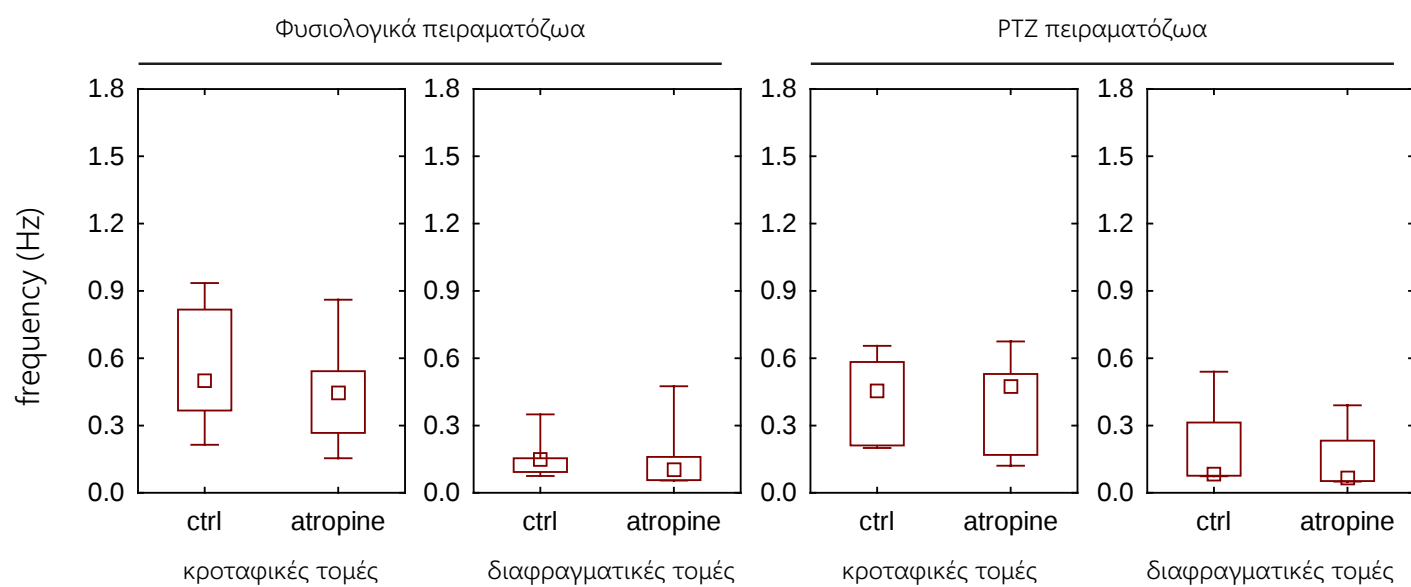
(γ) τομές φυσιολογικών πειραματοζώων			
Τομή	Συχνότητα εκφορτίσεων προ ατροπίνης	Με ατροπίνη (1μM)	Στατιστικό αποτέλεσμα (paired t-test p-value)
Κροταφική	0.587 ± 0.191 Hz, n = 5	0.213 ± 0.125 Hz, n = 5	0.11789
Διαφραγματική	0.291 ± 0.05 Hz, n = 6	0.264 ± 0.044 Hz, n = 6	0.02123
(δ) τομές PTZ πειραματοζώων			
Τομή	Συχνότητα εκφορτίσεων προ ατροπίνης	Με ατροπίνη (1μM)	Στατιστικό αποτέλεσμα (paired t-test p-value)
Κροταφική	0.53 ± 0.082 Hz, n = 5	0.339 ± 0.091 Hz, n = 5	0.1405
Διαφραγματική	0.233 ± 0.075 Hz, n = 5	0.148 ± 0.068 Hz, n = 5	0.01707

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η ατροπίνη, στη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε, με την υπόθεση ότι προκαλεί το μέγιστο δυνατό αποτέλεσμα, δεν επέφερε σημαντική μείωση της συχνότητας εκφορτίσεων σε όλες τις τομές (επιμέρους συγκρίσεις). Το εύρημα αυτό δείχνει ότι πιθανώς η συγκέντρωση δεν έχει το μέγιστο εφικτό αποτέλεσμα, όπως υπετέθη, ή ότι η ενδογενής συμμετοχή των μουσκαρινικών υποδοχέων στην διαμόρφωση της συχνότητας επιληπτοειδών εκφορτίσεων είναι μικρή ή με μεγάλη διακύμανση. Παρ'όλα αυτά, με πιο ολοκληρωμένη ανάλυση (2-way repeated measures ANOVA) φαίνεται η ατροπίνη να προκαλεί στατιστικά σημαντική μείωση της συχνότητας ($p < 0.001$).

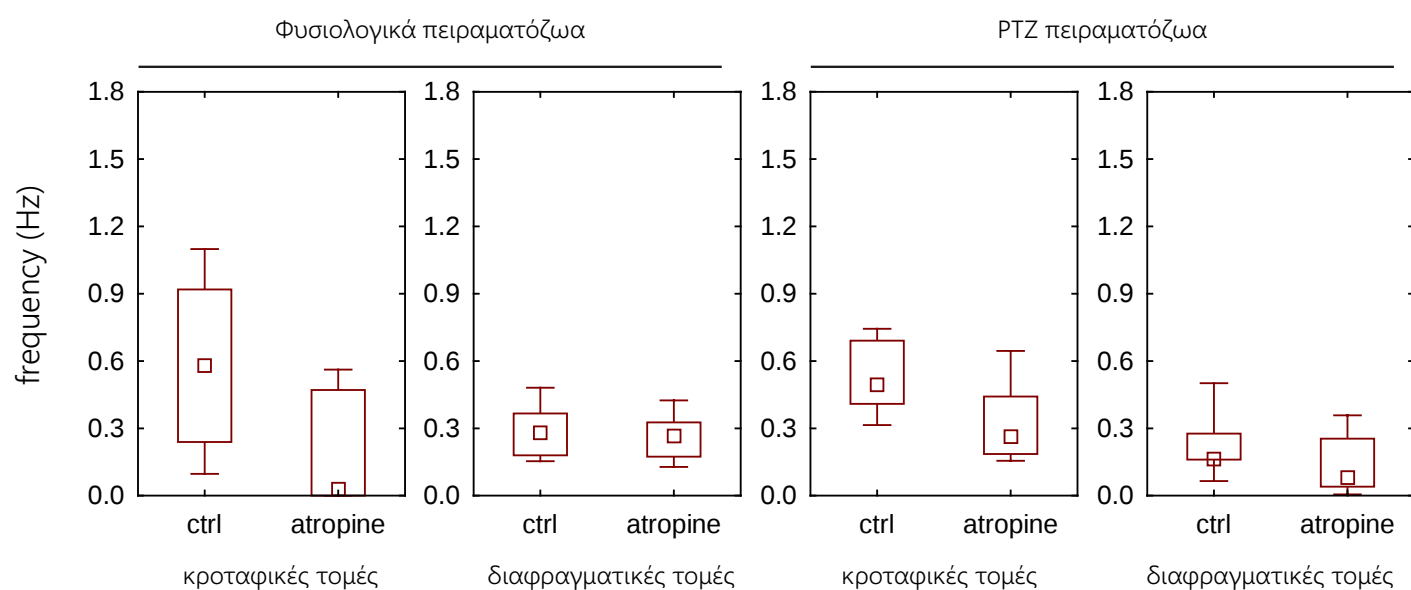
Μεταξύ των δύο μοντέλων επιληπτοειδών εκφορτίσεων (4-αμινοπυριδίνης και τΕΝΥ άνευ μαγνησίου) πιο ευαίσθητες στην ατροπίνη (και άρα πιθανώς με μεγαλύτερη συμμετοχή μουσκαρινικών υποδοχέων στην συχνότητα εκφορτίσεων) είναι οι εκφορτίσεις που προκαλούνται από την αμινοπυριδίνη (2-way repeated measures ANOVA $p = 0.041$). Αντίστροφα από την εσερίνη, μικρότερη μείωση της συχνότητας και μικρότερες τελικές συχνότητες καταγράφηκαν από διαφραγματικές τομές (2-way repeated measures ANOVA $p = 0.016$). Οι δύο παράγοντες (μοντέλο και προέλευση τομής) και πάλι δεν αλληλεπιδρούν ($p > 0.10$).

Αποτελέσματα

τΕΝΥ άνευ Mg^{2+}



τΕΝΥ με 50μM 4-AP



Γράφημα 3. Αποτύπωση του πλήρους συνόλου δεδομένων σε διαγράμματα ελάχιστου-25%-διαμέσου-75%-μεγίστου, για το αποτέλεσμα της προσθήκης ατροπίνης (1μM) στο διάλυμα διαβροχής -τΕΝΥ άνευ μαγνησίου επάνω, τΕΝΥ με αμινοπυριδίνη κάτω. Η ατροπίνη προκάλεσε την αύξηση των συχνοτήτων επιληπτοειδών εκφορτίσεων μεσοκρυσικού τύπου σε όλες τις ομάδες τομών.

Αποτελέσματα

3. Εσερίνη (10μM) και Ατροπίνη (1μM)

Επίσης, αφού παρατηρήσαμε αύξηση της συχνότητας των εκφορτίσεων με την εσερίνη (αύξηση της διαθεσιμότητας ακετυλοχολίνης) σε μέρος των τομών προσθέσαμε ατροπίνη, παράλληλα με την εσερίνη για να ελέγξουμε αν η δράση της επιπρόσθετης ακετυλοχολίνης άγεται από μускаρινικούς υποδοχείς.

Η ατροπίνη μειώνει την συχνότητα μετά την εσερίνη σε όλες τις υποομάδες τομών, όπως παρουσιάζεται στους ακόλουθους πίνακες. Η σχεδόν πλήρης επαναφορά της συχνότητας από την ατροπίνη στα προ εσερίνης επίπεδα, υποστηρίζει την υπόθεση ότι τουλάχιστον ένα μέρος του πλεονάσματος της ενδογενούς ακετυλοχολίνης, που προκλήθηκε από την προσθήκη της εσερίνης, έδρασε μέσω μускаρινικών υποδοχέων και αύξησε την συχνότητα των εκφορτίσεων, ανεξαρτήτως μοντέλου και προέλευσης των τομών.

Πίνακας 4α-β: Συχνότητα εκφορτίσεων τομών στην αρχική κατάσταση (προ εσερίνης), με εσερίνη και, ακολούθως, ατροπίνη ταυτόχρονα με την εσερίνη σε τΕΝΥ άνευ μαγνησίου.

(α) Τομές φυσιολογικών πειραματοζώων				
Τομή	Συχνότητα εκφορτίσεων προ εσερίνης	Με εσερίνη (10μM)	Με εσερίνη (10μM) και ατροπίνη (1μM)	Στατιστικό αποτέλεσμα (Repeated measures ANOVA p-value)
Κροταφική	0.44 ± 0.088 Hz, n = 13	0.561 ± 0.097 Hz, n = 13	0.302 ± 0.061 Hz, n = 13	0.00002
Διαφραγματική	0.246 ± 0.161 Hz, n = 5	0.163 ± 0.025 Hz, n = 5	0.083 ± 0.021 Hz, n = 5	0.53446
(β) Τομές PTZ πειραματοζώων				
Τομή	Συχνότητα εκφορτίσεων προ εσερίνης	Με εσερίνη (10μM)	Με εσερίνη (10μM) και ατροπίνη (1μM)	Στατιστικό αποτέλεσμα (Repeated measures ANOVA p-value)
Κροταφική	0.293 ± 0.058 Hz, n = 10	0.56 ± 0.114 Hz, n = 10	0.353 ± 0.082 Hz, n = 10	0.00396
Διαφραγματική	0.148 ± 0.021 Hz, n = 10	0.362 ± 0.063 Hz, n = 10	0.178 ± 0.033 Hz, n = 10	0.00028

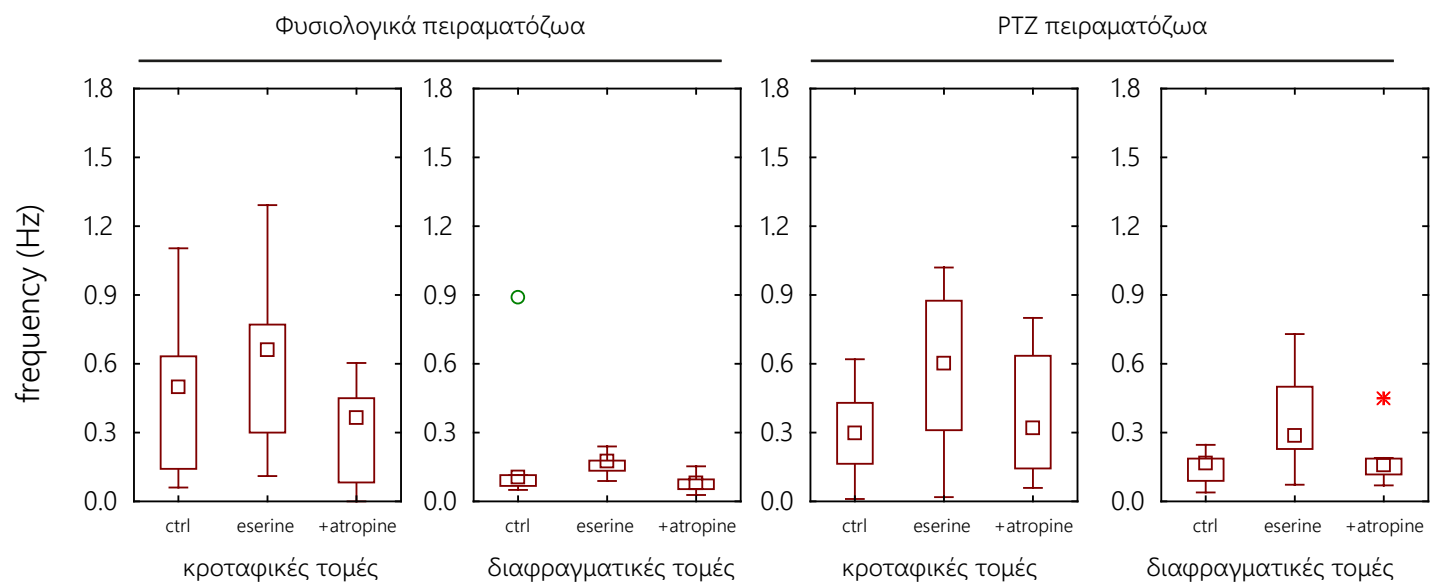
Πίνακας 4γ-δ: Συχνότητα εκφορτίσεων τομών στην αρχική κατάσταση (προ εσερίνης), με εσερίνη και, ακολούθως, ατροπίνη ταυτόχρονα με την εσερίνη σε τΕΝΥ με 50μM 4-αμινοπυριδίνη.

(γ) Τομές φυσιολογικών πειραματοζώων				
Τομή	Συχνότητα εκφορτίσεων προ εσερίνης	Με εσερίνη (10μM)	Με εσερίνη (10μM) και ατροπίνη (1μM)	Στατιστικό αποτέλεσμα (Repeated measures ANOVA p-value)
Κροταφική	0.419 ± 0.108 Hz, n = 8	0.905 ± 0.183 Hz, n = 8	0.511 ± 0.169 Hz, n = 8	0.00464
Διαφραγματική	0.188 ± 0.018 Hz, n = 4	0.599 ± 0.172 Hz, n = 4	0.207 ± 0.039 Hz, n = 4	0.05198
(δ) Τομές PTZ πειραματοζώων				
Τομή	Συχνότητα εκφορτίσεων προ εσερίνης	Με εσερίνη (10μM)	Με εσερίνη (10μM) και ατροπίνη (1μM)	Στατιστικό αποτέλεσμα (Repeated measures ANOVA p-value)
Κροταφική	0.494 ± 0.065 Hz, n = 7	0.889 ± 0.112 Hz, n = 7	0.543 ± 0.132 Hz, n = 7	0.02370
Διαφραγματική	0.283 ± 0.03 Hz, n = 4	0.595 ± 0.031 Hz, n = 4	0.254 ± 0.039 Hz, n = 4	0.00020

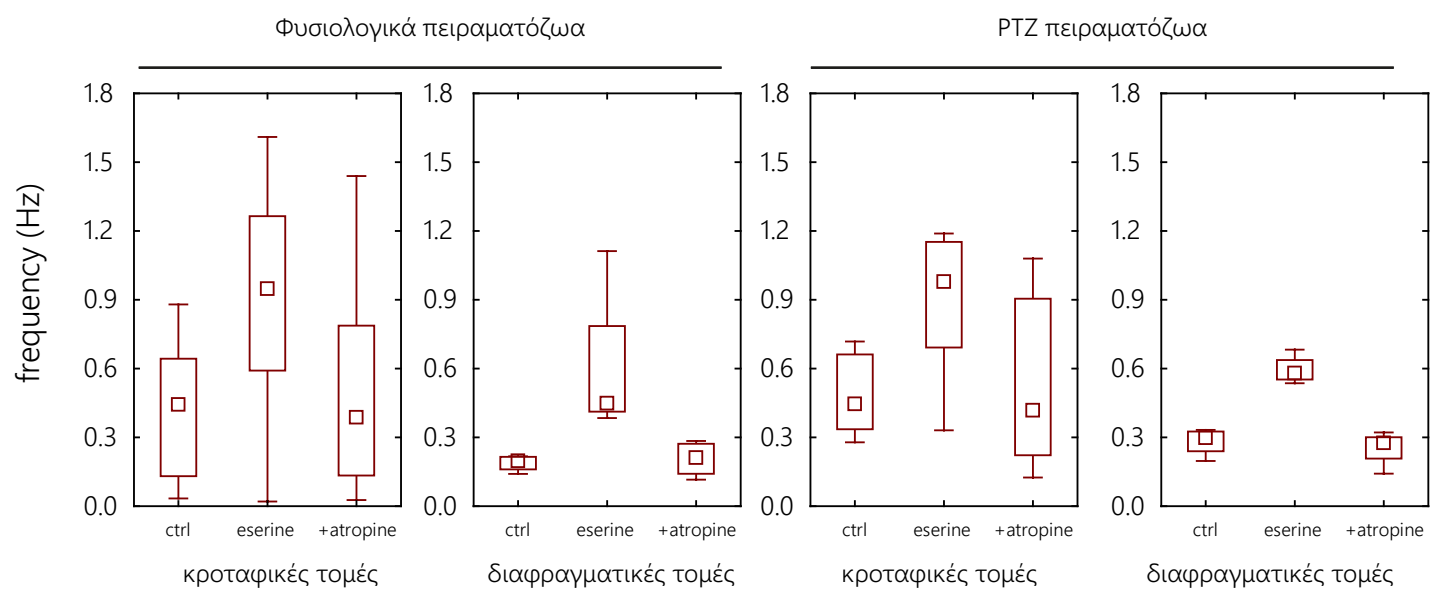
Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η ενδογενής ακετυλοχολίνη αυξάνει τη συχνότητα εκφορτίσεων, ενεργοποιώντας κυρίως μускаρινικούς υποδοχείς.

Αποτελέσματα

τENY άνευ Mg^{2+}



τENY με 50μM 4-AP



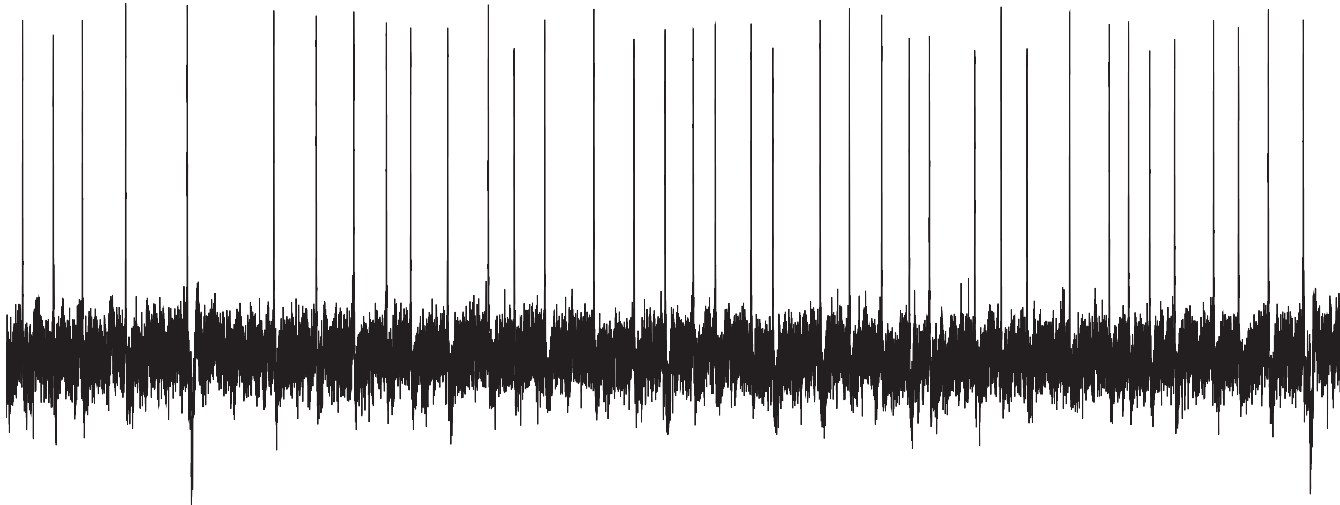
Γράφημα 4. Αποτύπωση του πλήρους συνόλου δεδομένων σε διαγράμματα ελάχιστου-25%-διαμέσου-75%-μεγίστου, για το αποτέλεσμα της προσθήκης εσερίνης (10μM) και ακολούθως ατροπίνης (1μM) στο διάλυμα διαβροχής -τENY άνευ μαγνησίου επάνω, τENY με αμινοπυριδίνη κάτω. Η ατροπίνη ανέστρεψε την αύξηση των συχνοτήτων επιληπτοειδών εκφορτίσεων μεσοκριτικού τύπου, που προκάλεσε η εσερίνη, σε όλες τις ομάδες τομών. (Τα σύμβολα -κύκλος και αστερίσκος- αναπαριστούν ακραίες τιμές).

Αποτελέσματα

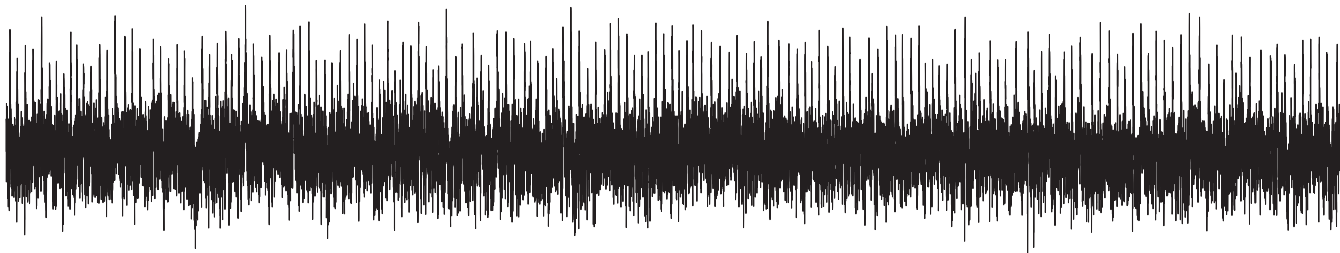
4. Καρβαχόλη (1 μ M)

Για να ελέγξουμε την δράση κι ενός εξωγενούς χολινεργικού αγωνιστή στην συχνότητα εκφορτίσεων, επιτυχ-
χάνοντας -πιθανώς- υψηλότερο ποσοστό κορεσμού των υποδοχέων, προσθέσαμε 1 μ M καρβαχόλης στο διάλυμα
διαβροχής.

Control



Carbachol (1 μ M)



0.5 mV
10 s

Εικόνα καταγραφής 4: Αποτέλεσμα της καρβαχόλης στην δραστηριότητα του πυραμιδικού πεδίου CA3a κροταφικής τομής
φυσιολογικού πειραματοζώου. Η δραστηριότητα (επιληπτοειδείς εκφορτίσεις μεσοκρισικού τύπου) επάγεται από την διαβροχή
με τΕΝΥ με 50 μ M 4-αμινοπυριδίνη. Η εικόνα είναι παρόμοια με αυτήν στο τΕΝΥ άνευ μαγνησίου.

Αποτελέσματα

Η καρβαχόλη αύξησε τη συχνότητα σε όλες τις υποομάδες τομών, όπως παρουσιάζεται στους ακόλουθους πίνακες.

Πίνακας 5α-β: Συχνότητα εκφορτίσεων τομών φυσιολογικών πειραματοζώων προ και κατά την διαβροχή με καρβαχόλη σε τΕΝΥ άνευ μαγνησίου.

(α) Τομές φυσιολογικών πειραματοζώων			
Τομή	Συχνότητα εκφορτίσεων προ καρβαχόλης	Με καρβαχόλη (1μΜ)	Στατιστικό αποτέλεσμα (paired t-test p-value)
Κροταφική	0.542 ± 0.116 Hz, n = 7	1.372 ± 0.34 Hz, n = 7	0.04860
Διαφραγματική	0.244 ± 0.086 Hz, n = 6	0.551 ± 0.09 Hz, n = 6	0.00242
(β) Τομές PTZ πειραματοζώων			
Τομή	Συχνότητα εκφορτίσεων προ καρβαχόλης	Με καρβαχόλη (1μΜ)	Στατιστικό αποτέλεσμα (paired t-test p-value)
Κροταφική	0.518 ± 0.098 Hz, n = 6	1.071 ± 0.275 Hz, n = 6	0.06642
Διαφραγματική	0.129 ± 0.035 Hz, n = 4	0.274 ± 0.069 Hz, n = 4	0.04408

Πίνακας 5γ-δ: Συχνότητα εκφορτίσεων τομών προ και κατά την διαβροχή με καρβαχόλη σε τΕΝΥ με 50 μΜ 4-αμινοπυριδίνης.

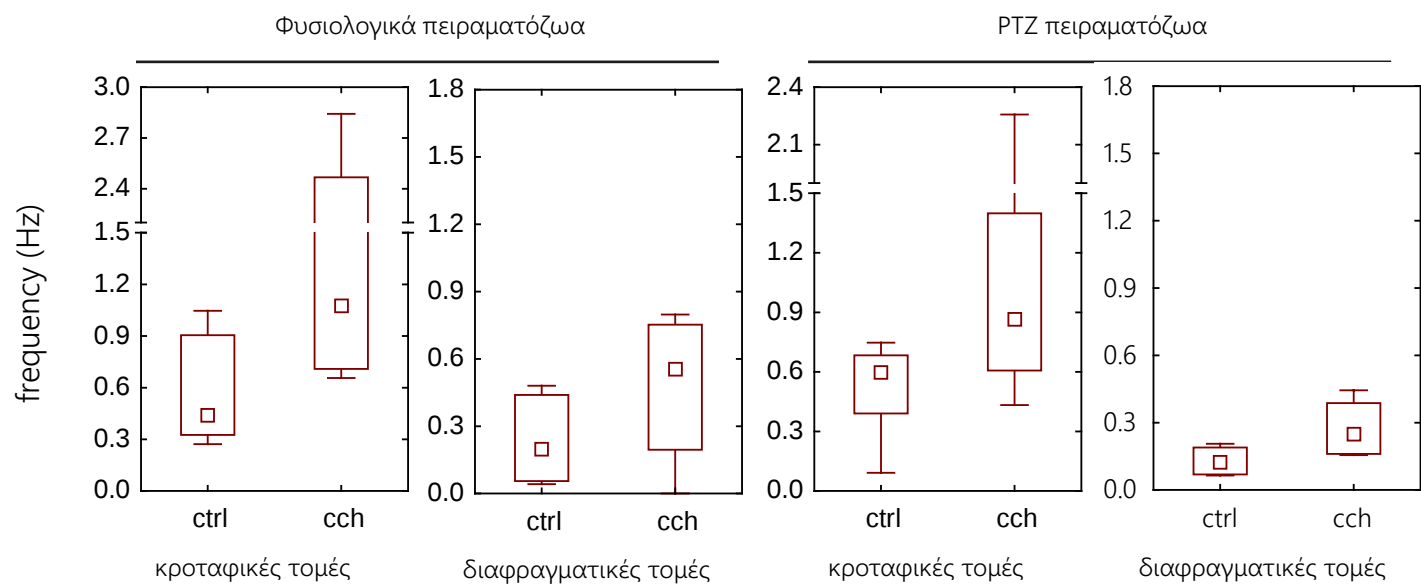
(γ) Τομές φυσιολογικών πειραματοζώων			
Τομή	Συχνότητα εκφορτίσεων προ καρβαχόλης	Με καρβαχόλη (1μΜ)	Στατιστικό αποτέλεσμα (paired t-test p-value)
Κροταφική	0.456 ± 0.073 Hz, n = 8	1.005 ± 0.133 Hz, n = 8	0.00050
Διαφραγματική	0.211 ± 0.033 Hz, n = 3	0.403 ± 0.125 Hz, n = 3	0.26664
(δ) Τομές PTZ πειραματοζώων			
Τομή	Συχνότητα εκφορτίσεων προ καρβαχόλης	Με καρβαχόλη (1μΜ)	Στατιστικό αποτέλεσμα (paired t-test p-value)
Κροταφική	0.517 ± 0.077 Hz, n = 6	1.258 ± 0.157 Hz, n = 6	0.00194
Διαφραγματική	0.221 ± 0.037 Hz, n = 6	0.593 ± 0.181 Hz, n = 6	0.11414

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η καρβαχόλη, πιθανώς ενεργοποιώντας σε μεγαλύτερο βαθμό τους μουσκαρινικούς υποδοχείς (με βάση την παρατήρηση της συνδυασμένης διαβροχής εσερίνης-ατροπίνης παραπάνω), προκαλεί αύξηση της συχνότητας εκφορτίσεων (επίσης από 2-way repeated measures ANOVA $p < 0.001$). Επίσης, οι κροταφικές τομές παρουσιάζουν μεγαλύτερη τελική συχνότητα σε σχέση με τις διαφραγματικές (2-way repeated measures ANOVA $p < 0.01$).

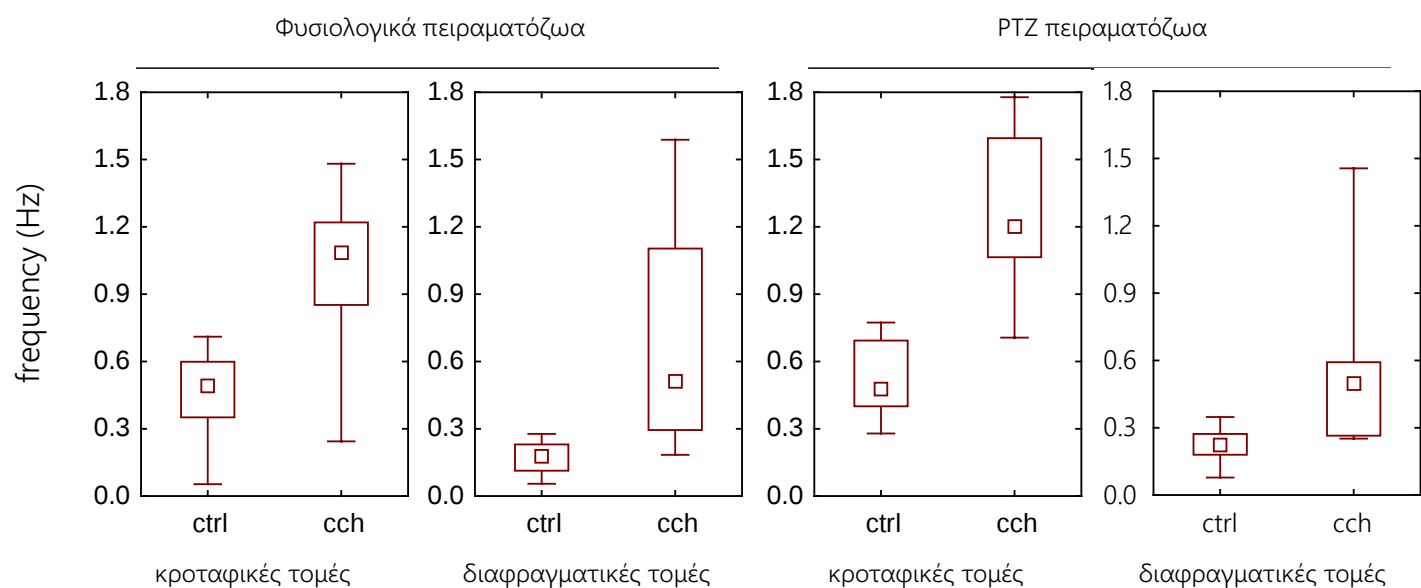
Σε σύγκριση με το αποτέλεσμα της εσερίνης, η καρβαχόλη επάγει υψηλότερες συχνότητες εκφορτίσεων (2-way repeated measures $p < 0.01$), γεγονός που δείχνει ότι η ενδογενής ακετυλοχολίνη δεν αρκεί για να παράγει το μέγιστο δυνατό αποτέλεσμα που επιτρέπουν οι υποδοχείς της.

Αποτελέσματα

τεΝΥ άνευ Mg^{2+}



τεΝΥ με 50μM 4-AP



Γράφημα 5. Αποτύπωση του πλήρους συνόλου δεδομένων σε διαγράμματα ελαχίστου-25%-διαμέσου-75%-μεγίστου, για το αποτέλεσμα της προσθήκης καρβαχόλης (10μM) στο διάλυμα διαβροχής -τεΝΥ άνευ μαγνησίου επάνω, τεΝΥ με αμινοπυριδίνη κάτω. Η καρβαχόλη προκάλεσε την αύξηση των συχνοτήτων επιληπτοειδών εκφορτίσεων μεσοκρισικού τύπου σε όλες τις ομάδες τομών.

Αποτελέσματα

5. Σύγκριση κροταφικών-διαφραγματικών τομών ως προς τη συχνότητα εκφορτίσεων

Η αρχική συχνότητα των κροταφικών τομών είναι μεγαλύτερη της αρχικής συχνότητας των διαφραγματικών τομών, όπως φαίνεται στους ακόλουθους πίνακες Παρά τίθεται η σύγκριση ανά ομάδες:

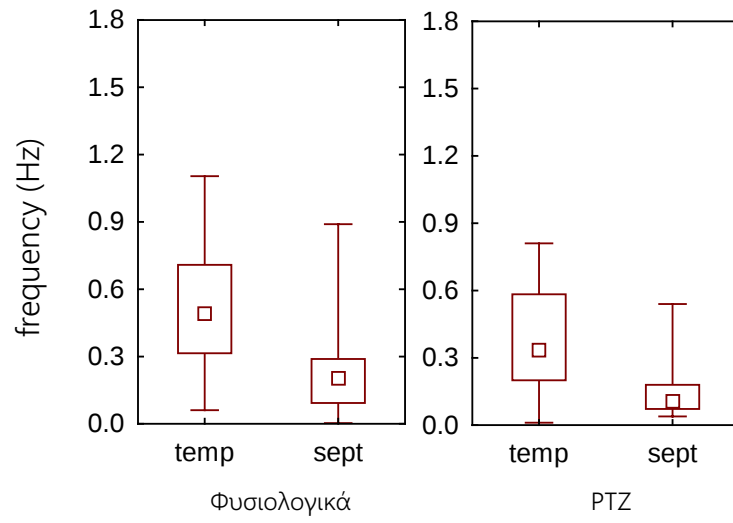
Πίνακας 6α-β: Συχνότητες εκφορτίσεων σε κροταφικές και διαφραγματικές τομές ιπποκάμπου φυσιολογικών ζώων.

(α) τΕΝΥ άνευ μαγνησίου.			
Πειραματόζωο	Συχνότητα εκφορτίσεων κροταφικών τομών	Συχνότητα εκφορτίσεων διαφραγματικών τομών	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Φυσιολογικό	0.52 ± 0.034 Hz, n = 64	0.234 ± 0.031 Hz, n = 33	0.00000
PTZ	0.372 ± 0.037 Hz, n = 34	0.15 ± 0.025 Hz, n = 24	0.00003
(β) τΕΝΥ με 50 μ M 4-αμινοπυριδίνη			
Πειραματόζωο	Συχνότητα εκφορτίσεων κροταφικών τομών	Συχνότητα εκφορτίσεων διαφραγματικών τομών	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Φυσιολογικό	0.488 ± 0.044 Hz, n = 33	0.272 ± 0.027 Hz, n = 23	0.00046
PTZ	0.528 ± 0.043 Hz, n = 22	0.239 ± 0.024 Hz, n = 18	0.00000

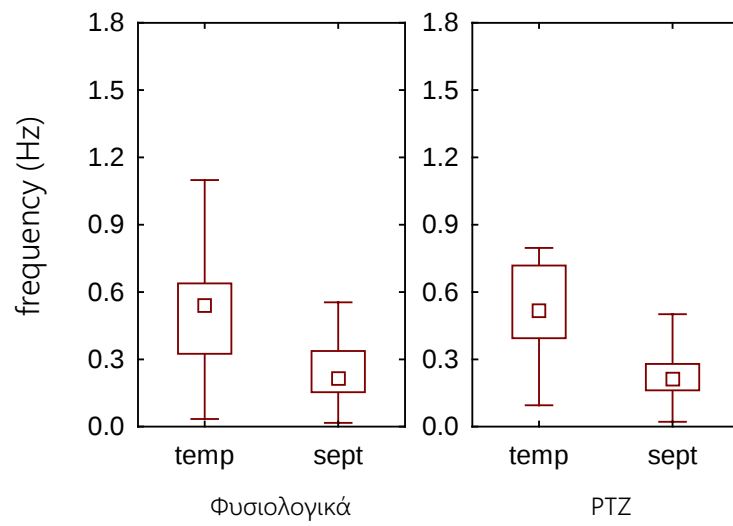
Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η συχνότητα επιληπτοειδών εκφορτίσεων μεσοκρυστικού τύπου είναι υψηλότερη στον κροταφικό έναντι του διαφραγματικού ιπποκάμπου, γεγονός που επιβεβαιώνεται στη βιβλιογραφία.

Αποτελέσματα

τENY άνευ Mg^{2+}



τENY με 50μM 4-AP



Γράφημα 6. Αποτύπωση του πλήρους συνόλου δεδομένων σε διαγράμματα ελαχίστου-25%-διαμέσου-75%-μεγίστου, για την σύγκριση συχνότητας επιληπτοειδών εκφορτίσεων μεταξύ κροταφικού και διαφραγματικού ιπποκάμπου -τENY άνευ μαγνησίου επάνω, τENY με αμινοπυριδίνη κάτω. Οι κροταφικές τομές εμφανίζουν υψηλότερη συχνότητα εκφορτίσεων σε σύγκριση με τις διαφραγματικές.

