



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΩΝ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Μακροχρόνιες συνέπειες επιληπτικών κρίσεων κατά την ανάπτυξη στη λειτουργία του
Ιπποκάμπου κι Ενδορρινικού φλοιού: χολινεργικούς έλεγχος κι υψίσυχνες ταλαντώσεις
μεσοκρυσικών εκφορτίσεων *in vitro*

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΛΙΣΓΑΡΑΣ ΧΡΗΣΤΟΣ-ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ (ΑΚΗΣ)

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, ΙΟΥΛΙΟΣ 2017

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΚΙ ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:

1. **Αικατερίνη Ψαρροπούλου**, Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (Επιβλέπουσα)
2. **Φεβρωνία Αγγελάτου**, Ομότιμη Καθηγήτρια, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών
3. **Κωνσταντίνος Παπαθεοδωρόπουλος**, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Επταμελής συμβουλευτική επιτροπή:

1. **Φεβρωνία Αγγελάτου**, Ομότιμη Καθηγήτρια, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών
2. **Ευτυχία Ασπροδίνη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Γεώργιος Κωστόπουλος**, Ομότιμος Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών
4. **Χαράλαμπος Λαμπρακάκης**, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
5. **Κωνσταντίνος Παπαθεοδωρόπουλος**, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών
6. **Χρίστος Παπαδελής**, Assistant Professor of Pediatrics, Harvard Medical School, Fetal-Neonatal Neuroimaging and Developmental Science Center, Boston Children's Hospital, Division of Newborn Medicine, Boston MA, USA
7. **Αικατερίνη Ψαρροπούλου**, Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (Επιβλέπουσα)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια/επίβλεψη/καθοδήγηση:

- της επιβλέπουσας Καθηγήτριας Φυσιολογίας του τμήματος ΒΕΤ **Αικατερίνης Ψαρροπούλου** την οποία ευχαριστώ θερμά για την μεντορία και την εξαιρετική καθοδήγηση που μου πρόσφερε. Επίσης, την ευχαριστώ για τις γνώσεις και τον ενθουσιασμό που μου μετέφερε για την συνέχιση της έρευνας στην Επιληψία.
- της **οικογένειάς** μου στην οποία και αφιερώνεται η συγκεκριμένη εργασία
- του Επικ. Καθ. **Χαράλαμπου Λαμπρακάκη** για τις πάντα εύστοχες παρατηρήσεις και συμβουλές του
- των μελών της τριμελούς κι επταμελούς συμβουλευτικής επιτροπής

«Duty is liberating. It forces you to transcend your own limitations and makes you do things that may not come naturally but must be done, because they are right» David Rockefeller

«Although the greatest scientific pioneers belonged to an aristocracy of the spirit.....I continue to believe that there is always room for anyone with average intelligence and an eagerness for recognition to utilize his energy and tempt fate» R.Y Cajal, Advice for a young investigator

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|---|-----|
| Συντομογραφίες | 4 |
| Πρόλογος | 5 |
| Σκοπός | 6 |
| Περίληψη (Ελληνική) | 8 |
| Summary | 9 |
| 1. Εισαγωγή | |
| 1.1 Επιληψία | 10 |
| 1.2 Επιληπτική κατάσταση - Status Epilepticus | 11 |
| 1.3 Μεσοκρισικές εκφορτίσεις | 13 |
| 1.4 Υψίσυχνες ταλαντώσεις (HFOs) | 17 |
| 1.5 Ιππόκαμπος | 19 |
| 1.6 Νευροχημεία | 24 |
| 1.7 Λειτουργία | 25 |
| 1.8 Ενδορρινικός φλοιός | 26 |
| 1.9 Λειτουργία και παθολογία | 28 |
| 1.10 Ακετυλοχολίνη | 29 |
| 2. Μέθοδοι | |
| 2.1 Πειραματόζωα | 30 |
| 2.2 Διαλύματα | 30 |
| 2.3 <i>In vivo</i> πρωτόκολλο | 32 |
| 2.4 <i>In vitro</i> πρωτόκολλο | 33 |
| 2.5 Ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές | 35 |
| 2.6 Επεξεργασία κι ανάκτηση δεδομένων | 37 |
| 2.7 Ανάλυση συχνότητας | 37 |
| 2.8 Ανάλυση HFOs | 37 |
| 2.9 Στατιστική ανάλυση | 38 |
| 3. Αποτελέσματα | |
| 3.1 Μελέτη 1 | 40 |
| 3.2 Μελέτη 2 | 69 |
| 3.3 Μελέτη 3 | 86 |
| 4. Συμπεράσματα | |
| 4.1 Μελέτη 1 | 95 |
| 4.2 Μελέτη 2 | 103 |
| 4.3 Μελέτη 3 | 107 |
| Βιβλιογραφία | 111 |

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

SE = Status Epilepticus

N = Normal - Φυσιολογικά πειραματόζωα

HFOs = High Frequency Oscillations

τENY = τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό

4-AP = 4-aminopyridine

CCh = carbachol

HFOs = High Frequency Oscillations - Υψίσυχνες ταλαντώσεις

Rs = Ripples - Ριπιδισμοί

FRs = Fast Ripples - Γρήγοροι ριπιδισμοί

ACh = acetylcholine

NMDA = *N*-methyl-D-aspartate

GABA_A = γ -aminobutyric acid type A receptor

T = κροταφική τομή

S = διαφραγματική τομή

mEC = medial entorhinal cortex - Μέσος ενδορρινικός φλοιός

CA3 = CA3 περιοχή του ιπποκάμπου

Σε όλη την έκταση της παρούσας διατριβής, θα χρησιμοποιηθούν κάποιοι όροι στην αγγλική για τη διευκόλυνση της παρουσίασης των συγκρίσεων κι αναλύσεων. Πιο συγκεκριμένα οι συχνότερα αναφερόμενοι είναι οι παρακάτω:

- **N = φυσιολογικές τομές ή φυσιολογικά πειραματόζωα, εκ του Normal**
- **SE = τομές από πειραματόζωα με ένα επεισόδιο επιληπτικής κατάστασης κατά την 20^η μέρα μετά τη γέννηση ή τομές από αυτά τα πειραματόζωα, εκ του Status Epilepticus**
- **T = κροταφική τομή, εκ του Temporal**
- **S = διαφραγματική τομή, εκ του Septal**
- **R(s) = Ριπιδισμοί, εκ του Ripple(s)**
- **FR(s) = Γρήγοροι ριπιδισμοί, εκ του Fast Ripple(s)**
- **HFOs = Υψίσυχνες ταλαντώσεις >80 Hz, εκ του High Frequency Oscillations**
- **mEC = Μέσος ενδορρινικός φλοιός, εκ του medial entorhinal cortex**
- **CA3 = CA3 περιοχή του ιπποκάμπου, εκ του *Cornu Ammonis* area 3**
- **Intact = Ακέραιη τομή ιπποκάμπου-ενδορρινικού φλοιού**
- **CA1 cut = Τομή ιπποκάμπου-ενδορρινικού φλοιού έπειτα από διατομή των ινών Schaffer**
- **Mini slice = Τομή ιπποκάμπου-ενδορρινικού φλοιού έπειτα από διατομή των ινών Schaffer και μετά από τομή στο ύψος του παραυποθέματος**

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η επιληψία αποτελεί το συχνότερο νευρολογικό νόσημα κι η νεογνική και παιδική ηλικία αποτελούν παράθυρα υψηλότερης συχνότητας εμφάνισης. Η πρώιμη μεταγεννητική ανάπτυξη χαρακτηρίζεται από μια «κρίσιμη περίοδο» ενισχυμένης συναπτικής πλαστικότητας και μάθησης. Οι επιληπτικές κρίσεις που προκύπτουν κατά τη διάρκειά της, τροποποιούν τη συναπτική πλαστικότητα, διαταράσσουν την ισορροπία μεταξύ διέγερσης κι αναστολής, επηρεάζοντας την ανάπτυξη του εγκεφάλου και κατ' επέκταση συμπεριφορά κατά την ωρίμανση. Υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις των μακροπρόθεσμων και πιθανά μόνιμων αλλαγών στον ώριμο εγκέφαλο έπειτα από πρώιμες επιληπτικές κρίσεις, χωρίς όμως να είναι γνωστοί οι δικτυακοί, συναπτικοί και κυτταρικοί μηχανισμοί που τις διέπουν. Σε αυτό το πλαίσιο, ο ακριβής ρόλος της χολινεργικής νευροδιαβίβασης παραμένει επίσης άγνωστος.

Η υπόθεση της παρούσας μελέτης είναι ότι οι πρώιμες επιληπτικές κρίσεις επηρεάζοντας μεταξύ άλλων και τη λειτουργία χολινεργικών νευρωνικών συνόλων, διαταράσσουν τη μελλοντική (ώριμη) απόκριση σε χολινεργικά ερεθίσματα αλλά και τη διαμόρφωση και μεταγωγή μεσοκριστικών εκφορτίσεων κι υψίσυχνων ταλαντώσεων στον ιππόκαμπο. Μια ακόμη υπόθεση αφορά την εξέταση της πιθανής τροποποίησης της επικοινωνίας μεταξύ των δομών ιπποκάμπου κι ενδορρινικού φλοιού μετά από κρίσεις, η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο σε φυσιολογικές (εδραίωση της μνήμης), όσο και σε παθοφυσιολογικές διεργασίες (μετάδοση/γενίκευση/ενίσχυση κρισικών φαινομένων).

Συνεπώς το αντικείμενο της παρούσας εργασίας χωρίζεται σε 2 γενικότερους άξονες μελέτης:

- στις χολινεργικές δράσεις στον ιππόκαμπο μετά από πρώιμες κρίσεις και
- στην επικοινωνία μεταξύ της CA3 περιοχής του ιπποκάμπου και των βαθέων στοιβάδων του μέσου ενδορρινικού φλοιού μετά από επιληπτική κατάσταση

ΣΚΟΠΟΣ

Οι επιληπτικές κρίσεις σε νεαρή ηλικία σχετίζονται με αυξημένη πιθανότητα επιβάρυνσης της νοητικής λειτουργίας, καθώς και με διευκόλυνση επανεμφάνισης επιληπτικών κρίσεων δια βίου. Οι γνωσιακές λειτουργίες, που επηρεάζονται από την εμφάνιση κρίσεων σε παιδιά, αφορούν διαταραχές της μνήμης και της μάθησης, δηλαδή διαδικασίες που εξαρτώνται σημαντικά από το νευρορρυθμιστικό ρόλο της ακετυλοχολίνης και παραπέμπουν στη λειτουργία του ιπποκάμπου. Το αντικείμενο της παρούσας διδακτορικής διατριβής αφορά στη μελέτη ηλεκτροφυσιολογικών παραμέτρων που διαφοροποιούνται μακροπρόθεσμα έπειτα από την εμφάνιση πρώιμων επιληπτικών κρίσεων. Στο κύριο άξονα της διατριβής εντάσσεται η μελέτη υψίσυχων ταλαντώσεων (HFOs, >80 Hz), λόγω της πρόσφατης κλινικής κι ερευνητικής τους αξιοποίησης ως βιοδεικτών στην επιληψία. Είναι ενδιαφέρον ότι ρυθμική νευρωνική δραστηριότητα φασματικά (Hz) ανάλογη των HFOs προκύπτει, μεταξύ άλλων, κι ως συνέπεια χολινεργικής νευροδιαβίβασης (ρυθμοί γάμμα). Στόχος της παρούσας εργασίας είναι να διερευνηθούν οι μακροχρόνιες και πιθανά μόνιμες συνέπειες πρώιμων επιληπτικών κρίσεων τύπου Status Epilepticus σε παραμέτρους της χολινεργικής νευροδιαβίβασης κατά την ενήλικη ζωή στο επίπεδο νευρωνικών κυκλωμάτων του ιπποκάμπου και του ενδορρινικού φλοιού. Ένας ακόμη στόχος αποτελεί κι η διερεύνηση της πιθανής σχέσης μεταξύ της χολινεργικής νευροδιαβίβασης και των HFOs, έπειτα από την πρόκληση πειραματικών επιληπτικών κρίσεων.

Με την εφαρμογή εξωκυττάρων ηλεκτροφυσιολογικών καταγραφών (από το πυραμιδικό στρώμα της CA3 περιοχή του ιπποκάμπου και τις βαθιές στοιβάδες του μέσου ενδορρινικού φλοιού) η παρούσα μελέτη στοχεύει να αποσαφηνίσει:

- την επίδραση της χολινεργικής νευροδιαβίβασης στη έκλυση μεσοκρυσικών εκφορτίσεων και συνοδών υψίσυχων ταλαντώσεων (HFOs) στον ώριμο ιπποκάμπο μετά από πρώιμες κρίσεις και *(Μελέτη 1)*
- την μεταβολή των ιδιοτήτων συγχρονισμού (μεσοκρυσικές εκφορτίσεις, HFOs) μεταξύ της πυραμιδικής στοιβάδας CA3 του ιπποκάμπου και τις βαθιές στοιβάδες του μέσου ενδορρινικού φλοιού έπειτα από πρώιμες κρίσεις *(Μελέτη 2, 3)*

Η πρωτοτυπία της συγκεκριμένης μελέτης έγκειται στο γεγονός ότι οι ερευνητικοί άξονες:

- **χολινεργικό σύστημα και HFOs** σε συνάρτηση με πρώιμες κρίσεις δεν έχουν μελετηθεί, αν κι οι κλινικές και πειραματικές ενδείξεις για το ρόλο τους είναι πολλαπλές
- **συσχέτιση μεταξύ της συχνότητας των μεσοκρυσικών εκφορτίσεων και της σύστασή τους σε HFOs** δεν μελετηθεί

- **συσχέτιση του μηχανισμού πρόκλησης της μεσοκρισικής δραστηριότητας κι της σύστασή αυτής σε HFOs, αλλά κι η ανάλυση αυτής διαφορετικά επίπεδα** (αργού κύματος vs HFOs -Rs, FRs) μετά από κρίσεις δεν έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά.
- **μετάδοση μεσοκρισικών εκφορτίσεων και HFOs** στο κύκλωμα ιπποκάμπου-ενδορρινικού φλοιού δεν έχει περιγραφεί, αν και είναι πολύ πιθανό η τροποποίηση της σχέσης τους να επιφέρει δυσμενείς επιπτώσεις μετά από κρίσεις, τόσο σε φυσιολογικές (εδραίωση της μνήμης) όσο και παθοφυσιολογικές διεργασίες (μετάδοση κρίσεων)

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής αναμένεται να συμβάλλουν:

- στην άγνωστη έως σήμερα ακριβή συνεισφορά της χολινεργικής νευροδιαβίβασης στις παρατηρούμενες συμπεριφορικές ή γνωσιακές διαταραχές στον ώριμο εγκέφαλο έπειτα από πρώιμες επιληπτικές κρίσεις
- στην αποκάλυψη των πιθανών μηχανισμών μέσω των οποίων αυτές οι πλαστικές αλλαγές ενδέχεται να επηρεάσουν μόνιμα την εγκεφαλική λειτουργία και συμπεριφορά
- στην επιτυχέστερη αντιμετώπιση ώριμων κρίσεων ή και πιθανή αναστολή τους-με ελαχιστοποίηση των δυσμενών παρενεργειών από τη φαρμακευτική αγωγή- και
- στη μείωση ή κι αναστροφή των αρνητικών επιπτώσεων των κρίσεων στη μετέπειτα λειτουργία του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος και τη συμπεριφορά.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ (ΕΛΛΗΝΙΚΗ)

Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου, έχουν συσχετίσει ένα επεισόδιο επιληπτικής κατάστασης (SE) κατά την ανάπτυξη με μακροπρόθεσμες νευροβιολογικές τροποποιήσεις στην ενηλικίωση, ανιχνεύσιμες *in vitro* και *in vivo*. Σε αυτή την εργασία μελετήσαμε τις πιθανές αλλαγές στη συχνότητα των μεσοκρισικών εκφορτίσεων και των συνοδών υψίσυχνων ταλαντώσεων HFOs (Rs, FRs) στα δίκτυα ιπποκάμπου CA3 κι στο μέσου ενδορρινικού φλοιού (mEC), εξετάζοντας την εξέλιξή τους και τον χολινεργικό τους έλεγχο μετά από SE. Σε αυτό το πλαίσιο, επιδιώξαμε επίσης να ανιχνεύσουμε τυχόν συσχετισμούς μεταξύ της συχνότητας των μεσοκρισικών εκφορτίσεων και των HFOs, στην περίπτωση που αυτές υπάρχουν.

Οι εξωκυττάρειες καταγραφές πραγματοποιήθηκαν από το υποπεδίο της CA3 διαφραγματικών (S) και κροταφικών (T) τομών ιπποκάμπου ή ταυτόχρονα από την πυραμιδική στοιβάδα της CA3 και τις βαθιές στοιβάδες του mEC βαθιά συνδυασμένων τομών ιπποκάμπου-mEC. Οι τομές προέρχονταν είτε από φυσιολογικά πειραματόζωα (N) είτε από πειραματόζωα που υποβλήθησαν σε μία γενικευμένη, παρατεταμένη SE-τύπου επιληπτική (60-90mg / Kg) κι επαγόμενη από PTZ (στο εξής "SE") κρίση κατά την 20^η ημέρα μετά την γέννηση. Αυθόρμητες μεσοκρισικές εκφορτίσεις σε αμφότερες τις περιοχές (CA3, mEC) προκλήθηκαν με διαβροχή των τομών (ιπποκάμπου, συνδυασμένες) είτε με tENY ελεύθερο-Mg²⁺ είτε σε tENY με 4-Αμινοπυριδίνη (4-AP, 50 μM).

Η συχνότητα CA3 IED των φετών του ιπποκάμπου ήταν παρόμοια με την ίδια προέλευση N φέτες σε όλα τα μοντέλα, αλλά διέφερε σε φέτες SE, χαμηλότερα σε ACSF χωρίς Mg²⁺ από ό, τι στο 4-AP, γεγονός που υποδηλώνει μακροπρόθεσμη αύξηση post-SE ενός ευαίσθητου 4-AP K⁺ αγωγιμότητα (α). Η εφαρμογή της χολινεργικής από το λουτρό αύξησε τα ποσοστά IED των ιπποκαμπάλλων CA3 παγκοσμίως, αλλά είχε ειδικές επιδράσεις περιοχής και κλιματισμού σε HFO, υποδηλώνοντας ότι τα IEDs και HFOs είναι διαφορετικά υπερσυγχρονικά φαινόμενα που παράγονται μέσα σε παρόμοια νευρωνικά δίκτυα. Οι ζευγαρωμένες εγγραφές από τις πυραμίδες CA3 και mEC βαθιά στρώματα (V-VI) συνδυασμένων φετών (N ή SE) αποκάλυψαν ότι η συχνότητα IED ήταν χαμηλότερη σε mEC σε σύγκριση με CA3 και στα δύο μοντέλα. Η απομόνωση των δύο περιοχών δεν άλλαξε αυτή τη σχέση. Επίσης, η συχνότητα CA3 IED ήταν παρόμοια σε όλες τις φέτες (N, SE), ωστόσο, η συχνότητα mEC IED ήταν υψηλότερη σε φέτες SE vs N σε αμφότερα τα μοντέλα. Τα CA3 HFOs είχαν 100 φορές μεγαλύτερη ισχύ από αυτά που καταγράφηκαν από το mEC. Ο λόγος FR / R ήταν χαμηλότερος σε CA3 έναντι mEC όταν συνδέονταν λειτουργικά (Intact), μια διαφορά που εξαφανίστηκε όταν απομονώθηκαν. Ο λόγος FR / R αυξήθηκε σε CA3 απουσία mEC. Τόσο σε φέτες N και SE. Είναι ενδιαφέρον ότι η κατεύθυνση των μεταβολών ισχύος R και FR μετα-SE ήταν μια εικόνα καθρέφτη μεταξύ CA3 και mEC και επίσης μεταξύ N, SE φέτες, δηλαδή αυξήσεις ισχύος σε mEC αντιστοιχούσαν σε μειώσεις ισχύος σε CA3 μετά την SE.

Η ανώριμη SE έχει βαθύ αντίκτυπο στην επικοινωνία του δικτύου CA3-mEC μακροπρόθεσμα και έχει ως αποτέλεσμα επιδράσεις ειδικά για την περιοχή σε ολόκληρο τον άξονα του septotemporal hippocampal. Οι μεταβολές στο δίκτυο του mEC μετά από SE, ενδέχεται να επιτρέψουν στην περιοχή αυτή να δρα ως ανεξάρτητο επιληπτογόνο υπόστρωμα μετά την SE, ενώ η ενισχυμένη χολινεργική διευκόλυνση στη συχνότητα των μεσοκρισικών εκφορτίσεων στο διαφραγματικό άκρο του ιπποκάμπου, υποδηλώνει ότι τουλάχιστον σε αυτή την περιοχή, το κατώφλι για κρίσεις θα μπορούσε να τροποποιηθεί με ένα ειδικό ερέθισμα. Συνολικά, η συνέχιση των κρίσεων πρώιμης ζωής εξαρτάται από την πληγείσα περιοχή και από τα ερεθίσματα που αντιμετωπίζει ο ενήλικας εγκέφαλος.

SUMMARY

We have earlier demonstrated that a single episode of early-life Status Epilepticus (SE) provokes lasting neurobiological effects persisting to adulthood and detectable *in vitro* and *in vivo*. In this work, we studied possible changes in adult IED frequency and concurrent HFOs (Rs, FRs) in hippocampal CA3 and medial entorhinal cortex networks (mEC), addressing their evolution and cholinergic control post-SE. In this setting, we have also aimed at detecting any correlation patterns between the IED frequency and HFOs, if any.

Field potential recordings were made from the CA3 subfield of Temporal (T) and Septal (S) hippocampal slices or simultaneously from the pyramidal CA3 and mEC deep layers of hippocampal-mEC (combined) slices. The slices were obtained either from Normal (N) or from animals subjected to a single PTZ-induced (60-90mg/Kg) generalized, sustained SE-like seizure (hereafter termed as “SE”) at PND 20. Spontaneous IEDs were induced in both areas (CA3, mEC) by bathing the slices (hippocampal, combined) either in Mg²⁺-free ACSF or in 4-Aminopyridine (4-AP, 50 μM).

CA3 IED frequency of hippocampal slices was similar in same origin N slices across models, but differed in SE slices, being lower in Mg²⁺-free ACSF than in 4-AP, suggesting a long-term post-SE increase of a 4-AP sensitive K⁺ conductance(s). Bath application of cholinergics increased hippocampal-CA3 IED rates universally, but had region- and conditioning-specific effects on HFOs suggesting that IEDs and HFOs are different hypersynchronous phenomena generated within similar neuronal networks. Paired recordings from the pyramidal CA3 and mEC deep layers (V-VI) of combined (N or SE) slices, revealed that IED frequency was lower in mEC compared to CA3 in both models; isolation of the 2 areas did not alter this relationship. Also, CA3 IED frequency was similar in all slices (N, SE) however, mEC IED frequency was higher in SE vs N slices in both models. CA3 HFOs had 100 times higher power than those recorded from mEC. FR/R ratio was lower in CA3 vs mEC when they were functionally connected (Intact), a difference that disappeared when they were isolated. The FR/R ratio increased in CA3 in the absence of mEC; both in N and SE slices. Interestingly, the direction of the R and FR power changes post-SE was a mirror image between CA3 and mEC and also between N, SE slices, that is power increases in mEC corresponded to power decreases in CA3 post-SE.

Immature SE has a profound impact on the communication modalities of CA3-mEC circuitry in the long term and results in region-specific effects across the septotemporal hippocampal axis. The post-SE changes in mEC network may enable this area to serve as an independent epileptogenic substrate post-SE, while the enhanced cholinergic facilitation of IED frequency in septal hippocampal extremity, suggests that at least to this area, the seizure threshold could be modified in a stimulus specific way. Overall, the sequelae of the early-life seizures depend on the affected area and on the stimuli that the adult brain faces.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Επιληψία

Η επιληψία, αποτελεί το συχνότερο νευρολογικό νόσημα καθώς επηρεάζει περίπου το 3% του πληθυσμού. Εκτιμάται πως 5-10/1000 άτομα αντιμετωπίζουν επιληπτικά επεισόδια σήμερα. Η επιληψία είναι μια νευρολογική διαταραχή του νευρικού συστήματος η οποία χαρακτηρίζεται από μια διαρκή προδιάθεση για την εμφάνιση περιοδικών και απρόβλεπτων κρίσεων. Τα πρώτα επεισόδια στον άνθρωπο, συνήθως εμφανίζονται κατά την παιδική ηλικία και εμμένουν δια βίου, υποβαθμίζοντας την ποιότητα ζωής των νοσούντων και τις δυνατότητες εκπαίδευσης, μάθησης κι εργασίας τους. Η επιληψία αποτελεί επομένως, μια ασθένεια (ή δυσλειτουργία) του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) με ευρύ κοινωνικό και οικονομικό αντίκτυπο.

Κατηγοριοποίηση

Οι επιληπτικές κρίσεις μπορούν να διακριθούν σε 2 κύριες κατηγορίες:

- Γενικευμένες
- Εστιακές

Γενικευμένες Επιληπτικές κρίσεις (Generalised seizures)

Οι γενικευμένες επιληπτικές κρίσεις συνοδεύονται από απώλεια της συνείδησης και εμπλέκουν το μεγαλύτερο τμήμα του εγκεφάλου. Διακρίνονται σε τονικο-κλονικές (grand mal) στις οποίες παρατηρείται εκτεταμένος μυϊκός τόνος κι υπερέκταση του σώματος, κι ακόλουθη εμφάνιση σπασμών που ενδέχεται να διαρκέσουν αρκετά λεπτά. Οι αφαιρετικές κρίσεις (petit mal) εμφανίζονται κυρίως κατά την παιδική ηλικία και χαρακτηρίζονται από σύντομη απώλεια της συνείδησης χωρίς κινητικές εκδηλώσεις.

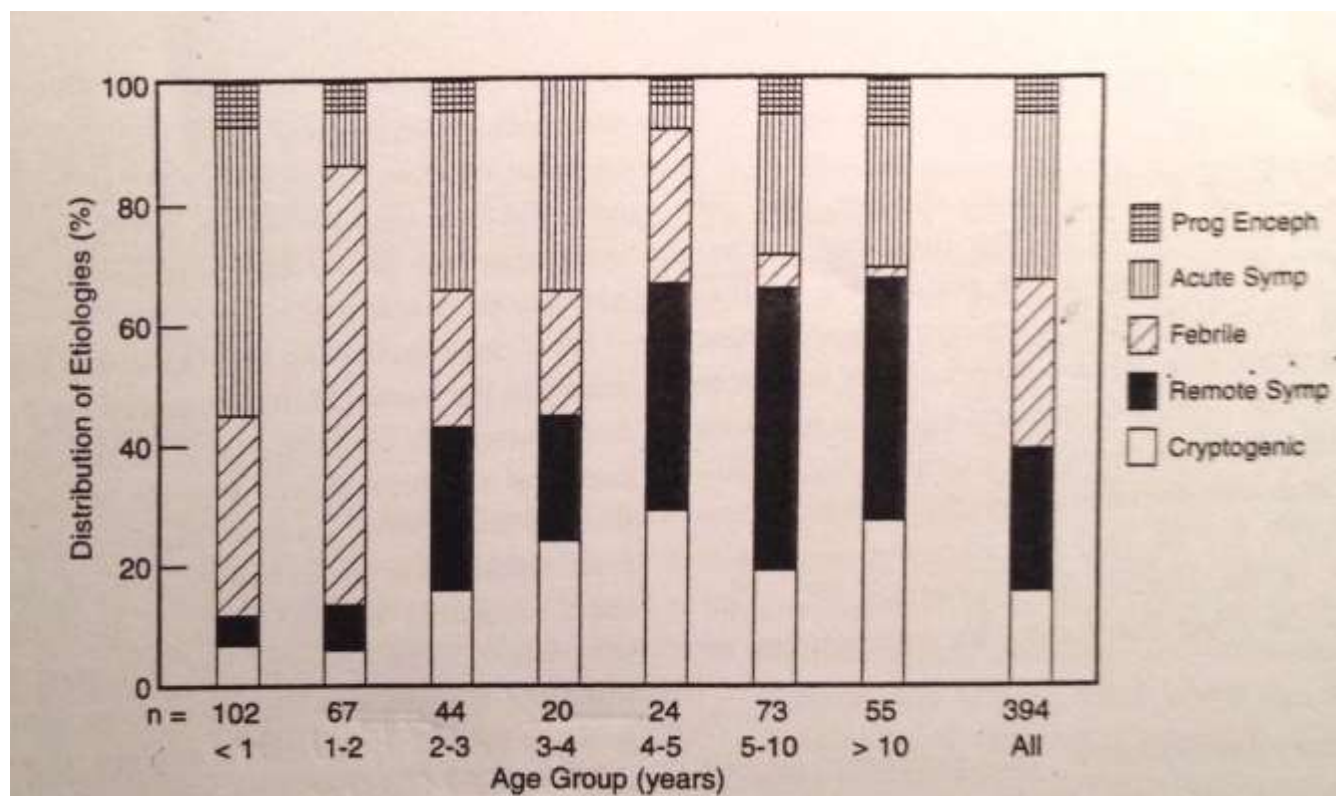
Εστιακές Επιληπτικές κρίσεις (Partial seizures)

Οι εστιακές επιληπτικές κρίσεις ξεκινούν και παραμένουν εστιασμένες σε συγκεκριμένες περιοχές τις «εστίες», η εντόπιση των οποίων στον φλοιό καθορίζει και την εκδήλωση των συμπτωμάτων. Με τον όρο «εστία» νοείται μια εύκολα διεγέρσιμη ομάδα νευρώνων η οποία είναι επιρρεπής σε συγχρονισμένη επιληπτική δραστηριότητα. Μπορούν να διακριθούν περαιτέρω σε απλές και σύμπλοκες βάσει των κλινικών συμπτωμάτων που εμφανίζει ο ασθενής.

1.2 Επιληπτική κατάσταση - Status Epilepticus (SE)

Η επιληπτική κατάσταση ή αλλιώς Status Epilepticus (SE) συνιστά μια κρίσιμη νευρολογική κατάσταση η οποία συνοδεύεται από σημαντική νοσηρότητα και θνησιμότητα {DeLorenzo, 1996 #190; DeLorenzo, 1995 #191; DeLorenzo, 1992 #192}. Η επιληπτική κατάσταση χαρακτηρίζεται από κρίσεις που διαρκούν περισσότερο των 30 λεπτών και συνοδεύονται συχνά από απώλεια συνείδησης {Hauser, 1990 #194}. Εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στα παιδιά {Hauser, 1990 #194} κι ενδέχεται να προκύψει ως συνάρτηση μιας υπάρχουσας επιληπτικής διαταραχής ή στο πλαίσιο μιας οξείας ασθένειας {Berg, 1999 #193} {Hauser, 1990 #194}. Η πιθανότητα εμφάνισης SE στα παιδιά αποτελεί συνάρτηση της ηλικίας {Maytal, 1989 #196} κι είναι ενδιαφέρον ότι στο 50% των περιπτώσεων, δεν έχει αναφερθεί προηγούμενο ιστορικό κρίσεων {Shinnar, 1997 #195}. Παιδιά μικρότερα του ενός έτους εμφανίζουν την υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης SE, με συγκρίσιμες πιθανότητες να εμφανίζουν επίσης και τα ηλικιωμένα άτομα {DeLorenzo, 1995 #191}. Η πιθανότητα εμφάνισης SE αυξάνεται με προηγούμενο ιστορικό SE σε πολύ νεαρά άτομα (<1 έτους) αλλά και σε άτομα με προ υπάρχουσες νευρολογικές κι επιληπτικές διαταραχές. Ωστόσο, η εμφάνιση επιληπτικής κατάστασης χωρίς προηγούμενο ιστορικό δεν είναι σπάνια και συνήθως εξαρτάται σε έναν μεγάλο βαθμό από την ηλικία {Maytal, 1989 #196}.

Η αιτιολογία του SE στα παιδιά αποτελεί συνάρτηση της ηλικίας (εικόνα 1) ενώ διαφέρει σημαντικά από αυτή των ενηλίκων.



Εικόνα 1: Κατανομή αιτιολογιών επιληπτικής κατάστασης σε παιδιά βάσει ηλικίας. Γράφημα από την εργασία των {Shinnar, 1997 #195}.

Πιο συγκεκριμένα, η αιτιολογία εμφάνισης SE στα παιδιά ποικίλλει και μπορεί να χαρακτηριστεί / συσχετιστεί με:

- *Ιδιοπαθής*: Η επιληπτική κατάσταση εμφανίζεται απουσία κάποιας βλάβης του ΚΝΣ ή κάποιας μεταβολικής ή συστημικής διαταραχής. Σε αυτήν την κατηγορία, ανήκουν επίσης και τα άτομα που εμφάνισαν ένα γεγονός SE χωρίς να έχουν σημειώσει προηγούμενο ιστορικό.
- *Συμπτωματική*: Σε αυτήν την περίπτωση η επιληπτική κατάσταση εμφανίζεται συναρτήσει ενός ήδη υπάρχοντος παθολογικού υποβάθρου το οποίο σχετίζεται με αυξημένη προδιάθεση για επιληπτικές κρίσεις όπως φλοιικές δυσπλασίες, σύνδρομα πνευματικής καθυστέρησης, τραύματα κι εγκεφαλικές αιμορραγίες.
- *Πυρετικές κρίσεις (febrile seizures)*: Οι πυρετικοί σπασμοί ευθύνονται για το 25% των παρατηρούμενων επεισοδίων επιληπτικής κατάστασης στα παιδιά και συνοδεύονται από υψηλή θερμοκρασία σώματος (άνω των 38.4 °C) απουσία κάποιας μόλυνσης ή ηλεκτρολυτικής ανισορροπίας.
- *Οξεία συμπτωματική*: Η επιληπτική κατάσταση ενδέχεται να προκύψει και ως συνάρτηση κάποιας οξείας ασθένειας σχετιζόμενης με μεταβολικές διαταραχές ή και νευρολογικές βλάβες. Στις βλάβες αυτές συμπεριλαμβάνονται η υποξία, η μηνιγγίτιδα και το τραύμα. Σε αυτήν την κατηγορία, συμπεριλαμβάνεται κι η περίπτωση των επεισοδίων SE που προκύπτουν μετά τη διακοπή της φαρμακευτικής αγωγής.
- *Προοδευτική εγκεφαλοπάθεια*: Το SE ενδέχεται να προκύψει και σε συνάρτηση με νευρολογικές διαταραχές όπως για παράδειγμα κακοήθειες και νευροεκφυλιστικές νόσοι, συνιστώντας μια σπάνια περίπτωση καθώς αντιπροσωπεύει μόνο 10% των περιπτώσεων με SE.

Είναι ενδιαφέρον πως κατά τη διάρκεια του πρώτου χρόνου ζωής, οι οξείες συμπτωματικές αιτιολογίες ευθύνονται για πάνω από το 50% των περιπτώσεων SE. Οι πυρετικές κρίσεις ευθύνονται για πάνω από τα 2/3 των περιπτώσεων SE κατά τον δεύτερο χρόνο ζωής, ενώ >60% των παιδιών με SE ηλικίας >4ετών σημειώνουν ιδιοπαθή ή συμπτωματική αιτιολογία {Shinnar, 1997 #195}.

Η ταξινόμηση των κρίσεων βάσει των οδηγιών της ILAE {Fisher, 2017 #275; Scheffer, 2017 #272} διακρίνει τις κρίσεις σε γενικευμένες (τονικο-κλονικές, τονικές ατονικές, αφαιρέσεις, μυόκλωνο), μερικές, συνθέτες μερικές και μερικές με δευτερογενή γενίκευση. Πρακτικά όλες οι προαναφερθείσες -εκτός των ατονικών- μπορούν να σημειωθούν κατά τη διάρκεια μιας επιληπτικής κατάστασης. Επίσης, η επιληπτική κατάσταση

μπορεί να διακριθεί περαιτέρω σε κλονικούς και μη-κλονικούς τύπους, με τους πρώτους να συναντώνται συχνότερα στα παιδιά με SE {Hauser, 1990 #194}.

Μακροχρόνιες συνέπειες SE

Η επιληπτική κατάσταση σε νεαρή ηλικία έχει συνδεθεί με νοητική υστέρηση {Aicardi, 1970 #197; Doose, 1979 #198} αλλά και με σημαντική νοσηρότητα και θνησιμότητα συναρτήσει της συν-υπάρχουσας νευρολογικής βλάβης. Υπολογίζεται ότι μόνο ένα μικρό ποσοστό της τάξης του 10% των ενηλίκων και παιδιών βιώνουν SE ως την πρώτη τους κρίση. Ωστόσο, η διάρκεια της πρώτης κρίσης στα παιδιά σχετίζεται ανάλογα με την αυξημένη πιθανότητα για παρατεταμένες κρίσεις στο μέλλον {Shinnar, 1996 #199; Shinnar, 2001 #200}. Ειδικότερα, δημιουργείται μια διαρκής προδιάθεση όχι μόνο για υποτροπιάζουσες κρίσεις αλλά και για κρίσεις μεγάλης διάρκειας που ενδέχεται να προσεγγίζουν και το SE {Shinnar, 1992 #201}. Η επιληπτική κατάσταση έχει συσχετιστεί θετικά με την εμφάνιση μελλοντικής φαρμακοανθεκτικότητας συναρτήσει του παθοφυσιολογικού υποβάθρου του ασθενούς {Berg, 1996 #202}. Ιδιοπαθές SE δεν φαίνεται να αυξάνει την πιθανότητα για την μετέπειτα ανάπτυξη επιληψίας {Shinnar, 1993 #204} {Shinnar, 1990 #203} ενώ αντίθετα συμπτωματικό SE φαίνεται να διευκολύνει σημαντικά την ανάπτυξη μελλοντικών επιληπτικών διαταραχών {Annegers, 1990 #205}. Επίσης, είναι ενδιαφέρον ότι νευροαπεικονιστικά ευρήματα συνέδεσαν την επιληπτική κατάσταση με μειωμένους εγκεφαλικούς όγκους, μια παρατήρηση που αποτελούσε συνάρτηση της ηλικίας εμφάνισης αλλά και του παθοφυσιολογικού υποβάθρου τους ασθενούς.

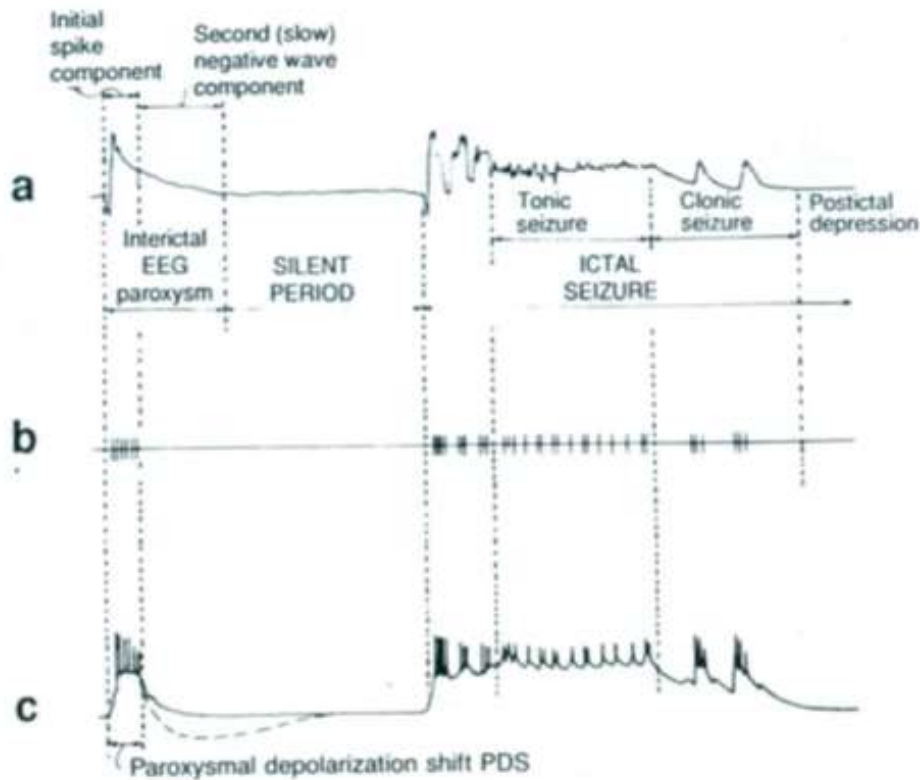
Πειραματικά μοντέλα μελέτης του SE

Έχουν αναπτυχθεί αρκετά μοντέλα μελέτης του SE τα οποία χρησιμοποιούν χημικά σπασμογόνα (καινικό οξύ, πεντυλενετετραζόλη, πιλοκαρπίνη, τοξίνη του τετάνου) χορηγούμενα είτε συστημικά είτε ενδοκρανιακά. Επίσης άλλα μοντέλα εφαρμόζουν ηλεκτρικό ερεθισμό (kindling) συγκεκριμένων δομών όπως είναι η αμυγδαλή ή εισπνοή χημικών παραγόντων (flurothyl) οι οποίοι προκαλούν κρίσεις. Όλες οι παραπάνω προσεγγίσεις, χρησιμοποιούνται για την πρόκληση επιληπτικών σπασμών στα πειραματόζωα είτε με την χορήγηση κατάλληλων δόσεων (οξείες, υποκατωφλικές) είτε με την εφαρμογή κατάλληλου (υποκατωφλικού ή διεγερτικού) ηλεκτρικού ερεθίσματος.

1.3 Μεσοκριστικές εκφορτίσεις

Οι επιληπτικές κρίσεις αποτελούν τη σημαντικότερη κλινική εκδήλωση. Στην εστιακή επιληψία και πιο συγκεκριμένα στην επιληψία μέσου κροταφικού λοβού, παρατηρούνται ηλεκτροεγκεφαλογραφικά πρότυπα που συμβαίνουν μεταξύ των κρίσεων κι ονομάζονται μεσοκριστικές εκφορτίσεις. Οι εκφορτίσεις αυτές δεν

συνοδεύονται από συμπεριφορικά συμπτώματα αλλά πρόσφατες μελέτες προτείνουν ότι σχετίζονται με απώλεια μνήμης {Gelinas, 2016 #225} {Kleen, 2010 #264;Kleen, 2013 #263} (**εικόνα 2**). Σύμφωνα με τη μορφολογία τους και τη συχνότητά τους μπορούν να διακριθούν σε μεσοκρισικές εκφορτίσεις (spikes) ή υψίσυχνες ταλαντώσεις -όταν αυτές παρατηρούνται ανεξάρτητα μεσοκρισικών εκφορτίσεων- (high frequency oscillations){de Curtis, 2012 #265}. Οι μεσοκρισικές εκφορτίσεις καταγράφονται κατά τη διάρκεια του ηλεκτροεγκεφαλογραφήματος ευρείας ζώνης (wideband) ενώ οι υψίσυχνες ταλαντώσεις προκύπτουν μετά από φίλτράρισμα κι ενίσχυση του κατάλληλου σήματος και διακρίνονται περαιτέρω σε συχνότητες Ripples (ριπιδισμοί: 80-200 Hz) και Fast ripples (γρήγοροι ριπιδισμοί: 200-600 Hz). Σε αυτήν την ενότητα θα εστιάσουμε κυρίως στις μεσοκρισικές εκφορτίσεις οι οποίες είναι ενδιαφέρον ότι έχουν καταγραφεί κι εκτός της επιληψίας, σε ένα μεγάλο εύρος νευρολογικών διαταραχών συμπεριλαμβανομένων των ψυχώσεων, του συνδρόμου ελλειμματικής προσοχής και των αγχωδών διαταραχών (ανασκόπηση {Barkmeier, 2009 #266}). Ωστόσο, η συνεισφορά των μεσοκρισικών εκφορτίσεων στην διευκόλυνση πρόκλησης ή αναστολή των κρίσεων, δεν είναι διασαφηνισμένη {Staley, 2005 #136} {Avoli, 2013 #137} {Gotman, 1984 #162;Gotman, 1991 #161}. Ιστορικά, η ιδέα του διττού ρόλου των μεσοκρισικών εκφορτίσεων δεν είναι καινούργια. Ο ρόλος τους να προωθούν ή να αναστέλλουν την ικτογένεση (πρόκληση/γέννηση κρίσεων) ήταν ήδη γνωστός από τις ηλεκτροεγκεφαλογραφικές καταγραφές των W. Penfield και T. Rasmussen στην δεκαετία του 50-60 οι οποίοι αναφέρονταν σε αυτά τα γεγονότα ως «πράσινες» και «κόκκινες» εκφορτίσεις {Levesque, 2017 #267}. Οι υπάρχουσες μελέτες αναφέρουν επιχειρήματα και προς τις δύο κατευθύνσεις. Οι μελέτες των μεσοκρισικών εκφορτίσεων προέρχονται από ηλεκτροεγκεφαλογραφικές καταγραφές με τοποθέτηση ηλεκτροδίων στο κρανίο αλλά και από εν τω βάθει καταγραφές. Οι μελέτες αυτές στοχεύουν στη τοπογραφική συσχέτιση των μεσοκρισικών εκφορτίσεων με την περιοχή του εγκεφάλου που είναι υπεύθυνη για την έκλυση κρίσεων, με απώτερο σκοπό την χειρουργική της αφαίρεση σε ασθενείς με φαρμακοανθεκτική επιληψία {Bast, 2004 #208;Benar, 2006 #209}. Επίσης, αρκετές μελέτες σε μοντέλα ζώων (ανασκόπηση αυτών {Avoli, 2013 #137}) έχουν αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμες για την αποκάλυψη των βασικών μηχανισμών που διέπουν την γέννηση, μεταγωγή και συσχέτιση των μεσοκρισικών εκφορτίσεων με την πρόκληση ή την αναστολή κρίσεων.

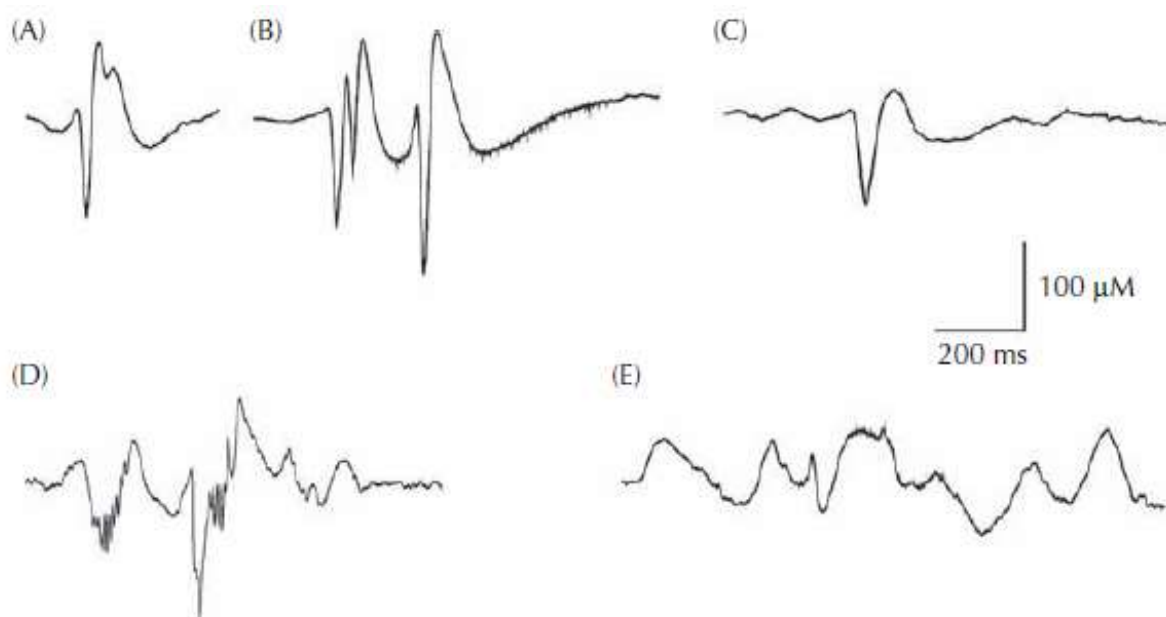


Εικόνα 2: Μεσοκρισική και κρισική δραστηριότητα. (a) Μεσοκρισικές και κρισικές εκφορτίσεις καταγραφόμενες ηλεκτροεγκεφαλογραφικά. (c) Ταυτόχρονη ενδοκυττάρια καταγραφή η οποία δείχνει την παροξυσμική δραστηριότητα.

Οι μεσοκρισικές εκφορτίσεις εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια αναφορικά με την μορφολογία τους (εικόνα 3), αντικατοπτρίζοντας πιθανότατα τον διαφορετικό νευροβιολογικό μηχανισμό που ευθύνεται για την εμφάνισή τους {Kooi, 1966 #213}. Ενδεικτικά, τα μεσοκρισικά αυτά φαινόμενα μπορούν να διακριθούν σε γρήγορες μεσοκρισικές εκφορτίσεις (spikes), σε spike bursts, οξύαιχμα κύματα και τις υψίσυχνες ταλαντώσεις -όταν αυτές παρατηρούνται ανεξάρτητα από τις μεσοκρισικές εκφορτίσεις-. Κάποια από τα αναφερόμενα μεσοκρισικά μοτίβα συναντώνται σε συγκεκριμένες παθολογίες σε σχέση με άλλες, συνιστώντας ένα διαγνωστικό βιοδείκτη. Για παράδειγμα, στην εστιακή φλοιική δυσπλασία τύπου II συναντάται το μεσοκρισικό μοτίβο που χαρακτηρίζεται από γρήγορη υψίσυχη δραστηριότητα (brushes) το οποίο εμφανίζεται ενισχυμένο κατά τον ύπνο βραδένων κυμάτων {Tassi, 2002 #214}. Εν τω βάθου ηλεκτροεγκεφαλογραφικές καταγραφές κατά τη διάρκεια προ-χειρουργικής αξιολόγησης φαρμακοεναθεκτικών ασθενών, έδειξαν ότι τα μεσοκρισικά αυτά γεγονότα συμπίπτουν με μια μεγάλη μεταβολή του μεμβρανικού δυναμικού παρόμοια της παροξυσμικής που καταγράφεται και πειραματικά {Prince, 1971 #215}.

Είναι επίσης γνωστό ότι η περιοχή καταγραφής μεσοκρισικών γεγονότων σχετίζεται με την ευρύτερη περιοχή που είναι υπεύθυνη για την πρόκληση κρίσεων {Talairach, 1966 #216}. Ειδικότερα, η καταγραφή μεσοκρισικών εκφορτίσεων ηλεκτροεγκεφαλογραφικά συμβάλλει στην χαρτογράφηση της ζώνης που

παρεμβάλλεται μεταξύ των φυσιολογικών και των επιληπτογόνων περιοχών και η οποία ονομάζεται «ερεθισμένη ζώνη» (irritative zone).



Εικόνα 3: Διαφορετικά μεσοκρισικά μοτίβα καταγραφόμενα ηλεκτροεγκεφαλογραφικά. (A) γρήγορη μεσοκρισική εκφόρτιση, **(B)** αθροίσματα/ομάδες γρήγορων μεσοκρισικών εκφορτίσεων, **(C)** οξύαιχμο κύμα, **(D)** γρήγορη δραστηριότητα (brush) σε συνάρτηση με μεσοκρισική εκφόρτιση, **(E)** παροξυσμική αργή δραστηριότητα σε συνάρτηση με αργό κύμα.

