



**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ : ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ν. ΣΑΚΕΛΛΑΡΙΔΗΣ**

***ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΙΕΓΕΡΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ  
ΠΥΡΑΜΙΔΟΕΙΔΩΝ ΝΕΥΡΩΝΩΝ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ CA1  
ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΥ***

***ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ***

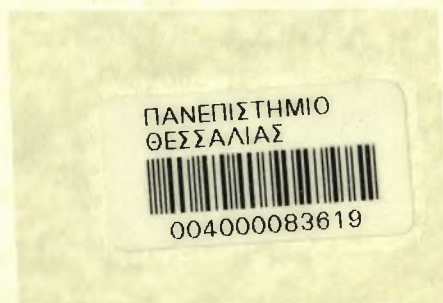
***Γκρέτα Ε. Βόζγιακ***

**ΛΑΡΙΣΑ 2003**



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

Αριθ. Εισ.: 2857/1  
Ημερ. Εισ.: 08-07-2009  
Δωρεά: \_\_\_\_\_  
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ  
612.82  
ΒΟΖ



## **ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ**

Ευτυχία Ασπροδίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας,  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Ευτυχία Ασπροδίνη, Αναπλ. Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Π.Θ.  
Πασχάλης Α. Μολυβδάς, Καθηγητής Φυσιολογίας, Π.Θ.  
Αντώνιος Καραβέλης, Καθηγητής Νευροχειρουργικής, Π.Θ.

## **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Πασχάλης Α. Μολυβδάς, Καθηγητής Φυσιολογίας, Π.Θ.  
Αντώνιος Καραβέλης, Καθηγητής Νευροχειρουργικής, Π.Θ.  
Γεώργιος Κουκούλης, Καθηγητής Ανατομοπαθολογίας, Π.Θ.  
Νικόλαος Σακελλαρίδης, Καθηγητής Φαρμακολογίας, Π.Θ.  
Ευτυχία Ασπροδίνη, Αναπλ. Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Π.Θ.  
Γεώργιος Χατζηγεωργίου, Επ. Καθηγητής Νευρολογίας, Π.Θ.  
Νικόλαος Πιτσίκας, Λέκτορας Φαρμακολογίας, Π.Θ.



# ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

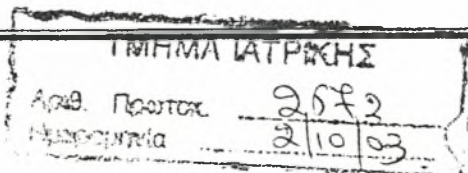
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής: Καθηγητής Ν. Σακελλαρίδης

Παπακρυαζή 22  
41222 Λάρισα

Τηλ: +30-41-565266  
Fax: +30-41-565266



Λάρισα 4/9/2003  
Αρ.Πρωτ.

Προς  
τη Γενική Συνέλευση  
Ειδικής Σύγκλησης  
του Ιατρικού Τμήματος  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Η επταμελής Επιτροπή αποτελούμενη από τους κ.κ. 1) Πασχάλη Α. Μολυβδά, 2) Αντώνιο Καραβέλη, 3) Γεώργιο Κουκούλη, 4) Νικόλαο Σακελλαρίδη, 5) Ευτυχία Ασπροδίνη επιβλέπουσα, 6) Γεώργιο Χατζηγεωργίου και 7) Νικόλαο Πιτσικά για την κρίση της διδακτορικής διατριβής της κ. Γκρέτας Βόζνιακ, με θέμα «Μελέτη της διεγερσιμότητας των πυραμιδοειδών νευρώνων της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου» αποφάσισε στις 4/9/2003 την αποδοχή της διατριβής με βαθμό **ΑΡΙΣΤΑ** και εισηγείται στη Γενική Συνέλευση να καλέσει τον υποψήφιο να δώσει τον νενομισμένο όρκο.

## Η ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1) Πασχάλης Α. Μολυβδάς

2) Αντώνιος Καραβέλης

3) Γεώργιος Κουκούλης

4) Νικόλαος Σακελλαρίδης

5) Ευτυχία Ασπροδίνη

6) Γεώργιος Χατζηγεωργίου

7) Νικόλαος Πιτσικάς

Στις κόρες μου την Αναστασία και την Άννα – Μαρία το αφιερώνω ως  
ελάχιστο δείγμα αγάπης

"Οι άνθρωποι πρέπει να γνωρίζουν  
ότι και οι ηδονές και χαρές και τα γέλια και  
τα παιχνίδια, όπως και οι στενοχώριες και η  
άσχημη διάθεση και τα κλάματα δεν  
προέρχονται από πουθενά αλλού παρά  
από τον εγκέφαλο. Χάρη σε τούτον έχουμε  
νόηση και λογική και βλέπουμε και ακούμε  
και καταλαβαίνουμε τα αισχρά και τα καλά  
τα δυσάρεστα....Και από τον εγκέφαλο  
προκαλούνται και ο φόβος και ο τρόμος...  
Όλα τούτα τα παθαίνουμε από τον  
εγκέφαλο, όταν δε είναι υγιής..."  
ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ, "Περί Ιερής Νούσου"

## ΣΥΝΟΠΤΙΚΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΟΝΟΜΑ	Γκρέτα
ΕΠΩΝΥΜΟ	Βόζνιακ
ΟΝΟΜΑ ΠΑΤΕΡΑ	Ευγένιος
ΟΝΟΜΑ ΜΗΤΕΡΑ	Αννα
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ	21-9-1965
ΥΠΗΚΟΟΤΗΤΑ	Ελληνική
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ	Έγγαμη, μητέρα δύο παιδιών
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΚΑΤΟΙΚΙΑΣ	Αχιλλέως 54, Βόλος
ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ	Πολωνικά (μητρική), Ελληνικά (άριστα), Αγγλικά (επαρκής)

### ΣΤΑΔΙΟΔΡΟΜΙΑ

1984	Απολυτήριο Λυκείου από 5 <sup>ο</sup> Λύκειο Ζέσουφ, Πολωνίας
1984 -1985	Πρακτική εξάσκηση σε κρατικό νοσοκομείο στο Ζέσουφ (στοιχείο απαραίτητο για την εισαγωγή στο Πανεπιστήμιο, Ιατρική Ακαδημία)
1986 - 1993	Ανώτατη εκπαίδευση, Ιατρική Ακαδημία, Πόζναν, Πολωνία, με εξειδίκευση στην Κλινική Φαρμακολογία σε συνεργασία με το Καρδιολογικό και το Ογκολογικό Τμήμα του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου του Πόζναν της Πολωνίας.
1993	Πτυχίο Φαρμακολογίας, Φαρμακολογικού Τμήματος και Ιατρικών Αναλύσεων της Ιατρικής Ακαδημίας, Πόζναν, Πολωνία.
1993	Master in Pharmacology, Ογκολογικό Τμήμα Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου, Πόζναν, Πολωνία.
1997	Εξετάσεις για την απόκτηση αναγνώρισης τίτλου σπουδών από το ΔΙΚΑΤΣΑ - έλλειψη της εξειδίκευσης του Κλινικού Φαρμακολόγου στην Ελλάδα (μαθήματα: Βιοφαρμακευτική, Τεχνολογία Φαρμάκων, Φαρμακολογία).
1999 – 2003	Υποψήφια Διδάκτωρ του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

## Δημοσιεύσεις και Ανακοινώσεις Επιστημονικών Εργασιών σε Συνέδρια

«Intracellular recordings from morphologically identified neurons of cat and rat nucleus reticularis thalami (NRT)» **G. Wozniak**, V. Crunelli, and E. Asprodini.  
15<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο της «Ελληνικής Εταιρείας για τις Νευροεπιστήμες»,  
Πάτρα, σελ. 91, 2000.

«Resting and active membrane properties of morphologically identified pyramidal neurons: in vitro intracellular recording from ventral and dorsal rat hippocampus» **G. Wozniak**, E. Asprodini, E. Kouvaras, C. Papatheodoropoulos, and George K. Kostopoulos.  
17<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο της «Ελληνικής Εταιρείας για τις Νευροεπιστήμες»,  
Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ρέθυμνο, σελ. 37, 2002.

«Differentiation of intrinsic membrane properties between Dorsal and Ventral CA1 principal hippocampal neurons» E. Kouvaras, E.K. Asprodini, C. Koutsona, **G. Wozniak**, C. Papatheodoropoulos and G. K. Kostopoulos.  
6-th IBRO World Congress Of Neuroscience. Prague, Czech Republic, poster 4043, 2003.

«Διαφοροποίηση των μεμβρανικών ιδιοτήτων πυραμιδοειδών νευρώνων της περιοχής CA1 του κοιλιακού και του ραχιαίου ιπποκάμπου αρουραίου»  
E. Δ. Κουβαράς<sup>1</sup>, E. Κ. Ασπροδίνη<sup>1</sup>, Χ. Κουτσώνα<sup>1</sup>, **G. Wozniak**<sup>1</sup>, Κ. Παπαθεωρόπουλος<sup>2</sup>, and Γ. Κωστόπουλος<sup>2</sup>  
18<sup>η</sup> Συνάντηση, Ελληνική Εταιρεία για τις Νευροεπιστήμες, Αθήνα, σελ. 107, 2003.

«Differentiation of intrinsic membrane properties between Dorsal and Ventral CA1 principal hippocampal neurons»  
**G. Wozniak**<sup>1</sup>, E. K. Asprodini<sup>1</sup>, E. Kouvaras<sup>1</sup>, C. Koutsona<sup>1</sup>, C. Papatheodoropoulos<sup>2</sup> and G. K. Kostopoulos<sup>2</sup>. (Brain Res. 2004, υποβλήθηκε)



### Υπό προετοιμασία

«Septo-temporal differentiation of NMDA - mediation synaptic transmission in rat CA1 hippocampal region»

**G. Wozniak**, E. Kouvaras, E. Asproдини, K. Papatheodoropoulos, G. Kostopoulos.

«Comparison of morphological characteristics between septal and temporal pyramidal neurons; relation to their electrophysiological properties»

V. Sinopoulos, **G. Wozniak**, E. Asproдини K. Papatheodoropoulos, G. Kostopoulos.

«Enhanced excitability of temporal hippocampal pyramidal neurons: the role of gap junctions» E. Kouvaras, **G. Wozniak**, E. Asproдини.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο χρονικό διάστημα Ιούνιος 1999 - Ιούνιος 2003, υπό την καθοδήγηση της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Φαρμακολογίας Ευτυχίας Ασπροδίνης. Η μελέτη αυτή δεν θα είχε ολοκληρωθεί χωρίς τη συμβολή και βοήθεια των συνεργατών και φίλων προς τους οποίους εκφράζω τις ευχαριστίες μου και την ευγνωμοσύνη μου.

Στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ευτυχία Ασπροδίνη εκφράζω τις θερμές μου ευχαριστίες για την καθοδήγηση, το μεγάλο ενδιαφέρον της, την πολλαπλή ηθική υποστήριξη και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από τα πρώτα βήματα και καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διατριβής.

