

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τμήμα Ιατρικής
Πρόγραμμα Σπουδών Επιλογής
“ ΙΑΤΡΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ”

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΘΕΜΑ:

“ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΝΑΠΤΙΚΗΣ ΔΙΕΓΕΡΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ CΑ1
ΠΥΡΑΜΙΔΙΚΩΝ ΝΕΥΡΩΝΩΝ ΤΗΣ ΡΑΧΙΑΙΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΚΟΙΛΙΑΚΗΣ ΜΟΙΡΑΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΥ”



Τριμελής Επιτροπή:

Π. Α. Μολυβδάς, Καθηγητής Φυσιολογίας

Σ. Μπονάνου-Τζεδάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας

Ε. Ασπροδίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας (επιβλέπουσα)

ΕΚΠΟΝΗΣΗ: ΑΔΑΜΟΠΟΥΛΟΥ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ

Λάρισα Φεβρουάριος 2004

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΠΙΛΟΓΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
Ημερομηνία 21/2/2004
Αριθμ. Πρωτ. 2613



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 2846/1
Ημερ. Εισ.: 28/06/2004
Δωρεά: _____
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ-ΠΣΕ-ΙΒ
2004
ΑΔΑ



✓

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τμήμα Ιατρικής
Πρόγραμμα Σπουδών Επιλογής
“ ΙΑΤΡΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ”

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΘΕΜΑ:

**“ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΝΑΠΤΙΚΗΣ ΔΙΕΓΕΡΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ CA1
ΠΥΡΑΜΙΔΙΚΩΝ ΝΕΥΡΩΝΩΝ ΤΗΣ ΡΑΧΙΑΙΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΚΟΙΛΙΑΚΗΣ ΜΟΙΡΑΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΥ”**

Τριμελής Επιτροπή:

Π. Α. Μολυβδάς, Καθηγητής Φυσιολογίας

Σ. Μπονάνου-Τζεδάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας

Ε. Ασπροδίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας (επιβλέπουσα)

ΕΚΠΟΝΗΣΗ: ΑΔΑΜΟΠΟΥΛΟΥ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ

Λάρισα Φεβρουάριος 2004

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

	Σελίδα
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	8

ΜΕΡΟΣ 1^ο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1: Γενικά χαρακτηριστικά του ιπποκάμπου	9
1.1.1: Ανατομία του ιπποκάμπου	9
Στοιβάδες του ιπποκάμπου	11
Τρισυναπτικό κύκλωμα	14
1.1.2: Συνδέσεις του ιπποκάμπου	15
Εσωτερικές συνδέσεις του ιπποκάμπου	15
Προσαγωγές ίνες του ιπποκάμπου	15
Απαγωγές ίνες του ιπποκάμπου	16
1.1.3: Νευροχημεία του ιπποκάμπου	17
Το γ-αμινοβουτυρικό οξύ	18
Η ακετυλοχολίνη	18
Η νορεπινεφρίνη	18
Το γλουταμινικό οξύ	18
Άλλες ουσίες	19
1.1.4: Υποδοχείς αμινοξέων στον ιπποκάμπο	19
α) Υποδοχείς γλουταμινικού οξέος	20
(I) Ιονοτρόποι υποδοχείς	20
NMDA υποδοχείς	20
μη-NMDA υποδοχείς	22
(II) Μεταβολοτρόποι υποδοχείς	22
β) Υποδοχείς γ-αμινοβουτυρικού οξέος	23
1.1.5: Συμβολή του ιπποκάμπου στη μνήμη	23
1.1.6: Ιπποκάμπος και επιληψία	25

1.2: Διαφορές κοιλιακού-ραχιαίου ιπποκάμπου	26
1.2.1: Σε ανατομικό επίπεδο	26
Προσαγωγές συνδέσεις	26
Απαγωγές συνδέσεις	27
Ιππόκαμπος και αμυγδαλή.....	27
Κατανομή ενδονευρώνων	27
1.2.2: Σε βιοχημικό επίπεδο	27
Κατανομή νευροδιαβιβαστών	28
Κατανομή υποδοχέων	28
1.2.3: Στην ισχαιμία	29
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	31

ΜΕΡΟΣ 2^ο

ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ	32
2.1: Πειραματόζωα	32
2.2: Προετοιμασία τομών εγκεφαλικού ιστού	32
2.3: Θάλαμος καταγραφής	34
2.4: Σύστημα καταγραφής - ανάλυσης των δεδομένων	34
2.5: Συναπτική διέγερση	38
2.6: Στατιστική ανάλυση των δεδομένων	38

ΜΕΡΟΣ 3^ο

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	39
3.1: Εισαγωγή.....	39
3.2: Παθητικές ιδιότητες των πυραμιδικών νευρώνων της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου	39
3.2.1: Δυναμικό μεμβράνης εν ηρεμία	40
3.2.2: Αντίσταση εισόδου	40
3.3: Διεγερσιμότητα των πυραμιδικών νευρώνων του ιπποκάμπου	41
3.4: Μετασυναπτικά δυναμικά	41
3.4.1: Μετασυναπτική αναστολή σε ραχιαίο και κοιλιακό ιππόκαμπο.....	45
3.4.2: Μετασυναπτική διέγερση σε ραχιαίο και κοιλιακό ιππόκαμπο.....	45

3.4.3: Τασεοεξαρτώμενη συμπεριφορά των NMDA υποδοχέων	48
3.4.4: Αυξημένη συναπτική NMDA-διαμεσολαβούμενη διέγερση στην κοιλιακή μοίρα του ιπποκάμπου	50

ΜΕΡΟΣ 4^ο

ΣΥΖΗΤΗΣΗ	52
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	54

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο χρονικό διάστημα Φεβρουάριος 2003 – Ιανουάριος 2004, υπό την καθοδήγηση και την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Φαρμακολογίας κ. Ευτυχίας Ασπροδίνη. Στην πραγματοποίηση της εργασίας αυτής συνέβαλλαν συνεργάτες και φίλοι προς τους οποίους εκφράζω τις ευχαριστίες μου και την ευγνωμοσύνη μου.

Στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Ευτυχία Ασπροδίνη εκφράζω τις θερμές μου ευχαριστίες για την καθοδήγηση, την αμέριστη βοήθεια, ηθική υποστήριξη και το μεγάλο ενδιαφέρον που έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διατριβής.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή κ. Πασχάλη-Αδάμ Μολυβδά για το ενδιαφέρον του και τις πολύτιμες παρατηρήσεις και υποδείξεις του που συνέβαλλαν στην τελική διαμόρφωση του κειμένου.

Οφείλω να ευχαριστήσω με ιδιαίτερη θέρμη την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Σοφία Μπονάνου – Τζεδάκη τόσο για την ενασχόλησή της με την παρούσα εργασία, τις πολύτιμες παρατηρήσεις και υποδείξεις της που συνέβαλλαν στην τελική διαμόρφωση του κειμένου, αλλά κυρίως για την ανεκτίμητη συμβολή της στη δημιουργία του Π.Σ.Ε. Ιατρικής Βιοχημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και για την αμέριστη στήριξη που παρείχε στο Τμήμα καθ' όλη τη διάρκεια της λειτουργίας του.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας κ. Ευάγγελο Κουβαρά για την πολύτιμη βοήθειά του στην διεκπεραίωση του πειραματικού μέρους της μελέτης και για την στήριξή του κατά την διάρκεια της συγγραφής της.

Ευχαριστώ επίσης την Δρ. Γκρέτα Βόζνιακ για την αμέριστη ηθική υποστήριξη και την βοήθεια που μου παρείχε αφειδώς από τη στιγμή της έναρξης της παρούσας εργασίας μέχρι και την τελευταία στιγμή της διεκπεραίωσής της.

Ευχαριστώ επίσης τον κ. Ηλία Μπέγα, μέλος ΕΤΕΠ του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας, για την τεχνική υποστήριξη στη διεκπεραίωση του πειραματικού μέρους της μελέτης.

Οφείλω επίσης να ευχαριστήσω όλα τα άτομα που εργάζονται στη Βιβλιοθήκη του Ιατρικού Τμήματος και στη Γραμματεία του ΠΣΕ Ιατρικής Βιοχημείας για τη συνεχή βοήθειά τους στην επίλυση ποικίλων προβλημάτων που προέκυπταν.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου και τον σύζυγό μου για την υπομονή, την κατανόηση, την εμπιστοσύνη τους και την πολύπλευρη υποστήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διατριβής.

Παρασκευή Αδαμοπούλου

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ACh = Ακετυλοχολίνη (**A**cetyl**C**holine)

AMPA = α-Αμινο-3-υδροξυ-5-μεθυλο-ισοξαζολο-προπιονικό οξύ (**a**-Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazol **P**ropionic Acid)

APV = 2-Αμινο-5-φωσφονοβαλερικό οξύ (2-Amino-5-**P**hosphono**V**aleric acid)

CA = Αμμώνιο Κέρας (**C**ornu **A**mmon)

CCK = Χολεκυστοκίνη (**C**hole**C**ysto**K**inine)

CNQX = 6-Κυανο-7-νιτροκινόξαλινο-2,3-διόνη (6-**C**yan-7-**N**itro**Q**uino**X**aline-2-3-dione)

CR = Καλρετινίνη (**C**al**R**etinine)

DAG = Διακυλογλυκερόλη (**D**i**A**cyl**G**lycerol)

EEG = Ηλεκτροεγκεφαλογράφημα (**E**lectro**E**ncephalo**G**ram)

GABA = γ-Αμινοβουτυρικό οξύ (**G**amma **A**mino**B**utyric Acid)

Glu = Γλουταμινικό οξύ (**G**lutamate)

IP₃ = Τριφωσφορική ινοσιτόλη (**I**nositol tri**P**hosphate)

NMDA = N-μεθυλο-D-ασπαρτικό οξύ (**N**-Methyl-**D**-**A**spartate)

NOS = Συνθάση του οξειδίου του αζώτου (**N**itric **O**xid **S**ynthase)

NPY = Νευροπεπτίδιο Y (**N**euro**P**eptide **Y**)

PLC = **P**hospho**L**ipase **C**

PV = Παρβαλβουμίνη (**P**ar**V**albumin)

Ri = Αντίσταση εισόδου (**i**nput **R**esistance)

RMP = Δυναμικό ηρεμίας μεμβράνης (**R**esting **M**embrane **P**otential)

SCOP = Σκοπολαμίνη (**S**copolamine)

SS = Σωματοστατίνη (**S**omato**S**tatine)

TENY = **T**εχνητό **E**γκεφαλο**N**ωτιαίο **Y**γρό

VIP = Αγγειοδραστικό εντερικό πεπτίδιο (**V**asoactive **I**ntestinal **P**eptide)

(Ca²⁺) = ιόντα Ασβεστίου

(Cl⁻) = ιόντα Χλωρίου

(K⁺) = ιόντα Καλίου

(Na⁺) = ιόντα Νατρίου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Πρόσφατες πληροφορίες δείχνουν ότι ο ιππόκαμπος μπορεί να διαφοροποιείται λειτουργικά κατά μήκος του άξονά του. Θεωρείται δηλαδή ότι ο κοιλιακός ιππόκαμπος είναι αποσυνδεδεμένος από την υπόλοιπη δομή όσον αφορά τις ενδο- και εξωιπποκάμπειες διασυνδέσεις και μπορεί να λειτουργεί με ποιοτικά διαφορετικό τρόπο ή ακόμα και ανεξάρτητα από το ραχιαίο ιππόκαμπο. Πιο συγκεκριμένα, ο κοιλιακός ιππόκαμπος φαίνεται να εμφανίζει μεγαλύτερη διεγερσιμότητα σε σχέση με τον ραχιαίο. Έχει ήδη αναδειχθεί η μικρότερη αναστολή οφειλόμενη σε διέγερση των GABA_A και GABA_B υποδοχέων στον κοιλιακό ιππόκαμπο.

Σκοπός της εργασίας ήταν η μελέτη της διαφοράς της μετασυναπτικής διέγερσης που οφείλεται στη δραστηριότητα των NMDA υποδοχέων των CA1 πυραμιδικών κυττάρων μεταξύ κοιλιακού και ραχιαίου ιπποκάμπου. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκαν ενδοκυττάρειες καταγραφές σε τομές ιπποκάμπου επίμυος και μελετήθηκαν τα μετασυναπτικά διεγερτικά δυναμικά που ελήφθησαν ύστερα από διέγερση των παραπλεύρων του Schaffer.

Βρέθηκε ότι το πλάτος των διεγερτικών μετασυναπτικών δυναμικών ήταν σημαντικά μεγαλύτερο στον κοιλιακό ($4,3 \pm 0,6$ mV) από ότι στον ραχιαίο ιππόκαμπο ($2,1 \pm 0,4$ mV), ενώ η διάρκεια των δυναμικών δεν παρουσίαζε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο μοιρών του ιπποκάμπου (κοιλιακός: $52,0 \pm 1,2$ ms, ραχιαίος: $46,7 \pm 3,2$ ms).

Αν και ο αριθμός των νευρώνων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μικρός ($n = 6$), τα παραπάνω ευρήματα συνηγορούν στην παρατηρούμενη μεγαλύτερη διεγερσιμότητα του κοιλιακού ιπποκάμπου σε σχέση με τον ραχιαίο.

ABSTRACT

Recent data have shown that the hippocampus is functionally differentiated along its dorsoventral (septotemporal) axis. It is suggested that the ventral hippocampus (VH) is to some extent disconnected from the rest of the structure both in terms of intrahippocampal and extrahippocampal connections, and may be involved in functions that are qualitatively different from, and independent of those of the dorsal hippocampus (DH). More specifically, it has been reported that the ventral part of the hippocampus is more excitable compared to the dorsal part. It has already been shown that GABA_A and GABA_B synaptic inhibition is weaker in the ventral hippocampus.

The aim of this thesis was to explore the possibility that NMDA-mediated synaptic potentials differ between dorsal and ventral hippocampus. For this purpose intracellular recordings were made from pyramidal neurons of rat hippocampal slices and the NMDA-mediated postsynaptic potentials (EPSPs) elicited by stimulation of Schaffer collaterals were studied.

The amplitude of the EPSPs was significantly higher in the ventral ($4,3 \pm 0,6$ mV) than in the dorsal ($2,1 \pm 0,4$ mV) hippocampus. On the other hand, the duration of the EPSPs was not significantly different between the two hippocampal regions (VH: $52,0 \pm 1,2$ ms, DH: $46,7 \pm 3,2$ ms).

Despite the limited number of the cells studied ($n = 6$), the above findings support the higher excitability observed in ventral compared to dorsal hippocampus.

ΜΕΡΟΣ 1^ο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1: Γενικά χαρακτηριστικά του ιπποκάμπου

Ο ιππόκαμπος ή ιπποκάμπειος σχηματισμός είναι μια μεγάλη δομή με σχήμα “C” η οποία αποτελεί μέρος του έσω τοιχώματος του εγκεφαλικού ημισφαιρίου. Το όνομά του προέρχεται από τον ιππόκαμπο, το γνωστό θαλάσσιο άλογο, με το οποίο προσομοιάζει σε μετωπιαία διατομή.

Ο ιππόκαμπος είναι μια δομή του εγκεφάλου η οποία αποτελεί μέρος του επιχειλίου ή μεταιχμιακού συστήματος. Παρόλο που βρίσκεται υποκάτω του εγκεφαλικού φλοιού δεν είναι πράγματι μια υποφλοιώδης δομή, αλλά ένας αυτοαναδιπλούμενος αρχαιοφλοιός πολύ πιο παλιός και περισσότερο πρωτογενής από τον περιβάλλοντα νεοφλοιό (Nieuwenhuys et al., 1997).

1.1.1: Ανατομία του Ιπποκάμπου

Ο ιππόκαμπος αποτελεί το κύριο μέρος του αρχαιοφλοιού. Βρίσκεται βαθιά στην έσω επιφάνεια του κροταφικού λοβού, καλυπτόμενος κατά μεγάλο μέρος από την παραϊπποκάμπεια έλικα. Έχει επίμηκες σχήμα με δακτυλιοειδή επάρματα (Nieuwenhuys et al., 1997).

Είναι δυνατό να διαιρεθεί μορφολογικά σε τρεις μοίρες: την προσυνδεσμική, την υπερσυνδεσμική και την οπισθοσυνδεσμική. Οι δύο πρώτες μοίρες είναι σχετικώς μικρές υποτυπώδεις δομές, ενώ ο οπισθοσυνδεσμικός ιππόκαμπος είναι καλά ανεπτυγμένος και αντιπροσωπεύει την κύρια μοίρα του ιπποκάμπειου σχηματισμού. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα ονόματα των τριών μοιρών αναφέρονται σε σχέση με το μεσολόβιο.

Ο οπισθοσυνδεσμικός ιππόκαμπος διαφοροποιείται σε τρεις δομές με επιμήκη διάταξη, την *οδοντωτή έλικα* (dentate gyrus), το *Αμμώνιο κέρασ* (Cornu Ammon, CA) και το *υπόθεμα του ιπποκάμπου* (subiculum). Η οδοντωτή ταινία είναι μορφολογικώς το εσώτερο τμήμα του φλοιού. Προς τα έξω συνεχίζεται με το Αμμώνιο κέρασ, το οποίο με τη σειρά του συνεχίζεται με το υπόθεμα του ιπποκάμπου. Λόγω της πτύχωσης του ιπποκάμπου, η οδοντωτή ταινία βρίσκεται πάνω από την αύλακα του ιπποκάμπου και το υπόθεμα κάτω από την αύλακα αυτή. Η οδοντωτή ταινία περιέχει μια κοκκιώδη στοιβάδα με μικρούς νευρώνες, ενώ μεγάλα πυραμιδικά κύτταρα επικρατούν στο Αμμώνιο κέρασ και στο υπόθεμα του ιπποκάμπου.

Μπορούμε να πούμε πως ο ιπποκάμπειος σχηματισμός είναι μια δίπλευρη επιχείλια δομή η οποία αποτελείται από δύο υπό μορφή “Cs” δομές που συγκλίνουν στην κορυφή και εκτείνονται χωριστά στη βάση (Amaral and Witter, 1989).

Το κορυφαίο τμήμα του σχηματισμού είναι γνωστό σαν ραχιαίος ιππόκαμπος και λόγω της εγγύτητάς του με το διάφραγμα (septum), μια δομή στον διάμεσο εγκέφαλο, ονομάζεται διαφραγματικός πόλος (septal pole). Η διαδρομή του κάθε ιπποκάμπειου σχηματισμού ακολουθεί τις μεσαίες όψεις του κοιλιακού δαπέδου της πλευρικής κοιλίας, που πραγματοποιείται στο κάτω άκρο που καλείται κοιλιακός πόλος (temporal pole) (Amaral and Witter, 1989).

Η εσωτερική δομή του ιπποκάμπου παραμένει ίδια καθ’ όλο το μήκος του και αποτελείται από μια αναδιπλούμενη συνέλιξη του εξελιγμένου παλαιού και περισσότερο απλού (με λιγότερα στρώματα κυττάρων) αρχαιοφλοιού. Σε κάθετη διατομή προς τον διαμήκη άξονά του (κοιλιακός – ραχιαίος), η εσωτερική δομή του ιπποκάμπειου σχηματισμού αποκαλύπτεται σαν δύο συναρμοσμένα “Cs”, το ένα ανάστροφα σε σχέση με το άλλο, καθένα με την δική του κύρια κυτταρική στοιβάδα. Το ένα “C” αποτελεί το Κέρας του Αμμωνίου, συχνά αναφερόμενο και σαν κύριος ιππόκαμπος (*Hippocampus proper*) (Amaral, 1978; Amaral and Witter, 1989; Bayer, 1985; Andersen, 1975; Witter, 1989). Η κύρια κυτταρική στοιβάδα του Αμμωνίου κέρατος είναι η στοιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων. Το άλλο “C” του ιπποκάμπειου σχηματισμού σχηματίζεται από την οδοντωτή έλικα - το όνομα της οποίας αναφέρεται στα οδοντώματα της επιφάνειάς της - και είναι μορφολογικώς το εσώτερο τμήμα του φλοιού. Η κύρια στοιβάδα της οδοντωτής έλικας είναι η στοιβάδα των κοκκιωδών κυττάρων. Η οδοντωτή έλικα, αν και θεωρείται μέρος του ιπποκάμπου, βρέθηκε ότι διαφέρει από τον κύριο ιππόκαμπο ως προς την αρχιτεκτονική των κυττάρων της (Amaral, 1978; Amaral and Witter, 1989; Bayer, 1985; Andersen, 1975; Witter, 1989). Εν τούτοις, μερικές φορές η πύλη της οδοντωτής έλικας (hilus), δηλαδή η περιοχή που βρίσκεται εσωτερικά του “C”, και αποτελείται από κοκκιώδη κύτταρα, αναφέρεται και σαν CA4 περιοχή.

Τα περισσότερα τμήματα του φλοιού του ιπποκάμπου είναι δυνατόν να διαιρεθούν με βάση τόσο την κυτταροαρχιτεκτονική τους, όσο και τις συνδέσεις τους. Συνοπτικά, είναι δυνατό να αναφερθεί ότι στο Αμμώνιο κέρατος διακρίνονται τέσσερα διαφορετικά πεδία τα οποία χαρακτηρίζονται σαν CA1 – CA3. Το πεδίο CA1 είναι εξαιρετικά ανεπτυγμένο στον άνθρωπο και τους άλλους πρωτεύοντες (Niewenhuys et al., 1997).