Ένας άλλος τύπος μεσοκρισικής (αλλά και κρισικής) δραστηριότητας είναι οι υψίσυχνες ταλαντώσεις (80-600 Hz), οι οποίες θα αναλυθούν παρακάτω {Andrade-Valenca, 2012 #100}{Bragin, 2002 #5}{Jacobs, 2008 #98}{Papadelis, 2016 #52}{Zijlmans, 2011 #101}. Συνήθως, οι υψίσυχνες ταλαντώσεις που καταγράφονται με εν τω βάθει ηλεκτρόδια από φαρμακοανθεκτικούς επιληπτικούς ασθενείς παρατηρούνται σε συνάρτηση με μεσοκρισικές εκφορτίσεις αλλά έχουν περιγράψει κι εκτός αυτών {Jacobs, 2008 #98}{Zijlmans, 2011 #101}. Ωστόσο, η διαγνωστική τους αξία στην εστιακή επιληψία φαίνεται να αυξάνει για τις μεσοκρισικές εκφορτίσεις που φέρουν υψίσυχνες ταλαντώσεις σε σύγκριση με αυτές που δεν φέρουν {Papadelis, 2016 #52}{Jacobs, 2008 #98}. Μάλιστα, αρκετές μελέτες προτείνουν ότι οι υψίσυχνες ταλαντώσεις αποτελούν ειδικότερους και πιο ευαίσθητους βιοδείκτες στον εντοπισμό της επιληπτογόνου περιοχής συγκριτικά με τις μεσοκρισικές εκφορτίσεις, ιδιαίτερα σε φαρμακοανθεκτικούς ασθενείς στους οποίους η μόνη επιλογή για την ελευθερία κρίσεων συνιστά η χειρουργική παρέμβαση {Jacobs, 2008 #98}{Urrestarazu, 2007 #231}{Bragin, 1999 #93}.

Μεσοκρισική δραστηριότητα με παρόμοια ηλεκτρογραφικά χαρακτηριστικά μπορεί να μελετηθεί και *in vitro* σε εγκεφαλικές τομές πειραματοζώων με τη χρήση πειραματικών πρωτοκόλλων που ευνοούν τον επιληπτοειδή συγχρονισμό {Avoli, 2016 #212}{Gutierrez, 1999 #217}. Αρκετές φαρμακολογικές μέθοδοι

έχουν αξιοποιηθεί γι' αυτό τον σκοπό. Ενδεικτικά, η άρση της GABA_A αναστολής, η ενεργοποίηση των NMDA υποδοχέων με αφαίρεση των ιόντων Mg²⁺ από το μέσο διαβροχής (μοντέλο άνευ-Mg²⁺), η αναστολή αγωγιμοτήτων καλίου (μοντέλο 4-AP), καθώς κι η χρήση αγωνιστών για τους μουσκαρινικούς υποδοχείς της ακετυλοχολίνης (καρβαχόλη).

1.4 Υψίσυχνες Ταλαντώσεις-High Frequency Oscillations (HFOs)

Αυθόρμητες ρυθμικές ταλαντώσεις πεδίου, όπως για παράδειγμα οι ρυθμοί θήτα (3-8 Hz), γάμμα (30-80 Hz) κι οι υψίσυχνες ταλαντώσεις (80-600 Hz) συναντώνται κατά τη αφύπνιση και κατά τη διάρκεια του ύπνου, συμπίπτοντας με αύξηση του βαθμού και συγχρονισμού της νευρωνικής πυροδότησης. Τα δίκτυα που υποστηρίζουν την έκλυση των πιο υψίσυχνων ταλαντώσεων (80-600 Hz) είναι σαφώς πιο περιορισμένα σε έκταση συγκριτικά με εκείνα των ρυθμών γάμμα και θήτα. Ο συγχρονισμός δε που επιτυγχάνεται σε χρονικό κλίμακα μερικών ms, είναι σημαντικά μεγαλύτερος. Αυτό είναι σημαντικό, καθώς οι υψίσυχνες ταλαντώσεις λόγω της δυνατότητάς τους να τροποποιούν την συναπτική διαβίβαση συμμετέχουν στην μεταγωγή πληροφοριών κι εδραίωση της μνήμης, αλλά και σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις όπως είναι η επιληψία.

Ripples - Ριπιδισμοί (80-200 Hz)

Στις μεταιχμιακές δομές πολλών θηλαστικών συμπεριλαμβανομένων των τρωκτικών, πρωτεύοντων και των ανθρώπων αυθόρμητες υψίσυχνες ταλαντώσεις στο εύρος των συχνοτήτων Ripple: 80-200 Hz έχουν καταγραφεί στις πυραμιδικές στοιβάδες της CA1 και CA3, στο υπόθεμα, τον ενδορρινικό φλοιό και την αμυγδαλή {Buzsaki, 1992 #221}. Οι Ripple ταλαντώσεις που καταγράφονται στον ιππόκαμπο συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της ακινησίας του πειραματοζώου και του ύπνου βραδέων κυμάτων (Slow wave sleep-SWS) όπου συμπίπτουν με οξύαιχμα κύματα μεγάλου ύψους (Sharp waves) {Buzsaki, 1986 #206}. Ωστόσο, καταγράφονται και κατά τη διάρκεια της εξερεύνησης και του ύπνου REM, αλλά σε μικρότερο βαθμό. Έχει προταθεί ότι οι συχνότητες Ripple προκύπτουν από την αλληλεπίδραση πυραμιδικών κυττάρων με ενδονευρώνες και πιο συγκεκριμένα, φαίνεται να είναι αποτέλεσμα ρυθμικών μετασυναπτικών ανασταλτικών δυναμικών στα πυραμιδικά κύτταρα {Csicsvari, 1999 #207}. Άλλοι υποψήφιοι μηχανισμοί, είναι η ηλεκτροτονική σύζευξη μέσω των στενοσυνδέσμων {Maier, 2002 #222} αλλά και οι μη συναπτικές οδοί {Traub, 1999 #223}. Ο φυσιολογικός ρόλος των συχνοτήτων Ripple αφορά τη μεταφορά πληροφοριών από τον ιππόκαμπο προς το νεοφλοιό κατά τη διάρκεια του ύπνου βραδέων κυμάτων {Buzsaki, 1996 #224}. Η διαδικασία αυτή διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παγίωση της μνήμης και οποιαδήποτε διατάραξη αυτής της μεταφοράς (π.χ μεσοκρισικές εκφορτίσεις) {Gelinas, 2016 #225} ενδέχεται να συμβάλλει σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις. Ωστόσο, οι συχνότητες Ripple ενέχονται και στην πρόκληση κρίσεων καθώς καταγράφονται πριν την έναρξή τους {Salami, 2016 #228; Shiri, 2016 #229} {Weiss, 2016 #227} αλλά και σε

στενή συσχέτιση (coupling) με μεσοκριτικές εκφορτίσεις κοντά σε επιληπτογόνες ζώνες {Weiss, 2016 #226}. Συνεπώς, είναι δύσκολο να διαχωριστούν φυσιολογικά και παθολογικά υψίσυχνα γεγονότα βάσει μόνο της συχνότητας τους {Engel, 2009 #230} καθώς θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν και τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά αλλά και ο τύπος της δραστηριότητας υποβάθρου που αυτά εμφανίζονται {Kerber, 2014 #276}. Σε κάθε περίπτωση, η ανάμειξη φυσιολογικών και παθολογικών Ripple γεγονότων είναι πολύ πιθανή και η αποφυγή αυτής συνιστά αντικείμενο εντατικής έρευνας.

Fast Ripples-Γρήγοροι ριπιδισμοί (200-600 Hz)

Υψίσυχνη δραστηριότητα στις συχνότητες Fast Ripple (200-600 Hz) έχει καταγραφεί στον σωματοαισθητικό φλοιό κατά τη διάρκεια αισθητικά προκληθέντων δυναμικών (somatosensory evoked potentials) {Curio, 1994 #268} {Ozaki, 2011 #269} αλλά και σε μη-επιληπτικά πειραματόζωα {Kandel, 1997 #270}. Ωστόσο, στις φυσιολογικές μεταιχμιακές δομές δεν καταγράφονται Fast ripple συχνότητες {Staba, 2012 #271} ενώ ακόμη και συχνότητες Ripple δεν παρατηρούνται στην φυσιολογική οδοντωτή έλικα {Engel, 2009 #230}. Σε μοντέλα ζώων με χρόνια επιληψία {Bragin, 1999 #93}, καταγράφονται από τις πυραμιδικές στοιβάδες της CA3 και της CA1 του ιπποκάμπου, την οδοντωτή έλικα, τον ενδορρινικό φλοιό {Bragin, 2002 #134} και εμφανίζονται πάντα σε πειραματόζωα που αργότερα εμφανίζουν αυθόρμητες κι υποτροπιάζουσες κρίσεις {Bragin, 1999 #15} {Bragin, 2000 #233}. Επίσης, σε ασθενείς με φαρμακοανθεκτική επιληψία φαίνεται να αυξάνουν κοντά σε επιληπτογόνες περιοχές {Jacobs, 2011 #141} {Weiss, 2016 #95} {Bragin, 2002 #134} {Urrestarazu, 2007 #231} αλλά και πριν την έναρξη κρίσεων {Weiss, 2016 #227} {Shiri, 2016 #229}. Ηλεκτροεγκεφαλογραφικές καταγραφές υπέδειξαν την παρουσία τους κατά τη διάρκεια του ύπνου βραδέων κυμάτων και του ύπνου REM, με μεγαλύτερη αντιπροσώπευση κατά το στάδιο NREM {Staba, 2004 #234}. Παράλληλα, οι Fast Ripple ταλαντώσεις έχουν συσχετιστεί και με παθολογοανατομικά ευρήματα. Υψηλοί λόγοι Fast Ripple/Ripple σχετίζονται θετικά με τον βαθμό της ατροφίας του ιπποκάμπου {Ogren, 2009 #235} αλλά και με μικρότερη πυκνότητα νευρικών κυττάρων στην οδοντωτή έλικα {Staba, 2007 #135} και στις CA περιοχές του ιπποκάμπου. Αυτά τα δεδομένα προτείνουν ότι οι Fast Ripple ταλαντώσεις σχετίζονται με την διαδικασία της επιληπτογένησης, ωστόσο η παρουσία τους δεν απαιτεί απαραίτητα την ύπαρξη κάποιας παθολογοανατομικής αλλοίωσης {Jiruska, 2010 #262}. Επίσης, οι Fast Ripple ταλαντώσεις τροποποιούνται με την φαρμακευτική αγωγή, με δεδομένα να προέρχονται τόσο από *in vitro* μελέτες {Behr, 2015 #237; Levesque, 2015 #238; Levesque, 2017 #236} {Frost, 2015 #239} όσο κι από μελέτες σε ασθενείς {Zijlmans, 2009 #240}. Από πλευράς μηχανισμών, πιστεύεται ότι αντιπροσωπεύουν μη ομαλή και υπερσυγχρονισμένη πυροδότηση ομάδων πυραμιδικών κυττάρων {Ibarz, 2010 #241} μιας μικρής περιοχής η έκταση της οποίας, δεν υπερβαίνει το 1 mm³ (Bragin, Mody et al. 2002).

1.5 Ιππόκαμπος

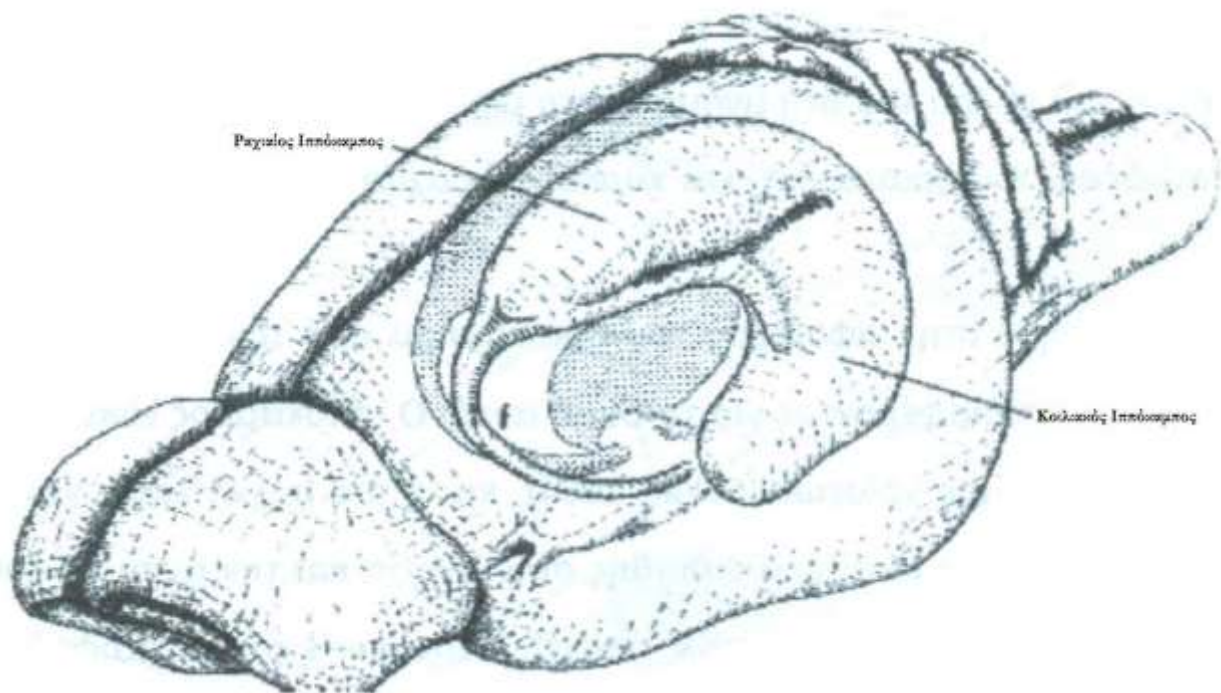
Ο ιππόκαμπος αποτελεί μια από τις πιο καλά μελετημένες δομές του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ). Σε αυτό συνέβαλαν η ευκρινής ανατομία κι εντόπιση του, αλλά και η ιδιαίτερα στρωματοειδής του οργάνωση. Πιο συγκεκριμένα, χαρακτηρίζεται από εγκάρσιες στρώσεις νευρωνικών στοιβάδων οι οποίες οργανώνονται σε ένα θεμελιώδες κύκλωμα το οποίο διατρέχει τον άξονα του ιπποκάμπου καθ' όλο το μήκος του. Ωστόσο, έχουν σημειωθεί σημαντικές διαφοροποιήσεις κατά το μήκος του αναφορικά με τη διεγερσιμότητα (Papatheodoropoulos, Asproдини et al. 2002, Papatheodoropoulos and Kostopoulos 2002, Papatheodoropoulos, Moschovos et al. 2005, Sotiriou, Papatheodoropoulos et al. 2005) αλλά και την συνδεσιμότητά του με άλλες περιοχές του φλοιού. Ειδικότερα, το διαφραγματικό άκρο εμπλέκεται κυρίως σε γνωσιακές λειτουργίες (Moser and Moser 1998) ενώ το κροταφικό, εμπλέκεται μεταξύ άλλων και στην απόκριση στο στρες και το συναίσθημα ενώ χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερα χαμηλή ουδό πρόκλησης επιληπτικών κρίσεων (Gilbert, Racine et al. 1985, Papatheodoropoulos, Moschovos et al. 2005, Fanselow and Dong 2010, Toyoda, Bower et al. 2013).

Η συμμετοχή του ιπποκάμπου σε λειτουργίες σχετιζόμενες με την μνήμη και την μάθηση, προέρχονται από την εργασία των (Scoville and Milner 2000) οι οποίοι περιέγραψαν την κλινική εικόνα του ασθενούς H.M ο οποίος υποβλήθηκε σε αμφοτερόπλευρη εκτομή ιπποκάμπου με σκοπό την αφαίρεση των επιληπτογόνων εστιών του και την ελευθερία κρίσεων. Νευροψυχολογικές δοκιμασίες όπως αυτές σχεδιάστηκαν από την Brenda Milner, περιέγραψαν την συμβολή των δομών αυτών σε διαδικασίες κωδικοποίησης νέων πληροφοριών σε μακροχρόνιες μνήμες, συμβάλλοντας στην εντατική μελέτη των δομών αυτών σε νευροανατομικό και συμπεριφορικό επίπεδο.

Ο ιππόκαμπος εμπλέκεται επίσης και σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις όπως είναι η επιληψία. Ειδικότερα, ο ιππόκαμπος αλλά και οι παρακείμενες ιπποκάμπιες δομές (ενδορρινικός φλοιός, περιρρινικός φλοιός, αμυγδαλή) συνιστούν ένα ιδιαίτερα επιληπτογόνο υπόβαθρο. Σε αυτό συνεισφέρουν η ιδιαίτερα χαμηλής ουδός για την πρόκληση κρίσεων αλλά και σε πολλές περιπτώσεις (ενδορρινικός φλοιός) η ενίσχυση του σήματος κατά την μετάδοσή του μέσα από κυκλώματα του ιπποκάμπου. Πολλοί ασθενείς που υποφέρουν από επιληψία έχουν κρίσεις που εμπλέκουν τον ιππόκαμπο και οι οποίες συνιστούν τις πιο φαρμακοανθεκτικές μορφές στην κλινική πράξη. Τέλος, τμήματα του ιπποκάμπου σχηματισμού ενέχονται επίσης και σε άλλες διαταραχές εκτός της επιληψίας όπως είναι η νόσος Alzheimer's, συνιστώντας σημαντικούς θεραπευτικούς στόχους.

Μακροσκοπική οργάνωση κι εντόπιση

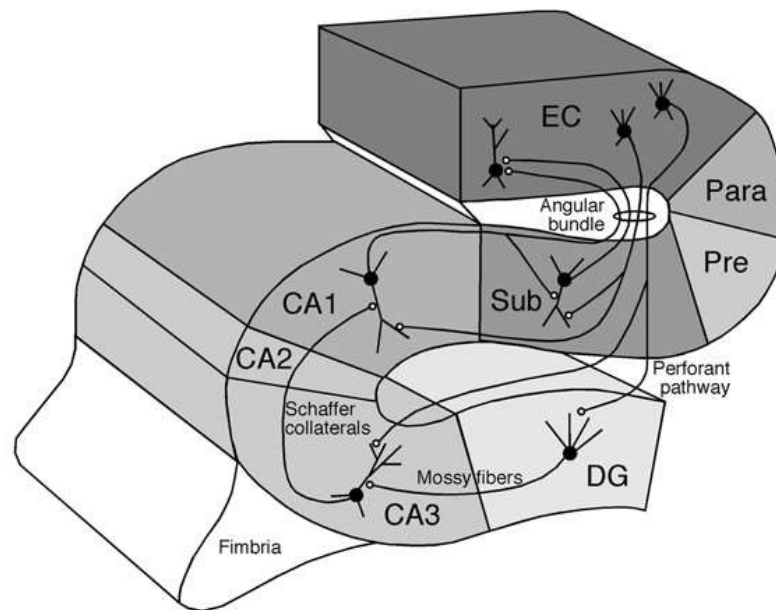
Η τρισδιάστατη εντόπιση του ιπποκάμπου στον εγκέφαλο επίμυος φαίνεται στην **εικόνα 4**. Πιο συγκεκριμένα, ο ιππόκαμπος είναι μια επιμήκης δομή που συνιστά αναδίπλωση του φλοιού και χαρακτηρίζεται από σχήμα δομής C. Εκτείνεται από τον διαφραγματικό πυρήνα (rostrally) προς τον κροταφικό φλοιό (caudally) με τον επιμήκη άξονά του να ονομάζεται διαφραγματικό-κροταφικός άξονας (septotemporal axis) κι ο ορθογώνιος, εγκάρσιος (transverse axis).



Εικόνα 4: Τρισδιάστατη εντόπιση ιπποκάμπου στον εγκέφαλο αρουραίου. Ο ιππόκαμπος συνιστά μια επιμήκη δομή σχήματος C η οποία εκτείνεται από το διαφραγματικό πυρήνα προς τον κροταφικό φλοιό. Ο επιμήκης άξονάς του ονομάζεται διαφραγματικο-κροταφικός ενώ ο ορθογώνιος, εγκάρσιος άξονας (Andersen et al., 2007).

Ανατομία

Ο ιππόκαμπος αποτελεί μέρος του ιπποκάμπειου σχηματισμού (**εικόνα 5**) και περιλαμβάνει τον κυρίως ιππόκαμπο (τμήματα CA-Cornus Amonis), την οδοντωτή έλικα (Dentate Gyrus), το υπόθεμα (Subiculum) και τον ενδορρινικό φλοιό (Entorhinal cortex). Το βασικό κύκλωμα του σχηματισμού του ιπποκάμπου ήταν ήδη γνωστό από τις μικροσκοπικές μελέτες του R.Y. Cajal, αλλά και από τις μελέτες των Andersen et al. οι οποίες συνέβαλλαν στον χαρακτηρισμό της τρισυναπτικής οδού (διατιτρούσα οδός-οδοντωτή έλικα, οδοντωτή έλικα-CA3, CA3-CA1) (**εικόνα 5**).



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση τρισυναπτικού κυκλώματος.

Στο κύκλωμα αυτό, ο ενδορρινικός φλοιός (EC) θεωρείται ο πρώτος σταθμός στο δίκτυο καθώς συνιστά την κύρια πύλη εισόδου της νευρωνικής δραστηριότητας που φθάνει στον ιππόκαμπο από τον νεοφλοιό. Οι επιφανειακές στοιβάδες (κυρίως η II) του μέσου ενδορρινικού φλοιού (mEC) προβάλλουν μέσω αξόνων στην οδοντωτή έλικα (Dentate Gyrus) και την CA3, αποτελώντας το κυριότερο μονοπάτι εισόδου το οποίο ονομάζεται διατιτραίνουσα οδός (perforant path). Η οδοντωτή έλικα δεν προβάλλει πίσω στον ενδορρινικό φλοιό, κατά συνέπεια το μονοπάτι είναι μονής κατεύθυνσης. Οι νευρώνες της στοιβάδας III του μέσου ενδορρινικού φλοιού προβάλλουν στην CA1 και στο υπόθεμα μέσω της διατιτραίνουσας οδού και του μονοπατιού «σκάφη» (alvear). Τα σώματα των πρωτοταγών νευρώνων της οδοντωτής έλικας, οργανώνονται στην κοκκιώδη στοιβάδα και μέσω των βρυωδών ινών (mossy fibers) καταλήγουν λίγο πιο πάνω από την πυραμιδική στοιβάδα της CA3. Ωστόσο, οι νευρώνες της CA3 δεν στέλνουν άξονες πίσω στην οδοντωτή έλικα. Οι πυραμιδικοί νευρώνες της CA3 προβάλλουν στην CA1 περιοχή μέσω των ινών Schaffer (Schaffer collaterals) χωρίς να υπάρχει είσοδος από την CA1 πίσω προς την CA3. Έπειτα, η CA1 περιοχή παρέχει την κυριότερη είσοδο νευρωνικής δραστηριότητας του υποθέματος (Subiculum), προβάλλοντας επίσης και στις βαθιές στοιβάδες (V-VI) του ενδορρινικού φλοιού μέσω της τοξοειδούς δεσμίδας (angular bundle). Παρά το γεγονός ότι το υπόθεμα προβάλλει στο προυπόθεμα και στο παραυπόθεμα η κυριότερη έξοδος του εντοπίζεται στον φλοιό και ειδικότερα στον μέσο ενδορρινικό φλοιό (mEC). Έτσι το κύκλωμα ξεκινά από τις επιφανειακές (II-III) στοιβάδες του ενδορρινικού φλοιού και «κλείνει» με τις προβολές της CA1 και του υποθέματος στις βαθιές στοιβάδες του μέσου ενδορρινικού φλοιού (V-VI). Οι πληροφορίες που εισέρχονται στον ενδορρινικό φλοιό από μια συγκεκριμένη φλοιική δομή είναι δυνατόν να διασχίσουν ολόκληρο τον ιππόκαμπο και να επιστρέψουν στην ίδια φλοιική περιοχή από την οποία προήλθαν. Οι αλλαγές που συμβαίνουν με τη ροή πληροφορίας μεταξύ των κυκλωμάτων του ιππόκαμπου-φλοιού διαδραματίζουν σημαντικότατο ρόλο στην κωδικοποίηση των πληροφοριών σε μακροχρόνιες μνήμες.

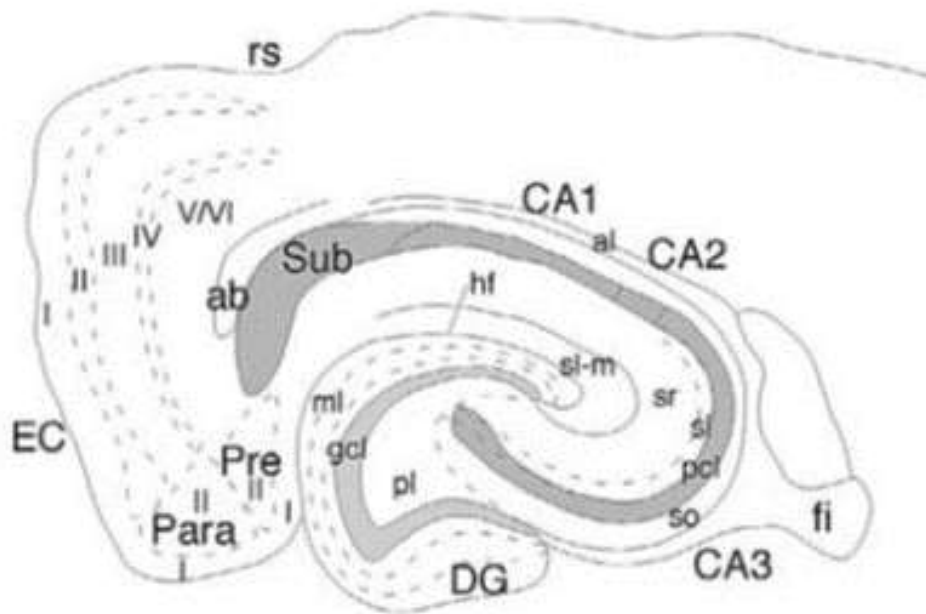
Διαφορές κροταφικού και διαφραγματικού ιπποκάμπου

Όπως αναφέρθηκε, ο επιμήκης άξονας του ιπποκάμπου διακρίνεται σε διαφραγματικό (septal) και κροταφικό (temporal) άκρο. Ειδικότερα, το διαφραγματικό (ραχιαίο) άκρο είναι εγγύτερα του διαφραγματικού πυρήνα, ενώ το κροταφικό (κοιλιακό), εντοπίζεται πιο κοντά στον κροταφικό λοβό. Τα άκρα αυτά εμφανίζουν σημαντικές διαφορές όσον αφορά τη διεγερσιμότητα, τη συνδεσιμότητα με άλλες περιοχές του φλοιού, αλλά και την κατανομή υποδοχέων για νευροδιαβιβαστικές ουσίες.

Ειδικότερα, το κροταφικό άκρο χαρακτηρίζεται από ισχυρότερη διεγερσιμότητα διαμεσολαβούμενη από τους ιονοτροπικούς υποδοχείς του γλουταμικού (AMPA, NMDAR) κι υψηλότερη αναλογία AMPA/NMDA συγκριτικά με το διαφραγματικό άκρο (Papatheodoropoulos, Moschovos et al. 2005). Επίσης, το κροταφικό άκρο χαρακτηρίζεται από χαμηλότερη αναλογία υπομονάδων NR2A/NR2B γεγονός το οποίο το καθιστά λιγότερο επιρρεπές στο μπλοκάρισμα των υποδοχέων NMDA από το μαγνήσιο (Pandis, Sotiriou et al. 2006). Επιπλέον, το διαφραγματικό άκρο χαρακτηρίζεται από εντονότερη συναπτική αναστολή εξαιτίας της έκφρασης διαφορετικών υπομονάδων των ιονοτροπικών υποδοχέων GABA_A (Sotiriou, Papatheodoropoulos et al. 2005). Όλες οι παραπάνω διαφορές καθιστούν το κροταφικό άκρο του ιπποκάμπου πιο διεγέρσιμο και κατά συνέπεια πιο επιρρεπές σε επιληπτοειδείς εκφορτίσεις συγκριτικά με το διαφραγματικό. Τέλος είναι ενδιαφέρον ότι μια πρόσφατη μελέτη των (Kouvaros and Papatheodoropoulos 2017) προτείνει ότι ο κροταφικός ιπποκάμπος σχετίζεται με υψηλότερο ύψος Ripple ταλαντώσεων σχετιζόμενων με οξύαιχμα κύματα, γεγονός το οποίο πιθανότατα τον καθιστά μια προτιμητέα περιοχή γέννησης της δραστηριότητας των οξύαιχμων κυμάτων-ριπιδισμών (Sharp wave Ripples-SPW-Rs).

Περιοχές-Ανατομία-Ιστολογία

Οι πρωτοταγείς νευρώνες του ιπποκάμπου ονομάζονται πυραμιδικοί, λόγω του σχήματος του σώματος τους. Οργανώνονται στην πυραμιδική στοιβάδα (pyramidal cell layer) η οποία διακρίνεται σε CA1, CA2, CA3, υποπεδία, βάσει του μεγέθους των νευρώνων της. Ειδικότερα, η CA3 περιοχή χαρακτηρίζεται από μεγάλα σώματα που νευρώνονται από την οδοντωτή έλικα ενώ η CA1 περιοχή περιλαμβάνει μικρότερα σώματα. Η CA2 συνιστά μια στενή περιοχή με μεγάλα σώματα (όπως και η CA3) με τη διαφορά ότι δεν νευρώνεται από τις βρυώδεις ίνες της οδοντωτής έλικας.



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση τομής υπόκαμπου-ενδορρινικού φλοιού. so: stratum oriens-πολυμορφική στοιβάδα, pcl: pyramidal cell layer-στοιβάδα πυραμιδικών κυττάρων, sl: stratum lucidum-διαυγής στοιβάδα, sr: stratum radiatum-ακτινωτή στοιβάδα, sl-m: stratum lacunosum-moleculare-βοθριώδης-μοριακή στοιβάδα, al: alveus-σκάφη, ab: angular bundle-τοξοειδής δεσμίδα, Sub:Subiculum-υπόθεμα, PreS: Presubiculum-προ-υπόθεμα, ParaS: Parasubiculum-παρα-υπόθεμα, EC: Entorhinal cortex-ενδορρινικός φλοιός, pl: polymorphic layer-πολυμορφική στοιβάδα, gcl: granule cell layer-κοκκιώδης στοιβάδα, ml: molecular cell layer-μοριώδης στοιβάδα.

Οι νευρώνες στον υπόκαμπο οργανώνονται σε 6 στοιβάδες (εικόνα 6). Το πυραμιδικό στρώμα συγκεντρώνει το σύνολο των πυραμιδικών κυττάρων (pyramidal cell layer). Η ακτινωτή στοιβάδα (stratum radiatum) εντοπίζεται πάνω από την πυραμιδική προς την πλευρά του φλοιού, και σε αυτήν εκτείνονται οι κορυφαίοι (apical) δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων. Κάτω από την πυραμιδική στοιβάδα εντοπίζεται η πολυμορφική στοιβάδα (stratum oriens) η οποία συγκεντρώνει τους βασικούς (basal) δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων. Καθοδικά της πολυμορφικής, εντοπίζεται μια στοιβάδα με εμμύελες ίνες η οποία ονομάζεται σκάφη (alvear). Ακριβώς ανοδικά της ακτινωτής στοιβάδας, υπάρχει η βοθριώδης-μοριώδης στοιβάδα (stratum lacunosum-moleculare) μέσω της οποίας η διατιτραίνουσα οδός (perforant path) κατευθύνεται από τον ενδορρινικό φλοιό (EC) προς την οδοντωτή έλικα (DG). Επίσης, στην CA3 περιοχή ανάμεσα στην ακτινωτή και την πυραμιδική στοιβάδα υπάρχει η διαυγής ζώνη (stratum lucidum) στην οποία καταλήγουν οι βρυώδεις ίνες προερχόμενες από την οδοντωτή έλικα.

Όσον αφορά την οδοντωτή έλικα (DG), εμφανίζει μια διαφορετική αρχιτεκτονική κι ιστολογική οργάνωση των στοιβάδων της. Οι πρωτοταγείς της νευρώνες, ονομάζονται κοκκιώδη κύτταρα κι οργανώνονται στην στοιβάδα των κοκκιωδών κυττάρων (granule cell layer). Τα κύτταρα αυτά είναι μικρά σε μέγεθος (~10μm) κι είναι πυκνά διατεταγμένα, χωρίς να παρεμβάλλονται κύτταρα γλοίας ανάμεσά τους (Claiborne, Amaral et

al. 1990). Οι άξονές τους ονομάζονται βρυώδεις ίνες και συνάπτονται με τα βρυώδη κύτταρα της πολυμορφικής στοιβάδας πριν καταλήξουν στα πυραμιδικά κύτταρα. Ο βαθμός «πυκνότητας» των σωμάτων διαφέρει στον κοιλιακό και ραχιαίο υπόκαμπο. Έτσι τα κοκκιώδη κύτταρα του κοιλιακού (κροταφικού) υποκάμπου εμφανίζουν πυκνότερη διάταξη σε σύγκριση με τα αντίστοιχα του ραχιαίου (διαφραγματικού). Επειδή η CA3 περιοχή εμφανίζει αντίθετη πυκνότητα διάταξης των πυραμιδικών της νευρώνων, αυτό έχει ως αποτέλεσμα την περιορισμένη επικοινωνία των 2 περιοχών στο διαφραγματικό άκρο. Προς την επιφάνεια του υποκάμπου οργανώνεται η μοριακή στοιβάδα (molecular layer) η οποία έχει πάχος περίπου 250 μm στον επίμυ. Περιλαμβάνει κυρίως δενδρίτες από την κοκκιώδη και πολυμορφική στοιβάδα, και 2 κυτταρικούς τύπους (MOPP, αξονο-αξονικά κύτταρα). Η κοκκιώδης και μοριακή στοιβάδα σχηματίζουν μια δομή που μοιάζει με V και η οποία συνιστά την πολυμορφική στοιβάδα (polymorphic cell layer). Η στοιβάδα αυτή περιέχει τα βρυώδη κύτταρα με μεγάλα κυτταρικά σώματα (~25-35 μm), το σχήμα των οποίων είναι πολυγωνικό ή σφαιρικό με τους δενδρίτες τους να φέρουν άκανθες. Επίσης, η οδοντωτή έλικα περιλαμβάνει και έναν μεγάλο αριθμό από ανασταλτικούς διανευρώνες όπως τα καλαθοειδή κύτταρα και τα κύτταρα σχήματος πολυελαίου.

1.6 Νευροχημεία

Στον υπόκαμπο ο κυριότερος διεγερτικός νευροδιαβιβαστής είναι το γλουταμικό το οποίο δρα μέσω των ιονοτροπικών (NMDA, AMPA, Kainate) και μεταβοτροπικών του υποδοχέων. Η διατιτράνουσα οδός, οι βρυώδεις ίνες, οι ίνες Schaffer απελευθερώνουν γλουταμικό στις συνάψεις τους. Σημαντικές διεγερτικές δράσεις σημειώνει, επίσης και η ακετυλοχολίνη (ACh) η οποία δρα σε ιονοτροπικούς (nAChR) και μεταβοτροπικούς (mAChR) υποδοχείς. Οι νικοτινικοί υποδοχείς εντοπίζονται προσυναπτικά ελέγχοντας την απελευθέρωση του γλουταμικού στις διεγερτικές συνάψεις αλλά και σε διανευρώνες ρυθμίζοντας τη διεγερσιμότητά τους. Οι μουσκαρινικοί υποδοχείς στην προσυναπτική τους εντόπιση μειώνουν την απελευθέρωση του γλουταμικού, οπότε θεωρούνται ανασταλτικοί ενώ μετασυναπτικά μειώνουν το ρεύμα καλίου με αποτέλεσμα να οδηγούν σε εκπόλωση.

Ο κύριος ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής στον υπόκαμπο είναι το GABA το οποίο δρα μέσω των ιονοτροπικών (GABA_A) και μεταβοτροπικών (GABA_B) του υποδοχέων. Οι ενδονευρώνες συνάπτονται τόσο με πυραμιδικούς όσο και με άλλους ενδονευρώνες, σχηματίζοντας νευρικά δίκτυα τα οποία συμμετέχουν σε διάφορους ρυθμούς στον υπόκαμπο. Οι ανασταλτικές συνάψεις γίνονται συνήθως στα σώματα των πυραμιδικών κυττάρων αλλά και στους δενδρίτες τους.

Τέλος, πρέπει να σημειωθεί πως τα πυραμιδικά κύτταρα εκφράζουν ένα μεγάλο αριθμό υποδοχέων για νευροδιαβιβαστές όπως η νορεπινεφρίνη, η σερετονίνη, η ντοπαμίνη αλλά και τα νευροπεπτίδια.

1.7 Λειτουργία

Μνήμη και μάθηση

Η λειτουργία του ιπποκάμπου είναι άμεσα συνυφασμένη με ανώτερες νοητικές λειτουργίες μνήμης και μάθησης (Young, Fox et al. 1994). Είναι πλέον γνωστό ότι βλάβη στον ιπποκάμπο δύναται να οδηγήσει σε απώλεια μνήμης αλλά και σε αδυναμία κωδικοποίησης νέων πληροφοριών. Ένα από τα πιο γνωστά παραδείγματα, αποτελεί η περίπτωση του ασθενούς H. M. ο οποίος υποβλήθηκε σε αμφοτερόπλευρη αφαίρεση ιπποκάμπου και παρακείμενων φλοιικών περιοχών για την αντιμετώπιση των κρίσεων του. Αν και ο H.M. ήταν ελεύθερος κρίσεων έχασε παρόλα αυτά τη δυνατότητα κωδικοποίησης νέων πληροφοριών σε μακροχρόνιες μνήμες. Μια άλλη περίπτωση συνιστά ο ασθενής R. B. ο οποίος λόγω ισχαιμίας κατά τη διάρκεια χειρουργικής επέμβασης, εμφάνισε σοβαρά προβλήματα μνήμης. Ο εγκέφαλος του ασθενούς R. B. εξετάστηκε post-mortem και διαπιστώθηκε ολική απώλεια νευρώνων στην CA1 περιοχή του ιπποκάμπου. Βάσει των ευρημάτων αυτών, προτάθηκε ότι η ένταση των διαταραχών μνήμης σχετίζεται με την έκταση της βλάβης στον ιπποκάμπο και τις παρακείμενες φλοιικές δομές.

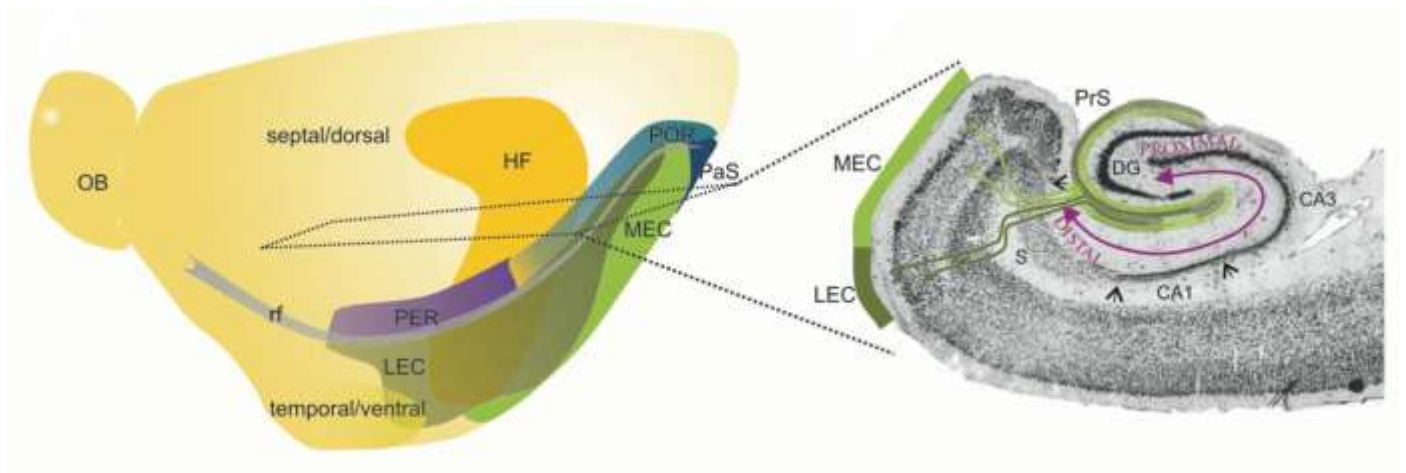
Αναφορικά με τα 2 άκρα του ιπποκάμπου, το διαφραγματικό άκρο εξειδικεύεται στην δηλωτική μνήμη (Moser 1995, Moser, Moser et al. 1995, de Hoz, Knox et al. 2003) ενώ το κροταφικό άκρο εκτός της μνήμης, συμμετέχει στην απόκριση στο συναίσθημα, το άγχος και τη διάθεση (Heckers and Konradi 2002, Sala, Perez et al. 2004, Frey, Andreazza et al. 2007, Adhikari, Topiwala et al. 2010, Fanselow and Dong 2010).

Μια ακόμα λειτουργία του ιπποκάμπου, σχετίζεται με την χωρική μνήμη. Σε αυτήν την περίπτωση, οι νευρώνες του ιπποκάμπου πυροδοτούν με διαφορετικά πρότυπα ανάλογα του ερεθίσματος που δέχονται από το περιβάλλον και την τοποθεσία του πειραματόζωου. Τα κύτταρα που ενεργοποιούνται σε μια συγκεκριμένη θέση του περιβάλλοντος, ονομάζονται κύτταρα θέσης (place cells) και παρέχουν στο πειραματόζωο έναν χωρικό χάρτη του περιβάλλοντος (O'Keefe and Dostrovsky 1971, O'Keefe 1979, O'Keefe and Burgess 2005). Επίσης, ο ιπποκάμπος χαρακτηρίζεται από EEG πρότυπα κυμάτων τα οποία σχετίζονται με λειτουργίες μνήμης και μάθησης. Για παράδειγμα ο ρυθμός θήτα (5-10 Hz), καταγράφεται όταν το πειραματόζωο εξερευνά το περιβάλλον του (Buzsaki 1989) κι αντικαθίσταται από οξύαιχμα κύματα υψηλού ύψους κατά τη διάρκεια της εγρήγορσης. Ειδικότερα, κατά τη διάρκεια του ρυθμού θήτα ο ιπποκάμπος δέχεται αναπαράσταση του περιβάλλοντος ενώ στην περίπτωση των οξύαιχμων κυμάτων, ο ιπποκάμπος διευκολύνει την εδραίωση της πληροφορίας σε μακροχρόνια μνήμη. Συνεπώς, σε αυτό το μοντέλο 2 σταδίων τόσο το εξερευνητικό στάδιο (θήτα) όσο και τα οξύαιχμα κύματα, είναι απαραίτητα κι οποιαδήποτε παρεμβολή (επιληπτική δραστηριότητα) δύναται να συνεισφέρει σε διαταραχές μνήμης.

1.8 Ενδορρινικός Φλοιός

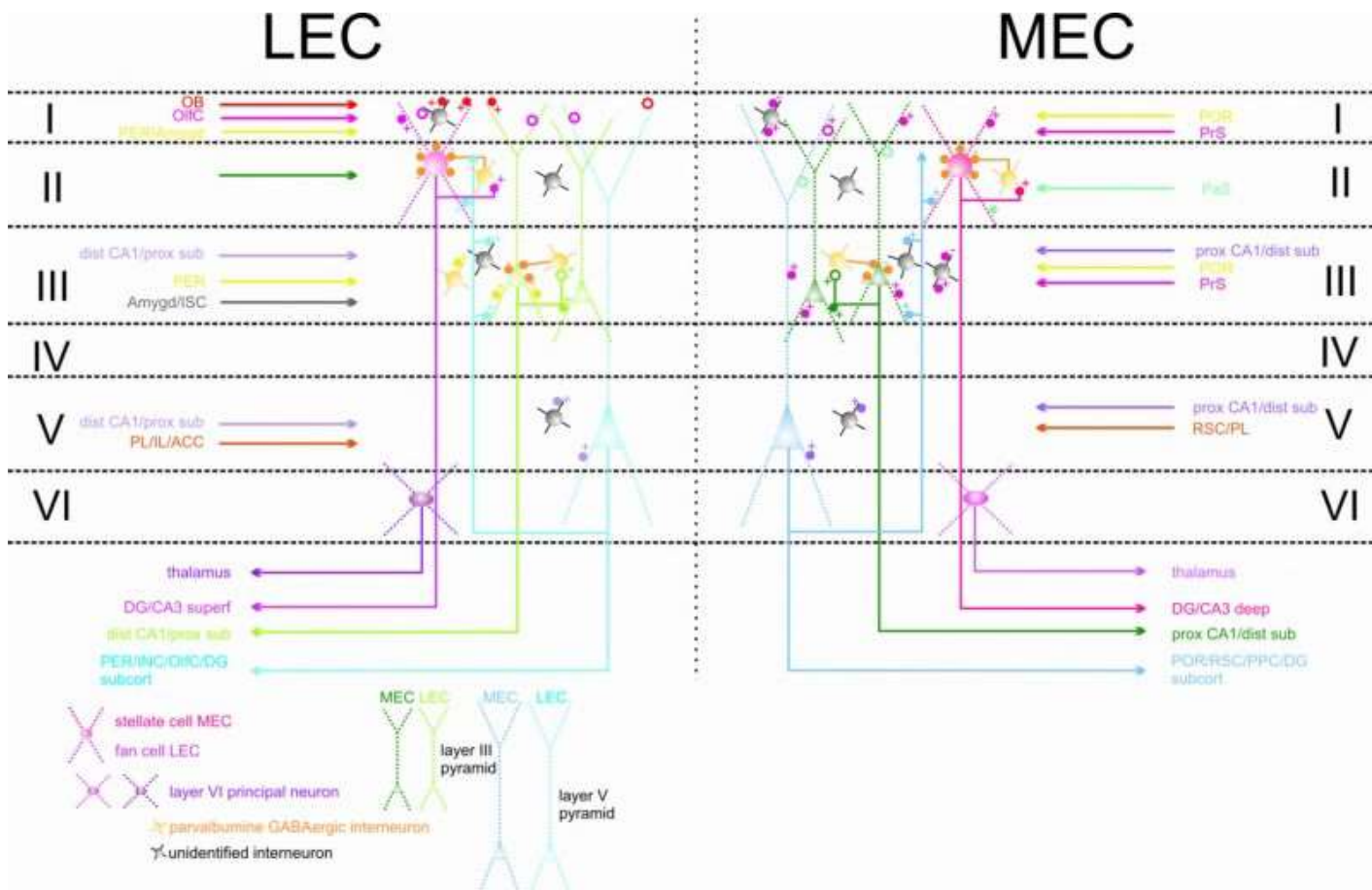
Ανατομία

Ο ενδορρινικός φλοιός (Entorhinal Cortex-EC) εντοπίζεται στον κροταφικό λοβό στον επίμυ (εικόνα 7) και συμμετέχει κυρίως στη χαρτογράφηση του χώρου (Hafting, Fyhn et al. 2005, Steffenach, Witter et al. 2005). Είναι μια δομή που λειτουργεί ως ενδιάμεσος κόμβος μεταξύ του ιπποκάμπου και του νεοφλοιού (Lavenex and Amaral 2000), συμμετέχοντας επίσης σε λειτουργίες μάθησης και πλοήγησης. Σε συνάρτηση με τον ιπποκάμπειο σχηματισμό και τις παρα-ιπποκάμπειες δομές, συμμετέχει σε λειτουργίες που σχετίζονται με τη συνείδηση και τη δηλωτική μνήμη.



Εικόνα 7: Εντόπιση ενδορρινικού φλοιού στο αριστερό εγκεφαλικό ημισφαίριο στον επίμυ (Canto, Wouterlood et al. 2008)

Ανατομικά, διακρίνεται (εικόνα 8) στον μέσο ενδορρινικό φλοιό (medial entorhinal cortex-mEC) και στον πλευρικό (lateral entorhinal cortex-LEC). Οι 2 περιοχές διαφέρουν στην μορφολογία, την πυκνότητα των νευρώνων αλλά και στις απαγωγές και προσαγωγές τους συνδέσεις (Witter, Naber et al. 2000, Witter, Wouterlood et al. 2000). Έτσι, το πλευρικό τμήμα είναι στενότερα συνδεδεμένο με τον περιρρινικό φλοιό, οσφρητικό λοβό και την αμυγδαλή ενώ το μέσο τμήμα αλληλεπιδρά περισσότερο με το υπόθεμα και τον ιππόκαμπο. Ο ενδορρινικός φλοιός περιλαμβάνει 6 κυτταρικές στοιβάδες (εικόνα 8) η καθεμία από τις οποίες προβάλλει σε διαφορετική περιοχή.



Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση των κυτταρικών στοιβάδων του μέσου και πλευρικού ενδορρινικού φλοιού.

Οι πρωτοταγείς νευρώνες του ενδορρινικού φλοιού είναι τα πυραμιδικά κύτταρα ή τροποποιημένες μορφές τους όπως τα αστεροειδή κύτταρα (stellate cells). Τα κύτταρα αυτά απελευθερώνουν γλουταμικό στις συνάψεις τους. Εκτός από τα πυραμιδικά κύτταρα, υπάρχουν κι ενδονευρώνες (PV^+) οι οποίοι συμμετέχουν σε τοπικά κυκλώματα κι απελευθερώνουν GABA στις συνάψεις τους. Τα 2 άκρα του ιπποκάμπου περιέχουν διαφορετικό ποσοστό mEC. Σε μια εγκάρσια τομή ιπποκάμπου-ενδορρινικού φλοιού το κροταφικό άκρο χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερο ποσοστό mEC σε σχέση με το διαφραγματικό, κατά συνέπεια το άκρο αυτό επιλέγεται για την μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των 2 περιοχών στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας.

Συνδεσμολογία

Ο μέσος ενδορρινικός φλοιός (mEC) αποτελεί την κύρια είσοδο νευρωνικής δραστηριότητας του ιπποκάμπου (Kerr, Agster et al. 2007). Πιο συγκεκριμένα, οι επιφανειακές του στοιβάδες (II, III) απαρτίζουν τη διατριαινύσα οδό (perforant path) μέσω της οποίας ο ιππόκαμπος δέχεται φλοιική νύρωση. Τα πυραμιδικά κύτταρα της στοιβάδας II προβάλλουν στην οδοντωτή έλικα και στην CA3 ενώ οι άξονες των κυττάρων της στοιβάδας III στοχεύουν στην CA1 περιοχή και στο υπόθεμα. Η έξοδος του ιπποκάμπου μέσω της CA1 περιοχής, κατευθύνεται προς τις βαθιές στοιβάδες (V-VI) του μέσου ενδορρινικού φλοιού. Αξίζει

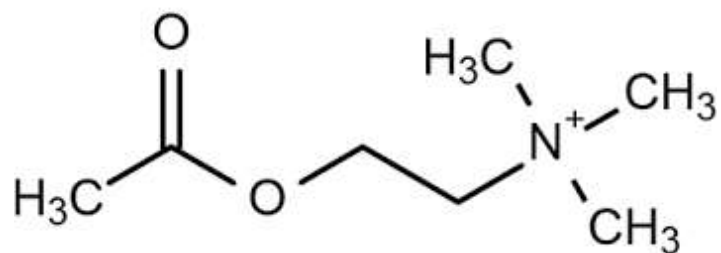
να σημειωθεί, πως τα πυραμιδικά κύτταρα της στοιβάδας V του μέσου ενδορρινικού φλοιού περιέχουν πυραμιδικά κύτταρα που παράγουν αυθόρμητες και συγχρονισμένες ριπές παρόμοιες με αυτές που καταγράφονται από το πυραμιδικό στρώμα της CA3.