Τον Καθηγητή κ. Νικόλαο Σακελλαρίδη ευχαριστώ θερμά για τη φιλική του διάθεση, το ενδιαφέρον του, τις πολύτιμες συμβουλές στο τελευταίο χρόνο της εκπόνησης και της συγγραφής της παρούσας διατριβής και για την μετάδοση του πνεύματος αισιοδοξίας και για τη συμπαράστασή του.

Τον Καθηγητή κ. Πασχάλη-Αδάμ Μολυβδά και τον Καθηγητή κ. Αντώνη Καραβέλη ευχαριστώ για τις πολύτιμες παρατηρήσεις και υποδείξεις τους, που συνέβαλαν στην τελική διαμόρφωση του κειμένου αυτής διατριβής. Τον Καθηγητή κ. Γεώργιο Κουκούλη ευχαριστώ για την πολύτιμη βοήθεια στη διεκπεραίωση της τελικής φάσης του ιστολογικού μέρους της μελέτης, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Γεώργιο Χατζηγεωργίου και το Λέκτορα κ. Νικόλαο Πιτσικά ευχαριστώ επίσης θερμά για τη συμβολή τους.

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

Επίσης οφείλω να ευχαριστήσω όλα τα άτομα που εργάζονται στη Βιβλιοθήκη, στους Γραμματείς του Ιατρικού Τμήματος για τη συνεχή βοήθειά τους στην επίλυση ποικίλων προβλημάτων που προέκυπταν.

Τέλος, θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια μου, για την πολύπλευρη υποστήριξη, την υπομονή, την κατανόηση και την συμπαράσταση σ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής.

# ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Σελίδα

## ΠΡΩΤΟ ΜΕΡΟΣ

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Γενικά.....	1
1.1 Συνδέσεις του ιπποκάμπου.....	3
2. Τρισυναπτικόν κύκλωμα.....	7
3. Ανατομική διαφοροποίηση ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου.....	10
4. Ιππόκαμπος, μνήμη και μάθηση.....	12
5. Ο Ιππόκαμπος και η επιληψία.....	14
6. Διεγερσιμότητα των νευρώνων του ιπποκάμπου.....	17
7. Φυσιολογία των ριπών των δυναμικών ενεργείας.....	21
8. Σκοπός και στόχος της εργασίας.....	23

## ΔΕΥΤΕΡΟ ΜΕΡΟΣ

### ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

1. Πειραματόζωα.....	24
2. Φαρμακολογική παράγοντες.....	24
3. Προετοιμασία τομών του εγκεφαλικού.....	25
4. Θάλαμος καταγραφής.....	25
5. Σύστημα καταγραφής – ανάλυσης των δεδομένων.....	26
6. Συναπτική διέγερση.....	31

7. Υπολογισμός σταθεράς χρόνου.....	34
8. Ιστολογία.....	34
9. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.....	36

## ΤΡΙΤΟ ΜΕΡΟΣ

### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή.....	37
Ιδιότητες της μεμβράνης των πυραμιδοειδών νευρώνων της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου.....	38
1. Παθητικές ιδιότητες μεμβράνης.....	38
1.1 Δυναμικό μεμβράνης εν ηρεμία.....	38
1.2 Αντίσταση εισόδου.....	39
1.3 Χρονική σταθερά της μεμβράνης.....	40
2. Ενεργητικές ιδιότητες μεμβράνης των πυραμιδοειδών νευρώνων .....	42
2.1 Σχέση ρεύματος-τάσης.....	43
2.2 Μονήρες δυναμικό ενέργειας.....	47
2.3 Ταχύ μεταϋπερπολωτικό δυναμικό (f- AHP).....	51
2.4 Μεταεκπολωτικό δυναμικό (ADP).....	55
2.5 Ιδιότητες των επαναλαμβανόμενων εκφορτίσεων.....	58
3. Μετασυναπτικά δυναμικά.....	65
5. Μορφολογία των πυραμιδοειδών νευρώνων.....	70

## ΤΕΤΑΡΤΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	75
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	81
ABSTRACT.....	82
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ.....	83

# ΠΡΩΤΟ ΜΕΡΟΣ

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### Ο ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΣ Ή ΑΜΜΩΝΕΙΟ ΚΕΡΑΣ:

#### 1. Γενικά.

Ο ιππόκαμπος ή ιπποκάμπειος σχηματισμός είναι ένα μεγάλο μόρφωμα που εμφανίζει το σχήμα του γράμματος **C** και αποτελεί τμήμα του έσω τοιχώματος των εγκεφαλικών ημισφαιρίων. Το όνομά του προέρχεται από τον ιππόκαμπο, το γνωστό θαλασσινό άλογο, με το οποίο προσομοιάζει σε μετωπιαία διατομή (Nieuwenhuys et al., 1983).

Ο ιπποκάμπειος σχηματισμός μπορεί να διαιρεθεί μορφολογικά σε τρεις μοίρες: τον προσυνδεσμικό, τον υπερσυνδεσμικό και τον οπισθοσυνδεσμικό ιππόκαμπο. Οι δύο πρώτες μοίρες είναι μικρά μορφώματα, ενώ ο οπισθοσυνδεσμικός ιππόκαμπος εμφανίζει καλή ανάπτυξη και αντιπροσωπεύει την κύρια μοίρα του ιπποκάμπου. Οι ονομασίες των τριών μοιρών αναφέρονται ως προς τη θέση τους σε σχέση με το μεσολόβιο (Nieuwenhuys et al., 1983).

Ο ιππόκαμπος είναι μια δομή του εγκεφάλου η οποία αποτελεί μέρος του επιχείλιου ή μεταιχμιακού συστήματος. Παρόλο που βρίσκεται από κάτω του εγκεφαλικού φλοιού δεν είναι πράγματι μια υποφλοιώδης δομή, αλλά ένας αυτοαναδιπλούμενος αρχαιοφλοιός παλαιότερος και περισσότερο πρωτογενής από τον περιβάλλοντα νεοφλοιό.

Ο οπισθοσυνδεσμικός ιππόκαμπος διαφοροποιείται σαφώς σε τρία μορφώματα που διατάσσονται επιμήκως, δηλαδή, την οδοντωτή έλικα το Αμμώνειο κέρασ και το υπόθεμα του ιπποκάμπου. Η οδοντωτή έλικα - το όνομά της αναφέρεται στην οδοντωτή όψη της επιφάνειάς της- αποτελεί το

πιο εσωτερικό τμήμα του ιπποκάμπου, ενώ το πιο εξωτερικό τμήμα αποτελούν το Αμμώνειο κέρασ και το υπόθεμα του ιπποκάμπου.

Εξαιτίας του τυλίγματος του ιπποκάμπου, η οδοντωτή ταινία βρίσκεται στην άνω πλευρά και το υπόθεμα του ιπποκάμπου στην κάτω πλευρά της αύλακας του ιπποκάμπου. Η οδοντωτή ταινία εμφανίζει μια κοκκώδη στοιβάδα με μικρά κύτταρα, ενώ στο Αμμώνειο κέρασ και στο υπόθεμα του ιπποκάμπου παρατηρούνται κυρίως μεγάλα πυραμοειδή κύτταρα. Στην έσω επιφάνεια του εγκεφαλικού ημισφαιρίου ο φλοιός του υποθέματος του ιπποκάμπου έρχεται σε επαφή με τον παραλλοφλοιό ή μεσοφλοιό. Ο φλοιός αυτός αποτελεί ένα μεταβατικό τύπο φλοιού μεταξύ του αλλοφλοιού του ιπποκάμπου και του νεοφλοιού. Ο μεταβατικός αυτός φλοιός καλύπτει την παραϊπποκάμπεια έλικα και βρίσκεται επίσης στην υπερμεσολόβια έλικα του προσαγωγίου.

Διάφορα πεδία, εκτός της οδοντωτής έλικας, δίδουν προβολές προς περιοχές εκτός του ιπποκάμπου σχηματισμού. Συγκεκριμένα, οι πυραμιδοειδείς νευρώνες του Αμμωνίου κέρατος προβάλλουν στους έξω διαφραγματικούς πυρήνες, ενώ το σύμπλεγμα του υποθέματος προβάλλει κυρίως στα μαστία, τον πρόσθιο θάλαμο και τον αμυγδαλοειδή πυρήνα. Η αντίληψη για τις εξωτερικές ιπποκάμπειες διασυνδέσεις άλλαξε σημαντικά την παρελθούσα δεκαετία. Η αντίληψη αυτή κυριαρχείτο από την ιδέα του κυκλώματος Perez σύμφωνα με το οποίο ο ιπποκάμπιος σχηματισμός θεωρείται ότι λαμβάνει αισθητική πληροφορία από τον νεοφλοιό. Η πρώιμη αυτή άποψη δεν ήταν μόνο απλή αλλά και ανακριβής. Επί παραδείγματι, το υπόθεμα προβάλλει κυρίως προς τα μαστία ενώ η κύρια μοίρα του ιπποκάμπου δίδει απαγωγές προς το σύμπλεγμα του διαφράγματος. Ο Amaral (1987) υποστηρίζει την γενική άποψη, ότι η οδοντωτή έλικα και το κέρασ του Αμμωνίου λαμβάνει λίγες ή καθόλου προσαγωγές από τον νεοφλοιό αντίθετα, το υπόθεμα και ο ενδορρινικός φλοιός δέχονται τέτοιες προβολές από τον κροταφικό, τον μετωπιαίο και από άλλους φλοιούς. Τουναντίον, όλα τα ιπποκάμπεια πεδία λαμβάνουν υποφλοιώδεις προσαγωγές ίνες.

## 1.1 Συνδέσεις του Ιπποκάμπου.

### Προσαγωγές και απαγωγές ίνες του ιπποκάμπου.

#### Οι προσαγωγές ίνες του ιπποκάμπου:

Ο ιπποκάμπος δέχεται προσαγωγές ίνες από:

- α. τον ενδορρινικό φλοιό
- β. το διάφραγμα
- γ. τον υποθάλαμο
- δ. το άνω τμήμα του εγκεφαλικού στελέχους

Οι συνδέσεις αυτές περιγράφονται παρακάτω:

α. Οι πλέον ευδιάκριτες και περισσότερες σε αριθμό προσαγωγές ίνες του ιπποκάμπου προέρχονται από τον ενδορρινικό φλοιό. Οι ίνες αυτές καταλήγουν στην οδοντωτή έλικα, και στο Αμμώνειο κέρασ (Εικόνα. 1). Ο ενδορρινικός φλοιός δέχεται άφθονες ίνες από το υπόθεμα του ιπποκάμπου και από το Αμμώνειο κέρασ, αλλά και από άλλες περιοχές του φλοιού του εγκεφάλου, όπως από τον προαπιοειδή φλοιό, το μετωπιαίο φλοιό και την κάτω μοίρα του κροταφικού φλοιού. Ίνες που εκφύονται από την έλικα του προσαγωγίου φθάνουν στον ενδορρινικό φλοιό μέσω του προσαγωγίου. Ο ενδορρινικός φλοιός δέχεται υποφλοιώδεις ίνες από τον πρόσθιο πυρήνα του θαλάμου (οι οποίες όπως και οι ίνες της έλικας του προσαγωγίου, φθάνουν μέσω του προσαγωγίου) και από την αμυγδαλή. Αξίζει να σημειωθεί ότι ορισμένος αριθμός ινών του προσαγωγίου καθώς και ινών που εκφύονται από την αμυγδαλή, παρακάμπτουν τον ενδορρινικό φλοιό και καταλήγουν απευθείας στο υπόθεμα του ιπποκάμπου (Nieuwenhuys et al., 1983).