Η περιοχή CA1 συνορεύει με το υπόθεμα του ιπποκάμπου. Ουσιαστικά αποτελεί την μεταβατική ζώνη μεταξύ του Αμμωνίου κέρατος και του παρακείμενου ρινικού φλοιού. Το

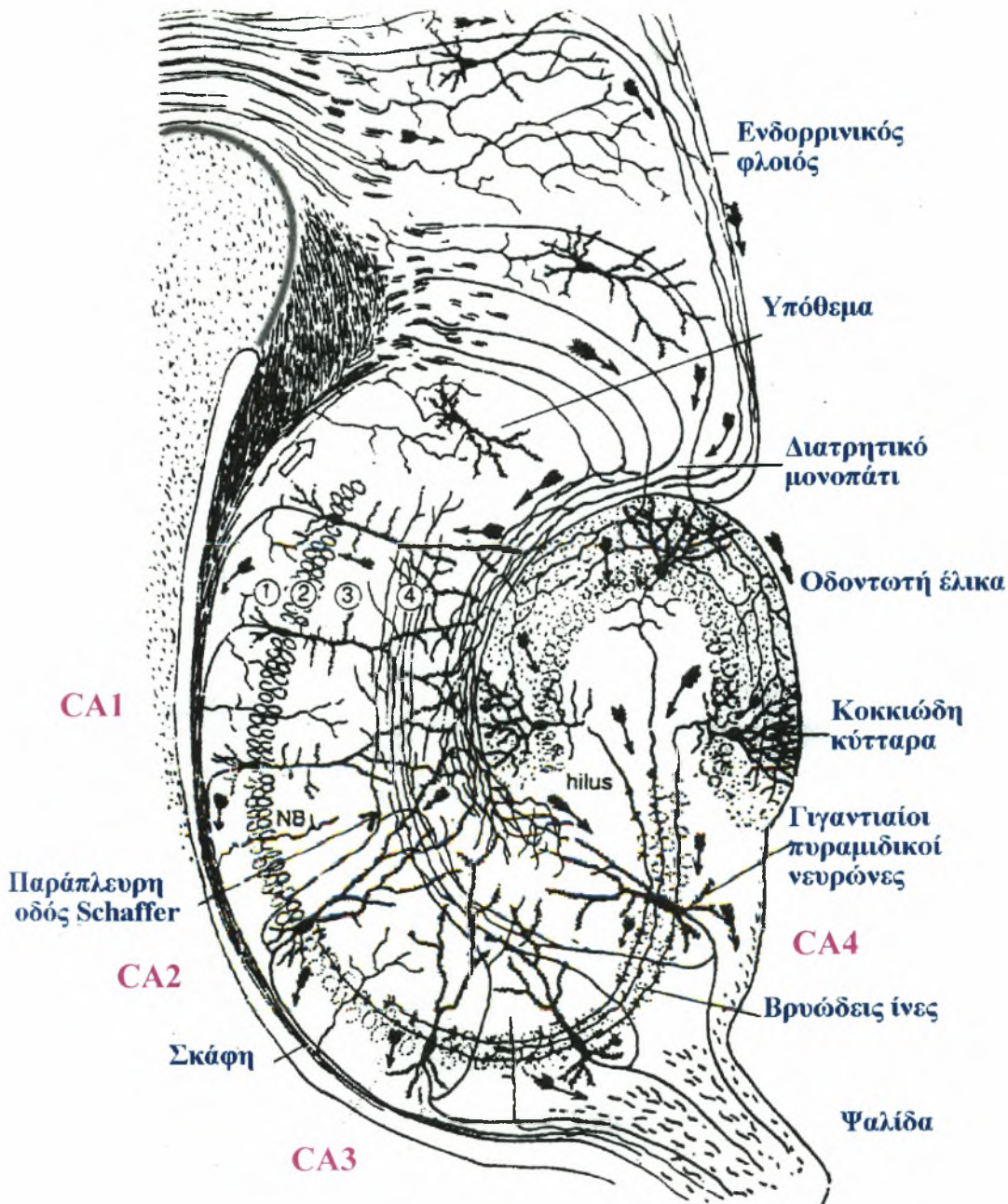
υπόθεμα χαρακτηρίζεται από μεγάλα πυραμιδικά κύτταρα, σε χαλαρή διάταξη, και με τελείως διαφορετική νευροφυσιολογική συμπεριφορά από τα κύτταρα της πυραμιδικής στοιβάδας (Balboni et al., 1993).

Στην ραχιαία επιφάνεια του ιπποκάμπου, προς την επιφάνεια του κροταφικού λοβού, υπάρχει μια πλατιά μνέλινη ταινία η παρυφή του ιπποκάμπου, που κάτω από το μεσολόβιο μεταβαίνει στην ψαλίδα (fornix), η οποία πορευόμενη τοξοειδώς καταλήγει στα μαστία.

Στοιβάδες του ιπποκάμπου

Στο Αμμώνιο κέρας διακρίνονται (με κατεύθυνση από την επιφάνεια προς τα μέσα) οι εξής στοιβάδες οι οποίες υφίστανται καθ' όλο το μήκος του ιπποκάμπου (Balboni et al, 1993; Shepherd, 1990, Εικόνες 1.1 και 1.2):

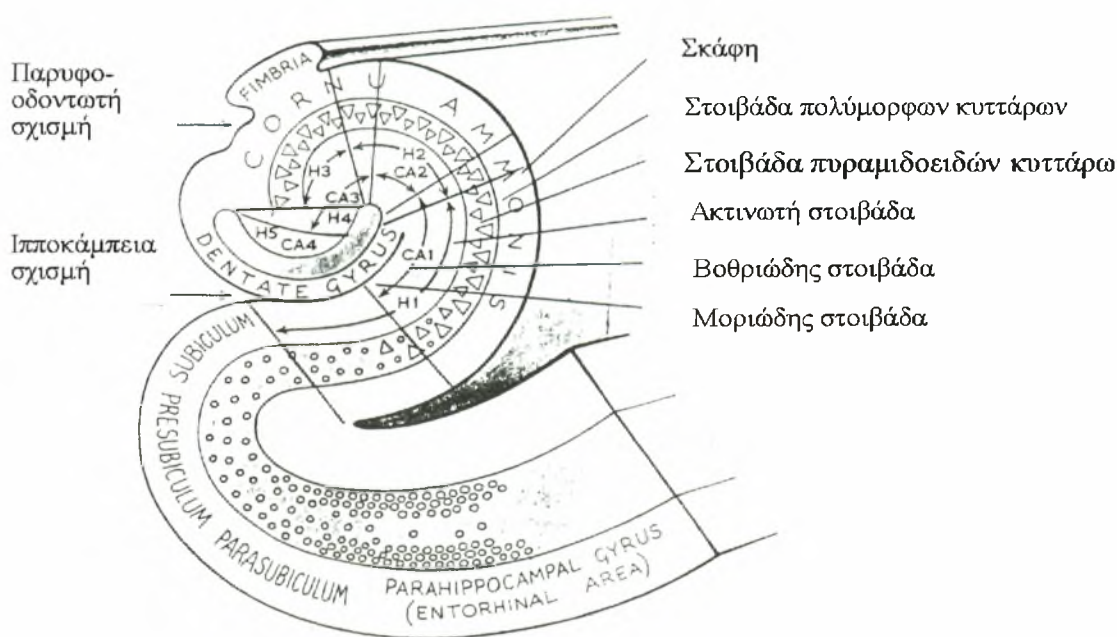
- Το επένδυμα (*ependyma*).
- Η σκάφη (*alveus*). Είναι μια λευκή στοιβάδα αποτελούμενη από ίνες προσαγωγές και απαγωγές προς τον ιππόκαμπο. Οι απαγωγές αποτελούνται από τους άξονες των πυραμιδικών κυττάρων και του υποθέματος και συγκλίνει στην παρυφή της ψαλίδας, δίνοντας παράλληλα και μικρές παράπλευρες ίνες που επανεισέρχονται στον ιππόκαμπο. Οι απαγωγές ίνες είναι συνήθως συνδεσμικές ομοτοπικές ή προέρχονται από διαφορετικές περιοχές του ετερόπλευρου ιππόκαμπου.
- Η στοιβάδα των πολύμορφων κυττάρων (*stratum oriens*). Αποτελείται κυρίως από τους βασικούς δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων και περιέχει και ενδονευρώνες. Διασχίζεται από απαγωγές και προσαγωγές ίνες.
- Η πυραμιδική στοιβάδα (*stratum pyramidale*). Αποτελείται από νευρικά κύτταρα μεσαίου και μεγάλου μεγέθους, τα πυραμιδικά κύτταρα, των οποίων η βάση είναι προσανατολισμένη προς τη στοιβάδα των πολύμορφων κυττάρων ενώ η κορυφή είναι προσανατολισμένη προς την ακτινωτή στοιβάδα. Οι κορυφιαίοι δενδρίτες των κυττάρων αυτών διασχίζουν την ακτινωτή στοιβάδα για να καταλήξουν στην βοθριώδη – μοριακή στοιβάδα. Οι άξονες των πυραμιδικών κυττάρων κατευθύνονται προς την σκάφη και συνεχίζουν στην ψαλίδα.
- Η διαφανής στοιβάδα (*stratum lucidum*). Στην στοιβάδα αυτή οι βρυώδεις ίνες προβάλλουν στους εγγύς (proximal) δενδρίτες των πυραμιδικών νευρώνων. Η διαφανής



Εικόνα 1.1: Στοιχεία του ιπποκάμπειου σχηματισμού. Διακρίνονται: το υπόθεμα, μέρος του ενδορρινικού φλοιού, η οδοντωτή έλικα, και οι περιοχές CA1 – CA4. Ο κυρίως ιππόκαμπος απαρτίζεται από: (1) Πολυμορφική στοιβάδα, (2) Στοιβάδα πυραμιδικών κυττάρων, (3) Ακτινωτή στοιβάδα και (4) Βοθριώδη – μοριώδη στοιβάδα. Τα γιγαντιαία πυραμιδικά κύτταρα της CA3 περιοχής προβάλλουν, μέσω των παράπλευρων οδών Schaffer, στα πυραμιδικά κύτταρα της CA1 περιοχής, και δια μέσου συνδεσμικών ινών (commisure via fibres) στη σκάφη του ετερόπλευρου ιπποκάμπου. Κοκκιοειδή κύτταρα της οδοντωτής έλικας στέλνουν βρυώδεις ίνες στα πυραμιδικά κύτταρα της CA3 περιοχής (Χειρόγραφο σχέδιο των Ramon y Cajal, 1911).

στοιβάδα δεν είναι πολύ εμφανής στον άνθρωπο όσο σε άλλα πρωτεύοντα. Επίσης δεν είναι παρούσα στα πεδία CA1 και CA2.

- Η ακτινωτή στοιβάδα (*stratum radiatum*). Αποτελείται από τους κορυφαίους δενδρίτες των πυραμδικών κυττάρων, από τους εγγύς δενδρίτες των πυραμδικών κυττάρων και από ενδονευρώνες.
- Η βοθριώδης – μοριώδης στοιβάδα (*stratum lacunosum – moleculare*). Σχηματίζεται από τους άπω (distal) δενδρίτες των πυραμδικών κυττάρων και από ενδονευρώνες.



Εικόνα 1.2: Στοιβάδες του ιπποκάμπειου σχηματισμού

Οι άξονες των πυραμδικών κυττάρων των πεδίων CA2 και CA3 οι οποίοι προβάλλουν στο πεδίο CA1 ονομάζονται παράπλευροι του Schaffer (Schaffer collaterals), και καταλήγουν κυρίως στην ακτινωτή στοιβάδα αλλά και στην στοιβάδα των πολύμορφων κυττάρων (Shepherd, 1990; Williams et al., 1995). Οι προβολές από τον ενδορρινικό φλοιό καταλήγουν στην οδοντωτή έλικα μέσω του διατηρητικού μονοπατιού, και στην συνέχεια ταξιδεύουν στην βοθριώδη – μοριακή στοιβάδα όπου οι ίνες τους συνάπτονται με τους κορυφαίους δενδρίτες των πυραμδικών κυττάρων (Εικόνα 1.2).

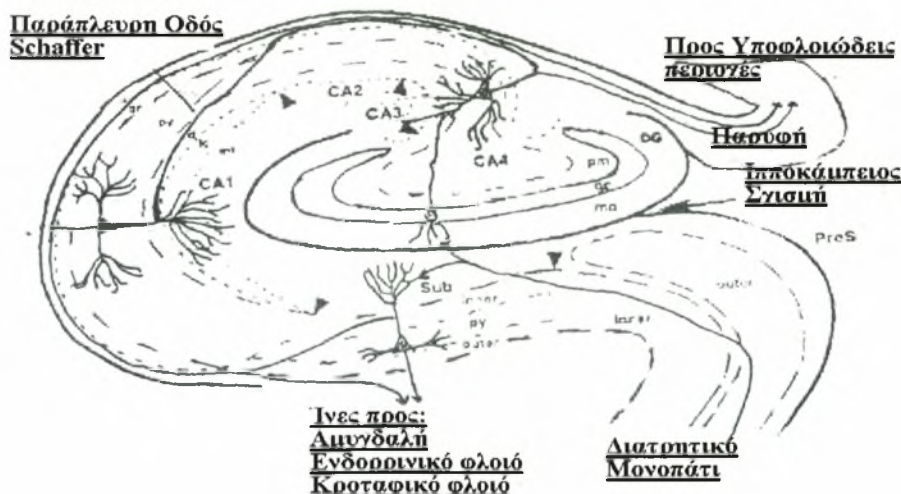
Τρισυναπτικό Κύκλωμα:

Μετά από τομή του ιπποκάμπου, ως προς τον διαμήκη του άξονα (ραχιαίο – κοιλιακό), εύκολα διακρίνεται ένα σύνολο από τρία συνδεδεμένα μονοπάτια γνωστό ως “τρिसυναπτικό κύκλωμα” (Εικόνες 1.1, 1.3) (Andersen, 1975; Swanson 1977; Swanson et al., 1981; Swanson, 1982).

Συγκεκριμένα, το τρισυναπτικό αυτό κύκλωμα δημιουργείται ως εξής:

- 1) Οι στοιβάδες I και II (ή επιφανειακές στοιβάδες) του ενδορρινικού φλοιού προβάλλουν στα κοκκιώδη κύτταρα της οδοντωτής έλικας μέσω του διατρητικού μονοπατιού (perforant path).
- 2) Τα κοκκιώδη κύτταρα της οδοντωτής έλικας προβάλλουν στα ευμεγέθη πυραμιδικά κύτταρα του Κέρατος του Αμμωνίου, και συγκεκριμένα στο πεδίο CA3, μέσω του συστήματος των βρυωδών ινών (mossy fibers).
- 3) Τα πυραμιδικά κύτταρα της CA3 περιοχής προβάλλουν σε αυτά της CA1 περιοχής μέσω του συστήματος των παράπλευρων κλάδων του Schaffer.

Στην συνέχεια, το CA1 πεδίο προβάλλει έντονα στο υπόθεμα, και έτσι κλείνει το κύκλωμα καταλήγοντας πάλι στον ενδορρινικό φλοιό (Swanson, 1977, 1982).



Εικόνα 1.3. : Το τρισυναπτικό μονοπάτι: Ένα πολύπλοκο εσωτερικό κύκλωμα μοναδικό στον ιππόκαμπο. Αποτελείται από τρία συνεχόμενα και μεταξύ τους συνδεδεμένα νευρωνικά μονοπάτια στο εσωτερικά και εξωτερικά του ιπποκάμπου.

- 1) Ενδορρινικός φλοιός: προβάλλει στα κύτταρα της οδοντωτής έλικας δια μέσου της διατρητικού μονοπατιού.
- 2) Τα κοκκιώδη κύτταρα της οδοντωτής έλικας προβάλλουν στα πυραμιδικά κύτταρα του Αμμωνίου Κέρατος και στο πεδίο CA3, μέσω του συστήματος των βρυωδών ινών.
- 3) Τα CA3 πυραμιδικά κύτταρα προβάλλουν στα CA1, μέσω του συστήματος των παράπλευρων κλάδων Schaffer.

1.1.2: Συνδέσεις του ιπποκάμπου

- Εσωτερικές συνδέσεις του ιπποκάμπου

Η κύρια ροή των πληροφοριών στον ιππόκαμπο θεωρείται ότι πραγματοποιείται με το τρισυναπτικό κύκλωμα.

Οι ίνες που προορίζονται για την οδοντωτή έλικα προέρχονται από όλα τα τμήματα της ενδορρινικής περιοχής και συγκροτούν την γνωστή ως κροταφο-αμμώνια ή διατιτραίνουσα οδό. Οι ίνες της μεγάλης αυτής δεσμίδας δεν απολήγουν αποκλειστικά στην οδοντωτή έλικα αλλά πορεύονται και προς άλλες μοίρες του ιπποκάμπειου σχηματισμού, δηλαδή προς το φλοιό του υποθέματος του ιπποκάμπου και προς τα διάφορα πεδία του Αμμωνίου κέρατος. Οι νευράξονες των κοκκιωδών κυττάρων της οδοντωτής έλικας οι οποίοι συγκροτούν το ιπποκάμπειο σύστημα βρυωδών ιών, απολήγουν ακολουθώντας τοπογραφική οργάνωση, στα πυραμιδικά κύτταρα του πεδίου CA3. Οι κύριες ενδοϊπποκάμπειες ίνες του πεδίου CA3 που πορεύονται προς το πεδίο CA1 αποτελούν τη γνωστή παράπλευρη οδό του Schaffer, όπως ήδη έχει προαναφερθεί. Οι περισσότερες από τις εσωτερικές συνδέσεις που αναφέρθηκαν εμφανίζουν εγκάρσια διάταξη σε σχέση με τον επιμήκη άξονα του ιπποκάμπου (Nieuwenhuys et al., 1997).

- Προσαγωγές ίνες του ιπποκάμπου

Ο ιππόκαμπος δέχεται προσαγωγές ίνες οι οποίες εκπορεύονται από:

(I) Διάφορες περιοχές του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων.

Οι περισσότερες ίνες της ογκώδους αυτής φλοιοϊπποκάμπειας σύνδεσης απολήγουν στον ενδορρινικό φλοιό στην έκφυση της διατιτραίνουσας οδού, άλλες ίνες πραγματοποιούν συνάψεις στην περιρρινική και στην ενδορρινική περιοχή, και άλλες παρακάμπτουν τον ενδορρινικό φλοιό και απολήγουν απ' ευθείας στο φλοιό του υποθέματος του ιπποκάμπου. Ο ενδορρινικός φλοιός δέχεται άφθονες ίνες από οπτικά, ακουστικά, σωματοαισθητικά και συνειρμικά πεδία, ενώ ίνες που εκφύονται από σύνθετα συνειρμικά πεδία απολήγουν απ' ευθείας στον ιππόκαμπο.

Επειδή η ενδορρινική περιοχή δέχεται και οσφρητικές πληροφορίες είτε από τον οσφρητικό βολβό είτε από τον προαπιοειδή φλοιό, είναι πιθανό οι πληροφορίες που φθάνουν στον ιππόκαμπο να προέρχονται από όλες τις αισθήσεις (Nieuwenhuys et al., 1997).

(II) Την αμυγδαλή.

Ο ιππόκαμπος και ο ενδορρινικός φλοιός δέχονται σημαντικό αριθμό ιών από την αμυγδαλή κυρίως από τους έξω και από τους βασικούς αμυγδαλικούς πυρήνες, αλλά και από τον έσω αμυγδαλικό πυρήνα (Nieuwenhuys et al., 1997).

(III) Τον έσω πυρήνα του διαφράγματος.

Οι ίνες αυτές καταλήγουν στην οδοντωτή έλικα και στην παρακείμενη περιοχή του Αμμωνίου κέρατος. Ο έσω πυρήνας του διαφράγματος περιέχει μεγάλο αριθμό χολινεργικών νευρώνων και είναι δυνατό να συμπεράνουμε ότι οι πολυάριθμες χολινεργικές ίνες του ιπποκάμπειου σχηματισμού προέρχονται από τους νευρώνες αυτούς. Εν τούτοις, οι ίνες που εκπορεύονται από τον έσω πυρήνα του διαφράγματος προς τον ιππόκαμπο δεν είναι όλες χολινεργικές, και είναι δυνατό να υπάρχουν και άλλοι νευροδιαβιβαστές, όπως το GABA και η ουσία P (Nieuwenhuys et al., 1997).

(IV) Τον θάλαμο.

Ο ιππόκαμπος δέχεται ίνες από τους πρόσθιους πυρήνες και το σύμπλεγμα των πυρήνων της μέσης γραμμής του θαλάμου. Οι ίνες των πρόσθιων πυρήνων του θαλάμου απολήγουν στο υπόθεμα, αποτελώντας μέρος ενός κυκλώματος που χαρακτηρίζει τον ιππόκαμπο και ονομάζεται κύκλωμα του Papez. Οι ίνες των θαλαμικών πυρήνων της μέσης γραμμής απολήγουν στον ενδορρινικό φλοιό, στο φλοιό του υποθέματος και στην CA1 περιοχή του ιπποκάμπου (Nieuwenhuys et al., 1997).

(V) Την υπερμαστική περιοχή.

Μέσω της ψαλίδας φτάνει στον ιππόκαμπο ένας σημαντικός αριθμός ινών. Οι περισσότερες από τις ίνες αυτές απολήγουν στην οδοντωτή έλικα και στο πεδίο CA3 του Αμμωνίου κέρατος (Nieuwenhuys et al., 1997).

(VI) Τους μεσεγκεφαλικούς πυρήνες της ραφής και τον υπομέλανα τόπο.

Ο ιππόκαμπος περιέχει νοραδρενεργικές και σεροτονινεργικές ίνες. Οι νοραδρενεργικές ίνες εκφύονται από τον υπομέλανα τόπο, ενώ οι σεροτονινεργικές ίνες εκφύονται από τους μεσεγκεφαλικούς πυρήνες της ραφής (Nieuwenhuys et al., 1997).

• Απαγωγές ίνες του ιπποκάμπου

Οι απαγωγές ίνες του ιπποκάμπου είναι δυνατό να ταξινομηθούν ως εξής:

(I) Ίνες του Αμμωνίου κέρατος.

Οι ίνες αυτές προβάλλουν στον έξω πυρήνα του διαφράγματος και είναι πιθανώς γλουταμινεργικές (Nieuwenhuys et al., 1997).

(II) Ίνες του υποθέματος του ιπποκάμπου για την προσυνδεσμική ψαλίδα.

Οι ίνες της προσυνδεσμικής ψαλίδας που εκφύονται από το υπόθεμα του ιπποκάμπου καταλήγουν στον έξω πυρήνα του διαφράγματος, στον επικλινή πυρήνα, στον προσυνδεσμικό ιππόκαμπο, και στην έσω μοίρα του μετωπιαίου φλοιού (Nieuwenhuys et al., 1997).

(III) Ίνες του υποθέματος του ιπποκάμπου για την μετασυνδεσμική ψαλίδα.

Ίνες της μετασυνδεδεσμικής ψαλίδας που εκφύονται από το υπόθεμα του ιπποκάμπου καταλήγουν στα μαστία, ενώ μερικές διανέμονται στον πρόσθιο πυρήνα του θαλάμου, και στην περιοχή του κουλιακού-έσω πυρήνα του υποθαλάμου. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μετασυνδεδεσμική ψαλίδα περιέχει σχεδόν αποκλειστικά ίνες που εκπορεύονται από το υπόθεμα του ιπποκάμπου, με μόνη εξαίρεση μερικές ίνες που προβάλλουν στον ιπποκάμπο (Nieuwenhuys et al., 1997).