1.9 Λειτουργία και Παθολογία

Ο ενδορρινικός φλοιός μαζί με τον ιππόκαμπιο σχηματισμό συμμετέχουν στην μετάφραση νεοφλοιικών πληροφοριών σε ανώτερης τάξης αναπαραστάσεις οι οποίες όταν συνδυαστούν με άλλα ερεθίσματα και κίνητρα, θα εξυπηρετήσουν γνωσιακές λειτουργίες όπως η συνειδητή μνήμη. Ειδικότερα, ο μέσος ενδορρινικός φλοιός είναι υπεύθυνος για την χαρτογράφηση του χώρου (spatial navigation) χάρη στην ύπαρξη των κυττάρων πλέγματος (grid cells) (Hafting, Fyhn et al. 2005) τα οποία εντοπίζονται κυρίως στην στοιβάδα II αλλά και σε μικρότερο αριθμό, στις στοιβάδες III και V.

Επίσης, ο (μέσος και πλευρικός) ενδορρινικός φλοιός εμπλέκονται στην εμφάνιση εκφορτίσεων κρισικού τύπου στον ιππόκαμπο (Lopantsev and Avoli 1998, Panuccio, D'Antuono et al. 2010) ενώ εμφανίζουν σημαντικές δυσλειτουργίες σε ασθενείς με επιληψία μέσου κροταφικού λοβού (Rutecki, Grossman et al. 1989).

1.10 Ακετυλοχολίνη (ACh)



Εικόνα 9: Χημικός τύπος της ακετυλοχολίνης

Η ακετυλοχολίνη (εικόνα 9) είναι ένας εστέρας οξικού οξέος και της χολίνης, με χημικό τύπο $\text{CH}_3\text{COO}(\text{CH}_2)_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ και συνιστά έναν διεγερτικό νευροδιαβιβαστή. Η σύνθεσή της πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα των νευρικών κυττάρων από την χολίνη και το ακετυλοσυνένζυμο-A, το οποίο χρησιμεύει ως δότης της ακετυλικής ομάδας. Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση αυτή είναι η ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης. Στη συνέχεια, η ACh αποθηκεύεται στα χολινεργικά τερματικά σε κυστίδια κι απελευθερώνεται με την έλευση του κατάλληλου ερεθίσματος. Μετά τη σύνδεση της ACh με τους υποδοχείς της υδρολύεται ταχέως από το ένζυμο ακετυλο-χολινεστεράση.

Η ACh δρα μέσω δύο τύπων υποδοχέων: (α) τους ιονοτροπικούς και (β) τους μεταβοτροπικούς υποδοχείς. Οι ιονοτροπικοί ονομάζονται νικοτινικοί (αγωνιστής η νικοτίνη) ενώ οι μεταβοτροπικοί μουσκαρινικοί (αγωνιστής η μουσκαρίνη). Στο ΚΝΣ οι μουσκαρινικοί υποδοχείς υπερτερούν σημαντικά των νικοτινικών (100:1). Οι νικοτινικοί υποδοχείς (nAChRs) εντοπίζονται κυρίως προσυναπτικά κι ελέγχουν την απελευθέρωση του νευροδιαβιβαστή αλλά και μετασυναπτικά όπου δρουν διεγερτικά. Οι μουσκαρινικοί υποδοχείς (mAChRs) εντοπίζονται επίσης προ- και μετασυναπτικά και διακρίνονται περαιτέρω στους υποτύπους M1, M2, M3, M4 και M5. Η προσυναπτική τους εντόπιση συνδέεται με μείωση της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστή ενώ η μετασυναπτική τους, με μείωση της αγωγιμότητας K^+ . Οι μετασυναπτικές δράσεις της ACh στο ΚΝΣ διαμεσολαβούνται από τον υπότυπο M1, ενώ οι M2 είναι προσυναπτικοί αντουποδοχείς. Οι M1, M3 και M5 προκαλούν κλείσιμο καναλιών K^+ κι εκπόλωση ενώ οι M2 και M4 οδηγούν σε άνοιγμα των καναλιών K^+ κι υπερπόλωση.

2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πειραματόζωα

Για την εκτέλεση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν επίμυες του στελέχους Sprague-Dawley ηλικίας 3-6 μηνών. Οι αποικίες τους προήλθαν από το Ινστιτούτο Παστέρ Αθηνών και στεγάστηκαν στη πειραματική μονάδα ζώων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Οι αναπαραγωγές τους όπως και η φροντίδα τους, πραγματοποιήθηκαν από το προσωπικό της πειραματικής μονάδας και ήταν σύμφωνος με τις Ευρωπαϊκές οδηγίες (2010/63/EE). Όλα τα πειραματόζωα διατηρούνταν σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (20-24 °C) και 12 ωρών φωτός/σκοτάδι κι είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό κατά την εκτροφή τους.

Στη παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν 105 φυσιολογικοί (N) επίμυες και 93 επίμυες (SE) που είχαν βιώσει ένα επεισόδιο γενικευμένης και παρατεταμένης επιληπτικής κατάστασης κατά τη 20^η ημέρα (P20) μετά τη γέννηση. Έπειτα από την εκτέλεση της *in vivo* διαδικασίας (βλ. αναλυτικά παρακάτω), τα πειραματόζωα, σημάνθηκαν με μικρά κοψίματα στα αυτιά έτσι ώστε καθένα από αυτά να φέρει έναν μοναδικό αριθμό. Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκαν όλοι οι δυνατοί χειρισμοί και σχεδιασμοί προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί ο αριθμός και η ταλαιπωρία των πειραματοζώων.

2.2 Διαλύματα

Τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό (τΕΝΥ)

Κατά τη διάρκεια της εξαγωγής του ιπποκάμπου και της παρασκευής εγκεφαλικών τομών (*in vitro* διαδικασία) χρησιμοποιήθηκε πλήρες τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό (τΕΝΥ) σύστασης: (σε mM) NaCl 124, KCl 2, KH₂PO₄ 1.25, CaCl 2, MgSO₄ 2, NaHCO₃ 26, γλυκόζη 10 και σε μικρή συγκέντρωση η χρωστική phenol red (Sigma-Aldrich) για το προσδιορισμό του κορεσμού σε μίγμα 95% O₂ 5% CO₂. Κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας του ιστού το διάλυμα διατηρήθηκε σε θερμοκρασία 2-3 °C και το pH του διαλύματος ήταν ~7.4 κι ήταν κορεσμένο σε μίγμα 95% O₂ 5% CO₂.

Τα stock διαλύματα του τΕΝΥ φυλάσσονταν σε 3 ξεχωριστά δοχεία (συγκέντρωση 10x):

- NaCl, KCl, KH₂PO₄, CaCl, γλυκόζη και phenol red (διάλυμα Α),
- NaHCO₃ (διάλυμα Β)
- MgSO₄ *7 H₂O (διάλυμα Γ)

Ο παραπάνω διαχωρισμός των διαλυμάτων διασφάλιζε τη καλύτερη συντήρησή τους.

Το τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό (τΕΝΥ) που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της καταγραφής είχε την ίδια σύσταση με αυτό που χρησιμοποιήθηκε στη παρασκευή των τομών με τη μόνη διαφορά ότι περιείχε:

- 4-αμινοπυριδίνη (4-AP) σε συγκέντρωση 50 μM
- ή δεν περιείχε πρόσθετο μαγνήσιο (άνευ-μαγνησίου ή Mg^{2+} -free).

Φάρμακα

Τα φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, ήταν η:

- Εσερίνη (Eserine), 10 μM (Sigma), αναστολέας του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση
- Καρβαχόλη (Carbachol), 1 μM (Tocris), μη-υδρολύσιμο ανάλογο της ακετυλοχολίνης
- Ατροπίνη (Atropine), 1 μM (Sigma), συναγωνιστικός μουσκαρινικός ανταγωνιστής
- 4-αμινοπυριδίνη (4-aminopyridine), 50 μM (4-AP), μπλόκερ του ρεύματος καλίου (κυρίως I_A)

Ειδικότερα, προετοιμάστηκαν ως υδατικά διαλύματα σε εκατονταπλάσια συγκέντρωση της τελικής και διατηρήθηκαν στην κατάψυξη ($-20\text{ }^\circ\text{C}$).

Διάλυμα ηλεκτροδίων

Το διάλυμα πλήρωσης του ηλεκτροδίου καταγραφής ήταν αγώγιμο ιοντικό διάλυμα NaCl συγκέντρωσης 4 M το οποίο περιείχε επίσης και μικρή ποσότητα κυανής χρωστικής (Potamine sky blue 6BX, Gurr Microscopy Materials) προκειμένου να γίνεται αντιληπτή η τυχόν καταστροφή του ηλεκτροδίου και πιθανή διαφυγή υγρού κατά τη διάρκεια της καταγραφής.

Άγαρ

Οι κύβοι άγαρεως που χρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας των τομών παρασκευάζονταν με την ανάμειξη 4 gr agar σε 100 ml απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια, το διάλυμα θερμαινόταν μέχρι βρασμού και τοποθετούνταν σε τρυβλίο για να στερεοποιηθεί. Έπειτα φυλασσόταν στο ψυγείο.

Ενέσιμο διάλυμα

Το διάλυμα που χρησιμοποιείται κατά την *in vivo* διαδικασία για την πρόκληση γενικευμένων και παρατεταμένων επιληπτικών σπασμών περιείχε 60 mg/kg πεντυλενετετραζόλης (PTZ) η οποία διαλυόταν σε φυσιολογικό ορό σύστασης 0.9% NaCl . Στην περίπτωση που το πειραματόζωο δεν εκδήλωνε τονικοκλονικούς σπασμούς μέσα σε 30 λεπτά από την πρώτη δόση, τότε πραγματοποιούνταν μια δεύτερη

(συμπληρωματική) ενδοπεριτονιακή ένεση με 10 mg/kg πεντυλενετετραζόλη. Όλα τα παραπάνω διαλύματα παρασκευάζονταν την ίδια ημέρα εκτέλεσης της *in vivo* διαδικασίας κι η ενδοπεριτονιακή χορήγησή τους γινόταν με σύριγγα ινσουλίνης.

2.3 *In vivo* πρωτόκολλο

Για την πρόκληση ενός επεισοδίου επιληπτικής κατάστασης (SE) χρησιμοποιήθηκε ενδοπεριτονιακά η χημική ουσία πεντυλενετετραζόλη (PTZ). Η PTZ αποτελεί ένα μη-συναγωνιστικό ανταγωνιστή του υποδοχέα GABA {Macdonald, 1978 #279} και συνδέεται με την θέση πρόσδεσης της πικροτοξίνης (PTX) {Ramanjaneyulu, 1984 #281;Squires, 1984 #280}. Ειδικότερα, η PTZ συνδέεται στον πόρο του καναλιού, αλληλεπιδρώντας με την διαμεμβρανική δομή TM2 που τον διαμορφώνει. Ωστόσο, είναι ενδιαφέρον ότι οι μηχανισμοί δράσης της PTX (αλλά και PTX-προσδετών) και της PTZ δεν είναι ταυτόσημοι αν και δρουν στη ίδια θέση {Huang, 2001 #278}. Μια από τις ομοιότητες συνιστά η τασεοελεγχόμενη φύση του μπλοκαρίσματος {Yoon, 1993 #283} {Huang, 2001 #278}. Αναφορικά με τις διαφορές, η αγχιστεία της PTZ για την θέση σύνδεσης εμφανίζεται 100 φορές μικρότερη από αυτή της PTX {Dillon, 1993 #284}.

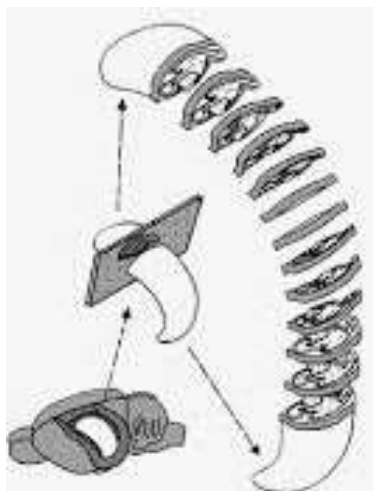
Στην παρούσα μελέτη αλλά και σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου {Potier, 2004 #9;Potier, 2005 #10, η αρχική δόση ήταν 60 mg/kg PTZ διαλυμένης σε φυσιολογικό ορό σύστασης 0.9% NaCl. Στην περίπτωση που τα πειραματόζωα δεν εμφάνιζαν τονικο-κλονικούς σπασμούς (~20%) εντός 30 λεπτών από την πρώτη δόση, τότε ακολουθούσε μια συμπληρωματική χορήγηση συγκέντρωσης 10 mg/kg. Συγκεντρωτικά, η δόση της πεντυλενετετραζόλης δεν ξεπερνούσε τα 90 mg/kg. Οι ενέσεις στα πειραματόζωα πραγματοποιήθηκαν κατά την 20^η ημέρα μετά τη γέννηση κι αξιολογήθηκαν αναφορικά με τη βαρύτητα και τη διάρκεια τους βάσει της κλίμακας του Racine. Η κλίμακα αυτή περιγράφει τα συμπεριφορικά στάδια σπασμών κατά τη διέγερση της αμυγδαλής αρουραίου αλλά πρακτικά εφαρμόζεται ικανοποιητικά και σε άλλα μοντέλα μελέτης, όπως αυτό της PTZ. Πιο συγκεκριμένα, η κλίμακα περιγράφει 5 στάδια τα οποία χαρακτηρίζονται από προοδευτική αύξηση της έντασης των σπασμών:

- 1^ο στάδιο: κινήσεις του στόματος και του προσώπου (facial movements)
- 2^ο στάδιο: κατακόρυφες κινήσεις του κεφαλιού (head hodding)
- 3^ο στάδιο: κλονικές κινήσεις των πρόσθιων άκρων (forelimb clonus)
- 4^ο στάδιο: τονικοί σπασμοί και στήριξη στα πίσω άκρα (seizures characterized by rearing)
- 5^ο στάδιο: τονικο-κλονικοί σπασμοί και απώλεια ισορροπίας (seizures characterized by rearing and falling)

Έπειτα από την χορήγηση της PTZ, η συμπεριφορά των πειραματοζώων παρακολουθήθηκε για διάστημα 4 ωρών μέχρι τα πειραματόζωα να επιστρέψουν στη φυσιολογική τους συμπεριφορά (βάδηση κτλ.). Στο μεσοδιάστημα αυτό, μετρήθηκε η διάρκεια που παρέμενε το πειραματόζωο στο στάδιο 5 της κλίμακας Racine. Όσα από τα πειραματόζωα χαρακτηρίζονταν από παραμονή στο στάδιο 5 για τουλάχιστον 20 συνεχόμενα λεπτά (επιληπτική κατάσταση), χρησιμοποιούνταν στη συνέχεια ως πειραματόζωα «SE». Ως πειραματόζωα «N», χρησιμοποιήθηκαν πειραματόζωα στα οποία χορηγήθηκε ενδοπεριτονιακά αντίστοιχη δόση φυσιολογικού ορού αντί χημικού σπασμογόνου. Ένα ποσοστό πειραματοζώων (~30%) δεν χρησιμοποιήθηκε καθώς δεν εμφάνιζε κρίσεις διάρκειας άνω των 20 λεπτών ή λόγω θνησιμότητάς τους (~20%). Στην παρούσα μελέτη δεν χρησιμοποιήθηκαν αντιεπιληπτικά ή αναισθητικά φάρμακα προκειμένου να τερματιστούν οι κρίσεις για την αποφυγή περαιτέρω αλληλεπιδράσεων.

2.4 *In vitro* πρωτόκολλο

Παρασκευή εγκεφαλικών τομών



Εικόνα 10: Παρασκευή εγκάρσιων τομών ιπποκάμπου.

- **Τομές ιπποκάμπου (κροταφικές και διαφραγματικές)**

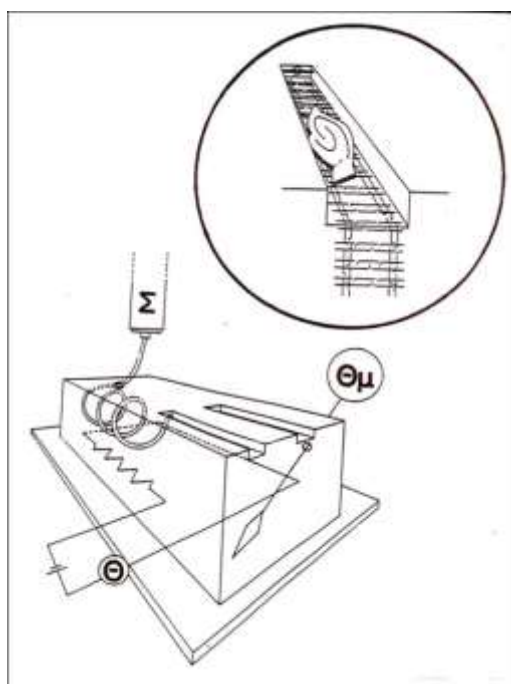
Για τη παρασκευή εγκεφαλικών τομών, τα πειραματόζωα αναισθητοποιούν με έκθεσή τους σε διεθλαιθέρα (Sigma-Aldrich) και στη συνέχεια αποκεφαλίζονταν με λαιμητόμο. Το μεγαλύτερο μέρος του κρανίου απομακρυνόταν με τη βοήθεια χειρουργικού ψαλιδιού με μια διατομή κατά μήκος της μέσης οβελιαίας γραμμής. Κατά την εξαγωγή του εγκεφάλου, απομακρύνονταν επίσης κι οι μήνιγγες προσκειμένου να αποφευχθεί ο τραυματισμός του ιστού. Καθόλη τη διάρκεια της διαδικασίας ο ιστός διαβρεχόταν συχνά με πλήρες οξυγονωμένο (95% O₂ 5% CO₂) tENY χαμηλής θερμοκρασίας (3-4 °C), προκειμένου να αποφευχθεί η αλλοίωσή του. Στη συνέχεια, ο ιστός μεταφερόταν σε τρυβλίο που περιείχε tENY χαμηλής θερμοκρασίας (3-4 °C) και στην επιφάνεια διηθητικού χαρτιού, πραγματοποιούνταν 2 διατομές με νυστέρι: (i) μια κατά

μήκος της μέσης οβελιαίας γραμμής ανάμεσα στα 2 ημισφαίρια και (ii) μια μετωπιαία τομή στο ύψος των διδυμίων, για να αφαιρεθεί η παραγκεφαλίδα. Στη συνέχεια, από κάθε ιππόκαμπο απομονωνόταν είτε το κροταφικό είτε το διαφραγματικό άκρο μαζί με τις παρακείμενες φλοιικές δομές.

- **Συνδυασμένες τομές ιπποκάμπου-ενδορρινικού φλοιού (κροταφικές)**

Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και στην περίπτωση παρασκευής συνδυασμένων τομών ιπποκάμπου-ενδορρινικού φλοιού. Η μόνη διαφορά ήταν ότι από κάθε ιππόκαμπο απομονωνόταν μόνο το κροταφικό άκρο μαζί με τις παρακείμενες φλοιικές περιοχές. Το ακραίο κροταφικό άκρο επιδεικνύει την υψηλότερη συνδεσιμότητα μεταξύ του ιπποκάμπου κι μέσου ενδορρινικού φλοιού σε μια εγκάρσια τομή {Avoli, 2002 #285} {Benini, 2003 #286}. Αυτό οφείλεται στο ότι ο κροταφικός ιππόκαμπος φέρει μεγαλύτερο ποσό μέσου ενδορρινικού φλοιού συγκριτικά με το διαφραγματικό άκρο.

Σε κάθε περίπτωση (τομές ιπποκάμπου, συνδυασμένες τομές ιπποκάμπου-ενδορρινικού φλοιού), τα τμήματα ιστού ακινητοποιούνταν στην επιφάνεια αγάρεως με τη χρήση κυανοακρυλικής (μη τοξικής) κόλλας και στη συνέχεια τοποθετούνταν στον μικροτεμαχιστή Vibratome (Pelco101 series). Πριν την παρασκευή τομών, η λεπίδα του μικροτεμαχιστή στρεφόταν κατά 20 μοίρες καθοδικά και στη συνέχεια, το παρασκεύασμα ακινητοποιούταν στο πλαστικό σκεύος της μικροτόμου με τον επιμήκη άξονα του ιστού κάθετο στη διεύθυνση κίνησης της λεπίδας. Ακολούθως, παρασκευάζονταν περίπου 4-5 εγκάρσιες τομές (**εικόνα 10**) πάχους 450-500 μm οι οποίες μεταφέρονταν σε υδατόλουτρο με πλήρες τΕΝΥ χαμηλής θερμοκρασίας (3-4 $^{\circ}\text{C}$).



Εικόνα 11: Θάλαμος διαβροχής τύπου διεπαφής (Haas-type).

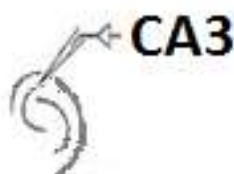
Στη συνέχεια, οι τομές επώάζονταν σε θάλαμο διαβροχής τύπου διεπαφής (Haas-type interface chamber) όπου διαβρέχονταν συνεχώς με τΕΝΥ σταθερής θερμοκρασίας (31 ± 2 $^{\circ}\text{C}$) κι οξυγόνωσης (95% O_2 5% CO_2) για 1

ώρα πριν ξεκινήσουν οι ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές (**εικόνα 11**). Ο θάλαμος αυτός προσφέρει ιδανικές συνθήκες καταγραφής στις οποίες καταγράφονται υψηλότερα HFO power σε σύγκριση με τον θάλαμο διαβροχής τύπου submerged {Morris, 2016 #288}.

2.5 Ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές

- **Τομές ιπποκάμπου**

Οι εξωκυττάρειες ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές στις τομές ιπποκάμπου (κροταφικές, διαφραγματικές) πραγματοποιήθηκαν από την πυραμιδική στοιβάδα της περιοχής CA3.



Εικόνα 12: Τομή ιπποκάμπου και θέση ηλεκτροδίου καταγραφής στην πυραμιδική στοιβάδα της περιοχής CA3.

- **Συνδυασμένες τομές ιπποκάμπου-ενδορρινικού φλοιού**

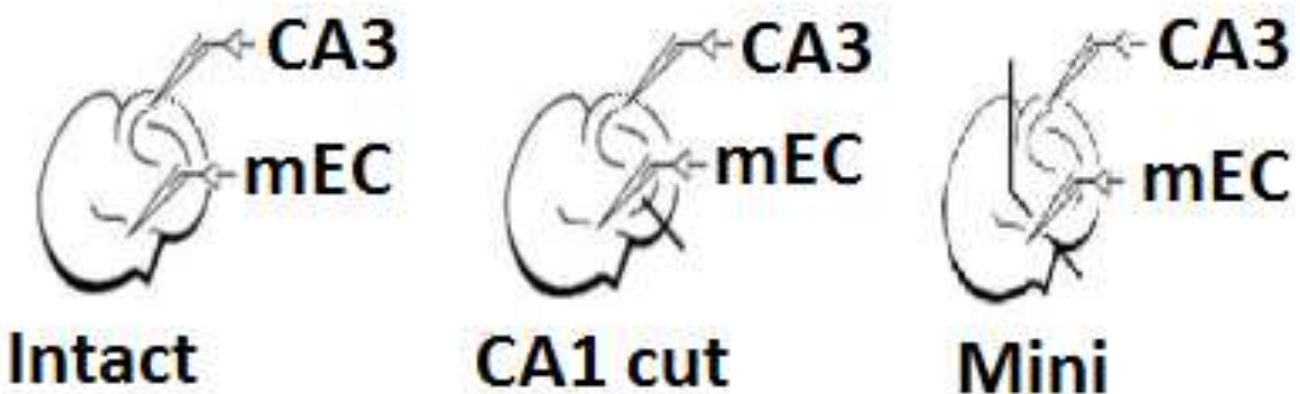
Στις συνδυασμένες τομές ιπποκάμπου-ενδορρινικού φλοιού πραγματοποιήθηκαν συζευγμένες εξωκυττάρειες καταγραφές από την πυραμιδική στοιβάδα της CA3 και τις βαθιές (V-VI) στοιβάδες του μέσου ενδορρινικού φλοιού (mEC). Σε αυτά τα πειράματα, στόχος ήταν να διερευνηθούν οι ιδιότητες συγχρονισμού μεταξύ των 2 περιοχών. Γι' αυτό τον σκοπό, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές διατομές στο παρασκεύασμα για τον αποκλεισμό συγκεκριμένων λειτουργικών συνδέσεων μεταξύ των 2 περιοχών. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν ταυτόχρονες καταγραφές από την πυραμιδική στοιβάδα της CA3 και τις βαθιές (V-VI) στοιβάδες του mEC στις παρακάτω καταστάσεις (**εικόνα 13**):

1. **Ακέραιη τομή (Intact)**

2. **Διατομή στη CA1 περιοχή (CA1 cut):** Τα ηλεκτρόδια απομακρύνθηκαν από τις περιοχές καταγραφής κι ακολουθούσε διατομή στην CA1 περιοχή με την βοήθεια νυστεριού. Με αυτόν τον τρόπο παρεμποδίστηκε η έξοδος της CA3 προς τον mEC. Στη συνέχεια τα ηλεκτρόδια τοποθετήθηκαν ξανά στις περιοχές καταγραφής και όσο πιο κοντά γινόταν στις αρχικές τους θέσεις.

3. **Πλήρης απομόνωση (Mini slice):** Παρομοίως, και σε αυτήν την περίπτωση τα ηλεκτρόδια απομακρύνθηκαν από τις περιοχές καταγραφής κι ακολουθούσε διατομή στο ύψος του παραυποθέματος. Με αυτόν τον τρόπο απομονώθηκε εντελώς ο mEC από την CA3, με αποτέλεσμα τη δημιουργία «mini» τομών (σαν τομές ιπποκάμπου). Στη συνέχεια τα ηλεκτρόδια τοποθετήθηκαν ξανά στις περιοχές καταγραφής και όσο πιο κοντά γινόταν στις αρχικές τους θέσεις.

Κατά τη διάρκεια εφαρμογής του πρωτοκόλλου χειρουργικής απομόνωσης τα άκρα που προκύπταν σε κάθε περίπτωση απομακρύνονταν κατάλληλα προκειμένου να διασφαλιστεί η κατά το δυνατόν πλήρης απομόνωσή τους.



Εικόνα 13: Πρωτόκολλο ηλεκτροφυσιολογικών καταγραφών και χειρουργικών διατομών σε συνδυασμένες τομές ιπποκάμπου-ενδορρινικού φλοιού.

2.6 Επεξεργασία κι ανάκτηση δεδομένων

Τα σήματα ενισχύονταν με τη βοήθεια ενισχυτή (Axoclamp 900A, Molecular devices) κι ακολουθούσε ψηφιοποίησή τους μέσω του Axon Digidata 1440A (Molecular devices) σε αρχεία τα οποία αποθηκεύονταν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή για περαιτέρω offline ανάλυση. Η δειγματοληψία είχε ρυθμιστεί στα 25 kHz ωστόσο οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε σήματα 5 kHz για πρακτικούς λόγους (χρήση ψηφιακών FIR φίλτρων).

2.7 Ανάλυση συχνότητας εκφορτίσεων

Στις καταγεγραμμένες κυματομορφές μετρήθηκε η συχνότητα (Hz) των μεσοκρισικών εκφορτίσεων με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος Clampfit (Axon/Molecular Devices). Κατά τη διάρκεια των σχετικών αναλύσεων περιοχές της καταγραφής με εμφανή θόρυβο δεν λήφθηκαν υπόψιν. Η μέτρηση της συχνότητας ξεκινούσε από το τέλος της καταγραφής και περιελάμβανε σταθερό διάστημα 5 min με σταθερή συχνότητα εκφορτίσεων. Το ίδιο ακριβώς διάστημα χρησιμοποιήθηκε επίσης και για τις αναλύσεις υψίσυχων ταλαντώσεων όπως περιγράφεται στη συνέχεια.

2.8 Ανάλυση υψίσυχων ταλαντώσεων (HFOs)

Οι αποθηκευμένες ψηφιακές καταγραφές (25 kHz) επεξεργάστηκαν κατάλληλα (decimated/down-sampled) ώστε η δειγματοληψία τους να μετατραπεί σε 5 kHz. Στη συνέχεια, τα ίχνη φιλτραρίστηκαν με τη χρήση FIR ψηφιακού φίλτρου σε 2 διαφορετικά «παράθυρα» συχνοτήτων (i) για τις συχνότητες Ripple (R: 80-200 Hz) και (ii) για τις συχνότητες Fast Ripple (FR: 200-600 Hz). Η ανάλυση των υψίσυχων γεγονότων πραγματοποιήθηκε στο ίδιο διάστημα (epoch) που αναλύθηκε κι η μεσοκρισική συχνότητα, η διάρκεια του οποίου ήταν 5 min. Ακολούθησε οπτικός έλεγχος των υψίσυχων ταλαντώσεων κι εφαρμογή της ανάλυσης χρόνου-συχνότητας (time-frequency analysis) όπου διαπιστώθηκαν απομονωμένοι νήσοι (islands) και στα 2 εύρη συχνοτήτων. Τα υψίσυχνα γεγονότα εντοπίστηκαν σε συνάρτηση με τις μεσοκρισικές εκφορτισείς κι όχι ανεξάρτητα αυτών. Στη συνέχεια, ακολούθησε εφαρμογή του αλγορίθμου FFT και μέτρηση του power ($\mu V^2/Hz$) των συχνοτήτων στα 2 εύρη ξεχωριστά με τη χρήση παραθύρου Hamming (1024 time points ανάλυση ~ 2.05 Hz). Επίσης, η ύπαρξη των υψίσυχων ταλαντώσεων διαπιστώθηκε και μετά από εφαρμογή του FFT στο αφιλτράριστο (raw) σήμα ως κορυφές στο power spectrum προκειμένου να αποκλειστεί η πιθανότητα δημιουργίας ψευδών γεγονότων ως αποτέλεσμα της διαδικασίας του φιλτραρίσματος οξύαιχμων γεγονότων.

2.9 Στατιστικές αναλύσεις

Όλα τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας εκφράζονται ως μέσος όρος \pm μέσο τυπικό σφάλμα (SEM). Για συγκρίσεις που αφορούσαν εξαρτημένες ομάδες τιμών και κατά ζεύγη, χρησιμοποιήθηκε το paired Student's t-test ενώ για ανεξάρτητες τιμές το unpaired Student's t-test. Για να ελεγχθούν υποθέσεις που αφορούσαν αλληλεπιδράσεις μεταξύ ανεξάρτητων μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε το test 2-way ANOVA και τιμές $p\text{-value} < 0.05$ θεωρούνταν στατιστικά σημαντικές. Ο αριθμός των τομών που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε σύγκριση αναφέρεται ως «n» σε όλη την έκταση της παρούσας εργασίας.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΜΕΛΕΤΗ 1

ΚΡΟΤΑΦΟ-ΔΙΑΦΡΑΓΜΑΤΙΚΗ ΔΙΕΓΕΡΣΙΜΟΤΗΤΑ ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ STATUS EPILEPTICUS:
ΧΟΛΙΝΕΡΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΗ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΜΕΣΟΚΡΙΣΙΚΩΝ ΕΚΦΟΡΤΙΣΕΩΝ ΚΑΙ ΤΙΣ
ΥΨΙΣΥΧΝΕΣ ΤΑΛΑΝΤΩΣΕΙΣ*

manuscript submitted in Neuroscience Journal

3.2 ΜΕΛΕΤΗ 2

ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΥ ΚΙ ΕΝΔΟΡΡΙΝΙΚΟΥ ΦΛΟΙΟΥ ΜΕΤΑ ΑΠΟ
STATUS EPILEPTICUS: ΜΕΣΟΚΡΙΣΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΚΙ ΥΨΙΣΥΧΝΟΣ ΣΥΓΧΡΟΝΙΣΜΟΣ

manuscript in preparation

3.3 ΜΕΛΕΤΗ 3

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΥ ΚΙ ΕΝΔΟΡΡΙΝΙΚΟΥ ΦΛΟΙΟΥ ΣΕ 2
ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΣΥΓΧΡΟΝΙΣΜΟΥ*

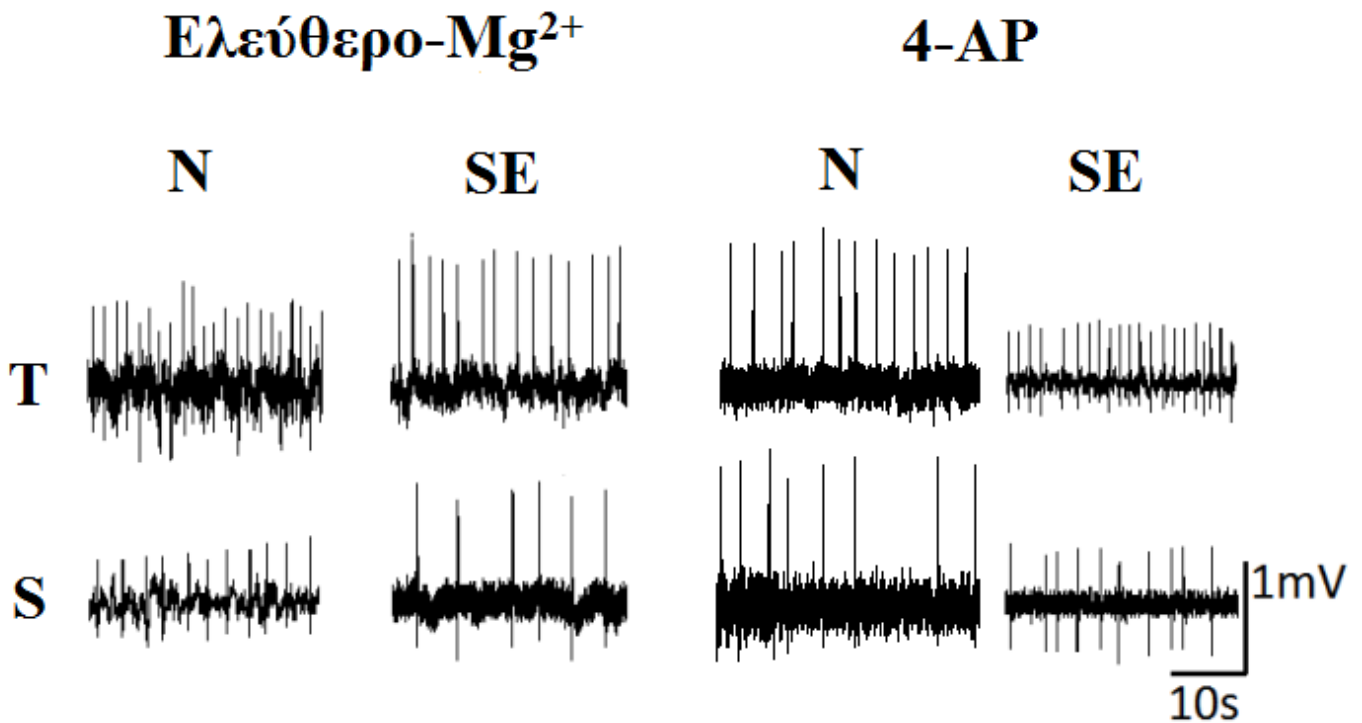
manuscript in preparation

3.1 ΜΕΛΕΤΗ 1

ΚΡΟΤΑΦΟ-ΔΙΑΦΡΑΓΜΑΤΙΚΗ ΔΙΕΓΕΡΣΙΜΟΤΗΤΑ ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ STATUS EPILEPTICUS: ΧΟΛΙΝΕΡΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΗ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΜΕΣΟΚΡΙΣΙΚΩΝ ΕΚΦΟΡΤΙΣΕΩΝ ΚΑΙ ΤΙΣ ΥΨΙΣΥΧΝΕΣ ΤΑΛΑΝΤΩΣΕΙΣ

Γενικές παρατηρήσεις αναφορικά με το ύψος, τη διάρκεια και τη μορφολογία των μεσοκρισικών εκφορτίσεων

Διαβροχή των τομών (διαφραγματικών, κροταφικών) με τΕΝΥ ελεύθερο Mg^{2+} ή με τΕΝΥ που περιείχε 50 μM 4-AP προκάλεσε την εμφάνιση αυθόρμητων δυναμικών πεδίου (μεσοκρισικού τύπου επιληπτοειδείς εκφορτίσεις, Interictal-like epileptiform discharges) ύψους 2-5 mV και διάρκειας <1 sec. Οι διάρκειες των μεσοκρισικών εκφορτίσεων δεν διέφεραν μεταξύ των 2 μοντέλων, φυσιολογικών (N) και SE τομών, ούτε μεταξύ κροταφικού (T) και διαφραγματικού (S) άκρου. Η διάρκεια των εκφορτίσεων στο ελεύθερο μαγνησίου κυμαινόταν 29-203 ms (n=22 τομές-10 γεγονότα από κάθε τομή) ενώ στην 4-AP 70-114 ms (n=27 τομές-10 γεγονότα από κάθε τομή). Οι μεσοκρισικές εκφορτίσεις παρουσίασαν παρόμοια μορφολογικά χαρακτηριστικά στα 2 μοντέλα συγχρονισμού (**εικόνα 14**). Τα χαρακτηριστικά αυτά ήταν παρόμοια μεταξύ N και SE τομών αλλά και μεταξύ T και S τομών (**εικόνα 14**). Η δραστηριότητα ήταν γενικά συνεχής, χωρίς αθροίσεις και κρισικές (ictal) εκφορτίσεις.

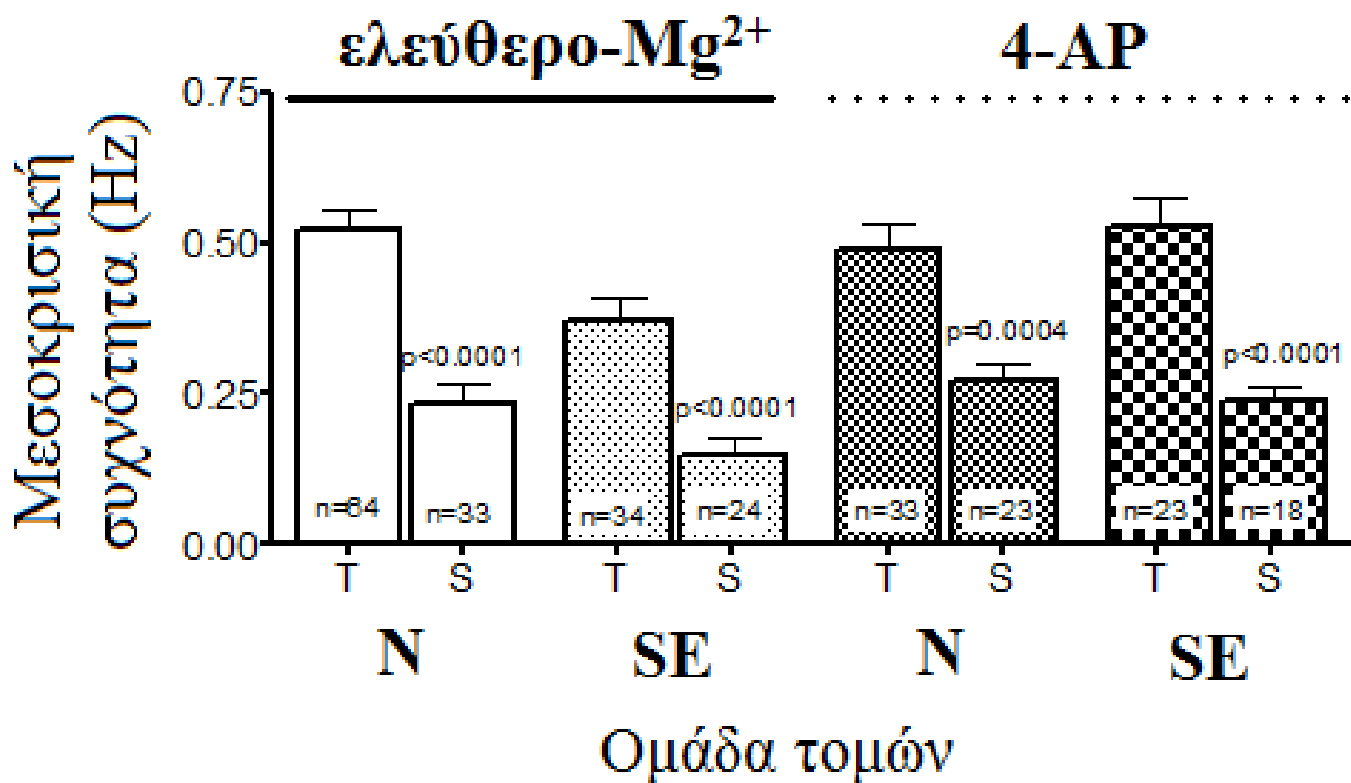


Εικόνα 14: Μεσοκρισικού τύπου επιληπτοειδής δραστηριότητα καταγραφόμενη εξωκυττάρια από το πυραμιδικό στρώμα της CA3 τομών υποκάμπου. Αντιπροσωπευτικά ηλεκτροφυσιολογικά ίχνη μεσοκρισικών εκφορτίσεων καταγραφόμενων από φυσιολογικές (N) και SE τομές προερχόμενες από το κροταφικό (T) ή διαφραγματικό (S) άκρο τομών υποκάμπου, υπό διαβροχή με tENY ελεύθερο Mg²⁺ ή 4-AP. Άξονες βαθμονόμησης: 1 mV, 10 s.

Σύγκριση συχνότητων μεσοκρισικών εκφορτίσεων μεταξύ κροταφικών και διαφραγματικών τομών

Στο μοντέλο ελεύθερο-Mg²⁺ η συχνότητα των μεσοκρισικών εκφορτίσεων (εικόνα 15, πίνακας 1) ήταν υψηλότερη στο T σε σχέση με το S άκρο, τόσο σε τομές N όσο και σε SE.

Στο μοντέλο της 4-AP παρατηρήθηκε η ίδια εικόνα: υψηλότερες μεσοκρισικές συχνότητες για τις T τομές σε σύγκριση με τις S, τόσο σε N όσο και σε SE τομές (εικόνα 15).



Εικόνα 15: Σύγκριση συχνοτήτων μεσοκρισικών εκφορτίσεων μεταξύ κροταφικών (T) και διαφραγματικών (S) τομών. Γράφημα μέσων τιμών μεσοκρισικής συχνότητας κροταφικών (T) και διαφραγματικών (S) τομών. Κάθε ζεύγος από κολώνες αντιπροσωπεύει τομές προερχόμενες από φυσιολογικά (N) και SE πειραματόζωα, στο ίδιο μέσο διαβροχής (ελεύθερο-Mg²⁺ ή 4-AP) αλλά διαφορετικής ανατομικής προέλευσης (T, S). Το πλήθος (n) των τομών φαίνεται στην βάση κάθε κολώνας και το στατιστικό αποτέλεσμα της σύγκρισης (unpaired Student's t-test) στην χαμηλότερη κολώνα του κάθε ζεύγους.

Πίνακας 1: Συχνότητες μεσοκρισικών εκφορτίσεων στην CA3 περιοχή του ιπποκάμπου μεταξύ κροταφικών και διαφραγματικών τομών, υπό διαβροχή με τΕΝΥ ελεύθερο-Mg²⁺ ή 4-AP (50 μM)

| | Κροταφικές τομές | Διαφραγματικές τομές | Στατιστικά** |
|---------------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------|
| <i>ελεύθερο-Mg²⁺</i> | | | |
| N | (1) 0.52 ± 0.034 Hz, n = 64 | (1) 0.234 ± 0.031 Hz, n = 33 | p<0.0001 |
| SE | (2) 0.372 ± 0.037 Hz, n = 34 | (2) 0.15 ± 0.025 Hz, n = 24 | p<0.0001 |
| <i>4-AP</i> | | | |
| N | (3) 0.488 ± 0.044 Hz, n = 33 | (3) 0.272 ± 0.027 Hz, n = 23 | p=0.0004 |
| SE | (4) 0.528 ± 0.043 Hz, n = 22 | (4) 0.239 ± 0.024 Hz, n = 18 | P<0.0001 |
| | | | |
| Στατιστικά* | (1) vs (2) p=0.007 | (1) vs (2) p=0.02 (1-tailed) | |
| | (3) vs (4) p>0.05 | (3) vs (4) p>0.05 | |
| | (1) vs (3) p>0.05 | (1) vs (3) p>0.05 | |
| | (2) vs (4) p=0.009 | (2) vs (4) p=0.016 | |

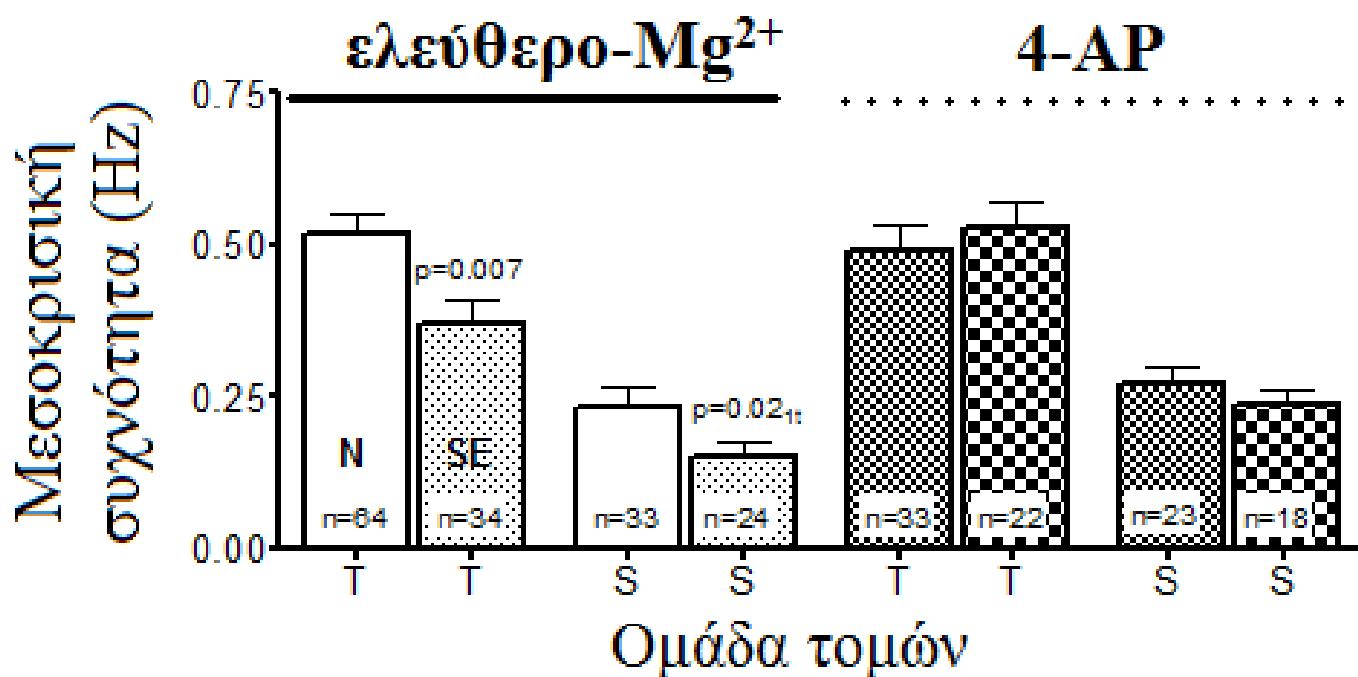
*συγκρίσεις κατά στήλες

**συγκρίσεις κατά σειρές

Σύγκριση συχνοτήτων μεσοκρισικών εκφορτίσεων μεταξύ N και SE τομών

Στο μοντέλο ελεύθερο-Mg²⁺ η συχνότητα των μεσοκρισικών εκφορτίσεων για τομές ίδιας ανατομικής προέλευσης (T, S) ήταν χαμηλότερη στις SE συγκριτικά με τις N τομές (T: n=64N, n=34SE, p=0.007 unpaired Student's t-test / S τομές: n=33N, n=24SE p=0.02 one-tailed unpaired Student's t-test) (εικόνα 16).

Στην 4-AP η συχνότητα των μεσοκρισικών εκφορτίσεων για τομές ίδιας ανατομικής προέλευσης (εικόνα 16) ήταν παρόμοιες μεταξύ N και SE τομών.

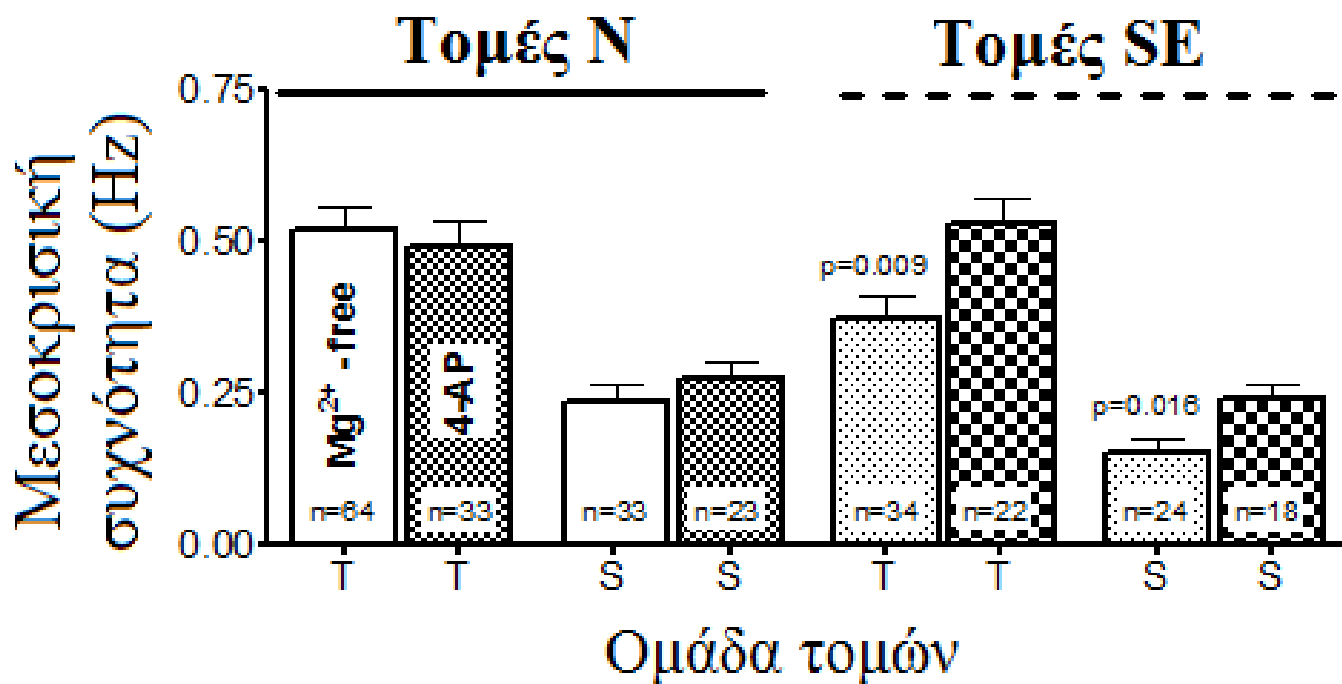


Εικόνα 16: Σύγκριση συχνοτήτων μεσοκρισικών εκφορτίσεων μεταξύ φυσιολογικών (N) και SE τομών. Γράφημα μέσω τιμών μεσοκρισικής συχνότητας με αναδιοργάνωση των δεδομένων του γραφήματος της εικόνας 15. Κάθε ζευγάρι από κολώνες αντιπροσωπεύει τομές ίδιας ανατομικής προέλευσης (T, S), στο ίδιο μέσο διαβροχής (ελεύθερο-Mg²⁺ ή 4-AP) προερχόμενες όμως από διαφορετικά πειραματόζωα (N, SE). Η πρώτη στήλη κάθε ζεύγους αναφέρεται σε τομές N ενώ η δεύτερη σε τομές SE. Το πλήθος (n) των τομών φαίνεται στην βάση κάθε κολώνας και το στατιστικό αποτέλεσμα της σύγκρισης (unpaired Student's t-test) στην χαμηλότερη κολώνα του κάθε ζεύγους.