Αποτελέσματα

6. Σύγκριση κροταφικών-διαφραγματικών τομών παρουσία εσερίνης (10μM) ως προς τη συχνότητα εκφορτίσεων

Παρουσία εσερίνης (10μM) η συχνότητα εκφορτίσεων των κροταφικών τομών είναι μεγαλύτερη της συχνότητας των διαφραγματικών τομών. Η σχετική μεταβολή της συχνότητας εκφορτίσεων δεν είναι σημαντικά διαφορετική μεταξύ κροταφικών και διαφραγματικών τομών με εξαίρεση τις τομές PTZ πειραματοζώων σε τΕΝΥ άνευ μαγνησίου (πίνακας 7β).

Παρουσία εσερίνης υφίστανται διαφορές μεταξύ κροταφικών και διαφραγματικών τομών. Η αρχική τάση των κροταφικών τομών να έχουν μεγαλύτερη συχνότητα εκφορτίσεων από τις διαφραγματικές διατηρείται παντού, και είναι στατιστικά σημαντική και στα δύο μοντέλα, και στα φυσιολογικά, και στα PTZ πειραματοζώα. Η αύξηση της συχνότητας, είναι σημαντικά μεγαλύτερη (τριπλασιασμός έναντι μικρότερων αυξήσεων (2-2.5x) σε όλες τις άλλες περιπτώσεις) στις διαφραγματικές τομές των PTZ πειραματοζώων για το μοντέλο με το ελεύθερο-Mg²⁺ τΕΝΥ.

Παρατίθεται η σύγκριση ανά ομάδες στους ακόλουθους πίνακες:

Πίνακας 7α-β: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική αύξηση παρουσία εσερίνης σε κροταφικές και διαφραγματικές τομές φυσιολογικών πειραματοζώων, σε τΕΝΥ άνευ μαγνησίου.

(α) Τομές φυσιολογικών πειραματοζώων			
Συγκρινόμενη μεταβλητή	κροταφικές τομές	διαφραγματικές τομές	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.635 ± 0.071 Hz, n = 25	0.345 ± 0.06 Hz, n = 12	0.01357
% της αρχικής συχνότητας	167.057 ± 15.869, n = 25	174.03 ± 19.05, n = 12	0.79383
(β) Τομές PTZ πειραματοζώων			
Συγκρινόμενη μεταβλητή	κροταφικές τομές	διαφραγματικές τομές	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.56 ± 0.076 Hz, n = 20	0.318 ± 0.047 Hz, n = 15	0.01751
% της αρχικής συχνότητας	189.859 ± 20.529, n = 20	298.208 ± 45.592, n = 15	0.02439

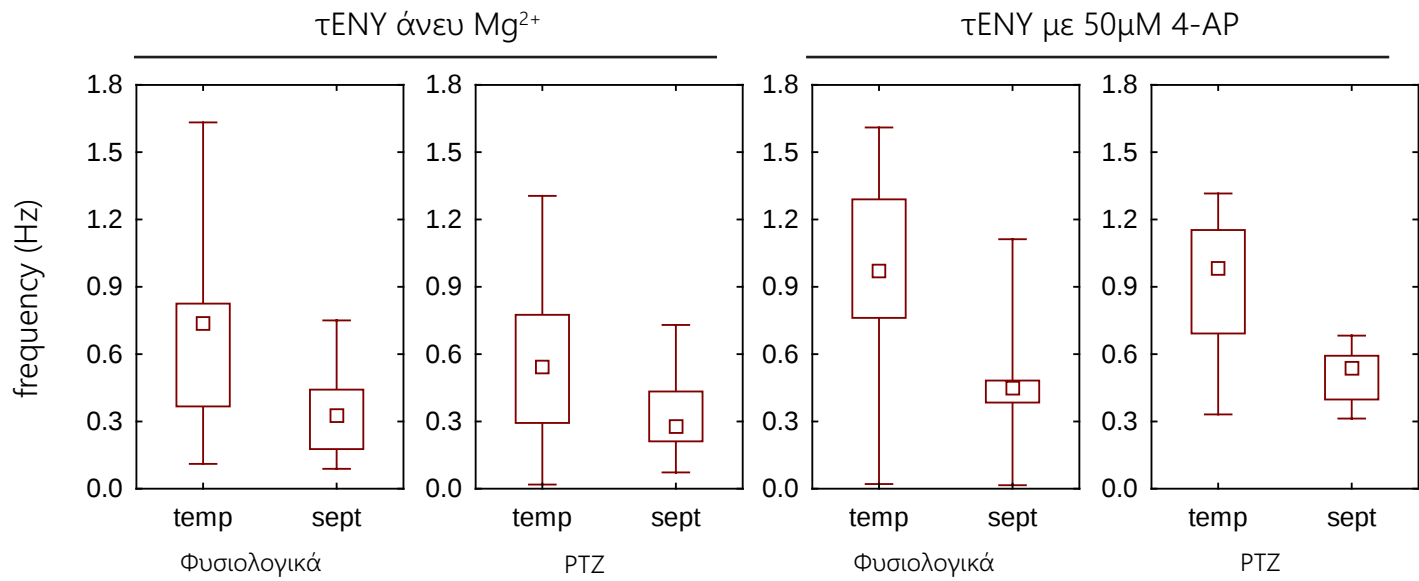
Πίνακας 7γ-δ: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική αύξηση παρουσία εσερίνης σε κροταφικές και διαφραγματικές τομές φυσιολογικών πειραματοζώων, σε τΕΝΥ με 50μM 4-αμινοπυριδίνη.

(γ) Τομές φυσιολογικών πειραματοζώων			
Συγκρινόμενη μεταβλητή	κροταφικές τομές	διαφραγματικές τομές	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.956 ± 0.112 Hz, n = 15	0.53 ± 0.073 Hz, n = 10	0.00942
% της αρχικής συχνότητας	237.338 ± 40.906, n = 15	248.708 ± 44.424, n = 10	0.85590
(δ) Τομές PTZ πειραματοζώων			
Συγκρινόμενη μεταβλητή	κροταφικές τομές	διαφραγματικές τομές	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.913 ± 0.102 Hz, n = 9	0.572 ± 0.033 Hz, n = 5	0.03287
% της αρχικής συχνότητας	260.88 ± 65.953, n = 9	221.114 ± 22.183, n = 5	0.67162

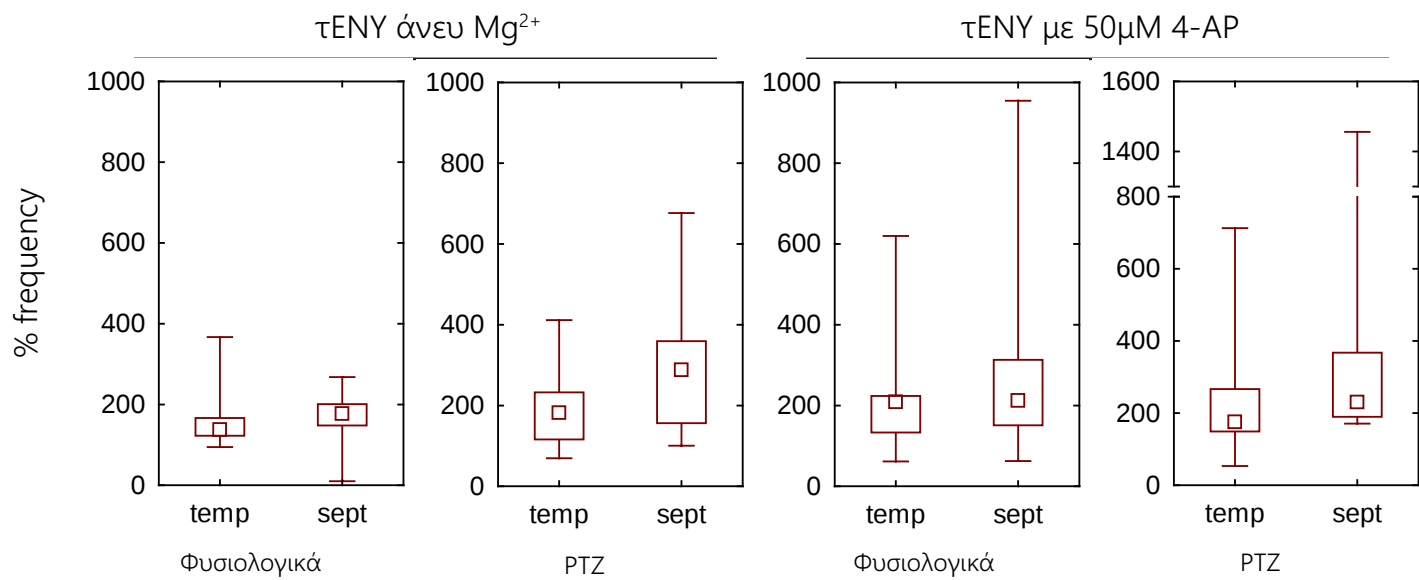
Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι οι τομές κροταφικού ιπποκάμπου διατηρούν τις υψηλότερες συχνότητες εκφορτίσεων κατά την παράταση της διέγερσης από την ενδογενή ακετυλοχολίνη (2-way repeated measures ANOVA p=0.021).

Αποτελέσματα

Συχνότητα εκφορτίσεων



Σχετική μεταβολή της συχνότητας



Γράφημα 7. Αποτύπωση του πλήρους συνόλου δεδομένων σε διαγράμματα ελαχίστου-25%-διαμέσου-75%-μεγίστου, για την διαφορά του αποτελέσματος της προσθήκης εσερίνης (10μM) στο διάλυμα διαβροχής -τENY άνευ μαγνησίου αριστερά, τENY με αμινοπυριδίνη δεξιά- μεταξύ κροταφικών και διαφραγματικών τομών. Παρουσία εσερίνης οι συχνότητες εκφορτίσεων των κροταφικών τομών παραμένουν υψηλότερες των συχνοτήτων των διαφραγματικών τομών, ενώ η % αύξηση των συχνοτήτων τείνει να είναι μεγαλύτερη στις διαφραγματικές τομές.

Στην υποπερίπτωση των τομών που προστέθηκε 1μM ατροπίνη επί της εσερίνης (10μM) δεν βρέθηκαν διαφορές μεταξύ τομών κροταφικού και διαφραγματικού άκρου. Δηλαδή, η ανατομική προέλευση της τομής δεν αλληλεπιδρά με την μείωση της συχνότητας εκφορτίσεων που προκαλεί η ατροπίνη, αφού προστεθεί σε τENY που περιέχει εσερίνη (2-way repeated measures ANOVA):

Αποτελέσματα

Πίνακας 8α: Συχνότητα εκφορτίσεων σε κανονικές συνθήκες, παρουσία εσερίνης και παρουσία εσερίνης και ατροπίνης σε κροταφικές και διαφραγματικές τομές, σε *t*ENY άνευ μαγνησίου.

Πειραματό-ζωο	Αρχική συχνότητα εκφορτίσεων κροταφικών τομών	Συχνότητα εκφορτίσεων κροταφικών τομών παρουσία εσερίνης	Συχνότητα εκφορτίσεων κροταφικών τομών παρουσία εσερίνης και ατροπίνης	Αρχική συχνότητα εκφορτίσεων διαφραγματικών τομών	Συχνότητα εκφορτίσεων διαφραγματικών τομών παρουσία εσερίνης	Συχνότητα εκφορτίσεων διαφραγματικών τομών παρουσία εσερίνης και ατροπίνης	Στατιστικό αποτέλεσμα (Repeated measures 2-way ANOVA p-value)
Φυσιολογικό	0.44 ± 0.091 Hz, n = 13	0.561 ± 0.084 Hz, n = 13	0.302 ± 0.053 Hz, n = 13	0.246 ± 0.147 Hz, n = 5	0.163 ± 0.136 Hz, n = 5	0.083 ± 0.086 Hz, n = 5	0.14337
PTZ	0.293 ± 0.044 Hz, n = 10	0.56 ± 0.092 Hz, n = 10	0.353 ± 0.062 Hz, n = 10	0.148 ± 0.044 Hz, n = 10	0.362 ± 0.092 Hz, n = 10	0.178 ± 0.062 Hz, n = 10	0.81433

Πίνακας 8β: Συχνότητα εκφορτίσεων σε κανονικές συνθήκες, παρουσία εσερίνης και παρουσία εσερίνης και ατροπίνης σε κροταφικές και διαφραγματικές τομές, σε *t*ENY με 50 μ M 4-αμινοπυριδίνης.

Πειραματό-ζωο	Αρχική συχνότητα εκφορτίσεων κροταφικών τομών	Συχνότητα εκφορτίσεων κροταφικών τομών παρουσία εσερίνης	Συχνότητα εκφορτίσεων κροταφικών τομών παρουσία εσερίνης και ατροπίνης	Αρχική συχνότητα εκφορτίσεων διαφραγματικών τομών	Συχνότητα εκφορτίσεων διαφραγματικών τομών παρουσία εσερίνης	Συχνότητα εκφορτίσεων διαφραγματικών τομών παρουσία εσερίνης και ατροπίνης	Στατιστικό αποτέλεσμα (Repeated measures 2-way ANOVA p-value)
Φυσιολογικό	0.419 ± 0.09 Hz, n = 8	0.905 ± 0.167 Hz, n = 8	0.511 ± 0.142 Hz, n = 8	0.188 ± 0.128 Hz, n = 4	0.599 ± 0.236 Hz, n = 4	0.207 ± 0.201 Hz, n = 4	0.92033
PTZ	0.494 ± 0.055 Hz, n = 7	0.889 ± 0.093 Hz, n = 7	0.543 ± 0.109 Hz, n = 7	0.283 ± 0.073 Hz, n = 4	0.595 ± 0.122 Hz, n = 4	0.254 ± 0.145 Hz, n = 4	0.88009

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι η δράση της εσερίνης μεσολαβείται σχεδόν αποκλειστικά από μουςκαρινικούς υποδοχείς και στις κροταφικές και στις διαφραγματικές τομές.

Αποτελέσματα

7. Σύγκριση κροταφικών-διαφραγματικών τομών παρουσία ατροπίνης (1μM) ως προς τη συχνότητα εκφορτίσεων

Παρουσία ατροπίνης (1μM) η συχνότητα εκφορτίσεων των κροταφικών τομών είναι μεγαλύτερη της συχνότητας των διαφραγματικών τομών. Η σχετική συχνότητα εκφορτίσεων διαφέρει μεταξύ κροταφικών και διαφραγματικών τομών, ανάλογα με το μοντέλο που χρησιμοποιείται για την πρόκληση των επιληπτοειδών εκφορτίσεων και με το ιστορικό του πειραματοζώου.

Στο μοντέλο με τΕΝΥ άνευ μαγνησίου, παρουσία ατροπίνης υφίστανται διαφορές μεταξύ κροταφικών και διαφραγματικών τομών τόσο στις συχνότητες των εκφορτίσεων όσο και στις σχετικές (%) μεταβολές –η συχνότητα εκφορτίσεων σε κροταφικές τομές φυσιολογικών πειραματοζώων εμφανίζει μεγαλύτερη μείωση σε σύγκριση με τις διαφραγματικές. Η αρχική τάση των κροταφικών τομών προς μεγαλύτερη συχνότητα εκφορτίσεων από τις διαφραγματικές γενικά διατηρείται στο μοντέλο αυτό. Αντίθετα, στο μοντέλο της αμινοπυριδίνης και σε τομές φυσιολογικών ζώων, οι διαφραγματικές τομές δείχνουν να καταλήγουν, μετά τη διαβροχή με ατροπίνη, σε μεγαλύτερες συχνότητες από τις κροταφικές, πιθανώς εξ αιτίας της μεγαλύτερης διακύμανσης στις συχνότητες των κροταφικών τομών, όπως φαίνεται και στο αντίστοιχο διάγραμμα παρακάτω. Στα PTZ πειραματοζώα η διαφορά κροταφικών-διαφραγματικών τομών διατηρείται και κατά την διαβροχή με ατροπίνη σε τΕΝΥ με 4-AP.

Παρατίθεται η σύγκριση ανά ομάδες στους ακόλουθους πίνακες:

Πίνακας 9α-β: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική μείωση παρουσία ατροπίνης σε κροταφικές και διαφραγματικές τομές, σε τΕΝΥ άνευ μαγνησίου.

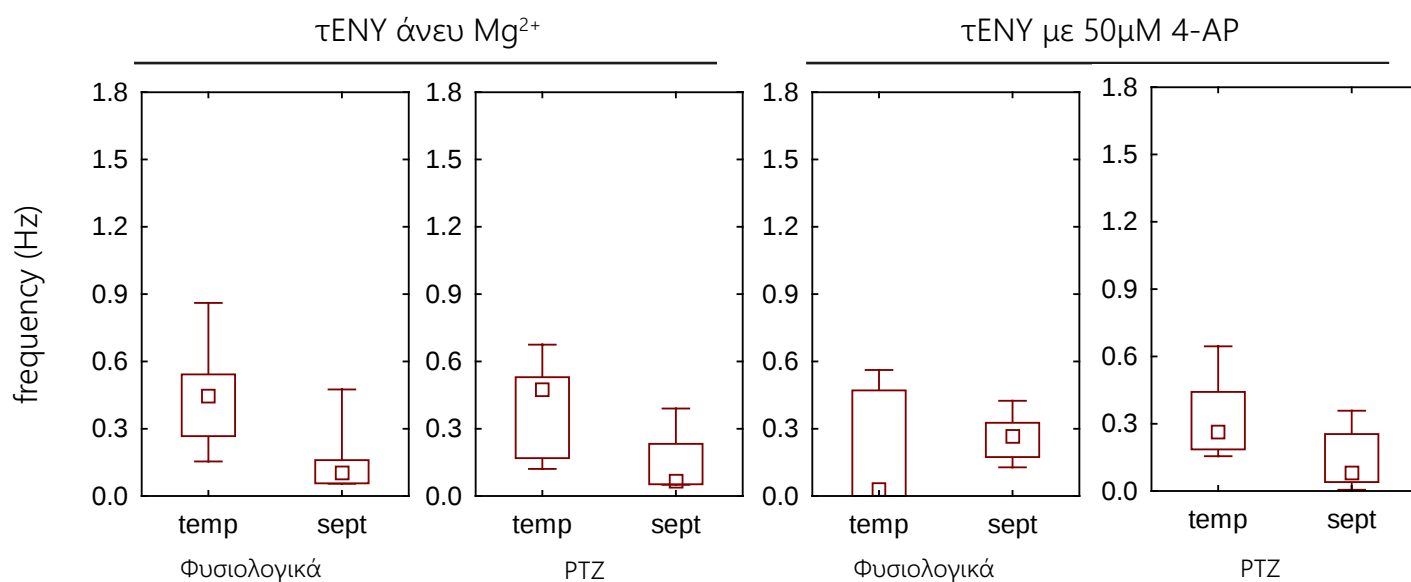
(α) Τομές φυσιολογικών πειραματοζώων			
Συγκρινόμενη μεταβλητή	κροταφικές τομές	διαφραγματικές τομές	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.448 ± 0.048 Hz, n = 19	0.159 ± 0.065 Hz, n = 6	0.00517
% της αρχικής συχνότητας	80.128 ± 5.936 , n = 19	86.152 ± 12.778 , n = 6	0.64006
(β) Τομές PTZ πειραματοζώων			
Συγκρινόμενη μεταβλητή	κροταφικές τομές	διαφραγματικές τομές	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.407 ± 0.075 Hz, n = 7	0.143 ± 0.083 Hz, n = 4	0.05157
% της αρχικής συχνότητας	91.851 ± 6.833 , n = 7	75.021 ± 9.028 , n = 4	0.17146

Πίνακας 9γ-δ: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική μείωση παρουσία ατροπίνης σε κροταφικές και διαφραγματικές τομές, σε τΕΝΥ με 50 μM 4-αμινοπυριδίνης

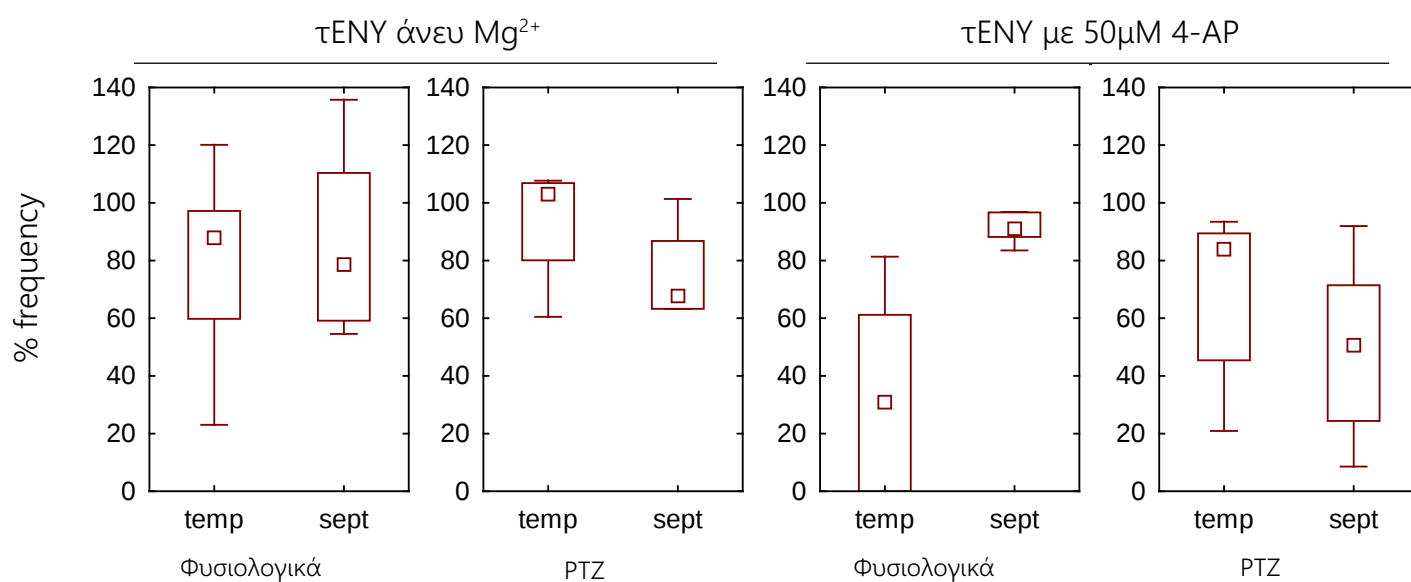
(γ) Τομές φυσιολογικών πειραματοζώων			
Συγκρινόμενη μεταβλητή	κροταφικές τομές	διαφραγματικές τομές	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.213 ± 0.125 Hz, n = 5	0.264 ± 0.044 Hz, n = 6	0.68366
% της αρχικής συχνότητας	34.683 ± 16.273 , n = 5	91.225 ± 2.143 , n = 6	0.00422
(δ) Τομές PTZ πειραματοζώων			
Συγκρινόμενη μεταβλητή	κροταφικές τομές	διαφραγματικές τομές	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.339 ± 0.091 Hz, n = 5	0.148 ± 0.068 Hz, n = 5	0.13207
% της αρχικής συχνότητας	66.635 ± 14.28 , n = 5	49.396 ± 15.146 , n = 5	0.43160

Αποτελέσματα

Συχνότητα εκφορτίσεων



Σχετική μεταβολή της συχνότητας



Γράφημα 8. Αποτύπωση του πλήρους συνόλου δεδομένων σε διαγράμματα ελαχίστου-25%-διαμέσου-75%-μεγίστου, για την διαφορά του αποτελέσματος της προσθήκης ατροπίνης (1 μ M) στο διάλυμα διαβροχής τ ENY άνευ μαγνησίου αριστερά, τ ENY με αμινοπυριδίνη δεξιά- μεταξύ κροταφικών και διαφραγματικών τομών. Παρουσία ατροπίνης οι συχνότητες εκφορτίσεων των κροταφικών τομών παραμένουν υψηλότερες των συχνοτήτων των διαφραγματικών τομών με εξαίρεση ίσως τις κροταφικές τομές φυσιολογικών πειραματοζώων κατά την διαβροχή με τ ENY με αμινοπυριδίνη, όπου η διακύμανση όμως δείχνει να είναι πολύ μεγαλύτερη των άλλων περιπτώσεων. Η % μείωση των συχνοτήτων τείνει να είναι μεγαλύτερη στις διαφραγματικές τομές, με την προαναφερθείσα εξαίρεση.

Αποτελέσματα

8. Σύγκριση κροταφικών-διαφραγματικών τομών παρουσία καρβαχόλης (1μM) ως προς τη συχνότητα εκφορτίσεων

Παρουσία καρβαχόλης (1μM) η συχνότητα εκφορτίσεων των κροταφικών τομών είναι μεγαλύτερη της συχνότητας των διαφραγματικών τομών. Η σχετική συχνότητα εκφορτίσεων δεν είναι σημαντικά διαφορετική μεταξύ κροταφικών και διαφραγματικών τομών.

Η αρχική τάση των κροταφικών τομών να έχουν μεγαλύτερη συχνότητα εκφορτίσεων από τις διαφραγματικές, διατηρείται παντού, και ειδικά στο μοντέλο της αμινοπυριδίνης οι διαφορές είναι εμφανέστερες και στατιστικά σημαντικές.

Παρατίθεται η σύγκριση ανά ομάδες στους ακόλουθους πίνακες:

Πίνακας 10α-β: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική αύξηση παρουσία καρβαχόλης σε κροταφικές και διαφραγματικές τομές, σε τΕΝΥ άνευ μαγνησίου.

(α) Τομές φυσιολογικών πειραματοζώων			
Συγκρινόμενη μεταβλητή	κροταφικές τομές	διαφραγματικές τομές	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	1.372 ± 0.34 Hz, n = 7	0.551 ± 0.09 Hz, n = 6	0.05277
% της αρχικής συχνότητας	301.816 ± 97.646, n = 7	442.723 ± 145.285, n = 6	0.42625
(β) Τομές PTZ πειραματοζώων			
Συγκρινόμενη μεταβλητή	κροταφικές τομές	διαφραγματικές τομές	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	1.071 ± 0.275 Hz, n = 6	0.274 ± 0.069 Hz, n = 4	0.05119
% της αρχικής συχνότητας	244.034 ± 59.404, n = 6	221.306 ± 21.519, n = 4	0.77304

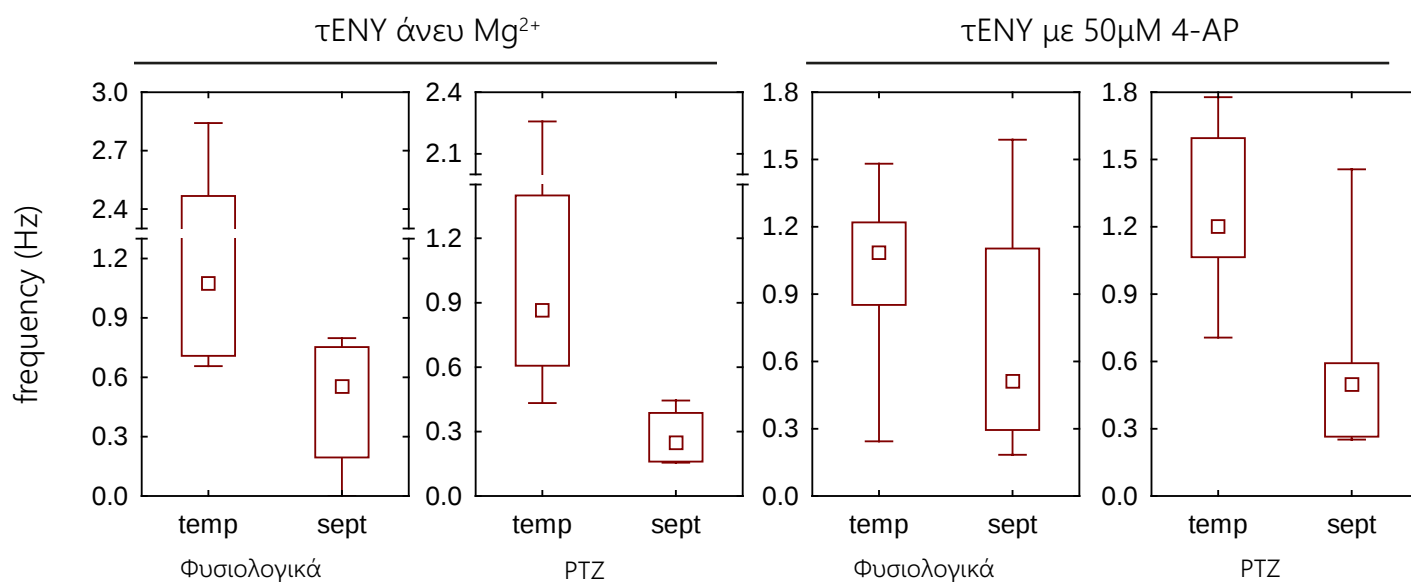
Πίνακας 10γ-δ: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική αύξηση παρουσία καρβαχόλης σε κροταφικές και διαφραγματικές τομές, σε τΕΝΥ με 50 μM 4-αμινοπυριδίνης.

(γ) τομές φυσιολογικών πειραματοζώων			
Συγκρινόμενη μεταβλητή	κροταφικές τομές	διαφραγματικές τομές	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	1.005 ± 0.133 Hz, n = 8	0.403 ± 0.125 Hz, n = 3	0.03028
% της αρχικής συχνότητας	256.513 ± 35.987, n = 8	196.629 ± 70.575, n = 3	0.42842
(δ) τομές PTZ πειραματοζώων			
Συγκρινόμενη μεταβλητή	κροταφικές τομές	διαφραγματικές τομές	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	1.258 ± 0.157 Hz, n = 6	0.593 ± 0.181 Hz, n = 6	0.01988
% της αρχικής συχνότητας	258.011 ± 32.878, n = 6	353.98 ± 136.225, n = 6	0.50902

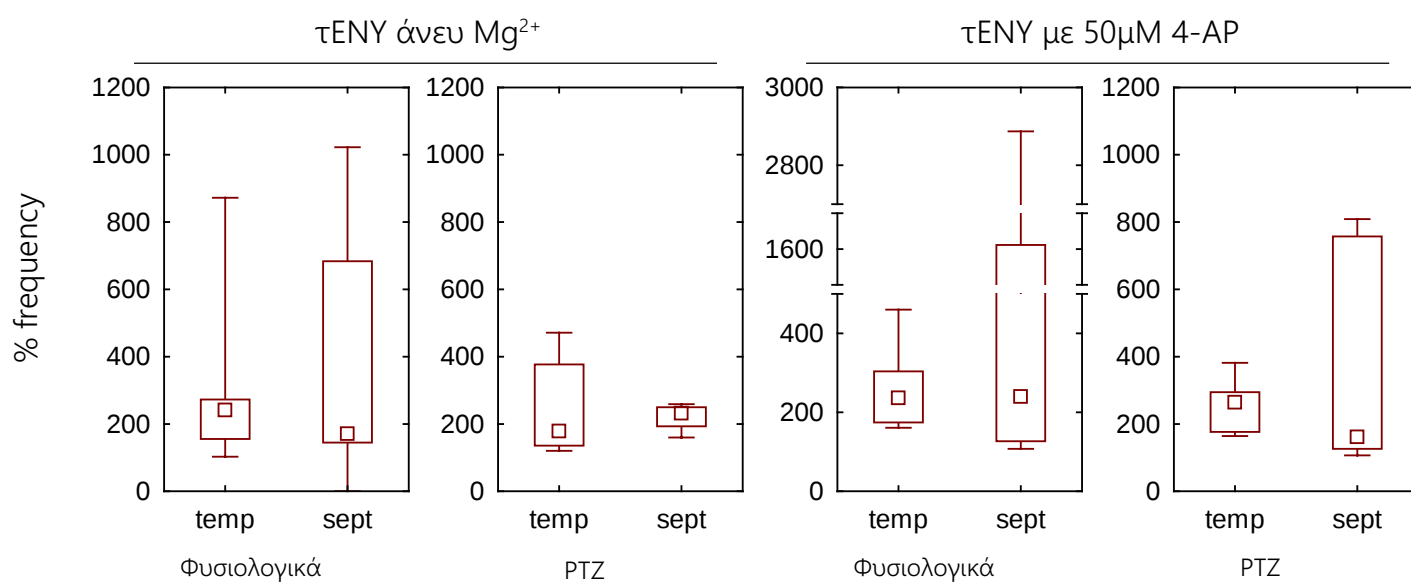
Τα αποτελέσματα αυτά, αν και παρεμφερή με αυτά της εσερίνης, δεν δείχνουν την διαβάθμιση των αυξήσεων της συχνότητας που φαινόταν με την ασθενέστερη χολινεργική διέγερση. Πιθανώς αυτό το πρότυπο αύξησης της συχνότητας να εξηγείται από την πρόσδεση της καρβαχόλης σε μεγαλύτερο βαθμό από ό,τι η ενδογενής ακετυλοχολίνη σε διαφορετικές θέσεις (λ.χ. εξωσυναπτικά).

Αποτελέσματα

Συχνότητα εκφορτίσεων



Σχετική μεταβολή της συχνότητας



Γράφημα 9. Αποτύπωση του πλήρους συνόλου δεδομένων σε διαγράμματα ελαχίστου-25%-διαμέσου-75%-μεγίστου, για την διαφορά του αποτελέσματος της προσθήκης καρβαχόλης (1 μ M) στο διάλυμα διαβροχής - τ ENY άνευ μαγνησίου αριστερά, τ ENY με αμινοπυριδίνη δεξιά- μεταξύ κροταφικών και διαφραγματικών τομών. Παρουσία καρβαχόλης οι συχνότητες εκφορτίσεων των κροταφικών τομών παραμένουν υψηλότερες των συχνοτήτων των διαφραγματικών τομών, ενώ η % αύξηση των συχνοτήτων είναι περίπου η ίδια, αν και τείνει να εμφανίζει μεγαλύτερη διακύμανση στις διαφραγματικές τομές.

Αποτελέσματα

9. Σύγκριση τομών φυσιολογικών-PTZ πειραματοζώων ως προς τη συχνότητα εκφορτίσεων

Η αρχική συχνότητα των τομών φυσιολογικών ζώων είναι μεγαλύτερη της αρχικής συχνότητας των τομών PTZ ζώων, εκτός των κροταφικών τομών στο μοντέλο της αμινοπυριδίνης.

Παρατίθεται η σύγκριση ανά ομάδες στους ακόλουθους πίνακες:

Πίνακας 11α: Συχνότητα εκφορτίσεων σε τομές φυσιολογικών και PTZ πειραματοζώων, σε τΕΝΥ άνευ μαγνησίου.

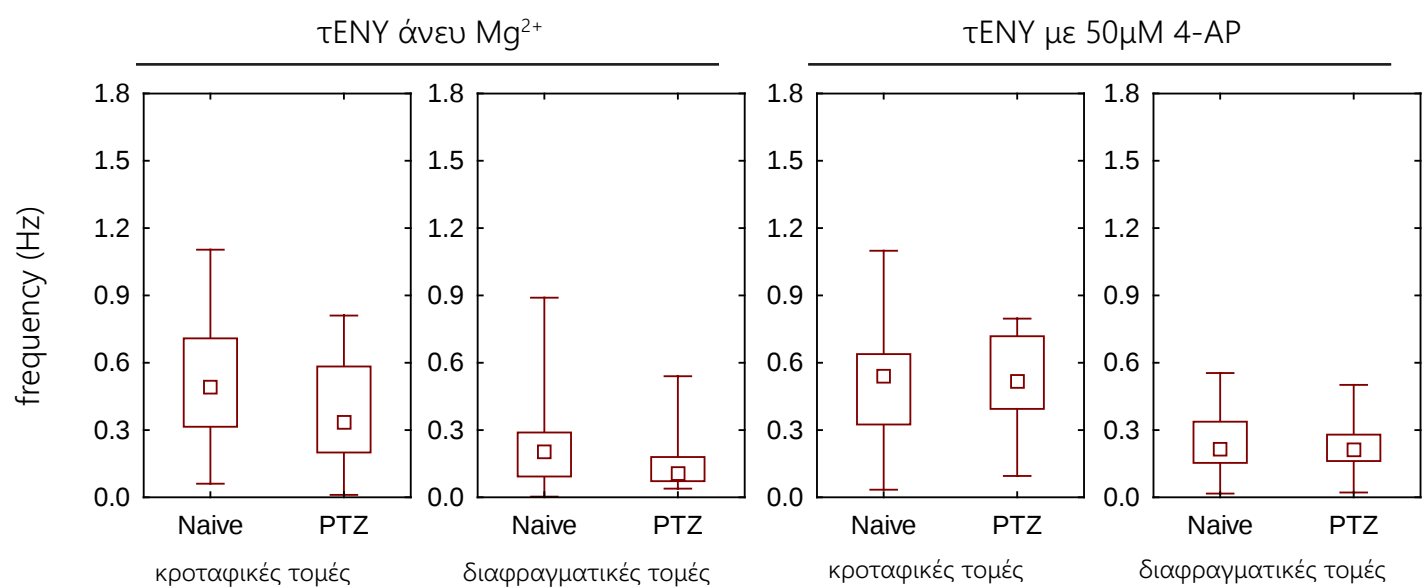
Τομές	Συχνότητα εκφορτίσεων τομών φυσιολογικών ζώων	Συχνότητα εκφορτίσεων τομών PTZ ζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Κροταφικές	0.52 ± 0.034 , n = 64	0.372 ± 0.037 , n = 34	0.00675
Διαφραγματικές	0.234 ± 0.031 , n = 33	0.15 ± 0.025 , n = 24	0.04827

Πίνακας 11β: Συχνότητα εκφορτίσεων σε τομές φυσιολογικών και PTZ πειραματοζώων, σε τΕΝΥ με 50 μ M 4-αμινοπυριδίνης.

Τομές	Συχνότητα εκφορτίσεων τομών φυσιολογικών ζώων	Συχνότητα εκφορτίσεων τομών PTZ ζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Κροταφικές	0.488 ± 0.044 , n = 33	0.528 ± 0.043 , n = 22	0.53818
Διαφραγματικές	0.272 ± 0.027 Hz, n = 23	0.239 ± 0.024 Hz, n = 18	0.37966

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι στο μοντέλο με τΕΝΥ άνευ μαγνησίου η συχνότητα των επιληπτοειδών εκφορτίσεων μεσοκρυσικού τύπου είναι χαμηλότερη στις τομές των PTZ πειραματοζώων. Η διαφορά αυτή δεν παρατηρείται στο τΕΝΥ με 50 μ M 4-αμινοπυριδίνης, επομένως πιθανώς δείχνει μειωμένη γλουταματεργική διέγερση στην βασική κατάσταση (χωρίς επιπλέον φάρμακα) είτε σε μεταβολή του μηχανισμού ελέγχου των επιληπτοειδών εκφορτίσεων.

Συχνότητα εκφορτίσεων



Γράφημα 10. Αποτύπωση του πλήρους συνόλου δεδομένων σε διαγράμματα ελαχίστου-25%-διαμέσου-75%-μεγίστου, για την σύγκριση της συχνότητας εκφορτίσεων μεταξύ τομών φυσιολογικών και PTZ πειραματοζώων -τΕΝΥ άνευ μαγνησίου αριστερά, τΕΝΥ με αμινοπυριδίνη δεξιά. Οι συχνότητες είναι παρεμφερείς στο μοντέλο της αμινοπυριδίνης, αλλά ελαφρώς χαμηλότερες στις τομές των PTZ πειραματοζώων στο μοντέλο με τΕΝΥ άνευ μαγνησίου.