(IV) «Μη ψαλίδες» ίνες.

Μεγάλος αριθμός ινών που εκφύονται από τον ιπποκάμπο προβάλλουν στον ενδορρινικό φλοιό, στην αμυγδαλή και σε περιοχές του γειτονικού έσω κροταφικού φλοιού (Nieuwenhuys et al., 1997).

1.1.3: Νευροχημεία του ιπποκάμπου

Η μετάδοση σημάτων μεταξύ των νευρώνων του ιπποκάμπου επιτυγχάνεται μέσω χημικών συνάψεων. Κατά τη χημική συναπτική διαβίβαση απελευθερώνεται από τον προσυναπτικό νευρώνα ένας νευροδιαβιβαστής ο οποίος στη συνέχεια διαχέεται στη συναπτική σχισμή και προσδένεται σε υποδοχείς της μετασυναπτικής κυτταρικής μεμβράνης. Χαρακτηριστικό είναι ότι ο υποδοχέας και όχι ο διαβιβαστής, είναι εκείνος που καθορίζει το κατά πόσον η συναπτική απόκριση είναι διεγερτική ή ανασταλτική. Η άμεσα ελεγχόμενη χημική διαβίβαση είναι πιο βραδεία, διότι χρειάζεται αρκετά μετασυναπτικά επιπλέον στάδια: οι υποδοχείς συζευγνύονται με ένζυμα που συνθέτουν δεύτερους αγγελιοφόρους οι οποίοι δρουν στη συνέχεια σε δομικά διαφορετικούς διαύλους ιόντων (Kandel et al., 1999).

Παρά το γεγονός ότι ακόμα και οι ταχύτεροι χημικοί μηχανισμοί είναι πιο βραδείς από την ηλεκτρική συναπτική διαβίβαση, η χημική διαβίβαση έχει το πλεονέκτημα ότι ένα και μόνο δυναμικό ενέργειας απελευθερώνει χιλιάδες μόρια νευροδιαβιβαστή, παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα ενίσχυσης των σημάτων από τον ένα νευρώνα στον άλλο. Ίσως επειδή η διεργασία αυτή περιλαμβάνει πολλά στάδια, η χημική διαβίβαση είναι δυνατόν να μεταβληθεί περισσότερο από ότι η ηλεκτρική διαβίβαση (Kandel et al., 1999).

Ένας μεγάλος αριθμός νευροδιαβιβαστών έχουν παρατηρηθεί και μελετηθεί στον ιπποκάμπο. Το γ-αμινοβουτυρικό (GABA) είναι πιθανώς ο βασικός ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής, η νορεπινεφρίνη και η ακετυλοχολίνη (ACh) αποτελούν τους βασικούς ρυθμιστές του ιπποκάμπου, ενώ το γλουταμινικό είναι ο πιο σημαντικός διεγερτικός νευροδιαβιβαστής της περιοχής. Υπάρχουν επίσης αρκετές άλλες ουσίες, όπως η σεροτονίνη, τα οπιοειδή και το αγγειοδραστικό εντερικό πολυπεπτίδιο (VIP) τα οποία

εμφανίζονται να υπάρχουν σε σημαντικές ποσότητες στον ιππόκαμπο (Williams et al., 1995).

- Το γ-αμινοβουτυρικό οξύ: Όπως ήδη αναφέρθηκε, αποτελεί τον κύριο ανασταλτικό νευροδιαβιβαστή τόσο για τα σώματα όσο και για τους δενδρίτες των πυραμιδικών και κοκκιωδών κυττάρων. Οι δύο διαφορετικοί υπότυποι GABA υποδοχέων παρουσιάζουν διαφορετικές κατανομές, με τον GABA_A υποδοχέα να υπερτερεί στα σώματα και τον GABA_B υποδοχέα να υπερτερεί στους δενδρίτες των νευρώνων του ιπποκάμπου (Shepherd, 1990; Williams et al., 1997).

GABAεργικοί νευρώνες εντοπίζονται και στις εν τω βάθει περιοχές της οδοντωτής έλικας (καλαθοκύτταρα), ενώ η υψηλότερη συγκέντρωση των GABA υποδοχέων εντοπίζεται στη μοριακή στοιβάδα της οδοντωτής έλικας. Στον κυρίως ιππόκαμπο GABAεργικά κύτταρα εντοπίζονται κυρίως στην στοιβάδα των πολύμορφων κυττάρων, αλλά επίσης και στην πυραμιδική και στην ακτινωτή στοιβάδα (Shepherd, 1990; Williams et al., 1995).

- Η ακετυλοχολίνη: Η ακετυλοχολίνη απαντάται ευρέως στον ιππόκαμπο, όπου και έχει νευρορυθμιστική δράση. Ως επί το πλείστον απαντάται στην στοιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων. Οι χολινεργικές ίνες του ιπποκάμπου προέρχονται κυρίως από το διάφραγμα. Η δράση της ακετυλοχολίνης στα πυραμιδικά κύτταρα του ιπποκάμπου συνίσταται στη μείωση της αργής μεταϋπερπόλωσης που παρατηρείται μετά από μια σειρά δυναμικών προκαλούμενων από ενδοκυττάρια έγχυση ρεύματος (Shepherd, 1990; Williams et al., 1995).

- Η νορεπινεφρίνη: Η νορεπινεφρίνη απαντάται κυρίως στα κύτταρα της πύλης της οδοντωτής έλικας (hilus cells), και σε μικρότερο βαθμό στην ακτινωτή στοιβάδα της CA1 περιοχής. Παρόλο που η νορεπινεφρίνη είναι απαραίτητη για τον έλεγχο της διεγερσιμότητας της CA1 περιοχής δεν έχει άμεση επίδραση στις ίνες της παράπλευρης οδού του Schaffer (Shepherd, 1990; Williams et al., 1995).

- Το γλουταμινικό οξύ (Glu): Το γλουταμινικό οξύ είναι ο κύριος διεγερτικός νευροδιαβιβαστής που απαντάται στον ιππόκαμπο. Ιδιαίτερη είναι η δράση του σε τρία μονοπάτια στον ιπποκάμπειο σχηματισμό:

- α) Στο διατρητικό μονοπάτι το οποίο προέρχεται από τον ενδορρινικό φλοιό και καταλήγει κυρίως στην οδοντωτή έλικα.

- β) Στις βρυώδεις ίνες που πορεύονται από την οδοντωτή έλικα προς την CA3 περιοχή.

γ) Στις παράπλευρες ίνες του Schaffer (δηλαδή στις νευρικές απολήξεις των πυραμιδικών κυττάρων της CA3 περιοχής) που καταλήγουν στην CA1 περιοχή (Shepherd, 1990; Williams et al., 1995).

- Άλλες ουσίες που εντοπίζονται στον ιππόκαμπο: Τα κοκκιώδη κύτταρα της οδοντωτής έλικας φαίνεται να συνθέτουν το οπιοειδές πεπτίδιο δυνορφίνη το οποίο είναι επίσης παρόν και στις βρυώδεις ίνες της CA3 περιοχής, ενώ η εγκεφαλίνη φαίνεται να είναι παρούσα στις προερχόμενες από τον ενδορρινικό φλοιό ίνες (Shepherd, 1990; Williams et al., 1995).

Υπάρχει επίσης ένα πυκνό πλέγμα ινών στις οποίες ανιχνεύεται σωματοστατίνη (SS) στην μοριώδη στοιβάδα της οδοντωτής έλικας και στην βοθριώδη – μοριώδη στοιβάδα του κυρίως ιπποκάμπου. Πολυάριθμοι νευρώνες σωματοστατίνης παρατηρούνται επίσης στην στοιβάδα των πολύμορφων κυττάρων της οδοντωτής έλικας, του Αμμωνίου κέρατος και στις εν τω βάθει στοιβάδες του ενδορρινικού φλοιού. Η περιεκτικότητα των διαφόρων περιοχών του ιπποκάμπου σε SS ανιχνεύθηκε με αντιδράσεις ανοσοαντίδρασης των στοιβάδων του ιπποκάμπου στην ουσία αυτή. Βρέθηκε ότι υψηλά επίπεδα SS υπάρχουν σε περιοχές που χαρακτηρίζονται επίσης από υψηλά επίπεδα GABA, ενώ στις ίδιες περιοχές παρατηρήθηκαν επίσης και υψηλά επίπεδα του νευροπεπτιδίου Y (NPY) (Shepherd, 1990; Williams et al., 1995).

Το αγγειοδραστικό εντερικό πολυπεπτίδιο (VIP), εντοπίστηκε σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε ορισμένα πεδία του ιπποκάμπου, ενώ είναι πράγματι σύνηθες στις επιφανειακές στοιβάδες του ενδορρινικού φλοιού (Shepherd, 1990; Williams et al., 1995).

Στην πύλη της οδοντωτής έλικας εντοπίστηκαν κύτταρα χολεκυστοκινίνης (CCK). Κύτταρα χολεκυστοκινίνης εντοπίστηκαν επίσης σε όλα τα επίπεδα του κέρατος του Αμμωνίου, ειδικά στην στοιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων, καθώς επίσης και στο υπόθεμα και στον ενδορρινικό φλοιό. Οι ιπποκάμπειες CCK-ίνες φαίνεται πως προβάλλουν προς το διάφραγμα και προς τους έσω πυρήνες των μαστίων (medial mammillary nucleus), καθότι αυτές στους αρουραίους, στους πιθήκους και στον άνθρωπο εντοπίζονται στην ψαλίδα, ενώ εγκάρσια διατομή της ψαλίδας οδηγεί σε μείωση της CCK σε αυτές τις δομές (Shepherd, 1990; Williams et al., 1995).

1.1.4: Υποδοχείς αμινοξέων στον ιππόκαμπο

Στον ιππόκαμπο απαντάται ένας μεγάλος αριθμός υποδοχέων, οι οποίοι ποικίλλουν μεταξύ τους τόσο αριθμητικά όσο και ποιοτικά. Οι δύο κυριότερες κατηγορίες υποδοχέων

αμινοξέων που συναντώνται στον ιππόκαμπο είναι: **α)** οι υποδοχείς του γλουταμινικού οξέος και **β)** οι υποδοχείς του γ-αμινοβουτυρικού οξέος.

α) Υποδοχείς γλουταμινικού οξέος

Ο κύριος διεγερτικός διαβιβαστής που απελευθερώνεται στον ιππόκαμπο είναι το γλουταμινικό οξύ. Οι μετασυναπτικοί υποδοχείς γλουταμινικού διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: (I) ιοντοτρόπους και (II) μεταβολοτρόπους (Kandel et al., 1999).

(I) Οι ιοντοτρόποι υποδοχείς του γλουταμινικού ταξινομούνται περαιτέρω σε δύο μεγάλες υποομάδες: τους NMDA υποδοχείς, και τους μη-NMDA υποδοχείς (Εικόνα 1.4). Οι μη-NMDA υποδοχείς καλούνται και AMPA υποδοχείς (Kandel et al., 1999).

• *NMDA υποδοχείς*

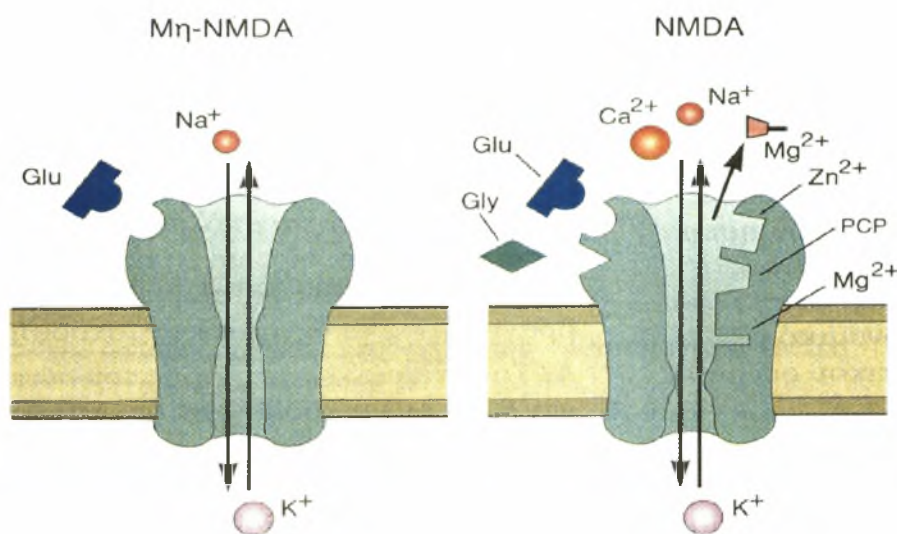
Οι NMDA υποδοχείς (Εικόνα 1.4) ενεργοποιούνται από το ανάλογο αμινοξέος NMDA (N-μεθυλο-D-ασπαρτικό) και η δράση τους αναστέλλεται από τη φαρμακευτική ουσία 2-αμινο-5-φωσφονοβαλερικό οξύ (APV). Η δράση του υποδοχέα NMDA αναστέλλεται επίσης από την ψευδαισθησιογόνο φαρμακευτική ουσία φαινοκυκλιδίνη (PCP, γνωστή ως «αγγελόσκονη») καθώς και από το MK801. Οι δύο αυτές ουσίες προσδένονται σε μία θέση που βρίσκεται στο εσωτερικό του ανοιχτού πόρου του διαύλου (Kandel et al., 1999).

Ο υποδοχέας NMDA και ο διάυλος του έχουν τέσσερις χαρακτηριστικές ιδιότητες:

- 1) Ο υποδοχέας ελέγχει έναν διάυλο κατιόντων μεγάλης αγωγιμότητας, ο οποίος είναι διαπερατός από τα ιόντα Ca^{2+} , Na^+ , και K^+ .
- 2) Η είσοδος Ca^{2+} δια μέσου του διαύλου που ενεργοποιείται από το NMDA θεωρείται ότι ενεργοποιεί ασβεστιοεξαρτώμενους «καταρράκτες» δεύτερου αγγελιοφόρου.
- 3) Ο διάυλος λειτουργεί μόνο με παρουσία γλυκίνης.
- 4) Ο διάυλος είναι μοναδικός μέχρι τώρα ανάμεσα στους διαύλους που ελέγχονται από διαβιβαστές, διότι ελέγχεται ταυτόχρονα από το γλουταμινικό οξύ και από την τάση του ρεύματος (Kandel et al., 1999).

Στο δυναμικό ηρεμίας (-65mV), το στόμιο του διαύλου-υποδοχέα NMDA φράσσεται από ένα Mg^{2+} , με αποτέλεσμα να μην συμβάλλει σχεδόν καθόλου στο φυσιολογικό συναπτικό δυναμικό. Όταν όμως η μεμβράνη εκπολώνεται παρουσία γλουταμινικού, το Mg^{2+} εκτινάσσεται από το στόμιο του διαύλου με ηλεκτροστατική απώθηση επιτρέποντας έτσι την είσοδο Na^+ και Ca^{2+} . Έτσι, η ροή ρεύματος δια μέσω του διαύλου είναι μέγιστη όταν υπάρχει γλουταμινικό οξύ και όταν ταυτόχρονα το κύτταρο έχει εκπολωθεί (Kandel et al., 1999).

Στα περισσότερα κύτταρα που έχουν υποδοχείς γλουταμινικού τύπου NMDA και μη-NMDA, η παρουσία Mg^{2+} στο εσωτερικό του διαύλου που ενεργοποιείται από το NMDA εμποδίζει τον διάυλο αυτό να συνεισφέρει σημαντικά στο διεγερτικό μετασυναπτικό δυναμικό (EPSP) στο δυναμικό ηρεμίας. Έτσι, το EPSP που παράγεται στο δυναμικό ηρεμίας εξαρτάται κυρίως από την ενεργοποίηση των μη-NMDA υποδοχέων. Ωστόσο, καθώς αυξάνεται η εκπόλωση του νευρώνα, το Mg^{2+} απομακρύνεται από το στόμιο των διαύλων NMDA. Κατά συνέπεια, ανοίγουν περισσότεροι διάυλοι NMDA και περισσότερο ρεύμα διαρρέει τους διαύλους αυτούς (Kandel et al., 1999).



Εικόνα 1.4: Ιοντοτρόποι υποδοχείς γλουταμινικού οξέος.

Το γλουταμινικό οξύ ελέγχει άμεσα δύο τύπους ιοντοτρόπων υποδοχέων. Ο υποδοχέας NMDA ρυθμίζει ένα διάυλο ο οποίος είναι διαπερατός από τα Ca^{2+} , K^+ , και Na^+ και έχει διάφορες θέσεις πρόσδεσης της γλυκίνης, του ψευδαργύρου, της φαινοκυκλιδίνης (PCP, «αγγελοσκοπη») και του Mg^{2+} που ρυθμίζουν τη λειτουργία του διαύλου με διαφορετικούς τρόπους. Παραδείγματος χάριν, στην κατάσταση ηρεμίας το Mg^{2+} αναστέλλει τη λειτουργία των διαύλων. Στους μη-NMDA υποδοχείς προσδένονται οι αγωνιστές του γλουταμινικού καϊνικού οξέ, κισκαλικό οξύ και AMPA. Οι υποδοχείς αυτοί ρυθμίζουν ένα διάυλο διαπερατό από τα Na^+ και τα K^+ (Kandel et al., 1999).

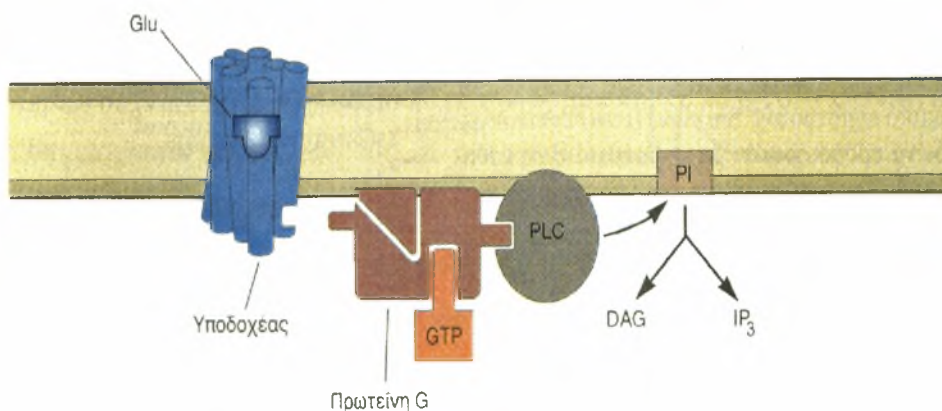
Οι διάυλοι που ενεργοποιούνται από το NMDA έχουν άλλη μία χαρακτηριστική ιδιότητα: ανοίγουν και κλείνουν με μεγάλη βραδύτητα με την παρουσία γλουταμινικού, με αποτέλεσμα να προκαλούν μια χαρακτηριστική ύστερη φάση στο EPSP. Η ύστερη φάση του EPSP που εξαρτάται από το NMDA είναι μικρή έπειτα από ένα μόνο προσυναπτικό δυναμικό ενέργειας. Ωστόσο, όταν ο προσυναπτικός νευρώνας εκπολώνεται επανειλημμένως, έτσι ώστε τα EPSP να προστίθενται και να εκπολώνουν το μετασυναπτικό

κύτταρο κατά 20mV ή και περισσότερο, ο υποδοχέας NMDA εκβάλλει το Mg^{2+} και δημιουργεί ένα πολύ ισχυρότερο ρεύμα. Έτσι, η ένταση με την οποία οι NMDA υποδοχείς συμβάλλουν στη συναπτική απάντηση εξαρτάται σημαντικά από τις επικρατούσες συνθήκες οφειλόμενες στον μέσω του Mg^{2+} τασεοεξαρτώμενο αποκλεισμό των διαύλων NMDA. Πολύ πιο σημαντικό είναι το γεγονός ότι το ρεύμα αυτό, το οποίο ενεργοποιείται από τον NMDA υποδοχέα, φέρεται σε μεγάλο βαθμό από το Ca^{2+} . Έτσι, η ενεργοποίηση του υποδοχέα NMDA, μέσω επανειλημμένων ερεθισμών, οδηγεί στην ενεργοποίηση ασβεστιοεξαρτώμενων ενζύμων και κινασών δεύτερου αγγελιοφόρου στο μετασυναπτικό κύτταρο (Kandel et al., 1999).

• Μη-NMDA υποδοχείς

Οι υποδοχείς αυτοί (Εικόνα 1.4) ονομάζονται και AMPA υποδοχείς καθώς ενεργοποιούνται από την φαρμακευτική ουσία α-αμινο-3-υδροξυ-5-μεθυλο-ισοξαζολοπροπιονικό οξύ (AMPA), ενώ η δράση τους αναστέλλεται από την 6-κυανο-7-νιτροκινοξαλινο-2,3,2-διόνη (CNQX). Οι υποδοχείς αυτοί είναι υπεύθυνοι για την ταχεία, πρώιμη αιχμή του EPSP (Kandel et al., 1999).

(II) Οι μεταβολοτρόποι υποδοχείς του γλουταμινικού οξέος (Εικόνα 1.5) αποτελούνται από μία μόνο πολυπεπτιδική επταελικοειδή αλυσίδα. Το γλουταμινικό οξύ όταν προσδένεται στον μεταβολοτρόπο υποδοχέα ενεργοποιεί και ένα δεύτερο αγγελιοφόρο.



Εικόνα 1.5: Μεταβολοτρόποι υποδοχείς γλουταμινικού οξέος.

Το γλουταμινικό οξύ ενεργοποιεί και ένα δεύτερο αγγελιοφόρο όταν προσδένεται στο μεταβολοτρόπο υποδοχέα. Η πρόσδεση διεγείρει τη δραστηριότητα του ενζύμου φωσφολιπάση C (PLC), οδηγώντας στο σχηματισμό δύο ενώσεων που δρουν ως δεύτεροι αγγελιοφόροι της 1,4,5-τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP₃) και της διακυλογλυκερόλης (DAG) (Kandel et al., 1999).

Η πρόσδεση διεγείρει τη δραστηριότητα του ενζύμου φωσφολιπάση C (PLC), οδηγώντας στο σχηματισμό δύο ενώσεων που δρουν ως δεύτεροι αγγελιοφόροι: της 1,4,5-τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP_3) και της διακυλογλυκερόλης (DAG) (Kandel et al., 1999).