Σύγκριση συχνοτήτων μεσοκρισικών εκφορτίσεων μεταξύ των 2 μοντέλων

Οι μεσοκρισικές συχνότητες των N τομών ίδιας ανατομικής προέλευσης ήταν παρόμοιες στο μοντέλο ελεύθερο-Mg²⁺ με αυτές που κατεγράφησαν στο μοντέλο της 4-AP (εικόνα 17).

Αντίθετα, οι μεσοκρισικές συχνότητες των SE τομών διέφεραν μεταξύ των 2 μοντέλων, υποδεικνύοντας μοντελο-εξαρτώμενη απόκριση. Για τομές ίδιας ανατομικής προέλευσης (T ή S), οι μεσοκρισικές συχνότητες ήταν υψηλότερες στην 4-AP σε σύγκριση με το ελεύθερο-Mg²⁺ (T τομές: n=34 άνευ-Mg²⁺ vs n=22 4-AP, p=0.009 unpaired Student's t-test / S τομές: n=24 άνευ-Mg²⁺ vs n=18 4-AP, p=0.016 unpaired Student's t-test) (εικόνα 17).



Εικόνα 17. Σύγκριση συχνοτήτων μεσοκρισικών εκφορτίσεων μεταξύ των 2 μοντέλων συγχρονισμού. Γράφημα μέσω των τιμών μεσοκρισικής συχνότητας με αναδιοργάνωση των δεδομένων του γραφήματος της εικόνας 16. Κάθε ζευγάρι από κολώνες αντιπροσωπεύει τομές ίδιας ανατομικής προέλευσης (T, S) προερχόμενες από την ίδια ομάδα πειραματόζων (N, SE) υπό διαβροχή σε διαφορετικό μέσο (ελεύθερο-Mg²⁺ ή 4-AP). Η πρώτη στήλη κάθε ζεύγους αναφέρεται σε τομές N που επώαστηκαν στο μοντέλο ελεύθερο-Mg²⁺ ενώ η δεύτερη σε τομές που επώαστηκαν σε 4-AP. Το πλήθος (n) των τομών φαίνεται στην βάση κάθε κολώνας και το στατιστικό αποτέλεσμα της σύγκρισης (unpaired Student's t-test) στην χαμηλότερη κολώνα του κάθε ζεύγους.

ΧΟΛΙΝΕΡΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΗ ΜΕΣΟΚΡΙΣΙΚΗ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ

Δράσεις χολινεργικών φαρμάκων

1. Εσερίνη (1 μM)

Προσθήκη της αντι-ακετυλοχολινεστεράσης εσερίνη (1 μM), τόσο στο μοντέλο ελεύθερο- Mg^{2+} όσο και της 4-AP (εικόνα 18), αύξησε τη μεσοκρισική συχνότητα ($n = 111$, $p < 0.001$, paired Student's t-test) με μια μικρή μείωση του ύψους των εκφορτίσεων. Η διάρκεια των εκφορτίσεων αυξήθηκε λίγο, χωρίς να είναι στατιστικά σημαντική.

2. Καρβαχόλη (1 μM)

Προσθήκη του μη-υδρολυόμενου αναλόγου της ακετυλοχολίνης καρβαχόλη (CCh) (1 μM), τόσο στο μοντέλο ελεύθερο- Mg^{2+} όσο και της 4-AP (εικόνα 19), αύξησε τη μεσοκρισική συχνότητα ($n = 46$, $p < 0.001$, paired Student's t-test) με μια μικρή μείωση του ύψους των εκφορτίσεων. Η διάρκεια των εκφορτίσεων αυξήθηκε λίγο, χωρίς να είναι στατιστικά σημαντική.

3. Ατροπίνη (10 μM)

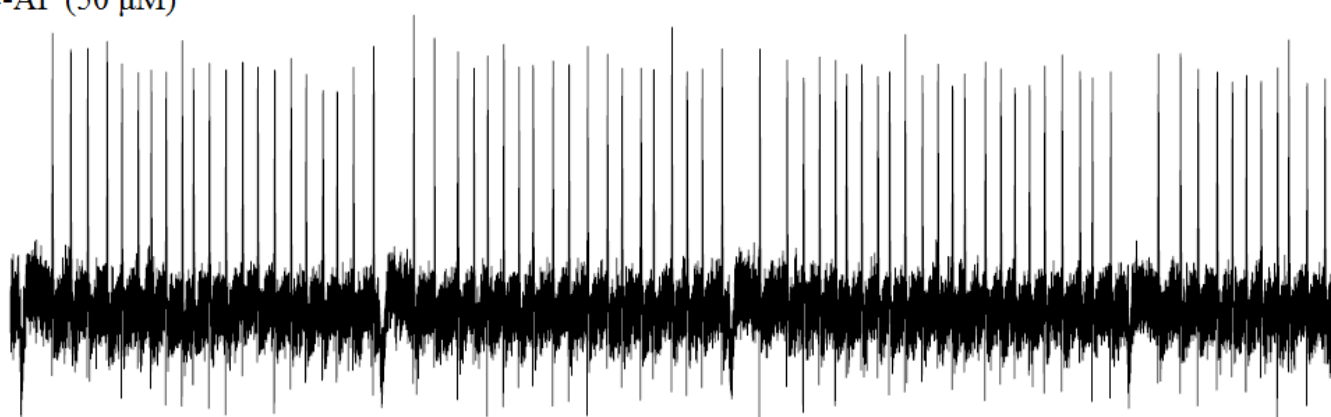
Προσθήκη του συναγωνιστικού μουσκαρινικού ανταγωνιστή ατροπίνη (10 μM), τόσο στο μοντέλο ελεύθερο- Mg^{2+} όσο και της 4-AP (εικόνα 21), μείωσε τη μεσοκρισική συχνότητα ($n = 59$, $p < 0.001$, paired Student's t-test), χωρίς σημαντικές αλλαγές του ύψους και της διάρκειας των εκφορτίσεων.

Με τους ανωτέρω φαρμακολογικούς χειρισμούς, δε παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή της μορφολογίας των εκφορτίσεων σε καμία ομάδα τομών. Επίσης, παρουσία των χολινεργικών φαρμάκων εσερίνης, και καρβαχόλης δεν κατεγράφησαν κρισικές (ictal) εκφορτίσεις. Οι δράσεις του κάθε φαρμάκου που ακολουθούν αναφέρονται στην τροποποίηση αυτών στην μεσοκρισική συχνότητα καθώς οι προκαταρκτικές αναλύσεις του ύψους και της διάρκειας, μετά από χολινεργικά δεν έδειξαν κάποια σταθερή δράση.

Δράσεις εσερίνης (1 μM)

Η προσθήκη εσερίνης αύξησε τη συχνότητα των μεσοκρυσικών εκφορτίσεων τόσο στο μοντέλο ελεύθερο- Mg^{2+} όσο και στην 4-AP (εικόνα 18). Οι μεσοκρυσικές συχνότητες παρουσία εσερίνης κυμάνθηκαν από 0.3-0.9 Hz. Οι κροταφικές (N, SE) τομές παρουσία εσερίνης είχαν υψηλότερες μεσοκρυσικές συχνότητες από τις διαφραγματικές (N, SE) τόσο στο ελεύθερο- Mg^{2+} όσο και στην 4-AP (πίνακας 2). Οι υψηλότερες συχνότητες που καταγράφησαν στις N σε σύγκριση με τις SE τομές στο μοντέλο ελεύθερο- Mg^{2+} (βλ. εικόνα 16), δεν παρατηρήθηκαν παρουσία εσερίνης (βλ. επίσης τα δεδομένα του πίνακα 2).

4-AP (50 μM)



+ Eserine (1 μM)



Εικόνα 18: Η προσθήκη της αντι-ακετυλοχολινεστεράσης εσερίνη (Eserine, 1 μM) στο μέσο διαβροχής, αύξησε τη συχνότητα των μεσοκρυσικών εκφορτίσεων. Αντιπροσωπευτική μεσοκρυσική δραστηριότητα καταγραφόμενη από την CA3 περιοχή κροταφικής φυσιολογικής τομής κατά τη διάρκεια συνεχούς διαβροχής με tENY που περιείχε 50 μM 4-AP (άνω ίχνος) και κατά τη διάρκεια προσθήκης 1 μM εσερίνης (κάτω ίχνος). Άξονες βαθμονόμησης: 1 mV, 10 sec.

Πίνακας 2: Συχνότητες μεσοκρισικών εκφορτίσεων στην CA3 περιοχή του ιπποκάμπου παρουσία εσερίνης (1 μM), υπό διαβροχή με τENY ελεύθερο- Mg^{2+} ή 4-AP (50 μM)

| | Κροταφικές τομές | Διαφραγματικές τομές | Στατιστικά** |
|---|----------------------------------|----------------------------------|--------------|
| <i>ελεύθερο-Mg^{2+}</i> | | | |
| N | (1) 0.635 ± 0.071 Hz, n = 25 | (1) 0.345 ± 0.06 Hz, n = 12 | p=0.013 |
| SE | (2) 0.56 ± 0.076 Hz, n = 20 | (2) 0.318 ± 0.047 Hz, n = 15 | p=0.017 |
| <i>4-AP</i> | | | |
| N | (3) 0.956 ± 0.112 Hz, n = 15 | (3) 0.53 ± 0.073 Hz, n = 10 | p=0.009 |
| SE | (4) 0.913 ± 0.102 Hz, n = 9 | (4) 0.572 ± 0.033 Hz, n = 5 | p=0.032 |
| | | | |
| Στατιστικά* | (1) vs (2) p>0.05 | (1) vs (2) p>0.05 | |
| | (3) vs (4) p>0.05 | (3) vs (4) p>0.05 | |
| | (1) vs (3) p=0.015 | (1) vs (3) p=0.031 (1-tailed) | |
| | (2) vs (4) p=0.013 | (2) vs (4) p=0.008 | |

*συγκρίσεις κατά στήλες

**συγκρίσεις κατά σειρές

Ποσοστιαίες αυξήσεις της συχνότητας μεσοκρισικών εκφορτίσεων παρουσία εσερίνης

Η προσθήκη εσερίνης σε κάθε μέσο διαβροχής (ελεύθερο- Mg^{2+} , 4-AP) προκάλεσε αυξήσεις στη συχνότητα εμφάνισης των μεσοκρισικών εκφορτίσεων που κυμάνθηκαν από 55-255%. Ειδικότερα, στο μοντέλο ελεύθερο- Mg^{2+} η μεγαλύτερη αύξηση μετά από την προσθήκη εσερίνης, παρατηρήθηκε στις διαφραγματικές SE τομές ($198.2 \pm 45.6\%$, n=15) (πίνακας 2A). Η ποσοστιαία αυτή αύξηση ήταν η υψηλότερη από κάθε άλλη ομάδα τομών {τόσο από το αντίστοιχο φυσιολογικό άκρο (vs $74.03 \pm 19.05\%$, n = 12, p=0.029) όσο και το κροταφικό SE άκρο (vs $89.859 \pm 20.529\%$, n = 20, p=0.024), αλλά και από τις N κροταφικές (vs. $67.057 \pm 15.869\%$, n = 25, p=0.002)}. Στο μοντέλο της 4-AP οι ποσοστιαίες αυξήσεις με την προσθήκη εσερίνης, ήταν παρόμοιες μεταξύ των ομάδων των τομών.

Πίνακας 2Α: Ποσοστιαία αύξηση[#] της συχνότητας στην CA3 περιοχή του ιπποκάμπου με προσθήκη εσερίνης (1 μ M), υπό διαβροχή με τΕΝΥ ελεύθερο-Mg²⁺ ή 4-AP (50 μ M)

| | Κροταφικές τομές | Διαφραγματικές τομές | Στατιστικά** |
|---------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|--------------|
| <i>ελεύθερο-Mg²⁺</i> | | | |
| N | (1) 67.057 \pm 15.869 %, n = 25 | (1) 74.03 \pm 19.05 %, n = 12 | p>0.05 |
| SE | (2) 89.859 \pm 20.529 %, n = 20 | (2) 198.208 \pm 45.592 %, n = 15 | p=0.024 |
| <i>4-AP</i> | | | |
| N | (3) 137.338 \pm 40.906 %, n = 15 | (3) 148.708 \pm 44.424 %, n = 10 | p>0.05 |
| SE | (4) 160.88 \pm 65.953 %, n = 9 | (4) 121.114 \pm 22.183 %, n = 5 | p>0.05 |
| | | | |
| Στατιστικά* | (1) vs (2) p>0.05 | (1) vs (2) p=0.029 | |
| | (3) vs (4) p>0.05 | (3) vs (4) p>0.05 | |
| | (1) vs (3) p>0.05 | (1) vs (3) p>0.05 | |
| | (2) vs (4) p>0.05 | (2) vs (4) p>0.05 | |

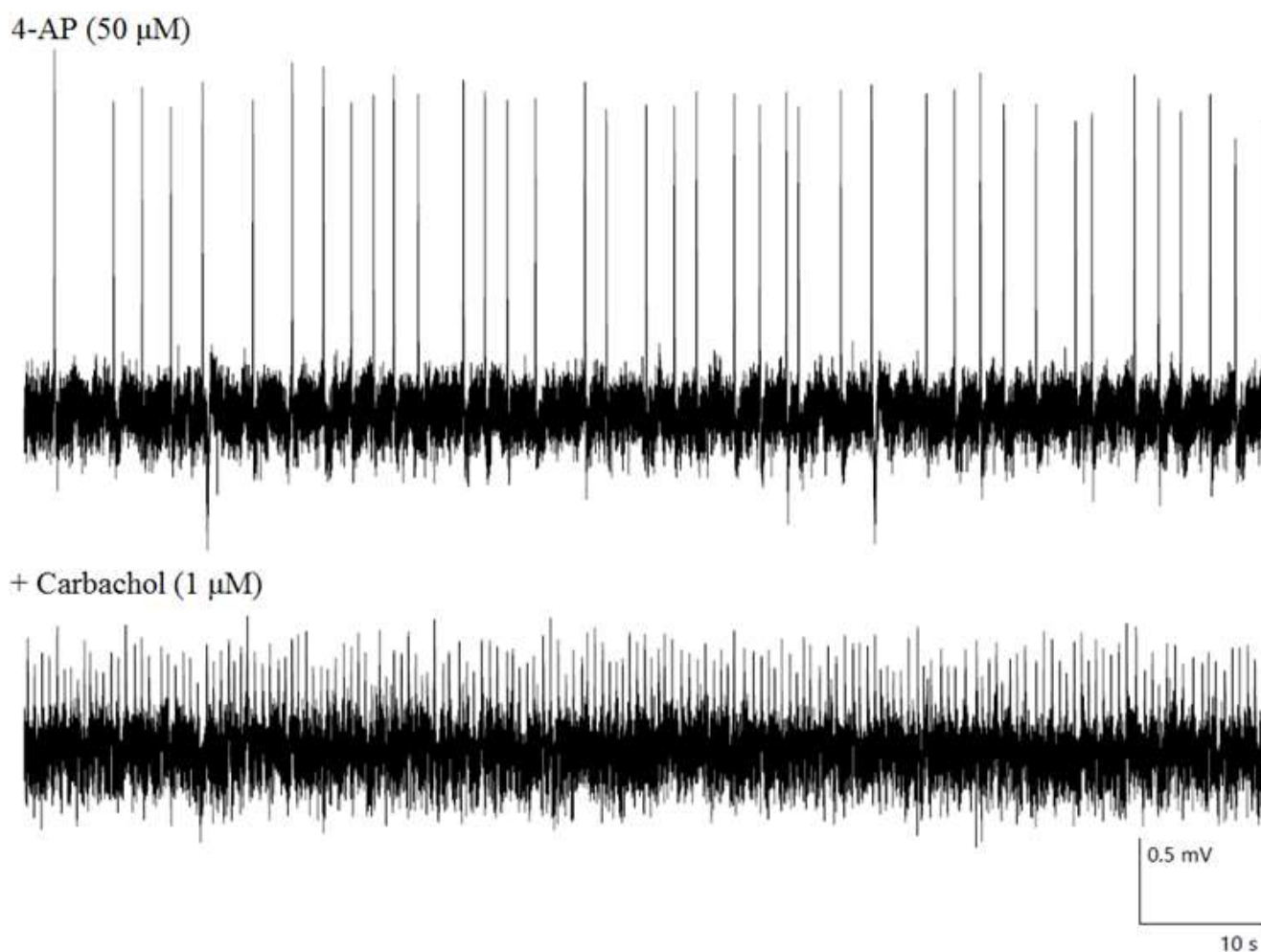
*συγκρίσεις κατά στήλες

**συγκρίσεις κατά σειρές

[#]ποσοστιαία αλλαγή της συχνότητας υπολογιζόμενη ως [(φάρμακο-control) / control] x 100

Δράσεις καρβαχόλης (1 μM)

Η προσθήκη καρβαχόλης αύξησε τη συχνότητα των μεσοκρισικών εκφορτίσεων τόσο στο μοντέλο ελεύθερο- Mg^{2+} όσο και στην 4-AP (εικόνα 19). Οι μεσοκρισικές συχνότητες παρουσία καρβαχόλης κυμάνθηκαν από 0.3-1.6 Hz και δεν διέφεραν μεταξύ των 2 μοντέλων ή μεταξύ φυσιολογικών και SE τομών. Οι κροταφικές (N, SE) τομές παρουσία καρβαχόλης είχαν υψηλότερες μεσοκρισικές συχνότητες από τις διαφραγματικές (N, SE) τόσο στο ελεύθερο- Mg^{2+} όσο και στην 4-AP (πίνακας 3). Οι υψηλότερες συχνότητες που κατεγράφησαν στις SE τομές στο μοντέλο της 4-AP σε σύγκριση με το ελεύθερο- Mg^{2+} (βλ. εικόνα 17), δεν παρατηρήθηκαν παρουσία καρβαχόλης (βλ. επίσης τα δεδομένα του πίνακα 3).



Εικόνα 19: Η προσθήκη του μη-υδρολυόμενου αναλόγου της ακετυλοχολίνης, καρβαχόλη (CCh, 1 μM) στο μέσο διαβροχής, αύξησε τη συχνότητα των μεσοκρισικών εκφορτίσεων. Αντιπροσωπευτική μεσοκρισική δραστηριότητα καταγραφόμενη από την CA3 περιοχή κροταφικής φυσιολογικής τομής κατά τη διάρκεια συνεχούς διαβροχής με tENY που περιείχε 50 μM 4-AP (άνω ίχνος) και κατά τη διάρκεια προσθήκης 1 μM καρβαχόλης (κάτω ίχνος). Άξονες βαθμονόμησης: 0.5 mV, 10 sec.

Πίνακας 3: Συχνότητες μεσοκρισικών εκφορτίσεων στην CA3 περιοχή του ιπποκάμπου παρουσία καρβαχόλης (1 μM), υπό διαβροχή με τΕΝΥ ελεύθερο- Mg^{2+} ή 4-AP (50 μM)

| | Κροταφικές τομές | Διαφραγματικές τομές | Στατιστικά** |
|---|---------------------------------|---------------------------------|--------------|
| <i>ελεύθερο-Mg^{2+}</i> | | | |
| N | (1) 1.372 ± 0.34 Hz, n = 7 | (1) 0.551 ± 0.09 Hz, n = 6 | p=0.02 1t |
| SE | (2) 1.071 ± 0.275 Hz, n = 6 | (2) 0.274 ± 0.069 Hz, n = 4 | p=0.02 1t |
| <i>4-AP</i> | | | |
| N | (3) 1.005 ± 0.133 Hz, n = 8 | (3) 0.403 ± 0.125 Hz, n = 3 | p=0.02 |
| SE | (4) 1.258 ± 0.157 Hz, n = 6 | (4) 0.593 ± 0.181 Hz, n = 6 | p=0.02 |
| | | | |
| Στατιστικά* | (1) vs (2) p>0.05 | (1) vs (2) p>0.05 | |
| | (3) vs (4) p>0.05 | (3) vs (4) p>0.05 | |
| | (1) vs (3) p>0.05 | (1) vs (3) p>0.05 | |
| | (2) vs (4) p>0.05 | (2) vs (4) p>0.05 | |

*συγκρίσεις κατά στήλες

**συγκρίσεις κατά σειρές

Ποσοστιαίες αυξήσεις της συχνότητας μεσοκρισικών εκφορτίσεων παρουσία καρβαχόλης

Η προσθήκη καρβαχόλης σε κάθε μέσο διαβροχής (ελεύθερο- Mg^{2+} , 4-AP) προκάλεσε αυξήσεις στη συχνότητα εμφάνισης των μεσοκρισικών εκφορτίσεων που κυμάνθηκαν από 20-300 %. Οι ποσοστιαίες αυξήσεις δεν διέφεραν ανά μοντέλο, ανατομική προέλευση της τομής (T, N) ούτε μεταξύ N και SE τομών (πίνακας 3A).

Πίνακας 3Α: Ποσοστιαία αύξηση[#] της μεσοκρισικής συχνότητας στην CA3 του ιπποκάμπου με προσθήκη καρβαχόλης, υπό διαβροχή με τΕΝΥ ελεύθερο-Mg²⁺ ή 4-AP (50 μM)

| | Κροταφικές τομές | Διαφραγματικές τομές | Στατιστικά** |
|---------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------|
| <i>ελεύθερο-Mg²⁺</i> | | | |
| N | (1) 201.816 ± 97.646 %, n = 7 | (1) 342.723 ± 145.285 %, n = 6 | p>0.05 |
| SE | (2) 144.034 ± 59.404 %, n = 6 | (2) 121.306 ± 21.519 %, n = 4 | p>0.05 |
| <i>4-AP</i> | | | |
| N | (3) 156.513 ± 35.987 %, n = 8 | (3) 96.629 ± 70.575 %, n = 3 | p>0.05 |
| SE | (4) 158.011 ± 32.878 %, n = 6 | (4) 253.98 ± 136.225 %, n = 6 | p>0.05 |
| | | | |
| Στατιστικά* | (1) vs (2) p>0.05 | (1) vs (2) p>0.05 | |
| | (3) vs (4) p>0.05 | (3) vs (4) p>0.05 | |
| | (1) vs (3) p>0.05 | (1) vs (3) p>0.05 | |
| | (2) vs (4) p>0.05 | (2) vs (4) p>0.05 | |

*συγκρίσεις κατά στήλες

**συγκρίσεις κατά σειρές

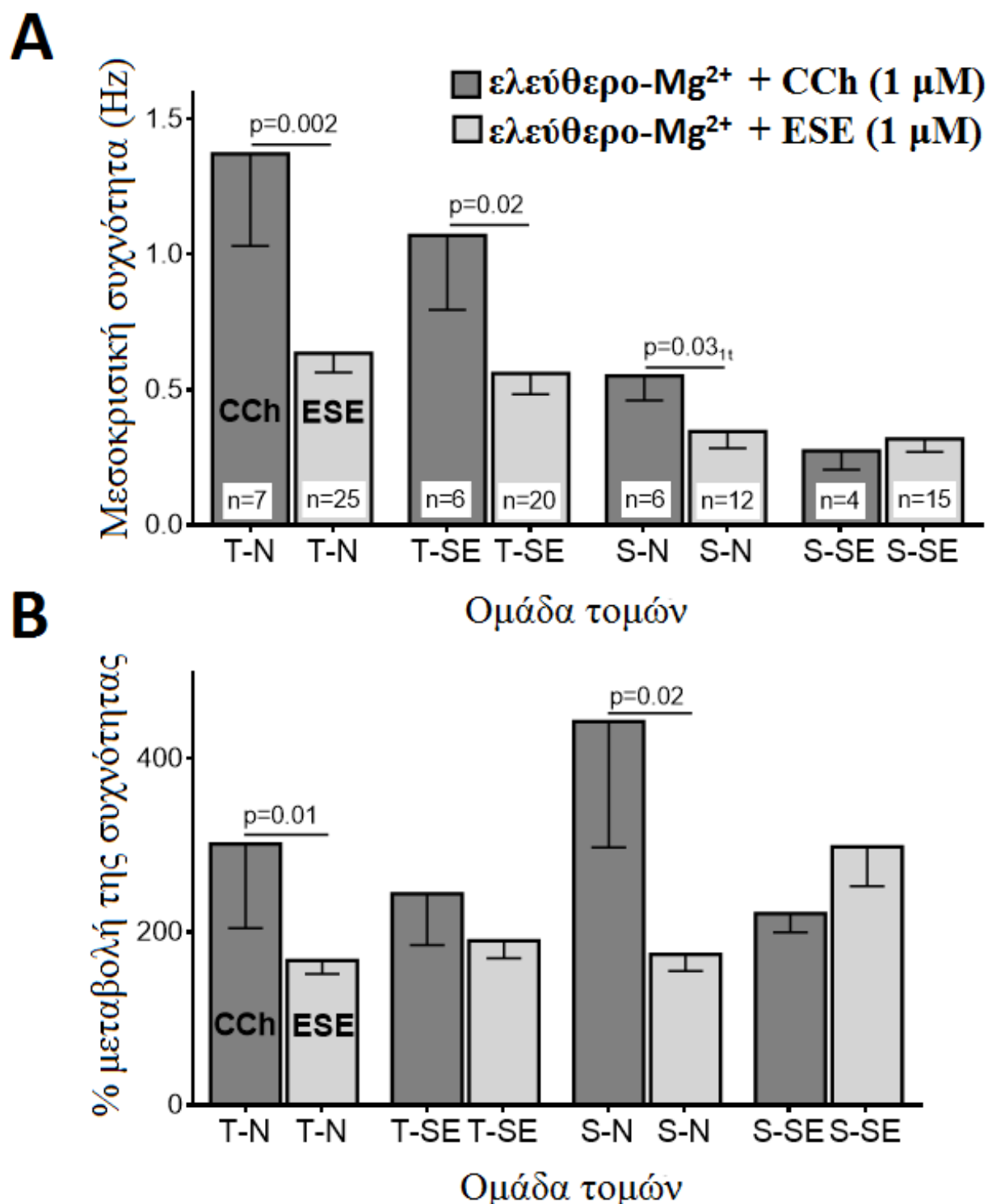
[#]ποσοστιαία αλλαγή της συχνότητας υπολογιζόμενη ως [(φάρμακο-control) / control] x 100

Σύγκριση των δράσεων εσερίνης (1 μM) και καρβαχόλης (1 μM)

Οι δράσεις της εσερίνης και της καρβαχόλης ήταν (ποσοστιαία και σε απόλυτες συχνότητες) παρόμοιες στην 4-AP αλλά διαφορετικές στο μοντέλο ελεύθερο- Mg^{2+} (Πίνακες 2 vs 3 και 2A vs 3A).

Στο μοντέλο ελεύθερο- Mg^{2+} , οι T τομές (N και SE) (εικόνα 20A) είχαν υψηλότερες μεσοκρισικές συχνότητες παρουσία καρβαχόλης συγκριτικά με αυτές που κατεγράφησαν παρουσία εσερίνης. Στις S τομές ίσχυε η ίδια εικόνα για τις N αλλά όχι για τις SE τομές όπου οι μεσοκρισικές συχνότητες παρουσία καρβαχόλης κι εσερίνης ήταν παρόμοιες.

Στις T-N τομές, οι ποσοστιαίες αυξήσεις (εικόνα 20B) στη μεσοκρισική συχνότητα που προκάλεσε η καρβαχόλη ήταν υψηλότερες από αυτές της εσερίνης. Στις S-N τομές οι ποσοστιαίες αυξήσεις από την προσθήκη καρβαχόλης ήταν υψηλότερες αυτών της εσερίνης. Αντίθετα, στις T-SE αλλά και στις S-SE τομές οι ποσοστιαίες αυξήσεις που προκάλεσαν τα 2 φάρμακα ήταν παρόμοιες.

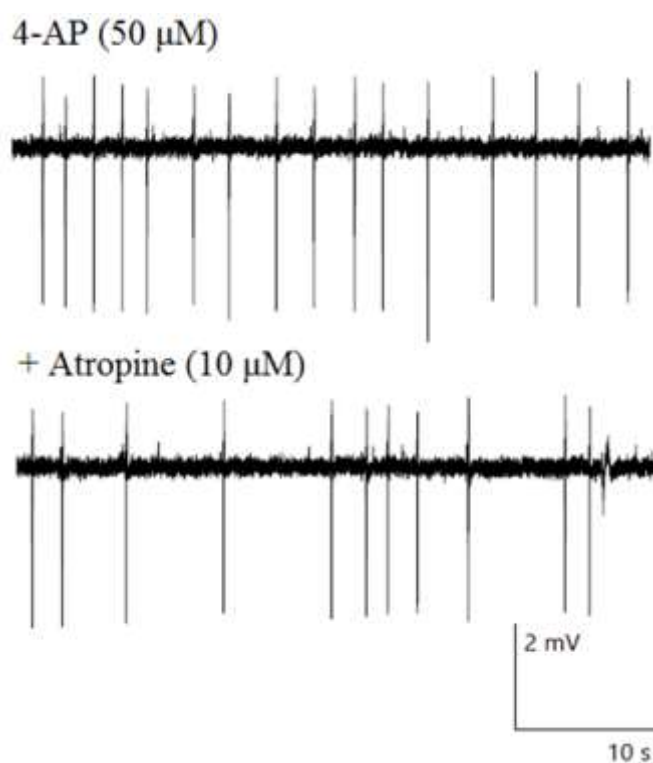


Εικόνα 20: Σύγκριση των δράσεων καρβαχόλης (1 μM) κι εσερίνης (1 μM) στη μεσοκρισική συχνότητα στο μοντέλο ελεύθερο-Mg²⁺ (A) Γράφημα μέσω τιμών μεσοκρισικής συχνότητας που κατεγράφησαν παρουσία είτε καρβαχόλης είτε εσερίνης. Κάθε κολώνα αντιπροσωπεύει τομές ίδιας ανατομικής προέλευσης (T, S) προερχόμενες από την ίδια ομάδα πειραματοζώων (N, SE). (B) Γράφημα ποσοστιαίων μεταβολών της μεσοκρισικής συχνότητας με προσθήκη είτε καρβαχόλης είτε εσερίνης. Τα δεδομένα προέκυψαν από τις ίδιες τομές από το γράφημα (A). Το πλήθος (n) των τομών φαίνεται στην βάση κάθε κολώνας του γραφήματος A και το στατιστικό αποτέλεσμα της σύγκρισης (unpaired Student's t-test) φαίνεται πάνω από αυτές.

Δράσεις ατροπίνης (10 μM)

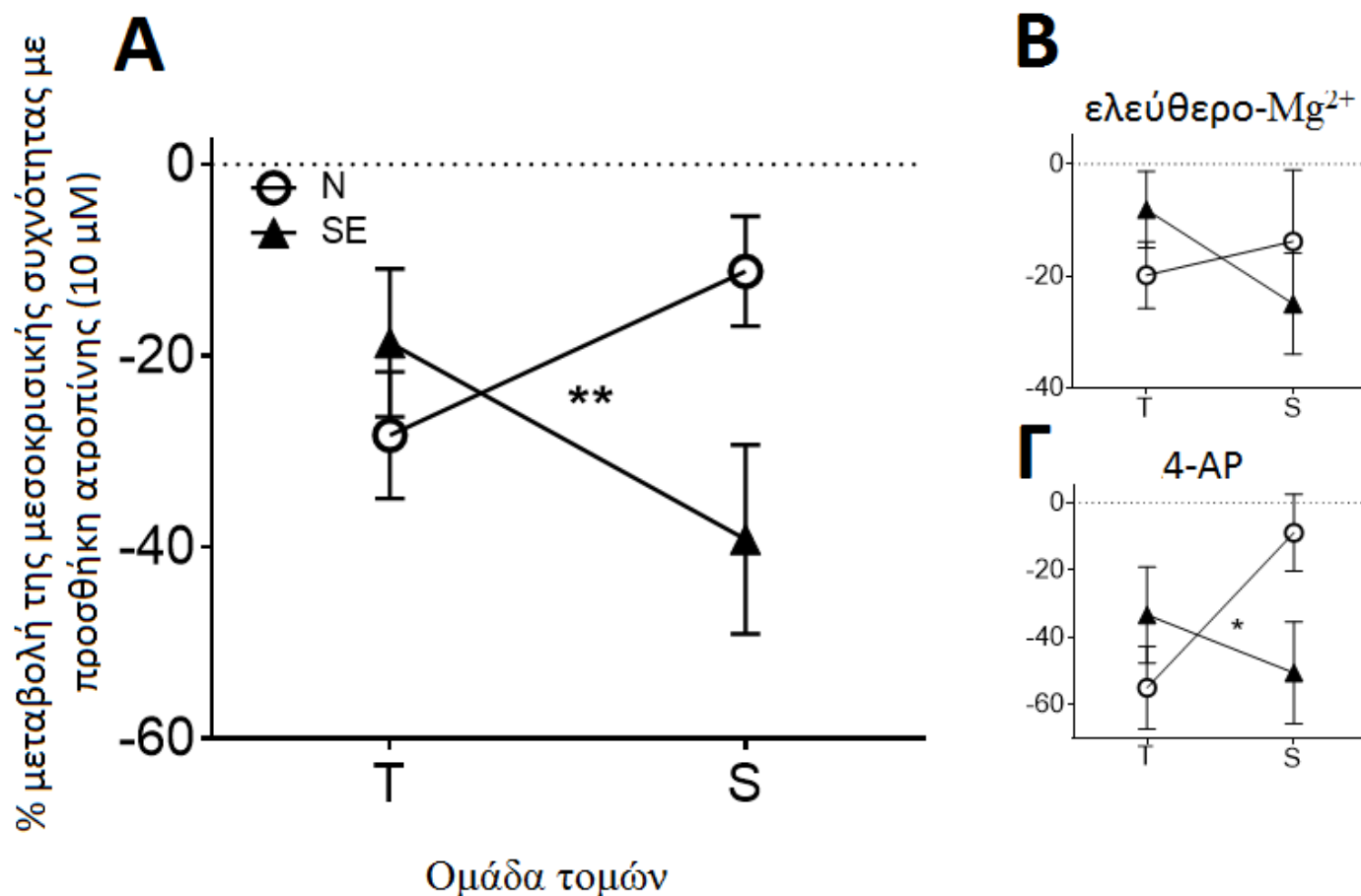
Η προσθήκη ατροπίνης σε τομές που δεν είχε γίνει προσθήκη αγωνιστών, μείωσε τη συχνότητα των μεσοκρυσικών εκφορτίσεων τόσο στο μοντέλο ελεύθερο- Mg^{2+} όσο και στην 4-AP (εικόνα 21). Δεδομένου ότι η χολινεργική νευρώση που δέχεται ο ιππόκαμπος είναι εξωτερική (κυρίως από το διάμεσο διάφραγμα), η δράση της ατροπίνης να μειώνει τη συχνότητα χωρίς την προσθήκη αγωνιστών, δείχνει ότι στο συγκεκριμένο παρασκεύασμα έχουν διατηρηθεί αρκετά χολινεργικά τερματικά με αποτέλεσμα η ενδογενής ακετυλοχολίνη που είναι διαθέσιμη διευκολύνει σημαντικά την εμφάνιση μεσοκρυσικών εκφορτίσεων.

Ειδικότερα, η μείωση της συχνότητας κυμάνθηκε από 8-55 % (εικόνα 22A). Η δράση της ατροπίνης ήταν εντονότερη στην 4-AP συγκριτικά με το μοντέλο ελεύθερο- Mg^{2+} , λόγω της αυξημένης απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστικών ουσιών στο μοντέλο αυτό και σε συνάρτηση με την συναγωνιστική φύση του ανταγωνιστή αυτού.



Εικόνα 21: Η προσθήκη του συναγωνιστικού αναστολέα των μουσκαρινικών υποδοχέων ακετυλοχολίνης (mAChRs), ατροπίνη (Atropine, 10 μM) στο μέσο διαβροχής, μείωσε τη συχνότητα των μεσοκρυσικών εκφορτίσεων. Αντιπροσωπευτική μεσοκρυσική δραστηριότητα καταγραφόμενη από την CA3 περιοχή διαφραγματικής φυσιολογικής τομής κατά τη διάρκεια συνεχούς διαβροχής της με tENY που περιείχε 50 μM 4-AP (άνω ίχνος) και κατά τη διάρκεια διαβροχής με 10 μM ατροπίνης (κάτω ίχνος). Άξονες βαθμονόμησης: 2 mV, 10 sec.

Στις Ν τομές η ποσοστιαία μείωση της μεσοκρισικής συχνότητας που προκάλεσε η ατροπίνη, ήταν μεγαλύτερη στο T-N άκρο σε σύγκριση με το S-N άκρο (**εικόνα 22Α**). Μετά από SE, η ποσοστιαία μείωση της συχνότητας από την ατροπίνη μειώθηκε ελάχιστα για το T-SE άκρο (σε σχέση με το T-N άκρο) ενώ αυξήθηκε για το S-SE άκρο (συγκριτικά με το S-N). Οι διαφορές κατά ζεύγη δεν ήταν στατιστικά σημαντικές, αλλά η διαφορετική κατεύθυνση (αναστροφή) των αλλαγών, μεταξύ Ν και SE ήταν ($p=0.023$, 2-way ANOVA) (**εικόνα 22Α**). Επίσης, η ίδια αναστροφή ήταν εμφανής στα δεδομένα του μοντέλου ελεύθερο- Mg^{2+} (**εικόνα 22Β**) όσο και στην 4-AP (**εικόνα 22Γ**) ξεχωριστά (στατιστικά σημαντική μόνο στην 4-AP, 2-way ANOVA, $p=0.027$), γεγονός που μας επέτρεψε την ομαδοποίηση των δεδομένων στο γράφημα της **εικόνας 22Α**.



Εικόνα 22: Ποσοστιαία μείωση της συχνότητας μεσοκρισικών εκφορτίσεων με την προσθήκη ατροπίνης (10 μM). (A) Τα δεδομένα από τα 2 μοντέλα ομαδοποιήθηκαν σύμφωνα με την ανατομική προέλευση της τομής (T, S) και τον τύπο του πειραματοζώου (N, SE). Παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση (**2-way ANOVA, $p=0.008$) των παραμέτρων: ανατομική προέλευση και τύπος πειραματοζώου όπως φαίνεται και στην τομή των γραμμών του γραφήματος. Το πλήθος των τομών ήταν: $n=25$ (T-N), $n=12$ (T-SE), $n=13$ (S-N) and $n=9$ (S-SE). Τα δεδομένα από το ελεύθερο- Mg^{2+} φαίνονται στο (B). Σε αυτήν την περίπτωση, η αλληλεπίδραση μεταξύ των προηγούμενων παραμέτρων δεν είναι στατιστικά σημαντική ($p>0.05$), ωστόσο η ίδια τάση ήταν εμφανής. Το πλήθος των τομών στο ελεύθερο- Mg^{2+} ήταν: $n=19$ (T-N), $n=7$ (T-SE), $n=6$ (S-N) και $n=4$ (S-SE). Τα δεδομένα από το μοντέλο της 4-AP μόνο, φαίνονται στο (Γ). Σε αυτήν την περίπτωση, η αλληλεπίδραση μεταξύ των προηγούμενων παραμέτρων επιβεβαιώθηκε και στατιστικά (*2-way ANOVA, $p=0.027$). Το πλήθος των τομών στο μοντέλο της 4-AP ήταν: $n=6$ (T-N), $n=5$ (T-SE), $n=7$ (S-N) και $n=5$ (S-SE).

Πίνακας 4A: Ποσοστιαία μείωση[#] της μεσοκριτικής συχνότητας στην CA3 του ιπποκάμπου με προσθήκη ατροπίνης (10 μM), υπό διαβροχή με τENY ελεύθερο- Mg^{2+} ή 4-AP (50 μM)

| | Κροταφικές τομές | Διαφραγματικές τομές | Στατιστικά** |
|---|----------------------------------|----------------------------------|--------------|
| <i>ελεύθερο-Mg^{2+}</i> | | | |
| N | (1) 19.872 ± 5.936 n = 19 | (1) 13.848 ± 12.778 n = 6 | p>0.05 |
| SE | (2) 8.149 ± 6.833 n = 7 | (2) 24.979 ± 9.028 n = 4 | p>0.05 |
| <i>4-AP</i> | | | |
| N | (3) 55.043 ± 12.308 %, n = 6 | (3) 8.872 ± 11.395 %, n = 7 | p=0.02 |
| SE | (4) 33.365 ± 14.28 %, n = 5 | (4) 50.604 ± 15.146 %, n = 5 | p>0.05 |
| | | | |
| Στατιστικά* | (1) vs (2) p>0.05 | (1) vs (2) p>0.05 | |
| | (3) vs (4) p>0.05 | (3) vs (4) p<0.05 (=0.048) | |
| | (1) vs (3) p=0.01 | (1) vs (3) p>0.05 | |
| | (2) vs (4) p>0.05 (limit) | (2) vs (4) p>0.05 | |

*συγκρίσεις κατά στήλες

**συγκρίσεις κατά σειρές

[#]ποσοστιαία αλλαγή της συχνότητας υπολογιζόμενη ως [(φάρμακο-control) / control] x 100

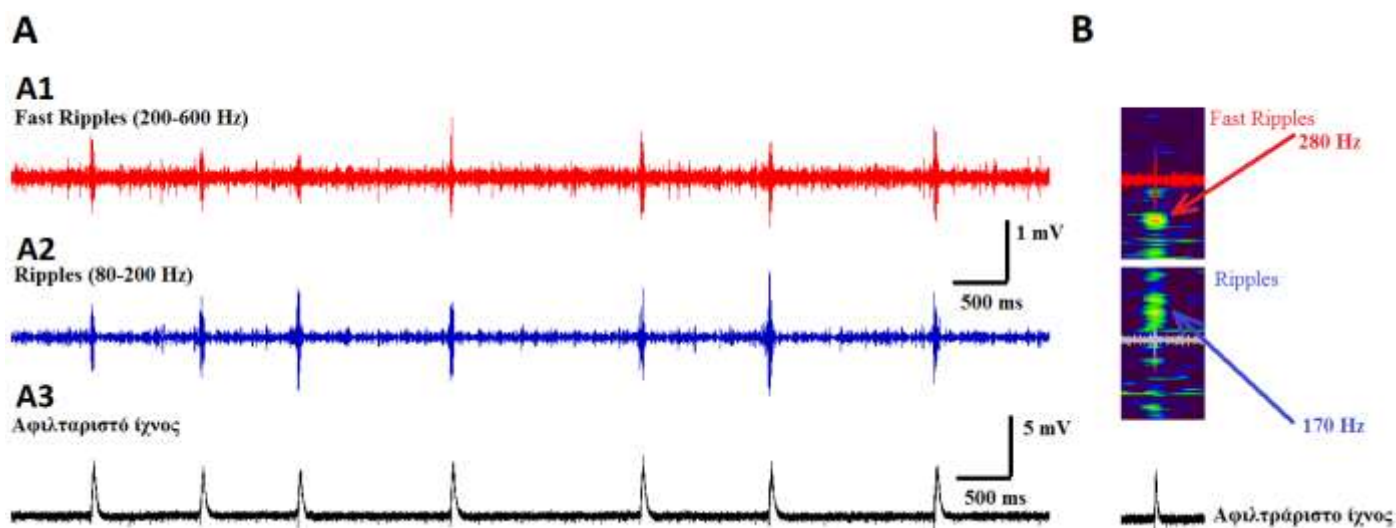
ΥΨΙΣΥΧΝΕΣ ΤΑΛΑΝΤΩΣΕΙΣ (HFOs)

Όλες οι ψηφιακές κυματομορφές αναλύθηκαν για την ύπαρξη υψίσυχνων ταλαντώσεων >80 Hz. Ειδικότερα, φιλτραρίστηκαν με τη χρήση ειδικών ψηφιακών FIR φίλτρων ξεχωριστά για τις συχνότητες Ripple (80-200 Hz) και Fast Ripple (200-600 Hz) όπως αναλύθηκε στις μεθόδους. Διαπιστώθηκε ότι και τα 2 εύρη συχνοτήτων ήταν παρόντα στο σήμα κι ότι συνέπιπταν με τις μεσοκρισικές εκφορτίσεις ενώ απουσιάζουν στο μεσοδιάστημα αυτών (εικόνα 23A, 23B).

Φασματική ανάλυση των υψίσυχνων ταλαντώσεων

Το σήμα (25 kHz) με κατάλληλη επεξεργασία μετατράπηκε σε σήμα η δειγματοληψία του οποίου ήταν 5 kHz, αρκετά ικανοποιητική για την μελέτη των υψίσυχνων γεγονότων που εστιάζει η παρούσα μελέτη (<600 Hz). Στη συνέχεια το σήμα φιλτραρίστηκε με τη χρήση FIR ψηφιακού φίλτρου για κάθε εύρος συχνοτήτων ξεχωριστά και με τον μετασχηματισμό Fourier (FFT), το σήμα μετατράπηκε από αλληλουχία στον χώρο του χρόνου σε αλληλουχία στον χώρο συχνοτήτων. Ειδικότερα, ο μετασχηματισμός FFT δημιουργεί ένα διάγραμμα το power spectrum, το οποίο στον οριζόντιο άξονά του φέρει τις συχνότητες στις οποίες φιλτραρίστηκε κάθε φορά το σήμα, και στον κάθετο άξονα το «power» των εκάστοτε συχνοτήτων μέσα στο σήμα (την αντιπροσώπευση/πυκνότητα αυτών-δηλαδή πόσο έντονη είναι μέσα στο σήμα). Συνεπώς, για μια δεδομένη συχνότητα υψηλές τιμές power αντιστοιχούν σε μεγαλύτερη αντιπροσώπευση των συχνοτήτων αυτών μέσα στο σήμα (στην παρούσα μελέτη, στο εσωτερικό των μεσοκρισικών εκφορτίσεων) ενώ αντίστοιχα μικρές τιμές power σε μικρότερη αντιπροσώπευση. Ουσιαστικά, εκφράζει την πυκνότητα μιας δεδομένης συχνότητας κι επειδή στην παρούσα μελέτη μιλάμε για διαφορές δυναμικού (εξωκτυτάρια σήματα- ΔV μεταξύ του ηλεκτροδίου καταγραφής και του ηλεκτροδίου βάσης) οι μονάδες του power είναι $\mu V^2/Hz$.

Η ανάλυση χρόνου-συχνότητας (time-frequency analysis) χρησιμοποιήθηκε για να εντοπιστεί στο χρόνο η εκάστοτε πυκνότητα (power) συχνότητας (εικόνα 23B). Δηλαδή για να διαπιστωθεί που ακριβώς εντοπίζεται το υψίσυχο γεγονός σε σχέση με το αργό κύμα. Συνεπώς, η παρούσα ανάλυση δίνει την δυνατότητα του εντοπισμού μιας συχνότητας μέσα στην καταγραφή μας. Σε αντίθεση, η προηγούμενη φασματική ανάλυση του power δεν δίνει ανάλογες πληροφορίες και γι' αυτό χαρακτηρίζεται πιο «στάσιμη» (stationary) ανάλυση.



Εικόνα 23: Υψίσυχνες ταλαντώσεις στο φάσμα συχνοτήτων Ripple (80-200 Hz) και Fast ripple (200-600Hz). Φιλτραρισμένα ίχνη για τις συχνότητες Fast Ripple (**A1**) Ripple (**A2**) και αφιλτράριστο ίχνος (**A3**). Υψίσυχνα γεγονότα δεν παρατηρούνταν ανάμεσα στις μεσοκρισικές εκφορτίσεις. (**B**) Ανάλυση χρόνου-συχνότητας (time-frequency analysis) όπου παρατηρούνται νησίδες και για τα 2 υψίσυχνα γεγονότα: Ripples ~170 Hz και Fast Ripples ~280Hz. Παρεμβάλλονται επίσης και τα αντίστοιχα γεγονότα ως ίχνη. Άξονες βαθμονόμησης: αφιλτράριστο ίχνος: 5 mV, 500 ms, φιλτραρισμένα ίχνη: 1 mV, 500 ms.

Συχνότητες Ripple (80-200 Hz)

Σε γενικές γραμμές το power των συχνοτήτων Rs ήταν υψηλότερο στο κροταφικό σε σύγκριση με το διαφραγματικό άκρο (βλ. βαθμονόμηση αξόνων για τις συχνότητες Ripples στην **εικόνα 24A, 24B**) τόσο στο μοντέλο ελεύθερο-Mg²⁺ όσο και στην 4-AP γεγονός που ακολουθεί τις παρατηρούμενες διαφορές στη συχνότητα (βλ. **εικόνα 15**).

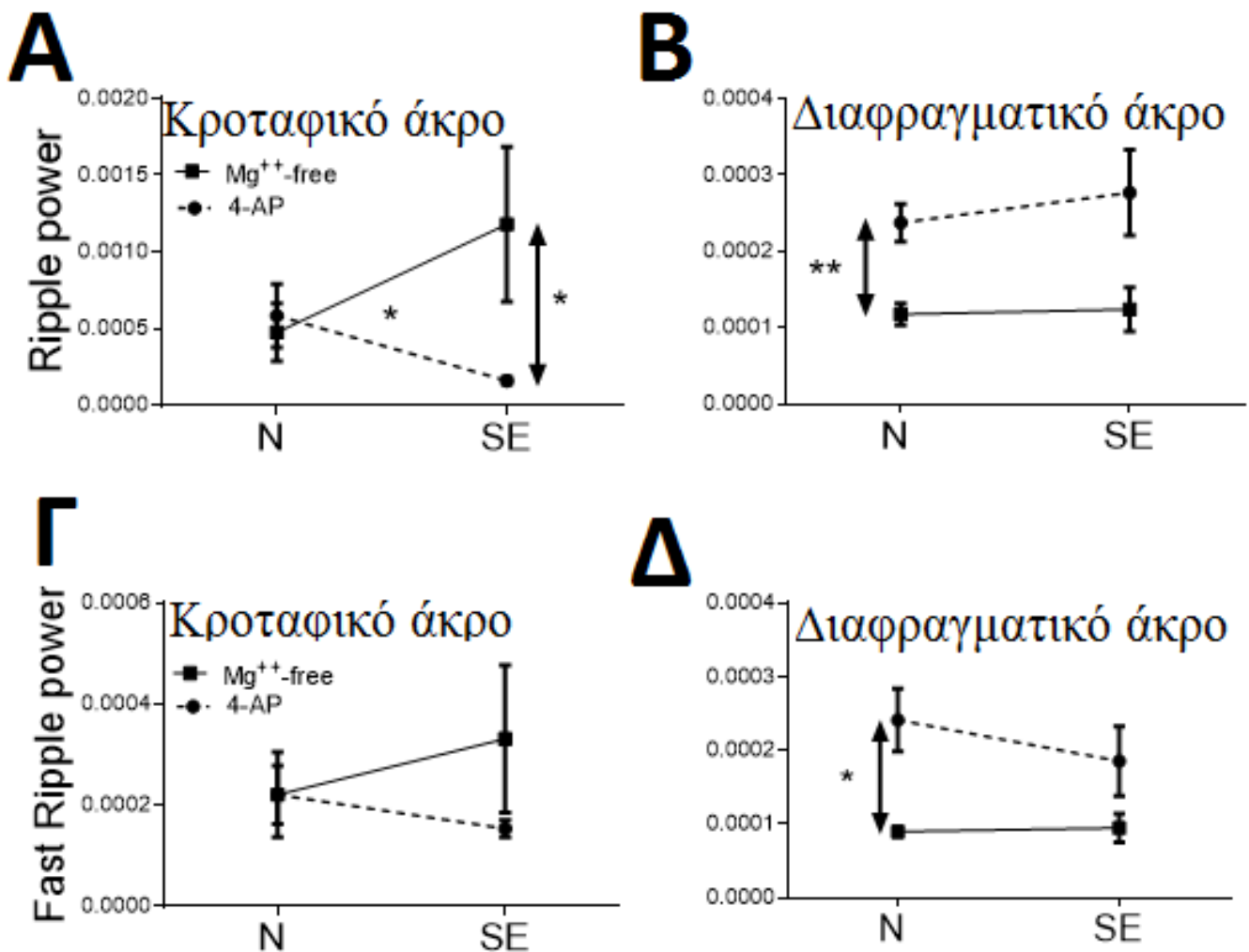
- **Κροταφικό άκρο (T)**

Στις T-N τομές, το R power ήταν παρόμοιο στο μοντέλο ελεύθερο-Mg²⁺ και στην 4-AP. Το R power μετά από SE άλλαξε, ακολουθώντας ένα μοντελο-εξαρτώμενο μοτίβο: αύξησή του στο μοντέλο ελεύθερο-Mg²⁺ και μείωσή του στην 4-AP (2-way ANOVA, $p=0.032$) (**εικόνα 24A**). Επίσης, το Ripple power των T-SE τομών ήταν υψηλότερο στο μοντέλο ελεύθερο-Mg²⁺ συγκριτικά με την 4-AP (unpaired Student's t-test, $p=0.02$). Μια πρώτη παρατήρηση είναι ότι οι διαφορές/αλλαγές στο power δεν συμβαδίζουν με τυχόν διαφορές/αλλαγές (ή όχι) στη συχνότητα των μεσοκρισικών εκφορτίσεων. Για παράδειγμα: Οι συχνότητες των T-SE τομών στην 4-AP ήταν υψηλότερες από το ελεύθερο-Mg²⁺, ενώ στο R power ίσχυε το αντίστροφο (βλ. **εικόνα 17 και 24A**). Σε αντίθεση, οι T-N τομές στα 2 μοντέλα είχαν παρόμοιες συχνότητες,

παρουσιάζοντας επίσης παρόμοια R power (**εικόνα 17 και 24A**). Στο μοντέλο ελεύθερο-Mg²⁺ οι συχνότητες των T τομών μειώνονται μετά από SE ενώ το R power φαίνεται να αυξάνει (**εικόνα 16 και 24A**). Στο μοντέλο της 4-AP η συχνότητα παραμένει η ίδια μετά από SE ενώ το R power φαίνεται να μειώνεται (**εικόνα 16 και 24A**).