Αποτελέσματα

10. Σύγκριση τομών φυσιολογικών και PTZ ζώων παρουσία εσερίνης (10μM) ως προς τη συχνότητα εκφορτίσεων

Παρουσία εσερίνης (10μM) δεν υφίστανται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ φυσιολογικών και PTZ πειραματοζώων σε καμμία διάκριση, με εξαίρεση την αύξηση της συχνότητας στις διαφραγματικές τομές στο μοντέλο με τΕΝΥ άνευ μαγνησίου, όπου οι τομές των PTZ πειραματοζώων παρουσίασαν μεγαλύτερη αύξηση σε σύγκριση με τις τομές φυσιολογικών ζώων. Η σχετική συχνότητα εκφορτίσεων δεν είναι σημαντικά διαφορετική μεταξύ τομών φυσιολογικών και PTZ ζώων στις άλλες κατηγορίες.

Παρατίθεται η σύγκριση ανά ομάδες στους ακόλουθους πίνακες:

Πίνακας 12α-β: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική μεταβολή της συχνότητας παρουσία εσερίνης σε τομές φυσιολογικών και PTZ πειραματοζώων, σε τΕΝΥ άνευ μαγνησίου.

(α) κροταφικές τομές			
Συγκρινόμενη μεταβλητή	Τομές φυσιολογικών ζώων	Τομές PTZ ζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.635 ± 0.071 , n = 25	0.56 ± 0.076 , n = 20	0.48143
% της αρχικής συχνότητας	167.057 ± 15.869 , n = 25	189.859 ± 20.529 , n = 20	0.37662
(β) διαφραγματικές τομές			
Συγκρινόμενη μεταβλητή	Τομές φυσιολογικών ζώων	Τομές PTZ ζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.345 ± 0.06 , n = 12	0.318 ± 0.047 , n = 15	0.72266
% της αρχικής συχνότητας	174.03 ± 19.05 , n = 12	298.208 ± 45.592 , n = 15	0.02986

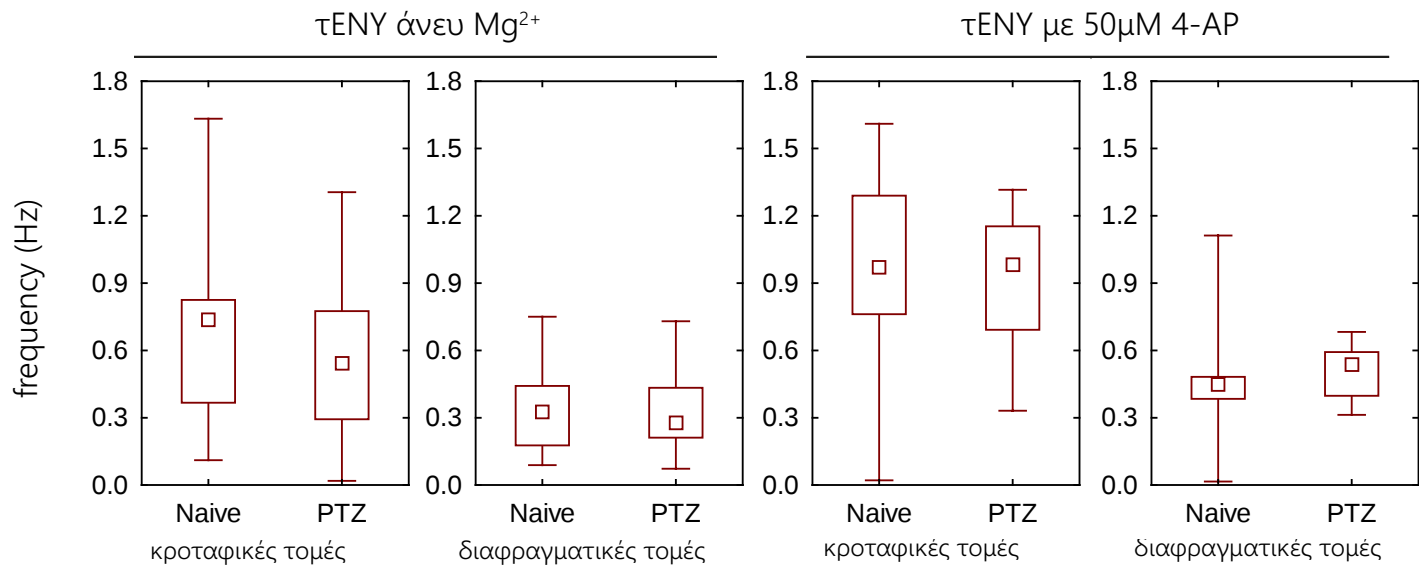
Πίνακας 12γ-δ: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική μεταβολή της συχνότητας παρουσία εσερίνης σε τομές φυσιολογικών και PTZ πειραματοζώων, σε τΕΝΥ με 50 μM 4-αμινοπυριδίνης.

(γ) κροταφικές τομές			
Συγκρινόμενη μεταβλητή	Τομές φυσιολογικών ζώων	Τομές PTZ ζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.956 ± 0.112 , n = 15	0.913 ± 0.102 , n = 9	0.79712
% της αρχικής συχνότητας	237.338 ± 40.906 , n = 15	260.88 ± 65.953 , n = 9	0.75105
(δ) διαφραγματικές τομές			
Συγκρινόμενη μεταβλητή	Τομές φυσιολογικών ζώων	Τομές PTZ ζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.53 ± 0.073 Hz, n = 10	0.572 ± 0.033 Hz, n = 5	0.69797
% της αρχικής συχνότητας	248.708 ± 44.424 Hz, n = 10	221.114 ± 22.183 Hz, n = 5	0.68167

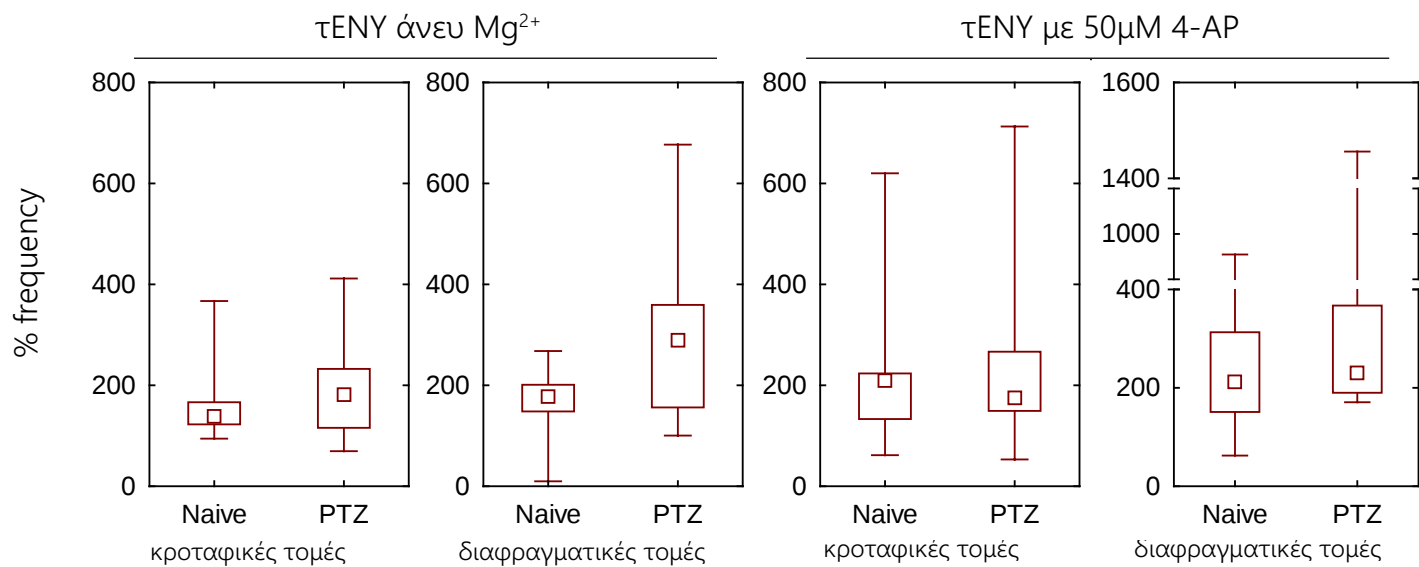
Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η αύξηση της συχνότητας που προκαλεί η εσερίνη, τείνει να εξομοιώσει τις συχνότητες εκφορτίσεων μεταξύ φυσιολογικών και PTZ πειραματοζώων, ειδικά για το μοντέλο με τΕΝΥ άνευ μαγνησίου, όπου υπήρχε και η αρχική διαφορά στην συχνότητα εκφορτίσεων (παρατήρηση προηγούμενου υπο-κεφαλαίου). Το εύρημα αυτό δείχνει ότι πιθανώς η βαρύτητα της διαθεσιμότητας της ακετυλοχολίνης στην διαμόρφωση της συχνότητας επιληπτοειδών εκφορτίσεων μεσοκρυστικού τύπου έχει αυξηθεί στα PTZ πειραματοζώα.

Αποτελέσματα

Συχνότητα εκφορτίσεων



Σχετική μεταβολή της συχνότητας



Γράφημα 11. Αποτύπωση του πλήρους συνόλου δεδομένων σε διαγράμματα ελαχίστου-25%-διαμέσου-75%-μεγίστου, για την διαφορά του αποτελέσματος της προσθήκης εσερίνης (10μM) στο διάλυμα διαβροχής -τENY άνευ μαγνησίου αριστερά, τENY με αμινοπυριδίνη δεξιά- μεταξύ τομών φυσιολογικών και PTZ πειραματοζώων. Παρουσία εσερίνης οι συχνότητες εκφορτίσεων των τομών φυσιολογικών πειραματοζώων είναι παρεμφερείς με αυτές των PTZ. Ενώ η % αύξηση των συχνοτήτων τείνει να είναι η ίδια, στα PTZ πειραματοζώα παρατηρείται σε όλες τις περιπτώσεις μια έκταση του εύρους της αύξησης της συχνότητας από την εσερίνη προς υψηλότερα ποσοστά.

Στην υποπερίπτωση των τομών που προστέθηκε 1μM ατροπίνη επί της εσερίνης (10μM) βρέθηκαν οριακές διαφορές μεταξύ τομών φυσιολογικών και PTZ πειραματοζώων στο μοντέλο με τENY άνευ μαγνησίου. Δηλαδή, η κρίση που προκλήθηκε αλληλεπιδρά με την μείωση της συχνότητας εκφορτίσεων που προκαλεί η ατροπίνη, αφού προστεθεί σε τENY χωρίς μαγνήσιο που περιέχει εσερίνη (2-way repeated measures ANOVA):

Αποτελέσματα

Πίνακας 13α: Συχνότητα εκφορτίσεων σε αρχικές συνθήκες, παρουσία εσερίνης, και παρουσία εσερίνης και ατροπίνης σε τομές φυσιολογικών και PTZ πειραματοζώων, σε τΕΝΥ άνευ μαγνησίου.

Τομές	Αρχική συχνότητα εκφορτίσεων τομών φυσιολογικών ζώων	Συχνότητα εκφορτίσεων τομών φυσιολογικών ζώων παρουσία εσερίνης	Συχνότητα εκφορτίσεων τομών φυσιολογικών ζώων παρουσία εσερίνης και ατροπίνης	Αρχική συχνότητα εκφορτίσεων τομών PTZ ζώων	Συχνότητα εκφορτίσεων τομών PTZ ζώων παρουσία εσερίνης	Συχνότητα εκφορτίσεων τομών PTZ ζώων παρουσία εσερίνης και ατροπίνης	Στατιστικό αποτέλεσμα (Repeated measures 2-way ANOVA p-value)
Κροταφικές	0.44 ± 0.074 Hz, n = 13	0.561 ± 0.098 Hz, n = 13	0.302 ± 0.066 Hz, n = 13	0.293 ± 0.085 Hz, n = 10	0.56 ± 0.112 Hz, n = 10	0.353 ± 0.075 Hz, n = 10	0.04608
Διαφραγματικές	0.246 ± 0.093 Hz, n = 5	0.163 ± 0.076 Hz, n = 5	0.083 ± 0.04 Hz, n = 5	0.148 ± 0.066 Hz, n = 10	0.362 ± 0.054 Hz, n = 10	0.178 ± 0.029 Hz, n = 10	0.04831

Πίνακας 13β: Συχνότητα εκφορτίσεων σε αρχικές συνθήκες, παρουσία εσερίνης, και παρουσία εσερίνης και ατροπίνης σε τομές φυσιολογικών και PTZ πειραματοζώων, σε τΕΝΥ με 50 μM 4-αμινοπυριδίνης.

Τομές	Αρχική συχνότητα εκφορτίσεων τομών φυσιολογικών ζώων	Συχνότητα εκφορτίσεων τομών φυσιολογικών ζώων παρουσία εσερίνης	Συχνότητα εκφορτίσεων τομών φυσιολογικών ζώων παρουσία εσερίνης και ατροπίνης	Αρχική συχνότητα εκφορτίσεων τομών PTZ ζώων	Συχνότητα εκφορτίσεων τομών PTZ ζώων παρουσία εσερίνης	Συχνότητα εκφορτίσεων τομών PTZ ζώων παρουσία εσερίνης και ατροπίνης	Στατιστικό αποτέλεσμα (Repeated measures 2-way ANOVA p-value)
Κροταφικές	0.419 ± 0.089 Hz, n = 8	0.905 ± 0.152 Hz, n = 8	0.511 ± 0.15 Hz, n = 8	0.494 ± 0.095 Hz, n = 7	0.889 ± 0.162 Hz, n = 7	0.543 ± 0.16 Hz, n = 7	0.88661
Διαφραγματικές	0.188 ± 0.025 Hz, n = 4	0.599 ± 0.123 Hz, n = 4	0.207 ± 0.039 Hz, n = 4	0.283 ± 0.025 Hz, n = 4	0.595 ± 0.123 Hz, n = 4	0.254 ± 0.039 Hz, n = 4	0.81104

Όπως προκύπτει από το post-hoc Scheffé test η διαφορά στις κροταφικές τομές σε τΕΝΥ άνευ μαγνησίου (13α) οφείλεται στον συνδυασμό:

- Μεγαλύτερης μείωσης της συχνότητας της ατροπίνης ($p < 0.01$) σε σχέση με την προηγούμενη αύξηση της συχνότητας από την εσερίνη ($p > 0.4$) στις τομές των φυσιολογικών ζώων, και
- Μεγαλύτερης αύξησης της συχνότητας της εσερίνης από την αρχική συχνότητα ($p < 0.01$) σε σχέση με την ακολουθούσα μείωση της συχνότητας από την ατροπίνη ($p > 0.05$) στις τομές των φυσιολογικών ζώων

Η διαφορά στις διαφραγματικές τομές σε τΕΝΥ άνευ μαγνησίου δεν δικαιολογείται από το Scheffé test ($p > 0.10$ για όλες τις συγκρίσεις), επομένως πιθανώς πρόκειται για τυχαία απόκλιση.

Στο μοντέλο της 4-αμινοπυριδίνης (13β), η αύξηση της συχνότητας από την εσερίνη και η ακόλουθη μείωση από την ατροπίνη δείχνουν όμοιες μεταξύ φυσιολογικών και PTZ πειραματοζώων.

Αποτελέσματα

11. Σύγκριση τομών φυσιολογικών και PTZ ζώων παρουσία ατροπίνης (1μM) ως προς τη συχνότητα εκφορτίσεων

Παρουσία ατροπίνης (1μM) οι τομές φυσιολογικών και PTZ ζώων δεν διαφέρουν σημαντικά ούτε στην συχνότητα εκφορτίσεων ούτε στην σχετική μεταβολή της από την αρχική συχνότητα, όπως φαίνεται στους ακόλουθους πίνακες, με εξαίρεση την σχετική μείωση της συχνότητας στις διαφραγματικές τομές στο μοντέλο της αμινοπυριδίνης, όπου οι τομές των PTZ πειραματοζώων παρουσίασαν μεγαλύτερη μείωση σε σύγκριση με τις τομές φυσιολογικών ζώων (πίνακας 14δ).

Πίνακας 14α-β: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική μεταβολή της συχνότητας παρουσία ατροπίνης σε τομές φυσιολογικών και PTZ πειραματοζώων, σε τΕΝΥ άνευ μαγνησίου.

(α) κροταφικές τομές			
Συγκρινόμενη μεταβλητή	Τομές φυσιολογικών ζώων	Τομές PTZ ζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.448 ± 0.048 , n = 19	0.407 ± 0.075 , n = 7	0.65874
% της αρχικής συχνότητας	80.128 ± 5.936 , n = 19	91.851 ± 6.833 , n = 7	0.28339
(β) διαφραγματικές τομές			
Συγκρινόμενη μεταβλητή	Τομές φυσιολογικών ζώων	Τομές PTZ ζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.159 ± 0.065 Hz, n = 6	0.143 ± 0.083 Hz, n = 4	0.87608
% της αρχικής συχνότητας	86.152 ± 12.778 Hz, n = 6	75.021 ± 9.028 Hz, n = 4	0.54236

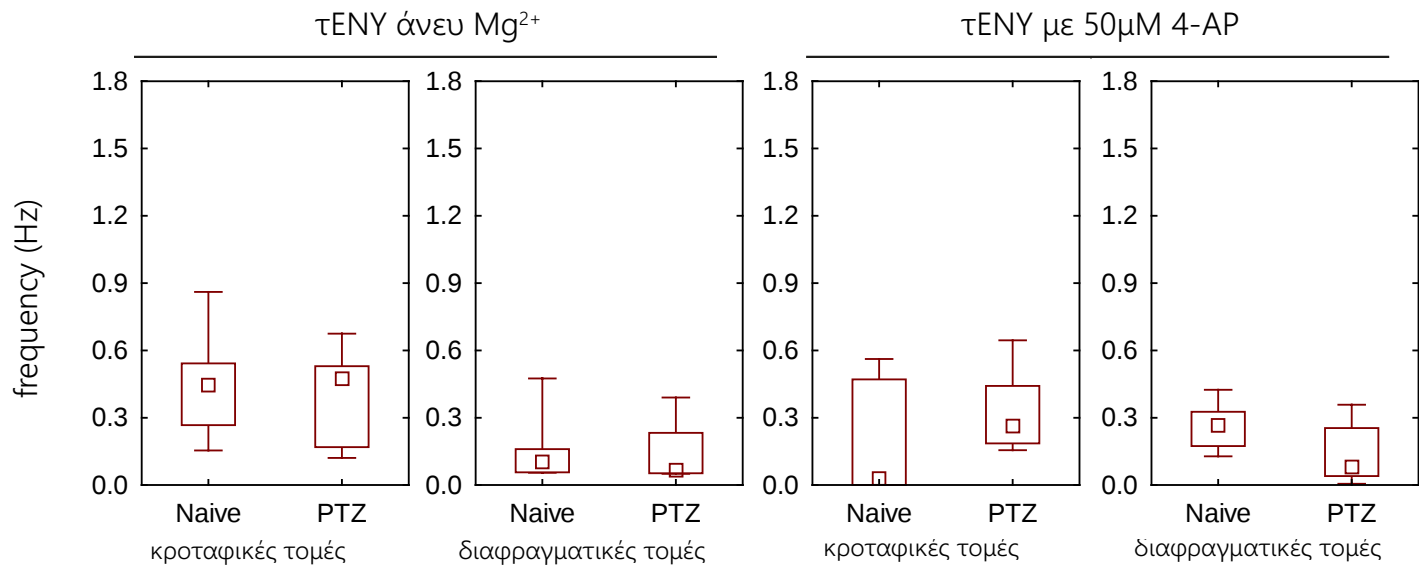
Πίνακας 14γ-δ: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική μεταβολή της συχνότητας παρουσία ατροπίνης σε τομές φυσιολογικών και PTZ πειραματοζώων, σε τΕΝΥ με 50 μM 4-αμινοπυριδίνης.

(γ) κροταφικές τομές			
Συγκρινόμενη μεταβλητή	Τομές φυσιολογικών ζώων	Τομές PTZ ζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.213 ± 0.125 , n = 5	0.339 ± 0.091 , n = 5	0.43929
% της αρχικής συχνότητας	34.683 ± 16.273 , n = 5	66.635 ± 14.28 , n = 5	0.17822
(δ) διαφραγματικές τομές			
Συγκρινόμενη μεταβλητή	Τομές φυσιολογικών ζώων	Τομές PTZ ζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.264 ± 0.044 , n = 6	0.148 ± 0.068 , n = 5	0.16988
% της αρχικής συχνότητας	91.225 ± 2.143 , n = 6	49.396 ± 15.146 , n = 5	0.01461

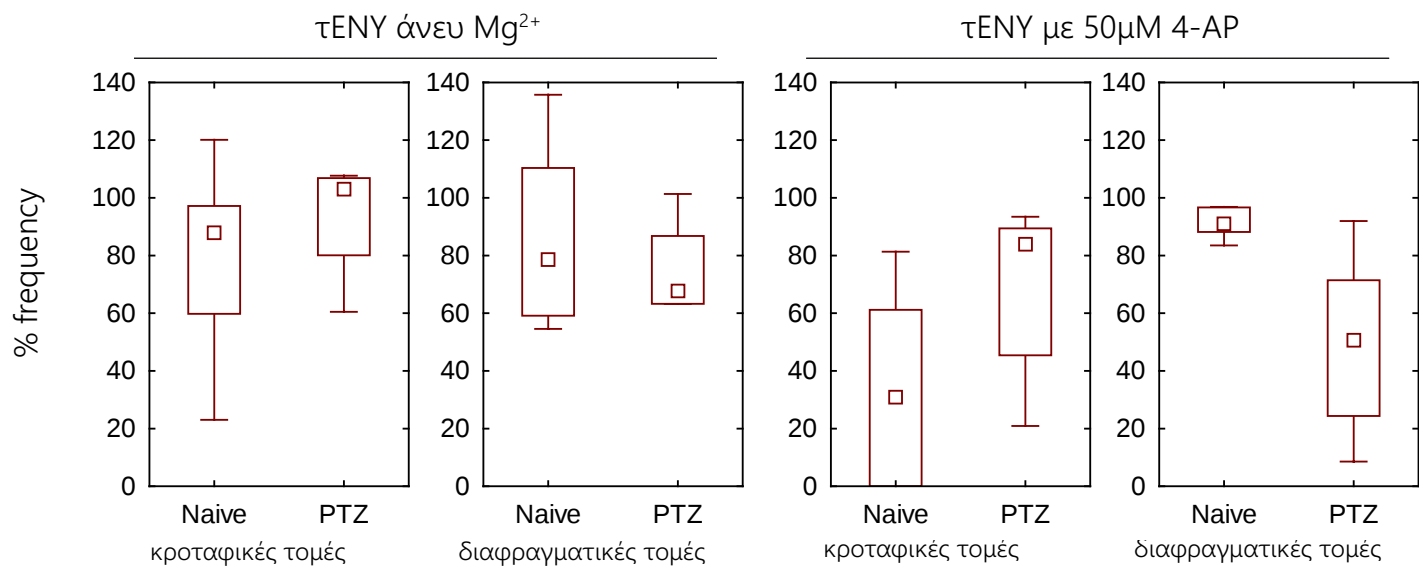
Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι η διαμόρφωση της συχνότητας εκφορτίσεων στο μοντέλο με τΕΝΥ άνευ μαγνησίου εξαρτάται σε μικρό βαθμό από την ενδογενή ακετυλοχολίνη. Αντιθέτως, στο μοντέλο της 4-αμινοπυριδίνης, η εξάρτηση της συχνότητας εκφορτίσεων από την ενδογενή ακετυλοχολίνη φαίνεται να είναι μεγαλύτερη, πιθανώς λόγω αυξημένης έκλυσής της. Και στα δύο μοντέλα, η επιληπτική κρίση που προκλήθηκε στα PTZ πειραματοζώα δείχνει να τείνει να εξασθενήσει την εξάρτηση της συχνότητας επιληπτοειδών εκφορτίσεων από την ενδογενή ακετυλοχολίνη στον κροταφικό ιππόκαμπο και να την ενισχύσει στον διαφραγματικό. Η διαφορά είναι ελαφρώς εμφανέστερη στο μοντέλο της αμινοπυριδίνης (όπου και αναμένεται η έκλυση ακετυλοχολίνης να είναι μεγαλύτερη).

Αποτελέσματα

Συχνότητα εκφορτίσεων



Σχετική μεταβολή της συχνότητας



Γράφημα 12. Αποτύπωση του πλήρους συνόλου δεδομένων σε διαγράμματα ελαχίστου-25%-διαμέσου-75%-μεγίστου, για την διαφορά του αποτελέσματος της προσθήκης ατροπίνης (1μM) στο διάλυμα διαβροχής -τENY άνευ μαγνησίου αριστερά, τENY με αμινοπυριδίνη δεξιά- μεταξύ τομών φυσιολογικών και PTZ πειραματοζώων. Παρουσία ατροπίνης οι συχνότητες εκφορτίσεων των τομών φυσιολογικών και PTZ πειραματοζώων είναι παρεμφερείς στο τENY άνευ μαγνησίου. Ωστόσο, η διαφορά της σχετικής μείωσης της συχνότητας δείχνει να μετατοπίζεται από το κροταφικό άκρο του ιπποκάμπου στο διαφραγματικό στα PTZ πειραματοζώα έναντι των φυσιολογικών. Η διαφορά είναι εμφανέστερη στο τENY με αμινοπυριδίνη και πιθανώς συμπαρασύρει και τις τελικές συχνότητες στην διαμόρφωση του ίδιου προτύπου.

Αποτελέσματα

12. Σύγκριση τομών φυσιολογικών και PTZ ζώων παρουσία καρβαχόλης (1μM) ως προς τη συχνότητα εκφορτίσεων

Παρουσία καρβαχόλης (1μM) η συχνότητα εκφορτίσεων δεν διαφέρει σημαντικά μεταξύ τομών φυσιολογικών και PTZ πειραματοζώων και η σχετική συχνότητα εκφορτίσεων (σε σύγκριση με την αρχική, προ καρβαχόλης) επίσης δεν είναι σημαντικά διαφορετική μεταξύ τομών φυσιολογικών και PTZ ζώων, όπως παρουσιάζεται στους ακόλουθους πίνακες:

Πίνακας 15α-β: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική μεταβολή της συχνότητας παρουσία ατροπίνης σε τομές φυσιολογικών και PTZ πειραματοζώων, σε τΕΝΥ άνευ μαγνησίου.

(α) κροταφικές τομές			
Συγκρινόμενη μεταβλητή	Τομές φυσιολογικών ζώων	Τομές PTZ ζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	1.372 ± 0.34 , n = 7	1.071 ± 0.275 , n = 6	0.51519
% της αρχικής συχνότητας	301.816 ± 97.646 , n = 7	244.034 ± 59.404 , n = 6	0.63782
(β) διαφραγματικές τομές			
Συγκρινόμενη μεταβλητή	Τομές φυσιολογικών ζώων	Τομές PTZ ζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.551 ± 0.09 , n = 6	0.274 ± 0.069 , n = 4	0.05756
% της αρχικής συχνότητας	442.723 ± 145.285 , n = 6	221.306 ± 21.519 , n = 4	0.25940

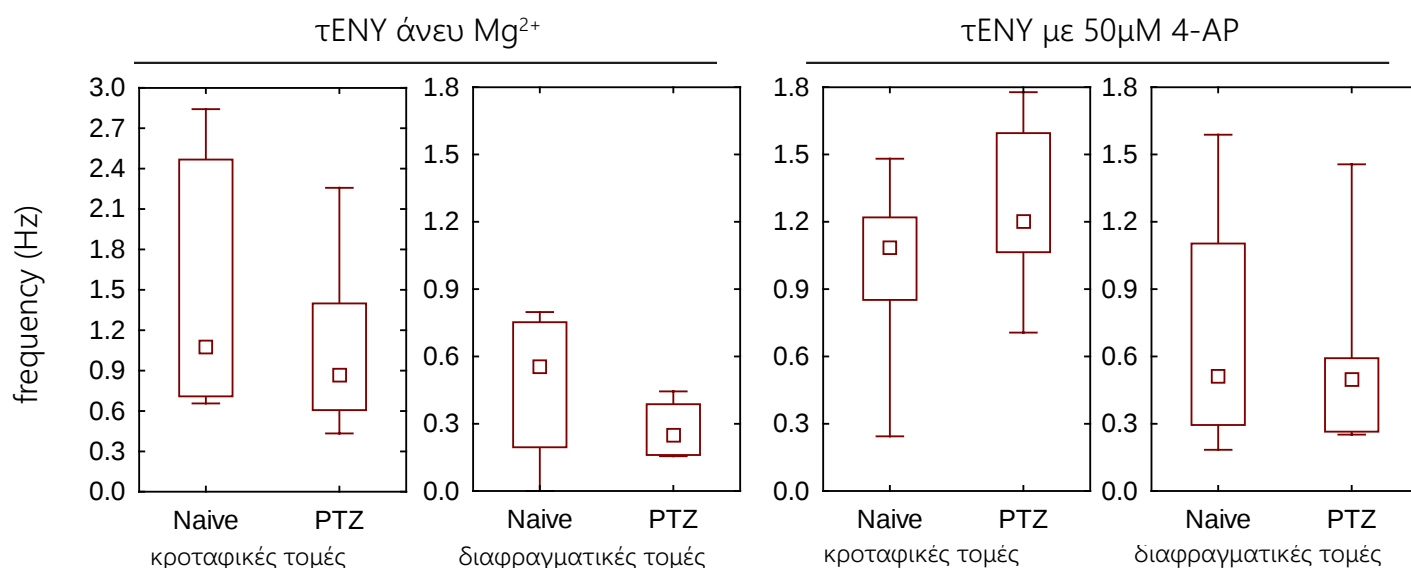
Πίνακας 15γ-δ: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική μεταβολή της συχνότητας παρουσία καρβαχόλης σε τομές φυσιολογικών και PTZ πειραματοζώων, σε τΕΝΥ με 50 μM 4-αμινοπυριδίνης.

(γ) κροταφικές τομές			
Συγκρινόμενη μεταβλητή	Τομές φυσιολογικών ζώων	Τομές PTZ ζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	1.005 ± 0.133 , n = 8	1.258 ± 0.157 , n = 6	0.24069
% της αρχικής συχνότητας	256.513 ± 35.987 , n = 8	258.011 ± 32.878 , n = 6	0.97682
(δ) διαφραγματικές τομές			
Συγκρινόμενη μεταβλητή	Τομές φυσιολογικών ζώων	Τομές PTZ ζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.403 ± 0.125 , n = 3	0.593 ± 0.181 , n = 6	0.51486
% της αρχικής συχνότητας	196.629 ± 70.575 , n = 3	353.98 ± 136.225 , n = 6	0.46721

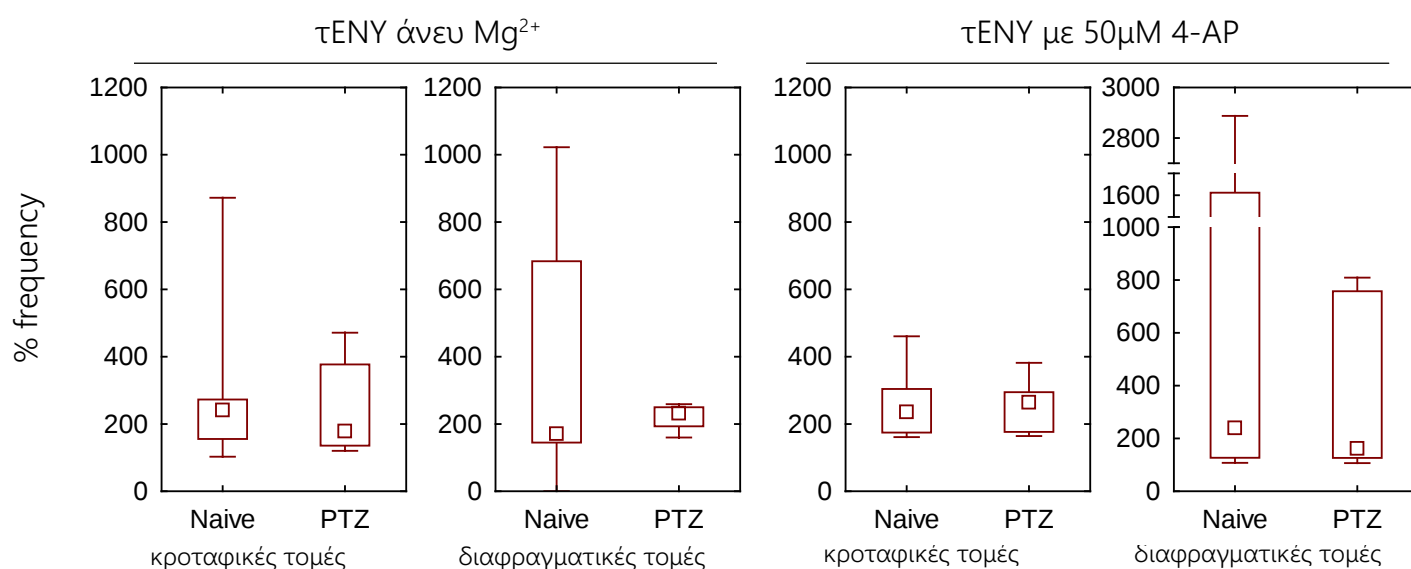
Από τα παραπάνω φαίνεται ότι με εντονότερη, εξωγενή χολινεργική διέγερση από αυτήν που επιτυγχάνεται με την ενδογενή ακετυλοχολίνη (υπο-κεφάλαιο με αποτελέσματα εσερίνης) οι τομές και των φυσιολογικών και των PTZ πειραματοζώων συμπεριφέρονται με παρεμφερή τρόπο ως προς την παραγωγή επιληπτοειδών εκφορτίσεων μεσοκρισικού τύπου.

Αποτελέσματα

Συχνότητα εκφορτίσεων



Σχετική μεταβολή της συχνότητας



Γράφημα 13. Αποτύπωση του πλήρους συνόλου δεδομένων σε διαγράμματα ελαχίστου-25%-διαμέσου-75%-μεγίστου, για την διαφορά του αποτελέσματος της προσθήκης καρβαχόλης (1μM) στο διάλυμα διαβροχής -τENY άνευ μαγνησίου αριστερά, τENY με αμινοπυριδίνη δεξιά- μεταξύ τομών φυσιολογικών και PTZ πειραματοζώων. Παρουσία καρβαχόλης τόσο οι συχνότητες εκφορτίσεων όσο και η % αύξηση των συχνοτήτων τείνουν να είναι παρεμφερείς. Οι διακυμάνσεις, αν και δείχνουν να διαφέρουν ανά ομάδα τομών δεν φαίνεται να εγκαθιστούν κάποιο συγκεκριμένο πρότυπο.

Αποτελέσματα

13. Σύγκριση μοντέλου τ ENY άνευ Mg^{2+} και αμινοπυριδίνης (50 μ M) ως προς τη συχνότητα εκφορτίσεων

Η αρχική συχνότητα εκφορτίσεων στο μοντέλο της αμινοπυριδίνης τείνει να είναι μεγαλύτερη της αρχικής συχνότητας στο ελεύθερο Mg^{2+} : με εξαίρεση τις κροταφικές τομές των φυσιολογικών πειραματοζώων. Η διαφορά μεταξύ των δύο μοντέλων είναι μεγαλύτερη στις τομές των PTZ πειραματοζώων.

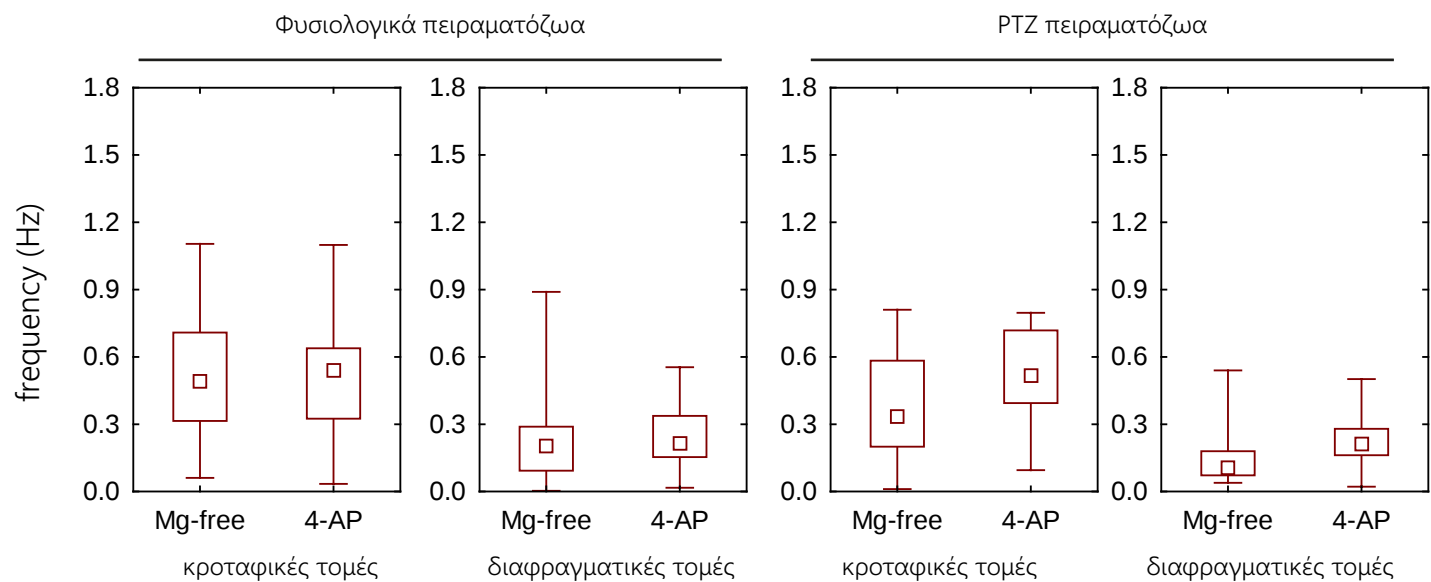
Πίνακας 15α: Συχνότητα εκφορτίσεων σε τομές φυσιολογικών πειραματοζώων, σε τ ENY άνευ μαγνησίου και σε τ ENY με 50 μ M 4-αμινοπυριδίνης.

Τομές	Συχνότητα εκφορτίσεων σε τ ENY άνευ Mg^{2+}	Συχνότητα εκφορτίσεων σε τ ENY με 50 μ M 4-AP	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Κροταφικές	0.52 ± 0.034 , n = 64	0.488 ± 0.044 , n = 33	0.56605
Διαφραγματικές	0.234 ± 0.031 , n = 33	0.272 ± 0.027 , n = 23	0.38576

Πίνακας 15β: Συχνότητα εκφορτίσεων σε τομές PTZ πειραματοζώων, σε τ ENY άνευ μαγνησίου και σε τ ENY με 50 μ M 4-αμινοπυριδίνης.