β. Ο έσω πυρήνας του διαφράγματος και ο πυρήνας της διαγώνιας ταινίας (του Broca) παρέχουν ίνες στο Αμμώνειο κέρασ και στο υπόθεμα του ιπποκάμπου δια μέσου της ψαλίδας. Οι ίνες του πυρήνα της διαγώνιας ταινίας απολήγουν επίσης στην οδοντωτή έλικα.

Τα κοκκοειδή κύτταρα της οδοντωτής έλικας απολήγουν στο Αμμώνειο κέρασ (CA3), το οποίο με τη σειρά του χορηγεί ίνες στο υπόθεμα του ιπποκάμπου. Οι συνδέσεις αυτές αποτελούν μία οδό με συγκεκριμένη κατεύθυνση, η οποία εξασφαλίζει τη μεταβίβαση των ώσεων που φθάνουν στον ιππόκαμπο, διαδοχικά στην οδοντωτή έλικα, στο Αμμώνειο κέρασ και στο υπόθεμα του ιπποκάμπου, από όπου, όπως αποδείχθηκε πρόσφατα, εκφύονται όλες οι απαγωγές ίνες (φλοιώδεις και υποφλοιώδεις) του ιπποκάμπου.

γ. Ο οπίσθιος υποθάλαμος παρέχει σημαντική εννεύρωση στον ιπποκάμπειο σχηματισμό, η οποία μέσω της ψαλίδας και μέσω μιας κοιλιακής οδού καταλήγει κυρίως στην οδοντωτή έλικα και στα πεδία CA2 και CA3 του κέρατος του Αμμωνίου. Μερικοί ενδιάμεσοι θαλαμικοί πυρήνες προβάλλουν επίσης στον ιπποκάμπειο σχηματισμό, ειδικά δε, στον ενδοκρρινικό φλοιό (Insusati et al., 1987).

δ. Στον επίμυ ο ιππόκαμπος δέχεται ίνες απευθείας από το μεσοσκελιαίο πυρήνα, τον άνω κεντρικό πυρήνα της ραφής, το ραχιαίο πυρήνα της καλύπτρας και τον υπομέλανα τόπο. Έχει δειχθεί ότι αρκετές από τις συνδέσεις αυτές αποτελούν μονοαμινεργικές ίνες (Nieuwenhuys et al., 1983).

#### Οι απαγωγές ίνες του ιπποκάμπου

Οι απαγωγές ίνες του μπορούν να ταξινομηθούν σε: (Εικόνα 1)

- α. απαγωγούς του Αμμώνειου κέρατος
- β. ίνες του υποθέματος του ιπποκάμπου για την προσυνδεσμική ψαλίδα
- γ. ίνες του υποθέματος του ιπποκάμπου για την μετασυνδεσμική ψαλίδα

δ. ίνες που δεν ακολουθούν την ψαλίδα

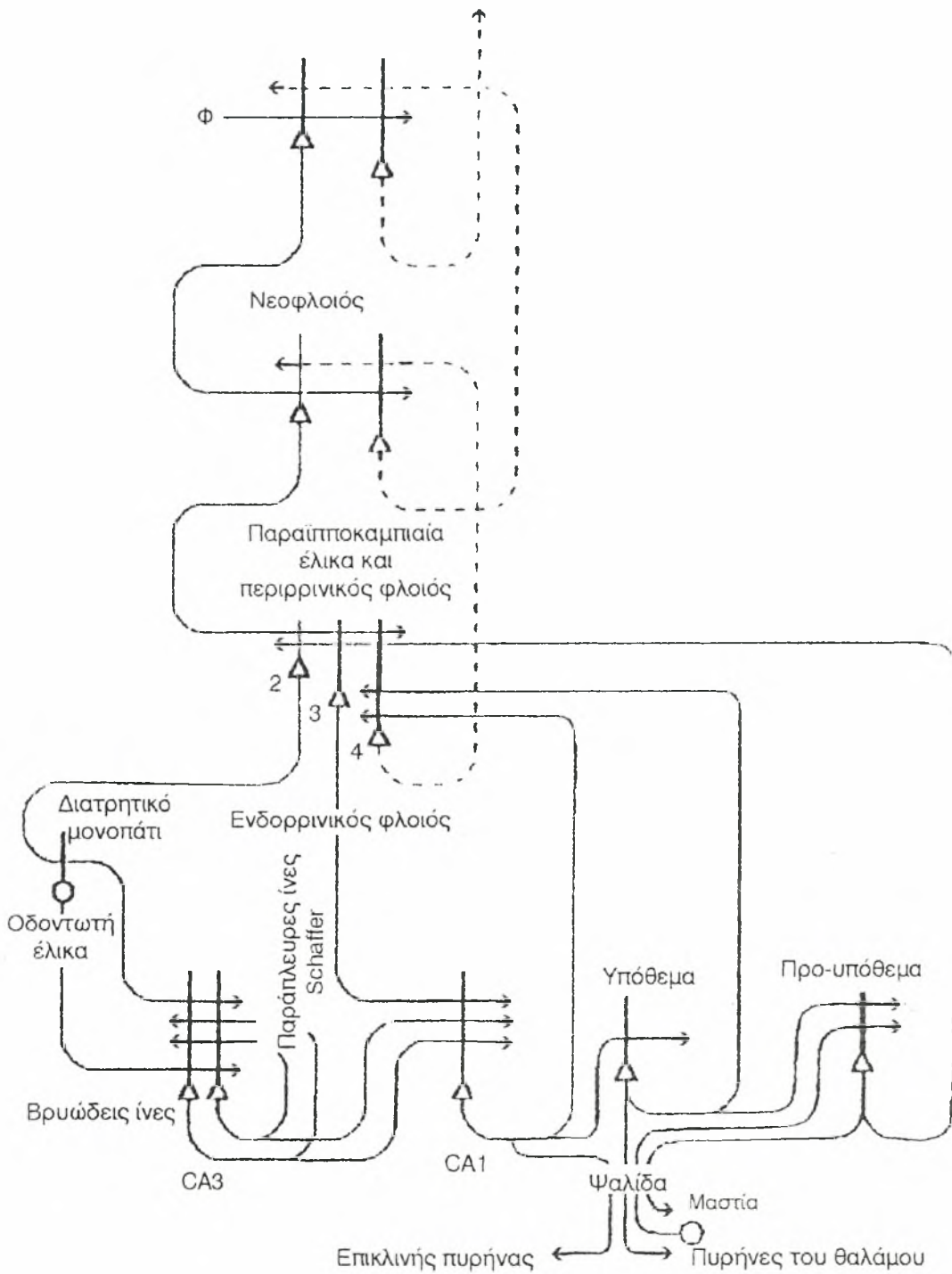
Η διανομή των ινών των τεσσάρων αυτών κατηγοριών είναι η παρακάτω:

α. Οι ίνες της προσυνδεσμικής ψαλίδας που εκφύονται από το Αμμώνειο κέρασ απολήγουν αποκλειστικά στην έξω μοίρα του διαφράγματος.

β. Οι ίνες της προσυνδεσμικής ψαλίδας που εκφύονται από το υπόθεμα του ιπποκάμπτου διανέμονται στην έξω μοίρα του διαφράγματος, στην έσω μοίρα του επικλινούς πυρήνα, στον πρόσθιο οσφρητικό πυρήνα, στον προσυνδεσμικό ιππόκαμφο, στην έσω μοίρα του μετωπιαίου φλοιού και στην ευθεία έλικα.

γ. Η μετασυνδεσμική ψαλίδα περιέχει αποκλειστικά, εκτός από μερικές ίνες για τον ιππόκαμφο, ίνες που εκφύονται από το υπόθεμα του ιπποκάμπτου. Οι περισσότερες από τις ίνες αυτές απολήγουν στα μαστία, ενώ μερικές ίνες απολήγουν στον πρόσθιο πυρήνα του θαλάμου, στο βασικό πυρήνα της τελικής ταινίας και στην περιοχή του κοιλιακού-έσω πυρήνα του υποθαλάμου.

δ. Το υπόθεμα του ιπποκάμπτου χορηγεί ίνες σε διάφορες περιοχές του φλοιού, στις οποίες περιλαμβάνεται ο ενδορρινικός φλοιός και περιοχές του γειτονικού έσω κροταφικού φλοιού. Εκτός από τις ίνες προς το φλοιό, το υπόθεμα του ιπποκάμπτου χορηγεί ίνες και στο αμυγδαλοειδές σώμα.



Εικόνα 1. Προσαγωγές και απαγωγές ίνες του ιπποκαμπιαίου σχηματισμού. Συνεχόμενες γραμμές: προσαγωγές συνδέσεις. Διακεκομμένες γραμμές: απαγωγές συνδέσεις.

## 2. Τρισυναπτικό κύκλωμα

Μετά από τομή του ιππόκαμπου, ως προς τον διαμήκη του άξονα (ραχιαίο - κοιλιακό), εύκολα διακρίνεται ένα σύνολο από τρία συνδεδεμένα μονοπάτια γνωστό ως τρισυναπτικό κύκλωμα (Witter, 1989; Andersen, 1975; Swanson, 1978; Swanson, 1982)

Συγκεκριμένα το τρισυναπτικό αυτό κύκλωμα αποτελείται από:

1. Τα κύτταρα των στοιβάδων I και II ή επιφανειακών στοιβάδων του ενδορρινικού φλοιού που προβάλλουν στα κοκκοειδή κύτταρα της οδοντωτής έλικας μέσω της διαπιτραινούσας οδού (perforant path).

2. Τα κοκκοειδή κύτταρα που προβάλλουν στα ευμεγέθη πυραμιδοειδή κύτταρα του κέρατος του Αμμωνίου, στο πεδίο CA3, μέσω του συστήματος των βρυωδών ινών (mossy fibers).

3. Τα CA3 πυραμιδοειδή κύτταρα, που προβάλλουν σε αυτά του CA1 πεδίου, μέσω του συστήματος των παράπλευρων κλάδων Schaffer (Schaffer collaterals) (Amaral, 1978; Bayer, 1985; Blackstad, 1956; Blackstad, 1958.)

Με τη σειρά του το CA1 πεδίο προβάλλει έντονα στο υπόθεμα και έτσι κλείνει το κύκλωμα καταλήγοντας πάλι στον ενδορρινικό φλοιό.

Είναι σύνηθες το κέρατος του Αμμωνίου να διαιρείται σε στοιβάδες οι οποίες διακρίνονται καθ' όλο το μήκος του ιπποκάμπου.