- **Διαφραγματικό άκρο (S)**

Στις S-N τομές, το R power ήταν μεγαλύτερο στο μοντέλο της 4-AP σε σύγκριση με το ελεύθερο-Mg²⁺ (unpaired Student's t-test, $p=0.0034$) (**εικόνα 24B**), μια σχέση που δεν φαίνεται να μεταβάλλεται μετά το SE. Στην περίπτωση των S τομών αλλαγές στο R power δεν φαίνεται να ακολουθούν τις αλλαγές στη μεσοκριστική συχνότητα. Για παράδειγμα: Στο μοντέλο ελεύθερο-Mg²⁺ οι συχνότητες των S τομών μειώνονται μετά από SE ενώ το R power παραμένει το ίδιο (**εικόνα 16 και 24B**). Σε αντίθεση, οι S-N τομές στα 2 μοντέλα είχαν παρόμοιες συχνότητες, παρουσιάζοντας όμως διαφορετικά R power: υψηλότερα στην 4-AP σε σχέση με το ελεύθερο-Mg²⁺ (**εικόνα 17 και 24B**). Οι συχνότητες των S-SE τομών στην 4-AP ήταν υψηλότερες από το ελεύθερο-Mg²⁺. Σε αυτήν την περίπτωση το R power φαίνεται να ακολουθεί αυτήν την τάση (**βλ. εικόνα 17 και 24B**).



Εικόνα 24: Υψίσυχνες ταλαντώσεις στις συχνότητες Ripple (80-200 Hz) και Fast Ripple (200-600 Hz) κροταφικών (T) και διαφραγματικών (S) τομών προερχόμενων από φυσιολογικά (N) και SE πειραματόζωα υπό διαβροχή με 2 μ ENY ελεύθερο-Mg²⁺ ή 4-AP. (A) Το power των συχνοτήτων Ripple στο κροταφικό και (B) διαφραγματικό άκρο υπό διαβροχή με μ ENY ελεύθερο-Mg²⁺ (συνεχής γραμμή) ή 4-AP (διακεκομμένη γραμμή). Το power των Ripples στο T άκρο αλλάζει με μοντελο-εξαρτώμενο τρόπο μετά από SE (2-way ANOVA, * $p=0.032$, επίσης οι τιμές για τις T-SE τομές διέφεραν μεταξύ των 2 μοντέλων * $p=0.02$). Στο S άκρο το power των Ripples είχε μικρότερες τιμές σε σχέση με αυτό στις κροταφικές τομές (βαθμονόμηση αξόνων) και δεν άλλαξε μετά το SE. Επίσης, στις S-N τομές, το Ripple power ήταν υψηλότερο στην 4-AP συγκριτικά με το ελεύθερο-Mg²⁺ (** $p=0.003$). (Γ) Το power των συχνοτήτων Fast Ripple στο T και στο S άκρο υπό διαβροχή με μ ENY ελεύθερο-Mg²⁺ (συνεχής γραμμή) ή 4-AP (διακεκομμένη γραμμή). Το power των Fast Ripples στο T άκρο φαίνεται να ακολουθεί το ίδιο μοτίβο αλλαγής όπως αυτό των Ripples, χωρίς όμως η αλλαγή να φθάνει το επίπεδο της στατιστικής σημαντικότητας. (Δ) Στο S άκρο το power των Fast Ripples δεν άλλαξε μετά το SE. Στις S-N τομές, το Fast Ripple power ήταν υψηλότερο στην 4-AP συγκριτικά με το ελεύθερο-Mg²⁺ (* $p=0.02$). Το πλήθος των τομών είναι το ίδιο με την εικόνα 25.

Συχνότητες Fast Ripple (200-600 Hz)

Οι συχνότητες FRs είχαν χαμηλότερο power συγκριτικά με τις συχνότητες Rs στις κροταφικές τομές (βλ. την **βαθμονόμηση των αξόνων στα διαγράμματα εικόνα 24A, Γ**) και παραπλήσιο στις διαφραγματικές (εικόνα **21B, Δ**).

- **Κροταφικό άκρο (T)**

Στις T-N τομές, το FR power ήταν παρόμοιο στο μοντέλο ελεύθερο-Mg²⁺ και στην 4-AP. Το R power φαίνεται να μεταβάλλεται μετά από SE. Ειδικότερα, υπάρχει μια τάση αύξησής του στο μοντέλο ελεύθερο-Mg²⁺ και μείωσής του στην 4-AP η οποία δεν είναι στατιστικά σημαντική (2-way ANOVA, $p > 0.05$) (εικόνα **24Γ**). Επίσης, στο FR power των T-SE τομών υπάρχει μια τάση για υψηλότερο στο μοντέλο ελεύθερο-Mg²⁺ συγκριτικά με την 4-AP η οποία όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική. Στην περίπτωση των T τομών οι διαφορές/αλλαγές στο power δεν συμβαδίζουν με τυχόν διαφορές/αλλαγές (ή όχι) στη συχνότητα των μεσοκρυστικών εκφορτίσεων. Για παράδειγμα: Οι συχνότητες των T-SE τομών στην 4-AP ήταν υψηλότερες από το ελεύθερο-Mg²⁺, ενώ στο FR power υπάρχει μια τάση για το αντίστροφο (βλ. εικόνα **17 και 24Γ**). Σε αντίθεση, οι T-N τομές στα 2 μοντέλα είχαν παρόμοιες συχνότητες, παρουσιάζοντας επίσης παρόμοια FR power (εικόνα **17 και 24Γ**). Στο μοντέλο ελεύθερο-Mg²⁺ οι συχνότητες των T τομών μειώνονται μετά από SE ενώ στο FR power φαίνεται να υπάρχει μια τάση προς αύξηση (εικόνα **16 και 24Γ**). Στο μοντέλο της 4-AP η συχνότητα παραμένει η ίδια μετά από SE ενώ στο FR power υπάρχει μια τάση προς μείωση (εικόνα **16 και 24Γ**).

- **Διαφραγματικό άκρο (S)**

Στις S-N τομές, το FR power ήταν μεγαλύτερο στο μοντέλο της 4-AP σε σύγκριση με το ελεύθερο-Mg²⁺ (unpaired Student's t-test, $p = 0.02$) (εικόνα **24Δ**), μια σχέση που δεν φαίνεται να μεταβάλλεται μετά το SE (ίσως μια μικρή πτώση του FR power στο μοντέλο της 4-AP). Στην περίπτωση των S τομών αλλαγές στο FR power δεν φαίνεται να ακολουθούν τις αλλαγές στη μεσοκρυστική συχνότητα. Για παράδειγμα: Στο μοντέλο ελεύθερο-Mg²⁺ οι συχνότητες των S τομών μειώνονται μετά από SE ενώ το R power παραμένει το ίδιο (εικόνα **16 και 24Δ**). Σε αντίθεση, οι S-N τομές στα 2 μοντέλα είχαν παρόμοιες συχνότητες, παρουσιάζοντας όμως διαφορετικά FR power: υψηλότερα στην 4-AP σε σχέση με το ελεύθερο-Mg²⁺ (εικόνα **17 και 24Δ**). Οι συχνότητες των S-SE τομών στην 4-AP ήταν υψηλότερες από το ελεύθερο-Mg²⁺. Σε αυτήν την περίπτωση το FR power φαίνεται να ακολουθεί αυτήν την τάση (βλ. εικόνα **17 και 24B**).

Λόγοι Fast Ripple/Ripple

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν μεταβάλλεται η αναλογία του power των FR και R στο σήμα υπολογίστηκε ο λόγος FR/R. Κλινικές μελέτες προτείνουν ότι ο λόγος FR/R αυξάνει κοντά σε επιληπτογόνες περιοχές {Staba, 2007 #135}. Επίσης, υψηλές τιμές του λόγου έχουν συνδεθεί με μειωμένους όγκους ιπποκάμπου, μικρότερη πυκνότητα νευρώνων στον ιππόκαμπο αλλά και με τον βαθμό των παθολογοανατομικών αλλοιώσεων στις εστίες. Στην παρούσα μελέτη οι λόγοι FR/R κυμάνθηκαν από 0.2-1.5 και δεν διέφεραν μεταξύ των τύπων των τομών στο άνευ-Mg²⁺ αλλά διέφεραν μόνο σε έναν τύπο τομών στην 4-AP (**εικόνα 25A**).

- **Κροταφικό άκρο (T)**

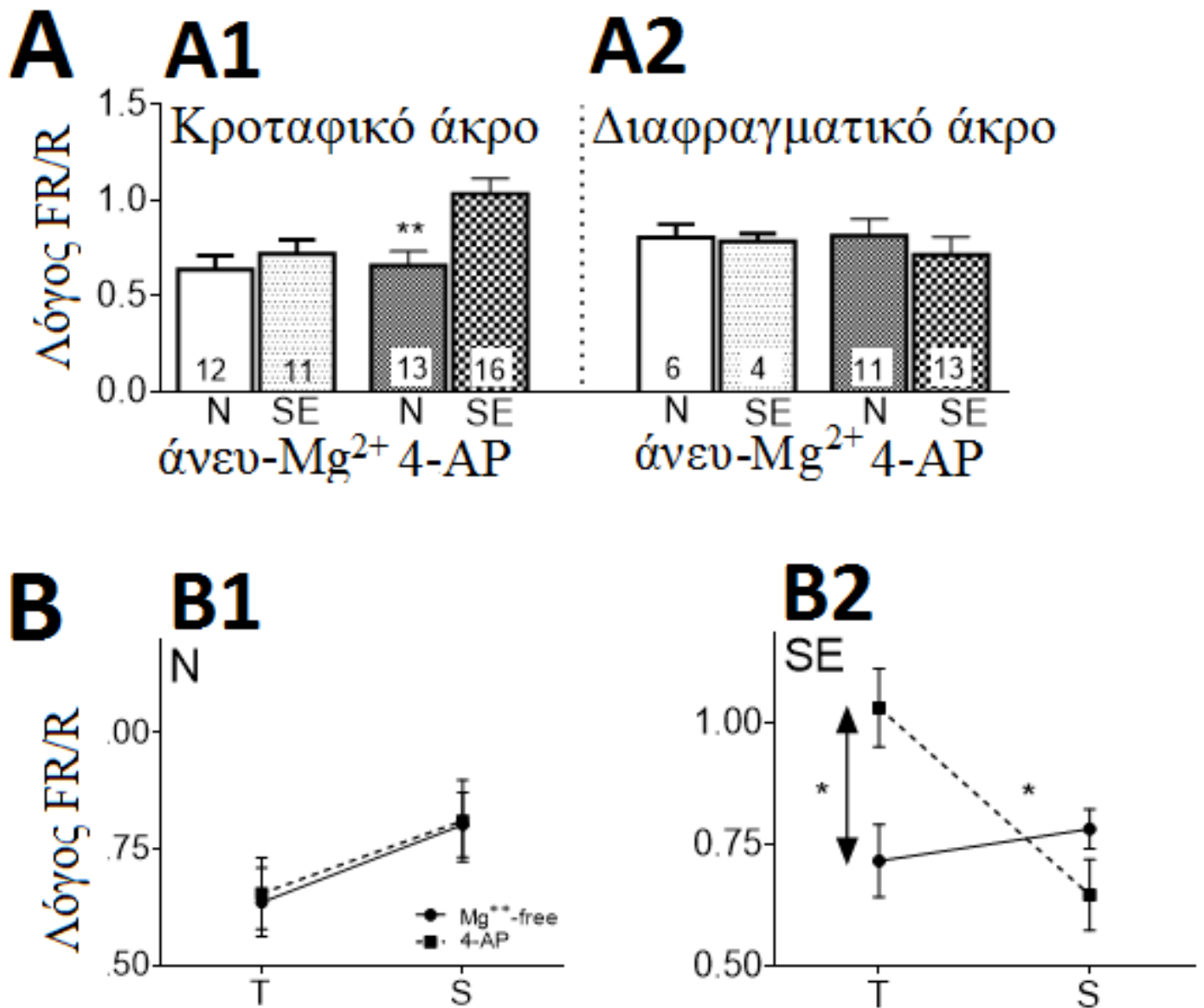
Οι FR/R λόγοι των T-N τομών ήταν παρόμοιοι μεταξύ των μοντέλων. Οι T-SE τομές έδειξαν του υψηλότερους λόγους από τις S-SE τομές ($p=0.01$), τις T-N τομές ($p=0.002$) και τις T-SE τομές στο μοντέλο ελεύθερο-Mg²⁺ ($p=0.013$).

- **Διαφραγματικό άκρο (S)**

Οι FR/R λόγοι ήταν παρόμοιοι μεταξύ των τύπων τομών και δεν διαπιστώθηκε καμία μεταβολή τους μετά από SE.

Μια διαφορετική ανάλυση των παραπάνω δεδομένων παρουσιάζεται στην **εικόνα 22B**. Σε αυτήν την ανάλυση διαπιστώθηκε ότι στις N τομές οι FR/R λόγοι ήταν παρόμοιοι στις T, S τομές (μια τάση για ελάχιστα υψηλότερους λόγους στις S συγκριτικά με τις T τομές). Αντίθετα, στις SE τομές φαίνεται μια μοντελο-εξαρτώμενη αλλαγή του λόγου (2-way ANOVA, $p=0.02$) λόγω κυρίως των T-SE τομών οι οποίες εμφανίζουν υψηλούς FR/R λόγους στο ελεύθερο-Mg²⁺ σε σχέση με την 4-AP (unpaired Student's t-test, $p=0.01$).

Είναι ενδιαφέρον ότι και σε αυτήν την περίπτωση, υπάρχουν αρκετά παραδείγματα που δείχνουν ότι οι διαφορές/αλλαγές στη συχνότητα των μεσοκρυσικών εκφορτίσεων δεν ακολουθούν κατ' ανάγκη αυτές του FR/R λόγου. Για παράδειγμα: Οι T τομές είχαν υψηλότερες συχνότητες σε σχέση με τις διαφραγματικές αλλά οι FR/R λόγοι τους ήταν στις περισσότερες των περιπτώσεων παρόμοιοι. Μια εξαίρεση αποτελεί η σύγκριση T-SE vs S-SE τομών στην 4-AP όπου οι διαφορές στη συχνότητα αντικατοπτρίζουν αυτές του λόγου FR/R (**εικόνα 15 και 25B2**). Οι T-SE τομές είχαν μικρότερους FR/R λόγους στο ελεύθερο-Mg²⁺ σε σχέση με την 4-AP. Οι συχνότητες όμως ήταν υψηλότερες στις T-SE τομές στην 4-AP σε σύγκριση με το ελεύθερο-Mg²⁺ (**εικόνα 17 και 25B2**). Τέλος, παρά τις υψηλότερες συχνότητες των S-SE τομών στην 4-AP σε σχέση με το ελεύθερο-Mg²⁺ οι λόγοι που κατεγράφησαν FR/R ήταν παρόμοιοι.



Εικόνα 25: Λόγοι FR/R μεταξύ φυσιολογικών (N) και SE τομών προερχόμενων από το κροταφικό (T) και διαφραγματικό (S) άκρο του ιπποκάμπου στα 2 μοντέλα συγχρονισμού (ελεύθερο-Mg²⁺ και 4-AP). (A1,2) Ο λόγος FR/R των T-SE τομών στην 4-AP διέφερε από το T-N άκρο στο ίδιο μοντέλο (*p=0.002, unpaired Student's t-test), τις S-SE τομές (S-SE στην 4-AP *p=0.015) αλλά και από τις T-SE τομές στο μοντέλο ελεύθερο-Mg²⁺ (*p=0.013). (B1) Οι λόγοι FR/R δεν διέφεραν μεταξύ φυσιολογικού T και S άκρου ή μεταξύ των 2 μοντέλων συγχρονισμού (ελεύθερο-Mg²⁺-συνεχής γραμμή ή στην 4-AP-διακεκομμένη γραμμή). Ωστόσο, μετά από SE (B2), ο λόγος FR/R μεταβλήθηκε μεταξύ T και S άκρου στο μοντέλο της 4-AP, αλλά όχι στο μοντέλο ελεύθερο-Mg²⁺ (2-way ANOVA, *p=0.032, επίσης οι FR/R λόγοι διέφεραν μεταξύ των μοντέλων μόνο για το T-SE άκρο, unpaired Student's t-test, *p=0.01).

ΧΟΛΙΝΕΡΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΙΣ ΥΨΙΣΥΧΝΕΣ ΤΑΛΑΝΤΩΣΕΙΣ (4-AP)

Οι χολινεργικές δράσεις στις υψίσυχνες ταλαντώσεις, μελετήθηκαν στο μοντέλο της 4-AP για τους εξής λόγους. Σε αυτό το μοντέλο τα χολινεργικά (εσερίνη, καρβαχόλη) έδειξαν ίδιες ποσοστιαίες μεταβολές στη συχνότητα των εκφορτίσεων. Επομένως, το μοντέλο της 4-AP θεωρήθηκε ιδανικό λόγω της δυνατότητας ανάλυσης καταγραφών με παρόμοιες μεσοκριτικές συχνότητες μεταξύ των N και SE τομών (T ή S) τόσο παρουσία εσερίνης όσο και παρουσία καρβαχόλης (**πίνακες 2 / 2A και 2 / 2B αντίστοιχα**). Επίσης, σε όλες τις περιπτώσεις, η προσθήκη χολινεργικών μείωσε το ύψος στον ίδιο βαθμό γεγονός που δίνει το πλεονέκτημα μελέτης κυματομορφών παρόμοιου ύψους παρουσία χολινεργικών. Επίσης, στο μοντέλο της 4-AP οι υψίσυχνες ταλαντώσεις είχαν υψηλότερα FR και R power σε σύγκριση με το ελεύθερο-Mg²⁺ (κι ιδιαίτερα οι συχνότητες FR power οι οποίες έχουν μικρότερο power σε σχέση με τις R), με αποτέλεσμα η ανάλυση να είναι πιο εύκολη.

Η διαβροχή των τομών με εσερίνη (1 μM) και καρβαχόλη (1 μM) προκάλεσε παρόμοιες αποκρίσεις στις υψίσυχνες ταλαντώσεις με αποτέλεσμα τα δεδομένα να ομαδοποιηθούν (στη συνέχεια του κειμένου αναφέρονται με τον όρο «χολινεργικά»). Ειδικότερα, τα R, FR power μετρήθηκαν πριν και κατά τη διάρκεια διαβροχής με χολινεργικά και οι παρατηρούμενες μεταβολές τους κανονικοποιήθηκαν και παρουσιάζονται ως ποσοστιαίες αλλαγές (**εικόνα 26A, B**).

Τα χολινεργικά επηρέασαν το R, FR power βάσει ανατομικής προέλευσης:

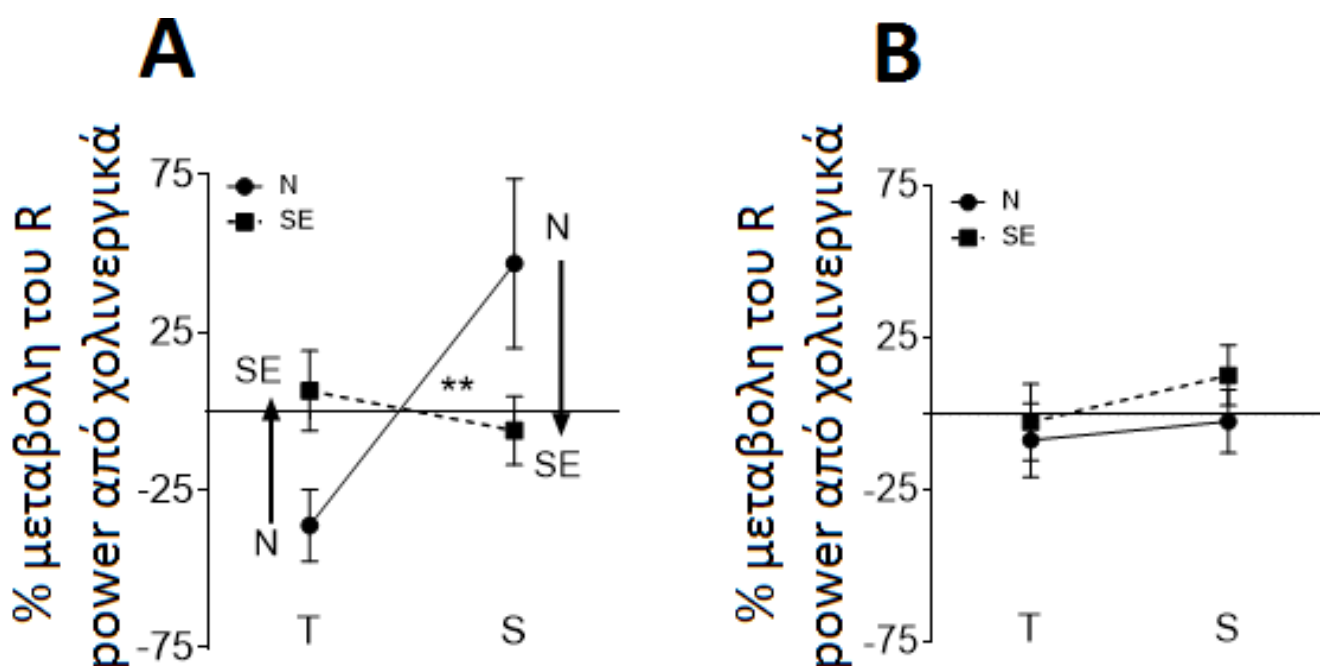
- **Κροταφικό άκρο (T)**

Στο T-N άκρο, τα χολινεργικά μείωσαν το R power. Μετά από SE (βλ. την κατεύθυνση του βέλους N προς SE), η μείωση του R power δεν παρατηρήθηκε (**εικόνα 26A**). Τα χολινεργικά δεν επηρέασαν το FR power (**εικόνα 26B**).

- **Διαφραγματικό άκρο (S)**

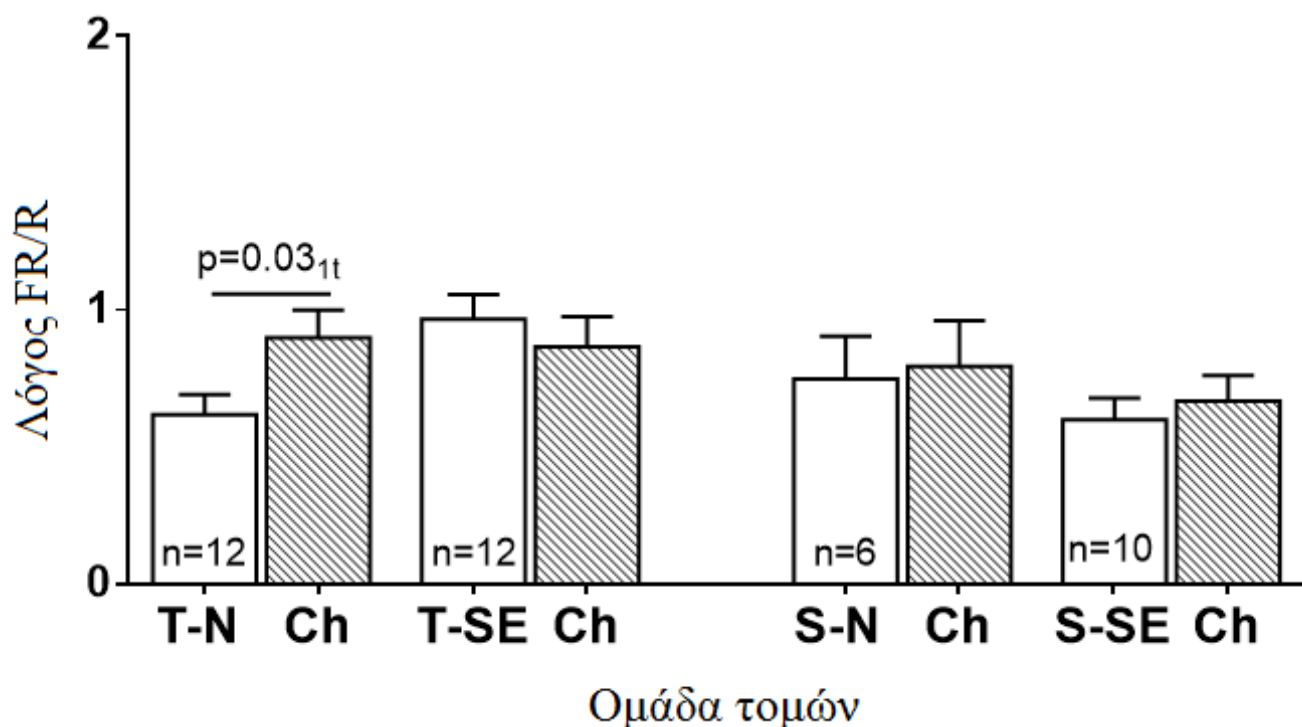
Στο S-N άκρο τα χολινεργικά αύξησαν το R power. Μετά από SE (βλ. την κατεύθυνση του βέλους N προς SE), δεν παρατηρήθηκε αντίστοιχη αύξηση του R power παρουσία χολινεργικών (**εικόνα 26A**). Τα χολινεργικά δεν επηρέασαν το FR power (**εικόνα 26B**).

Είναι ενδιαφέρον, ότι η διαφοροποίηση της δράσης των χολινεργικών στο R power μεταξύ T και S τομών δεν παρατηρήθηκε (υπάρχει μια τάση αναστροφής) μετά από SE (2-way ANOVA, $p=0.002$) (**εικόνα 26A**).

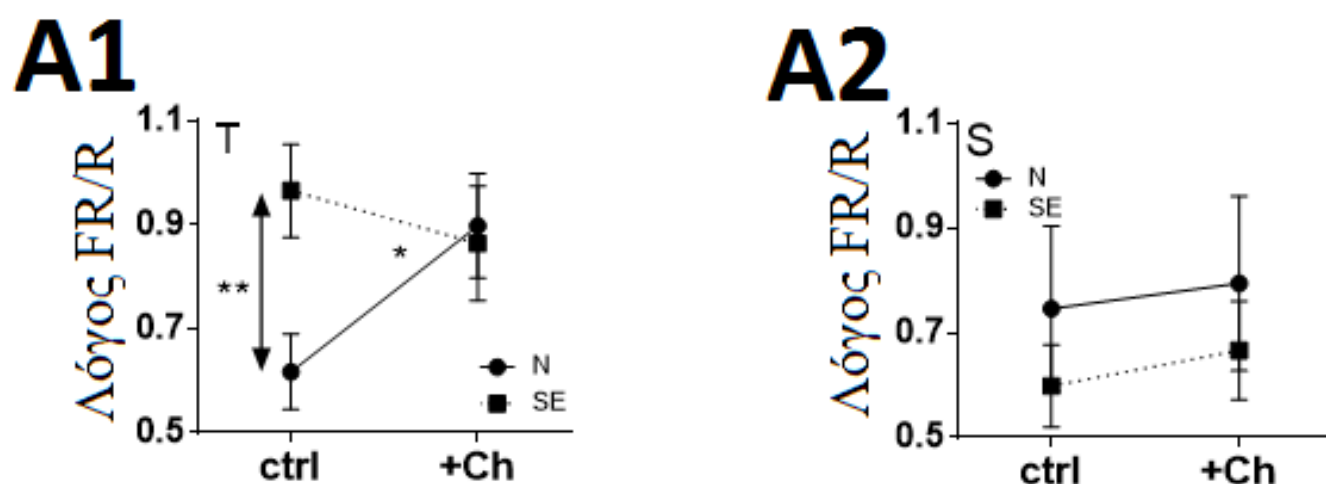


Εικόνα 26: Ποσοστιαία μεταβολή του R και FR power από χολινεργικά (Καρβαχόλη, 1 μ M ή Εσερίνη, 1 μ M) σε τομές κροταφικού (T) και διαφραγματικού (S) υποκάμπτου προερχόμενες από φυσιολογικά (N) (συνεχής γραμμή) ή SE (διακεκομμένη γραμμή) πειραματόζωα. (A) τα χολινεργικά επηρέασαν R power των N τομών βάσει ανατομικής προέλευσης (το μείωσαν στο T άκρο ενώ το αύξησαν στο S), αυτή η διαφοροποίηση δεν παρατηρήθηκε μετά από SE (2-way ANOVA, * $p=0.002$). (B) Τα χολινεργικά δεν επηρέασαν το FR power σε καμία υπο-ομάδα τομών. Το πλήθος των τομών (n) φαίνεται στο γράφημα της εικόνας 27.

Η προσθήκη χολινεργικών οδήγησε σε αύξηση του FR/R λόγου μόνο στο T-N άκρο και σε καμία άλλη ομάδα τομών (paired Student's t-test, $p=0.03$) (εικόνα 27). Ωστόσο, με μια διαφορετική παρουσίαση των δεδομένων (εικόνα 28) έγινε φανερή η αναστροφή της δράση των χολινεργικών στον FR/R λόγο μετά από SE, μόνο στις κροταφικές τομές (εικόνα 28A1). Ειδικότερα, τα χολινεργικά αυξήσαν τον λόγο FR/R στις T-N τομές, ενώ τον μείωσαν στις T-SE τομές (2-way ANOVA, $p<0.05$), μια διαφοροποίηση που δεν παρατηρήθηκε στις S τομές (εικόνα 28A2).



Εικόνα 27: Λόγοι FR/R πριν και κατά τη διάρκεια διαβροχής με χολινεργικά σε κροταφικές (T) και διαφραγματικές (S) τομές ιπποκάμπου φυσιολογικών (N) και SE πειραματοζώων. Τα χολινεργικά, αύξησαν τον λόγο FR/R μόνο στις T-N τομές (one-tailed Student's t-test for paired observations, * $p=0.03$). Το πλήθος των τομών (n) φαίνεται στην βάση κάθε κολώνας. Η πρώτη κολώνα αντιστοιχεί στην κατάσταση πριν την προθήκη χολινεργικών η δεύτερη κολώνα στην κατάσταση μετά την προσθήκη χολινεργικών.

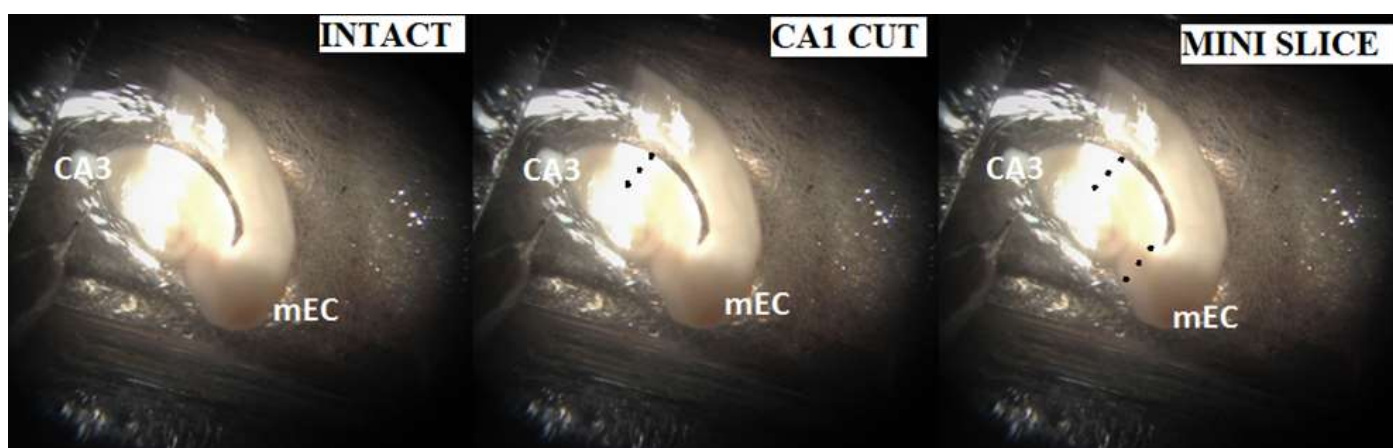


Εικόνα 28: Μεταβολή του λόγου FR/R από προσθήκη χολινεργικών σε T και S τομές ιπποκάμπου φυσιολογικών (N) και SE πειραματοζώων. Ο λόγος FR/R άλλαξε στο T άκρο (A1) με την προσθήκη χολινεργικών προς διαφορετική κατεύθυνση βάσει του ιστορικού του πειραματοζώου (N vs SE). Ειδικότερα, αυξήθηκε στις T-N τομές (συνεχής γραμμή) ενώ μειώθηκε στις T-SE (διακεκομμένη γραμμή) (2-way ANOVA, * $p<0.05$). (A2) Καμία παρόμοια μεταβολή δεν παρατηρήθηκε στο S άκρο.

3.2 ΜΕΛΕΤΗ 2

ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΥ ΚΙ ΕΝΔΟΡΡΙΝΙΚΟΥ ΦΛΟΙΟΥ ΜΕΤΑ ΑΠΟ STATUS EPILEPTICUS: ΜΕΣΟΚΡΙΣΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΚΙ ΥΨΙΣΥΧΝΟΣ ΣΥΓΧΡΟΝΙΣΜΟΣ

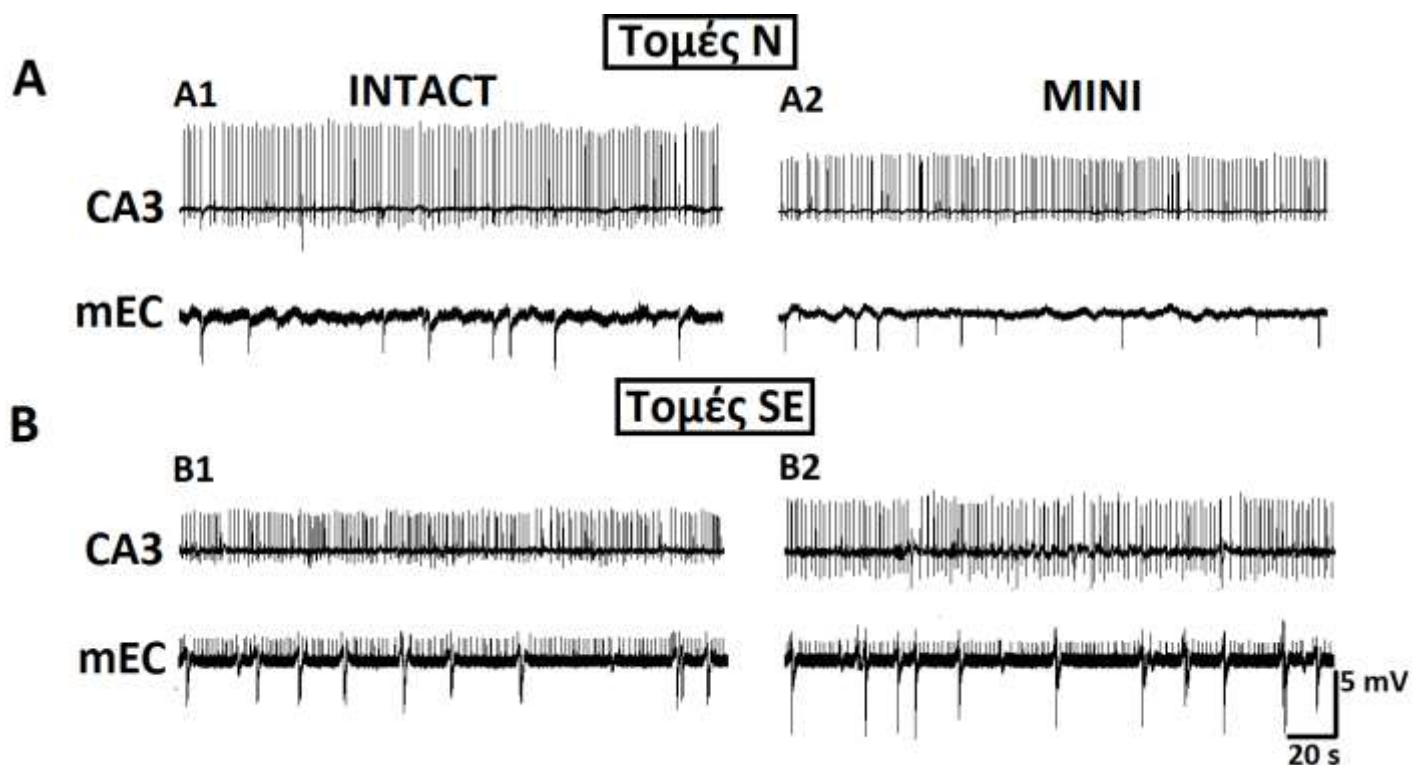
Ταυτόχρονες (συζευγμένες) εξωκυττάρειες ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές πραγματοποιήθηκαν από την πυραμιδική στοιβάδα της CA3 και τις βαθιές (V-VI) στοιβάδες του μέσου ενδορρινικού φλοιού (mEC) κατά τη διάρκεια συνεχούς διαβροχής των τομών με tENY που περιείχε 50 μ M 4-AP. Στην αρχή κάθε πειράματος, καταγραφόταν η δραστηριότητα από τις 2 περιοχές όταν (i) ήταν συνδεδεμένες (Intact), (ii) μετά από διατομή στις ίνες Schaffer (CA1 cut) και (iii) έπειτα από την πλήρη απομόνωσή τους με διατομή στο ύψος του παραυποθέματος (Mini slices) (εικόνα 29). Μεσοκρισικού τύπου επιληπτοειδής δραστηριότητα εμφανίστηκε και στις 2 περιοχές, με διαφορετικές όμως συχνότητες (εικόνα 30).



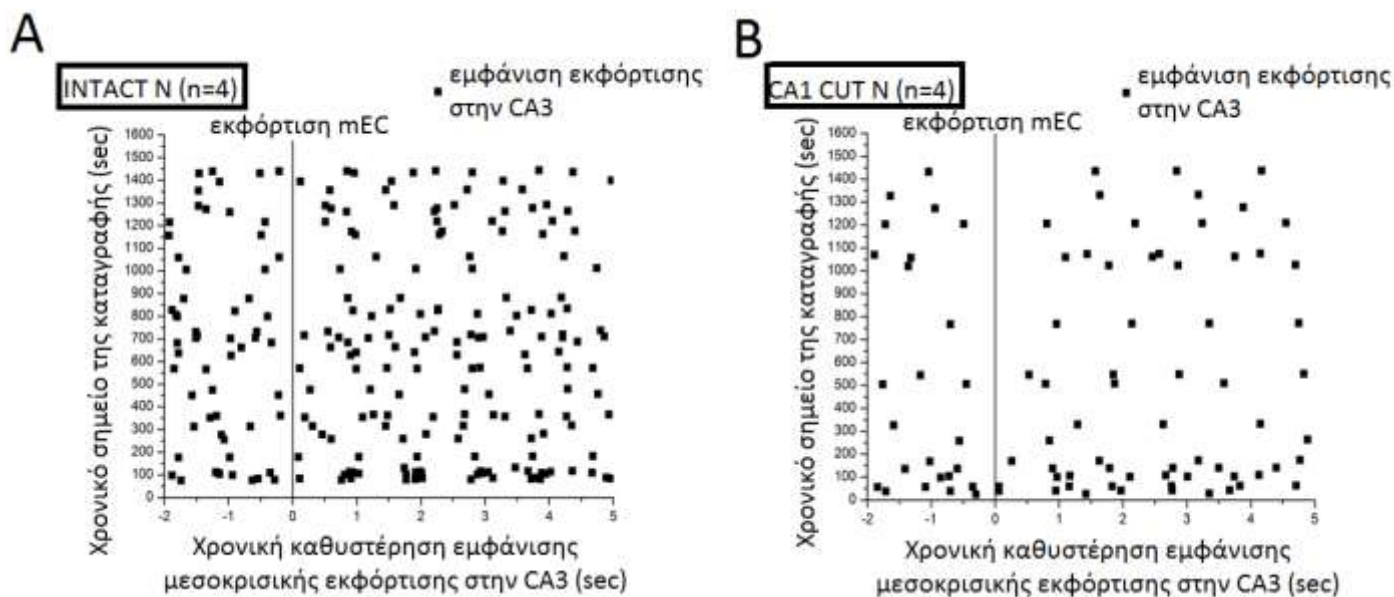
Εικόνα 29: Πρωτόκολλο ηλεκτροφυσιολογικών καταγραφών και χειρουργικών διατομών σε συνδυσασμένες τομές ιπποκάμπου-ενδορρινικού φλοιού.

Σε αρχικά πειράματα, διερευνήθηκε (με raster plots) αν σχετίζονταν χρονικά οι εκφορτίσεις των 2 περιοχών κι ειδικότερα αν υπήρχε κάποιο μοτίβο αλληλεπίδρασης ή συσχέτισης μεταξύ τους (εικόνες 30, 31). Γι' αυτόν το σκοπό, επιλέχθηκε ένα διάστημα 2 sec πριν και 5 sec μετά την μεσοκρισική εκφόρτιση του μέσου ενδορρινικού φλοιού (επειδή ήταν λιγότερο συχνή από αυτές της CA3-αναφέρεται ως σημείο «0» στα raster plots). Με σημείο αναφοράς λοιπόν την εκφόρτιση του ενδορρινικού ($t=0$) μετρήθηκε η χρονική καθυστέρηση εμφάνισης μεσοκρισικών εκφορτίσεων στην CA3 στο διάστημα -2 sec, +5 sec. Αυτή η ανάλυση δίνει την δυνατότητα διερεύνησης της επίδρασης της εκφόρτισης μιας περιοχής στις εκφορτίσεις της άλλης και κατά συνέπεια παρέχει πληροφορίες για την (πιθανή) αλληλεπίδρασή τους. Διαπιστώθηκε ότι οι μεσοκρισικές εκφορτίσεις ήταν ασύγχρονες στις 2 περιοχές (δεν συνέπιπταν σε καμία περίπτωση), μια παρατήρηση που δεν μεταβλήθηκε με την διατομή των ινών Schaffer, ούτε στις N (βλ. **εικόνα 31A, 31B**) αλλά ούτε και στις

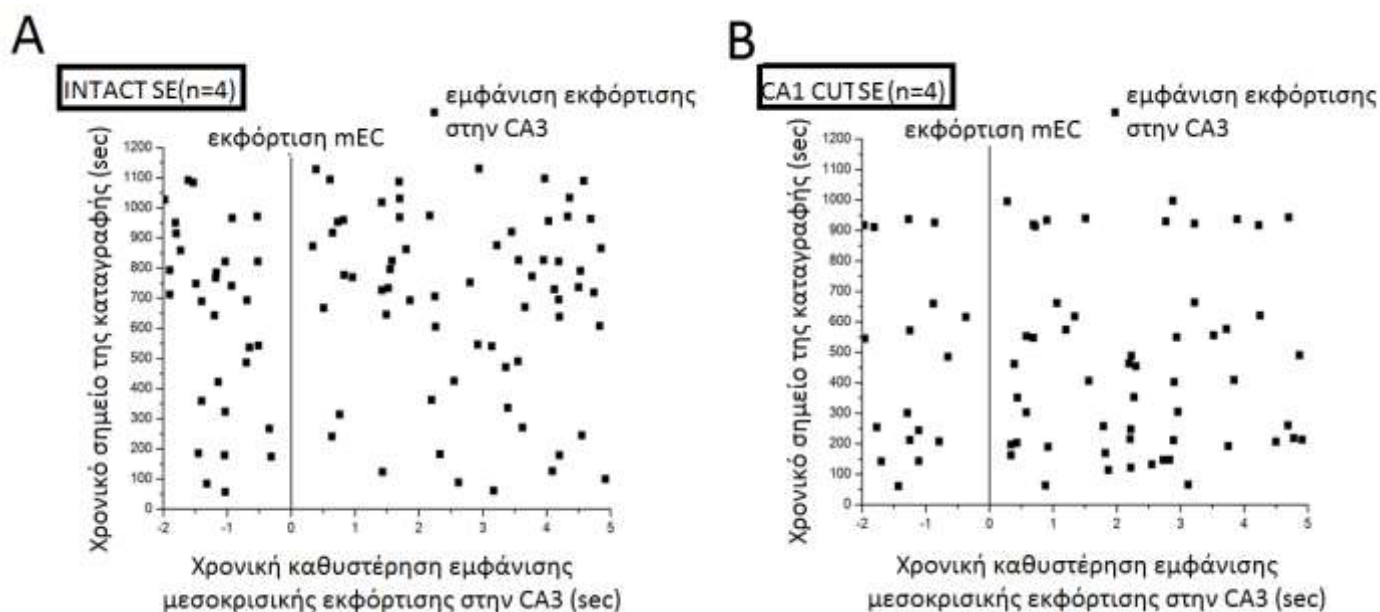
SE τομές (εικόνα 32A, 32B). Επίσης, δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή (αύξηση, μείωση) στις συχνότητες της CA3 στο διάστημα 2 sec πριν ή 5 sec μετά την εκφόρτιση του mEC.



Εικόνα 30: Συζευγμένες εξωκυττάρειες ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές από την πυραμιδική στοιβάδα της CA3 και τις βαθιές στοιβάδες του μέσου ενδορρινικού φλοιού (mEC) κατά τη διάρκεια συνεχούς διαβροχής με tENY που περιείχε 4-AP (50 μ M). Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά ίχνη για τις N (A), SE (B) τομές και για τις 2 περιοχές καταγραφής όταν αυτές (i) ήταν συνδεδεμένες (Intact) (A1 για τις N, B1 για τις SE τομές) και μετά από την πλήρη απομόνωσή τους με τομή στο ύψος του παρα-υποθέματος (Mini) (A2 για τις N, B2 για τις SE τομές). Άξονες βαθμονόμησης: 5 mV, 20 s



Εικόνα 31: Ανάλυση της χρονικής καθυστέρησης εμφάνισης μεσοκριακών εκφορτίσεων στην CA3 περιοχή φυσιολογικών τομών, σε διάστημα 2 sec πριν και 5 sec μετά την εκφόρτιση του mEC στα στάδια Intact (A) και (B) CA1 cut (epoch: 1600 sec καταγραφής). Δεν παρατηρήθηκε κάποιο σταθερό μοτίβο συσχέτισης μεταξύ των 2 περιοχών σε κάθε στάδιο.



Εικόνα 32: Ανάλυση της χρονικής καθυστέρησης εμφάνισης μεσοκριακών εκφορτίσεων στην CA3 περιοχή SE τομών, σε διάστημα 2 sec πριν και 5 sec μετά την εκφόρτιση του mEC στα στάδια Intact (A) και (B) CA1 cut (epoch: 1200 sec καταγραφής). Δεν παρατηρήθηκε κάποιο σταθερό μοτίβο συσχέτισης μεταξύ των 2 περιοχών σε κάθε στάδιο.

Σύγκριση συχνοτήτων μεσοκρισικών εκφορτίσεων μεταξύ της CA3 και του mEC

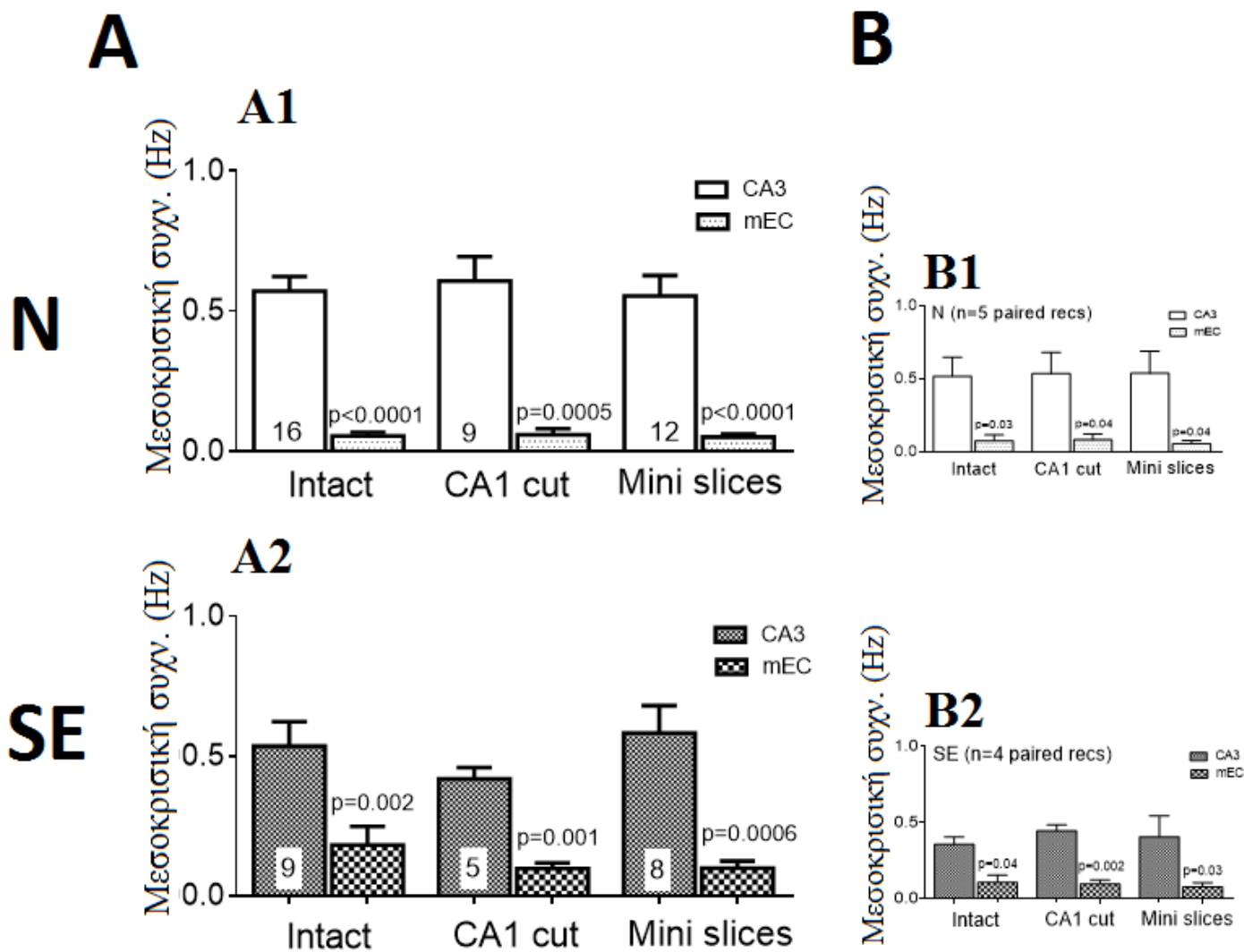
- **N τομές**

Στις N τομές οι μεσοκρισικές εκφορτίσεις ήταν συχνότερες στην CA3 περιοχή του ιπποκάμπου σε σύγκριση με τον mEC (**εικόνα 33A1**). Η διακοπή της εισόδου της δραστηριότητας της CA3 στον mEC, με διατομή που πραγματοποιήθηκε στις ίνες Schaffer (CA1 cut), δεν επηρέασε τις συχνότητες στις 2 περιοχές και συνεπώς δεν μετέβαλλε τη συσχέτισή τους. Η πλήρης απομόνωση των 2 περιοχών (Mini slices) που πραγματοποιήθηκε με διατομή στο ύψος του παρα-υποθέματος, δεν σημείωσε καμία επίδραση στις συχνότητες ούτε της CA3 αλλά ούτε και του mEC ώστε η διαφορά παρέμενε παρά τις διαδοχικές διατομές.