Τομές	Συχνότητα εκφορτίσεων σε τ ENY άνευ Mg^{2+}	Συχνότητα εκφορτίσεων σε τ ENY με 50 μ M 4-AP	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Κροταφικές	0.372 ± 0.037 , n = 34	0.528 ± 0.043 , n = 22	0.00911
Διαφραγματικές	0.15 ± 0.025 , n = 24	0.239 ± 0.024 , n = 18	0.01624

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι στα PTZ πειραματοζώα, η συνολική αύξηση της διεγερσιμότητας των μεμβρανών με το μοντέλο της 4-αμινοπυριδίνης παράγει μεγαλύτερης συχνότητας εκφορτίσεις σε σύγκριση με την παράταση του ορίου ανίχνευσης/άθροισης εκφορτίσεων που επιτυγχάνεται με την ενεργοποίηση των NMDA υποδοχέων από το ενδογενές γλουταμικό στο τ ENY άνευ μαγνησίου. Η διαφορά αυτή δεν παρατηρείται στις τομές από φυσιολογικά πειραματοζώα, γεγονός που ενδεχομένως υποδεικνύει μια αλλαγή στον μηχανισμό ελέγχου της συχνότητας επιληπτοειδών εκφορτίσεων στα PTZ πειραματοζώα.



Γράφημα 14. Αποτύπωση του πλήρους συνόλου δεδομένων σε διαγράμματα ελαχίστου-25%-διαμέσου-75%-μεγίστου, για την σύγκριση των συχνότητων επιληπτοειδών εκφορτίσεων μεσοκρυσικού τύπου στο τ ENY άνευ μαγνησίου και στο τ ENY με αμινοπυριδίνη μεταξύ τομών φυσιολογικών και PTZ πειραματοζώων. Οι συχνότητες εκφορτίσεων φαίνεται να είναι ελαφρώς υψηλότερες στο μοντέλο της αμινοπυριδίνης για τις τομές των PTZ πειραματοζώων.

Αποτελέσματα

14. Σύγκριση του μοντέλου με τΕΝΥ άνευ μαγνησίου κα του μοντέλου της αμινοπυριδίνης παρουσία εσερίνης (10μM) ως προς τη συχνότητα εκφορτίσεων

Παρουσία εσερίνης οι συχνότητες εκφορτίσεων στο τΕΝΥ άνευ Mg^{2+} είναι μικρότερες των συχνοτήτων εκφορτίσεων στο μοντέλο της αμινοπυριδίνης, σε κροταφικές και διαφραγματικές τομές, και των φυσιολογικών και των PTZ πειραματοζώων. Παρ'ότι στις σχετικές αυξήσεις διακρίνεται η ίδια τάση (μεγαλύτερη συχνότητα με εσερίνη, ως προς την αρχική συχνότητα) –με εξαίρεση το διαφραγματικό άκρο των PTZ– οι διαφορές δεν είναι στατιστικά επαρκώς μεγάλες.

Πίνακας 16α-β: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική μεταβολή της συχνότητας παρουσία εσερίνης σε τομές φυσιολογικών πειραματοζώων, σε τΕΝΥ άνευ μαγνησίου και σε τΕΝΥ με 50 μM 4-αμινοπυριδίνης.

(α) κροταφικές τομές			
Συγκρινόμενη μεταβλητή	εκφορτίσεις σε τΕΝΥ άνευ Mg^{2+}	εκφορτίσεις σε τΕΝΥ με 50μM 4-AP	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.635 ± 0.071 , n = 25	0.956 ± 0.112 , n = 15	0.01516
% της αρχικής συχνότητας	167.057 ± 15.869 , n = 25	237.338 ± 40.906 , n = 15	0.06901
(β) διαφραγματικές τομές			
Συγκρινόμενη μεταβλητή	εκφορτίσεις σε τΕΝΥ άνευ Mg^{2+}	εκφορτίσεις σε τΕΝΥ με 50μM 4-AP	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.345 ± 0.06 , n = 12	0.53 ± 0.073 , n = 10	0.06128
% της αρχικής συχνότητας	174.03 ± 19.05 , n = 12	248.708 ± 44.424 , n = 10	0.11613

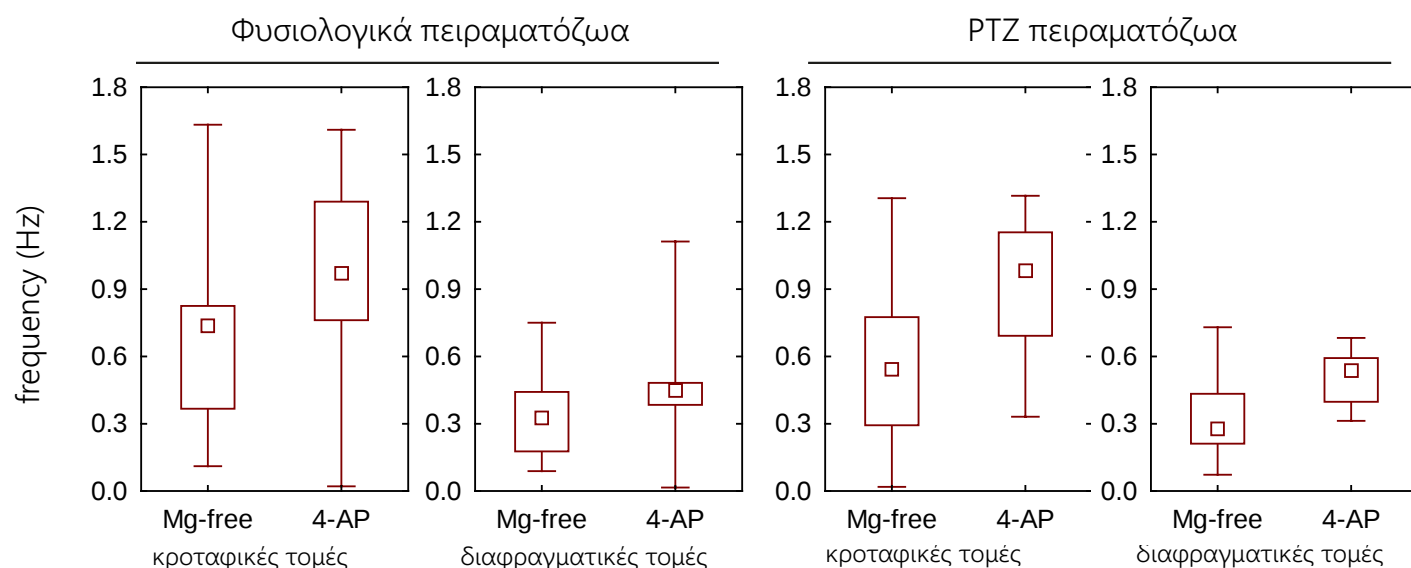
Πίνακας 16γ-δ: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική μεταβολή της συχνότητας παρουσία εσερίνης σε τομές PTZ πειραματοζώων, σε τΕΝΥ άνευ μαγνησίου και σε τΕΝΥ με 50 μM 4-αμινοπυριδίνης.

(γ) κροταφικές τομές			
Συγκρινόμενη μεταβλητή	εκφορτίσεις σε τΕΝΥ άνευ Mg^{2+}	εκφορτίσεις σε τΕΝΥ με 50μM 4-AP	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.56 ± 0.076 , n = 20	0.913 ± 0.102 , n = 9	0.01278
% της αρχικής συχνότητας	189.859 ± 20.529 , n = 20	260.88 ± 65.953 , n = 9	0.19259
(δ) διαφραγματικές τομές			
Συγκρινόμενη μεταβλητή	εκφορτίσεις σε τΕΝΥ άνευ Mg^{2+}	εκφορτίσεις σε τΕΝΥ με 50μM 4-AP	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.318 ± 0.047 , n = 15	0.572 ± 0.033 , n = 5	0.00751
% της αρχικής συχνότητας	298.208 ± 45.592 , n = 15	221.114 ± 22.183 , n = 5	0.35567

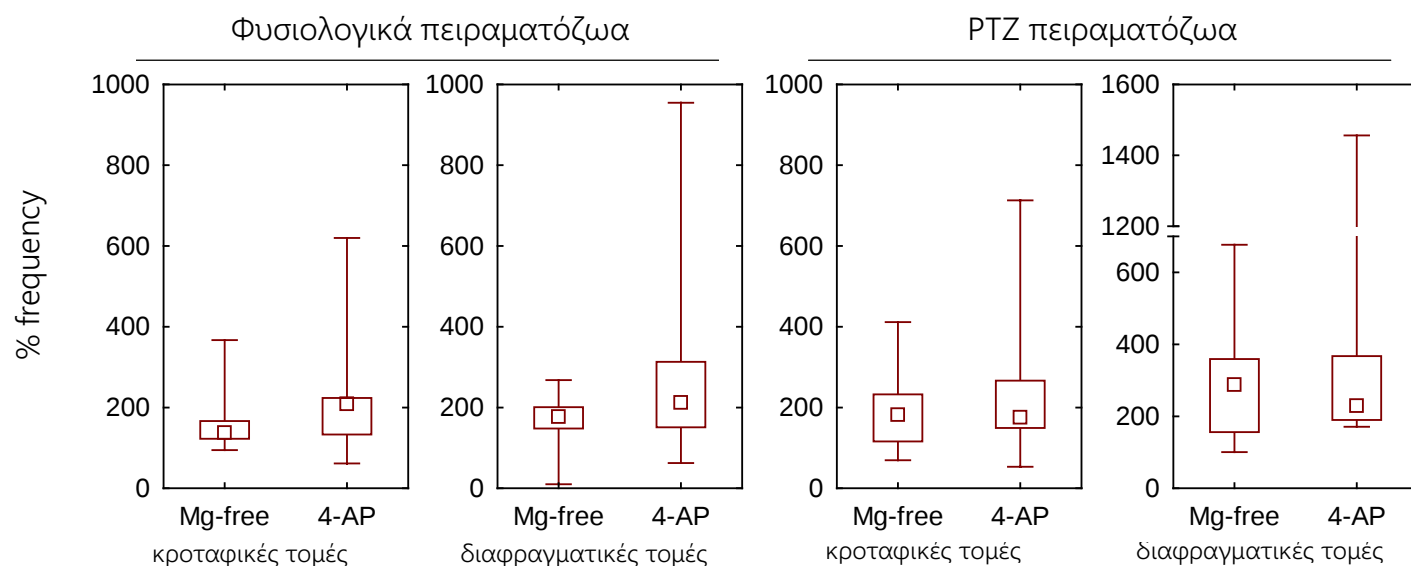
Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι αν και η αύξηση της διαθέσιμης ενδογενούς ακετυλοχολίνης προκαλεί παρεμφερείς αυξήσεις στην συχνότητα εκφορτίσεων και στα δύο μοντέλα (τΕΝΥ άνευ μαγνησίου, τΕΝΥ με 50 μM 4-αμινοπυριδίνη) στο μοντέλο της αμινοπυριδίνης οι αυξήσεις τείνουν να είναι μεγαλύτερες, οδηγώντας σε υψηλότερες τελικές συχνότητες εκφορτίσεων. Μοναδική εξαίρεση, στην οποία η αύξηση της συχνότητας από την εσερίνη είναι μεγαλύτερη στο μοντέλο του τΕΝΥ άνευ μαγνησίου, είναι οι διαφραγματικές τομές των PTZ πειραματοζώων (16δ), αλλά λόγω της διαφοράς στις αρχικές συχνότητες στις τομές των PTZ πειραματοζώων (προηγούμενο υπο-κεφάλαιο) η προαναφερθείσα διαφορά τελικών συχνοτήτων (μετά την προσθήκη εσερίνης) διατηρείται και σε αυτήν την περίπτωση.

Αποτελέσματα

Συχνότητα εκφορτίσεων



Σχετική μεταβολή της συχνότητας



Γράφημα 15. Αποτύπωση του πλήρους συνόλου δεδομένων σε διαγράμματα ελαχίστου-25%-διαμέσου-75%-μεγίστου, για την διαφορά του αποτελέσματος της προσθήκης εσερίνης (10μM) στο διάλυμα διαβροχής μεταξύ δύο διαλυμάτων διαβροχής -τΕΝΥ άνευ μαγνησίου και τΕΝΥ με αμινοπυριδίνη. Παρουσία εσερίνης οι συχνότητες που προκύπτουν είναι υψηλότερες για το μοντέλο της αμινοπυριδίνης, ενώ οι σχετικές αυξήσεις δεν παρουσιάζουν αξιόλογη διαφορά πέραν της μεγαλύτερης έκτασης των αυξήσεων στο τΕΝΥ με αμινοπυριδίνη.

Αποτελέσματα

Στην υποπερίπτωση των τομών που προστέθηκε 1μM ατροπίνη επί της εσερίνης (10μM) βρέθηκαν διαφορές μεταξύ του μοντέλου με τΕΝΥ άνευ μαγνησίου και του μοντέλου της αμινοπυριδίνης μόνο στα φυσιολογικά πειραματόζωα (πίνακας 17α), και στις κροταφικές και στις διαφραγματικές τομές (2-way repeated measures ANOVA), λόγω της μεγαλύτερης αύξησης της συχνότητας που προκαλεί η εσερίνη στο μοντέλο της αμινοπυριδίνης, όπως φαίνεται στους ακόλουθους πίνακες:

Πίνακας 17α: : Συχνότητα εκφορτίσεων σε αρχικές συνθήκες, παρουσία εσερίνης, και παρουσία εσερίνης και ατροπίνης σε τομές φυσιολογικών πειραματοζώων, σε τΕΝΥ άνευ μαγνησίου και σε τΕΝΥ με 50 μM 4-αμινοπυριδίνης.

Τομές	Αρχική συ- χνότητα εκ- φορτίσεων στο ελεύθε- ρο-Mg ²⁺	Συχνότη- τα εκφορ- τίσεων στο ελεύ- θερο-Mg ²⁺ παρουσία εσερίνης	Συχνό- τητα εκφορτί- σεων στο ελεύθε- ρο-Mg ²⁺ πα- ρουσία εσερίνης και ατρο- πίνης	Αρχική συχνότητα εκφορτί- σεων στο τΕΝΥ με 50μM 4-AP	Συχνότη- τα εκφορ- τίσεων στο τΕΝΥ με 50μM 4-AP παρουσία εσερίνης	Συχνότητα εκφορτί- σεων στο τΕΝΥ με 50μM 4-AP παρουσία εσερίνης και ατροπί- νης	Στατιστικό αποτέλεσμα (Repeated measures 2-way ANOVA p-value)
Κροταφικές	0.44 ± 0.086 Hz, n = 13	0.561 ± 0.116 Hz, n = 13	0.302 ± 0.094 Hz, n = 13	0.419 ± 0.11 Hz, n = 8	0.905 ± 0.148 Hz, n = 8	0.511 ± 0.12 Hz, n = 8	0.00966
Διαφραγ- ματικές	0.246 ± 0.122 Hz, n = 5	0.163 ± 0.102 Hz, n = 5	0.083 ± 0.028 Hz, n = 5	0.188 ± 0.137 Hz, n = 4	0.599 ± 0.114 Hz, n = 4	0.207 ± 0.031 Hz, n = 4	0.08304

Πίνακας 17β: : Συχνότητα εκφορτίσεων σε αρχικές συνθήκες, παρουσία εσερίνης, και παρουσία εσερίνης και ατροπίνης σε το-
μές PTZ πειραματοζώων, σε τΕΝΥ άνευ μαγνησίου και σε τΕΝΥ με 50 μM 4-αμινοπυριδίνης.

Τομές	Αρχική συ- χνότητα εκ- φορτίσεων στο ελεύθε- ρο-Mg ²⁺	Συχνό- τητα εκφορτί- σεων στο ελεύθε- ρο-Mg ²⁺ παρουσία εσερίνης	Συχνό- τητα εκφορτί- σεων στο ελεύθε- ρο-Mg ²⁺ παρουσία εσερίνης και ατρο- πίνης	Αρχική συχνότη- τα εκφορ- τίσεων στο τΕΝΥ με 50μM 4-AP	Συχνότη- τα εκφορ- τίσεων στο τΕΝΥ με 50μM 4-AP παρουσία εσερίνης	Συχνό- τητα εκφορτί- σεων στο τΕΝΥ με 50μM 4-AP πα- ρουσία εσερίνης και ατρο- πίνης	Στατιστικό αποτέλεσμα (Repeated measures 2-way ANOVA p-value)
Κροταφικές	0.293 ± 0.057 Hz, n = 10	0.56 ± 0.106 Hz, n = 10	0.353 ± 0.094 Hz, n = 10	0.494 ± 0.068 Hz, n = 7	0.889 ± 0.127 Hz, n = 7	0.543 ± 0.113 Hz, n = 7	0.55221
Διαφραγ- ματικές	0.148 ± 0.021 Hz, n = 10	0.362 ± 0.056 Hz, n = 10	0.178 ± 0.031 Hz, n = 10	0.283 ± 0.033 Hz, n = 4	0.595 ± 0.088 Hz, n = 4	0.254 ± 0.049 Hz, n = 4	0.13652

Όπως προκύπτει από το post-hoc Scheffe test για τις τομές του κροταφικού ιπποκάμπου, στο μοντέλο της αμινοπυριδίνης, τόσο η αύξηση (p<0.001) όσο και η μείωση (p<0.01) της συχνότητας που προκαλούνται διαδοχικά από την εσερίνη (10μM) και την ατροπίνη (1μM) είναι στατιστικά σημαντικές, σε αντίθεση με το μοντέλο με τΕΝΥ χωρίς μαγνήσιο, όπου πιο εμφανής και στατιστικά σημαντική είναι η μείωση της συχνότητας που προκαλεί η ατροπίνη (στο 2^ο βήμα, μετά την εσερίνη).

Αποτελέσματα

15. Σύγκριση του μοντέλου με τΕΝΥ άνευ μαγνησίου κα του μοντέλου της αμινοπυριδίνης παρουσία ατροπίνης (1μΜ) ως προς τη συχνότητα εκφορτίσεων

Παρουσία ατροπίνης (1μΜ) οι συχνότητες εκφορτίσεων και οι σχετικές μεταβολές μεταξύ του μοντέλου με τΕΝΥ άνευ Mg^{2+} και του μοντέλου της αμινοπυριδίνης δεν διαφέρουν σημαντικά, με εξαίρεση την διαφορά στις κροταφικές τομές των φυσιολογικών πειραματοζώων, όπου η ατροπίνη προκαλεί μεγαλύτερη σχετική μείωση της συχνότητας αλλά και χαμηλότερες τελικές συχνότητες στο μοντέλο της αμινοπυριδίνης (πίνακας 18α). Παρ'όλα αυτά, η ατροπίνη τείνει να προκαλεί μεγαλύτερες μειώσεις (18α,γ,δ) στην συχνότητα των εκφορτίσεων που προκαλεί η 4-αμινοπυριδίνη σε σύγκριση με το τΕΝΥ άνευ Mg^{2+} με μόνη εξαίρεση (παρεμφερή μείωση της συχνότητας) στις διαφραγματικές τομές των φυσιολογικών πειραματοζώων (πίνακας 18β).

Πίνακας 18α-β : Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική μεταβολή της συχνότητας παρουσία ατροπίνης σε τομές φυσιολογικών πειραματοζώων, σε τΕΝΥ άνευ μαγνησίου και σε τΕΝΥ με 50 μΜ 4-αμινοπυριδίνης.

(α) κροταφικές τομές			
Συγκρινόμενη μεταβλητή	εκφορτίσεις σε τΕΝΥ άνευ Mg^{2+}	εκφορτίσεις σε τΕΝΥ με 50μΜ 4-AP	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.448 ± 0.048 , n = 19	0.213 ± 0.125 , n = 5	0.04786
% της αρχικής συχνότητας	80.128 ± 5.936 , n = 19	34.683 ± 16.273 , n = 5	0.00394
(β) διαφραγματικές τομές			
Συγκρινόμενη μεταβλητή	εκφορτίσεις σε τΕΝΥ άνευ Mg^{2+}	εκφορτίσεις σε τΕΝΥ με 50μΜ 4-AP	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.159 ± 0.065 , n = 6	0.264 ± 0.044 , n = 6	0.21175
% της αρχικής συχνότητας	86.152 ± 12.778 , n = 6	91.225 ± 2.143 , n = 6	0.70360

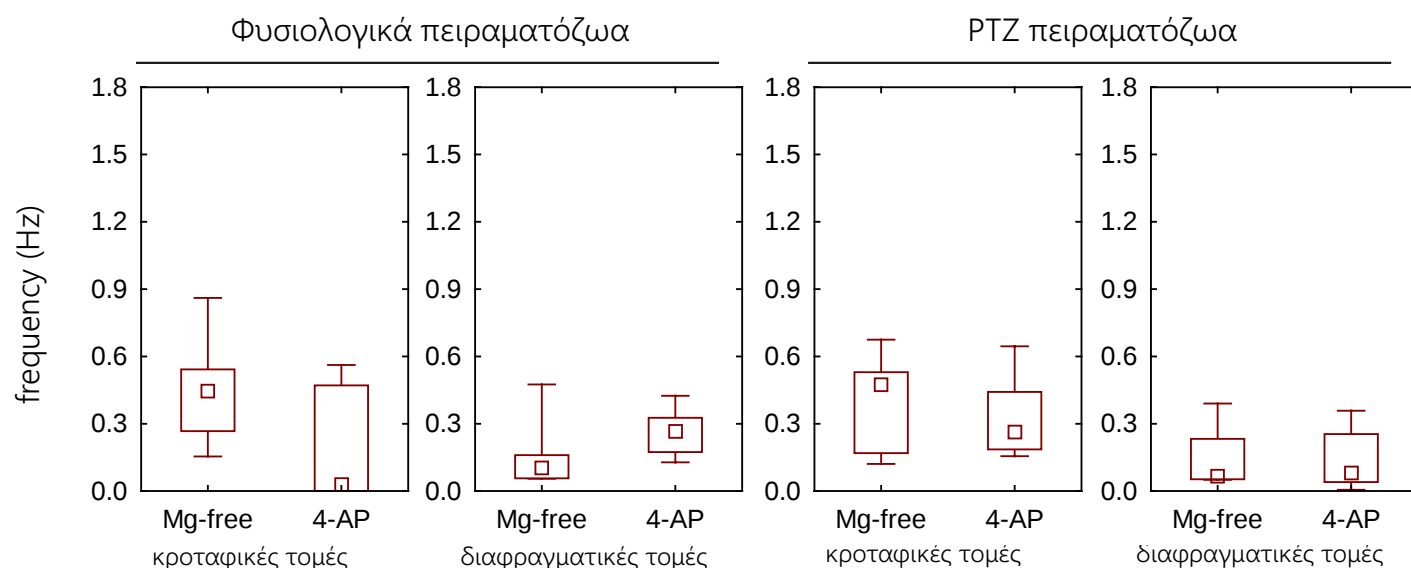
Πίνακας 18γ-δ:: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική μεταβολή της συχνότητας παρουσία ατροπίνης σε τομές PTZ πειραματοζώων, σε τΕΝΥ άνευ μαγνησίου και σε τΕΝΥ με 50 μΜ 4-αμινοπυριδίνης.

(γ) κροταφικές τομές			
Συγκρινόμενη μεταβλητή	εκφορτίσεις σε τΕΝΥ άνευ Mg^{2+}	εκφορτίσεις σε τΕΝΥ με 50μΜ 4-AP	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.407 ± 0.075 , n = 7	0.339 ± 0.091 , n = 5	0.57225
% της αρχικής συχνότητας	91.851 ± 6.833 , n = 7	66.635 ± 14.28 , n = 5	0.11025
(δ) διαφραγματικές τομές			
Συγκρινόμενη μεταβλητή	εκφορτίσεις σε τΕΝΥ άνευ Mg^{2+}	εκφορτίσεις σε τΕΝΥ με 50μΜ 4-AP	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.143 ± 0.083 , n = 4	0.148 ± 0.068 , n = 5	0.96127
% της αρχικής συχνότητας	75.021 ± 9.028 , n = 4	49.396 ± 15.146 , n = 5	0.21763

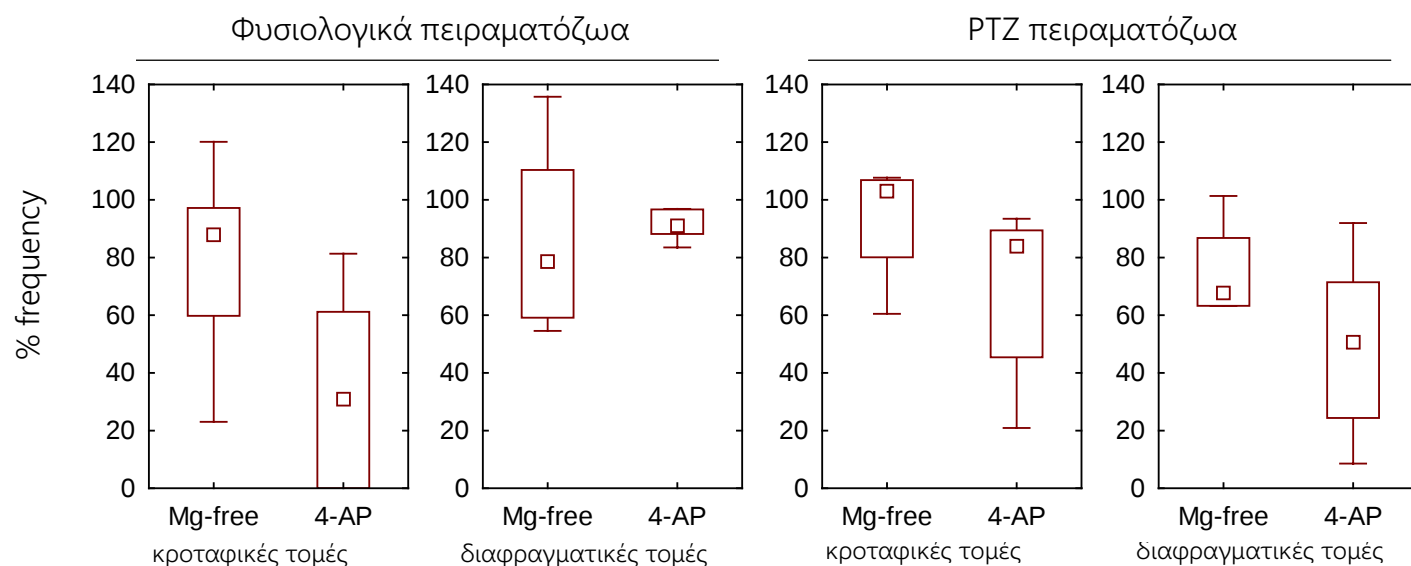
Τα παραπάνω αποτελέσματα με εξαίρεση τον διαφραγματικό ιππόκαμπο φυσιολογικών πειραματοζώων, τείνουν να δείξουν μεγαλύτερη συμμετοχή της ενεργοποίησης μουςκαρινικών υποδοχέων από την ενδογενή ακετυλοχολίνη, χωρίς περαιτέρω αύξησή της, στο μοντέλο της αμινοπυριδίνης, γεγονός που πιθανώς δικαιολογείται από την συνολική αύξηση της διεγερσιμότητας των μεμβρανών στο μοντέλο αυτό και άρα την ευκολότερη έκλυση νευροδιαβιβαστών, συμπεριλαμβανομένης της ακετυλοχολίνης.

Αποτελέσματα

Συχνότητα εκφορτίσεων



Σχετική μεταβολή της συχνότητας



Γράφημα 16. Αποτύπωση του πλήρους συνόλου δεδομένων σε διαγράμματα ελαχίστου-25%-διαμέσου-75%-μεγίστου, για την διαφορά του αποτελέσματος της προσθήκης ατροπίνης (1μM) στο διάλυμα διαβροχής μεταξύ δύο διαλυμάτων διαβροχής -tENY άνευ μαγνησίου και tENY με αμινοπυριδίνη. Παρουσία ατροπίνης οι συχνότητες που προκύπτουν είναι χαμηλότερες στο κροταφικό σε σχέση με τον διαφραγματικό ιππόκαμπο των φυσιολογικών ζώων, ενώ στα PTZ πειραματόζωα η συχνότητα και των διαφραγματικών τομών δείχνει να επιδέχεται εξίσου μεγάλη μείωση από την αναστολή των μουςκαρινικών υποδοχέων. Η ίδια τάση αντικατοπτρίζεται και στις σχετικές μεταβολές της συχνότητας.

Αποτελέσματα

16. Σύγκριση του μοντέλου με τΕΝΥ άνευ μαγνησίου κα του μοντέλου της αμινοπυριδίνης παρουσία καρβαχόλης (1μM) ως προς τη συχνότητα εκφορτίσεων

Παρουσία καρβαχόλης (1μM) δεν υφίστανται σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο μοντέλων σε καμμία διάκριση, ούτε στην τελική συχνότητα των εκφορτίσεων ούτε στην σχετική μεταβολή της συχνότητας λόγω καρβαχόλης, πέρα από μια μικρή διαφορά στις διαφραγματικές τομές των φυσιολογικών και των PTZ πειραματοζώνων: στις τομές των φυσιολογικών πειραματοζώνων η σχετική αύξηση της συχνότητας ήταν μεγαλύτερη στο τΕΝΥ άνευ Mg^{2+} , αλλά κατέληξε σε παραπλήσιες τιμές συχνοτήτων με το μοντέλο της αμινοπυριδίνης, ενώ στις τομές των PTZ πειραματοζώνων τόσο η σχετική αύξηση της συχνότητας όσο και η τελική συχνότητα ήταν μεγαλύτερες στο μοντέλο της αμινοπυριδίνης. Οι διαφορές αυτές δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές.

Πίνακας 19α-β:: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική μεταβολή της συχνότητας παρουσία καρβαχόλης σε τομές φυσιολογικών πειραματοζώνων, σε τΕΝΥ άνευ μαγνησίου και σε τΕΝΥ με 50 μM 4-αμινοπυριδίνης.

(α) κροταφικές τομές			
Συγκρινόμενη μεταβλητή	εκφορτίσεις σε τΕΝΥ άνευ Mg^{2+}	εκφορτίσεις σε τΕΝΥ με 50μM 4-AP	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	1.372 ± 0.34 , n = 7	1.005 ± 0.133 , n = 8	0.30874
% της αρχικής συχνότητας	301.816 ± 97.646 , n = 7	256.513 ± 35.987 , n = 8	0.65388
(β) διαφραγματικές τομές			
Συγκρινόμενη μεταβλητή	εκφορτίσεις σε τΕΝΥ άνευ Mg^{2+}	εκφορτίσεις σε τΕΝΥ με 50μM 4-AP	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.551 ± 0.09 , n = 6	0.403 ± 0.125 , n = 3	0.37084
% της αρχικής συχνότητας	442.723 ± 145.285 , n = 6	196.629 ± 70.575 , n = 3	0.29541

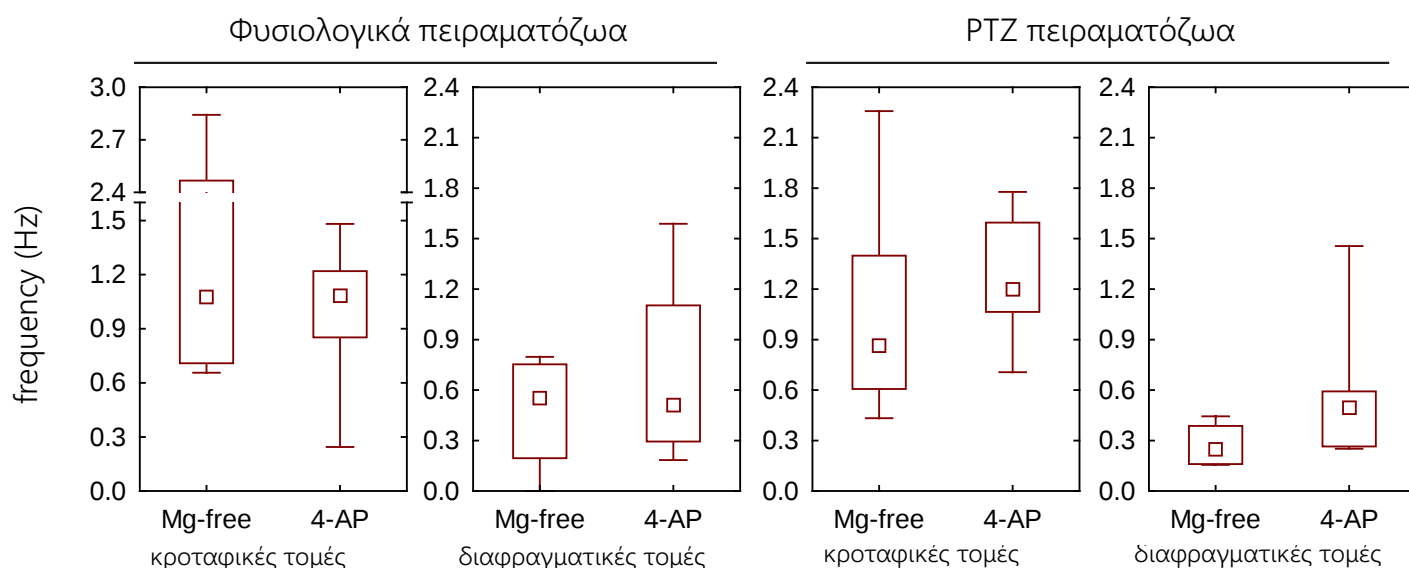
Πίνακας 19γ-δ:: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική μεταβολή της συχνότητας παρουσία καρβαχόλης σε τομές PTZ πειραματοζώνων, σε τΕΝΥ άνευ μαγνησίου και σε τΕΝΥ με 50 μM 4-αμινοπυριδίνης.

(γ) κροταφικές τομές			
Συγκρινόμενη μεταβλητή	εκφορτίσεις σε τΕΝΥ άνευ Mg^{2+}	εκφορτίσεις σε τΕΝΥ με 50μM 4-AP	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	1.071 ± 0.275 , n = 6	1.258 ± 0.157 , n = 6	0.56899
% της αρχικής συχνότητας	244.034 ± 59.404 , n = 6	258.011 ± 32.878 , n = 6	0.84104
(δ) διαφραγματικές τομές			
Συγκρινόμενη μεταβλητή	εκφορτίσεις σε τΕΝΥ άνευ Mg^{2+}	εκφορτίσεις σε τΕΝΥ με 50μM 4-AP	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.274 ± 0.069 , n = 4	0.593 ± 0.181 , n = 6	0.20838
% της αρχικής συχνότητας	221.306 ± 21.519 , n = 4	353.98 ± 136.225 , n = 6	0.46047

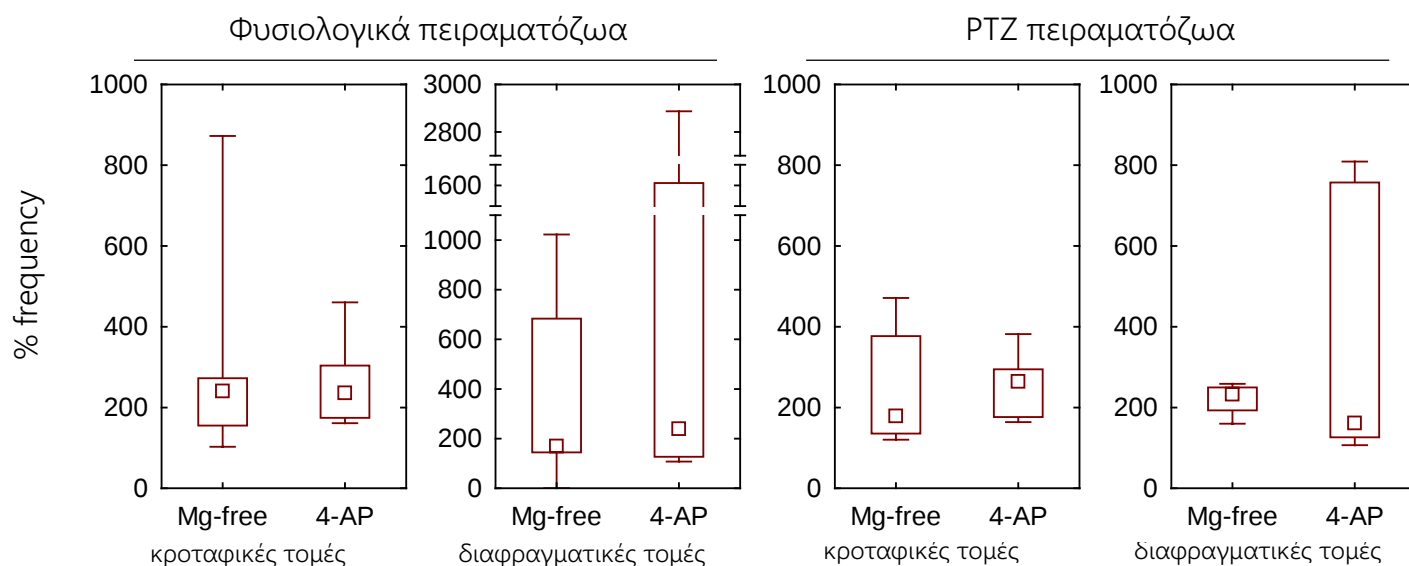
Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι εντονότερη χολινεργική διέγερση από αυτή που επιτυγχάνεται με την αύξηση της διαθεσιμότητας της ενδογενούς ακετυλοχολίνης, προκαλεί παρεμφερείς αυξήσεις στην συχνότητα επιληπτοειδών εκφορτίσεων μεσοκρυστικού τύπου, σε παρεμφερείς τελικές τιμές, ανεξαρτήτως μοντέλου, πιθανώς υποδηλώνοντας ένα άνω φράγμα της δυνατότητας χολινεργικών αγωνιστών να ρυθμίζουν την συχνότητα αυτών των επιληπτοειδών εκφορτίσεων.

Αποτελέσματα

Συχνότητα εκφορτίσεων



Σχετική μεταβολή της συχνότητας



Γράφημα 17. Αποτύπωση του πλήρους συνόλου δεδομένων σε διαγράμματα ελαχίστου-25%-διαμέσου-75%-μεγίστου, για την διαφορά του αποτελέσματος της προσθήκης καρβαχόλης (10μM) στο διάλυμα διαβροχής μεταξύ δύο διαλυμάτων διαβροχής -τΕΝΥ άνευ μαγνησίου και τΕΝΥ με αμινοπυριδίνη. Παρουσία εσερίνης οι συχνότητες που προκύπτουν τείνουν να είναι υψηλότερες για το μοντέλο της αμινοπυριδίνης στα PTZ πειραματόζωα (προφανώς διατήρηση της αρχικής διαφοράς), ενώ οι σχετικές αυξήσεις δεν παρουσιάζουν αξιόλογη διαφορά.