- Το επένδυμα (ependyma)
- Η σκάφη (alveus) αποτελούμενη από τους άξονες των πυραμιδοειδών κυττάρων και του υποθέματος (subiculum) και η οποία συγκλίνει στην παρυφή της ψαλίδας (fornix).
- Τη στοιβάδα των πολύμορφων κυττάρων (stratum oriens), αποτελούμενη κυρίως από τους βασικούς δενδρίτες των πυραμιδοειδών νευρώνων και μερικών ενδονευρώνων.
- Την πυραμιδική στοιβάδα (stratum pyramidale) αποτελούμενη από τα σώματα των πυραμιδοειδών νευρώνων.
- Τη διαφανή στοιβάδα (stratum lucidum), μέσω της οποίας οι βρυώδεις ίνες προβάλλουν στους δενδρίτες των πυραμιδοειδών νευρώνων του

CA3 πεδίου (η οποία δεν είναι σημαντική στον άνθρωπο όπως στα άλλα ανθρωποειδή και δεν είναι παρούσα στα πεδία CA1 και CA2).

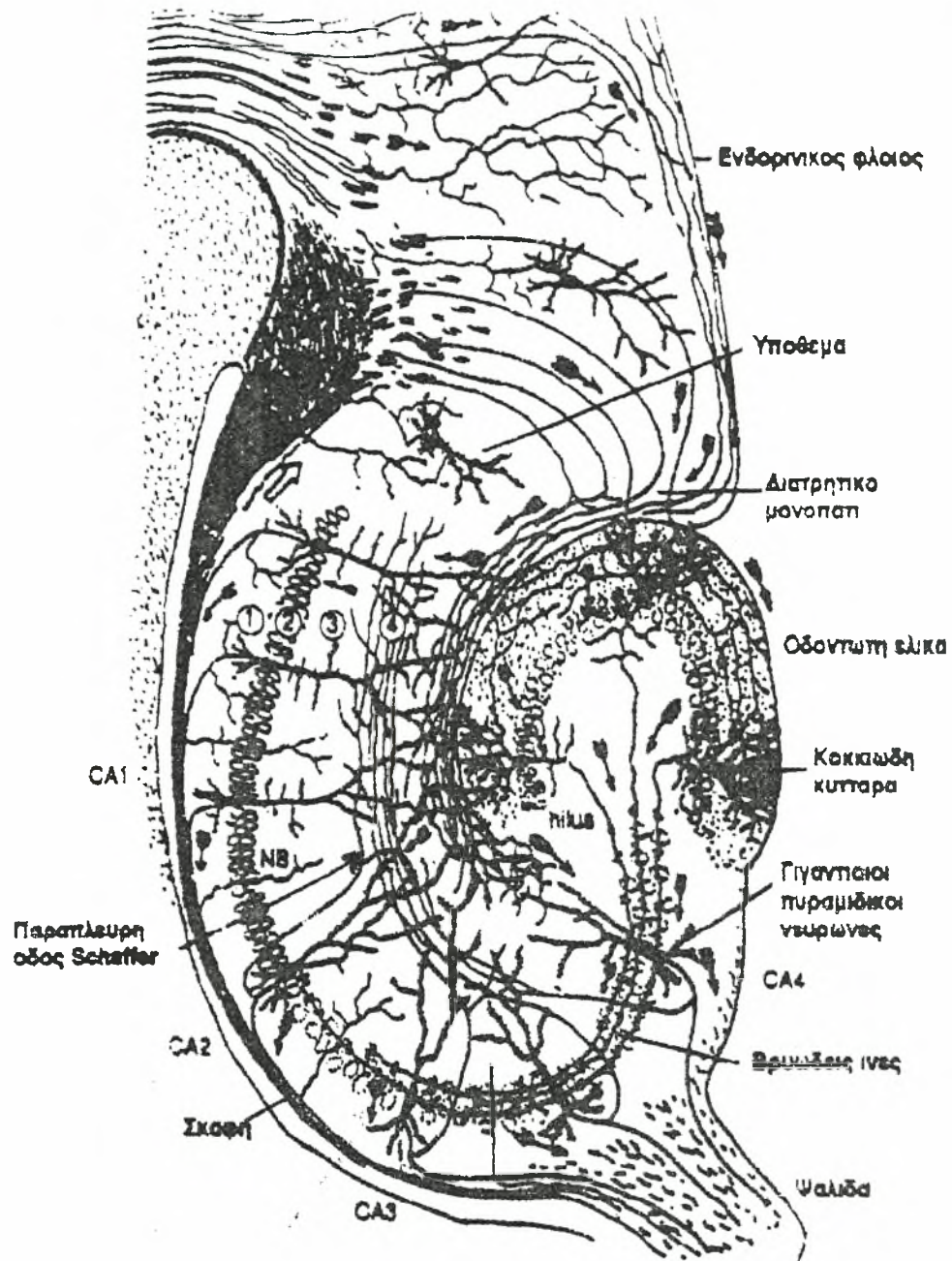
- Την ακτινωτή στοιβάδα (*stratum radiatum*)
- Τη βοθριώδη στοιβάδα (*stratum lacunosum*), και
- Την μοριωδή στοιβάδα (*stratum moleculare*).

Οι τρεις τελευταίες στοιβάδες αποτελούνται από τους άξονες και τους δένδριτες των πυραμιδοειδών νευρώνων της πυραμιδικής στοιβάδας.

Οι άξονες των πυραμιδοειδών νευρώνων των πεδίων CA3 και CA2, οι οποίοι προβάλλουν στο πεδίο CA1 (καλούμενοι παράπλευροι άξονες Schaffer) καταλήγουν κυρίως στην ακτινωτή στοιβάδα, αλλά και στην στοιβάδα των πολύμορφων κυττάρων (Williams et al., 1995).

Οι προβολές από τον ενδορρινικό φλοιό στην οδοντωτή έλικα, οι οποίες αποτελούν η διαπιτραίνουσα οδό, ταξιδεύουν στις στοιβάδες βοθριωδή και μοριωδή όπου οι ίνες τους συνάπτονται με τους κορυφαίους δένδριτες των πυραμιδοειδών νευρώνων (Williams et al., 1995).

Η οδοντωτή έλικα αποτελείται από την πολυμορφική στοιβάδα (*hilus*), την κοκκοειδή στοιβάδα (*stratum granulosum*) και τη μοριωδή στοιβάδα (*stratum moleculare*). Η μοριωδής στοιβάδα της οδοντωτής έλικας αποτελεί συνέχεια του ιπποκάμπου (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Λειτουργικά στοιχεία του ιπποκαμπιαίου σχηματισμού.

Ορισμός των περιοχών, οι οποίες συμπεριλαμβάνουν: Υπόθεμα, τμήμα του ενδορρινικού φλοιού, της οδοντωτής έλικας, και των περιοχών CA1 έως CA4. Ο ακριβής διαχωρισμός του ιπποκάμπου: (1) πολυμορφική στοιβάδα, (2) στοιβάδα πυραμιδοειδών νευρώνων, (3) ακτινωτή στοιβάδα, και (4) βοθριώδη-μοριώδη στοιβάδα. Γίγαντια πυραμιδικά κύτταρα στην περιοχή CA3 προβάλλουν, μέσω των παράπλευρων οδών Schaffer, στους πυραμιδοειδείς νευρώνες της περιοχής CA1, καθώς επίσης σε άλλα πυραμιδικά κύτταρα της περιοχής CA3, και δια μέσου συνδεσμικών ινών στη σκάφη του ετερόπλευρου ιπποκάμπου. Κοκκιοειδή κύτταρα της οδοντωτής έλικας στέλνουν βρυώδεις ίνες στα πυραμιδικά κύτταρα στην περιοχή CA3.

### 3. Ανατομική διαφοροποίηση ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπτου

Έρευνες σε ανατομικό επίπεδο καταδεικνύουν σημαντικότητες διαφορές μεταξύ του ραχιαίου και του κοιλιακού ιπποκάμπτου, στις διασυνδέσεις της κάθε μοίρας με άλλες φλοιώδεις και υποφλοιώδεις περιοχές του εγκεφάλου. Σε ό,τι αφορά τις προσαγωγές οδούς, ο ραχιαίος ιππόκαμπος τόσο των επίμυων όσο και των κατώτερων πρωτευόντων προσλαμβάνει πληροφορίες από αισθητικά και συνειρμικά φλοιϊκά κέντρα μέσω των οδών που διέρχονται από την εξωτερική μοίρα του ενδορρινικού φλοιού (Deacan et al., 1983; Room et al., 1986). Αντιθέτως, οι προσαγωγές ίνες από την αμυγδαλή, τον ίδιο 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 (Beckstad, 1978; Ruth et al., 1982). Οι δύο μοίρες του ιπποκάμπτου διαφοροποιούνται και ως προς τις απαγωγές συνδέσεις τους. Συγκεκριμένα, οι απαγωγές ίνες της ραχιαίας μοίρας του υποθέματος του ιπποκάμπτου καταλήγουν κυρίως στα μαστία και τους πρόσθιους πυρήνες του θαλαμού, 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 και στα μονοαμινεργικά κέντρα του διαμέσου εγκεφάλου (Swanson et al., 1978). Φαίνεται ότι οι απαγωγές αυτές συνδέσεις, οργανώνονται με τέτοιο τρόπο ώστε διαφορετικές ιπποκάμπειες περιοχές να χαρτογραφούνται μεθοδικά πάνω σε υποθαλαμικά συστήματα που διαμεσολαβούν στην έκφραση διαφορετικών κατηγοριών συμπεριφοράς (goal oriented behavior).

Αυτή η χαρτογράφηση χαρακτηρίζεται από μία μονοκατευθυντική ιπποκάμπειο - εξωδιαφραγματική προβολή και από δικατευθυντικές εξωδιαφραγματο - υποθαλαμικές προβολές όλες τοπογραφικά οργανωμένες. Οι Risold και Swanson (1996) έδειξαν ότι το ραχιαίο τμήμα

του ιπποκάμπτου προβάλλει σε μια πολύ μικρή περιοχή της έξω μοίρας του διαφράγματος (lateral septum, LS), ενώ προοδευτικά περισσότερα κοιλιακά τμήματα του νευρώνουν ευρύτερα τμήματα του LS. Το μεγαλύτερο τμήμα του ραχιαίου CA1 - υποθέματος πεδίου προβάλλει επιλεκτικά και μονόπλευρα στην LS ραχιαία περιοχή. Από εκεί οι προβολές κατευθύνονται προς του μεσοκοιλιακούς υποθαλαμικούς πυρήνες, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την έκφραση της κοινωνικής συμπεριφοράς, όπως η σεξουαλική συμπεριφορά του θηλυκού (επιβίωση και αναπαραγωγή). Η κοιλιακή μοίρα της CA1 - υποθέματος περιοχής προβάλλει επιλεκτικά και μονόπλευρα στο κοιλιακό LS, ο οποίος με τη σειρά του προβάλλει επιλεκτικά στη μέση μοίρα του μέσου προοπτικού πυρήνα του υποθαλάμου που σχετίζεται με συμπεριφορές πρόσληψης τροφής και με ενδοκρινείς - αυτόνομες απαντήσεις που σχετίζονται με όλα τα είδη συμπεριφοράς, όπως με τη σεξουαλική συμπεριφορά του αρσενικού (Risold and Swanson, 1996). Δεδομένης της συμβολής της αμυγδαλής στην επιληπτογένεση αξίζει να γίνει ιδιαίτερη αναφορά 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).