- **SE τομές**

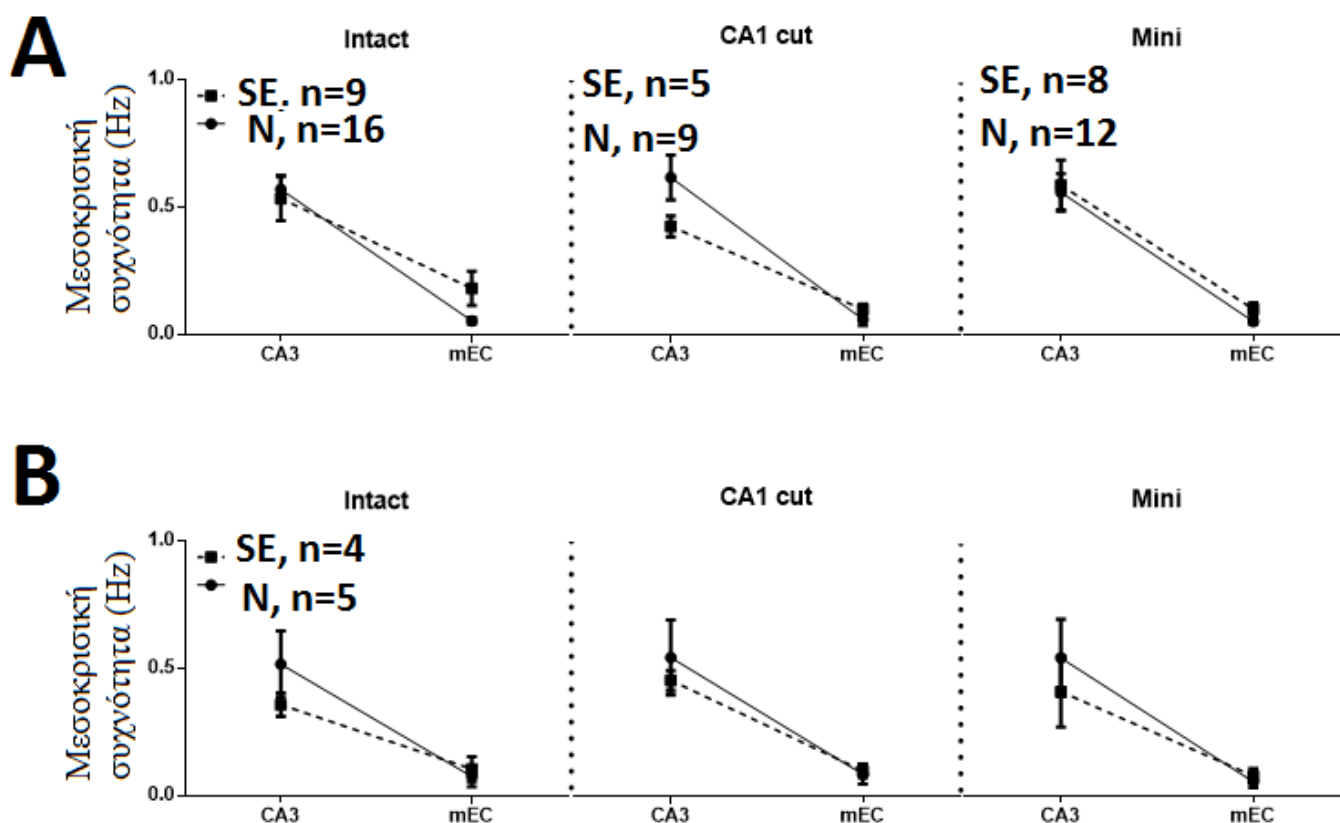
Στις SE τομές, η CA3 περιοχή είχε σημαντικά υψηλότερες συχνότητες από τον mEC και η διαφορά αυτή παρέμενε παρά τις διαδοχικές διατομές (**εικόνα 33A2**). Ωστόσο, παρατηρήθηκε μια τάση για μικρότερη διαφορά μεταξύ των συχνοτήτων των 2 περιοχών συγκριτικά με τις N τομές η οποία αναλύεται παρακάτω (**εικόνα 34**).

Στην **εικόνα 33A** βρίσκονται δεδομένα από συζευγμένες καταγραφές (paired recs), όμως υπήρχαν τομές για τις οποίες δεν ήταν διαθέσιμα και τα 3 στάδια καταγραφής (Intact, CA1 cut, Mini slices). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε και με τομές που περιλάμβαναν και τα 3 στάδια (**εικόνα 33B**) κι έδειξε το ίδιο αποτέλεσμα τόσο στις N (**εικόνα 33B1**) όσο και στις SE τομές (**εικόνα 33B2**).



Εικόνα 33: Σύγκριση συχνοτήτων μεσοκριακών εκφορτίσεων μεταξύ της CA3 περιοχής του ιπποκάμπου και των βαθών στοιβάδων του mEC. Μεσοκριακές συχνότητες καταγραφόμενες ταυτόχρονα από το πυραμιδικό στρώμα της CA3 και τις βαθιές (V-VI) στοιβάδες του μέσου ενδορρινικού φλοιού (mEC) κατά τη διάρκεια συνεχούς διαβροχής με TENY που περιείχε 50 μ M 4-AP. Στην αρχή κάθε πειράματος, καταγραφόταν η δραστηριότητα από τις 2 περιοχές όταν (i) ήταν συνδεδεμένες (Intact), (ii) μετά από διατομή στις ίνες Schaffer (CA1 cut) και (iii) έπειτα από την πλήρη απομόνωσή τους με διατομή στο ύψος του παρα-υποθέματος (Mini slices). Τα δεδομένα για τις φυσιολογικές (N) τομές παρουσιάζονται στο γράφημα **A1** και για τις SE τομές στο **A2**. Το πλήθος των τομών σε κάθε στάδιο καταγραφής φαίνεται στην πρώτη στήλη του κάθε ζεύγους από κολώνες και είναι το ίδιο και για τις 2 κολώνες (CA3, mEC)-ταυτόχρονες καταγραφές. Η πρώτη κολώνα κάθε ζεύγους αντιστοιχεί στην CA3 και η δεύτερη στον mEC. Το στατιστικό αποτέλεσμα κάθε σύγκρισης φαίνεται στην χαμηλότερη στήλη του κάθε ζεύγους. Δεδομένα από paired καταγραφές που περιλαμβάνουν και τα 3 στάδια καταγραφής φαίνονται στα γραφήματα **B1** για τις N τομές (n=5 τομές) και **B2** για τις SE τομές (n=4 τομές).

Από την σύγκριση των γραφημάτων **33A1** και **33A2** φαίνονται μια τάση για μικρότερη διαφορά μεταξύ των 2 περιοχών (CA3 vs mEC) στις SE συγκριτικά με τις N τομές. Προκειμένου να διαπιστωθεί αν μεταβάλλεται η σχέση αυτή μεταξύ των 2 περιοχών μετά από SE, τα δεδομένα μετασχηματίστηκαν γραφικά και παρουσιάζονται στην **εικόνα 34A**. Οι συνεχείς γραμμές αναφέρονται σε N τομές ενώ οι διακεκομμένες, σε SE τομές. Σε κάθε περίπτωση οι γραμμές ενώνουν τις συχνότητες της CA3 με αυτές του mEC. Σε αυτά τα γραφήματα φαίνεται ότι η σχέση μεταξύ των 2 περιοχών, δηλαδή οι υψηλότερες συχνότητες της CA3 σε σχέση με αυτές του mEC δεν τροποποιούνται μετά από SE (2-way ANOVA, $p > 0.05$). Επίσης φαίνεται ότι κάθε περιοχή διατηρεί τη συχνότητά της όπως και πριν τις διαδοχικές διατομές. Αυτό σημαίνει ότι η CA3 και ο mEC διατηρούν τις διαφορετικές συχνότητές τους και μετά από SE και ότι επιπλέον αυτές δεν μεταβάλλονται σημαντικά με τις διαδοχικές διατομές (**εικόνα 34A**). Τα ίδια αποτελέσματα ίσχυαν και για τομές που ήταν διαθέσιμα και τα 3 στάδια καταγραφής (**εικόνα 34B**).



Εικόνα 34: Σύγκριση συχνοτήτων μεσοκριακών εκφορτίσεων μεταξύ της CA3 και του mEC μεταξύ N (συνεχής γραμμή) και SE τομών (διακεκομμένη γραμμή), σε κάθε στάδιο καταγραφής (Intact, CA1 cut, Mini). Τα δεδομένα στο **A** αντιστοιχούν στα δεδομένα των γραφημάτων 33A1, 33A2 και τα δεδομένα στο **B**, αντιστοιχούν στα δεδομένα των γραφημάτων 33B1, 33B2. Σε κάθε περίπτωση, δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των N και SE τομών (2-way ANOVA, $p > 0.05$). Το πλήθος (n) των τομών φαίνεται στο ένθετο κάθε γραφήματος.

Σύγκριση συχνότητων μεσοκρισικών εκφορτίσεων μεταξύ φυσιολογικών και SE τομών

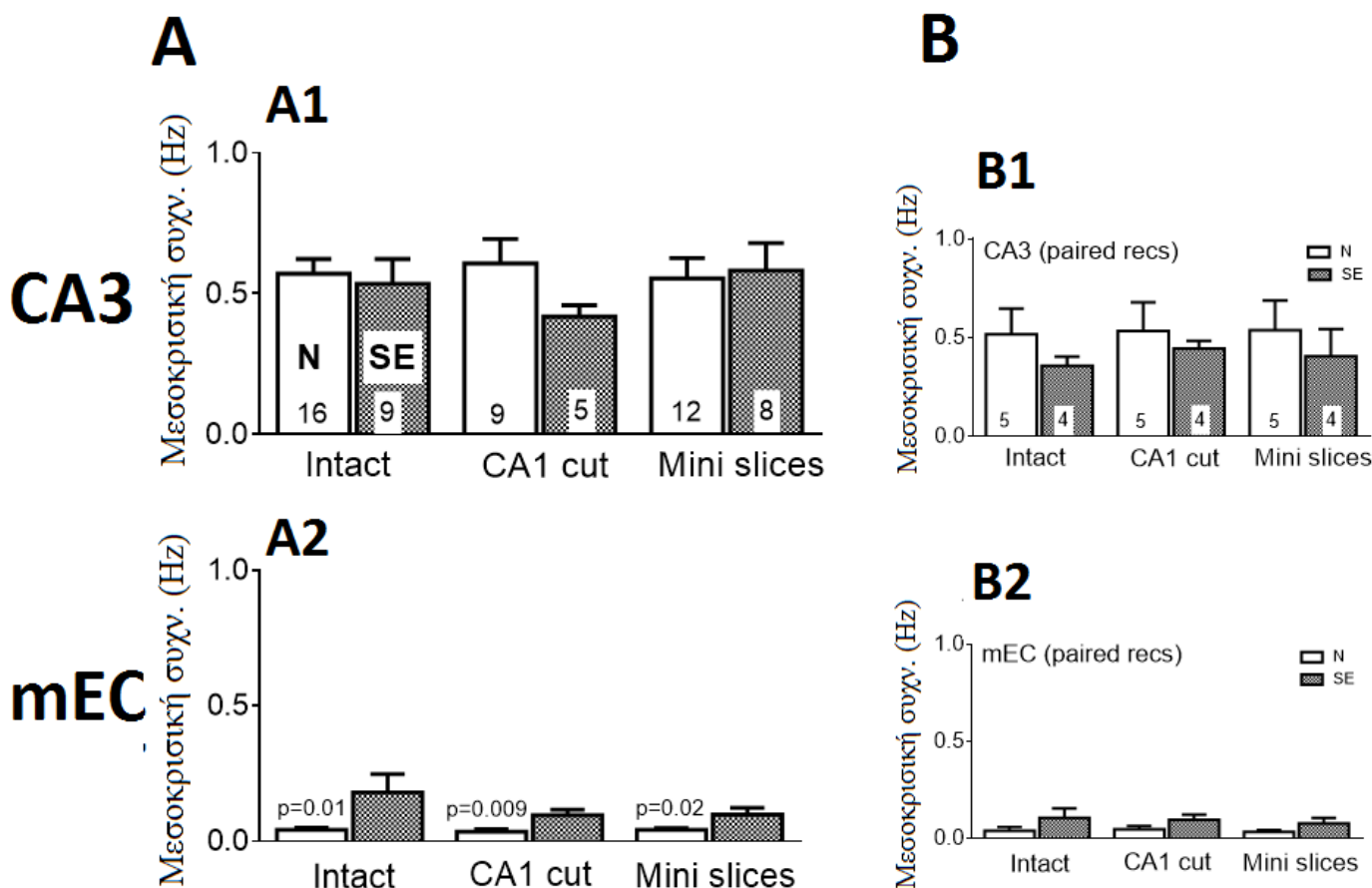
- **CA3 περιοχή**

Στις N τομές οι μεσοκρισικές συχνότητες στην CA3 δεν μεταβλήθηκαν μετά από τις διαδοχικές τομές στο παρασκεύασμα και ήταν ίδιες για κάθε στάδιο καταγραφής (Intact, CA1 cut, Mini slice). Επίσης η ίδια εικόνα ίσχυε και για τις SE τομές, στις οποίες δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή μετά από τις διαδοχικές τομές (υπήρχε ωστόσο, μια μικρή τάση για χαμηλότερες συχνότητες μετά τη διατομή στις ίνες Schaffer η οποία δεν επιβεβαιώθηκε στατιστικά). Οι συχνότητες της CA3 ήταν παρόμοιες μεταξύ N και SE τομών για κάθε στάδιο καταγραφής. Ωστόσο, παρατηρήθηκε μια τάση για μικρότερες συχνότητες των SE συγκριτικά με N τομών, μετά την διατομή στις ίνες Schaffer η οποία δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

- **mEC**

Στις N τομές οι μεσοκρισικές συχνότητες στον mEC δεν μεταβλήθηκαν μετά από τις διαδοχικές τομές στο παρασκεύασμα (Intact, CA1 cut, Mini slice). Παρόμοια εικόνα παρατηρήθηκε και για τις SE τομές, στις οποίες επίσης δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή μετά από τις διαδοχικές τομές. Οι συχνότητες του mEC ήταν σημαντικά υψηλότερες για στις SE σε σύγκριση με τις N τομές για κάθε στάδιο καταγραφής.

Οι ίδιες τάσεις παρατηρήθηκαν και σε καταγραφές όπου και τα 3 στάδια καταγραφής ήταν διαθέσιμα (**εικόνες 35B1, 35B2**).



Εικόνα 35: Σύγκριση συχνοτήτων μεσοκρισικών εκφορτίσεων μεταξύ φυσιολογικών (N) και SE τομών στην CA3 του υποκάμπου και στις βαθιές στοιβάδες του μέσου ενδορρινικού φλοιού (mEC). Μεσοκρισικές συχνότητες καταγραφόμενες ταυτόχρονα από το πυραμιδικό στρώμα της CA3 και τις βαθιές (V-VI) στοιβάδες του μέσου ενδορρινικού φλοιού (mEC) κατά τη διάρκεια συνεχούς διαβροχής με tENY που περιείχε 50 μM 4-AP. Στην αρχή κάθε πειράματος, καταγραφόταν η δραστηριότητα από τις 2 περιοχές όταν (i) ήταν συνδεδεμένες (Intact), (ii) μετά από διατομή στις ίνες Schaffer (CA1 cut) και (iii) έπειτα από την πλήρη απομόνωσή τους με διατομή στο ύψος του παρα-υποθέματος (Mini slices). Τα δεδομένα για την CA3 περιοχή φαίνονται στο γράφημα **A1** και για τον mEC στο γράφημα **A2**. Το πλήθος των τομών σε κάθε στάδιο καταγραφής φαίνεται στις κολώνες του διαγράμματος **A1** και είναι το ίδιο για τις αντίστοιχες τομές του διαγράμματος **A2** (συζευγμένες καταγραφές). **(B)** Δεδομένα από καταγραφές στις οποίες και τα 3 στάδια ήταν διαθέσιμα φαίνονται στα γραφήματα **B1** για την CA3 και **B2** για τον mEC, το πλήθος των τομών σε αυτήν την περίπτωση είναι n=5 N, n=4 SE τομές. Η πρώτη κολώνα κάθε ζεύγους αντιστοιχεί σε φυσιολογική τομή (N) και η δεύτερη σε SE τομή (SE). Το στατιστικό αποτέλεσμα κάθε σύγκρισης φαίνεται στην χαμηλότερη στήλη του κάθε ζεύγους.

ΥΨΙΣΥΧΝΕΣ ΤΑΛΑΝΤΩΣΕΙΣ (HFOs)

Σύγκριση του R, FR power μεταξύ φυσιολογικών και SE συνδυασμένων (Intact) τομών ανά περιοχή καταγραφής (CA3, mEC)

Μια γενικότερη παρατήρηση είναι ότι το R και FR power διέφερε βάσει της περιοχής καταγραφής (CA3, mEC). Ειδικότερα, ο mEC φαίνεται να υποστηρίζει χαμηλότερο power και για τις 2 συχνότητες (Rs και FRs) σε σύγκριση με την CA3 τόσο σε N όσο και σε SE τομές (βαθμονόμηση αξόνων της **εικόνας 36**). Στη συνέχεια θα συγκριθεί το R, FR power μεταξύ N και SE intact τομών ξεχωριστά για κάθε περιοχή.

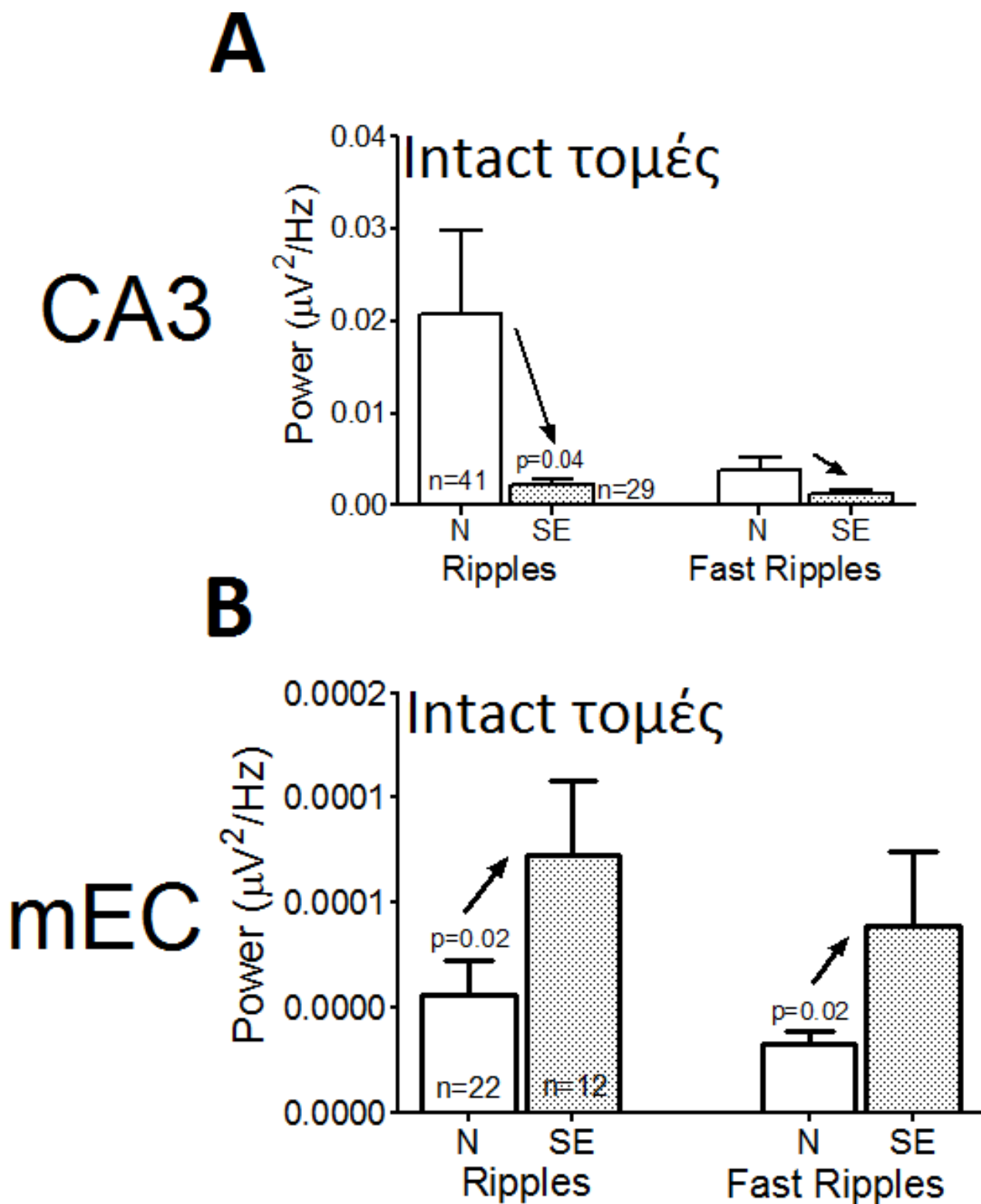
- **CA3**

Το R power ήταν σημαντικά υψηλότερο στις N σε σύγκριση με τις SE τομές. Η ίδια τάση παρατηρήθηκε και για το FR power, ωστόσο η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική (**εικόνα 36A**). Είναι ενδιαφέρον ότι και σε αυτήν την περίπτωση τομών, αλλαγές/διαφορές στη συχνότητα των μεσοκρισικών εκφορτίσεων δεν ακολουθούσαν απαραίτητα τις αλλαγές/διαφορές στις υψίσυχνες ταλαντώσεις. Για παράδειγμα: Πάρα τις παρόμοιες συχνότητες μεταξύ N και SE, το R και FR power ήταν σημαντικά χαμηλότερο στις SE συγκριτικά με τις N τομές.

- **mEC**

Σε αντίθεση με την CA3, στον mEC παρατηρήθηκαν υψηλότερα R και FR power στις SE τομές σε σχέση με τις N (**εικόνα 36B**). Στην περίπτωση του mEC οι υψηλότερες συχνότητες των SE τομών συγκριτικά με αυτές των N ακολουθούσαν τις διαφορές στις υψίσυχνες ταλαντώσεις όπου οι SE τομές είχαν υψηλότερα R και FR power σε σύγκριση με τις N τομές.

Συνεπώς, τα παραπάνω ευρήματα προτείνουν ότι οι υψίσυχνες ταλαντώσεις (Rs, FRs) αλλάζουν κατοπτρικά στις 2 περιοχές (CA3 vs mEC) μετά το SE.



Εικόνα 36: Σύγκριση του power των Rs και FRs μεταξύ φυσιολογικών και SE τομών στην CA3 περιοχή και τον mEC συνδυασμένων intact τομών. Οι συγκρίσεις του R, FR power μεταξύ N και SE τομών φαίνονται στα ζεύγη από τις κολώνες σε κάθε γραφήμα. Η πρώτη στήλη κάθε ζεύγους αφορά τις τομές N ενώ η δεύτερη τις τομές SE. **A:** R, FR power N και SE τομών στην CA3, **B:** R, FR power N και SE τομών στον mEC. Το πλήθος (n) των τομών φαίνεται στην βάση κάθε κολώνας και το στατιστικό αποτέλεσμα της κάθε σύγκρισης πάνω από την χαμηλότερη κολώνα του κάθε ζεύγους.

Σύγκριση του λόγου FR/R μεταξύ φυσιολογικών και SE συνδυασμένων (Intact) τομών ανά περιοχή καταγραφής (CA3, mEC)

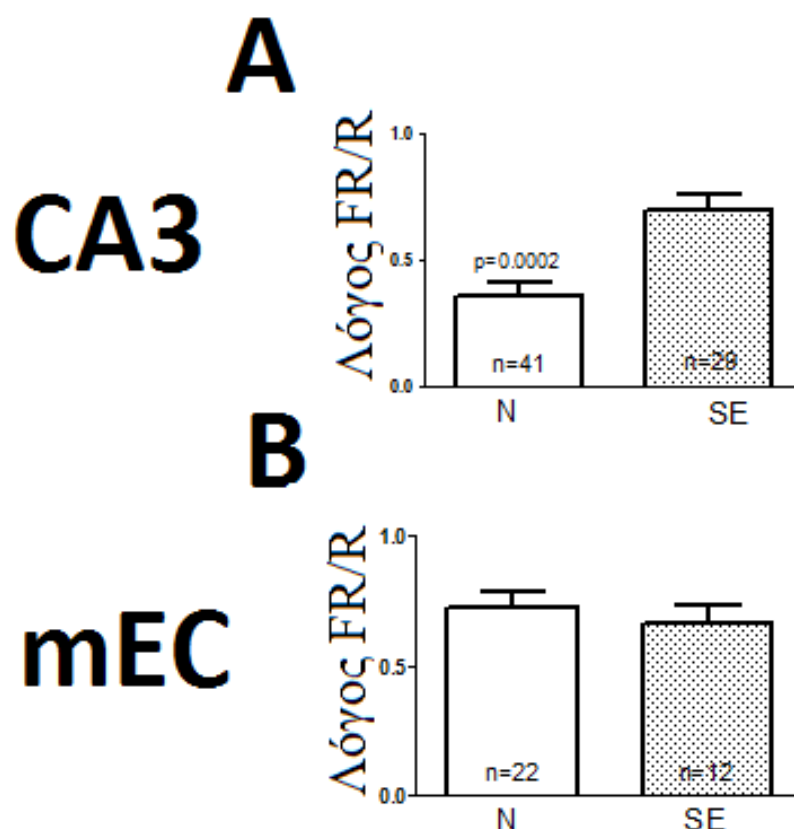
Ο υπολογισμός του λόγου FR/R για τις 2 περιοχές κι η σύγκριση αυτού μεταξύ N και SE τομών, έδειξε ενδιαφέροντα αποτελέσματα.

- **CA3**

Στην CA3 περιοχή ο λόγος FR/R ήταν υψηλότερος στις SE συγκριτικά με τις N τομές (εικόνα 37A). Είναι ενδιαφέρον ότι η σύγκριση των διαφορών αυτών με τις αντίστοιχες διαφορές στην συχνότητα φανερώνει ότι παρά την ίδια συχνότητα μεσοκριστικών εκφορτίσεων μεταξύ N και SE τομών, οι SE τομές χαρακτηρίζονταν από υψηλότερους FR/R λόγους.

- **mEC**

Στον mEC ο λόγος FR/R ήταν παρόμοιος μεταξύ N και SE τομών παρά τις υψηλότερες συχνότητες των SE σε σύγκριση με τις N τομές.



Εικόνα 37: Σύγκριση του λόγου FR/R μεταξύ N και SE τομών για κάθε περιοχή καταγραφής σε συνδυασμένες Intact τομές. Πιο συγκεκριμένα: A: μεταβολές του λόγου FR/R στην CA3 και B: μεταβολές του λόγου FR/R στον mEC. Το πλήθος των τομών φαίνεται στην βάση κάθε κολώνας και το στατιστικό αποτέλεσμα της κάθε σύγκρισης πάνω από την χαμηλότερη κολώνα του κάθε ζεύγους.

Επίδραση της πλήρους απομόνωσης των 2 περιοχών στο R, FR power

Παρατίθενται δεδομένα από συνδυασμένες τομές χωρίς διατομή των συνδέσεων μεταξύ CA3-mEC (Intact) και μετά από την διατομή αυτών (Mini). Οι τομές προέρχονται από φυσιολογικά (N) και SE πειραματόζωα. Οι καταγραφές και στις 2 περιπτώσεις ήταν ταυτόχρονες από την πυραμιδική στοιβάδα της CA3 και τις βαθιές στοιβάδες του mEC.

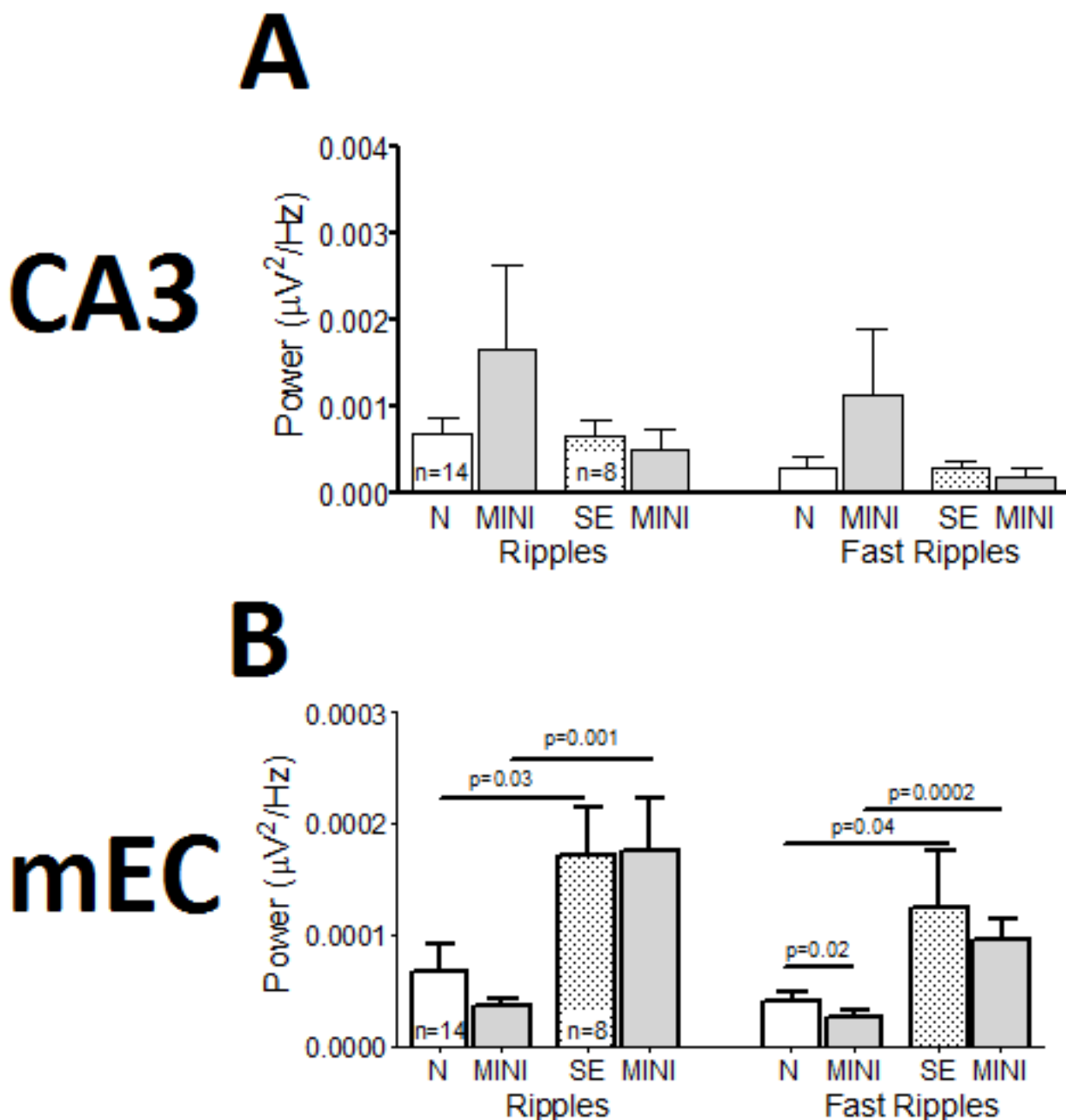
- **CA3**

Στις N τομές παρατηρήθηκε τάση για αύξηση του R και FR power στην CA3 μετά την απομόνωσή της από τον mEC (**εικόνα 38A**). Αντιθέτως, στις SE τομές φαίνεται μια τάση για μείωση του R και FR power μετά την πλήρη απομόνωση των 2 περιοχών. Είναι ενδιαφέρον ότι στην CA3 περιοχή των N τομών φαίνεται να υπάρχει μια τάση για αύξηση του R και FR power απουσία του mEC από το δίκτυο (μετάβαση από intact σε mini) η οποία δεν παρατηρείται μετά από SE.

- **mEC**

Στις N τομές παρατηρήθηκε τάση για μείωση του R και FR power στον mEC μετά την απομόνωσή του από την CA3 (**εικόνα 38B**). Αντιθέτως, στις SE τομές ο mEC διατήρησε τα ήδη υψηλά power, παρά τον αποχωρισμό του από τον έλεγχο της CA3. Είναι ενδιαφέρον ότι ο mEC μετά από SE χαρακτηριζόταν από υψηλότερα R και FR power (συγκριτικά με τις N τομές) ανεξάρτητα από τον έλεγχο ή όχι της CA3 (intact, mini).

Αξίζει να σημειωθεί πως οι αλλαγές μετά από SE ήταν προς την ίδια κατεύθυνση με τα δεδομένα της **εικόνας 36**: αυξήσεις των powers στον mEC (**εικόνα 36B**) και μειώσεις αυτών στην CA3 (**εικόνα 36A**). Συνεπώς, αναπαράγεται κι εδώ (αν και όχι με στατιστική σημαντικότητα στα δεδομένα της CA3) οι κατοπτρικές αλλαγές που συμβαίνουν στις 2 περιοχές μετά από SE.



Εικόνα 38: Επίδραση της πλήρους απομόνωσης των 2 περιοχών στο R, FR power. Παρατίθενται δεδομένα από συνδυασμένες τομές χωρίς διατομή των συνδέσεων μεταξύ CA3-mEC (Intact) και μετά από την διατομή αυτών (Mini) προερχόμενες από φυσιολογικά (N) και SE πειραματόζωα. Οι καταγραφές και στις 2 περιπτώσεις ήταν ταυτόχρονες από την πυραμιδική στοιβάδα της CA3 και τις βαθιές στοιβάδες του mEC. **(A)** R, FR power στην CA3 στην κατάσταση intact και μετά την πλήρη απομόνωση της από τον mEC. **(B)** R, FR power στον mEC σε κατάσταση intact και μετά την πλήρη απομόνωσή του από την CA3. Σε κάθε περίπτωση, το πλήθος των τομών φαίνεται στην βάση κάθε κολώνας. Η πρώτη κολώνα κάθε ζεύγους αφορά σε συνδυασμένες τομές χωρίς διατομή των συνδέσεων (intact), ενώ η δεύτερη κολώνα μετά τη διατομή αυτών (Mini). Το αποτέλεσμα κάθε στατιστικής σύγκρισης φαίνεται με γραμμές πάνω από τα ζεύγη που συγκρίνονται κάθε φορά.

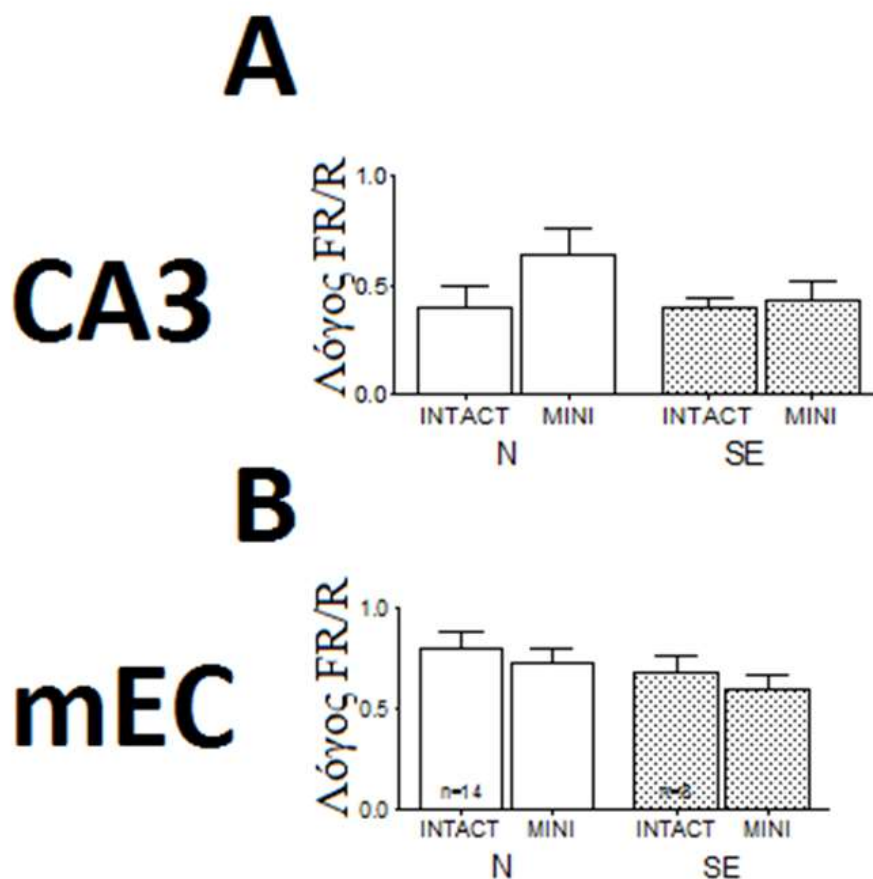
Επίδραση της πλήρους απομόνωσης των 2 περιοχών στον λόγο FR/R

- **CA3**

Στις N τομές, φαίνεται να υπάρχει μια τάση για αύξηση του λόγου FR/R μετά την απομόνωση από τον mEC (εικόνα 39A). Αντίθετα στις SE τομές δεν φαίνεται να ισχύει κάτι παρόμοιο.

- **mEC**

Στις N τομές οι λόγοι FR/R δεν φαίνεται να μεταβάλλονται σημαντικά μετά τον αποχωρισμό του mEC από την CA3 (εικόνα 39B). Η ίδια εικόνα παρατηρείται και στις SE τομές.



Εικόνα 39: Μεταβολή του λόγου FR/R στην CA3 και στον mEC μετά την πλήρη απομόνωσή τους.

Παρατίθενται δεδομένα από συνδυασμένες τομές χωρίς διατομή των συνδέσεων μεταξύ CA3-mEC (Intact) και μετά από την διατομή αυτών (Mini) προερχόμενες από φυσιολογικά (N) και SE πειραματόζωα. Οι καταγραφές και στις 2 περιπτώσεις ήταν ταυτόχρονες από την πυραμιδική στοιβάδα της CA3 και τις βαθιές στοιβάδες του mEC. Τα δεδομένα για την CA3 παρουσιάζονται στο γράφημα A ενώ για τον mEC στο γράφημα B. Το πλήθος των τομών φαίνεται γράφημα B και είναι το ίδιο και για το A. Η πρώτη κολώνα κάθε ζεύγους αφορά σε συνδυασμένες τομές χωρίς διατομή των συνδέσεων (intact), ενώ η δεύτερη κολώνα μετά τη διατομή αυτών (Mini).

Σχέση του λόγου FR/R στις 2 περιοχές και μεταβολή αυτής μετά την διακοπή των λειτουργικών συνδέσεων μεταξύ των 2 περιοχών

Ακολούθως, αναλύθηκε αν η διατομή των λειτουργικών συνδέσεων μεταξύ της CA3 και του mEC είχε κάποια επίδραση στη σχέση του λόγου FR/R μεταξύ των 2 περιοχών. Παρατίθενται δεδομένα από συνδυασμένες τομές χωρίς διατομή των συνδέσεων μεταξύ CA3-mEC (Connected areas) και μετά από την διατομή αυτών (Isolated areas). Οι τομές προέρχονται από φυσιολογικά (N) και SE πειραματόζωα. Οι καταγραφές και στις 2 περιπτώσεις ήταν ταυτόχρονες από την πυραμιδική στοιβάδα της CA3 και τις βαθιές στοιβάδες του mEC.

- **N τομές**

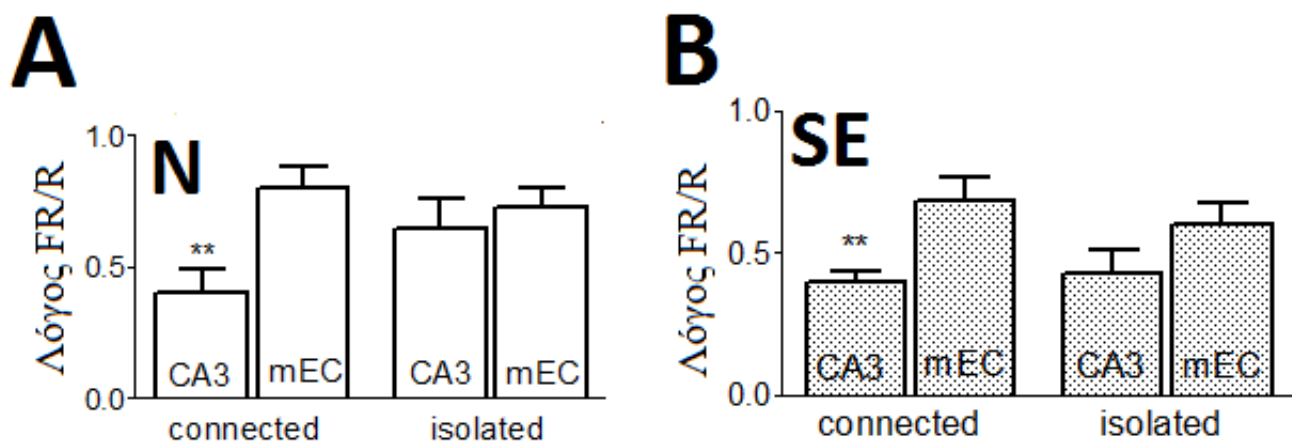
Σε φυσιολογικές τομές (**εικόνα 40A**) ο λόγος FR/R της CA3 ήταν μικρότερος από εκείνον του mEC ($p=0.0003$, unpaired Student's t test), μια διαφορά που δεν διατηρήθηκε μετά τον αποχωρισμό τους λόγω της αύξησης του λόγου στην CA3.

- **SE τομές**

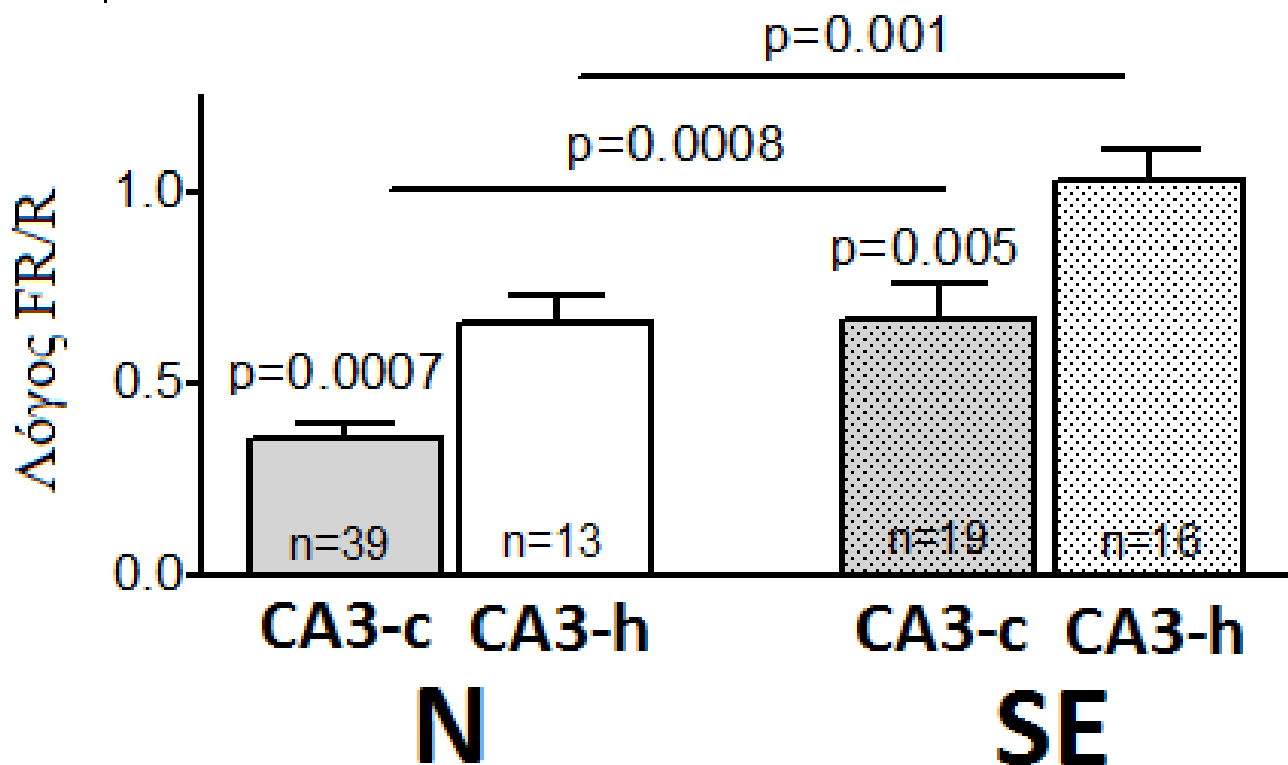
Η ίδια εικόνα όπως και στις N τομές παρατηρήθηκε και στις SE τομές (**εικόνα 40B**) με τον mEC να διατηρεί σημαντικά υψηλότερους FR/R λόγους από την CA3 ($p=0.009$, unpaired Student's t test) μια σχέση που δεν παρατηρείται μετά τον αποχωρισμό των 2 περιοχών.

Ως γενικότερη παρατήρηση, ο λόγος FR/R φαίνεται να τροποποιείται με διατομή των λειτουργικών συνδέσεων μεταξύ των 2 περιοχών. Ειδικότερα, φαίνεται να υπάρχει μια τάση για αύξηση του λόγου στην CA3 μετά την απομόνωσή της από τον mEC. Αντίθετα στον mEC δεν φαίνεται να επηρεάζεται ο λόγος FR/R μετά την απομόνωσή του από την CA3.

Μια σχετική παρατήρηση είναι η παρακάτω. Μετρήθηκε ο λόγος FR/R στην CA3 περιοχή συνδυασμένων τομών (CA3-c) και τομών ιπποκάμπου (CA3-h) (δηλαδή τομών που απουσιάζει ο mEC) και τα δεδομένα παρουσιάζονται στην **εικόνα 41**. Σε αυτά τα πειράματα φάνηκε ότι η CA3-c είχε σημαντικά χαμηλότερους FR/R λόγους σε σύγκριση με την CA3-h επιβεβαιώνοντας τα ευρήματα της απομόνωσης των 2 περιοχών που παρουσιάστηκαν στην **εικόνα 39A**. Αυτή η παρατήρηση ίσχυε και για N και για SE τομές. Παράλληλα, σε αυτά τα πειράματα διαπιστώθηκε επίσης και ο υψηλότερος FR/R λόγος της CA3 μετά από SE τόσο παρουσία (CA3-c) όσο και απουσία του mEC (CA3-h) στο δίκτυο.



Εικόνα 40: Σχέση του λόγου FR/R στις 2 περιοχές και μεταβολή αυτής μετά από απομόνωσή τους. Μεταβολές στη σχέση του λόγου FR/R μεταξύ των 2 περιοχών πριν (connected) μετά την πλήρη απομόνωσή τους (isolated) σε N (A) και SE (B) τομές. Η πρώτη κολώνα κάθε ζεύγους αφορά στην CA3 περιοχή, ενώ η δεύτερη κολώνα στον μέσο ενδορρινικό φλοιό (mEC). Το αποτέλεσμα κάθε στατιστικής σύγκρισης φαίνεται πάνω από την χαμηλότερη κολώνα κάθε ζεύγους. Το πλήθος των N τομών είναι n=14 ενώ των SE τομών n=8.

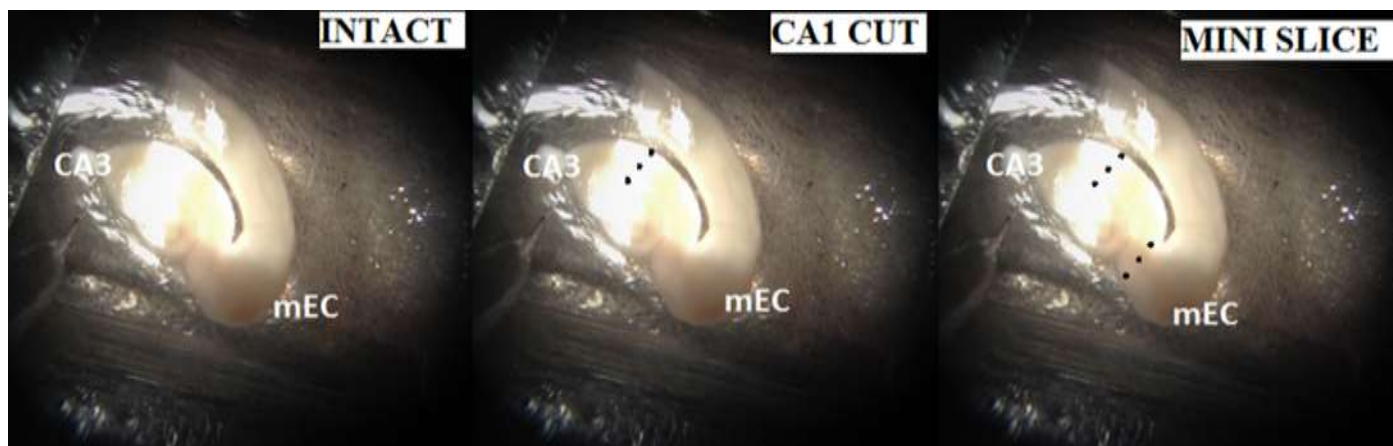


Εικόνα 41: Σύγκριση του λόγου FR/R μεταξύ της CA3 περιοχής συνδυασμένων τομών (CA3-c) και τομών ιπποκάμπου (CA3-h) προερχόμενων από φυσιολογικά (N) και SE πειραματόζωα. Η πρώτη κολώνα κάθε ζεύγους αφορά τιμές του λόγου FR/R από CA3-c τομές, ενώ η δεύτερη κολώνα αφορά τιμές του λόγου FR/R από τομές CA3-h (απουσία ενδορρινικού φλοιού). Το αποτέλεσμα κάθε στατιστικής σύγκρισης φαίνεται με γραμμές ή πάνω από την χαμηλότερη κολώνα κάθε ζεύγους, και το πλήθος των τομών στην βάση κάθε κολώνας.