Αποτελέσματα

17. Σύγκριση τομών αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων ως προς τη συχνότητα εκφορτίσεων

Η αρχική συχνότητα των τομών αρσενικών πειραματοζώων δεν είναι σημαντικά διαφορετική της αρχικής συχνότητας των τομών θηλυκών πειραματοζώων, όπως φαίνεται στους πίνακες 20α-δ παρακάτω.

Πίνακας 20α-β: Συχνότητες εκφορτίσεων τομών αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων, σε τΕΝΥ άνευ μαγνησίου.

(α) Τομές φυσιολογικών πειραματοζώων			
Τομές	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών αρσενικών πειραματοζώων	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών θηλυκών πειραματοζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Κροταφικές	0.52 ± 0.035 , n = 60	0.524 ± 0.133 , n = 4	0.97599
Διαφραγματικές	0.21 ± 0.034 , n = 18	0.264 ± 0.054 , n = 15	0.39236
(β) Τομές PTZ πειραματοζώων			
Τομές	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών αρσενικών πειραματοζώων	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών θηλυκών πειραματοζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Κροταφικές	0.355 ± 0.044 , n = 22	0.404 ± 0.069 , n = 12	0.53098
Διαφραγματικές	0.166 ± 0.043 , n = 13	0.131 ± 0.019 , n = 11	0.49856

Πίνακας 20γ-δ: Συχνότητες εκφορτίσεων τομών αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων, σε τΕΝΥ με 50 μΜ 4-αμινοπυριδίνης.

(γ) Τομές φυσιολογικών πειραματοζώων			
Τομές	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών αρσενικών πειραματοζώων	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών θηλυκών πειραματοζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Κροταφικές	0.497 ± 0.077 , n = 16	0.479 ± 0.048 , n = 17	0.84461
Διαφραγματικές	0.25 ± 0.029 , n = 7	0.282 ± 0.037 , n = 16	0.60037
(δ) Τομές PTZ πειραματοζώων			
Τομές	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών αρσενικών πειραματοζώων	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών θηλυκών πειραματοζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Κροταφικές	0.555 ± 0.069 , n = 7	0.515 ± 0.056 , n = 15	0.67873
Διαφραγματικές	0.233 ± 0.043 , n = 4	0.241 ± 0.029 , n = 14	0.90644

Πιθανώς θα αναμενόταν, λόγω ορμονικών αλλοιώσεων της διεγερσιμότητας του ιπποκάμπου, διαφορά στην συχνότητα των εκφορτίσεων που καταγράφονται από τομές θηλυκών πειραματοζώων. Ωστόσο, τέτοια διαφορά δεν παρατηρήθηκε. Επίσης, είναι πιθανότερο η δειγματοληψία (καθώς το πειραματόζωο για το κάθε πείραμα επιλεγόταν τυχαία) να είναι διάχυτη σε διάφορες φάσεις του κύκλου των θηλυκών, οπότε αναμένεται η διακύμανση να είναι μεγαλύτερη στα θηλυκά (0.049) σε σύγκριση με τα αρσενικά πειραματόζωα (0.072). Η τελευταία διαφορά δεν τείνει απλά προς την αντίθετη κατεύθυνση της υπόθεσης, αλλά επιβεβαιώνεται και στατιστικά (F-test $p < 0.05$). Επομένως, τομές από αρσενικά και θηλυκά πειραματόζωα δεν διαφέρουν ούτε στις αρχικές συχνότητες εκφορτίσεων ούτε σε μέσες τιμές, και οι τομές από τα θηλυκά έχουν οριακά μικρότερη διακύμανση των αρσενικών. Επίσης, η διακύμανση στις συχνότητες των τομών θηλυκών δεν βρέθηκε σε καμία υπο-ομάδα στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη αυτής των αρσενικών.

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι με την μεθοδολογία που ακολουθούμε, έχουμε ένα καλά απομονωμένο *in vitro* σύστημα για την μελέτη επιληπτοειδών εκφορτίσεων μεσοκρυσικού τύπου, πιθανώς, ανεξαρτήτως του μοντέλου που χρησιμοποιείται για την πρόκλησή τους, και το οποίο δεν επηρεάζεται σημαντικά από εξωγενείς παράγοντες (εδώ, ορμονικές διακυμάνσεις του πειραματοζώου, από το οποίο προέρχεται ο ιστός).

Για τα φαρμακολογικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν (προσθήκη 10μΜ εσερίνης, ή 1μΜ ατροπίνης ταυτόχρονα με 10μΜ εσερίνης, ή 10μΜ ατροπίνης, ή 1μΜ καρβαχόλης), τα αποτελέσματα ανά υποσύνολο δεδομένων κατά τις άλλες ανεξάρτητες μεταβλητές (φυσιολογικό ή PTZ πειραματόζωο, κροταφική ή διαφραγματική τομή, μοντέλο πρόκλησης επιληπτοειδών εκφορτίσεων), δεν επαρκούν για πλήρη ανάλυση, όπως εμφανίστηκε στις προηγούμενες συγκρίσεις, και παρουσιάζονται στο παράρτημα 3 ως πλήρεις πίνακες με τα κενά όπου

Αποτελέσματα

υπάρχουν.

Συνολικά, σε όσες περιπτώσεις τα δεδομένα επαρκούν για ανάλυση δεν εντοπίστηκαν ούτε στατιστικά σημαντικές ούτε διαφορετικώς αξιοσημείωτες διαφορές μεταξύ αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων.

3.0.5 Συνδυασμένες τομές ιπποκάμπου-ενδορρινικού φλοιού

3.0.6 Δραστηριότητα του ενδορρινικού φλοιού

Σε μέρος των πειραμάτων, διατηρήθηκε μαζί με τις τομές ιπποκάμπου και ο παρακείμενος ενδορρινικός φλοιός. Ο ενδορρινικός φλοιός μας ενδιέφερε αφ' ενός λόγω προηγούμενων ευρημάτων κρισικού τύπου εκφορτίσεων στον ιππόκαμπο παρουσία του πρώτου (Kojima et al., 1991), αφ' ετέρου γιατί αποτελεί την κύρια έξοδο του ιπποκάμπου με ρόλο μεταγωγής του σήματος σε εξωτερικές φλοιικές περιοχές.

Για τα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν τομές από το κροταφικό άκρο του ιπποκάμπου, καθώς γνωρίζουμε από την βιβλιογραφία ότι είναι πιο επιληπτογενές από το διαφραγματικό (βλ. κεφάλαιο 1.2), κι επίσης, με την διαδικασία παρασκευής τομών που ακολουθούμε, μπορούμε να είμαστε βέβαιοι ότι μια συνδυασμένη εγκάρσια τομή από το κροταφικό άκρο θα περιλαμβάνει μεγαλύτερο ακέραιο τμήμα του δικτύου ιπποκάμπου-μέσου ενδορρινικού φλοιού.

Παράλληλα με την καταγραφή στις στιβάδες V-VI του μέσου ενδορρινικού φλοιού γινόταν και καταγραφή από το πυραμιδικό υποπεδίο a-b της CA3 του ιδίου παρασκευάσματος.

Οι τομές εξετάστηκαν, κατά προτεραιότητα στο τΕΝΥ άνευ μαγνησίου, με την προοπτική να παρατηρηθούν κρισικού τύπου εκφορτίσεις, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Από την εξέταση της δραστηριότητας προέκυψε ότι στις καταγραφές δεν υπήρχε κρισικού τύπου δραστηριότητα, αλλά μεσοκρισικού τύπου επιληπτοειδείς εκφορτίσεις τόσο στην CA3 όσο και στον ενδορρινικό φλοιό.

Η συχνότητα των εκφορτίσεων στην CA3 (σε συμφωνία με τα ευρήματα που παρουσιάστηκαν σε προηγούμενο υπο-κεφάλαιο) ήταν ελαφρώς υψηλότερη στις τομές φυσιολογικών έναντι PTZ πειραματοζώων. (0.646 ± 0.113 Hz, $n = 8$ έναντι 0.471 ± 0.130 Hz, $n = 6$, Scheffé test $p > 0.05$)

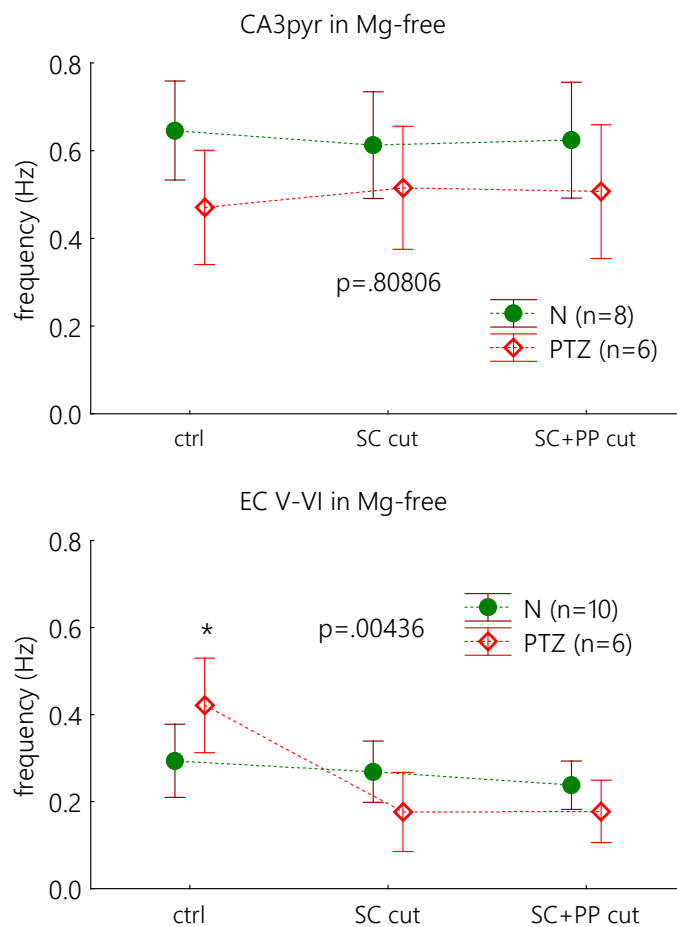
Παράλληλα, η συχνότητα των εκφορτίσεων του ενδορρινικού φλοιού ήταν υψηλότερη και πιο κοντά στην συχνότητα της CA3, στις τομές των PTZ πειραματοζώων σε σύγκριση με των φυσιολογικών (0.421 ± 0.109 Hz, $n = 6$ έναντι 0.294 ± 0.084 Hz, $n = 10$, Scheffé test $p < 0.01$). (γράφημα 19 υποκεφαλαίου 18, σημεία σημασμένα "ctrl", αριστερά)

18. Σύνδεση μεταξύ CA3 και ενδορρινικού φλοιού

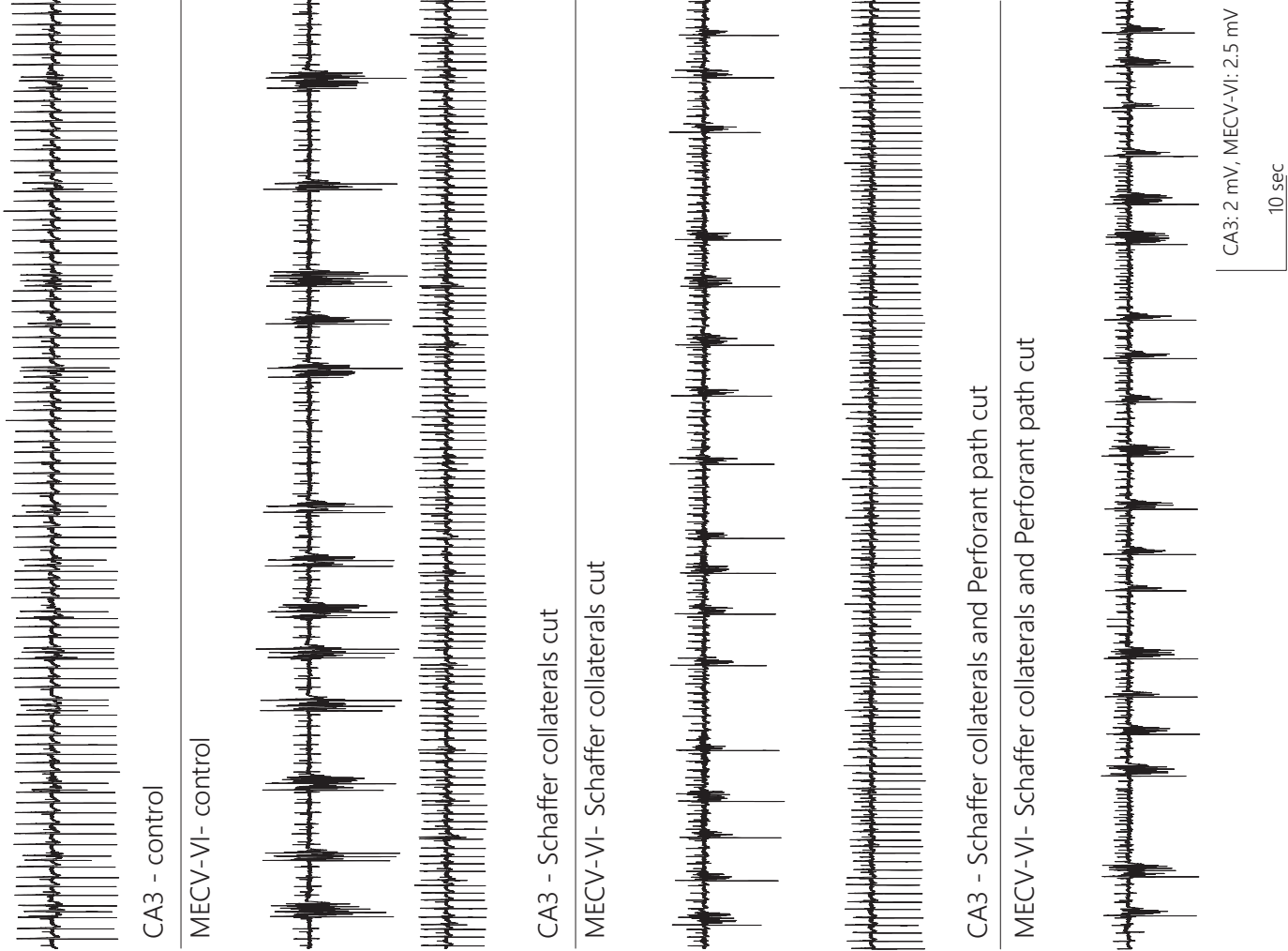
Για να διαπιστωθεί κατά πόσον η συχνότητα εκφορτίσεων στην CA3 επηρεάζει την συχνότητα εκφορτίσεων στον ενδορρινικό φλοιό, και κατά πόσον η ενδογενής δραστηριότητα της CA3 στο μοντέλο ενεργοποίησης των NMDA υποδοχέων υπόκειται σε ανατροφοδοτικό έλεγχο από τον ενδορρινικό φλοιό, διεκόπησαν με διαδοχικές τομές οι παράπλευρες ίνες Schaffer και σε δεύτερο χρόνο η διατιτρούσα οδός (πλήρης απομόνωση του ιπποκάμπου από τον ενδορρινικό φλοιό, ακριβώς όπως στις τομές -μόνο- ιπποκάμπου).

Όπως φαίνεται στο γράφημα 19, σε τομές φυσιολογικών πειραματοζώων η διακοπή των ινών Schaffer δεν είχε καμμία επίδραση στην συχνότητα εκφορτίσεων ούτε στην CA3 (0.646 ± 0.113 Hz, $n = 8$ έναντι 0.613 ± 0.122 Hz, Scheffé test $p > 0.50$) ούτε στον ενδορρινικό φλοιό (0.294 ± 0.084 Hz, $n = 10$ έναντι 0.269 ± 0.070 Hz, Scheffé test $p > 0.50$). Επιπλέον, η ακόλουθη διακοπή (πλήρης απομόνωση των περιοχών) δεν είχε, επίσης, καμμία επίδραση στην συχνότητα εκφορτίσεων ούτε της CA3 (0.613 ± 0.122 Hz, $n = 8$ έναντι 0.624 ± 0.132 Hz, Scheffé test $p > 0.50$) ούτε του ενδορρινικού φλοιού (0.269 ± 0.070 Hz, $n = 10$ έναντι 0.238 ± 0.056 Hz, Scheffé test $p > 0.50$).

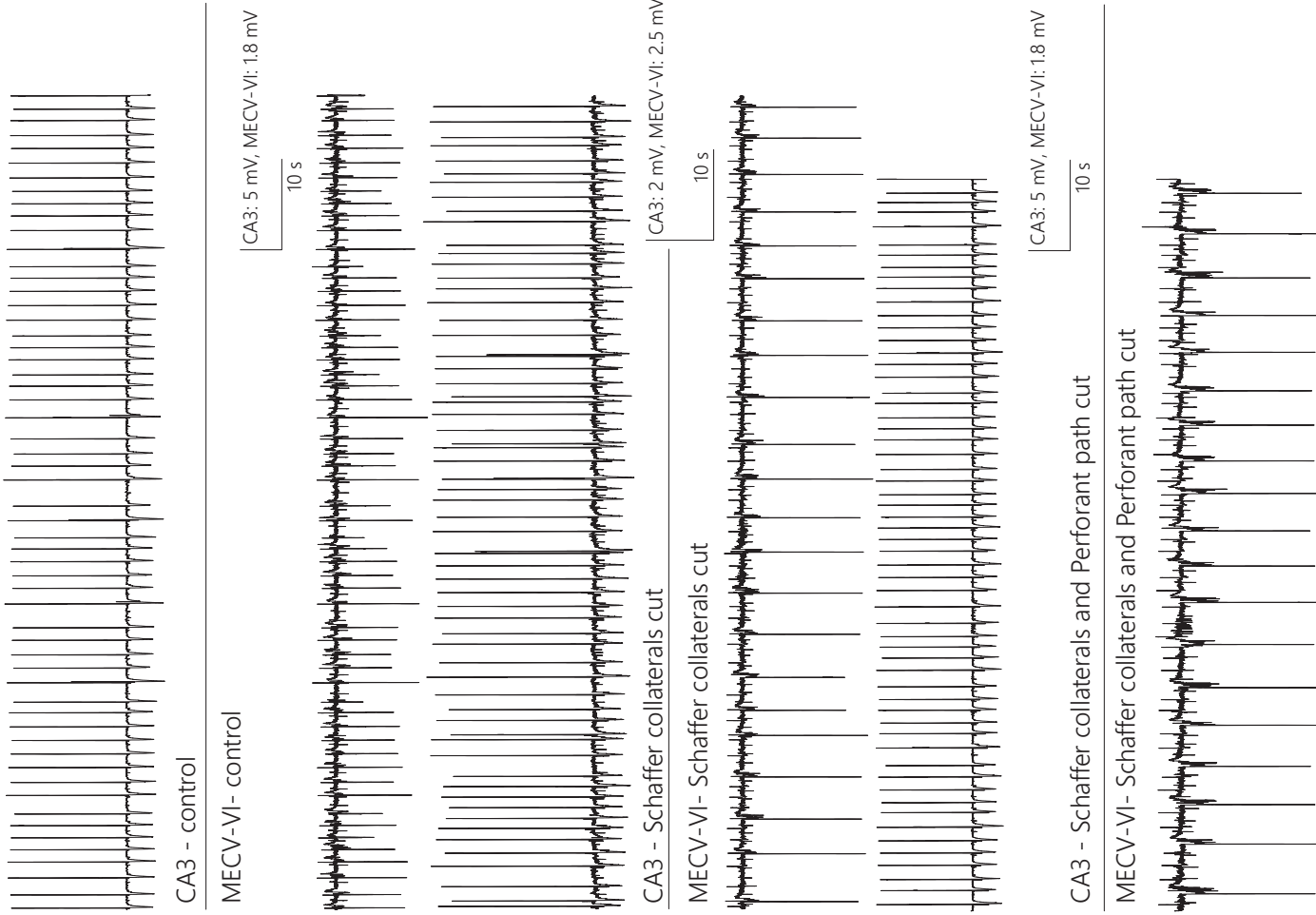
Αντιθέτως σε τομές PTZ πειραματοζώων με την πρώτη διακοπή (στις ίνες Schaffer) η συχνότητα εκφορτίσεων του ενδορρινικού φλοιού μειώθηκε σημαντικά σε τιμές παραπλήσιες των τομών των φυσιολογικών ζώων (0.471 ± 0.130 Hz, $n = 6$ έναντι 0.176 ± 0.091 Hz, Scheffé test $p < 0.05$). Η δεύτερη διακοπή, όπως και στις τομές των φυσιολογικών πειραματοζώων δεν προκάλεσε αλλαγές στη συχνότητα εκφορτίσεων των δύο περιοχών (CA3: 0.515 ± 0.140 Hz, $n = 6$ έναντι 0.507 ± 0.153 Hz, Scheffé test $p > 0.50$, ενδορρινικός φλοιός: 0.176 ± 0.091 Hz, $n = 6$ έναντι 0.178 ± 0.072 Hz, Scheffé test $p > 0.50$).



Γράφημα 18. Αρχικές συχνότητες εκφορτίσεων («ctrl») σε CA3 (πάνω) και ενδορρινικό φλοιό (κάτω) και μεταβολή αυτών με τομή (1) των παραπλεύρων ινών Schaffer (απομόνωση του ενδορρινικού φλοιού από την CA3) και (2) πλήρη απομόνωση των δύο περιοχών (με αποκοπή και της διατιτρούσας οδού), σε συνδυασμένες τομές φυσιολογικών (πράσινοι κύκλοι) και PTZ πειραματοζώων (κόκκινα τετράγωνα). Ενώ στην CA3 δεν υπάρχουν διαφορές εξ αρχής, και ούτε προκύπτουν μεταξύ φυσιολογικών και PTZ πειραματοζώων, στον ενδορρινικό φλοιό, η αρχική συχνότητα εκφορτίσεων τομών PTZ πειραματοζώων είναι σημαντικά υψηλότερη αυτής των φυσιολογικών, αλλά μειώνεται στα ίδια επίπεδα με τις τομές των φυσιολογικών μετά την αποκοπή της επικοινωνίας της CA3 προς τον ενδορρινικό φλοιό.



Αποτελέσματα



Αποτελέσματα

Εικόνα καταγραφής 5 -Προηγούμενη σελίδα: Ταυτόχρονες καταγραφές από την περιοχή CA3a και τη στιβάδα V-VI του μέσου ενδορρινικού φλοιού, από συνδυασμένη κροταφική τομή φυσιολογικού πειραματοζώου (αριστερά) και PTZ πειραματοζώου (δεξιά). Οι 2 άνω καταγραφές προέκυψαν από άθικτες τομές, οι επόμενες 2 (μεσαίες καθ' ύψος) μετά από την πρώτη τομή στην CA1 για την διακοπή της εξόδου της CA3 προς τον ενδορρινικό φλοιό, και οι 2 κάτω από την 2η τομή στην διατιτρούσα οδό εγκάρσια στο ύψος του υποθέματος για την διακοπή της εξόδου του ενδορρινικού φλοιού προς την επιπλέον της πρώτης τομής για την διακοπή της εξόδου της CA3 προς τον ενδορρινικό φλοιό.

Διακρίνεται η μείωση της συχνότητας των εκφορτίσεων μεσοκρισικού τύπου του ενδορρινικού φλοιού στην τομή του PTZ πειραματοζώου (δεξιά) μετά την διακοπή των ινών Schaffer. Η δεύτερη τομή στην διατιτρούσα οδό δεν επιφέρει κάποιο πρόσθετο αποτέλεσμα. Η συχνότητα της CA3 δεν δείχνει να επηρεάζεται από τις παρεμβάσεις.

Αντιθέτως, στην τομή του φυσιολογικού πειραματοζώου, η συχνότητα των εκφορτίσεων του ενδορρινικού φλοιού παραμένει σταθερά χαμηλότερη της CA3, ανεξαρτήτως παρέμβασης ή μη στην επικοινωνία CA3-MEC.

Σημειώνεται ότι οι κλίμακες δυναμικού (mV) και η μορφολογία της κυματομορφής μεταβάλλονται μετά από κάθε παρέμβαση λόγω μετατοπίσεων του ιστού κατά τις τομές και επανατοποθέτησης των ηλεκτροδίων κατά προσέγγιση στις ίδιες (μετατοπισμένες, πλέον) θέσεις. Στην καταγραφή του ενδορρινικού φλοιού είναι πιο εμφανής η παρεμβολή του άλλου καναλιού του ενισχυτή «cross-talk» πιθανώς λόγω της συνδεσμολογίας του ηλεκτροδίου αναφοράς (πιθανώς αφαιρείται εσφαλμένα και 2η φορά το υπόλειμμα της πρώτης αφαίρεσης, που θα έπρεπε να είναι μηδέν, αλλά η διακλάδωση τύπου Y που χρησιμοποιούμε, ίσως προκαλεί κάποια μικρή διαρροή προς το άλλο κανάλι). Σημειώνεται επίσης ότι η εικόνα έχει περιστραφεί κατά 90 μοίρες αριστερόστροφα (anti-clockwise) για να χωρέσει στην σελίδα.

Πέραν των συχνοτήτων των εκφορτίσεων διαπιστώθηκε ότι με την διακοπή των ινών Schaffer μεταβαλλόταν η διάρκεια των εκφορτίσεων του ενδορρινικού φλοιού. Η διάρκεια των εκφορτίσεων που μετρήθηκαν, δεν ακολουθούσε την κανονική κατανομή, αλλά προσεγγιζόταν καλά από 2 βασικές κορυφές (Gaussian) και μία έως δύο επιπλέον συμπληρωματικές. Η προσαρμογή των σύνθετων κατανομών έγινε με κριτήριο την απόσταση των δεδομένων από την εκτιμώμενη προσαρμοσμένη συνάρτηση (με χρήση του τεστ Kolmogorov-Smirnov) και με οπτικό έλεγχο της προσαρμοσμένης στην εμπειρική κατανομή των μετρήσεων, κυρίως για την αποφυγή υπερ-προσαρμογής.

Και στις τομές των φυσιολογικών (n=6) και στις τομές των PTZ (n=7) πειραματοζώων πριν την τομή των ινών Schaffer στην CA1 παρατηρήθηκαν δύο κύριες κορυφές στην κατανομή της διάρκειας των εκφορτίσεων του ενδορρινικού φλοιού, μια μεταξύ 400 και 900msec και μια μεταξύ 900 και 1300msec.

Μετά την τομή των ινών Schaffer, η διάρκεια των σύντομων εκφορτίσεων του ενδορρινικού φλοιού διπλασιάστηκε στις τομές των φυσιολογικών ζώων (από 412 προς 823msec) ενώ η διάρκεια των πιο παρατεταμένων αυξήθηκε κατά 20% περίπου (από 1022 προς 1238msec) με παράλληλη μείωση της διασποράς. Στις τομές των PTZ πειραματοζώων, αντίστοιχα, οι σύντομες εκφορτίσεις αυξήθηκαν σε διάρκεια μετά την τομή των ινών Schaffer κατά 50% περίπου (από 446 προς 665msec) ενώ οι πιο παρατεταμένες κατά 25% περίπου (από 918 προς 1152msec), με παράλληλη αύξηση της διασποράς.

Από τις προσαρμογές προέκυψαν οι ακόλουθες εκφράσεις (όπου x η διάρκεια των εκφορτίσεων), οι οποίες και απεικονίζονται (υπερτίθενται στα ιστογράμματα με μεγέθυνση της κάθετης κλίμακας) στο γράφημα 20.

Οι εκφράσεις είναι της μορφής:

$$\sum_i w_i \frac{e^{-\frac{(x-m_i)^2}{2s_i^2}}}{s_i \sqrt{2\pi}}$$

όπου w, m, s ένας συντελεστής βάρους (κανονικοποίησης) της κατανομής i, η μέση τιμή της και τυπική απόκλιση της, αντίστοιχα. Όπου x η ανεξάρτητη μεταβλητή (εδώ, η διάρκεια σε msec).

Από φυσιολογικά πειραματόζωα, σε αρχικές συνθήκες:

$$(0.197007744873024 * \exp(-((x - 411.756896022463)^2) / (2 * 49.207362078111 * 49.207362078111)) / (49.207362078111 * (2 * \pi)^{(1/2)})) + (0.526300672845315 * \exp(-((x - 1021.73880831873)^2) / (2 * 280.879834915689 * 280.879834915689)) / (280.879834915689 * (2 * \pi)^{(1/2)})) + (0.276691582281661 * \exp(-((x - 1807.45064677028)^2) / (2 * 682.103020033663 * 682.103020033663)) / (682.103020033663 * (2 * \pi)^{(1/2)}))$$

Αποτελέσματα

Από φυσιολογικά πειραματόζωα, μετά την τομή στις ίνες Schaffer:

$$(0.135326902206377 * \exp(-((x - 823.397634728923)^2) / (2 * 36.4947550810401 * 36.4947550810401)) / (36.4947550810401 * (2 * \pi)^{(1 / 2)})) + (0.829878373668077 * \exp(-((x - 1238.39055879068)^2) / (2 * 330.071799504579 * 330.071799504579)) / (330.071799504579 * (2 * \pi)^{(1 / 2)})) + (3.47947241255458E-02 * \exp(-((x - 3967.28380043276)^2) / (2 * 461.318005913792 * 461.318005913792)) / (461.318005913792 * (2 * \pi)^{(1 / 2)}))$$

Από PTZ πειραματόζωα, σε αρχικές συνθήκες:

$$(0.185892812194501 * \exp(-((x - 445.814243003691)^2) / (2 * 49.6983759911753 * 49.6983759911753)) / (49.6983759911753 * (2 * \pi)^{(1 / 2)})) + (0.247655269623794 * \exp(-((x - 642.277304995574)^2) / (2 * 116.388451169998 * 116.388451169998)) / (116.388451169998 * (2 * \pi)^{(1 / 2)})) + (0.560758756391357 * \exp(-((x - 918.39282903053)^2) / (2 * 117.938789614935 * 117.938789614935)) / (117.938789614935 * (2 * \pi)^{(1 / 2)})) + (5.69316179034867E-03 * \exp(-((x - 1767.92911029094)^2) / (2 * 377.682826605663 * 377.682826605663)) / (377.682826605663 * (2 * \pi)^{(1 / 2)}))$$

Από PTZ πειραματόζωα, μετά την τομή στις ίνες Schaffer:

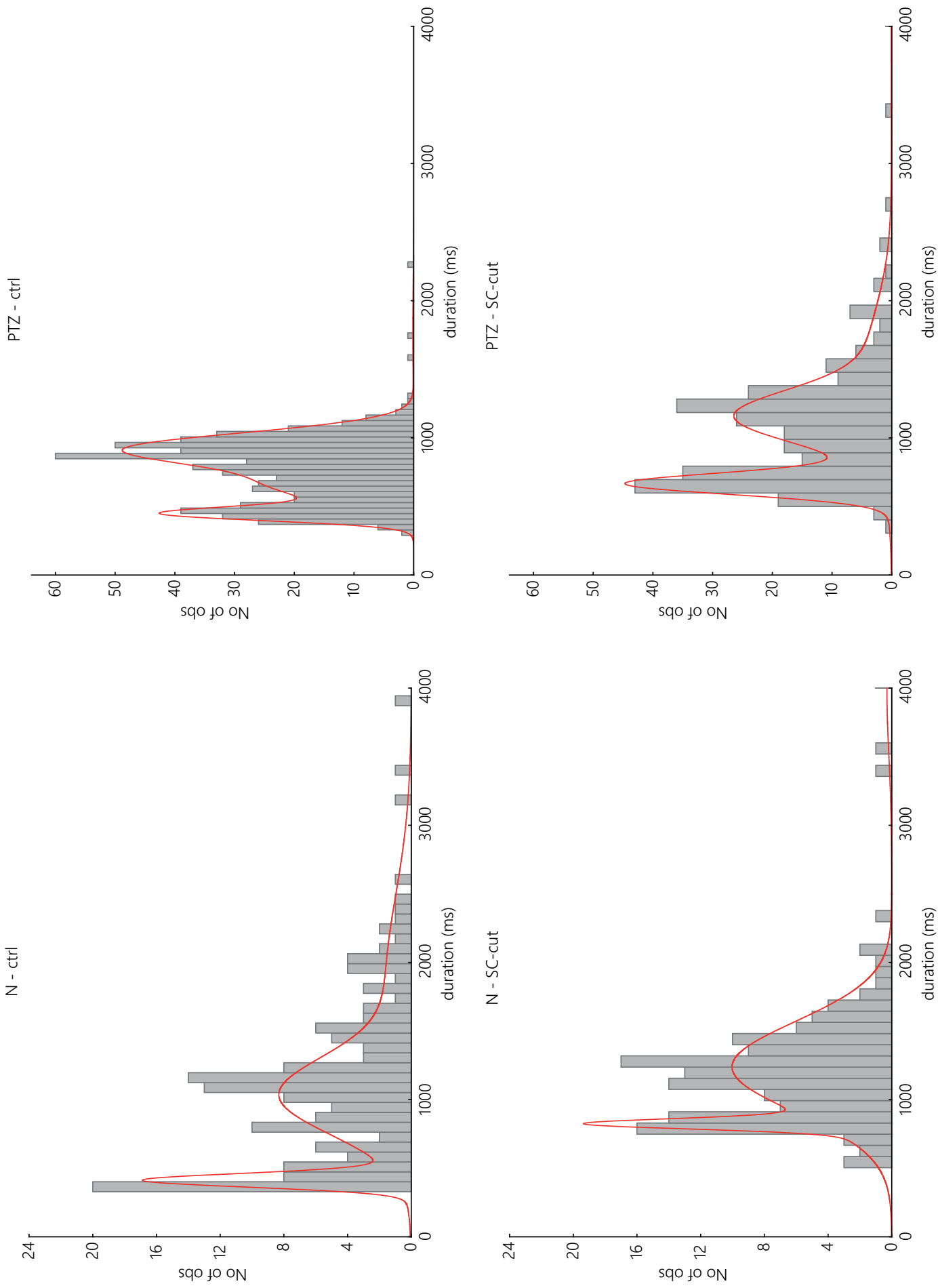
$$(0.328534889088167 * \exp(-((x - 664.654448766107)^2) / (2 * 77.1194908999474 * 77.1194908999474)) / (77.1194908999474 * (2 * \pi)^{(1 / 2)})) + (0.421338115008403 * \exp(-((x - 1152.11192069874)^2) / (2 * 188.397924506292 * 188.397924506292)) / (188.397924506292 * (2 * \pi)^{(1 / 2)})) + (0.230424583215686 * \exp(-((x - 1420.46151172634)^2) / (2 * 478.235059699273 * 478.235059699273)) / (478.235059699273 * (2 * \pi)^{(1 / 2)})) + (1.97024126877453E-02 * \exp(-((x - 5212.09233622574)^2) / (2 * 1863.2870323042 * 1863.2870323042)) / (1863.2870323042 * (2 * \pi)^{(1 / 2)}))$$

Από την σύγκριση φυσιολογικών και PTZ τομών και στις δύο συνθήκες (αρχική, μετά την τομή) με το μη παραμετρικό τεστ Kolmogorov-Smirnov, προκύπτει ότι οι διάρκειες των εκφορτίσεων διαφέρουν ($p < 0.05$) τόσο μεταξύ των ομάδων (φυσιολογικών - PTZ) όσο και μεταξύ των δύο καταστάσεων (αρχική - μετά την τομή). Επιπλέον, η μεταβολή των διαρκειών των εκφορτίσεων από την αρχική κατάσταση στην κατάσταση μετά την τομή εκτιμάται ότι απέχει στις δύο ομάδες, συγκρίνοντας τους λόγους τελικής (μετά την τομή των ινών Schaffer) προς αρχικής (πριν την τομή) κατανομής (απόσταση ως τετραγωνική ρίζα της απόκλισης Jensen-Shannon μεταξύ πραγματικής κατανομής μετά την κοπή των ινών Schaffer σε τομές των PTZ πειραματοζώων και εκτιμώμενης από την σχετική μεταβολή κατά την ίδια διαδικασία των τομών φυσιολογικών πειραματοζώων, προσεγγιστικά ίση με 0.57).

Από τα αποτελέσματα αυτά, ειδικά η μεταβολή των εκφορτίσεων του ενδορρινικού φλοιού, που από υψηλής συχνότητας και μικρής διάρκειας στις συνδυασμένες τομές των PTZ πειραματοζώων, μεταπίπτουν σε χαμηλότερης συχνότητας και διάρκειας –παρεμφερών με των τομών φυσιολογικών πειραματοζώων– δείχνει ότι στα PTZ πειραματόζωα ο ενδορρινικός φλοιός προσαρμόζει πιο εύκολα την δραστηριότητα που παράγει, στο πρότυπο των επιληπτοειδών εκφορτίσεων, που εισέρχονται με προέλευση την CA3.

Γράφημα 19. (επόμενη σελίδα) Ιστογράμματα των διαρκειών των εκφορτίσεων του ενδορρινικού φλοιού πριν (πάνω - “ctrl”) και μετά την τομή των ινών Schaffer (κάτω - “SC cut”), μετρημένων από συνδυασμένες τομές ιπποκάμπου και ενδορρινικού φλοιού φυσιολογικών (αριστερά - “N”) και PTZ (δεξιά) πειραματοζώων. Με συνεχή κόκκινη γραμμή η προσαρμοσμένη κατανομή, κατά περίπτωση.

Αποτελέσματα





Συζήτηση

4.1. Γενικές αρχικές τάσεις

Σε βασικές συνθήκες (μόνο με τα μοντέλα επαγωγής επιληπτοειδών εκφορτίσεων) οι διαφορές στην συχνότητα των εκφορτίσεων μεταξύ τομών κροταφικού και διαφραγματικού άκρου ήταν οι αναμενόμενες από τη βιβλιογραφία (κεφ. 1.2). Μεταξύ των φυσιολογικών και PTZ πειραματοζών υπήρχε μια μικρή διαφορά στις συχνότητες εκφορτίσεων στην αρχική κατάσταση (χωρίς επιπλέον φάρμακα) στο μοντέλο με tENY άνευ μαγνησίου, με μεγαλύτερες τις συχνότητες των φυσιολογικών ζών-μαρτύρων. (Η διαφορά αυτή δεν εμφανίστηκε στο μοντέλο της αμινοπυριδίνης). Η διαφορά αυτή, σε συνδυασμό με τις μεγαλύτερες αυξήσεις της συχνότητας που τείνει να προκαλεί ένα χολινεργικό ερέθισμα στα PTZ πειραματοζώα, ενδεχομένως δείχνει ότι η επιληπτοειδής κρίση που προκλήθηκε σε νεαρή ηλικία έχει αφενός αυξήσει την ελαστικότητα της απόκρισης του ιπποκάμπου στην παραγωγή επιληπτοειδών εκφορτίσεων ως προς τα επίπεδα ακετυλοχολίνης, αλλά και προκάλεσε αύξηση του εύρους της απόκρισης αυτής.