Από τα παραπάνω, γίνεται φανερό η διαφοροποίηση στις ανατομικές διασυνδέσεις μεταξύ ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπτου. Πράγματι κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών ένας σημαντικός αριθμός μελετών πρότεινε ότι η ραχιαία και η κοιλιακή μοίρα του ιπποκάμπτου αποτελούν δύο ξεχωριστές λειτουργικές οντότητες οι οποίες ελάχιστα μόνο συνδέονται μεταξύ τους. Η θεωρία αυτή βασίστηκε στο γεγονός ότι οι δύο αυτές μοίρες του ιπποκάμπτου διαφέρουν σημαντικά όχι μόνο ως προς την ανατομική, αλλά και ως προς και τη λειτουργική οργάνωσή τους.



#### 4. Ιππόκαμπος, μνήμη και μάθηση.

Μάθηση είναι η διεργασία με την οποία ο άνθρωπος και άλλα ζώα αποκτούν γνώσεις για τον κόσμο. Μνήμη είναι η συγκράτηση ή αποθήκευση των γνώσεων αυτών. Ακόμη και απλά ζώα έχουν την ικανότητα να μαθαίνουν από το περιβάλλον τους. Σαφώς, όμως, η ικανότητα αυτή φθάνει στο απόγειό της στον άνθρωπο. Στην εγγραφή των πληροφοριών της μνήμης βοηθούν εγκεφαλικές περιοχές που υπηρετούν την ανταμοιβή ή την τιμωρία (Mishkin and Appenzeller, 1986), οι οποίες λειτουργούν δια μέσου του μεταχιμιακού συστήματος και ιδιαίτερα δια του ιππόκαμπου και αμυγδαλοειδούς πυρήνα που διατηρούν πολυάριθμες συνδέσεις με τις φλοιώδεις περιοχές (Mishkin and Appenzeller, 1986). Πιστεύεται ότι ο ιππόκαμπος και οι σχετικές περιοχές του κροταφικού λοβού επεξεργάζονται, στη συνέχεια, αυτές τις πληροφορίες για μια περίοδο εβδομάδων ή μηνών και τις μεταφέρουν στον φλοιό των εγκέφαλικών ημισφαιρίων (Squire and Care 1991), πιθανώς στην περιοχή του οπτικού φλοιού η οποία έχει σχέση με την αναγνώριση προσώπων.

Ο ιππόκαμπος φαίνεται ότι είναι μόνο παροδικός χώρος αποθήκευσης της μακροχρόνιας μνήμης και ότι τελικά μεταβιβάζει σε άλλες περιοχές τις πληροφορίες που αποκτήθηκαν, πιθανώς στο φλοιό των εγκέφαλικών ημισφαιρίων για μόνιμη αποθήκευση (Milner, 1985). Ο ιππόκαμπος μπορεί να μην αποθηκεύει καθόλου μακροχρόνιες πληροφορίες αλλά να υποβοηθά στην αποθήκευση των πληροφοριών οι οποίες υπέστησαν αρχικά επεξεργασία από τον κάτω κροταφικό φλοιό. Επομένως, ο ιππόκαμπος μπορεί να είναι είτε σταθμός για την μακροχρόνια μνήμη, είτε σύστημα διευκόλυνσης το οποίο είναι σημαντικό για την αποθήκευση της μνήμης σε άλλο σημείο του εγκεφάλου (Milner, 1985; Squire, 1987).

Ο ιπποκάμπος θεωρείται η δομή η υπεύθυνη για συνειδητή μάθηση. Η ιδέα αυτή ενισχύθηκε από μια περίπτωση αμνησίας σε ασθενή με κάκωση στο CA1 πεδίο (Horel, 1994; Zola-Morgan, 1985). Άλλες κλινικές περιπτώσεις στις οποίες τμήματα του ιπποκάμπου αφαιρέθηκαν για ανακούφιση από ανυπόφορο πόνο (Gol and Faibish, 1967), ή για

την μείωση επιληπτικών κρίσεων (Glaser, 1980), δεν ήταν αναγκαίο να προκαλέσουν αμνησία, ενώ υπάρχουν μαρτυρίες από έρευνες σε ζώα οι οποίες δείχνουν ότι περιορισμένης έκτασης βλάβες στο ιππόκαμπο είναι ανίκανες να προκαλέσουν την σφαιρική αμνησία που εκφράστηκε στον ασθενή με δίπλευρη εκτομή των μέσων κροταφικών λοβών (Kandel, 1999).

Συνολικά, πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί τα τελευταία χρόνια για την εμπλοκή του ιππόκαμπου στη μνήμη και στη μάθηση (Zola-Morgan, 1989a, 1989b; Tulving, 1990; Jarrard, 1997; Strange, 1999). Τέλος, υπάρχουν πολλές ιδέες οι οποίες θεωρούν τον ιππόκαμπο ως αποτελούμενο από διαφορετικές περιοχές ή πεδία (στοιβάδες) που μπορεί να συμμετέχουν σε διαφορετικές υπολογιστικές λειτουργίες (Cohen and Eichenbaum, 1993).

#### Διαφορές μεταξύ ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου

Ιδιαίτερα διαφορετικός λειτουργικά όσον αφορά τη μνήμη εμφανίζεται ο ιππόκαμπος κατά μήκος του ραχιαίου-κοιλιακού του άξονα. Αυτό πιθανώς να οφείλεται και στο ότι οι φλοιώδεις και οι υποφλοιώδεις διασυνδέσεις του ραχιαίου και του κοιλιακού ιππόκαμπου είναι διαφορετικές. Έτσι, η αισθητική πληροφορία από το φλοιό εισέρχεται κυρίως στα 2/3 του ραχιαίου ή στα 3/4 της οδοντωτής έλικας (Hock, 1998). Διαπιστώθηκε ότι οι αρουραίοι μπορούν να εκτελέσουν δοκιμασία χωριακής περιπλάνησης αν σημαντικός ιστός της ραχιαίας περιοχής παραμένει χωρίς κάκωση ενώ ο κοιλιακός ιππόκαμπος δεν είναι ικανός να υποστηρίξει χωριακή μνήμη (spatial memory) (Moser et al., 1993, 1995).

Σε μια in vivo μελέτη έγινε σύγκριση της χωριακής εκλεκτικότητας των CA1 ραχιαίων νευρώνων και αντίστοιχων κοιλιακών σε αρουραίους. Κατά τη διάρκεια τυχαίας αναζήτησης τροφής σε ένα τετράγωνο θάλαμο που είχε απλά οπτικά σημεία-ορόσημα προσανατολισμού βρέθηκε σημαντικά μικρότερος ο αριθμός των κυττάρων θέσης (place cells) στον κοιλιακό από ότι στο ραχιαίο ιππόκαμπο. Η μέση χωριακή

εκλεκτικότητα ήταν σημαντικά χαμηλότερης ανάλυσης στον κοιλιακό ιππόκαμπο (δηλαδή μεγαλύτερης αναλογίας και πιο "έξυπνα" κύτταρα θέσης βρίσκονται στον ραχιαίο ιππόκαμπο) (Jung et al., 1994).

Επίσης, διαφορετικές επιπτώσεις στην εγκατάσταση μνήμης έχουν οι κακώσεις στον κοιλιακό και τον ραχιαίο ιππόκαμπο. Έτσι αρουραίοι με βλάβη της ραχιαίας μοίρας παρουσιάζουν χειροτέρευση της χωρικής μνήμης (Kohler et al., 1985; Risold and Swanson, 1996).

## 5. Ο Ιππόκαμπος και η επιληψία.

Η επιληψία ορίζεται ως σύνολο των κλινικών διαταραχών το οποίο προσβάλλει περίπου 0,5 – 1 % του Αμερικανικού πλυθισμού (Hauser and Hesdorfer 1990) και χαρακτηρίζεται από υπέρμετρες χωρίς έλεγχο ηλεκτρικές δραστηριότητες του εγκεφάλου. Επομένως, είναι πάθηση που χαρακτηρίζεται από επαναλαμβανόμενες κρίσεις, οι οποίες προκαλούν αιφνίδιες αλλά αναστρέψιμες μεταβολές στη λειτουργία του εγκεφάλου.

Οι επιληπτικές κρίσεις έχουν περιγραφεί από την αρχαιότητα. Αναφέρονται από τον Ιπποκράτη, το Γαληνό και τον Αβικέννα στον οποίο οφείλεται ο όρος *επιληψία*. Για πολλούς αιώνες η πάθηση θεωρούνταν ιερή ή σατανική. Οι πρώτες επιστημονικές έρευνες για την πάθηση άρχισαν τον περασμένο αιώνα. Σύμφωνα με τον ορισμό του Άγγλου νευρολόγου J. Hughlings Jackson, «η επιληψία οφείλεται σε επεισοδιακή και αιφνίδια εκφόρτιση, υπερβολική και ταχεία, που καταλαμβάνει ικανό αριθμό νευρώνων της φαιάς ουσίας του εγκεφάλου» (Logothetis, 1988). Ο ορισμός αυτός ισχύει πάντα, όπως αποδεικνύεται από τις σύγχρονες κλινικές και πειραματικές μελέτες. Οι επιληπτικές κρίσεις διακρίνουμε σε (Adams et al., 1995):

- α) γενικευμένες (επιληψίες ιδιοπαθείς και συμπτωματικές),
- β) μερικές ή εστιακές επιληψίες (τοπικές προσβολές),
- γ) ειδικά επιληπτικά σύνδρομα,

Στις γενικευμένες επιληψίες υπάγονται οι επιληψίες δύο τύπων – με σπασμούς (Grand Mal) και χωρίς σπασμούς (Petit Mal - absence) με την απώλεια της ικανότητας για αντίληψη και αντίδραση με κατάπαυση της

δραστηριότητας που ήταν σε εξέλιξη.

Η επιληψία είναι ο όρος που χρησιμοποιούμε για να περιγράψουμε μια παροδική και αιφνίδια, επαναλαμβανόμενη διαταραχή της συνειδήσεως καθώς και πολλών σωματικών και ψυχονοητικών λειτουργιών, οφειλόμενη σε υπέρμετρη και παροξυσμική εκφόρτιση ενός πληθυσμού νευρικών κυττάρων (Parageorgiou et al., 1993). Η επιληψία δεν είναι τόσο μία νόσος, αλλά περισσότερο είναι ένα σύνδρομο ποικίλης αιτιολογίας που κοινό χαρακτηριστικό έχει ότι μερικοί νευρώνες βρίσκονται σε κατάσπαση έντονης διεγερσιμότητας. Το ίδιο φαινόμενο μπορεί να προκληθεί και από αναστολή λειτουργίας ανασταλτικών νευροδιαβιβαστικών συστημάτων (Vlachos, 1989).

Η ιπποκαμπική (ρινογκεφαλική, ψυχοκινητική) επιληψία: σ' αυτήν περιλαμβάνεται το 70-80% των επιληψιών του κροταφικού λοβού. Συχνότερη αιτία της επιληψίας είναι σκλήρυνση του ιπποκάμπτου (Kanos et al., 2000) με νευρωνική απώλεια και αστροκυτταρική υπερπλασία. Η ιπποκάμπειος σχηματισμός - κροταφική επιληψία κατά κανόνα εκδηλώνεται στην αρχή με χαρακτηριστικές αύρες οι οποίες συνίστανται, σε έντονες συναισθηματικές φορτίσεις, εκστασιακές εμπειρίες, μνημονικές επαναβιώσεις παρελθουσών καταστάσεων με ιδιαίτερη ενέργεια και συναισθηματική μέθεξη, παράδοξες αισθητικό-αισθητηριακές εμπειρίες, ψευδαισθητικά φαινόμενα και σπλαχνικά φαινόμενα, όπως είναι η ταχυκαρδία, τα κοιλιακά και επιγαστρικά άλγη, οι εφιδρώσεις και τα δυσπνοϊκά φαινόμενα.