β) Υποδοχείς γ-αμινοβουτυρικού οξέος (υποδοχείς GABA)

Το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) είναι ένας σημαντικός ανασταλτικός διαβιβαστής στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Το αποτέλεσμα της δράσης του GABA εξαρτάται από το είδος του μετασυναπτικού υποδοχέα. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί, πως στον ιππόκαμπο διακρίνονται δύο βασικά είδη GABA υποδοχέων: οι $GABA_A$ και οι $GABA_B$. Οι $GABA_A$ είναι ιοντοτρόποι υποδοχείς και σχετίζονται με ταχεία αγωγιμότητα των ιόντων χλωρίου (Krnjevic and Schwartz, 1986). Απενεργοποιούνται από πικροτοξίνη και μπικουκουλίνη. Οι $GABA_B$ (Bowery et al., 1980; Bowery et al., 1981) σχετίζονται με αργή αγωγιμότητα ιόντων K^+ . Οι $GABA_B$ υποδοχείς είναι μεταβολοτρόποι και ενεργοποιούν έναν «καταρράκτη» δεύτερου αγγελιοφόρου, ο οποίος τελικά ενεργοποιεί έναν διάυλο K^+ . Επίσης, αναστέλλουν τη λειτουργία των τασεοεξαρτώμενων διαύλων Ca^{2+} . Οι $GABA_B$ υποδοχείς ενεργοποιούνται από τη βακλοφένη (baclophen) (Bowery et al., 1987). Ως απενεργοποιητές των $GABA_B$ υποδοχέων χρησιμοποιούνται η φακλοφένη (phaclofen), η σακλοφένη (saclofen) και το CGP35348 (Kandel et al., 1999).

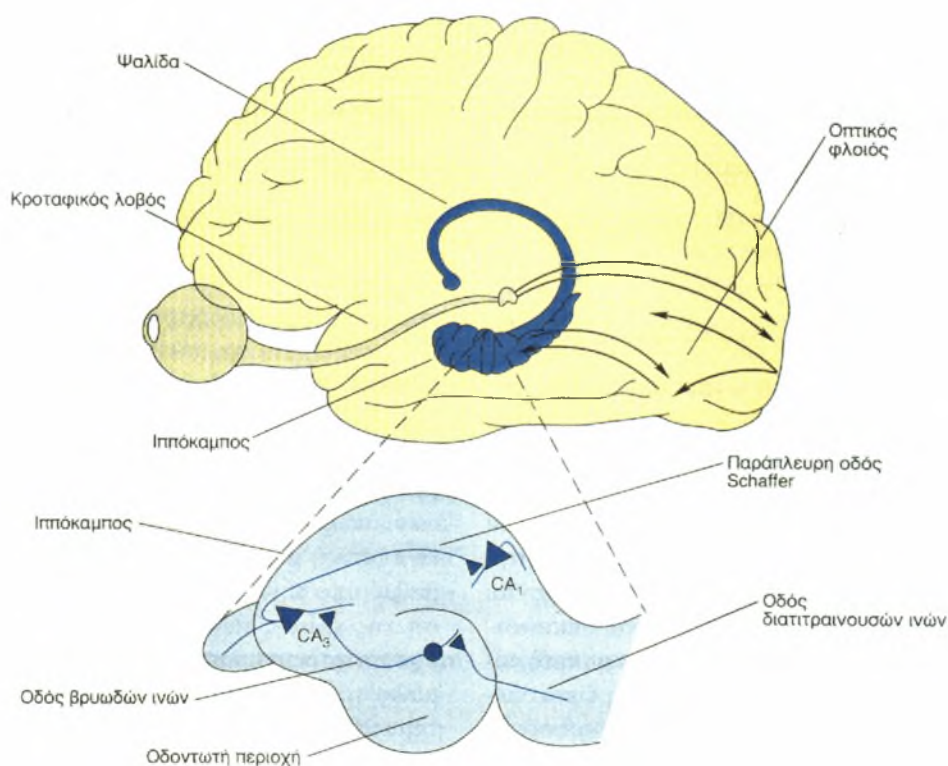
1.1.5: Συμβολή του ιπποκάμπου στη μνήμη

Ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές στον ιππόκαμπο θηλαστικών έχουν δείξει ότι δέχεται οπτικές, ακουστικές, απτικές, σπλαγχνικές, και λίγες μόνο οσφρητικές διεγέρσεις. Είναι συντονιστικό όργανο, που επηρεάζει την ορμονική, σπλαγχνική και συναισθηματική κατάσταση μέσω των συνδέσεών του με τον υποθάλαμο, τους πυρήνες του διαφράγματος και την υπερμεσολόβια έλικα.

Βλάβες στον ιπποκάμπειο σχηματισμό έχουν ως αποτέλεσμα την απώλεια της έκδηλης μνήμης. Για να ορίσουμε την έννοια «έκδηλη μνήμη» μπορούμε να πούμε πως μαθαίνουμε τι είναι ο κόσμος - αποκτώντας γνώσεις για άτομα, θέσεις και πράγματα τα οποία είναι προσιτά στην συνείδηση – χρησιμοποιώντας την έκδηλη μνήμη. Ή μαθαίνουμε πως να κάνουμε πράγματα – αποκτώντας κινητικές ή αντιληπτικές ικανότητες που είναι απρόσιτες στη συνείδηση – χρησιμοποιώντας την άδηλη μνήμη. Ο ιππόκαμπος λοιπόν θεωρείται η δομή η οποία είναι υπεύθυνη για την συνειδητή μάθηση, αλλά δεν σχετίζεται με την άδηλη μνήμη (Kandel et al., 1999).

Η αμφοτερόπλευρη αφαίρεση του ιπποκάμπου στον άνθρωπο (για τη θεραπεία της βαριάς επιληψίας) προκαλεί απώλεια της μνήμης. Παραμένουν παλαιές μνήμες ενώ οι πρόσφατες παραστάσεις διατηρούνται για λίγα μόνο λεπτά. Έτσι, σε ασθενείς με βλάβες στον ιπποκάμπειο σχηματισμό δεν παρατηρούνται προβλήματα όταν η ανάκληση γίνεται με μικρή καθυστέρηση, ενώ όταν η ανάκληση γίνεται με μεγάλη καθυστέρηση παρουσιάζουν απώλεια μνήμης, καθώς επίσης και αδυναμία στον προσανατολισμό στον χώρο (Milner, 1972; Nicholls et al., 1992; Scolville, 1954). Σε σχετική μελέτη (Kotloski et al., 2002) παρατηρήθηκε πως τραυματισμός του ιπποκάμπου είχε σαν αποτέλεσμα την απώλεια της χωρικής μνήμης με ταυτόχρονη μείωση των νευρώνων και εμφάνιση φαινομένων που προσομοιάζαν στην σκλήρωση του ιπποκάμπου. Απώλεια των νευρώνων του ιπποκάμπου και σοβαρή απώλεια μνήμης παρατηρήθηκαν επίσης και σε πειράματα που έγιναν σε αρουραίους οι οποίοι εμφάνιζαν υψηλά επίπεδα γλυκοκορτικοειδών (Landfield et al., 1981). Μερικά από τα συμπτώματα που παρατηρήθηκαν ήταν απώλεια οπτικής και λεκτικής μνήμης, αποθήκευσης και ανάκλησης πληροφοριών, κλπ.

Ο ιππόκαμπος φαίνεται ότι είναι μόνο παροδικός χώρος αποθήκευσης της μακρόχρονης μνήμης και ότι τελικά μεταβιβάζει σε άλλες περιοχές τις πληροφορίες που αποκτήθηκαν πιθανώς στον φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων, για μόνιμη αποθήκευση (Εικόνα 1.6). Παραδείγματος χάριν οι αισθητικές πληροφορίες που είναι απαραίτητες για την αναγνώριση ενός προσώπου υφίστανται επεξεργασία σε οπτικές περιοχές του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων που έχουν σχέση με την αναγνώριση προσώπων – δηλαδή στον κάτω κροταφικό φλοιό. Παράλληλα, οι οπτικές αυτές πληροφορίες για πρόσωπα μεταβιβάζονται επίσης στον ενδορρινικό φλοιό από τον οποίο εκπορεύεται η διατριαινούσα οδός δηλαδή η κύρια προσαγωγός οδός του ιπποκάμπου. Πιστεύεται, ότι τόσο ο ιππόκαμπος όσο και οι σχετικές περιοχές του κροταφικού λοβού επεξεργάζονται στη συνέχεια αυτές τις πρόσφατες πληροφορίες για περίοδο εβδομάδων ή μηνών – και τις μεταφέρουν στον φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων, πιθανώς στην περιοχή του οπτικού φλοιού η οποία έχει σχέση με την αναγνώριση προσώπων. Εναλλακτικά, ο ιππόκαμπος μπορεί να μην αποθηκεύει καθόλου μακροχρόνιες πληροφορίες, αλλά να χρησιμεύει ως «διευκολυντής» που βοηθά στην αποθήκευση των πληροφοριών οι οποίες υπέστησαν αρχικά επεξεργασία από τον κάτω κροταφικό φλοιό. Επομένως, ο ιππόκαμπος μπορεί να είναι είτε σταθμός για την μακρόχρονη μνήμη είτε σύστημα διευκόλυνσης, το οποίο είναι σημαντικό για την αποθήκευση της μνήμης σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου (Kandel et al., 1999).



Εικόνα 1.6: Ο ιππόκαμπος μπορεί να αποθηκεύσει τη μακρόχρονη μνήμη επί εβδομάδες και να τη μεταφέρει σε ειδικές περιοχές του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων. Το σχήμα δείχνει τη διεργασία αυτή για την οπτική μνήμη. Το νευρικό σήμα οδεύει προς το φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων και στη συνέχεια προς τον ιππόκαμπο, όπου αποθηκεύεται επί αρκετές εβδομάδες, πριν μεταφερθεί πίσω στο φλοιό ως μακρόχρονη μνήμη. Ο ιππόκαμπος (μεγέθυνση) έχει τρεις κύριες μετασυναπτικές οδούς, καθεμία από τις οποίες είναι ικανή για μακρόχρονη ενδυνάμωση και θεωρείται ότι παίζει ρόλο στη διεργασία της αποθήκευσης.

1.1.6: Ιππόκαμπος και επιληψία

Η επιληψία καθορίζεται ως επαναλαμβανόμενες επιληπτικές κρίσεις οι οποίες προκαλούν αιφνίδιες αλλά αναστρέψιμες μεταβολές στη λειτουργία του εγκεφάλου και χαρακτηρίζονται από παροδικές διαταραχές της σκέψης και της κίνησης. Οι επιληπτικές κρίσεις έχουν περιγραφεί από την αρχαιότητα. Αναφέρονται από τον Ιπποκράτη, το Γαληνό και τον Αβικέννα στον οποίο οφείλεται ο όρος *επιληψία*. Η επιληψία μπορεί να είναι μερική η γενικευμένη. Παραδείγματα γενικευμένης επιληψίας είναι η βαριά επιληψία (*grand mal*) και η μικρή επιληψία (*petit mal*). Ένα σημαντικό ποσοστό, που ανέρχεται περίπου στο 20-25% της

επιληψίας δεν μπορεί να αντιμετωπιστεί με φαρμακευτική αγωγή και αναφέρεται ως ανθεκτική επιληψία (intractable epilepsy) (Λογοθέτης, 1988).

Η πιο συχνή μορφή επιληψίας στους ενηλίκους είναι η επιληψία του κροταφικού λοβού. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι νευρώνες του υποκάμπτου έχουν πολύ χαμηλό ουδό έτσι ώστε ο υποκάμπος να έχει ιδιαίτερη σημασία ως θέση επιληπτικών σπασμών (Kahle et al., 1985). Συνήθως προκαλείται σκλήρυνση του υποκάμπτου με νευρωνική απώλεια και αστροκυτταρική υπερπλασία.

Έχει παρατηρηθεί (Landolt, 1957, 1960, 1962), ότι πολλοί από τους επιληπτικούς ασθενείς παρουσιάζουν ψυχωτικά φαινόμενα τα οποία διαρκούν επί ημέρες ή ακόμα και εβδομάδες ενίοτε, και κατά τη διάρκεια των οποίων το ηλεκτροεγκεφαλογράφημα (EEG) δείχνει αποκατάσταση της δυσρυθμίας ενώ κατά την ύφεση των ψυχωτικών φαινομένων παρατηρείται επανεμφάνιση των δυσρυθμιών.

Η επιληψία παθογενετικά αποδίδεται σε παροξυσμική ηλεκτρική εκφόρτιση διεγερτικών συνάψεων νευρικών κυττάρων. Το ίδιο φαινόμενο μπορεί να προκληθεί και από αναστολή λειτουργίας ανασταλτικών νευροδιαβιβαστικών σημάτων (Βλάχος, 1989).

Κλινικές και εργαστηριακές μελέτες (Galoyan et al., 2000; Merlin 1998, 1999, 2002; Merlin et al., 1998) συμφωνούν ότι οι παρακάτω παράγοντες συμβάλλουν, μεταξύ άλλων, στην επιληπτογένεση μετά από εστιακή βλάβη του εγκεφάλου:

- α) Αλλοιώσεις στις ενδογενείς ιδιότητες της κυτταρικής μεμβράνης.
- β) Εκτεταμένη συναπτική διεγερσιμότητα.
- γ) Ανωμαλίες στην GABAεργική αναστολή.

1.2: Διαφορές κοιλιακού-ραχιαίου υποκάμπτου

1.2.1: Σε ανατομικό επίπεδο

Έρευνες σε ανατομικό πεδίο καταδεικνύουν σημαντικότερες διαφορές μεταξύ του ραχιαίου και του κοιλιακού υποκάμπτου, στις διασυνδέσεις της κάθε μοίρας με άλλες φλοιώδεις και υποφλοιώδεις περιοχές του εγκεφάλου.

- Προσαγωγές συνδέσεις: Ο ραχιαίος υποκάμπος τόσο των επίμυων όσο και των κατώτερων πρωτευόντων προσλαμβάνει πληροφορίες από αισθητικά και συνειρμικά φλοιϊκά κέντρα μέσω οδών που διέρχονται από την εξωτερική μοίρα του ενδορρινικού φλοιού (Deacon et al., 1983; Room et al., 1986). Αντιθέτως, οι προσαγωγές ίνες από την αμυγδαλή, τον ιδίως υποθάλαμο, τους πυρήνες της υποθαλάμιας χώρας και το έσω τμήμα

της διαγώνιας ταινίας του Broca συνάπτονται στην εσωτερική μοίρα του ενδορρινικού φλοιού, η οποία στη συνέχεια προβάλλει ως επί το πλείστον στον κοιλιακό ιππόκαμπο (Beckstead 1978; Ruth et al., 1988).

- Απαγωγές συνδέσεις: Οι δύο μοίρες του ιπποκάμπου διαφοροποιούνται και ως προς τις απαγωγές τους συνδέσεις. Συγκεκριμένα, οι απαγωγές ίνες της ραχιαίας μοίρας του υποθέματος του ιπποκάμπου καταλήγουν κυρίως στα μαστία και τους πρόσθιους πυρήνες του θαλάμου, ενώ οι ίνες που εκφύονται από πιο κοιλιακά τμήματα του υποθέματος προβάλλουν στην οσφρητική περιοχή, στην αμυγδαλή, στον επικλινή πυρήνα του διαφράγματος, στους πρόσθιους πυρήνες του υποθαλάμου καθώς και στα μονοαμινεργικά κέντρα του διάμεσου εγκεφάλου (Risold and Swanson, 1996; Swanson et al., 1977).

- Ιππόκαμπος και αμυγδαλή: Δεδομένης της συμβολής της αμυγδαλής στην επιληπτογένεση αξίζει να γίνει ιδιαίτερη μνεία στην τοπογραφική οργάνωση των αμφίδρομων συνδέσεων της με τον ιππόκαμπο. Μόνο ο κοιλιακός ιππόκαμπος προβάλλει στην αμυγδαλή. Επίσης, τα πεδία του ενδορρινικού φλοιού που προβάλλουν στην αμυγδαλή είναι εκείνα που δέχονται ίνες από τον κοιλιακό ιππόκαμπο. Αντιστρόφως, η αμυγδαλή παρέχει ίνες μόνο στον κοιλιακό ιππόκαμπο, καθώς και σε εκείνα τα πεδία του ενδορρινικού φλοιού που δέχονται ίνες από τον κοιλιακό ιππόκαμπο (Pitkanen et al., 2000).

- Κατανομή ενδονευρώνων: Σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες (Nomura et al., 1997), έχουν επισημανθεί διαφορές στην κατανομή των ενδονευρώνων μεταξύ κοιλιακού και ραχιαίου ιπποκάμπου. Σαν χημικοί ιχνηλάτες χρησιμοποιήθηκαν: 1) η συνθάση του οξειδίου του αζώτου (nitric oxide synthase NOS), 2) η καλρετινίνη (calretinin CR), 3) η σωματοστατίνη (somatostatin), 4) η παρβαλβουμίνη (parvalbumin PV), 5) η χολεκυστοκινίνη (cholecystokinin). Γενικότερα, ο κοιλιακός ιππόκαμπος εμφάνισε μεγαλύτερη ανοσοδραστικότητα των ενδονευρώνων στις παραπάνω ουσίες. Πιο συγκεκριμένα, μεγαλύτερη ανοσοδραστικότητα στην καλρετινίνη παρουσιάστηκε σε όλες τις περιοχές του κοιλιακού ιπποκάμπου, ενώ μεγαλύτερη ανοσοδραστικότητα στη συνθάση του οξειδίου του αζώτου παρουσίασαν η κοιλιακή μοίρα της CA3 περιοχής και της οδοντωτής έλικας. Επίσης, μεγαλύτερη ανοσοδραστικότητα στην σωματοστατίνη παρουσίασαν η κοιλιακή μοίρα της CA1 περιοχής και της οδοντωτής έλικας. Αντιθέτως, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην αντίδραση των ενδονευρώνων στην παρβαλβουμίνη και στη χολεκυστοκινίνη, μεταξύ κοιλιακού και ραχιαίου ιπποκάμπου. Σημειώνεται ότι όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε GABAεργικούς νευρώνες.

1.2.2: Σε βιοχημικό επίπεδο

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα ευρήματα βιοχημικών μελετών σχετικά με την ποσοτική εντόπιση διαφόρων νευροδιαβιβαστών στις δύο μοίρες του ιπποκάμπου.

- Κατανομή Νευροδιαβιβαστών:

Σύμφωνα με μελέτες (Hortlang et al., 1991; Jeltsch et al., 1994) ο κοιλιακός ιππόκαμπος εμφανίζει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις GABA, γλουταμινικού και γλουταμίνης απ' ότι ο ραχιαίος. Όσον αφορά τα επίπεδα του ασπαρτικού, της γλυκίνης και του νευροπεπτιδίου Υ, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ κοιλιακού και ραχιαίου ιπποκάμπου (Hortnagl et al., 1991). Αντίθετα, κατά τον Jeltsch, η γλυκίνη φάνηκε να βρίσκεται σε υψηλότερα επίπεδα στον ραχιαίο ιππόκαμπο. Η ταυρίνη και η σερίνη φαίνονται να υπερτερούν στον ραχιαίο ιππόκαμπο.

Η σεροτονίνη και η νοραδρεναλίνη (Hortlang et al., 1991; Gage and Thompson, 1980) εμφανίζονται σε υψηλότερα επίπεδα στον κοιλιακό ιππόκαμπο. Το ίδιο φαίνεται να ισχύει και για την ορμόνη TRH (Low et al., 1989). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα αποτελέσματα της παραπάνω έρευνας κατέδειξαν ότι στον ιππόκαμπο μπορούν να υπάρχουν τόσο ενδογενείς όσο και εξωγενείς πηγές TRH. Οι εξωγενείς πηγές φτάνουν στον ιππόκαμπο μέσω του μονοπατιού της ψαλίδας και καταλήγουν κατά προτίμηση στον κοιλιακό ιππόκαμπο παρά στον ραχιαίο.

Σε άλλη βιοχημική μελέτη (Garcia Ruiz et al., 1993) έχει βρεθεί ότι η ικανότητα των μουσκαρινικών υποδοχέων να επάγουν την άθροιση της φωσφατιδιλ-ινοσιτόλης είναι μεγαλύτερη στον κοιλιακό από ότι στο ραχιαίο ιππόκαμπο. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η καρμπαχόλη (carbachol), ένας μουσκαρινικός αγωνιστής. Η ανάλυση των διαγραμμάτων που απεικονίζουν την σύνδεση της καρμπαχόλης με τον υποδοχέα έδειξε ότι στον κοιλιακό ιππόκαμπο υπήρξαν τρεις διαφορετικές καταστάσεις συγγένειάς της με τον υποδοχέα: η πολύ υψηλή (superhigh), η υψηλή (high), και η χαμηλή (low). Αντιθέτως, στο ραχιαίο ιππόκαμπο δεν υπήρξαν ενδείξεις της πολύ υψηλής συγγένειας. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην παραπάνω μελέτη επιβεβαιώθηκε ότι η κατανομή των μουσκαρινικών υποδοχέων είναι παρόμοια και στους δύο πόλους (Garcia Ruiz et al., 1993).

- Κατανομή Υποδοχέων:

Ο διαφορετικός ρόλος των διαφόρων νευροδιαβιβαστών και νευρορυθμιστών στις επιμέρους λειτουργίες του ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου καθίσταται σαφής όχι μόνο από τη βαθμίδωση των συγκεντρώσεων των ουσιών αυτών κατά μήκος του επιμήκους άξονα του ιπποκάμπου, αλλά και από την κατανομή των υποδοχέων τους στις αντίστοιχες περιοχές. Συγκεκριμένα, όσον αφορά τους NMDA υποδοχείς βρέθηκε ότι βρίσκονται σε

μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο ραχιαίο ιππόκαμπο στη βοθριώδη-μοριώδη στοιβάδα της CA1 περιοχής και στη μοριώδη περιοχή της οδοντωτής έλικας. Αντιθέτως, στις υπόλοιπες περιοχές της οδοντωτής έλικας η συγκέντρωσή τους βρέθηκε αυξημένη στον κοιλιακό ιππόκαμπο (Martens et al., 1998). Οι υποδοχείς αδενοσίνης τύπου A1 (Lee et al., 1983) εντοπίστηκαν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο ραχιαίο ιππόκαμπο, ενώ οι υποδοχείς της ωκυτοκίνης (Van Leeuwen et al., 1985) υπερτερούν αριθμητικά στον κοιλιακό ιππόκαμπο. Οι υποδοχείς του NPY (Kohler et al., 1987) υπερτερούν αριθμητικά στον κοιλιακό ιππόκαμπο, παρόλο που σύμφωνα με έρευνες (Hortnagl et al., 1991) τα επίπεδα του νευροπεπτιδίου Y δεν φαίνεται να διαφέρουν μεταξύ των δύο μοιρών.