Ακόμη κι αν περιορίσουμε την πιθανή συνέργεια μουσκαρινικών και NMDA υποδοχέων, στο μοντέλο της αμινοπυριδίνης η συχνότητα των τομών των PTZ πειραματοζών τείνει να είναι μεγαλύτερη των φυσιολογικών και επίσης φαίνεται να υπάρχει ήδη αυξημένη ενεργοποίηση μουσκαρινικών υποδοχέων (όπως δείχνει το πείραμα με την ατροπίνη), πιθανώς από αυξημένη έκλυση ακετυλοχολίνης ήδη από την αρχική κατάσταση (χωρίς πρόσθετα ερεθίσματα). Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει, πιθανώς, ότι στα πειραματοζώα με επιληπτικό ιστορικό και σε συνθήκες αυξημένης διέγερσης, η συχνότητα των επιληπτοειδών εκφορτίσεων τουλάχιστον στον ιπποκάμφο, εξαρτάται σε μεγαλύτερο βαθμό από την ακετυλοχολίνη, και μεσολαβείται περισσότερο από μουσκαρινικούς υποδοχείς. Στην υπόθεση αυτή συγκλίνουν και παράλληλα πειράματα του εργαστηρίου, από τα οποία φαίνεται ότι η βαρύτητα μιας 2ης προκλητής κρίσης στην ενήλικη ζωή αυξάνει σε μεγαλύτερο βαθμό σε επιληπτικού ιστορικού πειραματοζώα, εάν το έναυσμα της πρόκλησης των σπασμών είναι χολινεργικό/μουσκαρινικό (Kouis, Mikroulis, Psarropoulou –δεδομένα υπό δημοσίευση).

4.2. Ενδογενής ακετυλοχολίνη

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων με εσερίνη και ατροπίνη δείχνουν ότι η ενδογενής ακετυλοχολίνη έχει θετικό ρυθμιστικό ρόλο στην εμφάνιση των επιληπτοειδών εκφορτίσεων μεσοκρυστικού τύπου (μετρούμενη ως συχνότητα εμφάνισης), ανεξαρτήτως του μοντέλου που τις προκαλεί (0-Mg²⁺, 4-αμινοπυριδίνη) και ασκείται μέσω μουσκαρινικών υποδοχέων (πειράματα με εσερίνη και ατροπίνη ταυτόχρονα). Το αποτέλεσμα αυτό αναπαράγεται σε μεγαλύτερη ένταση από έναν εξωγενή χολινεργικό αγωνιστή (καρβαχόλη), γεγονός που δείχνει ότι η ρύθμιση του ρυθμού επανεμφάνισης των επιληπτοειδών εκφορτίσεων μεσοκρυστικού τύπου εξαρτάται και από την διαθεσιμότητα ακετυλοχολίνης.

Από την σύγκριση των αυξήσεων της συχνότητας των επιληπτοειδών εκφορτίσεων μεσοκρυστικού τύπου σε tENY άνευ Mg²⁺ που προκάλεσε η αύξηση της ενδογενούς ακετυλοχολίνης μεταξύ τομών διαφραγματικού και κροταφικού ιπποκάμπου στα PTZ έναντι των φυσιολογικών πειραματοζών, προκύπτει ότι η αύξηση στην διεγερσιμότητα ήταν μεγαλύτερη στον διαφραγματικό ιπποκάμφο των PTZ πειραματοζών. Η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρήθηκε στις διαφραγματικές τομές των πειραματοζών με ιστορικό σπασμών, οι οποίες είχαν επίσης την χαμηλότερη αρχική συχνότητα. Η συσχέτιση αρχικής συχνότητας με την σχετική αύξηση αν και υπάρχει και είναι αρνητική, δεν επαρκεί για να εξηγήσει στατιστικά την σημαντικά μεγαλύτερη αλλαγή που παρατηρήθηκε στα PTZ πειραματοζώα, οπότε η διαφορά που παρατηρούμε παραμένει έγκυρη. Στην περίπτωση της αμινοπυριδίνης η σχετική αύξηση που προκάλεσε η αύξηση της ενδογενούς ακετυλοχολίνης στη συχνότητα των εκφορτίσεων, ήταν παρεμφερής σε όλες τις ομάδες τομών, που πιθανώς εξηγείται από την μειωμένη συνεργιστική δράση με τους NMDA υποδοχείς (σε αντίθεση με το μοντέλο με tENY άνευ μαγνησίου).

Επίσης, σε τομές ίδιας προέλευσης (PTZ, διαφραγματικού ιπποκάμπου), αναλογικά μεγαλύτερη ήταν και η μείωση που προκάλεσε η ατροπίνη σε tENY με 4-αμινοπυριδίνη. Η μικρότερη (και πιο ομοιογενής μεταξύ φυσιολογικών και PTZ πειραματοζών, και στα δύο άκρα του ιπποκάμπου) μείωση της συχνότητας από την ατροπίνη στο tENY άνευ μαγνησίου, δείχνει ότι πιθανώς η συνέργεια NMDA-μουσκαρινικών υποδοχέων, όταν δεν συνοδεύεται από αύξηση της διέγερσης –όπως προκαλεί η αμινοπυριδίνη–, δεν επαρκεί για να παράγει σημαντικές διαφορές στην συχνότητα των επιληπτοειδών εκφορτίσεων.

Ο συνδυασμός αυτών των δύο παρατηρήσεων συμβαδίζει με την παραπάνω υπόθεση, που στηρίζεται και από το *in vivo* πείραμα, δηλαδή ότι στα επιληπτικού ιστορικού πειραματοζώα η έκφραση επιληπτοειδών εκφορτίσεων εξαρτάται σε μεγαλύτερο βαθμό από την δράση της ακετυλοχολίνης σε μουσκαρινικούς υποδοχείς, και επιπλέον δείχνει ότι και στον λιγότερο επιληπτογενή διαφραγματικό ιπποκάμφο ο έλεγχος αυτός ασκείται προς την ίδια κατεύθυνση. Καθώς ο διαφραγματικός ιπποκάμπος δέχεται σε φυσιολογικές συνθήκες εντονότερη χολινεργική εννεύρωση διαμέσου της παρυφής-ψαλίδας (Joyce et al., 1989; Nicoll, 1985; Wall et al., 2008; Wyss et al., 1980), το αυξημένο αποτέλεσμα, που έπεται της αύξησης της διαθέσιμης ενδογενούς ακετυλοχολίνης,

που παρατηρούμε ειδικά με την ταυτόχρονη ενίσχυση των ρευμάτων NMDA στις διαφραγματικές τομές των PTZ πειραματοζώων σε σύγκριση με των φυσιολογικών, συνηγορεί στην υπόθεση ότι μια παροδική αύξηση της ακετυλοχολίνης και του γλουταμικού σε πειραματόζωα με επιληπτικό ιστορικό μπορεί να προκαλέσει μια ενισχυμένη απόκριση επιληπτοειδών εκφορτίσεων, εφόσον αυτές προκύψουν, με πιθανή περαιτέρω ενίσχυση στο κύκλωμα ιπποκάμπου ενδορρινικού φλοιού (Chrobak and Buzsaki, 1994; Chrobak et al., 2000) και ενδεχομένως παροδικές γνωσιακές διαταραχές ή εξάπλωση της επιληπτικής δραστηριότητας, εάν η τελική ενισχυμένη δραστηριότητα εξαχθεί προς παρακείμενες φλοιικές περιοχές (Avoli et al., 2002; Kleen et al., 2010; Öztekin et al., 2011; Schwarcz and Witter, 2002).

4.3. Πιθανή εξήγηση της μουσκαρινικής ρύθμισης επί της συχνότητας των επιληπτοειδών εκφορτίσεων μεσοκρυσικού τύπου.

Από την σύγκριση των πειραμάτων με εσερίνη στα δύο μοντέλα φαίνεται ότι η αμινοπυριδίνη προκαλεί παρεμφερείς αυξήσεις στην συχνότητα σε όλες τις τομές, από τις οποίες δεν μπορούμε να υποστηρίξουμε κάποια διαφορά της απόκρισης της μεσοκρυσικού τύπου δραστηριότητας στην διαθέσιμη ακετυλοχολίνη. Αντιθέτως, το tENY άνευ μαγνησίου φαίνεται να επιτρέπει μια πιο ακραία κατανομή των αυξήσεων της συχνότητας με ιδιαίτερα τονισμένες τις αυξήσεις στο διαφραγματικό άκρο του ιπποκάμπου των PTZ πειραματοζώων. Αν και λόγω μικρής έκτασης δεν ανιχνεύεται από το στατιστικό test που χρησιμοποιήσαμε, φαίνεται επίσης να υπάρχει μια τάση μεγαλύτερων αυξήσεων στις τομές των PTZ πειραματοζώων έναντι των φυσιολογικών, καθώς και στις διαφραγματικές τομές έναντι των κροταφικών. Στο ίδιο μοντέλο, επίσης, η τάση μεγαλύτερης μείωσης της συχνότητας εκφορτίσεων με την προσθήκη ατροπίνης στις διαφραγματικές τομές των PTZ πειραματοζώων στις υποδηλώνει ότι, σε βασικές συνθήκες, η συνεισφορά της ενεργοποίησης των μουσκαρινικών υποδοχέων στον ρυθμό εμφάνισης μεσοκρυσικού τύπου εκφορτίσεων έχει αυξηθεί στα PTZ πειραματόζωα.

Από τα προαναφερθέντα, η διαφορά μεταξύ τομών κροταφικού και διαφραγματικού ιπποκάμπου μπορεί να είναι επαρκώς δικαιολογήσιμη από την μεγαλύτερη αναλογία NMDA:AMPA υποδοχέων στον διαφραγματικό ιπποκάμπο έναντι του κροταφικού (Pandis et al., 2006), σε συνδυασμό με την συνεργιστική δράση μουσκαρινικών και NMDA υποδοχέων (Markram and Segal, 1990). Η διαφορά μεταξύ φυσιολογικών και PTZ πειραματοζώων υποδεικνύει μια αυξορρύθμιση της ενεργοποίησης των διαύλων NMDA από την ενδογενή ακετυλοχολίνη στα PTZ πειραματόζωα, που πιθανώς εξηγείται καλά από προηγούμενα ευρήματα του εργαστηρίου, που υποστηρίζουν την μακροπρόθεσμη ενίσχυση της ενδοκυτταρικής διαβίβασης σήματος από την ενεργοποίηση των μουσκαρινικών υποδοχέων στο επίπεδο της σύζευξης με τις G-πρωτεΐνες στα επιληπτικού ιστορικού πειραματόζωα (Potier et al., 2005).

4.4. Συνδυασμένες τομές ιπποκάμπου-ενδορρινικού φλοιού

Τα πειράματα με τις συνδυασμένες τομές ιπποκάμπου-ενδορρινικού φλοιού προστέθηκαν ώστε να έχουμε πληρέστερη εικόνα της δραστηριότητας που εξέρχεται από τον ιπποκάμπο σε παθολογικές συνθήκες υπερσυγχρονισμού, όπως αναπαράγουμε in vitro στο μοντέλο με tENY άνευ μαγνησίου. Επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε κροταφικές τομές ιπποκάμπου-ενδορρινικού φλοιού για τα πειράματα αυτά, δοθείσης της αυξημένης διεγερσιμότητας και της ακεραιότητας του τοπικού δικτύου, που μας εξασφαλίζει η τεχνική παρασκευής εγκάρσιων τομών. Επιπλέον, αν και αναμέναμε την εμφάνιση επιληπτοειδών εκφορτίσεων κρυσικού τύπου, όπως αναφερόταν σε προηγούμενη βιβλιογραφία με παρόμοιες συνθήκες και παρασκευάσμα (Kojima et al., 1991), τέτοια δραστηριότητα δεν παρατηρήθηκε από τις ταυτόχρονες καταγραφές από την περιοχή CA3 του ιπποκάμπου (όπου ξεκινούν οι επιληπτοειδείς εκφορτίσεις) και την 5η-6η στιβάδα του μέσου ενδορρινικού φλοιού (που δέχεται την κύρια έξοδο του ιπποκάμπου, αλλά έχει και την δυνατότητα να παράγει ενδογενώς παρατεταμένες συγχρονισμένες εκφορτίσεις). Η διαφορά που παρατηρήθηκε εξ αρχής ήταν η υψηλότερη συχνότητα εκφορτίσεων στον ενδορρινικό φλοιό των PTZ πειραματοζώων, οι οποίες ακολουθούσαν χρονικά τις εκφορτίσεις της CA3. Αντιθέτως, στις τομές από τα φυσιολογικά πειραματόζωα η συχνότητα των εκφορτίσεων του ενδορρινικού φλοιού ήταν σημαντικά χαμηλότερη της CA3. Μετά την διακοπή των παραπλεύρων ινών Schaffer στην CA1, η συχνότητα παρέμεινε αμετάβλητη στις τομές από φυσιολογικά πειραματόζωα, ενώ μειώθηκε (στα ίδια επίπεδα με των φυσιολογικών) στις τομές των PTZ. Επιπλέον, η διάρκεια των εκφορτίσεων του ενδορρινικού, που ήταν αρχικά σημαντικά μικρότερη στα PTZ, αυξήθηκε και πλησίασε στις εκφορτίσεις των φυσιολογικών. Η διαφοροποίηση αυτή μεταξύ φυσιολογικών και PTZ πειραματοζώων υποδεικνύει έναν πιο στενό έλεγχο του εξερχόμενου σήματος από τον ιπποκάμπο επί της δραστηριότητας του ενδορρινικού φλοιού στα επιληπτικού ιστορικού πειραματόζωα. Θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η ευαισθησία του ενδορρινικού φλοιού στην είσοδο από τον ιπποκάμπο και η πιστότητα, με την οποία αναπαράγει/αναμεταδίδει τις επιληπτοειδείς εκφορτίσεις, εξαρτάται είτε από τοπική ρύθμιση του δικτύου μεταξύ πυραμικών του ιπποκάμπου (CA3 και CA1 κατ'επέκταση) και

των βαθέων στιβάδων του ενδορρινικού φλοιού (για παράδειγμα ενίσχυση διεγερτικών συνιστωσών) ή από παροδικές συνολικές αυξήσεις της διεγερσιμότητας. Η επαγωγή μιας τέτοιας δομικής/τοπολογικής ρύθμισης ή αύξηση της ευαισθησίας απόκρισης του ενδορρινικού φλοιού μετά από μια επιληπτική κρίση σε νεαρή ηλικία, πιθανώς διευκολύνει την εξάπλωση επιληπτικών κρίσεων σε παρακείμενες φλοιικές περιοχές και επηρεάζει άμεσα γνωσιακές λειτουργίες, που σχετίζονται με την ανάσυρση πληροφορίας από τον ιππόκαμπο.

4.5. Πιθανή εξήγηση των διαφορών σε σχέση με το μοντέλο πρόκλησης επιληπτοειδών εκφορτίσεων *in vitro* (τENY άνευ μαγνησίου και τENY με 4-αμινοπυριδίνη)

Από τη βιβλιογραφία (Buckle and Haas, 1982; Gloveli et al., 1995; Perreault and Avoli, 1991; Rutecki et al., 1987; Valenzuela and Benardo, 1995; Walther et al., 1986) γνωρίζουμε ότι τα δύο μοντέλα επιληπτοειδών εκφορτίσεων που χρησιμοποιήθηκαν, διαφέρουν ως προς την δραστηριότητα που παράγουν αλλά και μηχανιστικά: στο τENY άνευ μαγνησίου η παραγωγή επιληπτοειδών εκφορτίσεων επάγεται από την αύξηση του χρονικού ορίου μέσα στο οποίο μπορούν να αθροίζονται εκπολωτικά δυναμικά (οι δίαυλοι NMDA λειτουργούν ως ανιχνευτές σύμπτωσης εκπολώσεων) (Tsien, 2000), ενώ στο μοντέλο της 4-αμινοπυριδίνης μετατοπίζονται συνολικά οι ιδιότητες των μεμβρανών προς συνολική αύξηση της διεγερσιμότητας. Δηλαδή ενώ στο πρώτο επιτυγχάνεται αύξηση του συγχρονισμού του δικτύου χωρίς να επηρεάζονται τόσο σημαντικά οι συνιστώσες του όσο αυξάνεται ο χρονικός ορίζοντας ανίχνευσης εκπολωτικών εισόδων και πυροδότησης δυναμικών ενέργειας, στο δεύτερο επηρεάζονται απ'ευθείας οι συνιστώσες του δικτύου ως προς την διευκόλυνση παραγωγής δυναμικών ενέργειας. Έτσι ο συγχρονισμός ομάδων νευρώνων επιτυγχάνεται και στα δύο μοντέλα με αύξηση της πιθανότητας σύμπτωσης εκπολώσεων η οποία στο μοντέλο άνευ μαγνησίου μεσολαβείται κατά κύριο λόγο με εκτενέστερο χρονικό άθροισμα της δραστηριότητας, ενώ στο μοντέλο της αμινοπυριδίνης από την αύξηση του αριθμού των εκπολώσεων. Μια ακόμη χαρακτηριστική ιδιότητα του μοντέλου της αμινοπυριδίνης είναι η τάση της να παράγει ασθενέστερο συγχρονισμό, όπως αναμένεται από την δράση της στο ρεύμα A του καλίου, και μπορεί να παράγει σχετικά σταθερά δυναμικά σε μεγαλύτερη συχνότητα απ'αυτήν στην οποία θα πυροδοτούνταν κανονικά (με τον ανασταλτικό έλεγχο του ΙΑ σε ισχύ) (Rush and Rinzel, 1995).

Μεταξύ των δύο μοντέλων, η δράση της ενδογενούς ακετυλοχολίνης σε μουσκαρινικούς υποδοχείς μπορεί να προκαλεί διαφορετικές μεταβολές στην συχνότητα των εκφορτίσεων. Για την ακετυλοχολίνη, γνωρίζουμε ήδη από τη βιβλιογραφία αφ' ενός ότι διακόπτει το ρεύμα M του καλίου (κεφ. 1.3), μειώνοντας την δυνατότητα σταδιακής προσαρμογής (ουσιαστικά, μείωσης) της συχνότητας στην περίπτωση που παράγονται αλληπάλληλα δυναμικά ενέργειας (Destexhe and Paré, 1999), επιτρέποντας έτσι παρατεταμένα διαστήματα υψηλής συχνότητας εκφορτίσεων, αφ' ετέρου μετατοπίζει θετικά το δυναμικό της μεμβράνης, διευκολύνοντας την παραγωγή δυναμικού ενέργειας (Dodd et al., 1981; Haas, 1982).

Στο μοντέλο της αμινοπυριδίνης, καθώς αναμένεται να αυξηθεί μεταξύ άλλων και η έκλυση ακετυλοχολίνης (Tapia and Sitges, 1982), η αυξημένη διαθεσιμότητά της θα ενισχύεται περαιτέρω από τη δράση της αντιχολινεστεράσης στο πείραμά μας, οπότε θα αναμένεται και ενισχυμένο αποτέλεσμα επί της συχνότητας των εκφορτίσεων.

Στο μοντέλο της παρατεταμένης ενεργοποίησης των NMDA υποδοχέων με αφαίρεση του μαγνησίου από το τENY, με την ενεργοποίηση (κυρίως M1) μουσκαρινικών υποδοχέων, γνωρίζουμε ότι προκαλείται περαιτέρω ενίσχυση της ενεργοποίησης των ρευμάτων NMDA (Marino et al., 1998; Markram and Segal, 1990), με αποτέλεσμα (i) να διευκολύνεται η πυροδότηση δυναμικών λόγω δράσης της ακετυλοχολίνης στο δυναμικό της μεμβράνης, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, και (ii) να διευκολύνεται ο συγχρονισμός περισσότερων νευρώνων (πιθανώς με ομαδοποίηση σε λιγότερα αλλά πολυπληθέστερα σύνολα νευρώνων που πυροδοτούν ταυτόχρονα ή σχεδόν ταυτόχρονα), καθώς χαλαρώνει το χρονικό περιθώριο συγχρονισμού τους –ενισχύεται η ανίχνευση σύμπτωσης εκπολώσεων όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Ως αποτέλεσμα, θα αναμέναμε αυξημένες συχνότητες των «αθροισμένων» εκφορτίσεων πεδίου, αλλά πιθανώς χαμηλότερες σε σύγκριση, για παράδειγμα, με το μοντέλο της αμινοπυριδίνης, συνεκτιμώντας την αυξημένη διέγερση λόγω ακετυλοχολίνης στο μοντέλο της αμινοπυριδίνης, χωρίς επιπρόσθετους σημαντικούς περιορισμούς στον συγχρονισμό τους (πέραν αυτού που υπαγορεύει η τοπολογία του ανατροφοδοτούμενου δικτύου της CA3 –λ.χ. για την σύγκριση με το άλλο μοντέλο, ελάχιστη συμμετοχή των NMDA υποδοχέων στην πρόκληση των επιληπτοειδών εκφορτίσεων (Perreault and Avoli, 1991)), και της ενίσχυσης του συγχρονισμού (ακριβούς ή προσεγγιστικού) από την ενίσχυση των ρευμάτων NMDA. (Με λιγότερες ομάδες νευρώνων που πυροδοτούν ταυτόχρονα ή σχεδόν ταυτόχρονα –καθολικότερος συγχρονισμός του δικτύου– η μέγιστη συχνότητα συγχρονισμένων εκπολώσεων θα είναι μικρότερη της συχνότητας του αθροίσματος εκπολώσεων περισσότερων υπο-ομάδων νευρώνων).

Αυτή η υπόθεση για το αποτέλεσμα της ακετυλοχολίνης σε σχέση με την συχνότητα εκφορτίσεων στα δύο μο-

Συζήτηση

ντέλα, φαίνεται να συμφωνεί με το εύρημα μικρότερων συχνοτήτων εκφορτίσεων παρουσία εσερίνης (αύξησης της ενδογενούς ακετυλοχολίνης) στο μοντέλο με tENY άνευ μαγνησίου σε σύγκριση με τις υψηλότερες συχνοτήτες στο μοντέλο της αμινοπυριδίνης. Παρ'όλα αυτά, η διαφορά στην συχνότητα των εκφορτίσεων μεταξύ των δύο μοντέλων γίνεται πιο ασαφής όταν προσθέτουμε έναν εξωγενή χολινεργικό/μουςκαρινικό αγωνιστή (καρβαχόλη), πιθανώς επειδή η μεγαλύτερη άύξηση των συχνοτήτων που προκαλεί, υπερεκαλύπτει τις διαφορές αυτές.

4.6. Τεχνικά σχόλια

4.6.1 Επιλογή στατιστικών και αριθμητικών μεθόδων

Από τις μεταβλητές που εξετάστηκαν, η συχνότητα των εκφορτίσεων ακολουθούσε γενικά την κανονική κατανομή, με εξαίρεση τις σχετικές αυξήσεις στην περίπτωση της προσθήκης καρβαχόλης 1μM. Η μετατροπή των συχνοτήτων σε % σχετική μεταβολή ή % σχετική αύξηση/μείωση, παρ'ότι διευκολύνει την απεικόνιση, μεταφέρει, επίσης την διακύμανση των αρχικών τιμών της σύγκρισης και την προσθέτει αναλογικά στις τελικές, οπότε κάθε παραμετρική σύγκριση μεταξύ αρχικών και τελικών καταστάσεων καθίσταται αυτομάτως ανεφάρμοστη. Για τον λόγο αυτό οι συγκρίσεις και μεταξύ των ομάδων τομών και μεταξύ των συνθηκών καταγραφής έγιναν κατ'αρχήν με βάση τα πρωτότυπα δεδομένα.

Η δεύτερη μεταβλητή που εξετάστηκε (διάρκεια των εκφορτίσεων του ενδορρινικού) διαπιστώθηκε εξ αρχής ότι ακολουθούσε σημαντικά διαφορετική κατανομή από την κανονική και, μετά από δοκιμές, βρέθηκε ότι περιγραφόταν πληρέστερα από αθροίσματα επιμέρους κανονικών κατανομών (μίγματα καμπυλών Gaussian). Για αυτήν την περίπτωση, και επειδή ζητούμενη ήταν η σύγκριση τόσο της μεταβολής (σύγκριση 1ης τάξης) όσο και της μεταβολής μεταξύ των ομάδων (σύγκριση 2ης τάξης), χρησιμοποιήθηκαν μη παραμετρικές μέθοδοι και απ' ευθείας σύγκριση των προσαρμοσμένων εξισώσεων –η στατιστική βεβαιότητα των προσαρμογών διασφαλίστηκε με επαναλαμβανόμενες δοκιμές προσθήκης/αφαίρεσης στο πλήθος των συνιστωσών Gaussian μέχρι το p-value του Kolmogorov-Smirnov να πλησιάσει στην τιμή 1 χωρίς υπερ-προσαρμογή (“overfitting”). Τα αποτελέσματα των προσαρμογών προτιμήθηκαν για να συγκριθούν οι κατανομές έναντι μη-παραμετρικών μεθόδων, επειδή πληροφορίες που αποτυπώνονται στις σύνθετες κατανομές θα χανόταν με τη μη-παραμετρική διαδικασία. Η απόκλιση Jensen-Shannon επιλέχθηκε για την σύγκριση των μεταβάσεων, γιατί αποτελεί μια καλά μελετημένη μέθοδο (ημιάθροισμα των αμφίπλευρων αποκλίσεων Kullback-Leibler), που υπολογίζει απ' ευθείας την διαφορά στο πληροφοριακό περιεχόμενο της μετρούμενης μεταβλητής μεταξύ των καταστάσεων που ελέγχονται.

Στην περίπτωση των εκφορτίσεων της CA3 η διάρκεια των εκφορτίσεων δεν εξετάστηκε, αφ'ενός γιατί δεν φάνηκε σε καμία καταγραφή να προκύπτουν σημαντικά μεγαλύτερες ή μικρότερες εκφορτίσεις από τις επικρατούσες, αφ'ετέρου από ανάλυση προηγούμενων ευρημάτων του εργαστηρίου για διαφορετικό πείραμα αλλά με τις ίδιες συνθήκες (αδημοσίευτα δεδομένα (Karamba et al., 2009)), δεν είχαν εντοπιστεί αξιόλογες διαφορές τουλάχιστον μεταξύ των δύο άκρων του ιπποκάμπου στο tENY άνευ μαγνησίου. Παρ'όλα αυτά θα αναμέναμε με βάση τη βιβλιογραφία (Papatheodoropoulos et al., 2005) να υπάρχει μια διαφορά που δεν εντοπίστηκε (μεγαλύτερη διάρκεια εκφορτίσεων στο κροταφικό άκρο του ιπποκάμπου). Η απόκλιση ενδέχεται να οφείλεται ή (i) σε τεχνικούς λόγους (κυρίως προβλήματα απεικόνισης και αυξημένος θόρυβος της γραμμής παροχής ρεύματος του κτιρίου/απόπειρα μείωσης του θορύβου με φίλτράρισμα ή με μεσοστάθμιση των καταγραφών), ή (ii) σε διαφορές των συνθηκών καταγραφής (λ.χ. ταχύτητα ροής του tENY/επίπεδα κορεσμού οξυγόνου), ή (iii) σε διαφορές των πληθυσμών πειραματοζώων που χρησιμοποιήθηκαν. Αναπροσαρμογή αυτών των παραμέτρων και επανάληψη των μετρήσεων ίσως θα αναπαρήγαγε τα αναμενόμενα αποτελέσματα από την βιβλιογραφία, αλλά αποφεύχθηκε για την διατήρηση της συνέπειας (σταθερών συνθηκών) μεταξύ των πειραμάτων.

4.6.2 Σχετικά με την συμπερίληψη θηλυκών πειραματοζώων στο πείραμα

Τα θηλυκά πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα, προοριζόταν να συγκριθούν με τα αρσενικά, αν και όπως φάνηκε τελικά δεν εμφάνιζαν ούτε σημαντική διαφορά σε μέσες τιμές ούτε σε διακυμάνσεις. Παρ'όλο που η προσθήκη πειραματοζώων διευκολύνει την ομαδοποιημένη στατιστική ανάλυση, η διάκριση της επιπλέον μεταβλητής του φύλου απλά φαίνεται να παρέχει μια πληρέστερη εικόνα για το ρόλο του φύλου ενώ στην πραγματικότητα προκαλεί διάσπαση των συνόλων δεδομένων σε ανεπαρκή για ανάλυση υποσύνολα. Από στατιστική άποψη, συνολικά, η συμπερίληψη των θηλυκών πειραματοζώων και εφόσον επιδιώκουμε την αξιοποίηση της διάκρισης αρσενικών και θηλυκών με τους δεδομένους απρόβλεπτους αριθμούς πειραματοζώων ανά αναπαραγωγή και του λόγου αρσενικών : θηλυκά, που είναι διαθέσιμα, τελικώς περισσότερο μειώνει την αξία ή την ποιότητα των αποτελεσμάτων παρά ωφελεί, και θα έπρεπε είτε να αποφευχθεί σε μελλοντικά πειράματα (ειδικά αφού δεν βρέθηκαν διαφορές), είτε να διατηρηθεί αλλά με καθορισμό των ζητούμενων/

Συζήτηση

ερωτημάτων και ίσως της αναδιάταξης της προτεραιότητας αυτών, δοθέντων των περιορισμένων πόρων και δεδομένου ότι η διερευνητική ανάλυση έναντι του ελέγχου σαφώς ορισμένων υποθέσεων είναι λιγότερο ισχυρή στατιστικά. Για τον λόγο αυτό, αλλά κυριότερα, επειδή διαπιστώθηκε ότι δεν προέκυπταν διαφορές σε σχέση με αυτήν τη μεταβλητή για το δείγμα που χρησιμοποιήσαμε, ο ρόλος του φύλου εξαιρέθηκε από τις αναλύσεις για να έχουμε πιο αξιόπιστα αποτελέσματα.

Παρόλα αυτά, η απουσία διαφορών στο δείγμα μας, υποδηλώνει είτε ότι με τον πειραματικό μας σχεδιασμό προκύπτει ένα καλά απομονωμένο σύστημα, τουλάχιστον για τη μελέτη επιληπτοειδών εκφορτίσεων στα μοντέλα που χρησιμοποιήσαμε, είτε ότι οι διαφορές αρσενικών-θηλυκών πειραματοζώων, εάν υπάρχουν, είναι επαρκώς μικρές ώστε να υπερκαλύπτονται από τυχαίους παράγοντες που δεν έχουμε συνυπολογίσει (για παράδειγμα, stress).

4.7. Μελλοντικές κατευθύνσεις

Από τα αποτελέσματα μέχρι τώρα έχειδειχθεί ότι μια παρατεταμένη γενικευμένη επιληπτική κρίση κατά την ανάπτυξη μεταβάλλει με διαφορετικό τρόπο την χολινεργική διεγερσιμότητα στον κροταφικό και διαφραγματικό ιππόκαμπο, με μεγαλύτερες ενισχύσεις στον διαφραγματικό. Το εύρημα αυτό πιθανώς έχει φυσιολογική σημασία ειδικά σε λειτουργίες μνήμης και μάθησης, με τις οποίες σχετίζεται ο διαφραγματικός ιππόκαμπος και ενδεχομένως στην διευκόλυνση παραγωγής επιληπτικών κρίσεων. Ωστόσο, επειδή τα ευρήματά μας αντιστοιχούν σε μια τροποποίηση της φυσιολογικής δραστηριότητας τμημάτων του ιπποκάμπου *in vitro*, η απόκριση του ιπποκάμπου *in vivo*, σε φυσιολογικές συνθήκες ή συνθήκες που συνδέονται με την αύξηση της ακετυλοχολίνης (λ.χ. πλοήγηση, μάθηση) μπορεί να διαφέρει. Για τον λόγο αυτό, θα ήταν σκόπιμο να χρησιμοποιηθεί το πρωτόκολλο που ακολουθήσαμε για την επαγωγή επιληπτικών κρίσεων σε μικρή ηλικία, ακολουθούμενο από *in vivo* καταγραφή δυναμικών πεδίου και διαθέσιμης ακετυλοχολίνης στον ιππόκαμπο πειραματοζώων που υποβάλλονται σε δοκιμασίες πλοήγησης και αναγνώρισης χώρου. Τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος θα μας έδειχναν εάν η συσχέτιση διαθέσιμης ακετυλοχολίνης και ηλεκτροφυσιολογικής δραστηριότητας του ιπποκάμπου διαφέρει στα επιληπτικού ιστορικού πειραματοζώα σε σύγκριση με φυσιολογικά ζώα-μάρτυρες, σε φυσιολογικές συνθήκες.

Επίσης, παρατηρήσαμε ότι η συχνότητα του ενδορρινικού φλοιού τουλάχιστον στο ένα *in vitro* μοντέλο επιληπτοειδών εκφορτίσεων εξαρτάται σε μεγαλύτερο βαθμό στα PTZ πειραματοζώα από την συχνότητα των επιληπτοειδών εκφορτίσεων του ιπποκάμπου. Το εύρημα αυτό δείχνει πιθανώς συναπτική ενίσχυση της εισόδου του ενδορρινικού φλοιού από τον ιππόκαμπο ή αναδιαμόρφωση της τοπολογίας των συνάψεων ή αλλαγές σε μεμονωμένα συστήματα νευροδιαβιβαστών. Για την εξήγηση του μηχανισμού, με τον οποίο προκύπτει αυτή η διαφορά στα επιληπτικού ιστορικού πειραματοζώα, θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν χρώσεις διαδοχικών τομών και οπτική αναγνώριση των θέσεων συνάψεων των αξόνων από την CA1 προς τον ενδορρινικό φλοιό για να διαπιστωθεί εάν έχει προκύψει μετά την επιληπτική κρίση μια ευρύτερη αναδιάταξη του δικτύου, επίσης, διπλές καταγραφές μεταξύ συναπτικής συνδεόμενων κυττάρων της CA3/CA1 και του μέσου ενδορρινικού φλοιού για να αποκαλυφθεί πιθανή συναπτική ενίσχυση, και με τον ίδιο σχεδιασμό, δοκιμές γλουταματεργικών και GABAεργικών αγωνιστών αρχικά, και θετικών/αρνητικών νευρορυθμιστών (λ.χ. ακετυλοχολίνη) στην συνέχεια για την αποκάλυψη πιθανών αλλαγών στη νευροδιαβίβαση.

Επιπλέον, τα πειράματα των συνδυασμένων τομών πραγματοποιήθηκαν σε τομές από το κροταφικό άκρο του ιπποκάμπου, λόγω της αυξημένης του διεγερσιμότητας (κεφ. 1.2) αλλά και λόγω της ακεραιότητας του κυκλώματος ιπποκάμπου-μέσου ενδορρινικού φλοιού, που εξασφαλίζει η τεχνική παρασκευής τομών που χρησιμοποιούμε. Οι τομές διαφραγματικού ιπποκάμπου, με τον τρόπο που παρασκευάστηκαν δεν θα περιείχαν επαρκή τμήματα του μέσου ενδορρινικού φλοιού σύμφωνα με τον άτλαντα του Paxinos. Ωστόσο, η συμμετοχή του διαφραγματικού ιπποκάμπου σε λειτουργίες μνήμης έχει περιγραφεί καλά στην βιβλιογραφία (κεφ. 1.2), οπότε πιθανώς η παρασκευή διαφορετικών τομών (τομή σε διαφορετικό επίπεδο από το εγκάρσιο) θα μας επέτρεπε να προσδιορίσουμε εάν η μεταβολή της απόκρισης του ενδορρινικού φλοιού στην έξοδο του ιπποκάμπου μετά από την επιληπτική κρίση σε νεαρή ηλικία, παρουσιάζεται επίσης και για το διαφραγματικό άκρο του ιπποκάμπου. Το αποτέλεσμα αυτό πιθανώς θα εξηγούσε πληρέστερα τις μακροπρόθεσμες γνωσιακές επιπτώσεις του status epilepticus σε νεαρά άτομα.

Τέλος, καθώς έχουμε εντοπίσει με τα μέχρι τώρα ευρήματα, σε συνδυασμό με προηγούμενα αποτελέσματα του εργαστηρίου, ότι η αυξημένη αποτελεσματικότητα της ακετυλοχολίνης στην ρύθμιση της συχνότητας μεσοκρυστικού τύπου δραστηριότητας σε πειραματοζώα επιληπτικού ιστορικού ανάγεται σε αυξορρόθμιση της ενεργοποίησης των G-πρωτεϊνών που συνδέονται με τους μουςκαρινικούς υποδοχείς, πιθανώς μια εκτεταμένη βιοχημική μελέτη σύγκρισης δεύτερων αγγελιοφόρων και μεταγραφικών παραγόντων μεταξύ φυσιολογικών και «επιληπτικών» πειραματοζώων, ίσως αποκάλυπτε κάποιους στόχους φαρμακευτικής παρέμβασης για την αποτροπή μακροπρόθεσμα επαναλαμβανόμενων κρίσεων μετά από ένα επεισόδιο Status epilepticus σε παιδιά,

Συζήτηση

εφ'όσον διαπιστωθεί θετική συσχέτισή του με τις μεσοκρυσικές εκφορτίσεις.



Παράρτημα

5.1. Τμήμα 1. Αναλυτικός υπολογισμός απόκλισης Jensen-Shannon

Θεωρούμε δύο πυκνότητες πιθανότητας $p_1(x)$, $p_2(x)$ κατά μήκος συνεχούς πραγματικής μεταβλητής x και το ημιάθροισμά τους $m(x) \stackrel{\text{def}}{=} (p_1 + p_2)(x) / 2$.

Η απόκλιση Jensen-Shannon υπολογίζεται ως το ημιάθροισμα των αποστάσεων Kullback-Leibler της κάθε πυκνότητας p από την μέση πυκνότητα m :

$$D_{JS}(p_1 \parallel p_2) = \frac{1}{2} D_{KL}(p_1, m) + \frac{1}{2} D_{KL}(p_2, m)$$

Στην περίπτωση μας που θέλουμε να συγκρίνουμε τις αλλαγές πριν και μετά την τομή των ινών Schaffer, μεταξύ φυσιολογικών και PTZ πειραματοζώων, ορίζουμε τους λόγους των κατανομών (πυκνοτήτων πιθανότητας) μετά την τομή προς πριν την τομή. Η συνάρτηση που προκύπτει μας δίνει ένα μέτρο του πόσο και προς τα πού μετακινήθηκε η κατανομή, σε ευθέως ανάλογους όρους.