#### Διαφορές ραχιαίου και κοιλιακού ιππόκαμπτου

Ο ιππόκαμπος παρουσιάζει μια ετερογενή δομή η οποία σχετίζεται με διαφορετικές φυσιολογικές λειτουργίες όπως αυτές της μνήμης και της μάθησής όσο και σε παθολογικές καταστάσεις όπως η επιληπτογένεση. Αυτές οι διαφορές μελετήθηκαν στα τελευταία χρόνια από πολλούς ερευνητές με ένα ειδικό επιληπτικό μοντέλο των ηλεκτρικών διεγέρσεων (kindling) στο ραχιαίο και κοιλιακό ιππόκαμπο. Μοντέλο αυτό για πρώτη φορά γνωστοποιήθηκε από τον Alonso – De Florida and Delgado (1958), και στη συνέχεια ακολούθησε η τελειοποίησή του από τον

Goddard (1967). Πράγματι, το μοντέλο «kindling» έχει αναγνωριστεί από πολλούς ερευνητές ως πιο κατάλληλος τρόπος στη μελέτη της εκτεταμένης εγκεφαλικής διεγερσιμότητας (Mc Namara, 1984; Fisher, 1989; Mc Namara et al., 1993).

Τα τελευταία χρόνια έχουν πραγματοποιηθεί εκτεταμένες μελέτες σε ζώα που αφορούν το ρόλο του ιπποκάμπου στην επιληψία (Mangan et al., 1995; Esclapez et al., 1997; Wu and Leung 1997; Blumcke et al., 2000; Bragin et al., 2002). Κατά τη διάρκεια αυτών μελετών διαπιστώθηκε ότι ηλεκτρική διέγερση του ιπποκάμπου προκαλεί την εμφάνιση μεγαλύτερου αριθμού επιληπτικών κρίσεων στην κοιλιακή μοίρα από στη ραχιαία μοίρα του ιπποκάμπου, ενώ δεν υπήρξε διαφορά ως προς τη διάρκεια της επιληπτικής κρίσης (Becker, 1997).

Η διαφοροποίηση του ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου αναφορικά με την ευαισθησία τους στις επιληπτικές κρίσεις διαπιστώθηκε και με την έκθεσή τους σε οπιοειδή (επάγει επιληπτογενείς ρίπες η κοιλιακή περιοχή δια μέσου της αναστολής των μετασυναπτικών ανασταλτικών υποδοχέων) (Lee and Xie, 1999).

Ένα άλλο φαινόμενο που έχει διερευνηθεί με τη χρήση πρωτοκόλλων συμπεριφοράς είναι η επιληπτογένεση στις δύο μοίρες του ιπποκάμπου. Χαρακτηριστικά έχει βρεθεί ότι η επιληπτογένεση εγκαθίσταται ευκολότερα και ταχύτερα στον κοιλιακό ιπποκάμπο (Lerner-Natoli et al., 1984).

Με βάση όλα τα παραπάνω, η εξερεύνηση των μηχανισμών που διέπουν την ικανότητα του κοιλιακού ιπποκάμπου να παρουσιάζει επιληπτικές κρίσεις μπορεί να αποβεί χρήσιμη στην κατανόηση των διαφορετικών ρόλων που διαδραματίζουν ο ραχιαίος και ο κοιλιακός ιπποκάμπος. Κατ' επέκταση, μπορεί να δώσει πολύτιμα στοιχεία για τη φυσιολογική σημασία του αντίστοιχου επιμερισμού του ανθρώπινου ιπποκάμπου σε οπίσθιο και πρόσθιο (Strange et al., 1999; Quigg et al., 2000). 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. Πράγματι, βρέθηκε ότι ο κοιλιακός ιπποκάμπος είναι σαφώς ανθεκτικότερος στην υποξία (Hara et al., 1990).

Τα παραπάνω ευρήματα πιθανώς συνηγορούν υπέρ της αυξημένης διεγερσιμότητας που εμφανίζεται στον κοιλιακό ιππόκαμπο και την επιρρέπεια του προς επιληψία.

## 6. Διεγερσιμότητα των νευρώνων του ιπποκάμπου

Η διαφοροποίηση του ιπποκάμπου κατά μήκος του επιμήκους άξονα του συμπληρώνεται και από ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες οι οποίες καταδεικνύουν αυξημένη διεγερσιμότητα του κοιλιακού σε σχέση με το ραχιαίο ιππόκαμπο. Πράγματι, παρουσία ανταγωνιστών GABA<sub>A</sub> υποδοχέων (Borck and Jefferys, 1999), και υψηλής συγκέντρωσης K<sup>+</sup> (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 παραμένουν ακόμα ανεξιχνίαστοι.

Επιπλέον, παρατηρήθηκε αυξημένη διεγερσιμότητα των νευρώνων της κοιλιακής μοίρας, έναντι της ραχιαίας μετά από εκτίμηση της συχνότητας πυροδότησης.

Τα παραπάνω ευρήματα σημαδοτούν την ύπαρξη διαφοροποίησης μεταξύ των δύο μοιρών του ιπποκάμπου, που πιθανόν να οφείλεται είτε σε:

- α. διαφορές που αφορούν τις μεμβρανικές ιδιότητες των πυραμιδοειδών νευρώνων του ιπποκάμπου
- β. διαφορές που αφορούν τις διασυνδέσεις των νευρώνων του ιπποκάμπου σε επίπεδο εσωτερικών κυκλωμάτων

### Δίαυλοι και διεγερσιμότητα

Η μετάδοση νευρωνικών σημάτων εξαρτάται από ταχείς μεταβολές της διαφοράς ηλεκτρικού δυναμικού εκατέρωθεν της μεμβράνης των νευρικών κυττάρων. Αυτές οι ταχείες μεταβολές επιτυγχάνονται από τους

διαύλους ιόντων, μια τάξη ενσωματωμένων πρωτεϊνών που διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και απαντούν σε όλα τα κύτταρα του σώματος. Οι δίαυλοι αυτοί έχουν τρεις σημαντικές ιδιότητες.

1. άγουν ιόντα
2. αναγνωρίζουν και επιλέγουν συγκεκριμένα ιόντα
3. ανοίγουν και κλείνουν (αποκρινόμενοι σε ειδικά ηλεκτρικά μηχανικά ή χημικά σήματα)

Η ενεργοποίηση διαφορετικών κατηγοριών ιοντικών διαύλων, καθεμία από τις οποίες επιλέγει συγκεκριμένα ιόντα, αποτελεί το κλειδί της μεγάλης ικανότητας προσαρμογής της μετάδοσης νευρωνικών σημάτων. Οι δίαυλοι που παρεμβαίνουν στη μετάδοση νευρωνικών σημάτων είναι επίσης ελεγχόμενοι: αποκρίνονται σε ποικίλα ερεθίσματα, ανοίγοντας και κλείνοντας ενεργά.

Οι δίαυλοι ρυθμίζονται με τρεις τρόπους:

- α. από το δυναμικό της μεμβράνης
- β. από χημικούς διαβιβαστές
- γ. από την πίεση ή τη διάταση (μηχανικά ελεγχόμενοι δίαυλοι)

Ο κάθε δίαυλος είναι συνήθως πιο ευαίσθητος σε έναν μόνο τύπο επίδρασης. Υπάρχουν αρκετές ενεργητικές αγωγιμότητες στους πυραμιδοειδείς νευρώνες του ιπποκάμπου καθώς και σε πολλά άλλα συστήματα (Hille, 1984; Kaczmarek and Levitan, 1986), όμως οι δίαυλοι καλίου εμφανίζουν τη μεγαλύτερη ποικιλία.

Τουλάχιστον έξι έως επτά διαφορετικά ρεύματα καλίου πιστεύεται ότι εμφανίζονται στη μεμβράνη των νευρώνων του ιπποκάμπου (Halliwell and Adams, 1982; Zbicz and Weight, 1985). Επίσης υπάρχουν ιοντικοί δίαυλοι οι οποίοι είναι εκλεκτικοί στα ιόντα νατρίου, χλωρίου και ασβεστίου.

Οι τύποι των διαύλων καλίου διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την κινητική ενεργοποίησής τους, το εύρος της τάσης ενεργοποίησής και την ευαισθησία σε διάφορα προσδέματα:

1. Ο δίαυλος βραδείας ενεργοποίησης, ονομάζεται βραδύς ανορθωτικός δίαυλος ( $I_K$ ) ενεργοποιείται δια μέσου δυνατής εκπόλωσης και ενέχεται στην επαναπόλωση του δυναμικού ενέργειας.

2. Ο δίαυλος που ενεργοποιείται από το ασβέστιο ενεργοποιείται επίσης από εκπόλωση, αλλά η τασεοευαισθησία του εξαρτάται από την ενδοκυτταρική συγκέντρωση  $Ca^{2+}$ . Για τη διάνοιξη αυτού του διαύλου απαιτείται αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης  $Ca^{2+}$  (που εξασφαλίζεται από τους τασεοελεγχόμενους δίαυλους ασβεστίου), σε συνδυασμό με ταυτόχρονη εκπόλωση ( $I_C$ ). Λειτουργικά συμμετέχει στην επαναπόλωση του δυναμικού ενέργειας και φαίνεται να καθορίζει το μεσοδιάστημα μεταξύ των αιχμών.

3. Ο ταχύς παροδικός δίαυλος  $K^+$  ενεργοποιείται ταχέως από την εκπόλωση, σχεδόν τόσο ταχέως όσο και ο δίαυλος  $Na^+$ , αλλά απενεργοποιείται και ταχέως, υπό την προϋπόθεση όμως ότι η εκπόλωση διατηρείται ( $I_A$ ). Λειτουργικά είναι υπεύθυνος για την επιβράδυνση της αρχής των πυροδοτήσεων.

4. Ο δίαυλος τύπου M ενεργοποιείται με πολύ βραδύ ρυθμό από την εκπόλωση, αλλά απενεργοποιείται από την ακετυλοχολίνη ( $I_M$ ). Συνεισφέρει στη συχνότητα προσαρμογής των αιχμών.

5. Ο δίαυλος διαρροής βοηθάει στον καθορισμό του δυναμικού μεμβράνης εν ηρεμία ( $I_{K,leak}$ ).

6. Ο δίαυλος βραδείας μεταϋπερπόλωσης (slow afterhyperpolarization, sAHP) είναι ευαίσθητος στην αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου ( $I_{AHP}$ ). Συμμετέχει στην εξοικείωση της εκφόρτισης των δυναμικών ενέργειας.

7. Ο δίαυλος της "ακανόνιστης επανόρθωσης" (μικτός κατιονικός δίαυλος) ( $I_Q$ ). Αποτρέπει την ισχυρή μεταϋπερπόλωση.