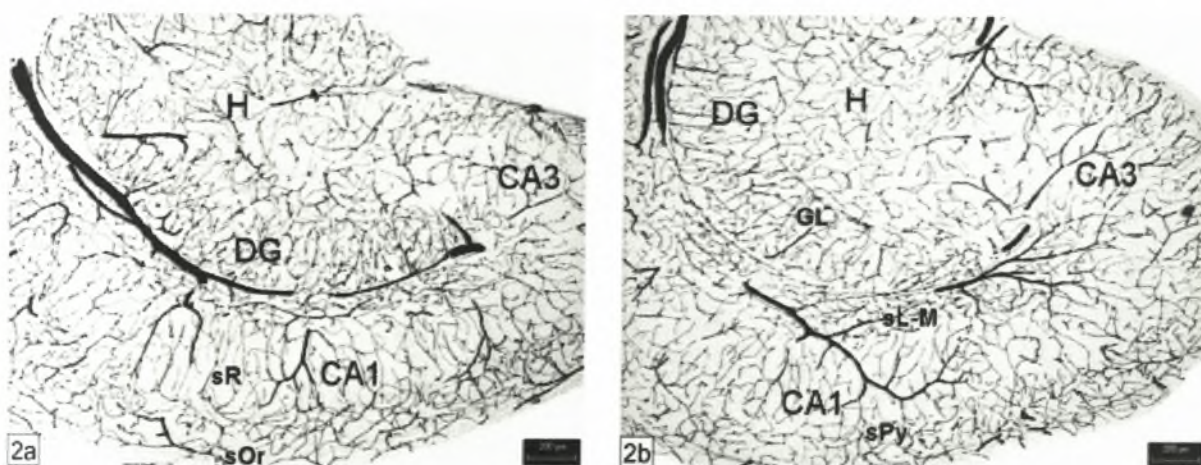
1.2.3: Στην ισχαιμία

Μία άλλη διάσταση της διαφοροποίησης μεταξύ της ραχιαίας και της κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου η οποία έχει μελετηθεί είναι η αντοχή των δύο περιοχών σε συνθήκες ισχαιμίας. Ο Rami και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι έπειτα από περίσφιξη της καρωτίδας σε επίμυες, η έκταση της βλάβης στον ραχιαίο ιππόκαμπο ήταν 82%, ενώ η βλάβη στον κοιλιακό ανερχόταν σε 16% (Rami et al., 1997). Στο ίδιο πείραμα χρησιμοποιήθηκε η σκοπολαμίνη (SCOP) για να διαπιστωθεί αν θα μπορούσε να επιδράσει στην επιβίωση του κατεστραμμένου από την ισχαιμία ιστού. Παρατηρήθηκε ότι ούτε στον ραχιαίο ούτε στον κοιλιακό ιππόκαμπο επήλθε βελτίωση έπειτα από την χρήση της.

Τα αίτια της μεγαλύτερης ανθεκτικότητας του κοιλιακού ιπποκάμπου στην ισχαιμία δεν έχουν ακόμα διευκρινισθεί. Σε γενικές γραμμές έχει δειχθεί ότι ο κοιλιακός ιππόκαμπος παρουσιάζει σημαντικά υψηλότερα επίπεδα αιμάτωσης αλλά μικρότερη πυκνότητα λεπτών τριχοειδών αγγείων σε σχέση με τον ραχιαίο ιππόκαμπο (Grivas et al., 2003). Κατά την διάρκεια των πειραμάτων ως χρωστική ουσία χρησιμοποιήθηκε η Indian ink. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε σημαντικά μεγαλύτερη πυκνότητα των αγγείων μεγάλης διαμέτρου στον κοιλιακό ιππόκαμπο, ενώ και οι δύο πόλοι του ιπποκάμπου εμφάνιζαν την ίδια πυκνότητα αγγείων μεσαίας διαμέτρου. Αντιθέτως, όσον αφορά το δίκτυο των τριχοειδών αγγείων παρατηρήθηκε σημαντικά μεγαλύτερη πυκνότητά του στον ραχιαίο ιππόκαμπο για την CA1 και την CA3 περιοχή (Εικόνα 1.7). Αυτό το πυκνότερο δίκτυο αιμάτωσης και η **μεγαλύτερη διάμετρος των αγγείων του κοιλιακού ιπποκάμπου** σε σχέση με τον ραχιαίο, ίσως να οδηγούν στην **μεγαλύτερη ανθεκτικότητά του στην ισχαιμία** (Grivas et al., 2003). Επιπρόσθετα, η αυξημένη ευαισθησία του ραχιαίου ιπποκάμπου στην ισχαιμία μπορεί επίσης να σχετίζεται με την αυξημένη πυκνότητα των λεπτών τριχοειδών αγγείων στην περιοχή αυτή του ιπποκάμπου. Μεγαλύτερη πυκνότητα

των τριχοειδών αγγείων σημαίνει μικρότερη απόσταση των κυττάρων από τον αυλό των αγγείων. Επομένως, οι νευρώνες του ραχιαίου ιπποκάμπου μπορεί να είναι συνηθισμένοι να εξαρτώνται από ταχύτερη παροχή θρεπτικών υλικών και οξυγόνου, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία σε επεισόδια ισχαιμίας-υποξίας (Grivas et al., 2003).

Το ανεπτυγμένο δίκτυο αιμάτωσης του κοιλιακού ιπποκάμπου πιθανόν να έχει ως αποτέλεσμα και την αυξημένη παραγωγή του ενδοθηλιακού αναπτυξιακού παράγοντα (eGF) από τα αγγεία (Papapetrooulos et al., 1997, Ziche et al., 1994). Ο eGF έχει αποδειχθεί πως πέραν της δράσης του ως αγγειογενετικός παράγοντας, διαδραματίζει επίσης σημαντικό νευροπροστατευτικό ρόλο στην κάκωση του νευρικού ιστού από ισχαιμικά επεισόδια (Jin et al., 2000).



Εικόνα 1.7: Φωτομικρογραφίες εγκάρσιων τομών κοιλιακού (2a) και ραχιαίου (2b) ιπποκάμπου. Φαίνεται το δίκτυο αιμάτωσης, έπειτα από έγχυση India ink, στις περιοχές CA1, CA3 και στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου (Grivas et al., 2003).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση των διεγερτικών συναπτικών δυναμικών που διαμεσολαβούνται από υποδοχείς NMDA και καταγράφονται από πυραμιδικούς νευρώνες της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου μετά από διέγερση των παράπλευρων ιών του Schaffer με τους εξής συγκεκριμένους στόχους :

- 1) τη φαρμακολογική απομόνωση και μελέτη των μετασυναπτικών δυναμικών που οφείλονται στη διέγερση υποδοχέων τύπου NMDA με τη χρήση κατάλληλων διαλυμάτων ανταγωνιστών,
- 2) τη σύγκριση της συναπτικής διεγερτικής διαβίβασης που διαμεσολαβείται από υποδοχείς τύπου NMDA μεταξύ της ραχιαίας και κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου.

ΜΕΡΟΣ 2^ο

ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

2.1: Πειραματόζωα

Χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί, νεαροί, άσπροι αρουραίοι Wistar με βάρος περίπου 150 gr ο καθένας κατά την ημέρα της επέμβασης. Τα πειραματόζωα στεγάζονταν ανά τρία σε κλωβούς σε χώρο με σταθερή θερμοκρασία (22 ± 1 °C) και εναλλαγή φωτός – σκότους κάθε 12 ώρες. Τα πειραματόζωα είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό.

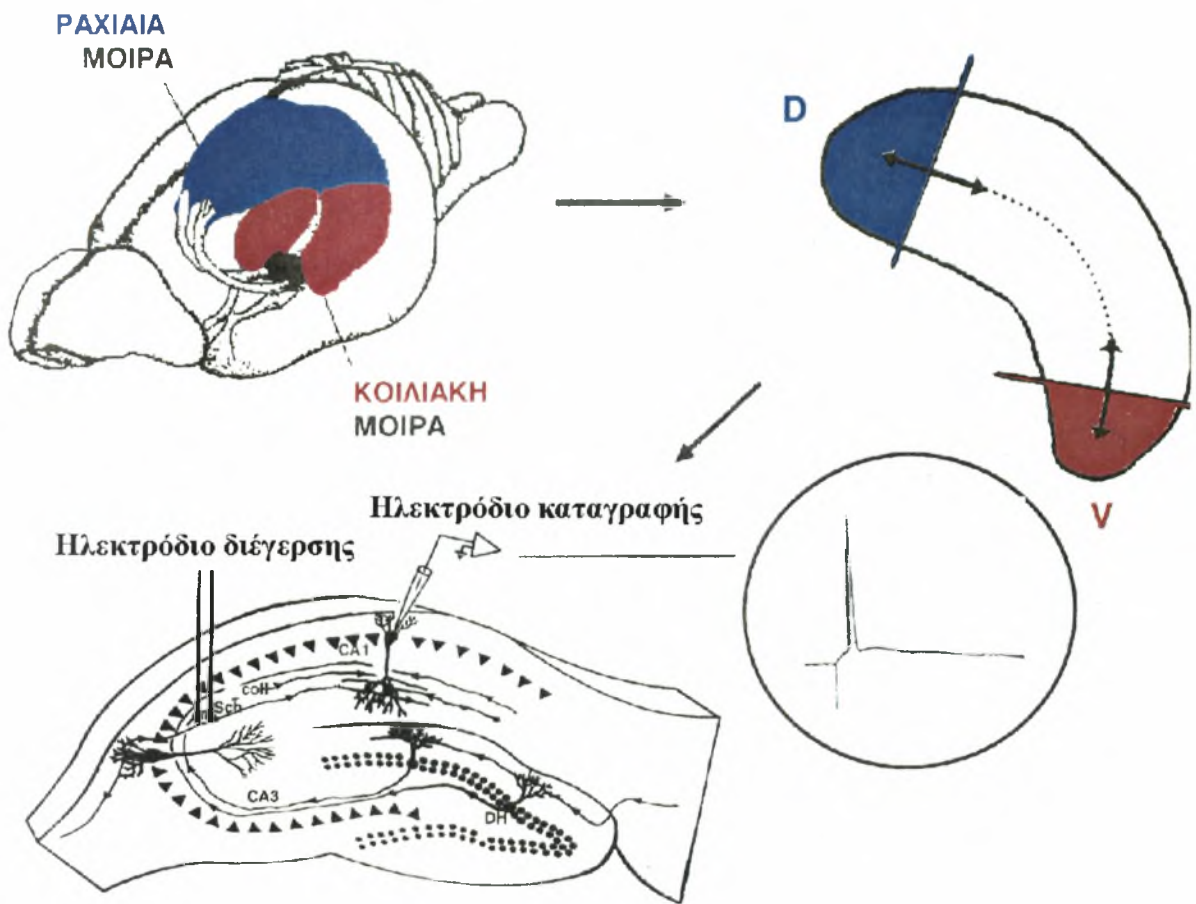
2.2: Προετοιμασία τομών εγκεφαλικού ιστού.

Τα πειραματόζωα αναισθητοποιήθηκαν με αιθέρα και στη συνέχεια θυσιάστηκαν με αποκεφαλισμό με ειδική λαιμητόμο. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε γρήγορο άνοιγμα του κρανίου με τη βοήθεια ειδικών ψαλιδιών, αφαίρεσή του, και απομάκρυνση της σκληρής μήνιγγας με πολύ προσεκτικές και λεπτές κινήσεις. Ο εγκέφαλος τοποθετήθηκε αμέσως σε οξυγονωμένο (95% O₂, 5% CO₂) τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό (TENY) διατηρημένο σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες (0-4^ο C), το οποίο είχε πρόσφατα παρασκευασθεί με τα εξής συστατικά: 124mM NaCl, 4mM KCl, 2mM CaCl₂, 2mM MgSO₄, 1,25mM NaH₂PO₄, 26mM NaHCO₃ και 10mM γλυκόζη.

Στη συνέχεια, από το κάθε ημισφαίριο αφαιρέθηκε ολόκληρος ο ιππόκαμπος, ο οποίος κόπηκε με τη βοήθεια ειδικού μικροτόμου σε κάθετες τομές πάχους 500 μm. Ελήφθησαν τρεις (3) τομές από την κοιλιακή μοίρα του ιπποκάμπου, οποίος αποτελεί το 1/3 του συνολικού ιπποκάμπου και 4-5 τομές από την ραχιαία μοίρα του ιπποκάμπου (Εικόνα 2.1).

Όλες οι διαδικασίες έγιναν σε σύντομο χρονικό διάστημα (περίπου 3 λεπτά) ώστε να εξασφαλισθεί η βιωσιμότητα του ιστού. Από τη στιγμή που ανοίχθηκε το κρανίο του ζώου και έγινε ορατός ο εγκέφαλος και μέχρι την ολοκλήρωση της όλης διαδικασίας, εμποτιζόταν σε τακτά χρονικά διαστήματα με TENY ώστε να διατηρηθεί σε πλήρη λειτουργικότητα για πολλές ώρες.

Στη συνέχεια, οι τομές τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στο οποίο έφθανε TENY με συνεχόμενη ροή σε θερμοκρασία δωματίου, όπου και επώασθησαν για 2 ώρες.



Εικόνα 2.1: Α. Μέθοδος λήψης λεπτών τομών ραχιαίας και κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου.

Β. Τοποθέτηση του καταγραφικού μικροηλεκτροδίου εντός της πυραμιδικής στοιβάδας και του ηλεκτροδίου διέγερσης στην περιοχή της παράπλευρης οδού Schaffer.

2.3: Θάλαμος Καταγραφής

Ο καταγραφικός θάλαμος (Εικόνα 2.2) ήταν όμοιος με αυτόν που χρησιμοποίησαν οι Brown και Haliwell (1981) με εξαίρεση τη χρήση κυκλοφορητή χαμηλής έντασης 1ml για τη συνεχόμενη ροή του τεχνητού οξυγονωμένου εγκεφαλονωτιαίου υγρού.

Στο λουτρό καταγραφής τοποθετήθηκε ένα απορροφητικό φίλτρο για να συγκρατεί τις τομές στη βάση του λουτρού κατά τη διάρκεια του πολύωρου πειράματος.

Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό ήταν τοποθετημένο σε μια ειδική γυάλινη φιάλη χωρητικότητας 500 ml με συνεχόμενη οξυγόνωση και τροφοδοτούσε συνεχώς το λουτρό. Η θερμοκρασία διατηρήθηκε στους $33 \pm 2^{\circ}\text{C}$ με τη βοήθεια θερμοστάτη.

Το μικροσκόπιο που χρησιμοποιήθηκε ήταν Nikon (μοντέλο SMZ-U/UW10/a/24). Χρησιμοποιήθηκε κατάλληλη λάμπα ψυχρού φωτισμού ώστε να μην επηρεάζεται η θερμοκρασία του συστήματος (Nikon Optical Fiber) και μικροχειριστές για την τοποθέτηση των μικροπιπετών στους νευρώνες των τομών του ιπποκάμπου κατά την διάρκεια των πειραμάτων.

Όλο το σύστημα καταγραφής ήταν τοποθετημένο πάνω σε γειωμένη αντικραδασμική τράπεζα και μέσα σε κλωβό Faraday.

2.4: Σύστημα καταγραφής – ανάλυσης των δεδομένων

Οι ενδοκυττάρια καταγραφές πραγματοποιήθηκαν με γυάλινες μικροπιπέτες (μικροηλεκτρόδια) που περιείχαν 2M οξικού καλίου και 2% βιοκυτίνης. Για την κατασκευή των ηλεκτροδίων χρησιμοποιήθηκαν τριχοειδείς γυάλινοι σωλήνες εξωτερικής διαμέτρου 1,2 mm, που εσωτερικά έφεραν μικροϊνες και οι οποίοι τοποθετούνταν σε έναν εξολκέα (Brown – flaming μοντέλο P-97 Sutter Instruments California). Η αντίσταση των ηλεκτροδίων κυμαινόταν μεταξύ 80 – 150 MΩ. Οι καταγραφές λαμβάνονταν χρησιμοποιώντας προενισχυτή DC με εμπέδηση υψηλής εισόδου (Axoclamp HS-2A, Axon-Instruments Inc.) με δυνατότητα σύνδεσης με γέφυρα Wheatstone που επιτρέπει την παροχή ρεύματος δια μέσου του μικροηλεκτροδίου καταγραφής.

Όλα τα πειράματα της τεχνικής καθήλωσης ρεύματος πραγματοποιήθηκαν με «εξισορρόπηση γέφυρας» διαμέσου του ενισχυτή Axoclamp. Με αυτόν τον τρόπο το δυναμικό στην άκρη του μικροηλεκτροδίου εμφανιζόταν συνεχώς στον παλμογράφο, ενώ ταυτοχρόνως ήταν δυνατό να διοχετευθεί ρεύμα μέσω του μικροηλεκτροδίου. Με την παροχή ρεύματος I_0 προέκυπτε πτώση τάσης V_e κατά μήκος του ηλεκτροδίου, η οποία εξαρτώνταν από την αντίσταση του ηλεκτροδίου (R_e). Αυτή η μείωση του δυναμικού

ελαχιστοποιήθηκε μέσω της εξισορρόπησης της γέφυρας Wheatstone, έτσι ώστε να είναι δυνατό να καταγραφεί η πραγματική τιμή του δυναμικού της μεμβράνης κατά τη διάρκεια της διοχέτευσης ρεύματος. Διαφορές δυναμικού που σχετίζονταν με την χωρητική αντίσταση τόσο της μεμβράνης του κυττάρου όσο και της γυάλινης επιφάνειας του μικροηλεκτροδίου ελαχιστοποιούνταν με την παροχή ρεύματος αντίθετης πολικότητας (capacitance compensation). Κάτω από σταθερές συνθήκες το δυναμικό V_0 που εμφανιζόταν στην έξοδο του ενισχυτή ήταν το άθροισμα του δυναμικού του μικροηλεκτροδίου V_e και του δυναμικού της μεμβράνης V_m . Προκειμένου να καταγράψουμε το πραγματικό δυναμικό της μεμβράνης το V_e έπρεπε να εξαλειφθεί, κάτι που πραγματοποιούνταν μέσω του διακόπτη input offset του ενισχυτή που χρησιμοποιούνταν.

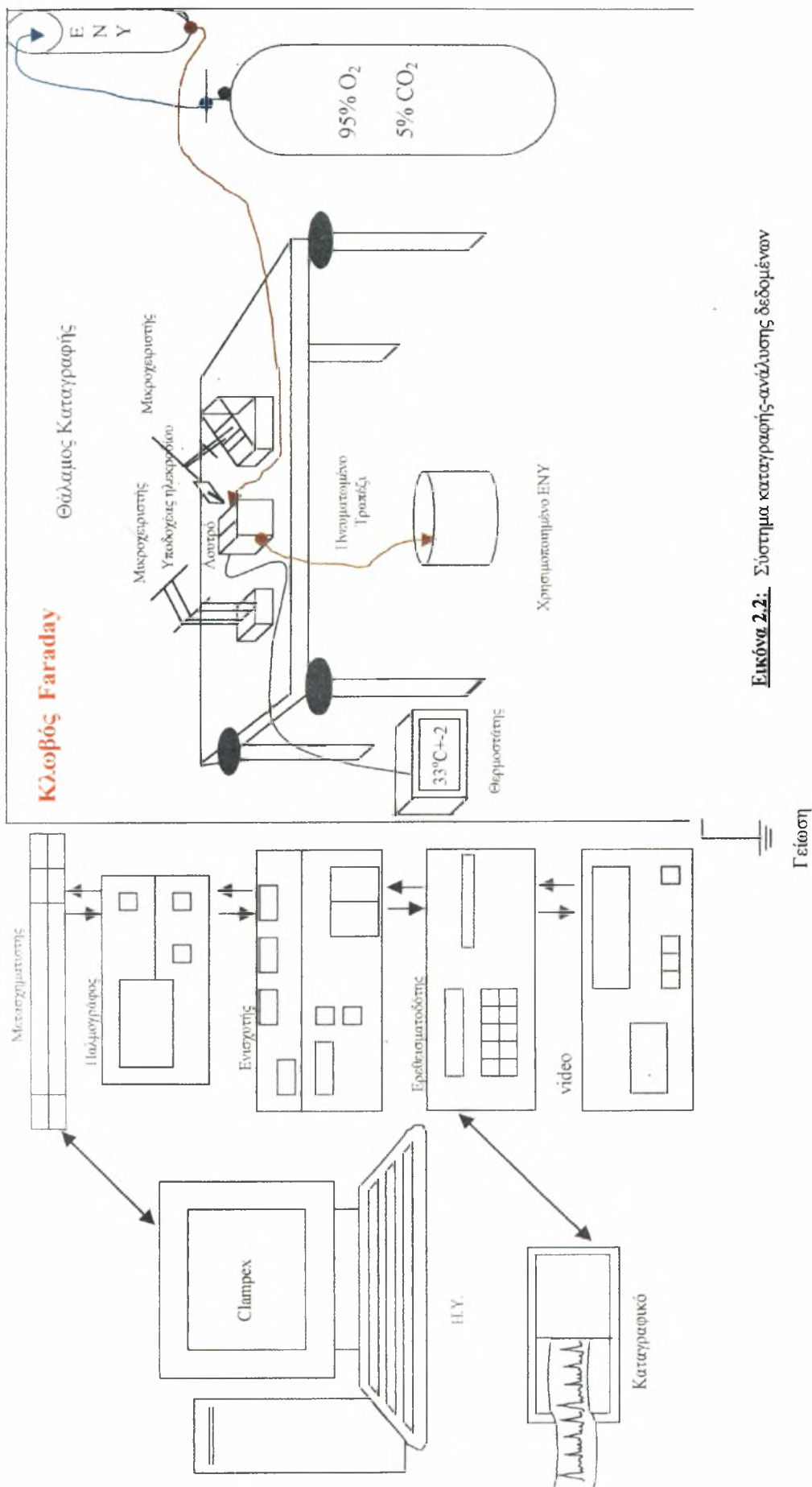
Η αντίσταση εισόδου του κυττάρου (Input Resistance, R_i) θεωρείτο ως το μέγεθος της απόκλισης του δυναμικού από την σταθερή κατάσταση (steady state) μετά την χορήγηση υπερπολωτικού ρεύματος, δεδομένου ότι η γέφυρα ήταν εξισορροπημένη επαρκώς. Έτσι, από το νόμο του Ohm ισχύει η σχέση:

$$R_i = V_m / I_0$$

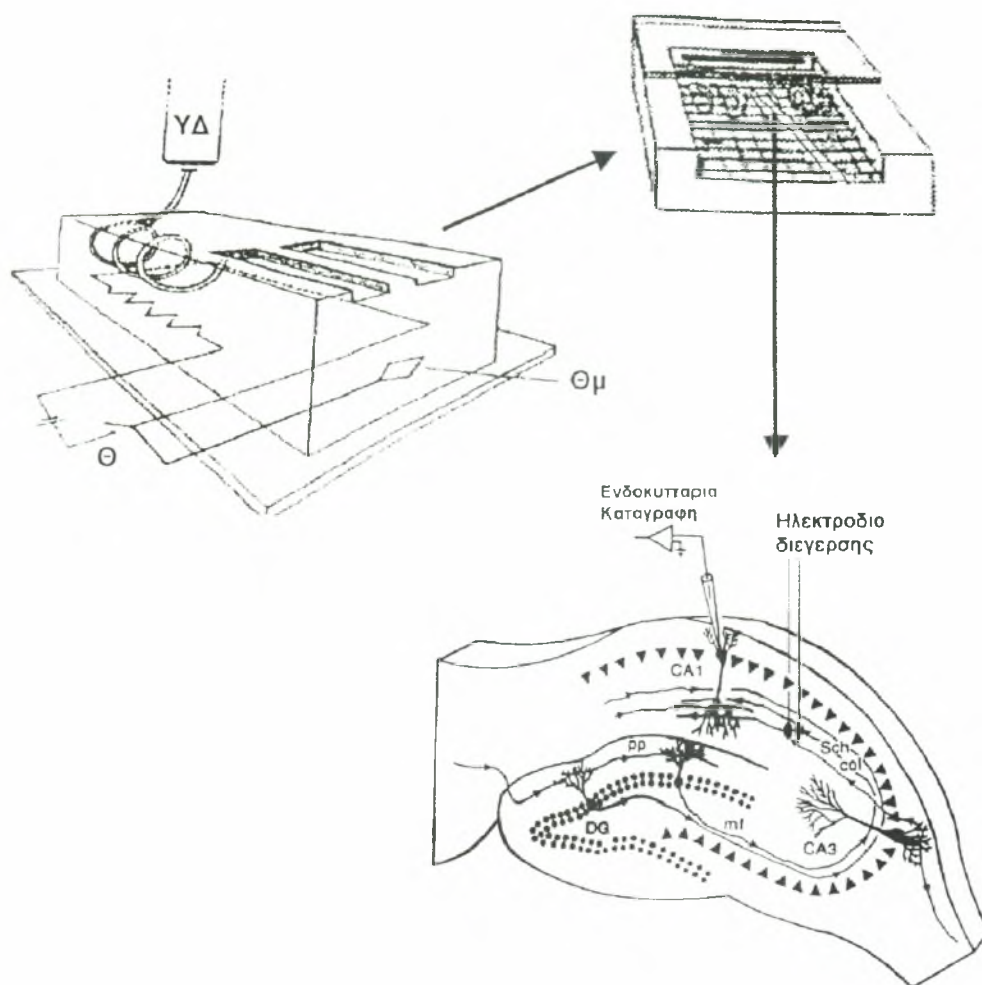
Η εξισορρόπηση της γέφυρας πραγματοποιούνταν μετά την τοποθέτηση του μικροηλεκτροδίου στην επιφάνεια της τομής του ιστού και πριν την τοποθέτησή του σε ένα νευρώνα. Η τοποθέτηση του μικροηλεκτροδίου στο νευρώνα πραγματοποιούνταν με τη βοήθεια στερεοσκοπίου (Nikon Ed plan apo 1x).

Στην συνέχεια, προωθούνταν το μικροηλεκτρόδιο έως ότου διατρύπουσε τη μεμβράνη ενός νευρώνα. Μεταβολή του δυναμικού της μεμβράνης προς την υπερπολωτική κατεύθυνση δήλωνε την είσοδο του μικροηλεκτροδίου στο εσωτερικό του νευρώνα. Υπερπολωτικοί παλμοί ρεύματος διάρκειας 10 ms και συχνότητας 100 Hz, χορηγούνταν δια μέσω του μικροηλεκτροδίου στο εσωτερικό του νευρώνα, παρέχοντας τη δυνατότητα μέτρησης της αντίστασης της μεμβράνης καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων.

Οι καταγραφές πραγματοποιούνταν σε νευρώνες που παρουσίαζαν αφενός σταθερό δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης υπερπολωμένο πλέον των 60 mV και αφετέρου δυναμικά ενεργείας με πλάτος μεγαλύτερο των 75 mV. Το απόλυτο δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης μετρούνταν ως η διαφορά μεταξύ της τιμής του δυναμικού πριν την απόσυρση του μικροηλεκτροδίου από τον νευρώνα και της τιμής αμέσως μετά.



Εικόνα 2.2: Σύστημα καταγραφής-ανάλυσης δεδομένων



Εικόνα 2.3: Ηλεκτροφυσιολογία του ιπποκάμπου *in vitro*. Υδατόλουτρο διπλής φάσης φιλοξενεί τις λεπτές τομές διαποτιζόμενες με θερμαινόμενο TENE υδροστατικά φερόμενο από υάλινο δοχείο (ΥΔ) (Θ = θερμοστάτης, Θμ = θερμόμετρο). Στη συγκεκριμένη τομή το καταγραφικό ηλεκτρόδιο είναι τοποθετημένο στον πυραμιδικό νευρώνα της CA1 στοιβάδας του ιπποκάμπου επίμυος και το ηλεκτρόδιο διέγερσης είναι τοποθετημένο στην περιοχή των παραπλεύρων Schaffer για τη συναπτική καταγραφή.

Για τη διοχέτευση ρεύματος στο νευρώνα διαμέσου του μικροηλεκτροδίου καταγραφής χρησιμοποιήθηκε ενισχυτής (Axoclamp-2B, Axon Instruments). Η διάρκεια και συχνότητα των παλμών του διοχετευόμενου ρεύματος καθοριζόταν από έναν ερεθισματοδότη (M-8 A.M.P.I), ενώ η τιμή του αυξομειωνόταν χειροκίνητα μέσω ενός ρυθμιζόμενου εντολέα βήματος. Ρεύμα DC (Direct Current) διοχετεύθηκε δια μέσου του μικροηλεκτροδίου. Η συνεχής παρακολούθηση των αποκρίσεων του δυναμικού της μεμβράνης μετά από κάθε εφαρμογή ρεύματος επιτυγχάνονταν με παλμογράφο.

Για τη συνεχόμενη καταγραφή του πειράματος χρησιμοποιήθηκε καταγραφικό χάρτου. Ταυτόχρονα, όλες οι καταγραφές αποθηκεύθηκαν σε αναλογική μορφή σε κασέτα ενός μαγνητικού μέσου εγγραφής (DTR 1204 digital tape recorder) που παρείχε δυνατότητα ανάλυσης των δεδομένων μετά το τέλος του πειράματος. Παράλληλα, όλα τα δεδομένα καταγράφηκαν, αποθηκεύτηκαν και αναλύθηκαν σε ψηφιακή μορφή με τη βοήθεια ενός προσωπικού Η/Υ που ήταν συνδεδεμένος με ένα σύστημα Digidata 1200 (Axon Instruments) χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PClamp 7.0 (Axon Instruments).

2.5: Συναπτική διέγερση

Το ηλεκτρόδιο ερεθισμού (Εικόνα 2.1, 2.3) τοποθετήθηκε στην ακτινωτή στοιβάδα, και σε σταθερή απόσταση από το σημείο καταγραφής, από όπου διέρχονται οι παράπλευροι άξονες Schaffer. Το ηλεκτρόδιο ερεθισμού ήταν κατασκευασμένο από μακρύ διπολικό μεταλλικό ανοξείδωτο σύρμα επενδεδυμένο με τεφλόν εκτός από το τελευταίο άκρο του. Μέσω του ηλεκτροδίου διαβιβάζονταν αυξανόμενες τιμές της τάσης (1-20V) έως την εμφάνιση στην οθόνη των υποουδικών και ουδικών μετασυναπτικών δυναμικών.

2.6: Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Τα δεδομένα εκφράστηκαν με τον μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου. Για τη σύγκριση μεταξύ των τιμών χρησιμοποιήθηκε το Student's t-test. Σημαντική στατιστική διαφορά καθορίστηκε για τιμές $p < 0,05$. Σε όλες τις περιπτώσεις ως n καθορίζεται ο αριθμός των νευρώνων.

ΜΕΡΟΣ 3ο

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Εισαγωγή

Η ροή πληροφοριών κατά μήκος των νευρώνων και μεταξύ τους επιτυγχάνεται μέσω ηλεκτρικών και χημικών σημάτων. Η μετάδοση ηλεκτρικών σημάτων είναι παρά πολύ σημαντική για την ταχεία μεταφορά πληροφοριών σε μεγάλες αποστάσεις. Όλα τα ηλεκτρικά σήματα – δυναμικά υποδοχέων, συναπτικά δυναμικά και δυναμικό ενεργείας – παράγονται από παροδικές μεταβολές της ροής ρεύματος προς το εσωτερικό του κυττάρου και το εξωτερικό περιβάλλον του, μεταβολές οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την απόκλιση του ηλεκτρικού δυναμικού εκατέρωθεν της μεμβράνης από την τιμή ηρεμίας.

Η ροή ρεύματος προς το εσωτερικό του κυττάρου και το εξωτερικό περιβάλλον του ελέγχεται από διαύλους ιόντων που εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη. Οι μεμβράνες έχουν δύο είδη διαύλων ιόντων: διαύλους εν ηρεμία και ελεγχόμενους διαύλους. Οι διαύλοι εν ηρεμία είναι συνήθως ανοιχτοί και δεν επηρεάζονται σημαντικά από εξωγενείς παράγοντες, όπως είναι το δυναμικό της μεμβράνης.

Το δυναμικό μεμβράνης ενός κυττάρου εν ηρεμία ονομάζεται δυναμικό ηρεμίας. Δεδομένου ότι το δυναμικό έξω από το κύτταρο ορίζεται κατά συνθήκη ως μηδενικό, το δυναμικό ηρεμίας είναι αρνητικό. Η συνήθης τιμή του είναι περίπου -60 έως -70mV .

3.2. Παθητικές ιδιότητες των πυραμιδικών νευρώνων της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου

Οι παθητικές ηλεκτρικές ιδιότητες των νευρώνων είναι σταθερές και δεν αλλάζουν κατά τη διάρκεια της μετάδοσης ηλεκτρικών σημάτων. Μερικές από αυτές είναι: **α)** το δυναμικό μεμβράνης εν ηρεμία, **β)** η αντίσταση εισόδου του κυττάρου και **γ)** η χρονική σταθερά της μεμβράνης.

Οι παθητικές αυτές ιδιότητες διαδραματίζουν κύριο ρόλο στη μετάδοση ηλεκτρικών σημάτων, διότι παρέχουν την οδό επιστροφής δια μέσου της οποίας τα ενεργά ρεύματα ρέουν προς το εσωτερικό του κυττάρου και προς το εξωτερικό περιβάλλον του. Αυτές οι ιδιότητες καθορίζουν έτσι τη χρονική εξέλιξη του συναπτικού δυναμικού το οποίο

παράγεται από το συναπτικό ρεύμα. Καθορίζουν επίσης το εάν ένα συναπτικό δυναμικό που δημιουργείται σε ένα δενδρίτη θα εξελιχθεί σε εκπόλωση που θα υπερβεί ή όχι τον ουδό, στην ζώνη εκκίνησης πάνω στον εκφυτικό κώνο του νευράξονα.

Οι παθητικές ιδιότητες είναι εξίσου χρήσιμες για τον καθορισμό της ταχύτητας με την οποία μεταδίδεται ένα δυναμικό ενεργείας μετά τη δημιουργία του και επομένως μπορούν να επηρεάσουν τη διεγερσιμότητα των νευρώνων.

3.2.1. Δυναμικό μεμβράνης εν ηρεμία

Το δυναμικό ηρεμίας προκύπτει από την κατανομή φορτίων εκατέρωθεν της κυτταρικής μεμβράνης. Η κατανομή των φορτίων προκαλεί διαφορά ηλεκτρικού δυναμικού, δηλαδή ηλεκτρική τάση, εκατέρωθεν της μεμβράνης, η οποία ονομάζεται δυναμικό μεμβράνης. Όταν το κύτταρο βρίσκεται εν ηρεμία το δυναμικό ορίζεται ως δυναμικό ηρεμίας. Το δυναμικό αυτό καθορίζεται από τους εν ηρεμία διαύλους ιόντων.

Συγκεντρώθηκαν δεδομένα από 6 πυραμιδικούς νευρώνες της ραχιαίας και της κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου. Το δυναμικό μεμβράνης εν ηρεμία δε διέφερε μεταξύ των νευρώνων της ραχιαίας ($62,4 \pm 0,4 \text{ mV}$, $\underline{n} = 4$) και της κοιλιακής ($63,2 \pm 0,6 \text{ mV}$, $\underline{n} = 2$) μοίρας του ιπποκάμπου ($p > 0,05$).

3.2.2. Αντίσταση εισόδου

Η σχέση μεταξύ ρεύματος και τάσης ορίζει μια αντίσταση, η οποία καλείται αντίσταση εισόδου του νευρώνα R_i . Η αντίσταση εισόδου του κυττάρου καθορίζει το μέγεθος της εκπόλωσης την οποία προκαλεί ένα σταθερό ρεύμα. Σύμφωνα με το νόμο του Ohm, το μέγεθος της εκπόλωσης, ΔV , είναι:

$$\Delta V = I \cdot R$$

Έτσι, από δύο κύτταρα που δέχονται τα ίδια συναπτικά ρεύματα, εκείνο το οποίο έχει τη μεγαλύτερη αντίσταση εισόδου θα εμφανίσει μεγαλύτερη μεταβολή της τάσεως μεμβράνης. **Αυτό σημαίνει ότι όσο μεγαλύτερη είναι η αντίσταση εισόδου του νευρώνα τόσο αυξημένη είναι η διεγερσιμότητά του.**

Επίσης, σε έναν εξιδανικευμένο σφαιρικό νευρώνα χωρίς αποφυάδες, η αντίσταση εισόδου εξαρτάται τόσο από την πυκνότητα των εν ηρεμία διαύλων στη μεμβράνη (δηλαδή από τον αριθμό διαύλων ανά μονάδα εμβαδού μεμβράνης) όσο και από το μέγεθος του νευρώνα. Όσο μεγαλύτερος είναι ο νευρώνας τόσο μεγαλύτερο είναι το εμβαδόν της

μεμβράνης του και τόσο μικρότερη είναι η αντίσταση εισόδου του νευρώνα και αντίστροφα. Η μέτρηση της αντίστασης εισόδου του κυττάρου έγινε από την καταγραφή των μεταβολών του δυναμικού της μεμβράνης μετά από διοχέτευση υπερπολωτικών ώσεων ρεύματος στο κυτταρικό σώμα του.

Στην παρούσα μελέτη η αντίσταση εισόδου των πυραμιδικών νευρώνων καθορίστηκε από την απόκλιση του δυναμικού της μεμβράνης στην σταθερή κατάσταση (steady state) μετά την εφαρμογή υπερπολωτικού ορθογώνιου παλμού πλάτους 0,05 nA και διάρκειας 150 ms, χρησιμοποιώντας το νόμο του Ohm:

$$R = \Delta V/I$$

Υπολογίζοντας την αντίσταση εισόδου με την παραπάνω μέθοδο δε βρέθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα σε νευρώνες του ραχιαίου ($51,9 \pm 5,0 \text{ M}\Omega$, $n = 4$) και του κοιλιακού ($49,8 \pm 4,2 \text{ M}\Omega$, $n = 2$) ιπποκάμπου ($p > 0,05$).

3.3: Διεγερσιμότητα των πυραμιδικών νευρώνων του ιπποκάμπου

Η διαφοροποίηση του ιπποκάμπου κατά μήκος του επιμήκους άξονά του συμπληρώνεται και από ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες οι οποίες καταδεικνύουν αυξημένη διεγερσιμότητα του κοιλιακού σε σχέση με το ραχιαίο ιππόκαμπο. Πράγματι, παρουσία ανταγωνιστών των GABA_A υποδοχέων (Borck and Jefferys, 1999), υψηλής συγκέντρωσης K⁺ (Bragdon et al., 1986; Gilbert et al., 1985; Borck and Jefferys, 1999), ή μετά από έκθεση τομών του ιπποκάμπου σε οπιοειδείς αγωνιστές (Lee et al., 1990), ο κοιλιακός ιππόκαμπος παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία στην ανάπτυξη επιληπτοειδών εκφορτίσεων από ότι ο ραχιαίος. Οι μηχανισμοί του τελευταίου αυτού φαινομένου όχι μόνον παραμένουν ανεξιχνίαστοι, αλλά έρχονται και σε αντίθεση με την ελαττωμένη συγκέντρωση υποδοχέων τύπου NMDA στον κοιλιακό ιππόκαμπο (Martens et al., 1998).

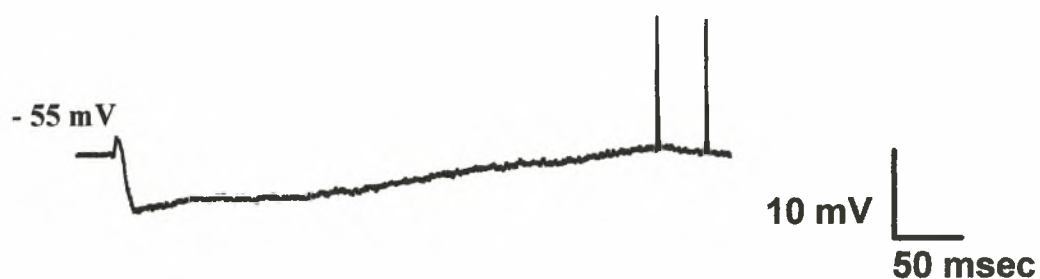
3.4: Μετασυναπτικά δυναμικά

Οι πληροφορίες τις οποίες μεταφέρει ένας νευρώνας είναι κωδικοποιημένες σε ηλεκτρικά σήματα που διατρέχουν τον νευράξονα και φθάνουν στη νευρική απόληξη. Η μετάδοση των σημάτων γίνεται μέσω χημικών συνάψεων. Ο προσυναπτικός νευρώνας απελευθερώνει έναν νευροδιαβιβαστή, ο οποίος στη συνέχεια διαχέεται στη συναπτική

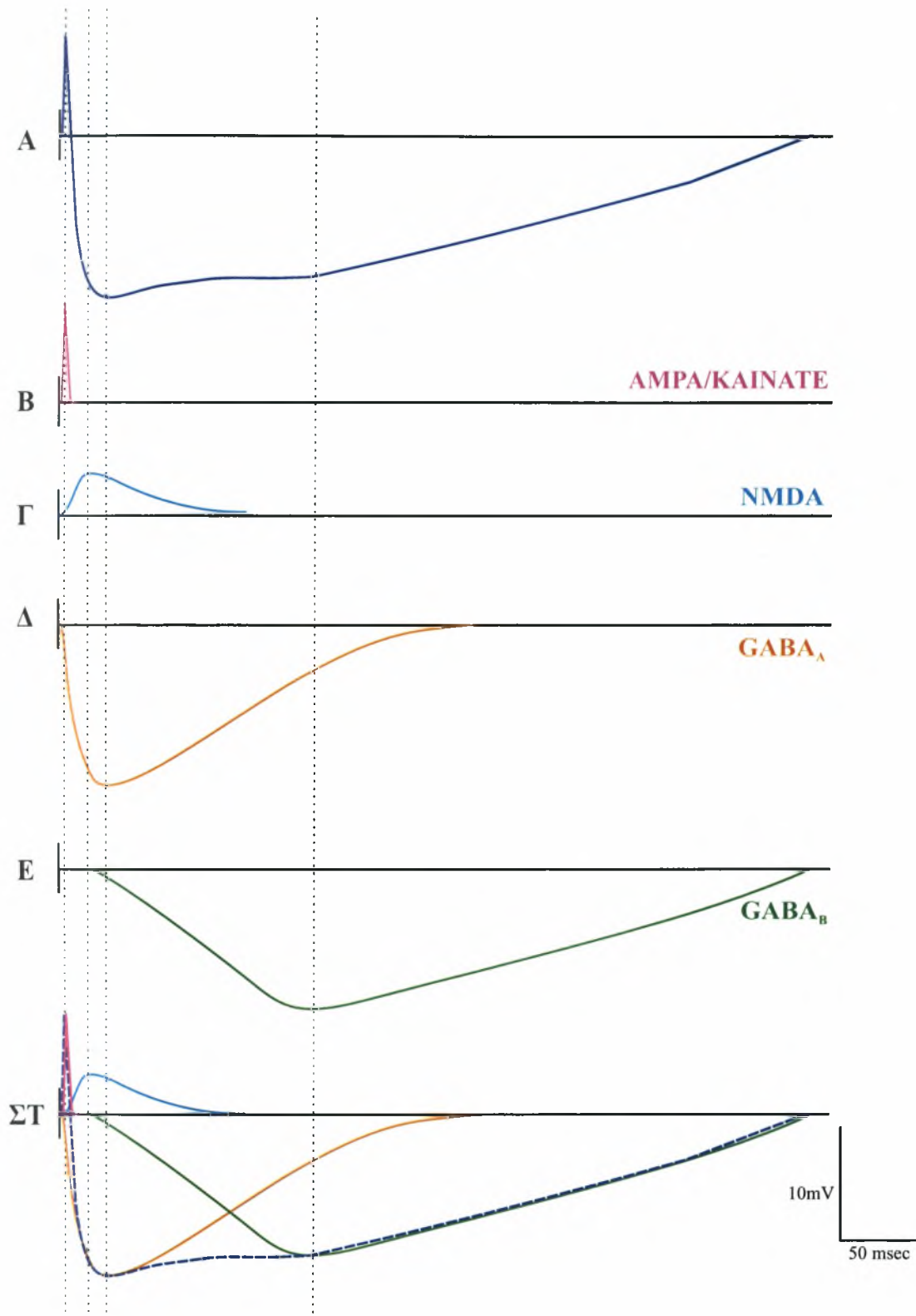
PAXIAIA MOIPA



ΚΟΙΛΙΑΚΗ ΜΟΙΡΑ



Εικόνα 3.1: Συναπτικές απαντήσεις που καταγράφονται σε πυραμδικούς νευρώνες της CA1 περιοχής της ραχιαίας και κοιλιακής μούρας του υποκάμπου μετά από ηλεκτρική διέγερση των παραπλεύρων ιών του Schaffer με υποουδική ένταση ρεύματος (Paratheodoropoulos et al., 2002).