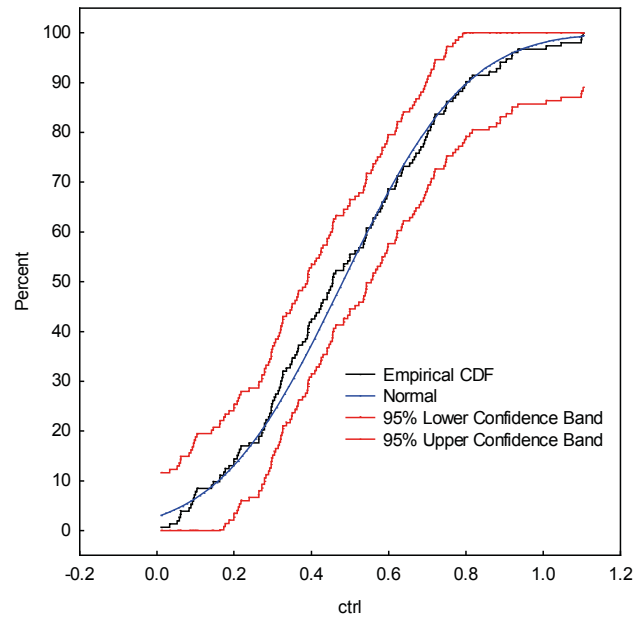
Επειδή για τον υπολογισμό χρειάζονται συναρτήσεις πεπερασμένου ολοκληρώματος στο $(-\infty, +\infty)$, αντί των λόγων των κατανομών υπολογίζουμε την «εκτιμώμενη» κατανομή μετά την τομή στην CA1 των PTZ πειραματοζώων (ο λόγος των φυσιολογικών πολλαπλασιασμένος με την αρχική κατανομή των PTZ), η οποία θα απέχει από την πραγματική τους κατανομή όσο ακριβώς και οι λόγοι των κατανομών φυσιολογικών και PTZ. Επομένως, αν p_k είναι η πραγματική κατανομή των διαρκειών μετά την τομή στην CA1 των συνδυασμένων τομών των PTZ πειραματοζώων και $\hat{p}_k$ η εκτιμώμενη, η απόκλιση Jensen-Shannon των δύο λόγων κατανομών υπολογίζεται από την εκφραση:

$$\frac{1}{2\ln 2} \int_{-\infty}^{+\infty} p_k(x) \ln \left(\frac{p_k(x)}{m_k} \right) dx + \frac{1}{2\ln 2} \int_{-\infty}^{+\infty} \hat{p}_k(x) \ln \left(\frac{\hat{p}_k(x)}{m_k} \right) dx$$

5.2. Τμήμα 2. Εξέταση κανονικότητας μεταβλητών

Πριν τον έλεγχο υποθέσεων, για όλες τις ομάδες ελέγχεται η κανονικότητα των εξαρτημένων μεταβλητών με το τεστ Kolmogorov-Smirnov, το οποίο παράγει μια τιμή του στατιστικού d και την αντίστοιχη τιμή p . Οι τιμές p που υπολογίζει αφορούν στο αν η εμπειρική κατανομή του δείγματος διαφέρει σημαντικά σε διασπορά ή σε σχήμα από την κανονική κατανομή (για $p < 0.05$). Για την περίπτωση των αρχικών συχνοτήτων, καθώς γνωρίζουμε από τη βιβλιογραφία την διαφορά στις συχνότητες εκφορτίσεων μεταξύ κροταφικού και διαφραγματικού άκρου, γίνεται η σχετική διάκριση και ελέγχεται η κανονικότητα ξεχωριστά στις διαφραγματικές και ξεχωριστά στις κροταφικές τομές.

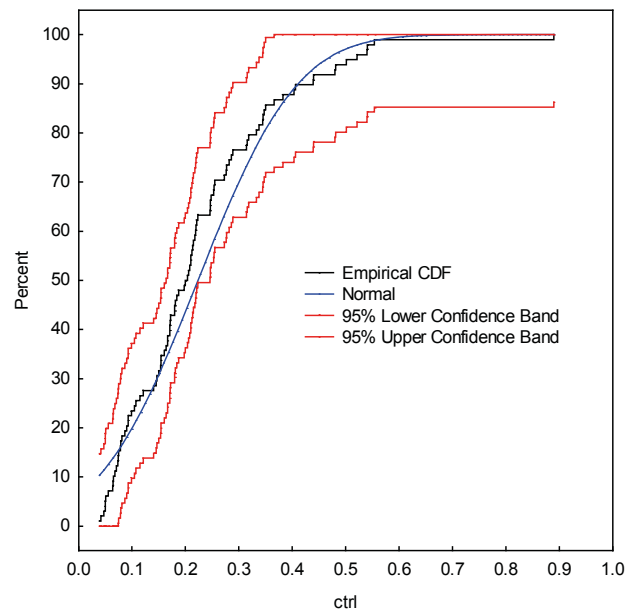
Κροταφικό άκρο: $KS\ 0.7 < p < 0.75$, n.s.



Διάγραμμα εμπειρικής αθροιστικής κατανομής (μαύρο) με διάστημα εμπιστοσύνης 95% (κόκκινα όρια) και προσαρμοσμένη αθροιστική κανονική κατανομή (μπλε). Στον οριζόντιο άξονα οι τιμές της μεταβλητής της οποίας εξετάζεται η κανονικότητα, στον κάθετο άξονα το ποσοστό των παρατηρήσεων.

Παράρτημα

Διαφραγματικό άκρο: KS $0.05 < p < 0.10$, n.s.

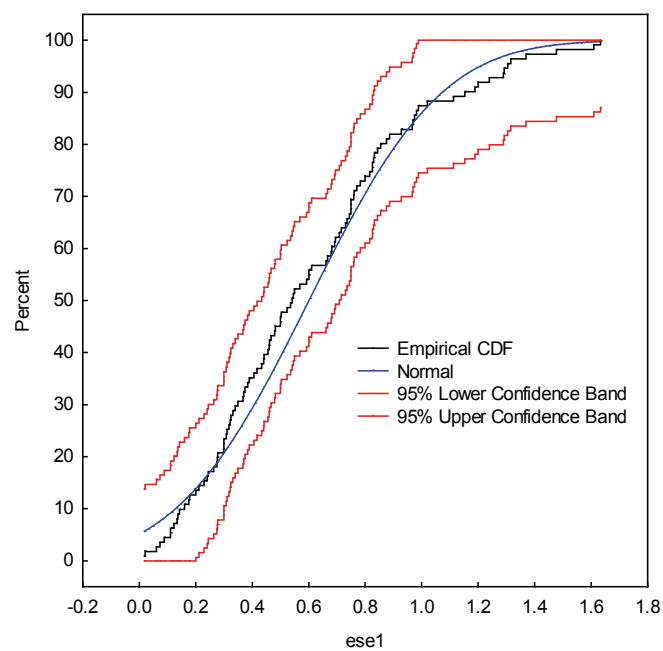


Διάγραμμα εμπειρικής αθροιστικής κατανομής (μαύρο) με διάστημα εμπιστοσύνης 95% (κόκκινα όρια) και προσαρμοσμένη αθροιστική κανονική κατανομή (μπλε). Στον οριζόντιο άξονα οι τιμές της μεταβλητής της οποίας εξετάζεται η κανονικότητα, στον κάθετο άξονα το ποσοστό των παρατηρήσεων.

Σε όλες τις υπο-ομάδες κατά τα φαρμακολογικά πειράματα η κανονικότητα δεν παραβιάζεται:

- Αρσενικά – θηλυκά: KS $d = 0.11$, $0.10 < p < 0.15$, ns – $d = 0.14$, $0.15 < p < 0.20$, ns
- Κροταφικός – διαφραγματικός ιππόκαμπος: $d = 0.06$, ns – $d = 0.15$, $0.05 < p < 0.10$, ns
- Φυσιολογικά – PTZ: $d = 0.09$, ns – $d = 0.12$, $0.15 < p < 0.20$, ns

Έλεγχος κανονικότητας συχνοτήτων μετά από προσθήκη εσερίνης στο μέσο διαβροχής: KS $d = 0.08$, ns.

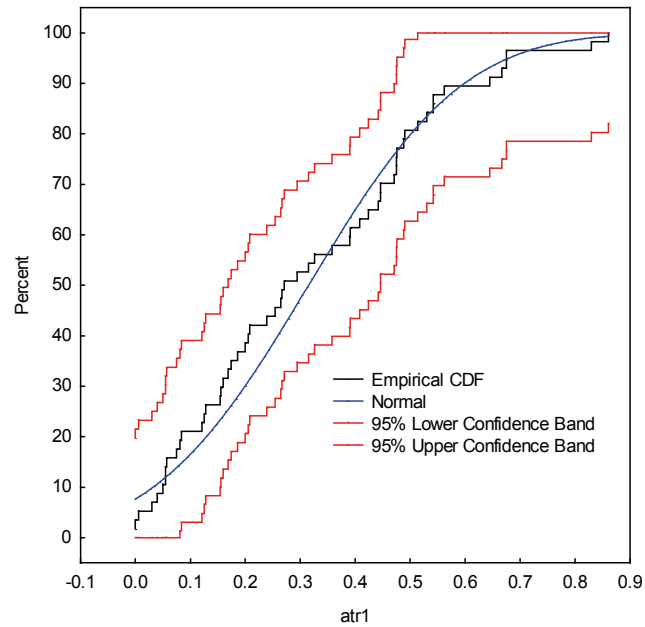


Διάγραμμα εμπειρικής αθροιστικής κατανομής (μαύρο) με διάστημα εμπιστοσύνης 95% (κόκκινα όρια) και προσαρμοσμένη αθροιστική κανονική κατανομή (μπλε). Στον οριζόντιο άξονα οι τιμές της μεταβλητής της οποίας εξετάζεται η κανονικότητα, στον κάθετο άξονα το ποσοστό των παρατηρήσεων.

Παράρτημα

Η σχετική αύξηση της συχνότητας, επίσης, δεν απέχει σημαντικά από την κανονική κατανομή: $KS\ d = 0.27$, $0.5 < p < 0.1$, ns

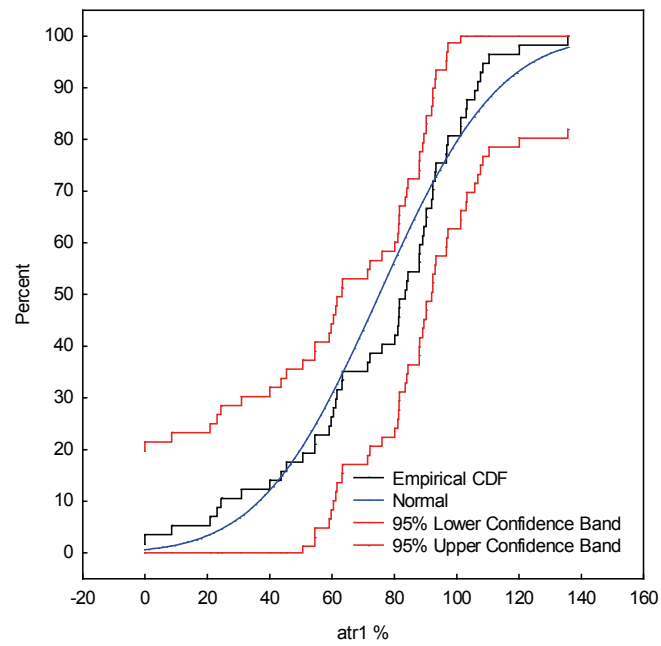
Έλεγχος κανονικότητας συχνοτήτων μετά από προσθήκη ατροπίνης στο μέσο διαβροχής: $KS\ d = 0.11$, ns.



Διάγραμμα εμπειρικής αθροιστικής κατανομής (μαύρο) με διάστημα εμπιστοσύνης 95% (κόκκινα όρια) και προσαρμοσμένη αθροιστική κανονική κατανομή (μπλε). Στον οριζόντιο άξονα οι τιμές της μεταβλητής της οποίας εξετάζεται η κανονικότητα, στον κάθετο άξονα το ποσοστό των παρατηρήσεων.

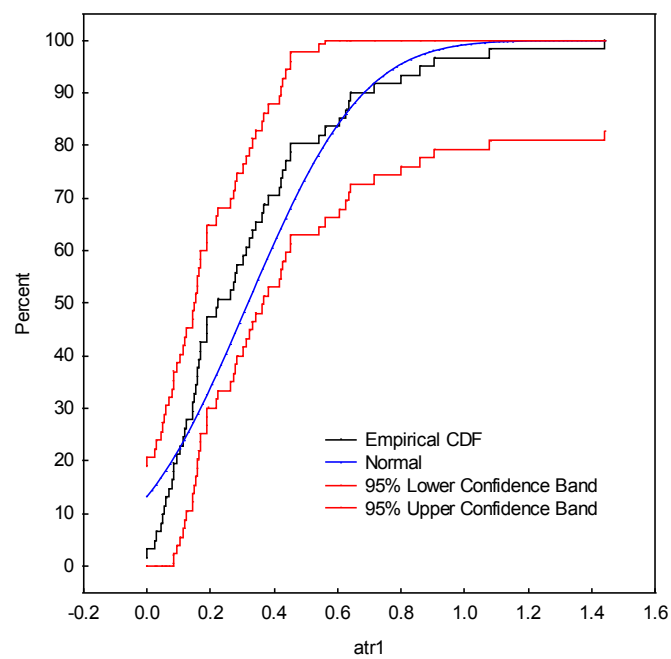
Παράρτημα

Η σχετική μεταβολή της συχνότητας, επίσης, δεν απέχει σημαντικά από την κανονική κατανομή: KS d = 0.16, $p < 0.1$, ns



Διάγραμμα εμπειρικής αθροιστικής κατανομής (μαύρο) με διάστημα εμπιστοσύνης 95% (κόκκινα όρια) και προσαρμοσμένη αθροιστική κανονική κατανομή (μπλε). Στον οριζόντιο άξονα οι τιμές της μεταβλητής της οποίας εξετάζεται η κανονικότητα, στον κάθετο άξονα το ποσοστό των παρατηρήσεων.

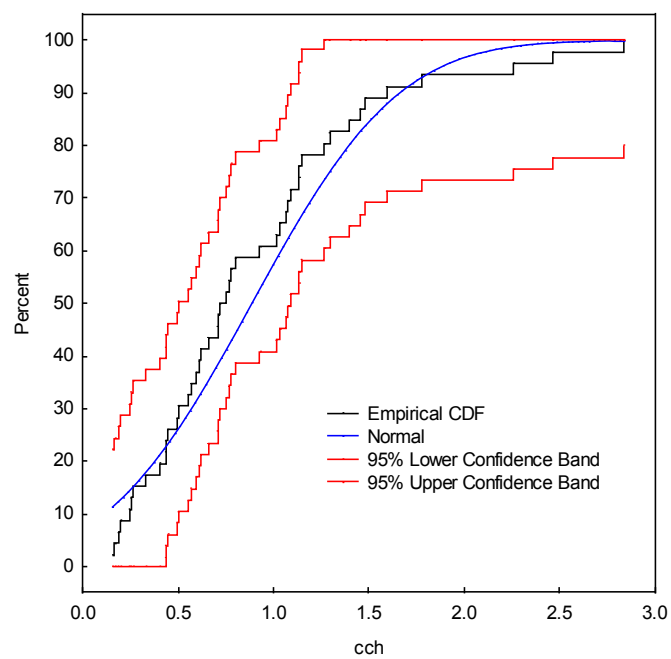
Έλεγχος κανονικότητας συχνοτήτων μετά από προσθήκη εσερίνης και ατροπίνης στο μέσο διαβροχής: KS d = 0.15, ns.



Διάγραμμα εμπειρικής αθροιστικής κατανομής (μαύρο) με διάστημα εμπιστοσύνης 95% (κόκκινα όρια) και προσαρμοσμένη αθροιστική κανονική κατανομή (μπλε). Στον οριζόντιο άξονα οι τιμές της μεταβλητής της οποίας εξετάζεται η κανονικότητα, στον κάθετο άξονα το ποσοστό των παρατηρήσεων.

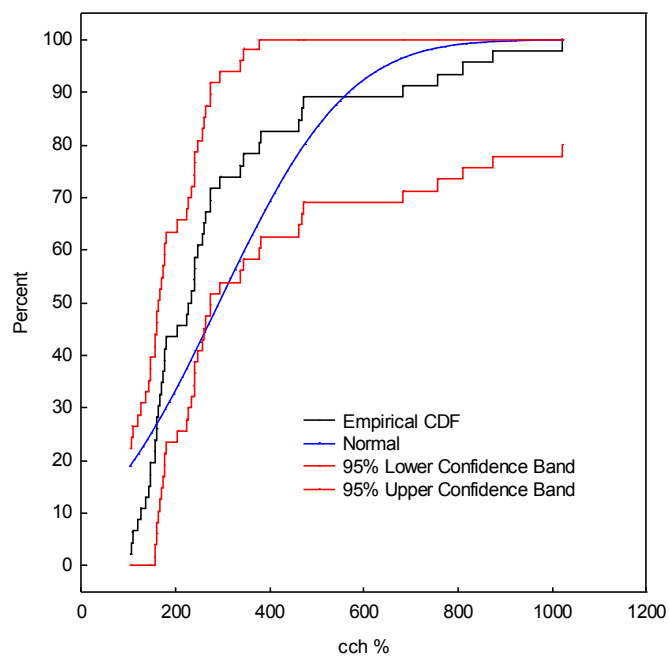
Παράρτημα

Έλεγχος κανονικότητας συχνοτήτων μετά από προσθήκη ατροπίνης στο μέσο διαβροχής: KS d = 0.26, ns.



Διάγραμμα εμπειρικής αθροιστικής κατανομής (μαύρο) με διάστημα εμπιστοσύνης 95% (κόκκινα όρια) και προσαρμοσμένη αθροιστική κανονική κατανομή (μπλε). Στον οριζόντιο άξονα οι τιμές της μεταβλητής της οποίας εξετάζεται η κανονικότητα, στον κάθετο άξονα το ποσοστό των παρατηρήσεων.

Η σχετική μεταβολή της συχνότητας, επίσης, δεν απέχει σημαντικά από την κανονική κατανομή: KS d = 0.25, $p < 0.01$.

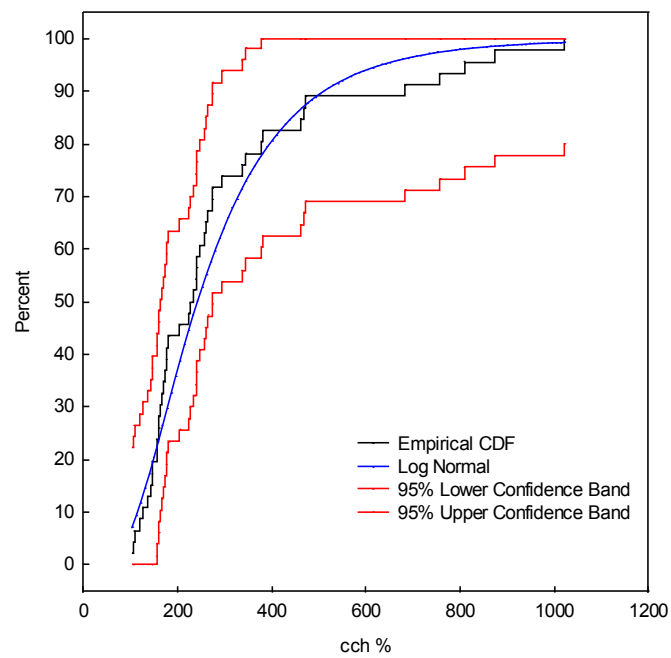


Διάγραμμα εμπειρικής αθροιστικής κατανομής (μαύρο) με διάστημα εμπιστοσύνης 95% (κόκκινα όρια) και προσαρμοσμένη αθροιστική κανονική κατανομή (μπλε). Στον οριζόντιο άξονα οι τιμές της μεταβλητής της οποίας εξετάζεται η κανονικότητα, στον κάθετο άξονα το ποσοστό των παρατηρήσεων.

Επειδή παραβιάζεται η κανονικότητα, και για να μην καταφύγουμε στη χρήση μετασχηματισμού Box-Cox, ελέγχθηκε και η απόκλιση από την log-Normal κατανομή.

Παράρτημα

Η log-Normal κατανομή δεν απορρίπτεται, $K-S\ d=0.13$, $0.35 < p < 0.40$, οπότε θα χρησιμοποιηθεί το αντίστοιχο γενικευμένο γραμμικό μοντέλο αντί για την απλή ANOVA, όπου χρειάζεται για την σχετική αύξηση της συχνότητας από την καρβαχόλη.



Διάγραμμα εμπειρικής αθροιστικής κατανομής (μαύρο) με διάστημα εμπιστοσύνης 95% (κόκκινα όρια) και προσαρμοσμένη αθροιστική κανονική κατανομή (μπλε). Στον οριζόντιο άξονα οι τιμές της μεταβλητής της οποίας εξετάζεται η κανονικότητα, στον κάθετο άξονα το ποσοστό των παρατηρήσεων.

5.3. Τμήμα 3. Συγκρίσεις αρσενικών-θηλυκών

Ακολούθως παρατίθενται οι πλήρεις πίνακες με τα δεδομένα (όπου υπάρχουν) για τις συγκρίσεις των φαρμακολογικών αποτελεσμάτων, που περιγράφηκαν συνοπτικά στα αποτελέσματα. Στις περιπτώσεις όπου σημεία δεδομένων δεν υπάρχουν, σημειώνεται (n=0) στους αντίστοιχους πίνακες.

Τα στατιστικά αποτελέσματα (t-test p-values) αν και ισχύουν για όλες τις περιπτώσεις, ίσως είναι δυσνόητα όπου (n=1) καθώς για την εξήγησή τους απαιτείται αναφορά στον ορισμό του ελέγχου υποθέσεων με t-test: Η τιμές p-value απεικονίζουν την πιθανότητα η συγκεκριμένη μέση τιμή (έστω και με n=1) να μην έχει προέλθει από ένα δείγμα της ίδιας μέσης τιμής με το δεύτερο συγκρινόμενο δείγμα.

Σύγκριση τομών αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων παρουσία εσερίνης (10μM)

Η συχνότητα εκφορτίσεων παρουσία εσερίνης δεν διαφέρει σημαντικά μεταξύ των τομών αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων. Η σχετική μεταβολή (%) επίσης δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ τομών αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων.

Οι τιμές στους ακόλουθους πίνακες (21α-η), αν και δεν υποστηρίζουν την θεώρηση διαφορών μεταξύ αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων σε σχέση με την επίδραση της εσερίνης στην συχνότητα εκφορτίσεων ή στην μεταβολή της συχνότητας που προκαλεί η εσερίνη, δεν παρέχουν την εγγύηση για την εξαγωγή συμπερασμάτων, λόγω μικρών και ανισόρροπα κατανεμημένων δειγμάτων.

Πίνακας 21α: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική μεταβολή της, παρουσία εσερίνης (10μM) σε κροταφικές τομές φυσιολογικών αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων, σε tENY άνευ μαγνησίου.

Συγκρινόμενη μεταβλητή	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών αρσενικών πειραματοζώων	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών θηλυκών πειραματοζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.63 ± 0.074 , n = 24	0.744 ± 0 , n = 1	0.76113
% της αρχικής συχνότητας	168.432 ± 16.482 , n = 24	134.054 ± 0 , n = 1	0.68043

Πίνακας 21β: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική μεταβολή της παρουσία εσερίνης (10μM) σε διαφραγματικές τομές φυσιολογικών αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων, σε tENY άνευ μαγνησίου.

Συγκρινόμενη μεταβλητή	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών αρσενικών πειραματοζώων	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών θηλυκών πειραματοζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.403 ± 0.101 , n = 4	0.316 ± 0.076 , n = 8	0.51870
% της αρχικής συχνότητας	204.269 ± 19.763 , n = 4	158.911 ± 25.957 , n = 8	0.28193

Παράρτημα

Πίνακας 21γ: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική μεταβολή της παρουσία εσερίνης (10μM) σε κροταφικές τομές PTZ αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων, σε τΕΝΥ άνευ μαγνησίου.

Συγκρινόμενη μεταβλητή	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών αρσενικών πειραματοζώων	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών θηλυκών πειραματοζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.551 ± 0.095 , n = 14	0.581 ± 0.134 , n = 6	0.86528
% της αρχικής συχνότητας	195.427 ± 26.686 , n = 14	176.866 ± 31.138 , n = 6	0.69016

Πίνακας 21δ: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική μεταβολή της παρουσία εσερίνης (10μM) σε διαφραγματικές τομές PTZ αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων, σε τΕΝΥ άνευ μαγνησίου.

Συγκρινόμενη μεταβλητή	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών αρσενικών πειραματοζώων	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών θηλυκών πειραματοζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.304 ± 0.061 , n = 10	0.347 ± 0.074 , n = 5	0.67653
% της αρχικής συχνότητας	292.536 ± 49.347 , n = 10	309.55 ± 104.017 , n = 5	0.86786

Πίνακας 21ε: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική μεταβολή της παρουσία εσερίνης (10μM) σε κροταφικές τομές φυσιολογικών αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων, σε τΕΝΥ με 50 μM 4-αμινοπυριδίνης.

Συγκρινόμενη μεταβλητή	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών αρσενικών πειραματοζώων	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών θηλυκών πειραματοζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.863 ± 0.189 , n = 8	1.063 ± 0.108 , n = 7	0.39394
% της αρχικής συχνότητας	267.521 ± 72.373 , n = 8	202.842 ± 31.793 , n = 7	0.45073

Πίνακας 21ζ: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική μεταβολή της παρουσία εσερίνης (10μM) σε διαφραγματικές τομές φυσιολογικών αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων, σε τΕΝΥ με 50 μM 4-αμινοπυριδίνης.

Συγκρινόμενη μεταβλητή	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών αρσενικών πειραματοζώων	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών θηλυκών πειραματοζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.461 ± 0.021 , n = 2	0.547 ± 0.091 , n = 8	0.66639
% της αρχικής συχνότητας	264.425 ± 48.757 , n = 2	244.778 ± 55.459 , n = 8	0.87146

Παράρτημα

Πίνακας 21ζ: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική μεταβολή της παρουσία εσερίνης (10μM) σε κροταφικές τομές PTZ αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων, σε τΕΝΥ με 50 μM 4-αμινοπυριδίνης.

Συγκρινόμενη μεταβλητή	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών αρσενικών πειραματοζώων	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών θηλυκών πειραματοζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	1.022 ± 0.089 , n = 3	0.859 ± 0.147 , n = 6	0.48913
% της αρχικής συχνότητας	226.72 ± 38.709 , n = 3	277.959 ± 99.824 , n = 6	0.73988

Πίνακας 21η: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική μεταβολή της παρουσία εσερίνης (10μM) σε διαφραγματικές τομές PTZ αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων, σε τΕΝΥ με 50 μM 4-αμινοπυριδίνης.

Συγκρινόμενη μεταβλητή	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών αρσενικών πειραματοζώων	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών θηλυκών πειραματοζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.569 ± 0 , n = 1	0.573 ± 0.043 , n = 4	0.97164
% της αρχικής συχνότητας	170.885 ± 0 , n = 1	233.672 ± 23.608 , n = 4	0.31985

Παράρτημα

Σύγκριση τομών αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων παρουσία ατροπίνης (1μM)

Η συχνότητα εκφορτίσεων παρουσία ατροπίνης καθώς και η σχετική μεταβολή της συχνότητας (%) δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τομών αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων.

Οι τιμές στους ακόλουθους πίνακες (22α-η), αν και δεν υποστηρίζουν την θεώρηση διαφορών μεταξύ αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων σε σχέση με την επίδραση της ατροπίνης στην συχνότητα εκφορτίσεων ή στην μεταβολή της συχνότητας που προκαλεί η ατροπίνη, δεν παρέχουν την εγγύηση για την εξαγωγή συμπερασμάτων, λόγω μικρών και ανισόρροπα κατανεμημένων δειγμάτων.

Πίνακας 22α: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική μεταβολή της παρουσία ατροπίνης (1μM) σε κροταφικές τομές φυσιολογικών αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων, σε tENY άνευ μαγνησίου.

Συγκρινόμενη μεταβλητή	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών αρσενικών πειραματοζώων	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών θηλυκών πειραματοζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.473 ± 0.05 , n = 17	0.238 ± 0.033 , n = 2	0.13718
% της αρχικής συχνότητας	83.023 ± 5.62 , n = 17	55.523 ± 32.464 , n = 2	0.16080

Πίνακας 22β: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική μεταβολή της παρουσία ατροπίνης (1μM) σε διαφραγματικές τομές φυσιολογικών αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων, σε tENY άνευ μαγνησίου.

Συγκρινόμενη μεταβλητή	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών αρσενικών πειραματοζώων	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών θηλυκών πειραματοζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.159 ± 0.08 , n = 5	0.16 ± 0 , n = 1	0.99694
% της αρχικής συχνότητας	81.314 ± 14.484 , n = 5	110.345 ± 0 , n = 1	0.45915

Πίνακας 22γ: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική μεταβολή της παρουσία ατροπίνης (1μM) σε κροταφικές τομές PTZ αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων, σε tENY άνευ μαγνησίου.

Συγκρινόμενη μεταβλητή	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών αρσενικών πειραματοζώων	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών θηλυκών πειραματοζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)		n = 0	-
% της αρχικής συχνότητας		n = 0	-

Παράρτημα

Πίνακας 22δ: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική μεταβολή της παρουσία ατροπίνης (1μM) σε διαφραγματικές τομές PTZ αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων, σε tENY άνευ μαγνησίου.

Συγκρινόμενη μεταβλητή	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών αρσενικών πειραματοζώων	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών θηλυκών πειραματοζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.39 ± 0 , n = 1	0.06 ± 0.008 , n = 3	0.00214
% της αρχικής συχνότητας	72.222 ± 0 , n = 1	75.954 ± 12.699 , n = 3	0.89667

Πίνακας 22ε: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική μεταβολή της παρουσία ατροπίνης (1μM) σε κροταφικές τομές φυσιολογικών αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων, σε tENY με 50 μM 4-αμινοπυριδίνης.

Συγκρινόμενη μεταβλητή	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών αρσενικών πειραματοζώων	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών θηλυκών πειραματοζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.187 ± 0.187 , n = 3	0.25 ± 0.22 , n = 2	0.84303
% της αρχικής συχνότητας	20.386 ± 20.386 , n = 3	56.127 ± 25.199 , n = 2	0.34967

Πίνακας 22ζ: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική μεταβολή της παρουσία ατροπίνης (1μM) σε διαφραγματικές τομές φυσιολογικών αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων, σε tENY με 50 μM 4-αμινοπυριδίνης.

Συγκρινόμενη μεταβλητή	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών αρσενικών πειραματοζώων	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών θηλυκών πειραματοζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.258 ± 0.033 , n = 4	0.276 ± 0.148 , n = 2	0.87107
% της αρχικής συχνότητας	93.917 ± 1.823 , n = 4	85.841 ± 2.334 , n = 2	0.05893

Πίνακας 22ζ: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική μεταβολή της παρουσία ατροπίνης (1μM) σε κροταφικές τομές PTZ αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων, σε tENY με 50 μM 4-αμινοπυριδίνης.

Συγκρινόμενη μεταβλητή	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών αρσενικών πειραματοζώων	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών θηλυκών πειραματοζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.355 ± 0.148 , n = 3	0.314 ± 0.128 , n = 2	0.85971
% της αρχικής συχνότητας	66.118 ± 22.758 , n = 3	67.411 ± 22.006 , n = 2	0.97175

Παράρτημα

Πίνακας 22η: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική μεταβολή της παρουσία ατροπίνης (1μM) σε διαφραγματικές τομές PTZ αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων, σε τΕΝΥ με 50 μM 4-αμινοπυριδίνης.

Συγκρινόμενη μεταβλητή	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών αρσενικών πειραματοζώων	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών θηλυκών πειραματοζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.125 ± 0.066 , n = 3	0.182 ± 0.176 , n = 2	0.74110
% της αρχικής συχνότητας	55.659 ± 19.659 , n = 3	40.002 ± 31.426 , n = 2	0.68109

Παράρτημα

Σύγκριση τομών αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων παρουσία καρβαχόλης (1μM)

Η συχνότητα εκφορτίσεων παρουσία καρβαχόλης καθώς και η σχετική μεταβολή της συχνότητας (%) δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τομών αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων.

Οι τιμές στους ακόλουθους πίνακες (23α-η), αν και δεν υποστηρίζουν την θεώρηση διαφορών μεταξύ αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων σε σχέση με την επίδραση της καρβαχόλης στην συχνότητα εκφορτίσεων ή στην μεταβολή της συχνότητας που προκαλεί η καρβαχόλη, δεν παρέχουν την εγγύηση για την εξαγωγή συμπερασμάτων, λόγω μικρών και ανισόρροπα κατανεμημένων δειγμάτων.

Πίνακας 23α: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική μεταβολή της παρουσία καρβαχόλης (1μM) σε κροταφικές τομές φυσιολογικών αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων, σε tENY άνευ μαγνησίου.

Συγκρινόμενη μεταβλητή	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών αρσενικών πειραματοζώων	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών θηλυκών πειραματοζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	1.473 ± 0.384 , n = 6	0.767 ± 0 , n = 1	0.51781
% της αρχικής συχνότητας	315.17 ± 114.451 , n = 6	221.689 ± 0 , n = 1	0.76999

Πίνακας 23β: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική μεταβολή της παρουσία καρβαχόλης (1μM) σε διαφραγματικές τομές φυσιολογικών αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων, σε tENY άνευ μαγνησίου.

Συγκρινόμενη μεταβλητή	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών αρσενικών πειραματοζώων	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών θηλυκών πειραματοζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)		n = 0	-
% της αρχικής συχνότητας		n = 0	-

Πίνακας 23γ: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική μεταβολή της παρουσία καρβαχόλης (1μM) σε κροταφικές τομές PTZ αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων, σε tENY άνευ μαγνησίου.

Συγκρινόμενη μεταβλητή	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών αρσενικών πειραματοζώων	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών θηλυκών πειραματοζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.607 ± 0 , n = 1	1.164 ± 0.317 , n = 5	0.51269
% της αρχικής συχνότητας	155.297 ± 0 , n = 1	261.782 ± 69.433 , n = 5	0.56520

Παράρτημα

Πίνακας 23δ: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική μεταβολή της παρουσία καρβαχόλης σε διαφραγματικές τομές PTZ αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων, σε τΕΝΥ άνευ μαγνησίου.

Συγκρινόμενη μεταβλητή	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών αρσενικών πειραματοζώων	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών θηλυκών πειραματοζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.156 ± 0, n = 1	0.313 ± 0.081, n = 3	0.43246
% της αρχικής συχνότητας	240.495 ± 0, n = 1	214.91 ± 29.058, n = 3	0.70277

Πίνακας 23ε: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική μεταβολή της παρουσία καρβαχόλης (1μM) σε κροταφικές τομές φυσιολογικών αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων, σε τΕΝΥ με 50 μM 4-αμινοπυριδίνης.

Συγκρινόμενη μεταβλητή	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών αρσενικών πειραματοζώων	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών θηλυκών πειραματοζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	1.152 ± 0.053, n = 4	0.857 ± 0.254, n = 4	0.30022
% της αρχικής συχνότητας	229.19 ± 41.153, n = 4	283.835 ± 62.067, n = 4	0.49074

Πίνακας 23ζ: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική μεταβολή της παρουσία καρβαχόλης σε διαφραγματικές τομές φυσιολογικών αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων, σε τΕΝΥ με 50 μM 4-αμινοπυριδίνης.

Συγκρινόμενη μεταβλητή	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών αρσενικών πειραματοζώων	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών θηλυκών πειραματοζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	0.405 ± 0, n = 1	0.401 ± 0.217, n = 2	0.99374
% της αρχικής συχνότητας	146.209 ± 0, n = 1	221.839 ± 114.174, n = 2	0.76746

Πίνακας 23ζ: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική μεταβολή της παρουσία καρβαχόλης (1μM) σε κροταφικές τομές PTZ αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων, σε τΕΝΥ με 50 μM 4-αμινοπυριδίνης.

Συγκρινόμενη μεταβλητή	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών αρσενικών πειραματοζώων	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών θηλυκών πειραματοζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)	1.778 ± 0, n = 1	1.154 ± 0.144, n = 5	0.15226
% της αρχικής συχνότητας	256.485 ± 0, n = 1	258.316 ± 40.266, n = 5	0.98608

Παράρτημα

Πίνακας 23η: Συχνότητα εκφορτίσεων και σχετική μεταβολή της παρουσία καρβαχόλης (1μM) σε διαφραγματικές τομές PTZ αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων, σε τΕΝΥ με 50 μM 4-αμινοπυριδίνης.

Συγκρινόμενη μεταβλητή	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών αρσενικών πειραματοζώων	Συχνότητα (Hz) εκφορτίσεων τομών θηλυκών πειραματοζώων	Στατιστικό αποτέλεσμα (t-test p-value)
Συχνότητα (Hz)		n = 0	-
% της αρχικής συχνότητας		n = 0	-



Αναφορές

Αναφορές

- (1993). Treatment of convulsive status epilepticus: Recommendations of the epilepsy foundation of america's working group on status epilepticus. *JAMA* 270, 854–859.
- (2007). *The Hippocampus Book* (Oxford University Press).
- Adhikari, A., Topiwala, M.A., Gordon, J.A., 2010. Synchronized Activity between the Ventral Hippocampus and the Medial Prefrontal Cortex during Anxiety. *Neuron* 65, 257–269.
- Aicardi, J., and Chevrie, J.J. (1970). Convulsive Status Epilepticus in Infants and Children. *Epilepsia* 11, 187–197.
- Amaral, D.G., 1993. Emerging principles of intrinsic hippocampal organization. *Current Opinion in Neurobiology* 3, 225–229.
- Amaral, D.G., Witter, M.P., 1989. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. *Neuroscience* 31, 571–591.
- Andersen, P., Bliss, T., Skrede, K., 1971. Unit analysis of hippocampal population spikes. *Experimental Brain Research* 13, 208–221.
- Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., O'Keefe, J. (Eds.), 2007. *The Hippocampus Book*. Oxford University Press.
- Auerbach, J.M., and Segal, M. (1996). Muscarinic receptors mediating depression and long-term potentiation in rat hippocampus. *J Physiol* 492, 479–493.
- Avoli, M., D'Antuono, M., Louvel, J., Köhling, R., Biagini, G., Pumain, R., D'Arcangelo, G., and Tancredi, V. (2002). Network and pharmacological mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system in vitro. *Prog. Neurobiol.* 68, 167–207.
- Barkmeier, D.T., and Loeb, J.A. (2009). An Animal Model to Study the Clinical Significance of Interictal Spiking. *Clin. EEG Neurosci. Off. J. Eeg Clin. Neurosci. Soc. Encs* 40, 234–238.
- Barmashenko, G., Hefft, S., Aertsen, A., Kirschstein, T., and Köhling, R. (2011). Positive shifts of the GABAA receptor reversal potential due to altered chloride homeostasis is widespread after status epilepticus. *Epilepsia* 52, 1570–1578.
- Becker, K., Sinzig, J.K., and Holtmann, M. (2004). "Attention deficits and subclinical epileptiform discharges: are EEG diagnostics in ADHD optional or essential?" *Dev. Med. Child Neurol.* 46, 501–502.
- Bernheim, L., Mathie, A., and Hille, B. (1992). Characterization of muscarinic receptor subtypes inhibiting Ca²⁺ current and M current in rat sympathetic neurons. *PNAS* 89, 9544–9548.
- Blanco, M.M., Jr, J.G. dos S., Perez-Mendes, P., Kohek, S.R.B., Cavarsan, C.F., Hummel, M., Albuquerque, C., and Mello, L.E. (2008). Assessment of seizure susceptibility in pilocarpine epileptic and nonepileptic Wistar rats and of seizure reinduction with pentylene-tetrazole and electroshock models. *Epilepsia* 9999.
- Bodick NC, O.W. (1997). Effects of xanomeline, a selective muscarinic receptor agonist, on cognitive function and behavioral symptoms in alzheimer disease. *Arch Neurol* 54, 465–473.
- Buckle, P.J., and Haas, H.L. (1982). Enhancement of synaptic transmission by 4-aminopyridine in hippocampal slices of the rat. *J. Physiol.* 326, 109–122.
- Buckle, P.J., and Haas, H.L. (1982). Enhancement of synaptic transmission by 4-aminopyridine in hippocampal slices of the rat. *J. Physiol.* 326, 109–122.
- Bumanglag, A.V., and Sloviter, R.S. (2008). Minimal latency to hippocampal epileptogenesis and clinical epilepsy after perforant pathway stimulation-induced status epilepticus in awake rats. *J. Comp. Neurol.* 510, 561–580.
- Buzsáki, G., 2002. Theta Oscillations in the Hippocampus. *Neuron* 33, 325–340.
- Calcagnotto, M.E., Barbarosie, M., and Avoli, M. (2000). Hippocampus–Entorhinal Cortex Loop and Seizure Generation in the Young Rodent Limbic System. *J. Neurophysiol.* 83, 3183–3187.
- Caulfield, M.P. (1993). Muscarinic Receptors—Characterization, coupling and function. *Pharmacology & Therapeutics* 58, 319–379.
- Caulfield, M.P., and Birdsall, N.J.M. (1998). International Union of Pharmacology. XVII. Classification of Muscarinic

Αναφορές

Acetylcholine Receptors. *Pharmacol Rev* 50, 279–290.