Αυτοί οι δίαυλοι καλίου γενικά μπορούν να χωριστούν σε δύο ομάδες, ανάλογα με το αν είναι τασεοελεγχόμενοι ή άσβεστο-εξαρτώμενοι και από ποιες ουσίες αποκλείονται. Το χαρακτηριστικό στοιχείο των διαύλων καλίου είναι ότι αναστέλλονται από την ουσία TEA - τετρααιθυλαμμώνιο (σε μεγάλη συγκέντρωση  $> 20$  mM μπλοκάρει τους διαύλους  $I_{AHP}$  και σε μικρή  $< 1$  mM αποκλείει τους διαύλους  $I_C$ ). Εκτός από την παραπάνω ουσία οι δίαυλοι  $I_C$  μπλοκάρονται με CTX (καρυμπδοτοξίνη), όμως οι δίαυλοι  $I_{AHP}$  είναι ευαίσθητοι στην απαμίνη και στην d-τοβοκουραρίνη.



Η ευαισθησία των διαύλων καλίου στις παραπάνω ουσίες έχει σημαντική λειτουργική σημασία. Πράγματι, αποκλείοντας τους  $I_{AHP}$ , ελαττώνεται η συχνότητα προσαρμογής (ISI), και αυξάνεται η διεγερσιμότητα του νευρώνα (Sah, 1996), καταστέλλοντας όμως τους διαύλους  $I_C$  παρατηρείται επιβράδυνση της επαναπόλωσης και ελατωμένη διεγερσιμότητα (Storm, 1986). Αναφέρεται επίσης ότι αποκλεισμός των  $I_{AHP}$  και  $I_C$ , έχει μεγάλη σημασία στη ρύθμιση της νευρωνικής διεγερσιμότητας (Gho, 1986). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι στους δενδρίτες των πυραμιδοειδών νευρώνων της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου εντοπίζονται ιοντικοί δίαυλοι καλίου οι οποίοι παρουσιάζουν διαφορετική κατανομή από τους δίαυλους καλίου που βρίσκονται στο σώμα. Οι δενδριτικοί αυτοί δίαυλοι ελέγχουν την μορφή και το εύρος των αντίδρομων διαδομένων δυναμικών ενέργειας, το εύρος των διεγερτικών μετασυναπτικών δυναμικών καθώς και την δενδριτική διεγερσιμότητα (Johnston et al., 2000).

Επιπλέον, υπάρχουν τουλάχιστον τέσσερις τύποι τασεοελεγχόμενων διαύλων ασβεστίου και δύο τύποι τασεοελεγχόμενων δίαυλων νατρίου. Έτσι, ένα είδος ιόντος μπορεί να διαπεράσει τη μεμβράνη δια μέσου πολλών διαφορετικών τύπων ιοντικών διαύλων καθένας από τους οποίους έχει τη δική του χαρακτηριστική κινητική και τη δική του τασεοευαισθησία (Kandel et al., 1995).

Από τα παραπάνω καθίσταται φανερή η σημασία των ιόντων ασβεστίου στην ρύθμιση της λειτουργίας των διαύλων καλίου οι οποίοι συμβάλλουν στην φάση επαναπόλωσης του μονήρους δυναμικού ενέργειας και στο βαθμό εξοικείωσης που παρουσιάζουν οι νευρώνες μετά από εφαρμογή εκπολωτικού παλμού ρεύματος μεγάλης διάρκειας. Επιπλέον η ελάττωση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης του ασβεστίου έχει βρεθεί ότι μειώνει την τιμή του εκπολωτικού ουδού (Frankenhaeuser, 1968). Τέλος, είναι γνωστό ότι παροδική μεταβολή της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του ασβεστίου προκαλεί την απελευθέρωση νευροδιαβαστών στην συναπτική σχισμή.

Στο βιβλίο του "*Ionic Channels of Excitable Membranes*", ο Bertil Hille συνοψίζει ως εξής τη σημασία των  $Ca^{2+}$  για τη ρύθμιση της νευρωνικής λειτουργίας: Ο ηλεκτρισμός χρησιμεύει για τον έλεγχο των

διαύλων και οι δίαυλοι χρησιμεύουν για την παραγωγή ηλεκτρισμού. Ωστόσο, το νευρικό σύστημα δεν είναι μια κατ'εξοχήν ηλεκτρική συσκευή. Τα περισσότερα διεγέρσιμα κύτταρα, τελικά, μεταφράζουν την ηλεκτρική διέγερση τους σε άλλες μορφές δραστηριότητας. Γενικεύοντας, τα διεγέρσιμα κύτταρα μεταφράζουν τον ηλεκτρισμό τους σε δράση διαμέσου ροής ιόντων  $Ca^{2+}$ , η οποία ρυθμίζεται από τασεοελεγχόμενους διαύλους  $Ca^{2+}$ . Τα ιόντα ασβεστίου είναι ενδοκυτταρικοί αγγελιοφόροι, ικανοί να ενεργοποιήσουν πολλές κυτταρικές λειτουργίες. Οι δίαυλοι ασβεστίου χρησιμεύουν ως μοναδικός συνδετικός κρίκος μετατροπής της εκπόλωσης σε όλες τις υπόλοιπες μη ηλεκτρικές δραστηριότητες που ελέγχονται από τη διέγερση.

## 7. Φυσιολογία των ριπών των δυναμικών ενεργείας

Στον ιππόκαμπο υπάρχουν δύο διαφορετικοί βασικοί τρόποι πυροδότησης και οι αλλαγές από τον ένα τρόπο στον άλλο μπορούν δραστικά να μεταβάλλουν την πορεία των εισερχόμενων σημάτων.

Είναι δεδομένο ότι οι ριπές είναι πιο σημαντικές μονάδες πληροφορίας από τα απλά δυναμικά ενέργειας (Lisman 1997). Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι οι μετρήσεις που πραγματοποιηθήκανε σε πολλούς νευρώνες, λαμβάνοντας υπόψη μόνο ριπές δυναμικών ενέργειας, ήταν η πιο αξιόπιστη πηγή πληροφοριών για αυτούς τους νευρώνες (Otto et al., 1991). Η πληροφορία αυτή είναι σημαντική για την κατανόηση του μηχανισμού για τη σταθεροποίηση της προσωρινής μνήμης, διαδικασία για την οποία ο ιππόκαμπος ως γνωστό είναι απαραίτητος (Buzsaki, 1989; Cattaneo et al., 1981).

Οι μηχανισμοί με τους οποίους οι πυραμιδοειδές νευρώνες του ιπποκάμπου της στοιβάδας CA1 παράγουν ριπές των δυναμικών ενέργειας δεν είναι ακόμα εντελώς αποσαφηνισμένοι. Οι περισσότερες μελέτες συμφωνούν ότι η παραγωγή των μεταεκπολωτικών δυναμικών (ADP), παρέχει την παρατεταμένη σωματική εκπόλωση που απαιτείται για την έναρξη των πολλαπλών δυναμικών (Jensen et al., 1994, 1996; White et al., 1989; Wong and Prince, 1981). Ωστόσο, υπάρχει κάποια ασυμφωνία για τους ιοντικούς μηχανισμούς που αποτελούν τη βάση του

μεταεκπολωτικού δυναμικού. Μερικές μελέτες προτείνουν εμπλοκή διαύλων νατρίου (Azouz et al., 1996), ενώ άλλες προτείνουν τους διαύλους ασβεστίου ως τους πιο σημαντικούς (Andreasen and Lambert, 1995; Hoffman et al., 1997; Traub et al., 1993; White et al., 1989; Wong and Prince 1981). Χρησιμοποιώντας λεπτομερείς φαρμακολογικές εξετάσεις των διαύλων νατρίου και ασβεστίου, ο Yaari και συνεργάτες προτείνουν ότι αυτή η ιδιότητα του ουδού των ριπών (threshold bursting) βασίζεται σε συγκεκριμένο ρεύμα νατρίου ( $I_{Na,p}$  persistent sodium current). Επίσης, αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων καλίου στον εξωτερικό χώρο από 3,5 σε 7,5 mM προκαλεί την ευκολότερη εμφάνιση των ριπών (Jensen et al., 1994).

Υπάρχουν επίσης σημαντικές ενδείξεις ότι οι ενεργητικές μεμβρανικές ιδιότητες των δενδριτικών διακλαδώσεων εμπλέκονται στην παραγωγή των μεταεκπολωτικών δυναμικών και των ριπών δυναμικών ενέργειας (Andreasen and Lambert, 1995; Hoffman et al., 1997; Traub et al., 1993; Wong and Stewart, 1992; Wong et al., 1979). Ως εκ τούτου τασεοελεγχόμενοι ιοντικοί δίαυλοι που βρίσκονται στις δενδριτικές διακλαδώσεις των πυραμιδοειδών νευρώνων της στοιβάδας CA1, ίσως ευθύνονται για τον τρόπο ρύθμισης των ριπών δυναμικών ενέργειας σε αυτούς τούς νευρώνες.

Μέχρι τώρα δεν έχει διευκρινιστεί αν αυτοί οι μηχανισμοί ενεργοποίησης των μεταεκπολωτικών δυναμικών στους πυραμιδοειδείς νευρώνες της πυραμιδικής στοιβάδας CA1 είναι οι ίδιοι στο ραχιαίο και τον κοιλιακό ιπποκάμψο, αν και υπάρχουν ενδείξεις ότι διαφέρουν μεταξύ των δύο μοιρών του ιπποκάμψου. Αυτό το γεγονός μπορεί να έχει άμεση σχέση με διαφορετικές ανατομικές διασυνδέσεις των δύο περιοχών και με διαφορετικές λειτουργίες.

Υπάρχουν ακόμα πάρα πολλά ερωτηματικά για τη διαφοροποίηση των ηλεκτροφυσιολογικών ιδιοτήτων των πυραμιδοειδών νευρώνων στη στοιβάδα CA1 του ραχιαίου και του κοιλιακού ιπποκάμψου. **Με βάση όλες τις τα παραπάνω πληροφορίες, είναι πιθανό να υπάρχει προδιάθεση αυξημένης διεγερσιμότητας των πυραμιδοειδών νευρώνων της κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμψου.**

## 8. Σκοπός και στόχος της εργασίας

Βασιζόμενοι στα παραπάνω, έγιναν στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής ενδοκυττάρειες καταγραφές από πυραμιδοειδείς νευρώνες της στοιβάδας CA1 του ιπποκάμπου, με σκοπό τη μελέτη των ηλεκτροφυσιολογικών χαρακτηριστικών των πυραμιδοειδών νευρώνων της περιοχής CA1 του κοιλιακού και του ραχιαίου ιπποκάμπου. **Στόχος ήταν να γίνει σύγκριση των παθητικών και ενεργητικών ιδιοτήτων της κυτταρικής μεμβράνης των νευρώνων αυτών και η διερεύνηση της διεγερσιμότητας τους.**

Συγκεκριμένα μελετήθηκαν:

1. Οι παθητικές ιδιότητες της κυτταρικής μεμβράνης: δυναμικό ηρεμίας, χρονική σταθερά και αντίσταση εισόδου.