Εικόνα 3.2: Ανάλυση των συνιστωσών της κυματομορφής μιας μετασυναπτικής απάντησης. Συναπτική απάντηση **Α:** συνολική απάντηση ενός νευρώνα, **Β:** οφειλόμενη στους AMPA υποδοχείς, **Γ:** οφειλόμενη στους NMDA υποδοχείς, **Δ:** οφειλόμενη στους GABA_A υποδοχείς, **Ε:** οφειλόμενη στους GABA_B υποδοχείς, **ΣΤ:** Απεικόνιση όλων των παραπάνω συνιστωσών και σύγκριση με την πραγματική μετασυναπτική απάντηση.

σχισμή και προσδέεται σε υποδοχείς της μετασυναπτικής μεμβράνης. Ο υποδοχέας, και όχι ο διαβιβαστής, είναι εκείνος που καθορίζει το κατά πόσον η συναπτική απόκριση είναι διεγερτική ή ανασταλτική.

Στη δημιουργία των μετασυναπτικών διεγερτικών (Excitatory postsynaptic potentials, EPSPs) και των ανασταλτικών δυναμικών (Inhibitory postsynaptic potentials, IPSPs) στους πυραμιδικούς νευρώνες της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου συμμετέχουν οι εξής νευροδιαβιβαστικές ουσίες:

1) Το GABA: Είναι ο κύριος ανασταλτικός διαβιβαστής στους πυραμιδικούς νευρώνες του ιπποκάμπου. Το GABA απελευθερώνεται από τους ανασταλτικούς GABAεργικούς ενδονευρώνες ενεργοποιώντας τους GABA_A και τους GABA_B υποδοχείς. Οι GABA_A υποδοχείς είναι διάυλοι διαπερατοί από ιόντα Cl⁻, ενώ οι GABA_B υποδοχείς συζευγνύονται με πρωτείνες G, και είτε αυξάνουν τη διαπερατότητα σε ιόντα K⁺, είτε αναστέλλουν τη λειτουργία των τασεοελεγχόμενων διαύλων Ca²⁺. Ο έλεγχος των διαύλων GABA_A επιτρέπει την εισροή Cl⁻ στο κύτταρο, με αποτέλεσμα την υπερπόλωση της μεμβράνης. Η διάνοιξη των διαύλων αυτών αυξάνει την αγωγιμότητα ηρεμίας και «βραχυκυκλώνει» κάθε διεγερτικό ρεύμα που εισρέει στο κύτταρο. Οι διάυλοι GABA_A είναι υπεύθυνοι για το ταχύ μετασυναπτικό ανασταλτικό δυναμικό (f-IPSP), ενώ οι διάυλοι GABA_B για το βραδύ μετασυναπτικό ανασταλτικό δυναμικό (s-IPSP) (Εικόνες 3.1, 3.2). Ο χρόνος επίτευξης μέγιστου πλάτους για τα GABA_A και GABA_B IPSPs ήταν 26 ± 0,8 και 118 ± 5 ms αντίστοιχα (Rainnie et al., 1991 (a); Rainnie et al., 1991 (b)).

2) Το γλουταμινικό οξύ: Απελευθερώνεται από τις συναπτικές απολήξεις των παραπλεύρων Schaffer, διεγείρει τους πυραμιδικούς νευρώνες της CA1 περιοχής και μπορεί να διεγείρει τους GABAεργικούς ανασταλτικούς ενδονευρώνες. Έχουν ήδη περιγραφεί οι διάφορες κατηγορίες ιοντοτρόπων υποδοχέων του γλουταμινικού οξέος. Οι μη-NMDA υποδοχείς (AMPA) είναι υπεύθυνοι για την ταχεία πρώιμη αιχμή του EPSP (Εικόνα 3.2). Ο δεύτερος τύπος, οι NMDA υποδοχείς, είναι διάυλοι διαπερατοί όπως έχει ήδη αναφερθεί, τόσο από Na⁺ και K⁺ όσο και από Ca²⁺. Στην κατάσταση ηρεμίας το στόμιο του διαύλου φράσσεται από ενδοκυτταρικό Mg²⁺, το οποίο απομακρύνεται όταν η μεμβράνη εκπολώνεται. Έτσι, για να ανοίξουν οι διάυλοι-υποδοχείς NMDA απαιτείται το γλουταμινικό και εκπόλωση. Στην καθυστέρηση κατά τη διάνοιξη της ροής ιόντων δια μέσου του διαύλου αυτού οφείλεται η ύστερη συνιστώσα του EPSP (Εικόνες 3.1, 3.2). Ο χρόνος επίτευξης του

μέγιστου πλάτους για τα διαμεσολαβούμενα από NMDA υποδοχείς EPSPs ήταν $19,0 \pm 1,5$ ms (Rainnie et al., 1991 (a); Rainnie et al., 1991 (b)).

3.4.1: Μετασυναπτική αναστολή σε ραχιαίο και κοιλιακό ιππόκαμπο

Η ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας σε συνεργασία με την ερευνητική ομάδα του Πανεπιστημίου Πατρών, έχει δείξει πρόσφατα ελαττωμένη GABAεργική αναστολή στον κοιλιακό ιππόκαμπο, εύρημα το οποίο συμβαδίζει με την αυξημένη διεγερσιμότητα αυτής της μοίρας του ιπποκάμπου (Paratheodoropoulos et al., 2002) (Εικόνα 3.3). Παρόλα αυτά, η πιθανότητα αυξημένης διεγερτικής (NMDA και μη-NMDA) συναπτικής διαβίβασης στον κοιλιακό ιππόκαμπο παραμένει ανεξερεύνητη.

3.4.2: Μετασυναπτική διέγερση σε ραχιαίο και κοιλιακό ιππόκαμπο

Όπως προαναφέρθηκε, η μετασυναπτική διέγερση αφορά κυρίως τη δραστηριοποίηση των υποδοχέων τύπου NMDA και AMPA/KAINATE. Τα δυναμικά που οφείλονται σε κάθε έναν από αυτούς τους υποδοχείς μπορούν να απομονωθούν και να μελετηθούν χρησιμοποιώντας κατάλληλους ανταγωνιστές. Η συναπτική απάντηση η οφειλόμενη σε δραστηριοποίηση των AMPA υποδοχέων (ύστερα από φαρμακολογικό αποκλεισμό των άλλων ομάδων υποδοχέων) είναι δύσκολο να μελετηθεί. Αυτό συμβαίνει διότι ο αποκλεισμός των ανασταλτικών GABA_A και GABA_B υποδοχέων σε συνδυασμό με την ενεργοποίηση των AMPA υποδοχέων οδηγεί στην εμφάνιση επιληπτοειδών εκφορτίσεων.

Επομένως, η παρούσα εργασία αφορά τη μελέτη των διεγερτικών συναπτικών απαντήσεων που οφείλονται στη δραστηριότητα των NMDA υποδοχέων. Για την απομόνωση των συναπτικών δυναμικών NMDA χρησιμοποιήθηκε διάλυμα TENY που περιελάμβανε επίσης:

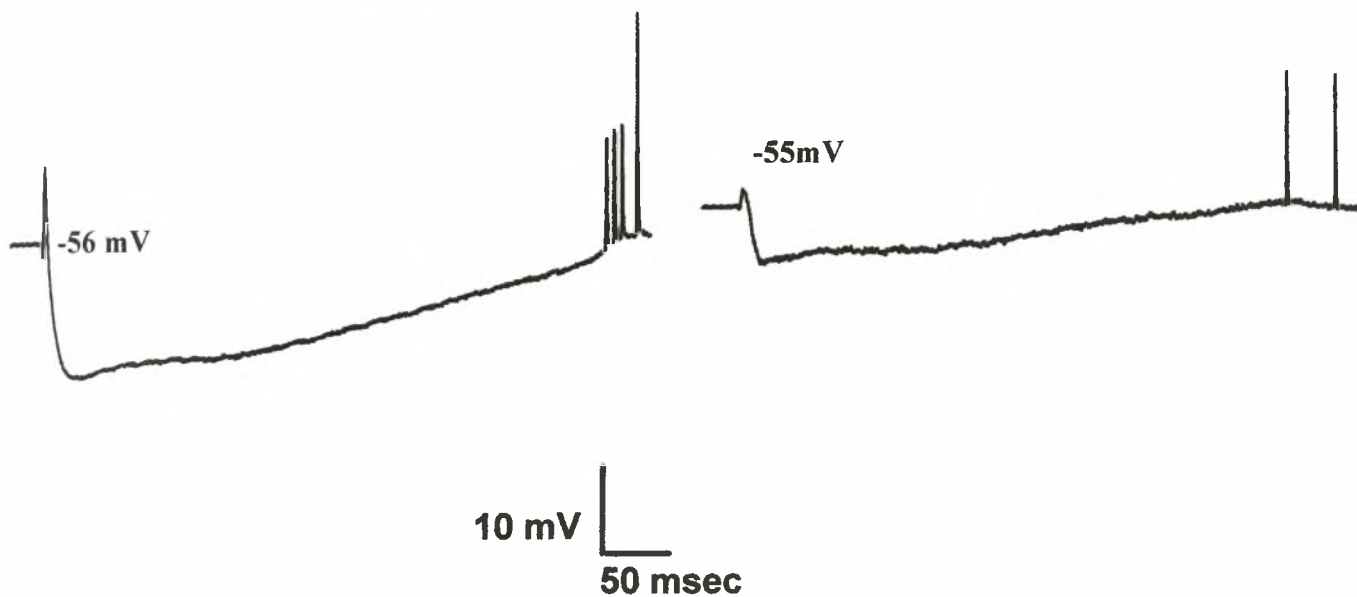
- 1) Τον ανταγωνιστή των υποδοχέων AMPA: CNQX (10μM)
- 2) Τον ανταγωνιστή των υποδοχέων GABA_A: bicuculline (50μM)
- 3) Τον ανταγωνιστή των υποδοχέων GABA_B: CGP35348 (500μM)

Όπως προαναφέρθηκε, οι NMDA υποδοχείς συμβάλλουν στην ύστερη συνιστώσα του EPSP. Στην παρούσα μελέτη ο ιστός αρχικά εκλούσθηκε με φυσιολογικό TENY, έγινε με διέγερση των παραπλεύρων ινών του Schaffer και προκλήθηκε συναπτικό δυναμικό που αποτελείται από EPSP και IPSP (Εικόνα 3.4A). Στη συνέχεια, ο ιστός εκλούσθηκε με

ΡΑΧΙΑΙΑ ΜΟΙΡΑ**ΚΟΙΛΙΑΚΗ ΜΟΙΡΑ****A**

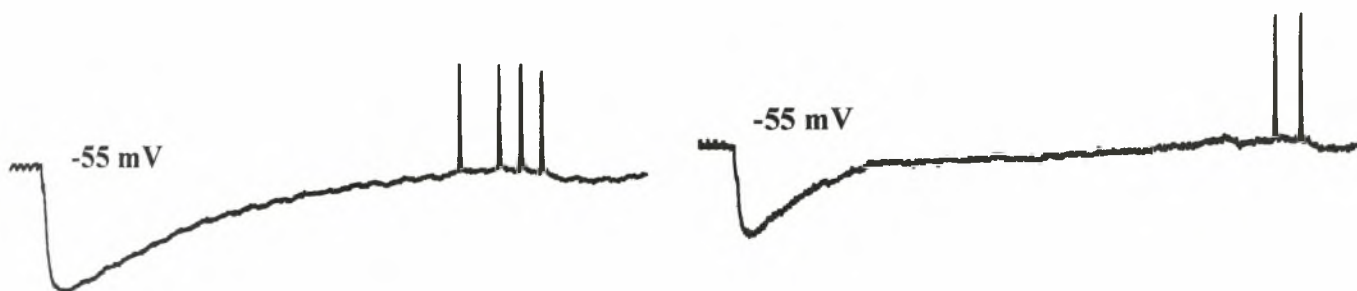
ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ ΤΕΝΥ

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ ΤΕΝΥ

**B**

CNQX + AP5 + CGP35348

CNQX + AP5 + CGP35348



Εικόνα 3.3: Οι νευρώνες της κοιλιακής μοίρας της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου παρουσιάζουν μειωμένη μετασυναπτική αναστολή σε σύγκριση με τους νευρώνες της ραχιαίας μοίρας (Paratheodoropoulos et al., 2002).

A

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ TENY

B

TENY + CNOX + BICUCULLINE + CGP35348

Εικόνα 3.4: Συναπτική απάντηση ενός CA1 πυραμιδικού νευρώνα της ραχιαίας μοίρας του υποκάμπου σε: **A)** Φυσιολογικό TEPY και **B)** διάλυμα TEPY το οποίο περιλαμβάνει ανταγωνιστές των AMPA, GABA_A και GABA_B υποδοχέων. Παρατηρείται η ύστερη συνιστώσα του EPSP η οποία οφείλεται πιθανώς σε ενεργοποίηση των υποδοχέων NMDA. Με βέλος σημειώνεται το χρονικό σημείο της συναπτικής διέγερσης.

διάλυμα φυσιολογικού TENY το οποίο περιελάμβανε τους ανταγωνιστές των AMPA, GABA_A και GABA_B υποδοχέων και καταγράφηκε εκ νέου η μετασυναπτική απάντηση. Στην εικόνα 3.4B φαίνεται η ύστερη συνιστώσα του EPSP η οποία πιθανώς οφείλεται στην ενεργοποίηση των υποδοχέων NMDA.

3.4.3: Τασεοεξαρτώμενη συμπεριφορά των NMDA υποδοχέων

Έχει ήδη αναφερθεί ότι οι υποδοχείς τύπου NMDA είναι τασεοεξαρτώμενοι υποδοχείς. Έτσι, η ροή ρεύματος δια μέσου του διαύλου NMDA εξαρτάται από το δυναμικό της κυτταρικής μεμβράνης. Όταν ο νευρώνας βρίσκεται σε κατάσταση ηρεμίας ο διάυλος NMDA αποκλείεται από το Mg²⁺. Όταν όμως ο προσυναπτικός νευρώνας εκπολώνεται επανειλημμένα, η αυξημένη έκλυση του γλουταμινικού προκαλεί αθροιζόμενα μετασυναπτικά δυναμικά τα οποία εκπολώνουν σημαντικά τη μετασυναπτική μεμβράνη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση του Mg²⁺ από το στόμιο του διαύλου με ηλεκτροστατική απώθηση, επιτρέποντας την είσοδο Na⁺ και Ca²⁺ και δημιουργώντας έτσι ένα ισχυρό ρεύμα. Έτσι, η ροή ρεύματος δια μέσω του διαύλου είναι μέγιστη όταν υπάρχει γλουταμινικό οξύ και όταν ταυτόχρονα το κύτταρο έχει εκπολωθεί.

Η τασεοεξαρτώμενη συμπεριφορά των διεγερτικών μετασυναπτικών NMDA-διαμεσολαβούμενων δυναμικών μελετήθηκε διατηρώντας τη μεμβράνη σε διαφορετικά δυναμικά, συγκεκριμένα -61, -68 και -70 mV (Εικόνα 3.5). Αυτό πραγματοποιήθηκε με την έγχυση αρνητικού ρεύματος DC, αυξανόμενης έντασης, δια μέσου του ηλεκτροδίου καταγραφής. Τα μετασυναπτικά NMDA-διαμεσολαβούμενα δυναμικά καταγράφηκαν σε συνθήκες φαρμακολογικού αποκλεισμού των υποδοχέων AMPA, GABA_A και GABA_B με τη χρήση διαλύματος TENY που περιείχε τους ανταγωνιστές των ως άνω υποδοχέων. Για την πρόκληση των μετασυναπτικών δυναμικών χρησιμοποιήθηκαν υποουδικές και ουδικές εντάσεις ερεθισμού των παράπλευρων ιών Schaffer.

Παρατηρήθηκε ότι η υπερπόλωση του δυναμικού της μεμβράνης του νευρώνα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του EPSP που απαιτείται για την πρόκληση δυναμικού ενέργειας (ουδικό πλάτος). Ταυτόχρονα, παρατηρήθηκε αύξηση της έντασης του συναπτικού ερεθισμού απαραίτητης για την πρόκληση ουδικού ερεθίσματος (11V, 15V, 18V για δυναμικά μεμβράνης -61mV, -68mV, -70mV αντίστοιχα). Αυτή η αύξηση είναι αναμενόμενη καθώς η υπερπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης απομακρύνει το δυναμικό της μεμβράνης από τον ουδό (δυναμικό μεμβράνης στο οποίο προκαλείται δυναμικό ενέργειας) και επομένως απαιτούνται συναπτικά ερεθίσματα μεγαλύτερης έντασης για την επίτευξη του ουδού.

3.4.4: Αυξημένη συναπτική NMDA-διαμεσολαβούμενη διέγερση στην κοιλιακή μοίρα του ιπποκάμπου

Για τη σύγκριση της μετασυναπτικής διέγερσης οφειλόμενης σε ενεργοποίηση NMDA υποδοχέων έγιναν καταγραφές από νευρώνες οι οποίοι εκλούστηκαν με TENV το οποίο περιείχε ανταγωνιστές των υποδοχέων AMPA, GABA_A και GABA_B. Μετρήθηκε το πλάτος των EPSPs που παρατηρήθηκαν και στις δύο μοίρες του ιπποκάμπου καθώς επίσης και η χρονική διάρκεια αυτών των μετασυναπτικών δυναμικών (Πίνακας 3.1).

	ΡΑΧΙΑΙΑ ΜΟΙΡΑ (n = 4)	ΚΟΙΛΙΑΚΗ ΜΟΙΡΑ (n = 2)
Πλάτος των EPSPs (mV)	2,1 ± 0,4	4,3 ± 0,6 *
Διάρκεια των EPSPs (ms)	46,7 ± 3,2	52,0 ± 1,2

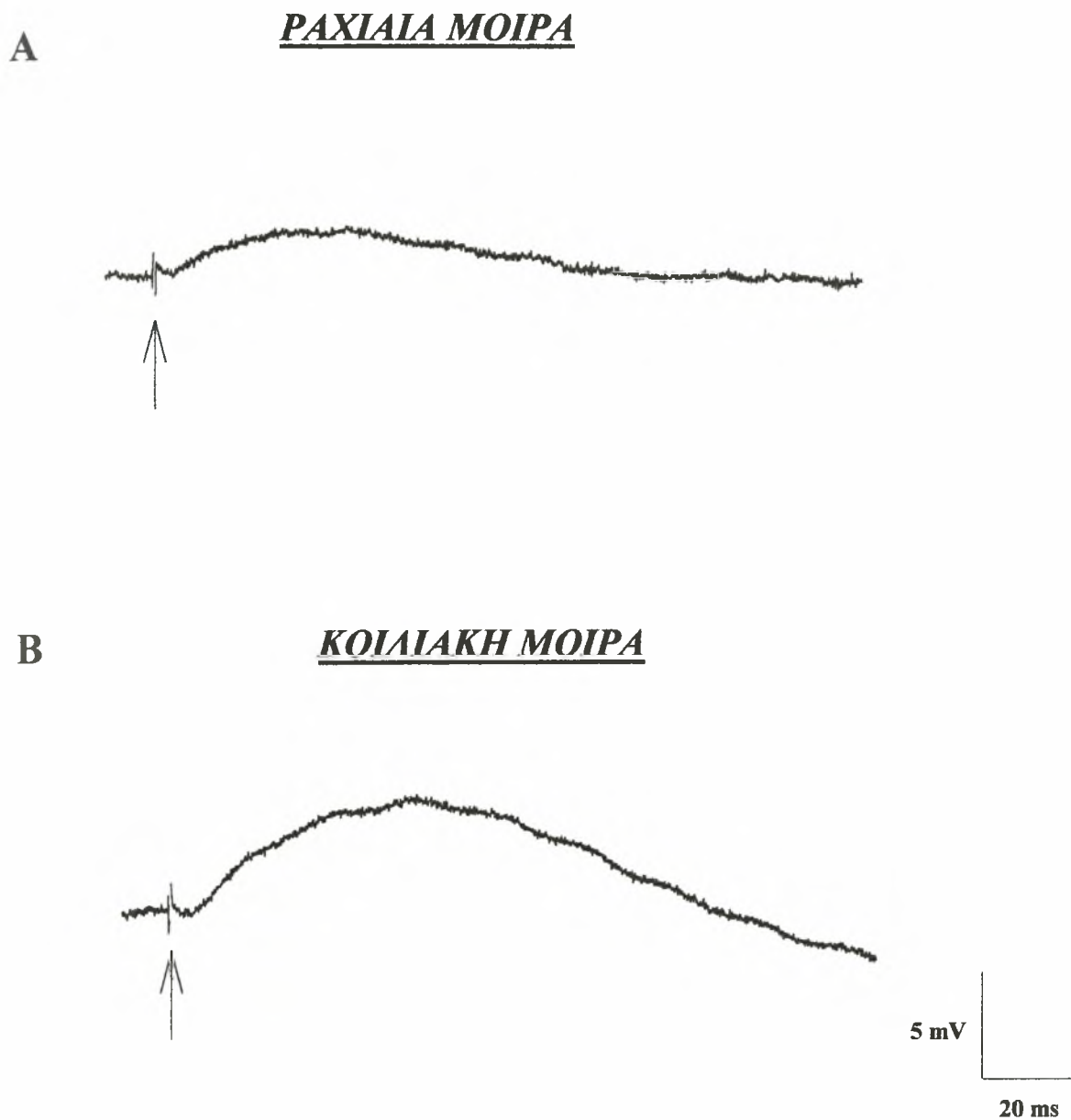
* $p < 0,05$

Πίνακας 3.1: Πλάτος και χρονική διάρκεια των οφειλόμενων σε NMDA υποδοχείς EPSPs στον κοιλιακό και στο ραχιαίο ιππόκαμπο.