3.3 ΜΕΛΕΤΗ 3

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΥ ΚΙ ΕΝΔΟΡΡΙΝΙΚΟΥ ΦΛΟΙΟΥ ΣΕ 2 ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΣΥΓΧΡΟΝΙΣΜΟΥ

Ταυτόχρονες εξωκυττάρειες ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές πραγματοποιήθηκαν από την πυραμιδική στοιβάδα της CA3 και τις βαθιές (V-VI) στοιβάδες του μέσου ενδορρινικού φλοιού κατά τη διάρκεια συνεχούς διαβροχής των τομών με tENY ελεύθερο-Mg²⁺ ή 50 μM 4-AP. Μεσοκριστικού τύπου επιληπτοειδής δραστηριότητα εμφανίστηκε και στις 2 περιοχές και η συχνότητά της αναλύεται παρακάτω. Στην αρχή κάθε πειράματος, καταγραφόταν η δραστηριότητα από τις 2 περιοχές όταν (i) ήταν συνδεδεμένες (Intact), (ii) μετά από διατομή στις ίνες Schaffer (CA1 cut) η οποία διέκοπτε την είσοδο της δραστηριότητας της CA3 στον ενδορρινικό φλοιό και (iii) έπειτα από την πλήρη απομόνωσή των 2 περιοχών με διατομή που πραγματοποιήθηκε στο ύψος του παρα-υποθέματος (Mini slices) (εικόνα 42). Παρατίθενται τα γραφήματα από το μοντέλο της 4-AP (μελέτη 2) για να γίνει η σύγκριση με τα αντίστοιχα γραφήματα στο ελεύθερο-Mg²⁺. Τα αποτελέσματα της 4-AP έχουν περιγραφεί αναλυτικά στην μελέτη 2, συνεπώς σε αυτήν την μελέτη αναλύονται τα δεδομένα στο ελεύθερο-Mg²⁺ και γίνεται παράλληλη σύγκριση αυτών με τα δεδομένα της 4-AP.



Εικόνα 42: Πρωτόκολλο ηλεκτροφυσιολογικών καταγραφών και χειρουργικών διατομών σε συνδυασμένες τομές ιπποκάμπου-ενδορρινικού φλοιού.

Σύγκριση συχνότητων μεσοκρισικών εκφορτίσεων μεταξύ της CA3 και του mEC στα 2 μοντέλα

Ελεύθερο-Mg²⁺

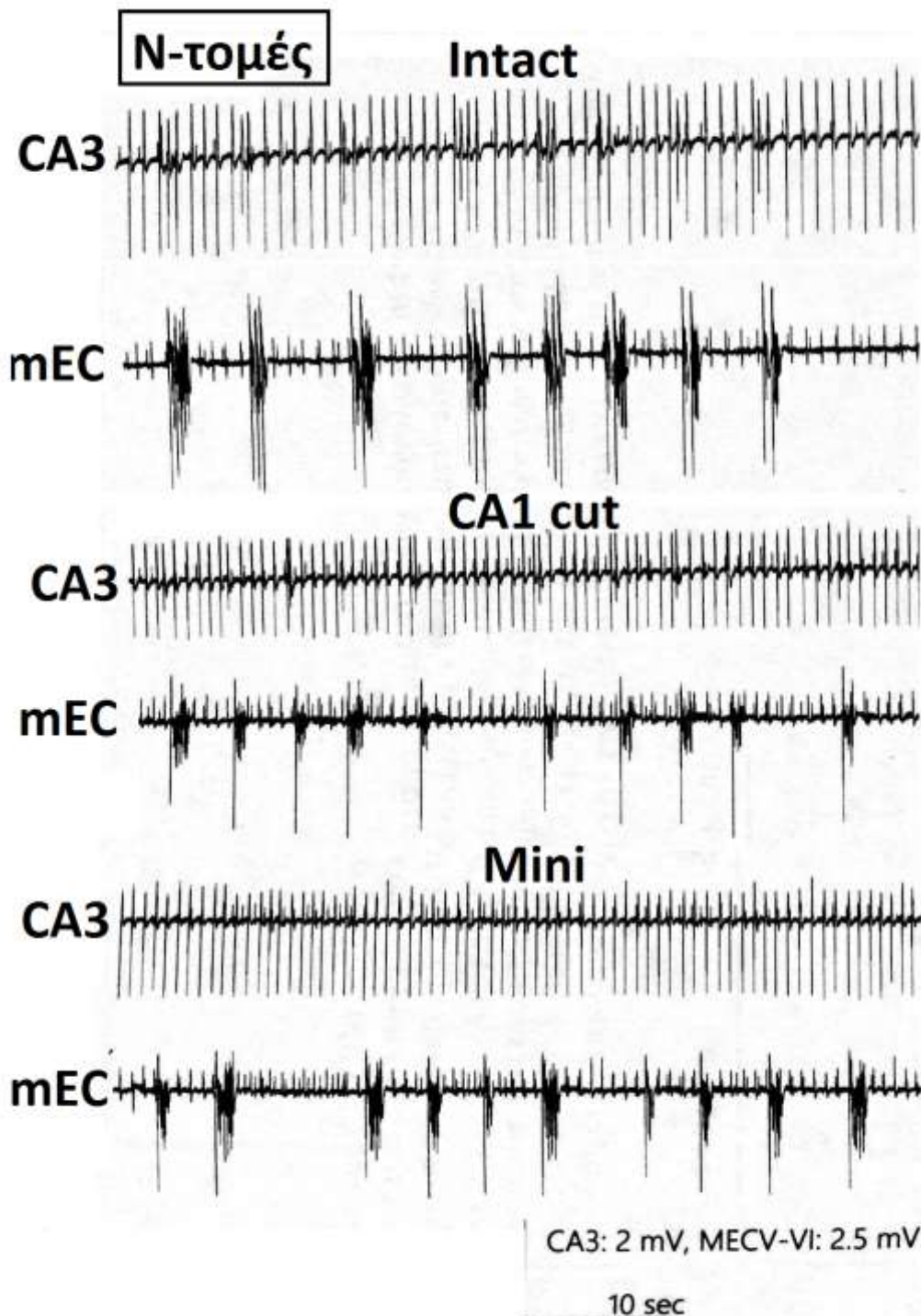
- **N τομές**

Στις N τομές οι μεσοκρισικές εκφορτίσεις ήταν συχνότερες στην CA3 περιοχή σε σύγκριση με τον mEC (εικόνα 43 και 45B1). Η διακοπή της εισόδου της δραστηριότητας της CA3 στον mEC, με διατομή που πραγματοποιήθηκε στις ίνες Schaffer (CA1 cut), δεν επηρέασε τις συχνότητες στις 2 περιοχές και συνεπώς δεν μετέβαλλε τη συσχέτισή τους. Η πλήρης απομόνωση των 2 περιοχών (Mini slices) που πραγματοποιήθηκε με διατομή στο ύψος του παρα-υποθέματος, δεν σημείωσε καμία επίδραση στις συχνότητες ούτε της CA3 αλλά ούτε και του mEC ώστε η διαφορά παρέμενε παρά τις διαδοχικές διατομές.

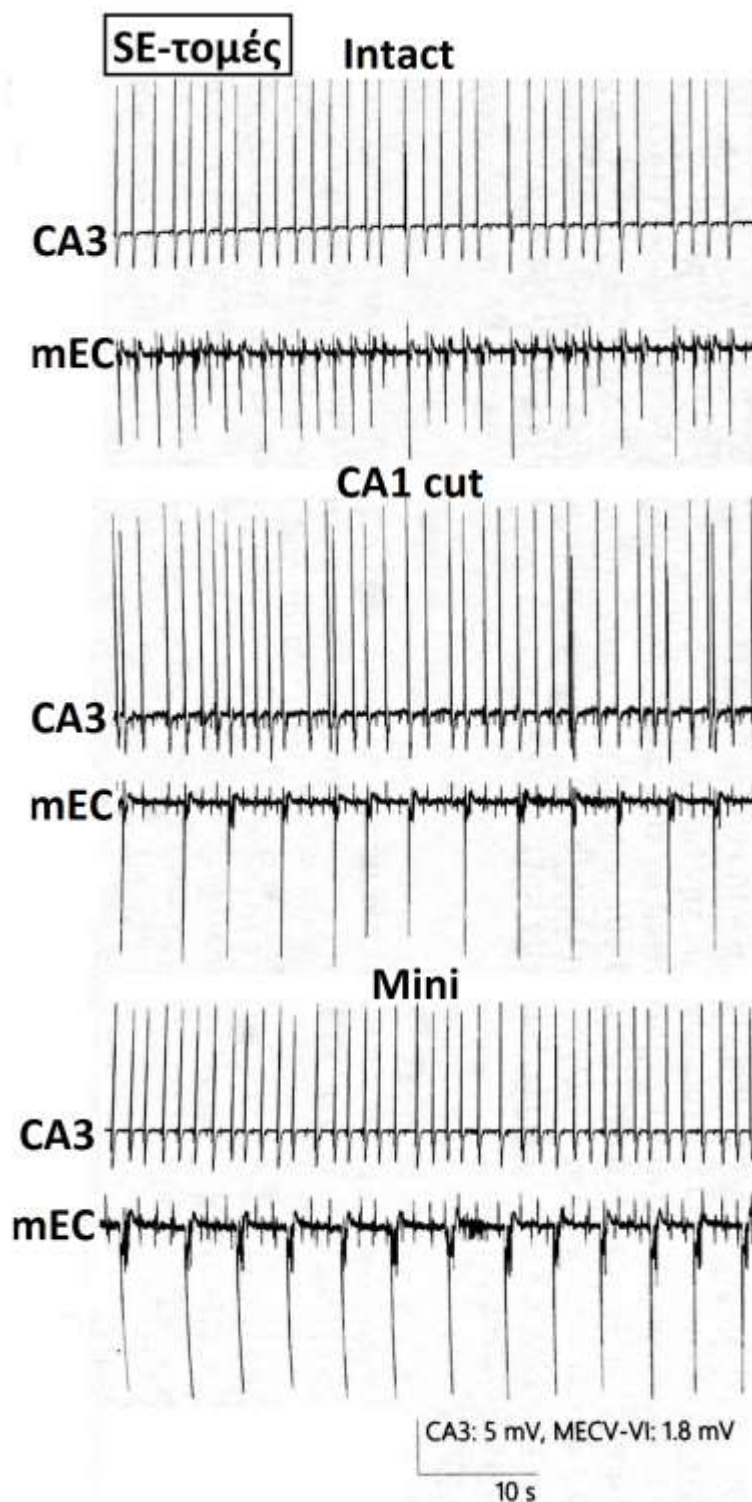
- **SE τομές**

Ωστόσο, στις SE τομές (εικόνα 44 και 45B2) οι συχνότητες μεταξύ των 2 περιοχών ήταν παρόμοιες για το πρώτο στάδιο της καταγραφής (Intact), αλλά όχι για κάθε επόμενο (CA1 cut, Mini) στα οποία η CA3 χαρακτηριζόταν από σημαντικά υψηλότερη μεσοκρισική δραστηριότητα σε σύγκριση με τον mEC.

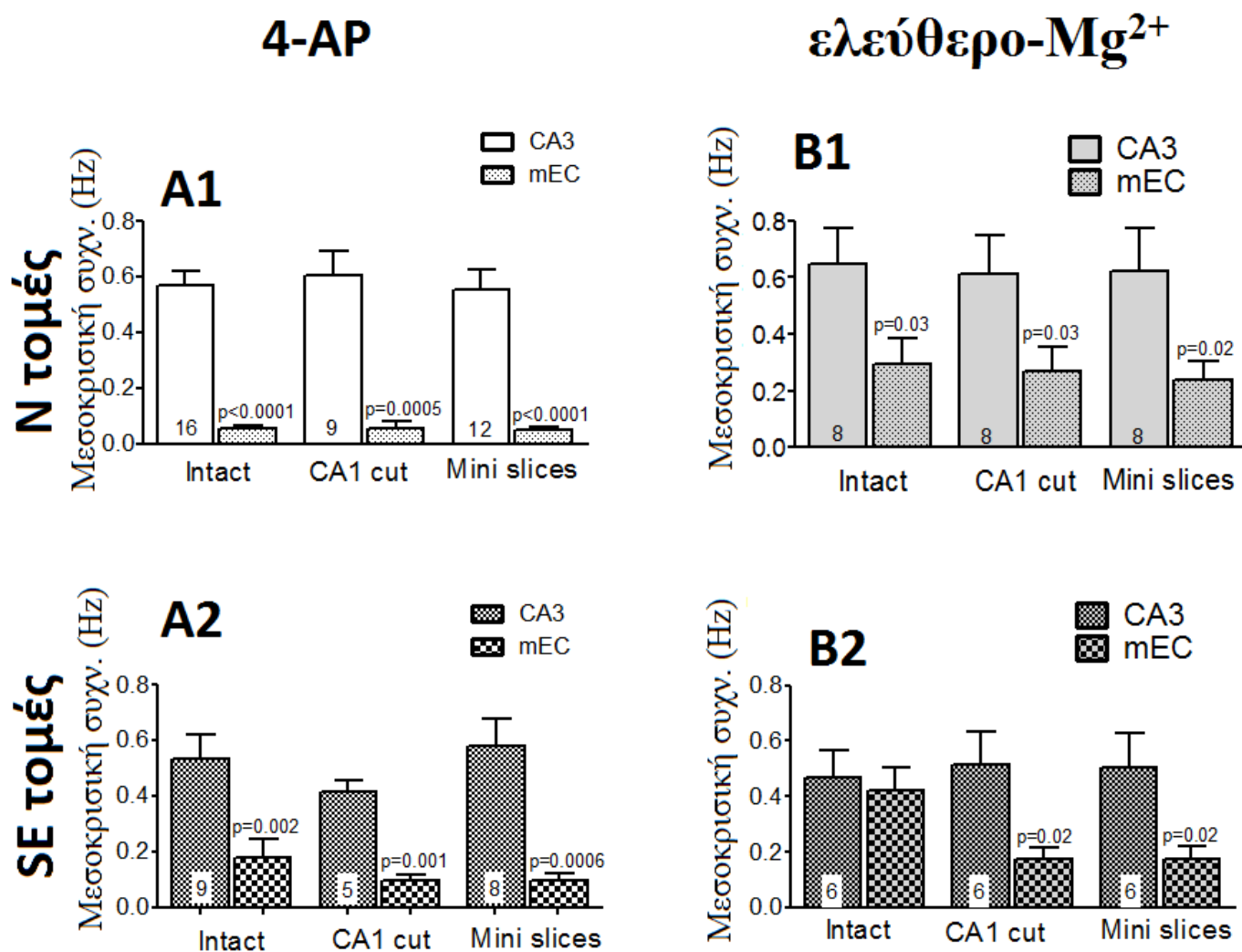
Συνεπώς, στις N τομές φαίνεται ότι η CA3 χαρακτηρίζεται από υψηλότερες συχνότητες σε σύγκριση με τον mEC, μια συσχέτιση που δεν μεταβαλλόταν με τις διαδοχικές διατομές και ήταν εμφανής τόσο στο μοντέλο ελεύθερο-Mg²⁺ όσο και στην 4-AP. Ωστόσο, στις SE-τομές υπήρχε μια τάση για μικρότερη διαφορά μεταξύ των συχνότητων των 2 περιοχών η οποία γινόταν φανερή στην intact κατάσταση στο ελεύθερο-Mg²⁺ όπου οι 2 περιοχές είχαν την ίδια συχνότητα.



Εικόνα 43: Συζευγμένες εξωκυττάρειες ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές από την πυραμιδική στοιβάδα της CA3 και τις βαθιές (V-VI) στοιβάδες του μέσου ενδορρινικού φλοιού (mEC) φυσιολογικών τομών κατά τη διάρκεια συνεχούς διαβροχής με τENY ελεύθερο- Mg^{2+} . Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά ίχνη για τις N τομές και για τις 2 περιοχές καταγραφής όταν αυτές ήταν συνδεδεμένες (Intact), (ii) μετά από διατομή στις ίνες Schaffer (CA1 cut) η οποία διέκοπτε την είσοδο της δραστηριότητας της CA3 στον ενδορρινικό φλοιό και (iii) έπειτα από την πλήρη απομόνωσή των 2 περιοχών με διατομή που πραγματοποιήθηκε στο ύψος του παρα-υποθέματος (Mini slices). Άξονες βαθμονόμησης: CA3: 2 mV, 10 s, mEC: 2.5 mV, 10 s



Εικόνα 44: Συζευγμένες εξωκυττάριας ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές από την πυραμιδική στοιβάδα της CA3 και τις βαθιές (V-VI) στοιβάδες του μέσου ενδορρινικού φλοιού (mEC) SE τομών κατά τη διάρκεια συνεχούς διαβροχής με τ ENY ελεύθερο- Mg^{2+} . Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά ίχνη για τις SE τομές και για τις 2 περιοχές καταγραφής όταν αυτές ήταν συνδεδεμένες (Intact), (ii) μετά από διατομή στις ίνες Schaffer (CA1 cut) η οποία διέκοπτε την είσοδο της δραστηριότητας της CA3 στον ενδορρινικό φλοιό και (iii) έπειτα από την πλήρη απομόνωσή των 2 περιοχών με διατομή που πραγματοποιήθηκε στο ύψος του παρα-υποθέματος (Mini slices). Άξονες βαθμονόμησης: CA3: 5 mV, 10 s, mEC: 1.8 mV, 10 s



Εικόνα 45: Σύγκριση συχνοτήτων μεσοκρισικών εκφορτίσεων μεταξύ της CA3 και των βαθών (V-VI) στοιβάδων του μέσου ενδορρινικού φλοιού (mEC). Μεσοκρισική δραστηριότητα κατεγράφη ταυτόχρονα από το πυραμιδικό στρώμα της CA3 και τις βαθιές (V-VI) στοιβάδες του μέσου ενδορρινικού φλοιού (mEC) κατά τη διάρκεια συνεχούς διαβροχής των τομών με tENY που περιείχε 50 μM 4-AP (αριστερή στήλη γραφημάτων) ή tENY άνευ-Mg²⁺ (δεξιά στήλη γραφημάτων). Στην αρχή κάθε πειράματος, καταγραφόταν η δραστηριότητα από τις 2 περιοχές όταν (i) ήταν συνδεδεμένες (Intact), (ii) μετά από τομή στις ίνες Schaffer (CA1 cut) και (iii) έπειτα από την πλήρη απομόνωσή τους, με τομή στο ύψος του παρα-υποθέματος (mini slices). Τα δεδομένα για τις φυσιολογικές (N) τομές στην 4-AP παρουσιάζονται στο γράφημα **A1** και για τις SE τομές στο **A2**. Τα δεδομένα για τις φυσιολογικές (N) τομές στο tENY άνευ-Mg²⁺ παρουσιάζονται στο γράφημα **B1** και για τις SE τομές στο **B2**. Το πλήθος των τομών σε κάθε στάδιο καταγραφής φαίνεται στην πρώτη στήλη του κάθε ζεύγους από κολώνες και είναι το ίδιο και για τις 2 κολώνες (CA3, mEC)-ταυτόχρονες καταγραφές. Η πρώτη κολώνα κάθε ζεύγους αντιστοιχεί στην CA3 και η δεύτερη στον mEC. Το στατιστικό αποτέλεσμα κάθε σύγκρισης φαίνεται στην χαμηλότερη στήλη του κάθε ζεύγους.

Σύγκριση συχνοτήτων μεσοκρισικών εκφορτίσεων μεταξύ φυσιολογικών και SE τομών, στα 2 μοντέλα

Ελεύθερο-Mg²⁺

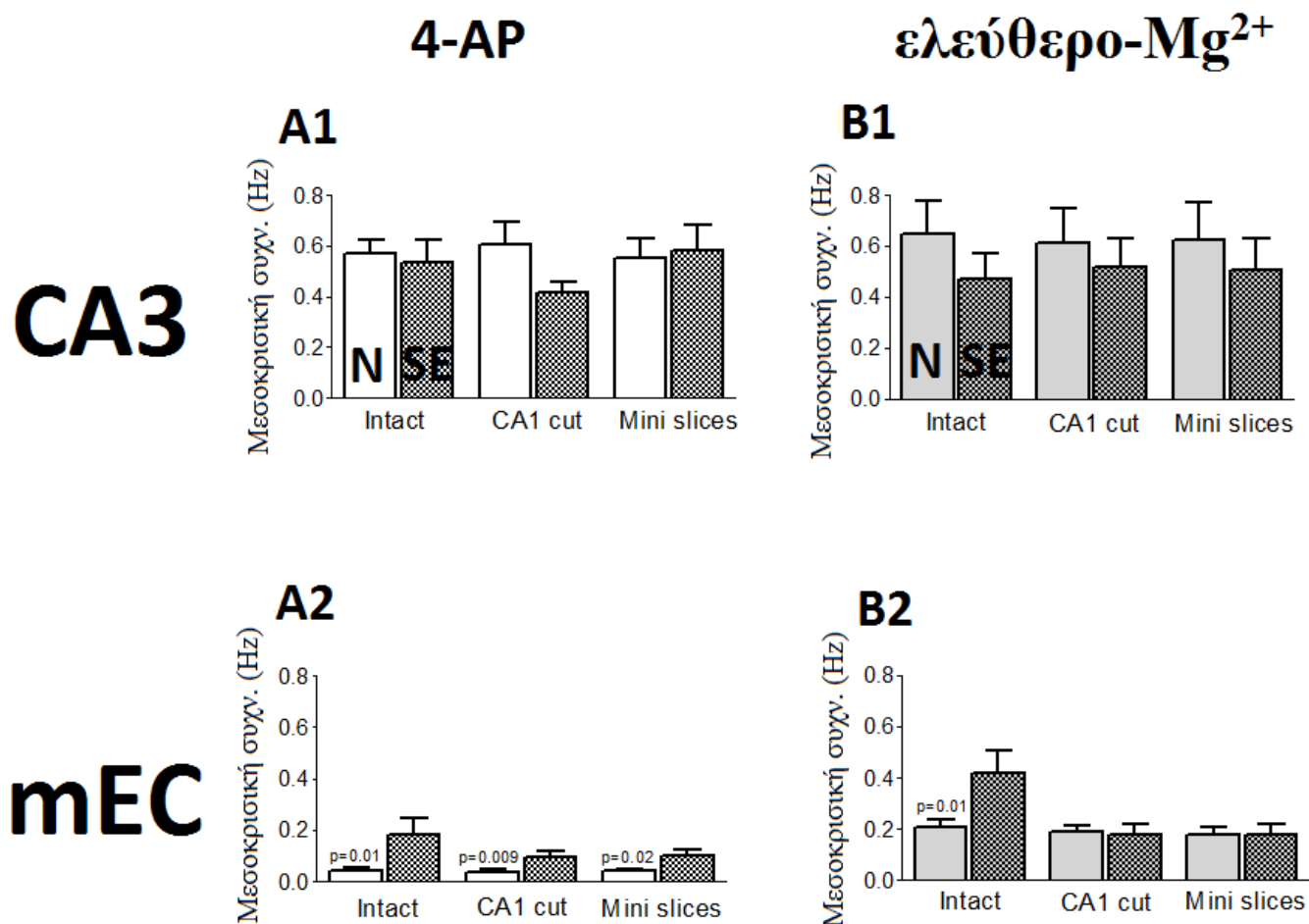
- **CA3 περιοχή**

Στις N τομές οι μεσοκρισικές συχνότητες στην CA3 δεν μεταβλήθηκαν μετά από τις διαδοχικές τομές στο παρασκεύασμα και συνεπώς ήταν ίδιες για κάθε στάδιο καταγραφής (Intact, CA1 cut, Mini slice). Επίσης η ίδια εικόνα ίσχυε και για τις SE τομές, στις οποίες δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή μετά από τις διαδοχικές τομές. Οι συχνότητες της CA3 ήταν παρόμοιες μεταξύ N και SE τομών (**εικόνα 46A2**) για κάθε στάδιο καταγραφής (υπήρχε βέβαια μια τάση για χαμηλότερες συχνότητες στις SE τομές vs N, η οποία δεν επιβεβαιώθηκε στατιστικά).

- **mEC**

Στις N τομές οι μεσοκρισικές συχνότητες στον mEC δεν μεταβλήθηκαν μετά από τις διαδοχικές τομές στο παρασκεύασμα (Intact, CA1 cut, Mini slice). Ο mEC μετά από SE, είχε υψηλότερες συχνότητες μόνο στο πρώτο στάδιο καταγραφής (Intact) αλλά παρόμοιες για κάθε επόμενο (CA1 cut, Mini) (**εικόνα 46B2**). Παρόμοια εικόνα ίσχυε και για τις SE τομές, στις οποίες δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή μετά από τις διαδοχικές τομές. Οι συχνότητες του mEC ήταν σημαντικά υψηλότερες στις SE σε σύγκριση με τις N τομές για κάθε στάδιο καταγραφής.

Είναι ενδιαφέρον ότι οι αυξήσεις που παρατηρήθηκαν μετά από SE και στα 2 μοντέλα συγχρονισμού αφορούσαν πάντοτε τον mEC (**εικόνες 46A2, 46B2**) και σπανίως την CA3 (**εικόνες 46A1, 46B1**). Φαίνεται λοιπόν πως το SE επιδρά διαφορετικά στις 2 περιοχές: αυξάνοντας τη διεγερσιμότητα του mEC και διατηρώντας στα ίδια σχεδόν επίπεδα (ή και μειώνοντας) τη δραστηριότητα της CA3.



Εικόνα 46: Σύγκριση συχνοτήτων μεσοκρικών εκφορτίσεων μεταξύ φυσιολογικών και SE τομών στα 2 μοντέλα. Μεσοκρική δραστηριότητα κατεγράφη ταυτόχρονα από το πυραμιδικό στρώμα της CA3 και τις βαθιές (V-VI) στοιβάδες του μέσου ενδορρινικού φλοιού (mEC) κατά τη διάρκεια συνεχούς διαβροχής με τΕΝΥ που περιείχε 50 μM 4-AP (αριστερή στήλη γραφημάτων) ή τΕΝΥ ελεύθερο-Mg²⁺ (δεξιά στήλη γραφημάτων). Στην αρχή κάθε πειράματος, καταγραφόταν η δραστηριότητα από τις 2 περιοχές όταν (i) ήταν συνδεδεμένες (Intact), (ii) μετά από τομή στις πλευρικές ίνες Schaffer (CA1 cut) και (iii) έπειτα από την πλήρη απομόνωσή τους, με τομή στο ύψος του παρα-υποθέματος (mini slices). Τα δεδομένα στο μοντέλο της 4-AP και για την CA3 περιοχή φαίνονται στο γράφημα **A1** και για τον mEC στο γράφημα **A2**. Τα δεδομένα στο μοντέλο ελεύθερο-Mg²⁺ και για την CA3 περιοχή φαίνονται στο γράφημα **B1** και για τον mEC στο γράφημα **B2**. Το πλήθος των τομών σε κάθε στάδιο καταγραφής είναι το ίδιο με την εικόνα 45. Η πρώτη κολώνα κάθε ζεύγους αντιστοιχεί στην σε φυσιολογική τομή (N) και η δεύτερη σε SE τομή (SE). Το στατιστικό αποτέλεσμα κάθε σύγκρισης φαίνεται στην χαμηλότερη κολώνα του κάθε ζεύγους.

Σύγκριση συχνότητων μεσοκρισικών εκφορτίσεων μεταξύ των 2 μοντέλων

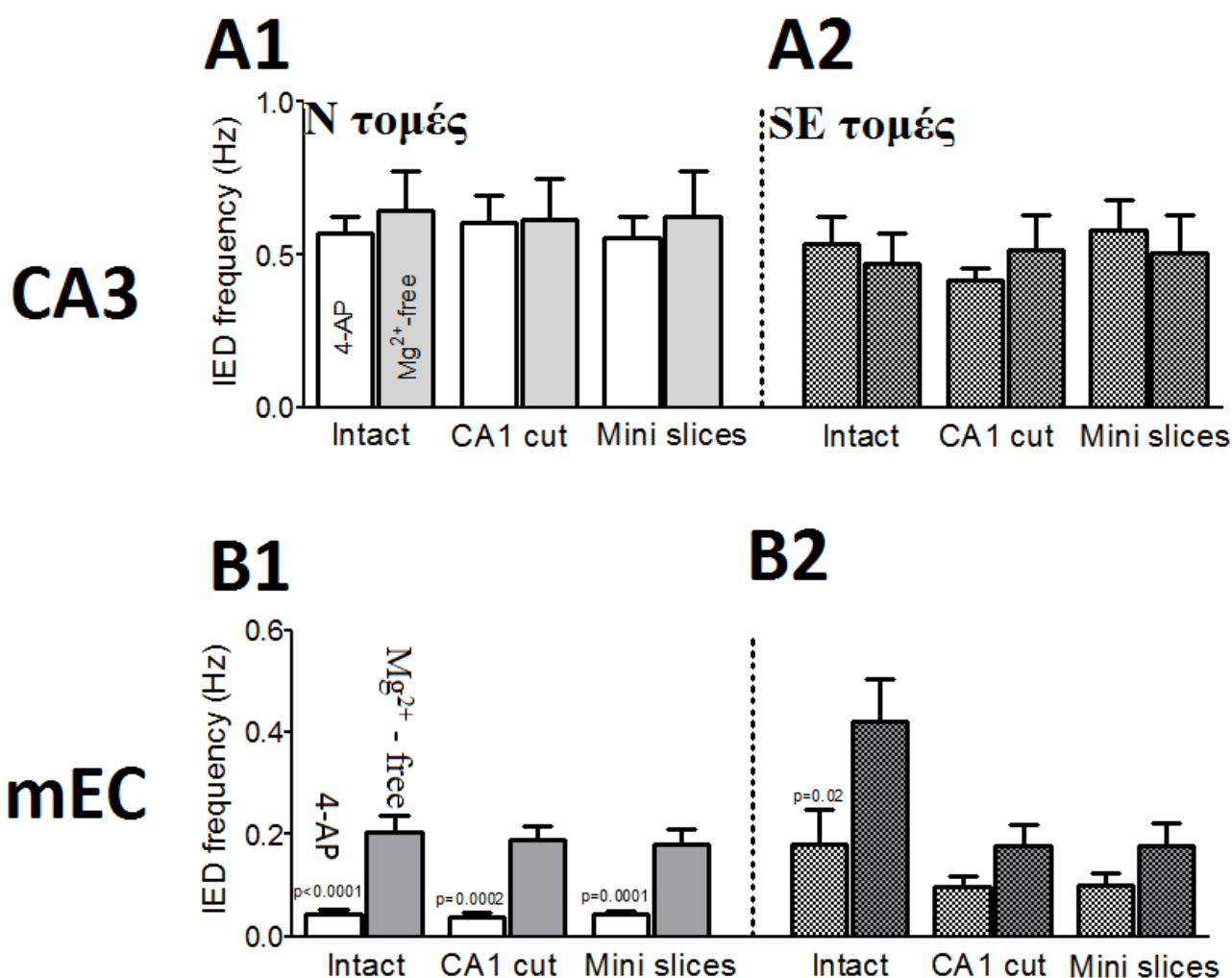
- **CA3**

Στην CA3 περιοχή, οι συχνότητες που κατεγράφησαν μεταξύ των 2 μοντέλων και σε ιδίου τύπου τομές (Intact, CA1 cut, Mini) ήταν παρόμοιες τόσο σε N (**εικόνα 47A1**) όσο και σε SE τομές (**εικόνα 47A2**).

- **mEC**

Αντίθετα στον mEC παρατηρήθηκε μοντελο-εξαρτώμενη απόκριση. Στις φυσιολογικές τομές (**εικόνα 47B1**), οι μεσοκρισικές εκφορτίσεις ήταν συχνότερες στο μοντέλο ελεύθερο-Mg²⁺ συγκριτικά με την 4-AP. Οι διαδοχικές τομές που πραγματοποιήθηκαν (Intact, CA1 cut, Mini) δεν μετέβαλλαν αυτή τη συσχέτιση. Στις SE τομές παρατηρήθηκαν επίσης υψηλότερες συχνότητες στο ελεύθερο-Mg²⁺ (**εικόνα 47B2**) συγκριτικά με την 4-AP για την πρώτη κατάσταση καταγραφής (Intact) αλλά και στις 2 επόμενες (CA1 cut, Mini) στις οποίες όμως η τάση αυτή δεν επιβεβαιώθηκε στατιστικά.

Είναι ενδιαφέρον ότι η χρήση 2 διαφορετικών *in vitro* μοντέλων συγχρονισμού έδειξε διαφορές στον mEC αλλά όχι στην CA3. Ειδικότερα, διαπιστώθηκε μια τάση του mEC για υψηλότερες συχνότητες μεσοκρισικών εκφορτίσεων υπό συνθήκες πλήρους ενεργοποίησης των NMDA υποδοχέων συγκριτικά με το μπλοκάρισμα αγωγιμοτήτων K⁺ που προκαλεί η 4-AP.



Εικόνα 47: Σύγκριση συχνοτήτων μεσοκρειακών εκφορτίσεων σε ίδιου τύπου τομές μεταξύ των 2 μοντέλων. Μεσοκρειακή δραστηριότητα κατεγράφη ταυτόχρονα από το πυραμιδικό στρώμα της CA3 και τις βαθιές (V-VI) στοιβάδες του μέσου ενδορρινικού φλοιού (mEC) κατά τη διάρκεια συνεχούς διαβροχής των τομών με tENY που περιείχε 50 μ M 4-AP ή tENY ελεύθερο-Mg²⁺. Στην αρχή κάθε πειράματος, καταγραφόταν η δραστηριότητα από τις 2 περιοχές όταν (i) ήταν συνδεδεμένες (Intact), (ii) μετά από τομή στις ίνες Schaffer (CA1 cut) και (iii) έπειτα από την πλήρη απομόνωσή τους, με τομή στο ύψος του παραυποθέματος (mini slices). Τα δεδομένα για τις φυσιολογικές (N) τομές παρουσιάζονται στα αριστερά γραφήματα ενώ για τις SE τομές στα δεξιά γραφήματα. Τα δεδομένα για την CA3 περιοχή των φυσιολογικών τομών (N) παρουσιάζονται στο γράφημα **A1** και των SE τομών στο γράφημα **A2**. Αντιστοίχως και για τα δεδομένα του ενδορρινικού φλοιού (γραφήματα **B1**, **B2**). Το πλήθος των τομών σε κάθε στάδιο καταγραφής είναι το ίδιο με την εικόνα 45. Η πρώτη κολώνα κάθε ζεύγους αντιστοιχεί σε δεδομένα από το tENY που περιείχε 50 μ M 4-AP και η δεύτερη αντιστοιχεί στο μοντέλο ελεύθερο-Mg²⁺. Το στατιστικό αποτέλεσμα κάθε σύγκρισης φαίνεται στην χαμηλότερη στήλη του κάθε ζεύγους.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1 ΜΕΛΕΤΗ 1

ΚΡΟΤΑΦΟ-ΔΙΑΦΡΑΓΜΑΤΙΚΗ ΔΙΕΓΕΡΣΙΜΟΤΗΤΑ ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ STATUS EPILEPTICUS: ΧΟΛΙΝΕΡΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΗ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΜΕΣΟΚΡΙΣΙΚΩΝ ΕΚΦΟΡΤΙΣΕΩΝ ΚΑΙ ΤΙΣ ΥΨΙΣΥΧΝΕΣ ΤΑΛΑΝΤΩΣΕΙΣ

Κύρια ευρήματα

- Παρατεταμένο και γενικευμένο SE κατά την ανάπτυξη συνδέεται με μακροπρόθεσμες (πιθανά μόνιμες) αλλαγές στην απόκριση του ιπποκάμπου, ανιχνεύσιμες *in vitro*
- Περιγράψαμε ότι (i) διαφορετικά μοντέλα δίνουν διαφορετικά αποτελέσματα τόσο σε επίπεδο αργού κύματος όσο και σε επίπεδο HFOs και ότι (ii) η ανάλυση της συχνότητας μεσοκρισικών εκφορτίσεων σε διαφορετικά επίπεδα (αργού κύματος, HFOs Rs, FRs-) δίνει επιπλέον πληροφορίες
- Η κροταφο-διαφραγματική διεγερσιμότητα τροποποιείται με ιστορικό SE αλλά μέσω διαφορετικών μηχανισμών στα 2 άκρα του ιπποκάμπου.
- Στο κροταφικό άκρο μετά από SE φαίνεται να τροποποιείται περισσότερο ο HFO συγχρονισμός και λιγότερο η διευκολυντική δράση της ενδογενούς ακετυλοχολίνης, συνεπώς οι αλλαγές μετά από SE φαίνεται να εντοπίζονται σε δικτυακό επίπεδο
- Στο διαφραγματικό άκρο μετά από SE, φαίνεται να αυξάνει η ευαισθησία στην διευκολυντική δράση της ενδογενούς ακετυλοχολίνης στην συχνότητα των μεσοκρισικών εκφορτίσεων και πιθανότατα οι αλλαγές να εντοπίζονται σε συναπτικό επίπεδο
- Μια καθολική τροποποίηση σε όλο τον ιπποκάμπο αφορά την προσαρμοστική ενίσχυση αγωγιμοτήτων K^+ (ευαίσθητων στην 4-AP και την ACh)
- Δείξαμε ότι παρόμοια μακροσκοπικά κι ηλεκτροφυσιολογικά χαρακτηριστικά μεσοκρισικών εκφορτίσεων υποκρύπτουν διαφορετικά HFO χαρακτηριστικά σε συνάρτηση με την ανατομική προέλευση, το ιστορικό, το πειραματικό μοντέλο μελέτης και το «παράθυρο» συχνότητων των HFOs (Rs, FRs)

- **Μετά από SE αλλάζει κι η συχνότητα των μεσοκρυσικών εκφορτίσεων κι οι περιεχόμενες HFOs, οι αλλαγές όμως δεν είναι παράλληλες και δεν ακολουθούν ένα προβλέψιμο μοτίβο**
- **Η ακετυλοχολίνη ελέγχει τη δικτυακή διεγερσιμότητα σε επίπεδο αργού κύματος ομοιογενώς, αλλά επηρεάζει παραμέτρους του HFO συγχρονισμού συναρτήσει της ανατομικής προέλευσης κι του ιστορικού SE**
- **Ο FR/R λόγος αυξάνεται στον T-N ιππόκαμπο από χολινεργικά ενώ εμφανίζεται ήδη αυξημένος σε T-SE τομές**

Διαφορές στη συχνότητα μεσοκρισικών εκφορτίσεων φυσιολογικών και SE τομών

Οι φυσιολογικές τομές είχαν παρόμοιες συχνότητες στα 2 μοντέλα συγχρονισμού γεγονός που προτείνει ότι τα 2 μοντέλα επάγουν ισοδύναμα τον συγχρονισμό των νευρωνικών δικτύων στο συγκεκριμένο παρασκεύασμα. Αντιθέτως, οι SE τομές παρουσίασαν μοντελο-εξαρτώμενη απόκριση. Για τομές ίδιας ανατομικής προέλευσης, οι συχνότητες των SE τομών ήταν χαμηλότερες από αυτές των φυσιολογικών στο μοντέλο ελεύθερο-Mg²⁺ αλλά όχι στην 4-AP. Η συγκεκριμένη διαφοροποίηση πιθανότατα οφείλεται σε μια προσαρμοστική ενίσχυση υπερπολωτικών αγωγιμοτήτων K⁺ μετά από SE, ανιχνεύσιμη στο μοντέλο ελεύθερο-Mg²⁺ αλλά όχι στην 4-AP (η οποία είναι μπλόκερ αγωγιμοτήτων K⁺-κυρίως του ρεύματος I_A).

Η επίδραση των κρίσεων στις αγωγιμότητες K⁺ έχει μελετηθεί σε διαφορετικά πειραματικά μοντέλα, ηλικίες πειραματοζώων και χρονικά διαστήματα μετά από SE. Είναι ενδιαφέρον ότι έχουν αναφερθεί αυξήσεις των καναλιών K⁺ και ειδικότερα των υπομονάδων KCNQ2 -το μοριακό ανάλογο για το ρεύμα I_M (ευαίσθητο στην ακετυλοχολίνη)- σε πειραματόζωα με υποτροπιάζουσες κρίσεις, αλλά και μετά από kindling (Penschuck, Bastlund et al. 2005). Επίσης, μια προσαρμοστικά αυξημένη αγωγιμότητα K⁺ είναι πολύ πιθανό να συνδέεται με την προφανή αυξημένη χολινεργική διέγερση μετά από SE (Meilleur, Carmant et al. 2000, Meilleur, Aznavour et al. 2003) ή την ενισχυμένη δράση της μουσκαρινικής νευροδιαβίβασης μετά από κρίσεις. Σε υποστήριξη αυτού, το kindling προκαλεί πλαστικές αλλαγές στη μουσκαρινική νευροδιαβίβαση (Girgis 1981, Morimoto, Holmes et al. 1987, Cain, Desborough et al. 1988) συμπεριλαμβανομένης της αύξησης της έκφρασης των γονιδίων m1, m3 των μουσκαρινικών υποδοχέων (Mingo, Cottrell et al. 1998). Στο πλαίσιο αυτό, προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας συνέδεσαν ένα επεισόδιο SE κατά την ανάπτυξη με τη μακροπρόθεσμη αύξηση στη σύζευξη των G πρωτεϊνών των μουσκαρινικών υποδοχέων (Potier, Senecal et al. 2005) και τη χαμηλότερη ουδό για χολινεργικές κρίσεις (Kouis, Mikroulis et al. 2014).

Χολινεργικές δράσεις

Διαβροχή των τομών με εσερίνη (αντι-ακετυλοχολινεστεράση) και καρβαχόλη (μη-υδρολυόμενο ανάλογο της ακετυλοχολίνης) αύξησε τη συχνότητα των μεσοκρισικών εκφορτίσεων ενώ η διαβροχή με ατροπίνη (μουσκαρινικός ανταγωνιστής) τη μείωσε. Οι παραπάνω δράσεις (αυξήσεις, μειώσεις) παρατηρήθηκαν ανεξαρτήτως ανατομικής προέλευσης της τομής, ιστορικού SE ή πειραματικού μοντέλου μελέτης γεγονός που προτείνει ότι οι νευρο-τροποποιητικές δράσεις της ενδογενούς ακετυλοχολίνης στη μεσοκρισική συχνότητα είναι καθολικές (Mikroulis and Psarropoulou 2012). Αναμένεται βέβαια να είναι ακόμη πιο έντονες *in vivo* όπου η διαθεσιμότητα της ακετυλοχολίνης είναι ακόμη μεγαλύτερη συγκριτικά με το παρασκεύασμα που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη. Στις διεγερτικές αυτές δράσεις θα μπορούσε να

συμβάλλει επίσης κι η αυξημένη απελευθέρωση γλουταμικού από την ακετυλοχολίνη(Kozhemyakin, Rajasekaran et al. 2010).

Η εσερίνη (1 μM) διπλασίασε τη συχνότητα στις περισσότερες υποομάδες τομών κι η καρβαχόλη σε χαμηλές συγκεντρώσεις (1 μM) προκάλεσε σε πολλές των περιπτώσεων υψηλότερες συγκριτικά συχνότητες. Αυτές οι παρατηρήσεις προτείνουν πως η αυξημένη απελευθέρωση ακετυλοχολίνης όπως όταν αυτή συμβαίνει σε ένα πλήθος συμπεριφορικών ή παθοφυσιολογικών καταστάσεων συμπεριλαμβανομένων των κρίσεων, επηρεάζει σημαντικά τον συγχρονισμό των νευρωνικών δικτύων(Hillert, Imran et al. 2014).

Η δράση της καρβαχόλης και της εσερίνης ήταν παρόμοιες στην 4-AP η οποία αυξάνει την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστικών ουσιών (Perreault and Avoli 1991) ενώ αντίθετα στο μοντέλο ελεύθερο- Mg^{2+} η δράση της καρβαχόλης ήταν εντονότερη αυτής της εσερίνης. Ακόμη, οι δράσεις τους διέφεραν μεταξύ κροταφικού και διαφραγματικού άκρου του ιπποκάμπου και βάσει ιστορικού SE. Οι διαφορές στη δράση της εσερίνης και της καρβαχόλης ήταν πιο έντονες (μεγαλύτερες) στο κροταφικό φυσιολογικό άκρο και παρόμοιες στο διαφραγματικό SE άκρο. Αυτές οι παρατηρήσεις φανερώνουν μια διαφορά στους διαθέσιμους υποδοχείς και τους υποδοχείς που καταλαμβάνονται από τα ενδογενή επίπεδα (εσερίνη) στο κροταφικό φυσιολογικό άκρο, αλλά όχι στο διαφραγματικό SE άκρο. Ωστόσο, σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου (Meilleur, Aznavour et al. 2003, Potier, Senecal et al. 2005)δεν βρέθηκαν αλλαγές στην πυκνότητα των υποδοχέων ή στην διαθεσιμότητα της ακετυλοχολίνης μετά από SE (σε όλο τον εγκέφαλο), παρόλα αυτά όμως τοπικές αυξήσεις των επιπέδων της δεν μπορούν να αποκλειστούν.

Η χολινεργική διέγερση δεν επηρέασε τις υψηλότερες συχνότητες μεσοκρισικών εκφορτίσεων του κροταφικού συγκριτικά με του διαφραγματικού άκρου γεγονός που προτείνει ότι οι μηχανισμοί που υποστηρίζουν αυτή τη διαφοροποίηση είναι ανεξάρτητοι ή δεν επηρεάζονται από χολινεργικούς μηχανισμούς. Είναι ενδιαφέρον ότι η διαφορά μεταξύ φυσιολογικών και SE τομών στο μοντέλο ελεύθερο- Mg^{2+} δεν παρατηρείται παρουσία χολινεργικών αγωνιστών (εσερίνη, καρβαχόλη). Αυτές οι παρατηρήσεις υποστηρίζουν την προσαρμοστικά αυξημένη αγωγιμότητα K^+ και παράλληλα φανερώνουν την ευαισθησία αυτής στην ακετυλοχολίνη.

Σε αυτό το πλαίσιο οι νικοτινικές δράσεις δεν συζητούνται καθώς σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου (Psarropoulou, Beaucher et al. 1998, Meilleur, Carmant et al. 2000, Mikroulis and Psarropoulou 2012)οι παρατηρούμενες χολινεργικές δράσεις ήταν πλήρως αναστρέψιμες παρουσία ατροπίνης (μουςκαρινικός ανταγωνιστής). Επίσης, σύμφωνα με προηγούμενα ευρήματα(Meilleur, Aznavour et al. 2003, Potier and Psarropoulou 2004) οι νικοτινικές δράσεις στην συχνότητα των μεσοκρισικών εκφορτίσεων αποδείχθηκαν αμελητέες στο συγκεκριμένο παρασκεύασμα.

Οι δράσεις της ατροπίνης στη συχνότητα (μειώσεις) προτείνουν ότι η ενδογενής ακετυλοχολίνη διευκολύνει τη μεσοκρισική δραστηριότητα ανεξάρτητα από τον μηχανισμό πρόκλησης των μεσοκρισικών εκφορτίσεων (ελεύθερο- Mg^{2+} , 4-AP). Επίσης, η δράση της να μειώνει τη συχνότητα απουσία χολινεργικών αγωνιστών φανερώνει (και διασφαλίζει) ότι στο συγκεκριμένο παρασκευασμά έχουν διατηρηθεί αρκετά χολινεργικά τερματικά αν αναλογιστούμε ότι η χολινεργική νεύρωση που δέχεται ο ιππόκαμπος είναι εξωτερική (διάμεσο διάφραγμα). Οι δράσεις της ατροπίνης ήταν εντονότερες στο μοντέλο της 4-AP συγκριτικά με το ελεύθερο- Mg^{2+} . Αυτά τα αποτελέσματα πιθανότατα να οφείλονται στην αυξημένη και μη-ειδική απελευθέρωση νευροδιαβιβαστικών ουσιών στην 4-AP (Perreault and Avoli 1991) σε συνάρτηση με τη συναγωνιστική φύση του αναστολέα αυτού. Τα αποτελέσματα της ατροπίνης μετά από SE, φανερώνουν ότι ευαισθησία του διαφραγματικού ιπποκάμπου στη διευκολυντική δράση της ενδογενούς ακετυλοχολίνης αυξάνει, μια τάση που είναι εμφανής και στα 2 μοντέλα συγχρονισμού. Η συγκεκριμένη παρατήρηση πιθανότατα να συνδέεται με τη μεγαλύτερη πυκνότητα μουσκαρινικών υποδοχέων στο άκρο αυτό (Ulas, Gradkowska et al. 1987, Joyce, Gibbs et al. 1989) η οποία ενισχύει το συνεργατικό αποτέλεσμα με τους NMDA υποδοχείς (Marino, Rouse et al. 1998) συμπεριλαμβανομένων των αλλαγών (διεγερτικών/προ-επιληπτικών) που υφίστανται οι τελευταίοι μετά από κρίσεις (Zhou, Sun et al. 2015). Ανεξαρτήτως μηχανισμών, οι μουσκαρινικές δράσεις φαίνεται να συνδράμουν στην κροταφο-διαφραγματική διεγερσιμότητα αλλά και σε τροποποιήσεις αυτής με ιστορικό SE (Isaeva, Romanov et al. 2015).

Υψίσυχνες ταλαντώσεις

Οι μεσοκρισικές εκφορτίσεις περιείχαν υψίσυχνες ταλαντώσεις στις συχνότητες Ripple και Fast Ripple όπως έχει αναφερθεί και σε άλλες μελέτες (Bragin, Engel et al. 1999, Bragin, Engel et al. 1999, Alvarado-Rojas, Huberfeld et al. 2015). Ωστόσο, ηλεκτροεγκεφαλογραφικά ευρήματα περιέγραψαν υψίσυχνα φαινόμενα πολλές φορές κι ανεξάρτητα μεσοκρισικών εκφορτίσεων (Jacobs, LeVan et al. 2008, Zijlmans, Jacobs et al. 2011). Αυτές οι διαφοροποιήσεις πιθανότατα να αφορούν σε υψίσυχνη δραστηριότητα που διαδίδεται από κοντινές περιοχές στην περιοχή καταγραφής.

Το power των Ripple ήταν σχεδόν διπλάσιο από αυτό των Fast Ripple γεγονός που φανερώνει τη μεγαλύτερη συνεισφορά τους στις μεσοκρισικές εκφορτίσεις (Jacobs, LeVan et al. 2008). Τα power των Ripple και Fast Ripple ήταν υψηλότερα στην 4-AP συγκριτικά με το μοντέλο ελεύθερο- Mg^{2+} , ακολουθώντας τις υψηλότερες συχνότητες μεσοκρισικών εκφορτίσεων στο μοντέλο αυτό. Παρόλα αυτά, σε πολλές περιπτώσεις, οι αλλαγές στο Ripple και Fast Ripple power δεν ακολουθούσαν αυτές της συχνότητας. Για παράδειγμα, στο μοντέλο ελεύθερο- Mg^{2+} οι συχνότητες μετά από SE ήταν χαμηλότερες (σε σχέση με τις φυσιολογικές) ανεξάρτητα από την ανατομική προέλευση της τομής (διαφραγματικές και κροταφικές). Ωστόσο, αλλαγές στα Ripple και Fast Ripple power μετά από SE, διαπιστώθηκαν μόνο στις κροταφικές τομές. Επίσης, παρά τις παρόμοιες

συχνότητες φυσιολογικών και SE τομών στην 4-AP (κροταφικών και διαφραγματικών) το Ripple power μειώθηκε μετά από SE μόνο στις κροταφικές τομές. Αυτές οι παρατηρήσεις προτείνουν ότι αλλαγές στη συχνότητα και στις υψίσυχνες ταλαντώσεις δεν συνδέονται κατά ένα προβλέψιμο τρόπο.