Cavarsan, C.F., Avanzi, R.D.T., Queiroz, C.M., Xavier, G.F., Mello, L.E., and Covolan, L. (2011). m1 Acetylcholine Receptor Expression is Decreased in Hippocampal CA1 region of Aged Epileptic Animals. *Aging Dis.* 2, 301–307.

Chauviere, L., Raftafi, N., Thinus-Blanc, C., Bartolomei, F., Esclapez, M., and Bernard, C. (2009). Early Deficits in Spatial Memory and Theta Rhythm in Experimental Temporal Lobe Epilepsy. *J Neurosci* 29, 5402–5410.

Chrobak, J., and Buzsaki, G. (1994). Selective activation of deep layer (V-VI) retrohippocampal cortical neurons during hippocampal sharp waves in the behaving rat. *J Neurosci* 14, 6160–6170.

Chrobak, J.J., Buzsáki, G., 1996. High-Frequency Oscillations in the Output Networks of the Hippocampal–Entorhinal Axis of the Freely Behaving Rat. *J. Neurosci.* 16, 3056–3066.

Chrobak, J.J., Lrincz, A., and Buzski, G. (2000). Physiological patterns in the hippocampo-entorhinal cortex system. *Hippocampus* 10, 457–465.

Cobb, S.R., Bulters, D.O., Davies, C.H., 2000. Coincident activation of mGluRs and mAChRs imposes theta frequency patterning on synchronised network activity in the hippocampal CA3 region. *Neuropharmacology* 39, 1933–1942.

Colgin, L.L., Kubota, D., Brucher, F.A., Jia, Y., Branyan, E., Gall, C.M., Lynch, G., 2004. Spontaneous Waves in the Dentate Gyrus of Slices From the Ventral Hippocampus. *J Neurophysiol* 92, 3385–3398.

Connor, J.A., and Stevens, C.F. (1971). Prediction of repetitive firing behaviour from voltage clamp data on an isolated neurone soma. *J. Physiol.* 213, 31–53.

Coppola, A., and Moshé, S.L. (2009). Why is the developing brain more susceptible to status epilepticus? *Epilepsia* 50, 25–26.

Cross, D.J., and Cavazos, J.E. (2007). Synaptic reorganization in subiculum and CA3 after early-life status epilepticus in the kainic acid rat model. *Epilepsy Res.* 73, 156–165.

Csicsvari, J., Jamieson, B., Wise, K.D., Buzsáki, G., 2003. Mechanisms of Gamma Oscillations in the Hippocampus of the Behaving Rat. *Neuron* 37, 311–322.

Cummings, J.L. (2003). Use of Cholinesterase Inhibitors in Clinical Practice: Evidence-Based Recommendations. *The American Journal of Geriatric Psychiatry* 11, 131–145.

De Hoz, L., Knox, J., Morris, R.G.M., 2003. Longitudinal axis of the hippocampus: Both septal and temporal poles of the hippocampus support water maze spatial learning depending on the training protocol. *Hippocampus* 13, 587–603.

DeLorenzo, R.J., Hauser, W.A., Towne, A.R., Boggs, J.G., Pellock, J.M., Penberthy, L., Garnett, L., Fortner, C.A., and Ko, D. (1996). A prospective, population-based epidemiologic study of status epilepticus in Richmond, Virginia. *Neurology* 46, 1029–1035.

DeLorenzo, R.J., Towne, A.R., Pellock, J.M., and Ko, D. (1992). Status Epilepticus in Children, Adults, and the Elderly. *Epilepsia* 33, 15–25.

Destexhe, A., and Paré, D. (1999). Impact of network activity on the integrative properties of neocortical pyramidal neurons in vivo. *J. Neurophysiol.* 81, 1531–1547.

Dingledine, R. (1984). *Brain Slices* (Plenum Press).

Dodd, J., Dingledine, R., and Kelly, J.S. (1981). The excitatory action of acetylcholine on hippocampal neurones of the guinea pig and rat maintained in vitro. *Brain Res.* 207, 109–127.

Dolorfo, C.L., Amaral, D.G., 1998a. Entorhinal cortex of the rat: Topographic organization of the cells of origin of the perforant path projection to the dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 398, 25–48.

Dolorfo, C.L., Amaral, D.G., 1998b. Entorhinal cortex of the rat: Organization of intrinsic connections. *J. Comp. Neurol.* 398, 49–82.

Drachman DA, L.J. (1974). Human memory and the cholinergic system: A relationship to aging? *Arch Neurol* 30, 113–121.

Draguhn, A., Traub, R.D., Bibbig, A., Schmitz, D., 2000. Ripple (~200-Hz) Oscillations in Temporal Structures. *Journal*

of Clinical Neurophysiology High-Frequency EEG 17, 361–376.

Dudek, F.E., Ekstrand, J.J., and Staley, K.J. (2010). Is Neuronal Death Necessary for Acquired Epileptogenesis in the Immature Brain? *Epilepsy Curr.* 10, 95–99.

Dyhrfeld-Johnsen, J., Berdichevsky, Y., Swiercz, W., Sabolek, H., and Staley, K.J. (2010). Interictal spikes precede ictal discharges in an organotypic hippocampal slice culture model of epileptogenesis. *J. Clin. Neurophysiol.* 27, 418–424.

Eckenstein, F.P., Baughman, R.W., and Quinn, J. (1988). An anatomical study of cholinergic innervation in rat cerebral cortex. *Neuroscience* 25, 457–474.

English, J.D., and Sweatt, J.D. (1997). A Requirement for the Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade in Hippocampal Long Term Potentiation. *J. Biol. Chem.* 272, 19103–19106.

Fanselow, M.S., Dong, H.-W., 2010. Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? *Neuron* 65, 7–19.

Fisahn, A., Contractor, A., Traub, R.D., Buhl, E.H., Heinemann, S.F., McBain, C.J., 2004. Distinct Roles for the Kainate Receptor Subunits GluR5 and GluR6 in Kainate-Induced Hippocampal Gamma Oscillations. *J. Neurosci.* 24, 9658–9668.

Fisahn, A., Yamada, M., Duttaroy, A., Gan, J.-W., Deng, C.-X., McBain, C.J., and Wess, J. (2002). Muscarinic Induction of Hippocampal Gamma Oscillations Requires Coupling of the M1 Receptor to Two Mixed Cation Currents. *Neuron* 33, 615–624.

Fisher, R.S. (1989). Animal models of the epilepsies. *Brain Res. Rev.* 14, 245–278.

Flynn, D.D., Reeve, C.M., and Ferrari-DiLeo, G. (1997). Pharmacological strategies to selectively label and localize muscarinic receptor subtypes. *Drug Development Research* 40, 104–116.

Frey, B.N., Andreazza, A.C., Nery, F.G., Martins, M.R., Quevedo, J., Soares, J.C., Kapczinski, F., 2007. The role of hippocampus in the pathophysiology of bipolar disorder. *Behavioural Pharmacology* 18, 419–430.

Gage, F.H., Thompson, R.G., 1980. Differential distribution of norepinephrine and serotonin along the dorsal-ventral axis of the hippocampal formation. *Brain Research Bulletin* 5, 771–773.

Gigout, S., Wierschke, S., Lehmann, T.-N., Horn, P., Dehnicke, C., and Deisz, R.A. (2012). Muscarinic acetylcholine receptor-mediated effects in slices from human epileptogenic cortex. *Neuroscience* 223, 399–411.

Gillies, M.J., Traub, R.D., LeBeau, F.E.N., Davies, C.H., Gloveli, T., Buhl, E.H., Whittington, M.A., 2002. A Model of Atropine-Resistant Theta Oscillations in Rat Hippocampal Area CA1. *J Physiol* 543, 779–793.

Gloveli, T., Albrecht, D., and Heinemann, U. (1995). Properties of low Mg²⁺ induced epileptiform activity in rat hippocampal and entorhinal cortex slices during adolescence. *Dev. Brain Res.* 87, 145–152.

Gloveli, T., Dugladze, T., Rotstein, H.G., Traub, R.D., Monyer, H., Heinemann, U., Whittington, M.A., Kopell, N.J., 2005a. Orthogonal arrangement of rhythm-generating microcircuits in the hippocampus. *PNAS* 102, 13295–13300.

Gloveli, T., Dugladze, T., Saha, S., Monyer, H., Heinemann, U., Traub, R.D., Whittington, M.A., Buhl, E.H., 2005b. Differential involvement of oriens/pyramidal interneurons in hippocampal network oscillations in vitro. *J Physiol* 562, 131–147.

Gotman, J. (1984). Relationships between triggered seizures, spontaneous seizures, and interictal spiking in the kindling model of epilepsy. *Exp. Neurol.* 84, 259–273.

Haas, H.L. (1982). Cholinergic disinhibition in hippocampal slices of the rat. *Brain Res.* 233, 200–204.

Hafting, T., Fyhn, M., Molden, S., Moser, M.-B., Moser, E.I., 2005. Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature* 436, 801–806.

Háros, N., Ellender, T.J., Zemankovics, R., Mann, E.O., Exley, R., Cragg, S.J., Freund, T.F., and Paulsen, O. (2009). Maintaining network activity in submerged hippocampal slices: importance of oxygen supply. *Eur. J. Neurosci.* 29, 319–327.

Háros, N., Pálhalmi, J., Mann, E.O., Németh, B., Paulsen, O., Freund, T.F., 2004. Spike Timing of Distinct Types of GABAergic Interneuron during Hippocampal Gamma Oscillations In Vitro. *J. Neurosci.* 24, 9127–9137.

Αναφορές

- Hasselmo, M.E. (2006). The role of acetylcholine in learning and memory. *Current Opinion in Neurobiology* 16, 710–715.
- Heckers, S., Konradi, C., 2002. Hippocampal neurons in schizophrenia. *Journal of Neural Transmission* 109, 891–905.
- Hesdorffer, D.C., Logroscino, G., Cascino, G., Annegers, J.F., and Hauser, W.A. (1998). Risk of unprovoked seizure after acute symptomatic seizure: Effect of status epilepticus. *Annals of Neurology* 44, 908–912.
- Heverin, M., Engel, T., Meaney, S., Jimenez-Mateos, E.M., Al-Saudi, R., and Henshall, D.C. (2012). Bi-lateral changes to hippocampal cholesterol levels during epileptogenesis and in chronic epilepsy following focal-onset status epilepticus in mice. *Brain Res.* 1480, 81–90.
- Hill, J.J., and Peralta, E.G. (2001). Inhibition of a Gi-activated Potassium Channel (GIRK1/4) by the Gq-coupled m1 Muscarinic Acetylcholine Receptor. *J. Biol. Chem.* 276, 5505–5510.
- Hille, B., Beech, D.J., Bernheim, L., Mathie, A., Shapiro, M.S., and Wollmuth, L.P. (1995). Multiple G-protein-coupled pathways inhibit N-type Ca channels of neurons. *Life Sciences* 56, 989–992.
- Insausti, R., Herrero, M.T., Witter, M.P., 1997. Entorhinal cortex of the rat: Cytoarchitectonic subdivisions and the origin and distribution of cortical efferents. *Hippocampus* 7, 146–183.
- Inui, K., Motomura, E., Okushima, R., Kaige, H., Inoue, K., and Nomura, J. (1998). Electroencephalographic Findings in Patients with DSM-IV Mood Disorder, Schizophrenia, and Other Psychotic Disorders. *Biol. Psychiatry* 43, 69–75.
- Jambaqué, I., Hertz-Pannier, L., Mikaeloff, Y., Martins, S., Peudenier, S., Dulac, O., and Chiron, C. (2006). Severe memory impairment in a child with bihippocampal injury after status epilepticus. *Dev. Med. Child Neurol.* 48, 223–226.
- Jones, B.E. (2004). Activity, modulation and role of basal forebrain cholinergic neurons innervating the cerebral cortex. In *Progress in Brain Research*, K.K. Laurent Descarries, ed. (Elsevier), pp. 157–169.
- Joyce, J., Gibbs, R., Cotman, C., and Marshall, J. (1989). Regulation of muscarinic receptors in hippocampus following cholinergic denervation and reinnervation by septal and striatal transplants. *J Neurosci* 9, 2776–2791.
- Judge, S.I.V., and Bever Jr., C.T. (2006). Potassium channel blockers in multiple sclerosis: Neuronal Kv channels and effects of symptomatic treatment. *Pharmacol. Ther.* 111, 224–259.
- Jung, K.-H., Chu, K., Lee, S.-T., Kim, J.-H., Kang, K.-M., Song, E.-C., Kim, S.-J., Park, H.-K., Kim, M., Lee, S.K., et al. (2008). Region-specific plasticity in the epileptic rat brain: A hippocampal and extrahippocampal analysis. *Epilepsia* 9999.
- Kandel, E.R., Schwartz, J., and Jessel, T. (2000). *Principles of Neural Science* (New York: McGraw Hill).
- Kang, T.-C., Kim, D.-S., Kwak, S.-E., Kim, J.-E., Won, M.H., Kim, D.-W., Choi, S.-Y., and Kwon, O.-S. (2006). Epileptogenic roles of astroglial death and regeneration in the dentate gyrus of experimental temporal lobe epilepsy. *Glia* 54, 258–271.
- Karamba, A., Mikroulis, A., and Psarropoulou, C. (2009). GABAA receptor antagonism during NMDA receptor activation transforms epileptiform discharges in rat hippocampal slices. In *Proceedings of the 31st Scientific Conference of Hellenic Association for Biological Sciences*, (Athens, Greece: Hellenic Society for Biological Sciences).
- Kerr, K.M., Agster, K.L., Furtak, S.C., Burwell, R.D., 2007. Functional neuroanatomy of the parahippocampal region: The lateral and medial entorhinal areas. *Hippocampus* 17, 697–708.
- Kim, J.-E., Ryu, H.J., and Kang, T.-C. P2X7 receptor activation ameliorates CA3 neuronal damage via a tumor necrosis factor- α -mediated pathway in the rat hippocampus following status epilepticus. *J Neuroinflammation* 8, 62–62.
- Klausberger, T., Magill, P.J., Márton, L.F., Roberts, J.D.B., Cobden, P.M., Buzsáki, G., Somogyi, P., 2003. Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo. *Nature* 421, 844–848.
- Kleen, J.K., Scott, R.C., Holmes, G.L., and Lenck-Santini, P.P. (2010). Hippocampal interictal spikes disrupt cognition in rats. *Ann. Neurol.* 67, 250–257.
- Kocsis, B., Bragin, A., Buzsáki, G., 1999. Interdependence of Multiple Theta Generators in the Hippocampus: A Partial Coherence Analysis. *J. Neurosci.* 19, 6200–6212.

Αναφορές

- Kohl, M.M., Shipton, O.A., Deacon, R.M., Rawlins, J.N.P., Deisseroth, K., Paulsen, O., 2011. Hemisphere-specific optogenetic stimulation reveals left-right asymmetry of hippocampal plasticity. *Nature Neuroscience* 14, 1413–1415.
- Kojima, H., Kowada, M., and Bragdon, A.C. (1991). Mechanism of Electrographic Seizure Generation in the Rat Brain Slice in Low Magnesium Medium: Modulatory Effect of Interictal Bursting on Seizure Generation. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 45, 279–283.
- Konopacki, J., Gołbiewski, H., Eckersdorf, B., 1992. Carbachol-induced rhythmic slow activity (theta) in cat hippocampal formation slices. *Brain Res.* 578, 13–16.
- Kozhemyakin, M., Rajasekaran, K., and Kapur, J. (2010). Central Cholinesterase Inhibition Enhances Glutamatergic Synaptic Transmission. *J Neurophysiol* 103, 1748–1757.
- Kremin, T., and Hasselmo, M.E. (2007). Cholinergic suppression of glutamatergic synaptic transmission in hippocampal region CA3 exhibits laminar selectivity: Implication for hippocampal network dynamics. *Neuroscience* 149, 760–767.
- Krendl, R., Lurger, S., and Baumgartner, C. (2008). Absolute spike frequency predicts surgical outcome in TLE with unilateral hippocampal atrophy. *Neurology* 71, 413–418.
- Lanzafame, A.A., Christopoulos, A., and Mitchelson, F (2003). Cellular Signaling Mechanisms for Muscarinic Acetylcholine Receptors.
- LeBeau, F.E.N., Towers, S.K., Traub, R.D., Whittington, M.A., Buhl, E.H., 2002. Fast Network Oscillations Induced by Potassium Transients in the Rat Hippocampus in Vitro. *J Physiol* 542, 167–179.
- Leung, L.S., 1998. Generation of theta and gamma rhythms in the hippocampus. *Neurosci Biobehav Rev* 22, 275–290.
- Leutgeb, S., Leutgeb, J.K., Moser, M.-B., Moser, E.I., 2005. Place cells, spatial maps and the population code for memory. *Current Opinion in Neurobiology* 15, 738–746.
- Levey, A.I., Edmunds, S.M., Heilman, C.J., Desmond, T.J., and Frey, K.A. (1994). Localization of muscarinic M3 receptor protein and M3 receptor binding in rat brain. *Neuroscience* 63, 207–221.
- Levey, A.I., Edmunds, S.M., Hersch, S.M., Wiley, R.G., and Heilman, C.J. (1995b). Light and electron microscopic study of m2 muscarinic acetylcholine receptor in the basal forebrain of the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 351, 339–356.
- Levey, A.I., Edmunds, S.M., Koliatsos, V., Wiley, R.G., and Heilman, C.J. (1995a). Expression of M1-M4 Muscarinic Acetylcholine Receptor Proteins in Rat Hippocampus and Regulation by Cholinergic Innervation. *J. Neurosci.* 15, 4077–4092.
- Lewis, D.V., Jones, L.S., and Mott, D.D. (1990). Hippocampal epileptiform activity induced by magnesium-free medium: differences between areas CA1 and CA2-3. *Epilepsy Res.* 6, 95–101.
- Li, X.-G., Somogyi, P., Ylinen, A., Buzsáki, G., 1994. The hippocampal CA3 network: An in vivo intracellular labeling study. *The Journal of Comparative Neurology* 339, 181–208.
- Liu, X., Muller, R.U., Huang, L.-T., Kubie, J.L., Rotenberg, A., Rivard, B., Cilio, M.R., and Holmes, G.L. (2003). Seizure-Induced Changes in Place Cell Physiology: Relationship to Spatial Memory. *J. Neurosci.* 23, 11505–11515.
- Lörincz, A., Buzsáki, G., 2000. Two-Phase Computational Model Training Long-Term Memories in the Entorhinal-Hippocampal Region. *Annals of the New York Academy of Sciences* 911, 83–111.
- Lothman, E.W., Bertram III, E.H., and Stringer, J.L. (1991). Functional anatomy of hippocampal seizures. *Prog. Neurobiol.* 37, 1–82.
- Lüttjohann, A., Fabene, P.F., and van Luijckelaar, G. (2009). A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiol. Behav.* 98, 579–586.
- Marino, M.J., Rouse, S.T., Levey, A.I., Potter, L.T., and Conn, P.J. (1998). Activation of the genetically defined m1 muscarinic receptor potentiates N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor currents in hippocampal pyramidal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 11465–11470.
- Markram, H., and Segal, M. (1990). Acetylcholine potentiates responses to N-methyl-d-aspartate in the rat hippocampus. *Neuroscience Letters* 113, 62–65.

Αναφορές

- Marrion, N.V., Smart, T.G., Marsh, S.J., and Brown, D.A. (1989). Muscarinic suppression of the M-current in the rat sympathetic ganglion is mediated by receptors of the M1-subtype. *Br J Pharmacol* 98, 557–573.
- Mazarati, A., Bragin, A., Baldwin, R., Shin, D., Wilson, C., Sankar, R., Naylor, D., Engel, J., and Wasterlain, C.G. (2002). Epileptogenesis After Self-Sustaining Status Epilepticus. *Epilepsia* 43, 74–80.
- Meilleur, S., Aznavour, N., Descarries, L., Carmant, L., Mamer, O., and Psarropoulou, C. (2003). Pentylenetetrazol-induced Seizures in Immature Rats Provoke Long-term Changes in Adult Hippocampal Cholinergic Excitability. *Epilepsia* 44, 507–517.
- Meilleur, S., Carmant, L., and Psarropoulou, C. (2000). Immature rat convulsions and long-term effects on hippocampal cholinergic neurotransmission. *Neuroreport* 11, 521–524.
- Melliti, K., Meza, U., and Adams, B. (2000). Muscarinic Stimulation of $\alpha 1E$ Ca Channels Is Selectively Blocked by the Effector Antagonist Function of RGS2 and Phospholipase C- $\beta 1$. *J. Neurosci.* 20, 7167–7173.
- Mesulam, M.-M., Mufson, E.J., Wainer, B.H., and Levey, A.I. (1983). Central cholinergic pathways in the rat: An overview based on an alternative nomenclature (Ch1–Ch6). *Neuroscience* 10, 1185–1201.
- Meza, U., Bannister, R., Melliti, K., and Adams, B. (1999). Biphasic, Opposing Modulation of Cloned Neuronal $\alpha 1E$ Ca Channels by Distinct Signaling Pathways Coupled to M2 Muscarinic Acetylcholine Receptors. *J. Neurosci.* 19, 6806–6817.
- Miller, J.W., and Gotman, J. (2008). The meaning of interictal spikes in temporal lobe epilepsy Should we count them? *Neurology* 71, 392–393.
- Mizuseki, K., Sirota, A., Pastalkova, E., Buzsáki, G., 2009. Theta Oscillations Provide Temporal Windows for Local Circuit Computation in the Entorhinal-Hippocampal Loop. *Neuron* 64, 267–280.
- Morimoto, K., Fahnestock, M., and Racine, R.J. (2004). Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Progress in Neurobiology* 73, 1–60.
- Morris, R.G., Frey, U., 1997. Hippocampal synaptic plasticity: role in spatial learning or the automatic recording of attended experience? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 352, 1489–1503.
- Moser, M.-B., Moser, E.I., 1998. Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus* 8, 608–619.
- Moser, M.B., Moser, E.I., Forrest, E., Andersen, P., Morris, R.G., 1995. Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 9697–9701.
- Nickels, K.C., Grossardt, B.R., and Wirrell, E.C. (2012). Epilepsy-related mortality is low in children: A 30-year population-based study in Olmsted County, MN. *Epilepsia* 53(12), 2164–71.
- Nicolai, J., and Kasteleijn-Nolst Trenite, D. (2011). Interictal discharges and cognition. *Epilepsy Behav.* 22, 134–136.
- Nicoll, R.A., 1985. The septo-hippocampal projection: a model cholinergic pathway. *Trends in Neurosciences* 8, 533–536.
- O’Keefe, J., 1976. Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Experimental Neurology* 51, 78–109.
- O’Neill, J., Senior, T., Csicsvari, J., 2006. Place-Selective Firing of CA1 Pyramidal Cells during Sharp Wave/Ripple Network Patterns in Exploratory Behavior. *Neuron* 49, 143–155.
- Öztekin, I., McElree, B., Staresina, B.P., and Davachi, L. (2011). Working Memory Retrieval: Contributions of the Left Prefrontal Cortex, the Left Posterior Parietal Cortex, and the Hippocampus. *J. Cogn. Neurosci.* 21, 581–593.
- Pálhalmi, J., Paulsen, O., Freund, T.F., Hájos, N., 2004. Distinct properties of carbachol- and DHPG-induced network oscillations in hippocampal slices. *Neuropharmacology* 47, 381–389.
- Pandis, C., Sotiriou, E., Kouvaras, E., Asprodini, E., Papatheodoropoulos, C., Angelatou, F., 2006. Differential expression of NMDA and AMPA receptor subunits in rat dorsal and ventral hippocampus. *Neuroscience* 140, 163–175.
- Panuccio, G., D’Antuono, M., de Guzman, P., De Lannoy, L., Biagini, G., and Avoli, M. (2010). In vitro ictogenesis and parahippocampal networks in a rodent model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiol. Dis.* In Press, Corrected Proof.

- Papatheodoropoulos, C., Moschovos, C., and 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* 135, 765–779.
- Pemberton, K.E., Hill-Eubanks, L.J., and Jones, S.V.P. (2000). Modulation of low-threshold T-type calcium channels by the five muscarinic receptor subtypes in NIH 3T3 cells. *Eur J Physiol* 440, 452–461.
- Perreault, P., and Avoli, M. (1991). Physiology and pharmacology of epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat hippocampal slices. *J. Neurophysiol.* 65, 771–785.
- Pike, F.G., Goddard, R.S., Suckling, J.M., Ganter, P., Kasthuri, N., Paulsen, O., 2000. Distinct frequency preferences of different types of rat hippocampal neurones in response to oscillatory input currents. *J Physiol* 529, 205–213.
- Potier, S., and Psarropoulou, C. (2001). Endogenous acetylcholine facilitates epileptogenesis in immature rat neocortex. *Neuroscience Letters* 302, 25–28.
- Potier, S., and Psarropoulou, C. (2004). Modulation of muscarinic facilitation of epileptiform discharges in immature rat neocortex. *Brain Research* 997, 194–206.
- Potier, S., Sncal, J., Chabot, J.-G., Psarropoulou, C., and Descarries, L. (2005). A pentylenetetrazole-induced generalized seizure in early life enhances the efficacy of muscarinic receptor coupling to G-protein in hippocampus and neocortex of adult rat. *European Journal of Neuroscience* 21, 1828–1836.
- Pressler, R.M., Robinson, R.O., Wilson, G.A., and Binnie, C.D. (2005). Treatment of interictal epileptiform discharges can improve behavior in children with behavioral problems and epilepsy. *J. Pediatr.* 146, 112–117.
- Psarropoulou, C., and Avoli, M. (1995). Subthreshold membrane-potential oscillations in immature rat CA3 hippocampal neurones. *Neuroreport* 6, 2561–2564.
- Racine, R.J. (1972). Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 32, 281–294.
- Reece, L.J., and Schwartzkroin, P.A. (1991). Effects of cholinergic agonists on two non-pyramidal cell types in rat hippocampal slices. *Brain Research* 566, 115–126.
- Rice, A.C., Floyd, C.L., Lyeth, B.G., Hamm, R.J., and DeLorenzo, R.J. (1998). Status Epilepticus Causes Long-Term NMDA Receptor-Dependent Behavioral Changes and Cognitive Deficits. *Epilepsia* 39, 1148–1157.
- Richer, L.P., Shevell, M.I., and Rosenblatt, B.R. (2002). Epileptiform abnormalities in children with attention-deficit-hyperactivity disorder. *Pediatr. Neurol.* 26, 125–129.
- Rosati, A., Aghakhani, Y., Bernasconi, A., Olivier, A., Andermann, F., Gotman, J., and Dubeau, F. (2003). Intractable temporal lobe epilepsy with rare spikes is less severe than with frequent spikes. *Neurology* 60, 1290–1295.
- Rouse, S., Gilmor, M., and Levey, A.. (1998). Differential presynaptic and postsynaptic expression of m1–m4 muscarinic acetylcholine receptors at the perforant pathway/granule cell synapse. *Neuroscience* 86, 221–232.
- Rouse, S.T., Hamilton, S.E., Potter, L.T., Nathanson, N.M., and Conn, P.J. (2000). Muscarinic-induced modulation of potassium conductances is unchanged in mouse hippocampal pyramidal cells that lack functional M1 receptors. *Neuroscience Letters* 278, 61–64.
- Rush, M.E., and Rinzel, J. (1995). The potassium A-current, low firing rates and rebound excitation in Hodgkin-Huxley models. *Bull. Math. Biol.* 57, 899–929.
- Rusted, J.M., and Warburton, D.M. (1988). The effects of scopolamine on working memory in healthy young volunteers. *Psychopharmacology* 96, 145–152.
- Rutecki, P.A., Lebeda, F.J., and Johnston, D. (1987). 4-Aminopyridine produces epileptiform activity in hippocampus and enhances synaptic excitation and inhibition. *J. Neurophysiol.* 57, 1911–1924.
- Sala, M., Perez, J., Soloff, P., Ucelli di Nemi, S., Caverzasi, E., Soares, J.C., Brambilla, P., 2004. Stress and hippocampal abnormalities in psychiatric disorders. *European Neuropsychopharmacology* 14, 393–405.
- Sarter, M., Hasselmo, M.E., Bruno, J.P., and Givens, B. (2005). Unraveling the attentional functions of cortical cholinergic inputs: interactions between signal-driven and cognitive modulation of signal detection. *Brain Research Reviews* 48, 98–111.

Αναφορές

- Schäfer, M.K.-H., Eiden, L., and Weihe, E. (1998). Cholinergic neurons and terminal fields revealed by immunohistochemistry for the vesicular acetylcholine transporter. I. Central nervous system. *Neuroscience* 84, 331–359.
- Schwarcz, R., and Witter, M.P. (2002). Memory impairment in temporal lobe epilepsy: the role of entorhinal lesions. *Epilepsy Res.* 50, 161–177.
- Seeger, T., Fedorova, I., Zheng, F., Miyakawa, T., Koustova, E., Gomeza, J., Basile, A.S., Alzheimer, C., and Wess, J. (2004). M2 Muscarinic Acetylcholine Receptor Knock-Out Mice Show Deficits in Behavioral Flexibility, Working Memory, and Hippocampal Plasticity. *J. Neurosci.* 24, 10117–10127.
- Shinnar, S., Berg, A.T., Moshe, S.L., O'Dell, C., Alemany, M., Newstein, D., Kang, H., Goldensohn, E.S., and Hauser, W.A. (1996). The Risk of Seizure Recurrence After a First Unprovoked Afebrile Seizure in Childhood: An Extended Follow-up. *Pediatrics* 98, 216–225.
- Shinoe, T., Matsui, M., Taketo, M.M., and Manabe, T. (2005). Modulation of Synaptic Plasticity by Physiological Activation of M1 Muscarinic Acetylcholine Receptors in the Mouse Hippocampus. *J. Neurosci.* 25, 11194–11200.
- Shorvon, S. (1994). The outcome of tonic-clonic status epilepticus. *Curr. Opin. Neurol.* 7, 93–95.
- Silvestri, R., Gagliano, A., Calarese, T., Aricò, I., Cedro, C., Condurso, R., Germanò, E., Vita, G., and Tortorella, G. (2007). Ictal and interictal EEG abnormalities in ADHD children recorded over night by video-polysomnography. *Epilepsy Res.* 75, 130–137.
- Sloviter, R.S. (2009). Experimental status epilepticus in animals: What are we modeling? *Epilepsia* 50, 11–13.
- 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* 82, 690–700.
- Squire, L.R., 2004. Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory* 82, 171–177.
- Staley, K., Hellier, J.L., and Dudek, F.E. (2005). Do Interictal Spikes Drive Epileptogenesis? *Neuroscientist* 11, 272–276.
- Sunderland, T., Tariot, P.N., Weingartner, H., Murphy, D.L., Newhouse, P.A., Mueller, E.A., and Cohen, R.M. (1986). Pharmacologic modelling of Alzheimer's disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 10, 599–610.
- Tapia, R., and Sitges, M. (1982). Effect of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes. *Brain Res.* 250, 291–299.
- Teyler, T.J., DiScenna, P., 1986. The hippocampal memory indexing theory. *Behav. Neurosci.* 100, 147–154.
- Tort, A.B.L., Rotstein, H.G., Dugladze, T., Gloveli, T., Kopell, N.J., 2007. On the formation of gamma-coherent cell assemblies by oriens lacunosum-moleculare interneurons in the hippocampus. *PNAS* 104, 13490–13495.
- Towers, S.K., LeBeau, F.E.N., Gloveli, T., Traub, R.D., Whittington, M.A., Buhl, E.H., 2002. Fast Network Oscillations in the Rat Dentate Gyrus In Vitro. *J Neurophysiol* 87, 1165–1168.
- Treves, A., Rolls, E.T., 1994. Computational analysis of the role of the hippocampus in memory. *Hippocampus* 4, 374–391.
- Tricoire, L., and Rio, C.A.C.-D. (2007). Illuminating Cholinergic Microcircuits in the Neocortex. *J. Neurosci.* 27, 12119–12120.
- Tsien, J.Z. (2000). Linking Hebb's coincidence-detection to memory formation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 266–273.
- Tyler, A.L., Mahoney, J.M., Richard, G.R., Holmes, G.L., Lenck-Santini, P.-P., and Scott, R.C. (2012). Functional Network Changes in Hippocampal CA1 after Status Epilepticus Predict Spatial Memory Deficits in Rats. *J. Neurosci.* 32, 11365–11376.
- Valentino, R.J., and Dingledine, R. (1981). Presynaptic inhibitory effect of acetylcholine in the hippocampus. *J. Neurosci.* 1, 784–792.
- Valenzuela, D., Han, X., Mende, U., Fankhauser, C., Mashimo, H., Huang, P., Pfeffer, J., Neer, E.J., and Fishman, M.C. (1997). Gao is necessary for muscarinic regulation of Ca²⁺ channels in mouse heart. *PNAS* 94, 1727–1732.

Αναφορές

- Valenzuela, V., and Benardo, L.S. (1995). An in vitro model of persistent epileptiform activity in neocortex. *Epilepsy Res.* 21, 195–204.
- Verney, C., Baulac, M., Berger, B., Alvarez, C., Vigny, A., Helle, K.B., 1985. Morphological evidence for a dopaminergic terminal field in the hippocampal formation of young and adult rat. *Neuroscience* 14, 1039–1052.
- Vogt, K.E., and Regehr, W.G. (2001). Cholinergic Modulation of Excitatory Synaptic Transmission in the CA3 Area of the Hippocampus. *J. Neurosci.* 21, 75–83.
- Wall, S.J., Wolfe, B.B., and Kromer, L.F. (2008). Cholinergic Deafferentation of Dorsal Hippocampus by Fimbria-Fornix Lesioning Differentially Regulates Subtypes (m1-m5) of Muscarinic Receptors. *J. Neurochem.* 62, 1345–1351.
- Walther, H., Lambert, J.D.C., Jones, R.S.G., Heinemann, U., and Hamon, B. (1986). Epileptiform activity in combined slices of the hippocampus, subiculum and entorhinal cortex during perfusion with low magnesium medium. *Neurosci. Lett.* 69, 156–161.
- Wanaverbecq, N., Semyanov, A., Pavlov, I., Walker, M.C., and Kullmann, D.M. (2007). Cholinergic Axons Modulate GABAergic Signaling among Hippocampal Interneurons via Postsynaptic $\alpha 7$ Nicotinic Receptors. *J. Neurosci.* 27, 5683–5693.
- Wang, H.-X., Ouyang, M., Zhang, W.-M., Sheng, J.-Z., and Wong, T.-M. (1998). DIFFERENT MECHANISMS FOR $[Ca^{2+}]_i$ OSCILLATIONS INDUCED BY CARBACHOL AND HIGH CONCENTRATIONS OF $[Ca^{2+}]_o$ IN THE RAT VENTRICULAR MYOCYTE. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 25, 257–265.
- Wasterlain, C.G., and Treiman, D.M. (2006). *Status Epilepticus - Mechanisms and Management* (Cambridge, Massachusetts: THE MIT PRESS).
- Wasterlain, C.G., Farber, D.B., and Fairchild, D. (1985). Cholinergic kindling: What has it taught us about epilepsy? *J. Neural Transmission* 63, 119–132.
- Wess, J. (2004). MUSCARINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR KNOCKOUT MICE: Novel Phenotypes and Clinical Implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44, 423–450.
- Wilson, M.A., McNaughton, B.L., 1994. Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. *Science* 265, 676–679.
- Witter, M.P., 2007. The perforant path: projections from the entorhinal cortex to the dentate gyrus, in: Helen E. Scharfman (Ed.), *Progress in Brain Research*. Elsevier, pp. 43–61.
- Witter, M.P., Groenewegen, H.J., Lopes da Silva, F.H., Lohman, A.H.M., 1989. Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. *Progress in Neurobiology* 33, 161–253.
- Witter, M.P., Moser, E.I., 2006. Spatial representation and the architecture of the entorhinal cortex. *Trends in Neurosciences* 29, 671–678.
- Wittner, L., Henze, D., Záborszky, L., Buzsáki, G., 2007. Three-dimensional reconstruction of the axon arbor of a CA3 pyramidal cell recorded and filled in vivo. *Brain Structure and Function* 212, 75–83.
- Woolf, N.J. (1991). Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. *Progress in Neurobiology* 37, 475–524.
- Wu, C., Sui, G., and Fry, C.H. (2002). The role of the L-type Ca^{2+} channel in refilling functional intracellular Ca^{2+} stores in guinea-pig detrusor smooth muscle. *J Physiol* 538, 357–369.
- Wyss, J.M., Swanson, L.W., and Cowan, W.M. (1980). The organization of the fimbria, dorsal fornix and ventral hippocampal commissure in the rat. *Anat. Embryol. (Berl.)* 158, 303–316.