Οι κυματομορφές που εμφανίζονται στην εικόνα 3.6 προέκυψαν ως μέσος όρος 4 και 5 κυματομορφών για τη ραχιαία και την κοιλιακή μοίρα αντίστοιχα.

Παρατηρήθηκε ότι το πλάτος των διεγερτικών δυναμικών EPSPs που προκλήθηκαν στους πυραμιδικούς νευρώνες του ιπποκάμπου ήταν μεγαλύτερο στον κοιλιακό ιππόκαμπο σε σύγκριση με το ραχιαίο. Ωστόσο, η διάρκεια των EPSPs δε βρέθηκε να διαφέρει σημαντικά μεταξύ των δύο μοιρών του ιπποκάμπου (Εικόνα 3.6).

TENY + CNOX + BICUCULLINE



Εικόνα 3.6: Οι μετασυναπτικοί νευρώνες της περιοχής CA1 της κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου παρουσιάζουν αυξημένη μετασυναπτική διέγερση οφειλόμενη σε δραστηριοποίηση υποδοχέων NMDA σε σύγκριση με τους νευρώνες της ραχιαίας μοίρας. Με βέλος σημειώνεται το χρονικό σημείο της συναπτικής διέγερσης.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη αφορά τη σύγκριση της διεγερσιμότητας των πυραμιδικών νευρώνων της CA1 περιοχής μεταξύ κοιλιακού και ραχιαίου ιπποκάμπου. Συγκεκριμένα, συγκρίθηκαν οι συναπτικές απαντήσεις που οφείλονται σε διέγερση των υποδοχέων NMDA μεταξύ των δύο μοιρών του ιπποκάμπου. Παρατηρήθηκε, μετά από ηλεκτρικό ερεθισμό των παράπλευρων ιών Schaffer, ότι το πλάτος των μετασυναπτικών δυναμικών είναι μεγαλύτερο στον κοιλιακό ιπποκάμπο. Αντίθετα, η χρονική διάρκεια των μετασυναπτικών δυναμικών είναι παρόμοια, και στις δύο μοίρες του ιπποκάμπου.

Μετασυναπτικά διεγερτικά δυναμικά προκαλούνται στους πυραμιδικούς νευρώνες της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου κυρίως μετά από διέγερση αξόνων των πυραμιδικών νευρώνων της περιοχής CA3 οι οποίοι σχηματίζουν την οδό των παραπλεύρων ιών του Schaffer (Andreasen et al., 1989). Μετά από διέγερση της οδού καταγράφονται διεγερτικά μετασυναπτικά δυναμικά που προέρχονται από τη δραστηριοποίηση των υποδοχέων τύπου NMDA και των μη-NMDA, καθώς και ανασταλτικά δυναμικά (Andreasen et al., 1989). Στην παρούσα μελέτη τα NMDA-διαμεσολαβούμενα μετασυναπτικά δυναμικά ελήφθησαν μετά από φαρμακολογικό αποκλεισμό των AMPA, GABA_A και GABA_B υποδοχέων με τους ειδικούς για κάθε τύπο ανταγωνιστές, δηλαδή CNQX, bicuculline, CGP35348, αντίστοιχα. Τα μετασυναπτικά αυτά δυναμικά που προκλήθηκαν σε νευρώνες της ραχιαίας μοίρας του ιπποκάμπου παρουσιάζουν παρόμοια ηλεκτροφυσιολογικά χαρακτηριστικά, δηλαδή παρόμοιες τιμές πλάτους και διάρκειας, με αυτά που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία (Andreasen et al., 1989). Αντίθετα, είναι η πρώτη φορά που καταγράφονται NMDA-διαμεσολαβούμενα μετασυναπτικά δυναμικά στην κοιλιακή μοίρα του ιπποκάμπου.

Το φαινόμενο της διεγερσιμότητας του ιπποκάμπου σχηματισμού ήταν πάντοτε ένα από τα κύρια θέματα των μελετών τα τελευταία χρόνια, και συγκεκριμένα η εμπλοκή του στη μάθηση, στη μνήμη και στα επιληπτικά φαινόμενα (Landfield et al., 1981; Milner et al., 1972; Nicholls et al., 1992; Scolville, 1954). Σχετικά πρόσφατες πληροφορίες δείχνουν ότι ο ιπποκάμπος μπορεί να διαφοροποιείται λειτουργικά κατά μήκος του επιμήκους άξονά του, και ότι κοιλιακός ιπποκάμπος είναι αποσυνδεδεμένος από την υπόλοιπη δομή όσον αφορά τις ενδο- και εξωιπποκάμπειες διασυνδέσεις και μπορεί να λειτουργεί με ποιοτικά

διαφορετικό τρόπο ή ακόμα και ανεξάρτητα από το ραχιαίο ιππόκαμπο (Moser and Moser, 1998).

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας συμφωνούν με πληροφορίες που έχουμε από άλλες μελέτες που αφορούν τη μεγαλύτερη διεγερσιμότητα του κοιλιακού ιπποκάμπου σε σχέση με το ραχιαίο (Maruki et al., 2001; Quigg et al., 1997; Strange et al., 1999) και δείχνουν ότι η μετασυναπτική απάντηση των NMDA υποδοχέων στον κοιλιακό ιππόκαμπο είναι μεγαλύτερη σε σχέση με το ραχιαίο. Η διαφορά αυτή βέβαια, αν και ενδεικτική, δεν μπορεί να αξιολογηθεί καθώς ο αριθμός των νευρώνων που χρησιμοποιήθηκαν για τις μετρήσεις είναι περιορισμένος. Επιπλέον πειράματα απαιτούνται για την πιστοποίηση ή απόρριψη των ευρημάτων αυτών.

Η φυσιολογική σημασία της διαφοροποίησης της συναπτικής, NMDA-διαμεσολαβούμενης, διέγερσης μεταξύ ραχιαίας και κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου είναι σημαντική δεδομένης της συμβολής του ιπποκάμπου σε φυσιολογικές διαδικασίες όπως η μνήμη και η μάθηση, αλλά και σε παθολογικές καταστάσεις όπως η επιληψία.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Λογοθέτης Α. Ιωάννης. *Νευρολογία*. Θεσσαλονίκη, University Studio Press, 1988.
- 2) Βλάχος Δ. Ιωάννης, Παπαδόπουλος Ι. Νικόλαος. *Στοιχεία Λειτουργικής και Κλινικής Νευροανατομικής Σημειολογίας: η Ανατομική άποψη*. Αθήνα, Παρισιάνος, 1989.
- 3) Amaral D. G. A golgi study in the hilar region of the hippocampus in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 182: 851-914, 1978.
- 4) Amaral D.G., and Witter M.P. The three dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. *Neuroscience* 31: 571-591, 1989.
- 5) Andersen P. Organization of hippocampal neurons and their interconnections. *The Hippocampus* Vol. 1. R.L. Isaacson and K.H. Pribram, ed New York: Plenum Press, pp. 155-175, 1975.
- 6) Balboni C. G., Bastianini A., Brizzi E., et al. Sistema Nervoso Centrale. In: *Anatomia Umana* Vol. 3, Ed : ermes, pp. 182-184, 1997.
- 7) Bayer S. Hippocampal region. In: *The rat nervous system*. Vol. 1, Forebrain and midbrain. G. Paxinos, Ed: New York: Academic Press, p.p. 335-352, 1985.
- 8) Beckstead R.M. Afferent connections of the entorhinal area in the rat as demonstrated by retrograde cell-labeling with horseradish peroxidase. *Brain Res.* 152: 249-264, 1978.
- 9) Bowery N.G., Doble A., Hill D.R., Hudson A.L., Shaw J.S., Turnbull M. J. and Warrington R. Bicuculline-insensitive GABA receptors on peripheral autonomic nerve terminals. *Eur. J. Pharmacol.* 71: 53-70, 1981.
- 10) Bowery N.G., Hill D.R., Hudson A. L., Doble A., Middlemiss D. N., Shaw J., and Turnbull M. Baclophen decreases neurotransmitter release in the mammalian CNS by an action at a novel GABA receptor. *Nature* 283: 92-94, 1980.
- 11) Bowery N. G., Hudson A. L. and Price G.W. GABA_A and GABA_B receptor site distribution in the rat central nervous system. *Neurosci.* 20(2): 365-383, 1987.
- 12) Deacon T.W., Eichenbaum H.E., Rosenberg P., Ekman K.W. Afferent connection of the perirhinal cortex in the rat. *J Comp. Neurol.*, 220: 168-190, 1983.
- 13) Fernandez G., Weyerts H., Schrader-Bolsche M., Tendolkar I., Smid H.G., Tempelmann C., Hinrichs H., Scheich H., Elger C.E., Magnum G.R., Heinze H.J. Successful verbal encoding into episodic memory engages the posterior hippocampus: a parametrically analyzed functional magnetic resonance imaging study. *J Neurosci* 18; 1941-1847, 1998.
- 14) Gage F.H., and Thompson R.G. Differential distribution of norepinephrine and serotonin along the dorso-ventral axis of the hippocampal formation. *Brain Res. Bull.* 5: 771-773, 1980.
- 15) Galoyan S. M., and Merlin, L. R. Long-lasting potentiation of epileptiform bursts of group I mGluRs is NMDA receptor independent. *J. Neurophysiol.* 83: 2463-2467, 2000.
- 16) Garcia Ruiz A.J., Zambelli M., La Porta C., Ladinsky H., and Consolo S. Differences between rat dorsal and ventral hippocampus in muscarine receptor agonist binding and interaction with phospholipase. *C. Eur. J Pharmacol.* 244: 125-131, 1993.
- 17) Grivas H., Michaloudi Ch., Batzios Ch., et al. Vascular network of the rat hippocampus is not homogeneous along the septotemporal axis. *Brain Res.* 971, Issue 2: 245-249, 2003.

- 18) Hortnagl H., Berger M.I., Sperk G., and Pifl C. Regional heterogeneity in the distribution of neurotransmitter markers in the rat hippocampus. *Neurosci.* 45: 261-272, 1991.
- 19) Jeltsch H., Cassel J.C., Simler S., Lazarus C., Kelche C., Hertting G., Jackisch R., and Will R. Hippocampal amino acid concentrations after raphe and/or septal cell suspension grafts in rats with fimbria-fornix lesions. *Neurosci.* 63: 41-45, 1994.
- 20) Jin K.L., Mao X.O., and Greenberg D.A. Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in vitro ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 10242-10247, 2000.
- 21) Kahle W., Leonhardt H., Platzer W. Τελικός Εγκέφαλος, In: *Εγχειρίδιο ανατομικής του ανθρώπου με έγχρωμο άτλαντα*, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, pp. 216-221, 1985.
- 22) Krnjevic K. and Schwartz S. The action of gamma-aminobutyric acid on cortical neurons. *Exp. Brain Res.* 3: 320-336, 1967.
- 23) Kandel E.R., Schwartz J.H., and Jessel T.M. *Νευροεπιστήμη και Συμπεριφορά*, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, pp.687-688, 1999.
- 24) Kohler C., Schultzberg M., Radesater A. C. Distribution of neuropeptide Y receptors in the rat hippocampal region. *Neurosci. Lett.* 75: 141-146, 1987.
- 25) Kotloski R., Lynch M., Lauersdorf S., and Sutula T. Repeated brief seizures induce progressive hippocampal neuron loss and memory deficits. *Prog Brain Res.* 135: 95-110, 2002.
- 26) Landfield P. W., Baskin R.w., and Pitter T.A. Brain-aging correlates: Retardation by hormonal Pharmacological treatments. *Science* 214: 581-584, 1981.
- 27) Landolt H. Significance of electroencephalography in the therapy of epilepsy. *Nervenarzt* 28(4): 170-176, 1957.
- 28) Landolt H. Temporal lobe epilepsy and its psychopathology. A contribution to the knowledge of the psychophysical correlation to the knowledge of the psychophysical correlation between epilepsy and brain lesions. *Bibl Psychiatr. Neurol.* 112: 1-102, 1960.
- 29) Landolt H. Psychic disorders in epilepsy. Clinical and electroencephalographic research. *Dtsch Med Wochenschr.* 87: 446-452, 1962.
- 30) Lee K.S., Reddington M., Schuber P., and Kreuzbert G. Regulation of the strength of adenosine modulation in the hippocampus by differential distribution of CA1 receptors. *Brain Res* 260: 156-159, 1983.
- 31) Lee P.H., Xie C.W., Lewis D.V., Wilson W.A., Mitchell C.L., and Hong J.S. Opioid-induced epileptiform bursting in hippocampal slices: higher susceptibility in ventral than dorsal hippocampus. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 253: 545-551, 1990.
- 32) Lektisch H., Cassel J.C., Simler S., Lazarus C., Kelche C., Hertting G., Jackisch R., and Will R. Hippocampal aminoacid concentrations after raphe and /or septal cell suspension grafts in rats with fimbria —fornix lesions. *Neurosci.* 63: 41-45, 1994.
- 33) Low W.C., Roepke J., Farber S.D., Hill T.G., Sattin A., and Kubek M.J. Distribution of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in the hippocampal formation as determined by radioimmunoassay. *Neurosci. Lett.* 103: 314-319, 1989.
- 34) Martens U., Capito B., Wree A. Septotemporal distribution of [³H]MK-801, [³H]AMPA and [³H]Kainate bindings sites in the rat hippocampus. *Anat Embryol* 198: 195-204, 1998.

- 35) Maruki K., Izaki Y., Hori K., Nomura M., and Yamauchi T. Effects of rat ventral and dorsal hippocampus temporal activation on delayed alternation task. *Brain Res* 895: 273-276, 2001.
- 36) Maruki K., Izaki Y., Nomura M., and Yamauchi T. Differences in paired-pulse facilitation and long-term potentiation between dorsal and ventral CA1 region in anesthetized rats. *Hippocampus* 11: 655-661, 2001.
- 37) Merlin L.R. Metabotropic glutamate receptors in the plasticity of excitatory responses in the hippocampus: Clinical Impact. *Adv. Exp. Med. Biol.* 446: 131-144, 1998.
- 38) Merlin L. R. Group I mGluR-mediated silent induction of long-lasting epileptiform discharges. *J. Neurophysiol.* 82: 1078-1081, 1999.
- 39) Merlin L. R. Differential roles for mGluR1 and mGluR5 in the persistent prolongation of epileptiform bursts. *J. Neurophysiol.* 87(1): 621-625, 2002.
- 40) Merlin L. R., Bergold P. J., and Wong R. K. S. Requirement of protein synthesis for group I mGluR-mediated induction of epileptiform discharges. *J. Neurophysiol.* 80: 989-993, 1998.
- 41) Milner B. Memory disturbance after bilateral hippocampal lesions. In: Milner P., Glickman S., eds. *Cognitive processes and the brain*. Princeton, NJ: VAn Nostrand, 1965.
- 42) Milner B. Disorders of learning and memory after temporal lobe lesions in man. *Clinical Neurosurgery* 19: 421-446, 1972.
- 43) Milner B., Corkin S., Teuber H.L. Further analysis of the hippocampal amnesic syndrome: 14-year follow-up study of H.M. *Neuropsychologia* 6: 317-388, 1968.
- 44) Nicholls J.G., Martin R.A., and Wallace B. G. *From Neuron to Brain*, Ed: Sinauer Associates, Inc, U.S.A., pp. 320-327, 1992.
- 45) Nieuwenhuys R., Voogd J., and van Huijzen C. *Το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα του Ανθρώπου. Σύνοψη και Ατλαντάς*. Τρίτη Έκδοση, Εκδόσεις Κυριακίδη, pp. 363-374, 1997.
- 46) Nomura T., Fukuda T., Aika Y., Heizmann W.C., Emson c. P., Kobayashi T., and Kosaka T. distribution of nonprincipal neurons in the rat hippocampus, with special reference to their dorsoventral difference. *Brain Res.* 751: 64-80, 1997.
- 47) Nyberg L., McIntosh A.R., Houle S., Nilsson L.G., Tulving E. Activation of medial temporal structures during episodic memory retrieval. *Nature* 380: 715-717, 1996.
- 48) Papapetropoulos A., Desai K.M., Rudic R.D., et al. Nitric oxide synthase inhibitors attenuate transforming-growth-factor- α -stimulated capillary organization in vitro. *Am. J. Pathol.* 150: 1835-1844, 1997.
- 49) Papatheodoropoulos C., Asproдини E., Nikita I., et al. Weaker synaptic inhibition in CA1 region of ventral compared to dorsal hippocampal slices. *Brain Res.* 948: Iss 1-2, 2002.
- 50) Pitkanen A., Pikkarainen N., and Ylinen A. Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. *Ann. N Y Acad. Sci.* 911: 369-391, 2000.
- 51) Quigg M., Bertram E.H., and Jackson T. Longitudinal distribution of hippocampal atrophy in medial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.*: 27-101, 1997.
- 52) Rainnie D. G., Asproдини E. K., and Shinnick-Gallagher P. Inhibitory transmission in the basolateral amygdala. *J. Neurophysiol.* 66: 986-998, 1991 (a).
- 53) Rainnie D. G., Asproдини E. K., and Shinnick-Gallagher P. Inhibitory transmission in the basolateral amygdala. *J. Neurophysiol.* 66: 999-1009, 1991 (b).

- 54) Rami A., Ausmeir F., Winckler J., and Kriegstein J. Differential effects of scopolamine on neuronal survival in ischemia and glutamate neurotoxicity: relationships to the excessive vulnerability of the dorsoseptal hippocampus. *J Chem. NeuroAn.* 13, Issue 3: 201-208, 1997.
- 55) Rempel-Clower N.L., Zola S.M., Squire L.R., Amaral D>G. Three cases of enduring memory impairment after bilateral damage limited to the hippocampal formation. *J Neurosci* 16: 5233-5255, 1996.
- 56) Risold P.Y., and Swanson L.W. Structural evidence from functional domains in the rat hippocampus. *Science* 272: 1484-1488, 1996.
- 57) Rombouts S.A., Machielsen W.C., Witter M.P., Barkhof F., Lindeboom J., Scheltens P. Visual association encoding activates the medial temporal lobe: a functional magnetic resonance imaging study. *Hippocampus* 7: 594-601, 1997.
- 58) Room P., Groenewegen H.J. Connections of the parahippocampal cortex. I. Cortical afferents. *J Comp Neurol.*251: 415-450, 1986.
- 59) Room P., Groenewegen H.J. Connections of the parahippocampal cortex in the cat. II. Subcortical afferents. *J Comp Neurol.* 251: 451-473, 1986.
- 60) Ruth R. E., Collier T.J., and Routtenberg A. Topographical relationship between the entorhinal cortex and the septotemporal axis of the dentate gyrus in rats. II. Cells projecting from lateral entorhinal subdivisions. *J Comp Neurol* 270: 506-516, 1988.
- 61) Scoville W.B. The limbic lobe in man. *J Neurosurg.* 11: 64-66, 1954.
- 62) Scoville W.B., Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol Neurosurg Psychiat* 20: 11- 21, 1957.
- 63) Shepherd G. Hippocampus, Brown T. and Zador A., In: *The Synaptic Organization of the Brain*, Ed: Oxford University Press, pp. 346-388, 1990.
- 64) Squire L.R., Ojemann J.G., Miezín F.M., Petersen S.E., Videen T.O., Raichle M.E. Activation of the hippocampus in normal humans: A functional anatomical study of memory. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1837-1841, 1992.
- 65) Stern C.E., Corkin S., Gonzalez R.G., Guimaraes A.R., Baker J.R., Jennings P.J., Carr C.A., Sigiura R.M., Vedantham V., Rosen B.R. The hippocampal formation participates in novel picture encoding: evidence from functional magnetic resonance imaging. *Proc natl Acad Sci USA* 93: 8660-8665, 1996.
- 66) Strange B.A., Fletcher P.C., Henson R.N., Friston K.J., and Dolan R.J. Segregating the functions of human hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 4034-7039, 1999.
- 67) Swanson L.W. and Cowan W.M. An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J. Comp. Neural.* 172: 49-84, 1977.
- 68) Swanson L.W. Normal hippocampal circuitry. *Neurosci. Res.* 20: 624-637, 1982.
- 69) Swanson L.W. The anatomical organization of septo-hippocampal projections. *Ciba Found Symp.*58: 25-48, 1977.
- 70) Swanson L.W., Sawchenko P.E., and Cowan W.M. Evidence for collateral projections by neurons in Ammon horn, the dentate gyrus and the subiculum: a multiple retrograde labeling study in the rat. *J. Neurosci.* 5, 548-549, 1981.

- 71) Van Leeuwen F.W., van Heerikhuize J., van der Meulen G., and Wolters P. Light microscopic autoradiographic localization of [3J]oxytocin binding sites in the rat brain, pituitary and mammary gland. *Brain Res.* 359: 320-325, 1985.
- 72) Williams P., Banmister L., Berry M., Collins P., Dussek J., and Ferguson M. The Hippocampal Formation. In: *Gray's anatomy 38th edition*. London: Churchill Livingstone, pp. 1123-1131, 1995.
- 73) Witter M.P. A survey of the anatomy of the hippocampal formation, with emphasis on the septotemporal organization of its intrinsic and extrinsic connections. In: Schwarcz R., Ben-Ari Y. (eds) Excitatory amino acids and epilepsy. *Adv Exp Med Biol* 203: 67-82, 1986.
- 74) Witter M.P. *Connectivity of rat hippocampus*. In: The hippocampus – new vistas, Neurology and Neurobiology, Vol. X. Chan - Palay and C. Kohler, Ed: New York: Alan R. Liss Inc, 1989.
- 75) Witter M.P., Room P., Groenewegen H.J., and Lohman A.H.M. Connections of the parahippocampal cortex in the cat. V. Intrinsic connections: Comments on input/output connections with the hippocampus. *J Comp. Neurol.* 252: 78-94, 1986.
- 76) Ziche M., Morbidelli L., Masini E., et al. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial growth cell migration in vitro promoted by substance P. *J. Clin. Invest.* 94: 2036-2044, 1994.
- 77) Zola-Morgan S., Squire L.R., Amaral D.G. Human amnesia and the medial temporal lobe region: Enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J Neurosci* 6: 2950-2967, 1986.