Ο λόγος FR/R έχει συσχετιστεί με παθολογοανατομικές αλλοιώσεις κι αυξημένες τιμές του συναντώνται κοντά σε επιληπτικές εστίες (Bragin, Wilson et al. 2002, Staba, Wilson et al. 2002, Staba, Frighetto et al. 2007). Οι λόγοι FR/R ήταν παρόμοιοι μεταξύ φυσιολογικού κροταφικού και διαφραγματικού ιπποκάμπου παρά τις διαφορές στις συχνότητες τους. Μετά από SE, η ισορροπία αυτή διαταράχθηκε με το κροταφικό-SE άκρο να χαρακτηρίζεται από τους υψηλότερους λόγους (στην 4-AP) σε σχέση με κάθε άλλη ομάδα τομών. Αυτές οι παρατηρήσεις προτείνουν ότι το κροταφικό SE άκρο σε συνθήκες μειωμένων αγωγιμοτήτων K^+ (4-AP), όπως για παράδειγμα κατά την απελευθέρωση ακετυλοχολίνης (μπλοκάρισμα ρεύματος I_M) είναι ικανό να διατηρήσει υψηλούς FR/R λόγους, γεγονός που ίσως να αυξάνει την πιθανότητα εκδήλωσης κρισικών (Ictal) φαινομένων στο άκρο αυτό. Σε πολλές περιπτώσεις οι αλλαγές στη μεσοκρισική συχνότητα δεν ακολουθούν τις αλλαγές στις υψίσυχνες ταλαντώσεις γεγονός που υποστηρίζει την υπόθεση ότι πρόκειται για ανεξάρτητα υπερσύγχρονα φαινόμενα παραγόμενα σε παρόμοια νευρωνικά δίκτυα (Jacobs, LeVan et al. 2008).

Οι παραπάνω διαφοροποιήσεις μεταξύ της συχνότητας των μεσοκρισικών εκφορτίσεων και των υψίσυχνων ταλαντώσεων πιθανότατα να συνδράμουν στην αποκάλυψη του ρόλου των μεσοκρισικών εκφορτίσεων στην πρόκληση ή αναστολή των κρίσεων (Barbarosie and Avoli 1997, Curtis, Tassi et al. 2005, Staley, Hellier et al. 2005, Spencer, Goncharova et al. 2008, Avoli, de Curtis et al. 2013). Τα μέχρι τώρα επιχειρήματα στηρίζονταν κυρίως στην συχνότητα των μεσοκρισικών εκφορτίσεων. Ένας ακόμη καθοριστικός παράγοντας ίσως να αποτελεί κι η σύσταση των μεσοκρισικών εκφορτίσεων σε υψίσυχνες ταλαντώσεις κι ιδιαίτερα στις συχνότητες Fast Ripple (Jacobs, Kobayashi et al. 2011). Ο συνδυασμός υψηλής συχνότητας μεσοκρισικών εκφορτίσεων αλλά κι η υψηλή σύσταση αυτών σε υψίσυχνες ταλαντώσεις ίσως συμβάλλει στην μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης κρισικών (Ictal) φαινομένων. Οι κροταφικές SE τομές (4-AP) είχαν τις υψηλότερες συχνότητες αλλά και τους υψηλότερους FR/R λόγους. Οι πρώιμες κρίσεις είναι πιθανό να αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης κρίσεων στο κροταφικό άκρο μέσω διατάραξης του HFO συγχρονισμού σε συνθήκες μειωμένων αγωγιμοτήτων K^+ (4-AP), όπως για παράδειγμα κατά την απελευθέρωση της ακετυλοχολίνης. Σε υποστήριξη αυτού, χρόνιες ηλεκτροεγκεφαλογραφικές καταγραφές από επιληπτικά πειραματόζωα που ενέθηκαν με πιλοκαρπίνη έδειξαν ότι ο κροταφικός ιππόκαμπος, μαζί με το κροταφικό υπόθεμα εμφάνιζαν την πιο πρώιμη κρισική δραστηριότητα (Toyoda, Bower et al. 2013). Παράλληλα, προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου έδειξαν ότι πειραματόζωα με ιστορικό SE επιδεικνύαν χαμηλότερη ουδό για χολινεργικές κρίσεις (πιλοκαρπίνη), σε σύγκριση με φυσιολογικά πειραματόζωα (Kouis, Mikroulis et al. 2014).

Χολινεργικές δράσεις στις υψίσυχνες ταλαντώσεις

Η καρβαχόλη κι η εσερίνη προκάλεσαν παρόμοιες δράσεις (παρακάτω θα αναφέρονται ως “χολινεργικές” δράσεις) στις υψίσυχνες ταλαντώσεις, με αποτέλεσμα οι δράσεις τους να ομαδοποιηθούν και να αναλυθούν στο μοντέλο της 4-AP όπου παρατηρήθηκαν παρόμοιες αλλαγές στη συχνότητα των μεσοκρισικών εκφορτίσεων. Τα χολινεργικά μείωσαν το power των συχνοτήτων R στο κροταφικό φυσιολογικό άκρο ενώ το αύξησαν στο διαφραγματικό. Αυτή η διαφοροποίηση δεν παρατηρήθηκε μετά από SE. Η ισορροπία διέγερσης-αναστολής διαφέρει στον κροταφο-διαφραγματικό άξονα (Paratheodoropoulos, Asproдини et al. 2002). Ειδικότερα, έχουν περιγράψει διαφορετικοί υπότυποι GABAεργικών υποδοχέων στα 2 άκρα του (Sotiriou, Paratheodoropoulos et al. 2005) αλλά και πιο αδύναμη αναστολή στο κροταφικό άκρο. Επίσης, υπάρχουν ανατομικές μελέτες που υποστηρίζουν ότι στο διαφραγματικό άκρο οι ανασταλτικοί νευρώνες φέρουν μουσκαρινικούς υποδοχείς (Van der Zee and Luiten 1993), γεγονός που ίσως να συνδέεται με την αύξηση του Ripple power στο άκρο αυτό. Κάτι ανάλογο δεν έχει περιγραφεί στο κροταφικό άκρο. Χολινεργική ενεργοποίηση φαίνεται να μειώνει το Ripple power (Norimoto, Mizunuma et al. 2012) στο άκρο του ιπποκάμπου με μειωμένο ανασταλτικό έλεγχο σε συνάρτηση με τον μειωμένο μουσκαρινικό έλεγχο των ανασταλτικών κυκλωμάτων στο άκρο αυτό. Μετά από SE, η διαφοροποίηση αυτή χάνεται με τις χολινεργικές δράσεις να είναι λιγότερο δραστικές στη μείωση του Ripple power στο κροταφικό άκρο. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με τη βιβλιογραφία και με στάδιο του ύπνου (REM) όπου αυξημένη απελευθέρωση ακετυλοχολίνης, εμφανίζει μειωμένη κατασταλτική επίδραση στις Ripple ταλαντώσεις κοντά σε επιληπτογόνες (Frauscher, von Ellenrieder et al. 2016, Sakuraba, Iwasaki et al. 2016) συγκριτικά με φυσιολογικές φλοιικές περιοχές. Επίσης η μείωση του Ripple power έχει παρατηρηθεί και σε επιληπτογόνες περιοχές με παρεμπόδιση φυσιολογικών ρυθμών που σχετίζονται με την μνήμη (Martin, Loring et al. 1988, Blake, Wroe et al. 2000). Τέλος, αυτή η διαφοροποίηση της χολινεργικής δράσης στις συχνότητες Ripple πιθανότατα να σχετίζεται και με την διαφορά στη συνδεσιμότητα των 2 άκρων με τον φλοιό και τη στενότερη σύνδεση του διαφραγματικού άκρου με γνωσιακές λειτουργίες.

Είναι ενδιαφέρον ότι τα χολινεργικά δεν σημείωσαν καμία δράση στις συχνότητες Fast Ripple. Ο λόγος FR/R αυξήθηκε μόνο στο κροταφικό φυσιολογικό άκρο, μια αλλαγή που συνδέεται με την μείωση του R power εκεί. Επίσης, είναι πιθανό ο FR/R λόγος στο κροταφικό SE άκρο να μην αυξήθηκε περαιτέρω καθώς ήταν ήδη υψηλός πριν την προσθήκη χολινεργικών ουσιών.

Όλα τα παραπάνω ευρήματα, υποστηρίζουν τον νευροτροποποιητικό ρόλο της ακετυλοχολίνης στις υψίσυχνες ταλαντώσεις βάσει της ανατομικής προέλευσης της τομής, του ιστορικού του πειραματοζώου και του «παράθυρου» συχνοτήτων των HFOs που μελετώνται κάθε φορά (Rs vs FRs). Αυτό το εύρημα έρχεται σε αντίθεση με τις ομοιογενείς αυξήσεις των χολινεργικών στη συχνότητα των μεσοκρισικών εκφορτίσεων

καθόλο το μήκος του ιπποκάμπου. Συνεπώς, οι χολινεργικές δράσεις θα ήταν σκόπιμο να συμπεριλαμβάνουν κι εξέταση των δράσεων στα HFOs εκτός των τροποποιήσεων στη συχνότητα των μεσοκρισικών εκφορτίσεων.

4.2 ΜΕΛΕΤΗ 2

ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΥ ΚΙ ΕΝΔΟΡΡΙΝΙΚΟΥ ΦΛΟΙΟΥ ΜΕΤΑ ΑΠΟ STATUS EPILEPTICUS: ΜΕΣΟΚΡΙΣΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΥΨΙΣΥΧΝΟΣ ΣΥΓΧΡΟΝΙΣΜΟΣ

Κύρια ευρήματα

- Ένα επεισόδιο SE κατά την ανάπτυξη συνδέεται με αυξημένες συχνότητες μεσοκρισικών εκφορτίσεων μόνο στον mEC
- Οι υψίσυχνες ταλαντώσεις αλλάζουν κατοπτρικά στις 2 περιοχές μετά από SE: αυξήσεις του R και FR power στον mEC και μειώσεις αυτών στην CA3
- Οι αυξήσεις της συχνότητα των μεσοκρισικών εκφορτίσεων και του power των υψίσυχνων ταλαντώσεων μετά από SE μόνο στον mEC, ενδέχεται να τον καθιστούν μια ανεξάρτητη επιληπτογόνο περιοχή μετά από SE
- Η έξοδος της CA3 σε υψίσυχνες ταλαντώσεις εμφανίζεται μειωμένη μετά από SE, χωρίς να μεταβάλλεται η συχνότητα των μεσοκρισικών εκφορτίσεων που παράγει σε κάθε περίπτωση (N, SE)

Σύγκριση συχνοτήτων μεσοκρισικών εκφορτίσεων μεταξύ φυσιολογικών και SE τομών στις 2 περιοχές

Πάρα την μεγάλη υπερδιεγερσιμότητα που χαρακτηρίζει τον επιληπτικό εγκέφαλο (Sloviter 1987, Esclapez, Hirsch et al. 1999, Kobayashi, Wen et al. 2003, de Guzman, Inaba et al. 2006, Kumar and Buckmaster 2006) υπάρχουν αρκετές μελέτες που προτείνουν ότι ο επιληπτικός ιστός *in vitro* χαρακτηρίζεται από παρόμοια (ή ακόμη και μειωμένη (Panuccio, D'Antuono et al. 2010)) συγχρονισμένη δραστηριότητα με αυτή του φυσιολογικού ιστού, υπό διαβροχή με tENY που περιέχει χημικά σπασμογόνα. Στα πειράματα της παρούσας μελέτης η CA3 περιοχή ακόμη και μετά από SE εμφανίσε παρόμοια συχνότητα μεσοκρισικών εκφορτίσεων με τις φυσιολογικές τομές. Αντίθετα, ο ενδορρινικός φλοιός εμφανίζεται πιο επιρρεπής στην δράση της 4-AP να παράγει ακόμα συχνότερες μεσοκρισικές εκφορτίσεις μετά από SE. Είναι γνωστό ότι η 4-AP σε χαμηλές συγκεντρώσεις μπλοκάρει ρεύματα K^+ άναμεσα στα οποία τα ρεύματα I_A ($Kv1.4$), I_D και I_M (Gustafsson, Galvan et al. 1982). Η εργασία των (Zahn, Tolner et al. 2008) αναφέρει πως η έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί για τα κανάλια $Kv1.4$ δεν μεταβάλλεται στο μοντέλο του καινικού. Τα κανάλια αυτά εντοπίζονται συχνότερα στα προσυναπτικά τερματικά των γλουταματεργικών νευρώνων (Geiger and Jonas 2000) και το μπλοκάρισμα αυτών από την 4-AP συνεπάγεται την παράταση του δυναμικού ενέργειας, την αυξημένη εισροή ασβεστίου και την επακόλουθη αύξηση της απελευθέρωσης γλουταμικού. Επίσης η απελευθέρωση του γλουταμικού μπορεί επίσης να αυξηθεί κι από την ακετυλοχολίνη απευθείας {Kozhemyakin, 2010 #66} (ακετυλοχολίνη ήδη αυξημένη λόγω της 4-AP). Πολλές από τις αλλαγές που συμβαίνουν μετά από κρίσεις αφορούν είτε σε προσαρμοστικές αλλαγές είτε σε αλλαγές που σχετίζονται με υπερδιεγερσιμότητα (προ-επιληπτικές). Είναι ενδιαφέρον ότι ειδικά στον ενδορρινικό φλοιό (Kobayashi, Wen et al. 2003, de Guzman, Inaba et al. 2006, Kumar and Buckmaster 2006), στο υπόθεμα (Knorr, Kivi et al. 2005) αλλά και στην αμυγδαλή (Benini and Avoli 2005) έχουν περιγραφεί αυξήσεις των υποδοχέων NMDA (Kobayashi, Wen et al. 2003) στο μοντέλο της πιλοκαρπίνης. Είναι λοιπόν πιθανό οι υψηλότερες συχνότητες που καταγράφονται στον ενδορρινικό μετά από SE να οφείλονται στην αυξημένη απελευθέρωση του γλουταμικού σε συνδυασμό με την αύξηση των υποδοχέων NMDA μετά από SE, ειδικά στον ενδορρινικό φλοιό (κατι ανάλογο δεν έχει περιγραφεί για την CA3). Μια ακόμη εργασία, υποστηρίζει και λειτουργική αύξηση των υποδοχέων NMDA σε φλοιικές περιοχές πειραματοζώων με αυθόρμητες κι υποτροπιάζουσες κρίσεις η οποία διευκολύνει την επανατροφοδοτική διέγερση και πρόκληση κρίσεων στο μοντέλο αυτό {Lozonaya, 2014 #287}.

Σύγκριση του power των υψίσυχνων ταλαντώσεων μεταξύ φυσιολογικών και SE τομών

- **CA3**

Είναι γνωστό ότι περιοχές του ιπποκάμπου και του σχηματισμού του όπως η περιοχή CA3, το υπόθεμα κι η οδοντωτή έλικα έχουν συνδεθεί με προστατευτικούς ή αποτρεπτικούς ρόλους στην πρόκληση ή μεταγωγή των κρίσεων αντίστοιχα. Ανάμεσα σε αυτές, ξεχωρίζει η θέση της οδοντωτής έλικας(de Guzman, Inaba et al. 2006) αλλά και της περιοχής CA3(Barbarosie and Avoli 1997, Avoli, D'Antuono et al. 2002). Η ρυθμικά επαναλαμβανόμενη δραστηριότητα της CA3 (0.5-1 Hz) μπορεί να θεωρηθεί κι αντιεπιληπτογόνος(Jensen and Yaari 1988, Barbarosie and Avoli 1997) ενώ έχει προταθεί ότι αυτή η ικανότητα εμφανίζεται μειωμένη σε μοντέλα πειραματοζώων με χρόνια επιληψία(Barbarosie and Avoli 1997, Avoli, D'Antuono et al. 2002). Ωστόσο, οι μελέτες αυτές εστίασαν μόνο στις συχνότητες των μεσοκρισικών γεγονότων κι όχι στην σύσταση αυτών σε υψίσυχνες ταλαντώσεις(Panuccio, D'Antuono et al. 2010). Στα πειράματα της παρούσας μελέτης και μετά από SE, η περιοχή CA3 εμφανίζει μειωμένη ικανότητα για την παραγωγή υψίσυχνων ταλαντώσεων (κυρίως για συχνότητες Ripples) με καμία μεταβολή της συχνότητας των μεσοκρισικών της εκφορτίσεων (φυσιολογικές vs SE τομές).

- **mEC**

Αντίθετα, ο ενδορρινικός φλοιός εμφανίζει μεγαλύτερη ικανότητα για την παραγωγή υψίσυχνων ταλαντώσεων μετά από SE. Τα δεδομένα αυτά προτείνουν ότι το ιστορικό SE δημιουργεί κατοπτρικές αλλαγές στις 2 περιοχές αναφορικά με τις υψίσυχνες ταλαντώσεις.

Πιο συγκεκριμένα, η έξοδος της CA3 σε υψίσυχνες ταλαντώσεις φαίνεται να μειώνεται μετά από SE. Αντίθετα, ο ενδορρινικός φλοιός φαίνεται να παράγει συχνότερες μεσοκρισικές εκφορτίσεις αποτελούμενες από υψίσυχνες ταλαντώσεις με μεγαλύτερα R και FR powers. Βάσει αυτών των παρατηρήσεων μετά από SE, ο ενδορρινικός φλοιός θα ήταν πιθανό να λειτουργήσει κι ως μια ανεξάρτητη επιληπτογόνος περιοχή(Jones 1993, Barbarosie and Avoli 1997)κάτω από έναν «μειωμένο» έλεγχο της CA3.

Επίδραση της απομόνωσης των 2 περιοχών στις υψίσυχνες ταλαντώσεις

- **CA3**

Στη CA3 περιοχή φυσιολογικών τομών παρατηρήθηκε τάση για αύξηση των υψίσυχνών ταλαντώσεων (R, FR) μετά τον απόχωρισμό της από τον ενδορρινικό φλοιό. Αντίθετα στις SE τομές παρατηρήθηκαν αντίστοιχα μειώσεις.

- **mEC**

Είναι ενδιαφέρον ότι στον ενδορρινικό φλοιό παρατηρήθηκε μια κατοπτρική εικόνα. Ειδικότερα, σε φυσιολογικές τομές υπήρξε μια τάση για μείωση των υψίσυχνων ταλαντώσεων μετά τον απόχωρισμό του από την CA3. Αντίθετα, στις SE τομές οι υψίσυχνες ταλαντώσεις του ενδορρινικού φλοιού δεν επηρεάστηκαν μετά τον αποχωρισμό του από την CA3.

Αυτά τα πειράματα προτείνουν μια τροποποιημένη έξοδο της CA3 σε υψίσυχνες ταλαντώσεις μετά από SE, ενώ παράλληλα περιγράφουν την ικανότητα του ενδορρινικού φλοιού να διατηρεί υψηλά powers (σε σύγκριση με τα φυσιολογικά) υψίσυχνων ταλαντώσεων τόσο παρουσία όσο και απουσία της CA3 στο δίκτυο. Σε αυτό προστίθεται επίσης κι η ικανότητά του για υψηλότερες μεσοκρισικές συχνότητες μετά από SE κάτω από τον έλεγχο ή όχι της CA3. Συνεπώς το SE κατά την ανάπτυξη φαίνεται να επηρεάζει τη διεγερσιμότητα του δικτύου ιπποκάμπου-φλοιού τόσο σε επίπεδο αργού κύματος-το οποίο ήταν εμφανές στον ενδορρινικό φλοιό-, όσο και σε επίπεδο υψίσυχνων ταλαντώσεων και στις 2 περιοχές (κατοπτρική εικόνα).

Η κατεύθυνση της αλλαγής του λόγου FR/R φαίνεται να εξαρτάται από την περιοχή καταγραφής (CA3 vs mEC). Για παράδειγμα, ο λόγος FR/R άλλαξε μετά από SE μόνο στην CA3 περιοχή αλλά όχι στον mEC. Ο λόγος FR/R όταν οι 2 περιοχές ήταν συνδεδεμένες, ήταν μικρότερος στην CA3 συγκριτικά με τον mEC, τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε SE τομές. Η απομόνωση των 2 περιοχών όμως, συνδέθηκε με παρόμοιους FR/R λόγους μεταξύ των 2 περιοχών λόγω κυρίως της αύξησης του λόγου στην CA3. Φαίνεται λοιπόν ότι οι αλλαγές του λόγου FR/R εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την περιοχή καταγραφής (CA3 vs mEC). Η εξίσωση των FR/R λόγων μεταξύ των 2 περιοχών μετά την απομόνωσή τους, ενδέχεται να αποτελεί κι ένα φυσικό επακόλουθο της απομόνωσης, αφού παρατηρείται τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε SE τομές.

Αντίθετα, η κατεύθυνση των αλλαγών του R, FR power φαίνεται να αποτελεί συνάρτηση τόσο της περιοχής καταγραφής όσο και του ιστορικού του πειραματοζώου. Σε αυτήν την περίπτωση, οι αλλαγές μετά από SE είναι κατοπτρικές μεταξύ των 2 περιοχών. Τέλος, είναι ενδιαφέρον ότι η σύγκριση του λόγου FR/R στην CA3 μεταξύ τομών ιπποκάμπου και συνδυασμένων τομών, επιβεβαίωσε την αύξηση του λόγου FR/R που παρατηρήθηκε στην CA3 μετά την απομόνωσή της από τον mEC. Ειδικότερα, αυτή η παρατήρηση ίσχυε τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε SE τομές. Συνεπώς η απουσία του mEC από το δίκτυο φαίνεται να συμβάλλει στους υψηλότερους λόγους της CA3 ανεξαρτήτως της ύπαρξης ιστορικού SE.

4.3 ΜΕΛΕΤΗ 3

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΥ ΚΙ ΕΝΔΟΡΡΙΝΙΚΟΥ ΦΛΟΙΟΥ ΣΕ 2 ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΣΥΓΧΡΟΝΙΣΜΟΥ

Κύρια ευρήματα

- Η CA3 διατηρεί υψηλότερες συχνότητες μεσοκρυσικών εκφορτίσεων σε σχέση με τον mEC κυρίως σε φυσιολογικές τομές, με μια τάση για μικρότερη διαφορά στις συχνότητες των 2 περιοχών μετά από SE
- Η CA3 μετά από SE, εμφανίζει είτε παρόμοια (4-AP) είτε ελάχιστα μειωμένη (ελεύθερο-Mg²⁺) συχνότητα μεσοκρυσικών εκφορτίσεων συγκριτικά με τις φυσιολογικές τομές
- Αντίθετα, ο mEC εμφανίζει υψηλότερες συχνότητες μεσοκρυσικών εκφορτίσεων, μετά από SE
- Η CA3 χαρακτηρίζεται από παρόμοιες συχνότητες μεσοκρυσικών εκφορτίσεων στα 2 μοντέλα συγχρονισμού τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε SE τομές
- Αντίθετα, ο mEC εμφανίζει υψηλότερες συχνότητες μεσοκρυσικών εκφορτίσεων στο ελεύθερο-Mg²⁺ σε σύγκριση με 4-AP τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε SE τομές
- Ο mEC φαίνεται ακόμη πιο διεγερσιμός μετά από SE κι υπο συνθήκες πλήρους ενεργοποίησης των NMDA υποδοχέων (ελεύθερο-Mg²⁺), γεγονός που πιθανότατα να συνδέεται με την αύξηση των υποδοχέων αυτών μετά από SE
- Ο μηχανισμός υπερδιεγερσιμότητας του mEC μετά από SE, δεν φαίνεται να απαντάται στην CA3

Σύγκριση της σχέσης CA3-mEC

Ταυτόχρονες εξώκυττάρειες καταγραφές από την πυραμιδική στοιβάδα της CA3 και τις βαθιές στοιβάδες του mEC έδειξαν ότι η μεσοκρυσική δραστηριότητα στις 2 περιοχές ήταν ασύγχρονη και στα 2 μοντέλα συγχρονισμού.

- **N τομές**

Στις φυσιολογικές τομές η CA3 είχε υψηλότερες συχνότητες μεσοκρυσικών εκφορτίσεων από αυτές του mEC τόσο στο μοντέλο ελεύθερο-Mg²⁺ όσο και στην 4-AP. Αυτή η σχέση δεν άλλαξε ούτε μετά την παρεμπόδιση της εισόδου της δραστηριότητας της CA3 στον mEC (CA1 cut) αλλά ούτε και μετά από την πλήρη απομόνωση των 2 περιοχών (Mini slices).

- **SE τομές**

Ωστόσο, στις SE τομές παρατηρήθηκε μια τάση για μείωση της διαφοράς μεταξύ των συχνοτήτων των 2 περιοχών και στα 2 μοντέλα συγχρονισμού. Μάλιστα, στο μοντέλο ελεύθερο-Mg²⁺ οι 2 περιοχές εμφάνισαν παρόμοιες συχνότητες στο πρώτο στάδιο καταγραφής (Intact). Αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν ότι μετά από SE υπάρχει μια τάση για μεγαλύτερο συγχρονισμό μεταξύ των 2 περιοχών, λόγω κυρίως της αύξησης της συχνότητας των μεσοκρυσικών εκφορτίσεων στον mEC μετά από SE.

Σύγκριση συχνοτήτων μεσοκρυσικών εκφορτίσεων μεταξύ φυσιολογικών και SE τομών, για κάθε περιοχή καταγραφής

- **CA3**

Στην CA3 περιοχή οι συχνότητες των μεσοκρυσικών εκφορτίσεων ήταν είτε παρόμοιες (4-AP) με αυτές των SE τομών είτε ελάχιστα χαμηλότερες (ελεύθερο-Mg²⁺). Αυτή η συσχέτιση ίσχυε για κάθε στάδιο καταγραφής (Intact, CA1 cut, Mini) καθώς δεν μεταβλήθηκε με τις διαδοχικές διατομές στο παρασκεύασμα και στα 2 μοντέλα συγχρονισμού.

- **mEC**

Αντίθετα στον mEC κατεγράφησαν υψηλότερες συχνότητες μεσοκρυσικών εκφορτίσεων μετά από SE στο μοντέλο της 4-AP. Η ίδια εικόνα παρατηρήθηκε επίσης και για το πρώτο στάδιο καταγραφής (Intact) στο μοντέλο ελεύθερο-Mg²⁺.

Συμπερασματικά, η μεσοκρυσική δραστηριότητα της CA3 δεν φαίνεται να επηρεάζεται μετά από SE ενώ αντίθετα, η διεγερσιμότητα του mEC φαίνεται να ενισχύεται. Βάσει αυτών των παρατηρήσεων, οι αλλαγές

στη συχνότητα των μεσοκρυσικών εκφορτίσεων φαίνεται να εξαρτώνται περισσότερο από το ιστορικό του πειραματοζώου (N, SE) και την περιοχή καταγραφής (CA3, mEC) παρά από το μοντέλο μελέτης, καθώς και τα 2 μοντέλα ξεχωριστά συγκλίνουν σε παρόμοια αποτελέσματα για τις συγκρίσεις N vs SE. Όπως αναφέρθηκε και στην μελέτη 2 υπάρχουν αναφορές ότι στον ενδορρινικό φλοιό (Kobayashi, Wen et al. 2003, de Guzman, Inaba et al. 2006, Kumar and Buckmaster 2006) οι υποδοχείς NMDA αυξάνουν (Kobayashi, Wen et al. 2003), μετά από SE. Σε υποστήριξη αυτού, στο μοντέλο ελεύθερο-Mg²⁺ οι SE τομές είχαν υψηλότερες συχνότητες μεσοκρυσικών εκφορτίσεων συγκριτικά με τις φυσιολογικές τομές. Ωστόσο, αυτή η διαφορά ήταν εμφανής μόνο για το πρώτο στάδιο καταγραφής (Intact) αλλά όχι για τα επόμενα 2 στάδια (CA1 cut, Mini). Συνεπώς, τα αποτελέσματα της υψηλότερης συχνότητας μεσοκρυσικών εκφορτίσεων στον mEC μετά από SE, πιθανότατα να οφείλονται στην αύξηση των NMDA υποδοχέων ως μια προ-επιληπτική/διεγερτική δράση του SE στη δομή αυτή.

Σύγκριση συχνότητων μεσοκρυσικών εκφορτίσεων μεταξύ των 2 μοντέλων, για κάθε περιοχή καταγραφής

- **CA3**

Η CA3 περιοχή τόσο των φυσιολογικών όσο και των SE τομών παρουσίασε παρόμοιες συχνότητες μεσοκρυσικών εκφορτίσεων στα 2 μοντέλα συγχρονισμού για το ίδιο στάδιο καταγραφής (Intact, CA1 cut, Mini). Στην περίπτωση της CA3, η μεσοκρυσική συχνότητα φαίνεται ανεξάρτητη του μοντέλου πρόκλησης (ελεύθερο-Mg²⁺, 4-AP) και του ιστορικού (N, SE) του πειραματοζώου.

- **mEC**

Αντίθετα, στον mEC καταγράφονται μοντελο-εξαρτώμενες αποκρίσεις τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε SE τομές. Ειδικότερα και στους 2 τύπους τομών (N, SE) οι συχνότητες των μεσοκρυσικών εκφορτίσεων ήταν υψηλότερες στο ελεύθερο-Mg²⁺ σε σύγκριση με την 4-AP για το ίδιο στάδιο καταγραφής (Intact, CA1 cut, Mini). Αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν ότι ο mEC είναι περισσότερο διεγέρσιμος υπο διαβροχή με ελεύθερο-Mg²⁺ ανεξάρτητα αν η τομή είναι φυσιολογική ή SE. Σε υποστήριξη αυτού, υπάρχουν αναφορές {Buchheim, 2000 #218} ότι στο μοντέλο ελεύθερο-Mg²⁺ η κρυσική δραστηριότητα ξεκινά κατά προτίμηση από τον mEC. Η αντίστοιχη δραστηριότητα στο μοντέλο της 4-AP επιδεικνύει μια πιο ευρύτερη προτίμηση που εμπλέκει τον περιρρινικό, τον κροταφικό φλοιό και σε μικροτερο βαθμό τον mEC (Buchheim, Schuchmann et al. 2000). Αυτό πιθανότατα οφείλεται στους πολλούς διαφορετικούς μηχανισμούς που ενεργοποιούνται στο μοντέλο της 4-AP {Ives, 1990 #210; Perreault, 1991 #68; Rutecki, 1987 #211} (μπλοκαρισμά ρεύματος I_A, αύξηση της εισροής ασβεστίου, αυξημένη απελευθέρωση νευροδιαβιβαστικών ουσιών). Στην περίπτωση του mEC η μεσοκρυσική συχνότητα εξαρτάται τόσο από το μοντέλο μελέτης (ελεύθερο-Mg²⁺, 4-AP) όσο κι από το ιστορικό (N, SE) του πειραματοζώου. Μια σχετική παρατήρηση, είναι

ότι η μοντελο-εξαρτώμενη απόκριση που εμφανίζει ο mEC είναι πιο εμφανής στις φυσιολογικές τομές ενώ τείνει να μειώνεται στις SE τομές. Αυτά τα αποτελέσματα πιθανότατα να οφείλονται στην αύξηση των υποδοχέων NMDA μετά από SE (Kobayashi, Wen et al. 2003, de Guzman, Inaba et al. 2006, Kumar and Buckmaster 2006). Αυτό υποστηρίζεται από τις υψηλότερες συχνότητες των SE τομών στο ελεύθερο-Mg²⁺ σε σύγκριση με τις αντίστοιχες φυσιολογικές τομές, αλλά και με τις SE τομές στο μοντέλο της 4-AP (κυρίως στο πρώτο στάδιο καταγραφής-αλλά και για τα 2 επόμενα χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική η διαφορά-ωστόσο η τάση είναι εμφανής).

Συνεπώς, η χρήση 2 διαφορετικών μοντέλων συγχρονισμού φαίνεται ιδιαίτερα χρήσιμη για την αποκάλυψη των διαφορετικών όψεων των πλαστικών αλλαγών μετά από κρίσεις στις ιδιότητες συγχρονισμού του δικτύου CA3-mEC. Επίσης, φαίνεται ότι οι μηχανισμοί που επηρεάζονται μετά από SE δεν είναι όμοιοι σε κάθε περιοχή, αποτελώντας πιθανότατα συνάρτηση του υποβάθρου της κάθε περιοχής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adhikari, A., M. A. Topiwala and J. A. Gordon (2010). "Synchronized activity between the ventral hippocampus and the medial prefrontal cortex during anxiety." Neuron **65**(2): 257-269.

Alvarado-Rojas, C., G. Huberfeld, M. Baulac, S. Clemenceau, S. Charpier, R. Miles, L. M. de la Prida and M. Le Van Quyen (2015). "Different Ripple mechanisms subiculum " Ann Neurol **77**(2): 281-290.

Avoli, M., M. D'Antuono, J. Louvel, R. Kohling, G. Biagini, R. Pumain, G. D'Arcangelo and V. Tancredi (2002). "Network and pharmacological mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system in vitro." Prog Neurobiol **68**(3): 167-207.

Avoli, M., M. de Curtis and R. Kohling (2013). "Does interictal synchronization influence ictogenesis?" Neuropharmacology **69**: 37-44.

Barbarosie, M. and M. Avoli (1997). "CA3-driven hippocampal-entorhinal loop controls rather than sustains in vitro limbic seizures." J Neurosci **17**(23): 9308-9314.

Benini, R. and M. Avoli (2005). "Rat subicular networks gate hippocampal output activity in an in vitro model of limbic seizures." J Physiol **566**(Pt 3): 885-900.

Blake, R. V., S. J. Wroe, E. K. Breen and R. A. McCarthy (2000). "Accelerated forgetting in patients with epilepsy: evidence for an impairment in memory consolidation." Brain **123 Pt 3**: 472-483.

Bragin, A., J. Engel, Jr., C. L. Wilson, I. Fried and G. Buzsaki (1999). "High-frequency oscillations in human brain." Hippocampus **9**(2): 137-142.

Bragin, A., J. Engel, Jr., C. L. Wilson, I. Fried and G. W. Mathern (1999). "Hippocampal and entorhinal cortex high-frequency oscillations (100--500 Hz) in human epileptic brain and in kainic acid--treated rats with chronic seizures." Epilepsia **40**(2): 127-137.

Bragin, A., I. Mody, C. L. Wilson and J. Engel, Jr. (2002). "Local generation of fast ripples in epileptic brain." J Neurosci **22**(5): 2012-2021.

Bragin, A., C. L. Wilson, R. J. Staba, M. Reddick, I. Fried and J. Engel, Jr. (2002). "Interictal HFOs in the human EC." Ann Neurol **52**(4): 407-415.

Buchheim, K., S. Schuchmann, H. Siegmund, F. Weissinger, U. Heinemann and H. Meierkord (2000). "Comparison of intrinsic optical signals associated with low Mg²⁺-and 4-aminopyridine-induced seizure-like events reveals characteristic features in adult rat limbic system." Epilepsia **41**(6): 635-641.

Buzsaki, G. (1989). "Two-stage model of memory trace formation: a role for "noisy" brain states." Neuroscience **31**(3): 551-570.

Cain, D. P., K. A. Desborough and D. J. McKittrick (1988). "Retardation of amygdala kindling by antagonism of NMD-aspartate and muscarinic cholinergic receptors: evidence for the summation of excitatory mechanisms in kindling." Exp Neurol **100**(1): 179-187.

Canto, C. B., F. G. Wouterlood and M. P. Witter (2008). "What does the anatomical organization of the entorhinal cortex tell us?" Neural Plast **2008**: 381243.

Claiborne, B. J., D. G. Amaral and W. M. Cowan (1990). "Quantitative, three-dimensional analysis of granule cell dendrites in the rat dentate gyrus." J Comp Neurol **302**(2): 206-219.

Curtis, M., L. Tassi, G. Lo Russo, R. Mai, M. Cossu and S. Francione (2005). "Increased discharge threshold after an interictal spike in human focal epilepsy." Eur J Neurosci **22**(11): 2971-2976.

de Guzman, P., Y. Inaba, G. Biagini, E. Baldelli, C. Mollinari, D. Merlo and M. Avoli (2006). "Subiculum network excitability is increased in a rodent model of temporal lobe epilepsy." Hippocampus **16**(10): 843-860.

de Hoz, L., J. Knox and R. G. Morris (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**(5): 587-603.

Esclapez, M., J. C. Hirsch, Y. Ben-Ari and C. Bernard (1999). "Newly formed excitatory pathways provide a substrate for hyperexcitability in experimental temporal lobe epilepsy." J Comp Neurol **408**(4): 449-460.

- Fanselow, M. S. and H. W. Dong (2010). "Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures?" Neuron **65**(1): 7-19.
- Frauscher, B., N. von Ellenrieder, F. Dubeau and J. Gotman (2016). "EEG desynchronization during phasic REM sleep suppresses interictal epileptic activity in humans." Epilepsia **57**(6): 879-888.
- Frey, B. N., A. C. Andreazza, F. G. Nery, M. R. Martins, J. Quevedo, J. C. Soares and F. Kapczinski (2007). "The role of hippocampus in the pathophysiology of bipolar disorder." Behav Pharmacol **18**(5-6): 419-430.
- Geiger, J. R. and P. Jonas (2000). "Dynamic control of presynaptic Ca²⁺ inflow by fast-inactivating K⁺ channels in hippocampal mossy fiber boutons." Neuron **28**(3): 927-939.
- Gilbert, M., R. J. Racine and G. K. Smith (1985). "Epileptiform burst responses in ventral vs dorsal hippocampal slices." Brain Res **361**(1-2): 389-391.
- Girgis, M. (1981). "Neuronal hypersensitivity to acetylcholinesterase inhibitors induced by a kindling stimulus in the rabbit brain." Brain Res **208**(2): 379-386.
- Gustafsson, B., M. Galvan, P. Grafe and H. Wigstrom (1982). "A transient outward current in a mammalian central neurone blocked by 4-aminopyridine." Nature **299**(5880): 252-254.
- Hafting, T., M. Fyhn, S. Molden, M. B. Moser and E. I. Moser (2005). "Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex." Nature **436**(7052): 801-806.
- Heckers, S. and C. Konradi (2002). "Hippocampal neurons in schizophrenia." J Neural Transm (Vienna) **109**(5-6): 891-905.
- Hillert, M. H., I. Imran, M. Zimmermann, H. Lau, S. Weinfurter and J. Klein (2014). "Dynamics of hippocampal acetylcholine release during lithium-pilocarpine-induced status epilepticus in rats." J Neurochem **131**(1): 42-52.
- Isaeva, E., A. Romanov, G. L. Holmes and D. Isaev (2015). "Status epilepticus results in region-specific alterations in seizure susceptibility along the hippocampal longitudinal axis." Epilepsy Res **110**: 166-170.

Jacobs, J., K. Kobayashi and J. Gotman (2011). "High-frequency changes during interictal spikes detected by time-frequency analysis." Clin Neurophysiol **122**(1): 32-42.

Jacobs, J., P. LeVan, R. Chander, J. Hall, F. Dubeau and J. Gotman (2008). "Interictal high-frequency oscillations (80-500 Hz) are an indicator of seizure onset areas independent of spikes in the human epileptic brain." Epilepsia **49**(11): 1893-1907.

Jensen, M. S. and Y. Yaari (1988). "The relationship between interictal and ictal paroxysms in an in vitro model of focal hippocampal epilepsy." Ann Neurol **24**(5): 591-598.

Jones, R. S. (1993). "Entorhinal-hippocampal connections: a speculative view of their function." Trends Neurosci **16**(2): 58-64.

Joyce, J. N., R. B. Gibbs, C. W. Cotman and J. F. Marshall (1989). "Regulation of muscarinic receptors in hippocampus following cholinergic denervation and reinnervation by septal and striatal transplants." J Neurosci **9**(8): 2776-2791.

Kerr, K. M., K. L. Agster, S. C. Furtak and R. D. Burwell (2007). "Functional neuroanatomy of the parahippocampal region: the lateral and medial entorhinal areas." Hippocampus **17**(9): 697-708.

Knopp, A., A. Kivi, C. Wozny, U. Heinemann and J. Behr (2005). "Cellular and network properties of the subiculum in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy." J Comp Neurol **483**(4): 476-488.

Kobayashi, M., X. Wen and P. S. Buckmaster (2003). "Reduced inhibition and increased output of layer II neurons in the medial entorhinal cortex in a model of temporal lobe epilepsy." J Neurosci **23**(24): 8471-8479.

Kouis, P., A. Mikroulis and C. Psarropoulou (2014). "A single SE changes adult threshold in a stimulus-specific way." Epilepsy Res **108**(9): 1564-1571.

Kouvaros, S. and C. Papatheodoropoulos (2017). "Prominent differences in sharp waves, ripples and complex spike bursts between the dorsal and the ventral rat hippocampus." Neuroscience **352**: 131-143.

Kozhemyakin, M., K. Rajasekaran and J. Kapur (2010). "Central cholinesterase inhibition enhances glutamatergic synaptic transmission." J Neurophysiol **103**(4): 1748-1757.

Kumar, S. S. and P. S. Buckmaster (2006). "Hyperexcitability, interneurons, and loss of GABAergic synapses in entorhinal cortex in a model of temporal lobe epilepsy." J Neurosci **26**(17): 4613-4623.

Lavenex, P. and D. G. Amaral (2000). "Hippocampal-neocortical interaction: a hierarchy of associativity." Hippocampus **10**(4): 420-430.

Lopantsev, V. and M. Avoli (1998). "Laminar organization of epileptiform discharges in the rat entorhinal cortex in vitro." J Physiol **509 (Pt 3)**: 785-796.

Marino, M. J., S. T. Rouse, A. I. Levey, L. T. Potter and P. J. Conn (1998). "Activation of the genetically defined m1 muscarinic receptor potentiates N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor currents in hippocampal pyramidal cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(19): 11465-11470.

Martin, R. C., D. W. Loring, K. J. Meador and G. P. Lee (1988). "Differential forgetting in patients with temporal lobe dysfunction." Arch Clin Neuropsychol **3**(4): 351-358.

Meilleur, S., N. Aznavour, L. Descarries, L. Carmant, O. A. Mamer and C. Psarropoulou (2003). "Pentylentetrazol-induced seizures in immature rats provoke long-term changes in adult hippocampal cholinergic excitability." Epilepsia **44**(4): 507-517.

Meilleur, S., L. Carmant and C. Psarropoulou (2000). "Immature rat convulsions and long-term effects on hippocampal cholinergic neurotransmission." Neuroreport **11**(3): 521-524.

Mikroulis, A. V. and C. Psarropoulou (2012). "Endogenous ACh effects on NMDA-induced interictal-like discharges along the septotemporal hippocampal axis of adult rats and their modulation by an early life generalized seizure." Epilepsia **53**(5): 879-887.

Mingo, N. S., G. A. Cottrell, A. Mendonca, Z. Gombos, J. H. Eubanks and W. M. Burnham (1998). "Amygdala-kindled and electroconvulsive seizures alter hippocampal expression of the m1 and m3 muscarinic cholinergic receptor genes." Brain Res **810**(1-2): 9-15.

Morimoto, K., K. H. Holmes and G. V. Goddard (1987). "Kindling-induced changes in EEG recorded during stimulation from the site of stimulation. III. Direct pharmacological manipulations of the kindled amygdala." Exp Neurol **97**(1): 17-34.

Moser, E. I. (1995). "Learning-related changes in hippocampal field potentials." Behav Brain Res **71**(1-2): 11-18.

Moser, M. B. and E. I. Moser (1998). "Functional differentiation in the hippocampus." Hippocampus **8**(6): 608-619.

Moser, M. B., E. I. Moser, E. Forrest, P. Andersen and R. G. Morris (1995). "Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(21): 9697-9701.

Norimoto, H., M. Mizunuma, D. Ishikawa, N. Matsuki and Y. Ikegaya (2012). "Muscarinic receptor activation disrupts hippocampal sharp wave-ripples." Brain Res **1461**: 1-9.

O'Keefe, J. (1979). "A review of the hippocampal place cells." Prog Neurobiol **13**(4): 419-439.

O'Keefe, J. and N. Burgess (2005). "Dual phase and rate coding in hippocampal place cells: theoretical significance and relationship to entorhinal grid cells." Hippocampus **15**(7): 853-866.

O'Keefe, J. and J. Dostrovsky (1971). "The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat." Brain Res **34**(1): 171-175.

Pandis, C., E. Sotiriou, E. Kouvaras, E. Asprodini, C. Papatheodoropoulos and F. Angelatou (2006). "Differential expression of NMDA and AMPA receptor subunits in rat dorsal and ventral hippocampus." Neuroscience **140**(1): 163-175.

Panuccio, G., M. D'Antuono, P. de Guzman, L. De Lannoy, G. Biagini and M. Avoli (2010). "In vitro ictogenesis and parahippocampal networks in a rodent model of temporal lobe epilepsy." Neurobiol Dis **39**(3): 372-380.

Papatheodoropoulos, C., E. Asprodini, I. Nikita, C. Koutsona and G. Kostopoulos (2002). "Weaker synaptic inhibition in CA1 region of ventral compared to dorsal rat hippocampal slices." Brain Res **948**(1-2): 117-121.

Papatheodoropoulos, C. and G. Kostopoulos (2002). "Spontaneous GABA(A)-dependent synchronous periodic activity in adult rat ventral hippocampal slices." Neurosci Lett **319**(1): 17-20.

Papatheodoropoulos, C., C. Moschovos and G. Kostopoulos (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**(3): 765-779.

Penschuck, S., J. F. Bastlund, H. S. Jensen, T. B. Stensbol, J. Egebjerg and W. P. Watson (2005). "Changes in KCNQ2 immunoreactivity in the amygdala in two rat models of temporal lobe epilepsy." Brain Res Mol Brain Res **141**(1): 66-73.

Perreault, P. and M. Avoli (1991). "Physiology and pharmacology of epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat hippocampal slices." J Neurophysiol **65**(4): 771-785.

Potier, S. and C. Psarropoulou (2004). "Modulation of muscarinic facilitation of epileptiform discharges in immature rat neocortex." Brain Res **997**(2): 194-206.

Potier, S., J. Senecal, J. G. Chabot, C. Psarropoulou and L. Descarries (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." Eur J Neurosci **21**(7): 1828-1836.

Psarropoulou, C., J. Beaucher and C. Harnois (1998). "Comparison of the effects of M1 and M2 muscarinic receptor activation in the absence of GABAergic inhibition in immature rat hippocampal CA3 area." Brain Res Dev Brain Res **107**(2): 285-290.

Rutecki, P. A., R. G. Grossman, D. Armstrong and S. Irish-Loewen (1989). "Electrophysiological connections between the hippocampus and entorhinal cortex in patients with complex partial seizures." J Neurosurg **70**(5): 667-675.

- Sakuraba, R., M. Iwasaki, E. Okumura, K. Jin, Y. Kakisaka, K. Kato, T. Tominaga and N. Nakasato (2016). "High frequency oscillations are less frequent but more specific to epileptogenicity during rapid eye movement sleep." Clin Neurophysiol **127**(1): 179-186.
- Sala, M., J. Perez, P. Soloff, S. Ucelli di Nemi, E. Caverzasi, J. C. Soares and P. Brambilla (2004). "Stress and hippocampal abnormalities in psychiatric disorders." Eur Neuropsychopharmacol **14**(5): 393-405.
- Scoville, W. B. and B. Milner (2000). "Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. 1957." J Neuropsychiatry Clin Neurosci **12**(1): 103-113.
- Sloviter, R. S. (1987). "Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy." Science **235**(4784): 73-76.
- Sotiriou, E., C. Papatheodoropoulos and F. Angelatou (2005). "Differential expression of gamma-aminobutyric acid--a receptor subunits in rat dorsal and ventral hippocampus." J Neurosci Res **82**(5): 690-700.
- Spencer, S. S., Goncharova, II, R. B. Duckrow, E. J. Novotny and H. P. Zaveri (2008). "Interictal spikes on intracranial recording: behavior, physiology, and implications." Epilepsia **49**(11): 1881-1892.
- Staba, R. J., L. Frighetto, E. J. Behnke, G. W. Mathern, T. Fields, A. Bragin, J. Ogren, I. Fried, C. L. Wilson and J. Engel, Jr. (2007). "Increased fast ripple to ripple ratios correlate with reduced hippocampal volumes and neuron loss in temporal lobe epilepsy patients." Epilepsia **48**(11): 2130-2138.
- Staba, R. J., C. L. Wilson, A. Bragin, I. Fried and J. Engel, Jr. (2002). "Quantitative HFOs human hippocampus and entorhinal cortex." J Neurophysiol **88**(4): 1743-1752.
- Staley, K., J. L. Hellier and F. E. Dudek (2005). "Do interictal spikes drive epileptogenesis?" Neuroscientist **11**(4): 272-276.
- Steffenach, H. A., M. Witter, M. B. Moser and E. I. Moser (2005). "Spatial memory in the rat requires the dorsolateral band of the entorhinal cortex." Neuron **45**(2): 301-313.

Toyoda, I., M. R. Bower, F. Leyva and P. S. Buckmaster (2013). "Early activation of ventral hippocampus and subiculum during spontaneous seizures in a rat model of temporal lobe epilepsy." J Neurosci **33**(27): 11100-11115.

Ulas, J., M. Gradkowska, M. Skup and B. Oderfeld-Nowak (1987). "Differential response of hippocampal muscarinic cholinergic receptors to various deafferentations of the hippocampus in the rat." Acta Neurobiol Exp (Wars) **47**(5-6): 249-257.

Van der Zee, E. A. and P. G. Luiten (1993). "GABAergic neurons of the rat dorsal hippocampus express muscarinic acetylcholine receptors." Brain Res Bull **32**(6): 601-609.

Witter, M. P., P. A. Naber, T. van Haeften, W. C. Machielsen, S. A. Rombouts, F. Barkhof, P. Scheltens and F. H. Lopes da Silva (2000). "Cortico-hippocampal communication by way of parallel parahippocampal-subicular pathways." Hippocampus **10**(4): 398-410.

Witter, M. P., F. G. Wouterlood, P. A. Naber and T. Van Haeften (2000). "Anatomical organization of the parahippocampal-hippocampal network." Ann N Y Acad Sci **911**: 1-24.

Young, B. J., G. D. Fox and H. Eichenbaum (1994). "Correlates of hippocampal complex-spike cell activity in rats performing a nonspatial radial maze task." J Neurosci **14**(11 Pt 1): 6553-6563.

Zahn, R. K., E. A. Tolner, C. Derst, C. Gruber, R. W. Veh and U. Heinemann (2008). "Reduced ictogenic potential of 4-aminopyridine in the perirhinal and entorhinal cortex of kainate-treated chronic epileptic rats." Neurobiol Dis **29**(2): 186-200.

Zhou, C., H. Sun, P. M. Klein and F. E. Jensen (2015). "Neonatal seizures alter NMDA glutamate receptor GluN2A and 3A subunit expression and function in hippocampal CA1 neurons." Front Cell Neurosci **9**: 362.

Zijlmans, M., J. Jacobs, Y. U. Kahn, R. Zelmann, F. Dubeau and J. Gotman (2011). "Ictal and interictal high frequency oscillations in patients with focal epilepsy." Clin Neurophysiol **122**(4): 664-671.