2. Οι ενεργητικές ιδιότητες της κυτταρικής μεμβράνης οι οποίες προκύπτουν από την ανάλυση του δυναμικού ενεργείας των νευρώνων.

3. Μελετήθηκε επιπλέον:

α. Οι μεταβολές του δυναμικού μεμβράνης μετά από εφαρμογή ανοδικού ορθογώνιου παλμού μακράς διάρκειας.

β. Οι επαναλαμβανόμενες εκφορτίσεις μετά από εφαρμογή καθοδικού ορθογώνιου παλμού μακράς διάρκειας.

4. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των "ραχιαίων" και "κοιλιακών" νευρώνων της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου.

# ΔΕΥΤΕΡΟ ΜΕΡΟΣ

## ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

### 1. Πειραματόζωα

Σε όλα τα πειράματα της μελέτης αυτής χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί, νεαροί, άσπροι επίμυες Wistar, με βάρους 160-250 γραμμαρίων ο καθένας την ημέρα της επέμβασης. Πριν από την έναρξη των πειραμάτων τα πειραματόζωα ζούσαν ανά τρία σε κλωβούς. Τα ζώα διέμεναν σε χώρο με σταθερή θερμοκρασία ( $22 \pm 1$  °C) και εναλλαγή φωτός - σκότους κάθε 12 ώρες. Τα πειραματόζωα είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό.

### 2. Φαρμακολογικοί παράγοντες

Στις φαρμακολογικές μελέτες χρησιμοποιήθηκαν ουσίες οι οποίες συμπεριλάμβαναν ανταγωνιστές των γλουταμινεργικών υποδοχέων τύπου μη NMDA, την 6-κυανο-7-νιτροκίνοξαλινο-2,3-διόνη (CNQX, 10  $\mu$ M), 4-hydroxyquinoline-2-carboxylic acid (Kynurenic acid, 1 mM), και τύπου NMDA D-(-)-2amino-5-phosphonopentanoic acid (AP5, 50  $\mu$ M), και τον ανταγωνιστή των GABA<sub>B</sub> υποδοχέων 3-aminopropyl-diethoxymethyl-phosphonic acid (CGP 35348, 0,5 mM). Όλα τα φάρμακα αγοράσθηκαν από την Tocris, UK.

### 3. Προετοιμασία τομών του εγκεφάλου

Τα πειραματόζωα αναισθητοποιήθηκαν με αιθέρα και ο εγκέφαλος αφαιρέθηκε αμέσως από το κρανίο με την βοήθεια ειδικής σπάτουλας. Ο εγκέφαλος τοποθετήθηκε σε κρύο (0-4°C) οξυγονωμένο τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό (TENY) που είχε παρασκευασθεί πρόσφατα με τα εξής συστατικά: 124 mM NaCl, 4 mM KCl, 10 mM γλυκόζη, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> και 26 mM NaHCO<sub>3</sub>.

Στη συνέχεια από το κάθε ημισφαίριο αφαιρέθηκε ολόκληρος ο ιπποκάμπος, ο οποίος κόπηκε με τη βοήθεια του μικροτόμου σε κάθετες τομές πάχους 500 μm. Ελήφθησαν 3 τομές από την κοιλιακή μοίρα του ιπποκάμπου, ο οποίος αποτελεί το 1/3 του συνολικού ιπποκάμπου, και 4-5 τομές από την ραχιαία μοίρα του ιπποκάμπου (Εικόνα 3,4). Όλες οι διαδικασίες έγιναν σε σύντομο χρονικό διάστημα (περίπου 3 λεπτά), ώστε να εξασφαλισθεί η βιωσιμότητα του ιστού. Οι τομές τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στο οποίο έφθανε TENY με συνεχόμενη ροή (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) σε θερμοκρασία 33°C ± 2°C, όπου και επωάσθηκαν για 1,5 ώρα.

### 4. Θάλαμος καταγραφής

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

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°C ± 2°C, με τη βοήθεια θερμοστάστη. Χρησιμοποιήθηκε μικροσκόπιο Nikon (μοντέλο SMZ-U/UW10/A/24), λάμπα ψυχρού φωτισμού (Nikon Optical Fiber Light Source),

μικροχειριστές (Narishige Japan, μοντέλο M-P 1) για την τοποθέτηση των μικροπιπετών στους νευρώνες των τομών του ιπποκάμπου κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

Όλο το σύστημα καταγραφής ήταν τοποθετημένο πάνω σε γειωμένη αντικραδασμική τράπεζα και μέσα σε κλωβό Faraday (Εικόνα 5).

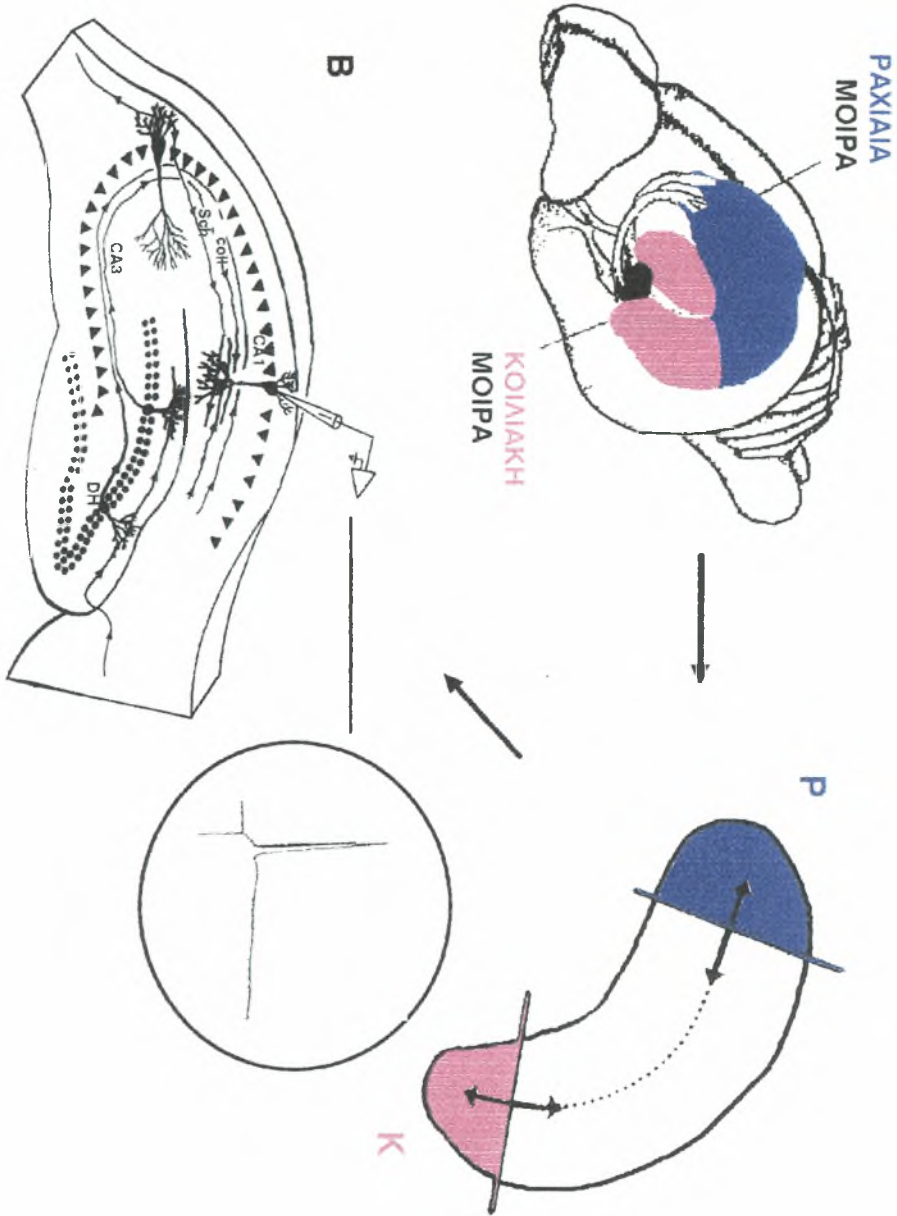
## 5. Σύστημα καταγραφής - ανάλυσης των δεδομένων

Πραγματοποιήθηκαν ενδοκυττάρειες καταγραφές, με γυάλινα μικροηλεκτρόδια πλήρη οξικού καλίου 2M και σε ορισμένες περιπτώσεις, βιοκυτίνη 1.5%. Η αντίσταση των ηλεκτροδίων κυμαινόταν μεταξύ 80 -150 MΩ. Για την κατασκευή των μικροηλεκτροδίων χρησιμοποιήθηκαν γυάλινα τριχοειδή 1,2 mm, που εσωτερικά έφεραν μικροίνες, και τα οποία τοποθετούνταν σε έναν εξολκέα (Brown – flaming μοντέλο P-97 Sutter Instruments California). Οι καταγραφές λαμβανόταν χρησιμοποιώντας προενισχυτή DC με εμπέδηση υψηλής εισόδου (Axoclamp HS-2A, Axon-Instruments Inc.) με δυνατότητα ενεργής σύνδεσης με γέφυρα Wheatstone που επιτρέπει την παροχή ρεύματος διαμέσου του μικροηλεκτροδίου καταγραφής.

Όλα τα πειράματα της τεχνικής καθήλωσης ρεύματος πραγματοποιήθηκαν με «εξισορρόπιση γέφυρας» διαμέσου ενισχυτή τύπου Axoclamp 2A. Με αυτόν τον τρόπο η διαφορά δυναμικού στην άκρη των μικροηλεκτροδίων εμφανιζόταν συνεχώς στον παλμογράφο, ενώ ταυτοχρόνως ήταν δυνατό να διοχετευθεί ρεύμα διαμέσω του μικροηλεκτροδίου. Με την παροχή ρεύματος  $I_0$  προέκυπτε πτώση τάσης  $V_e$  κατά μήκος του ηλεκτροδίου που εξαρτώνταν από την αντίσταση του ηλεκτροδίου ( $R_e$ ). Προκειμένου να καταγραφεί η πραγματική τιμή του δυναμικού μεμβράνης, κατά τη διάρκεια της διοχέτευσης ρεύματος, αυτή η μείωση του δυναμικού έπρεπε να ελαχιστοποιηθεί μέσω της εξισορρόπησης της γέφυρας. Διαφορές δυναμικού που σχετίζονταν με

A

## ΤΟΜΕΣ ΡΑΧΙΑΙΟΥ ΚΑΙ ΚΟΙΛΙΑΚΟΥ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΥ



Εικόνα 3. Α. Μέθοδος λήψης λεπτών τομών ραχιαίας και κοιλιακής μείρας του ιπποκάμπτου.  
 Β. Τοποθέτηση του καταγραφικού μικροηλεκτροδίου εντός της πυραμιδικής στοιβάδας.



τη 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 των  $V_e$  και του δυναμικού της μεμβράνης  $V_m$ . Προκειμένου να καταγράψουμε το πραγματικό δυναμικό της μεμβράνης το  $V_e$  έπρεπε να εξαληφθεί, κάτι που πραγματοποιούνταν μέσω του διακόπτη input offset του ενισχυτή που χρησιμοποιούνταν.

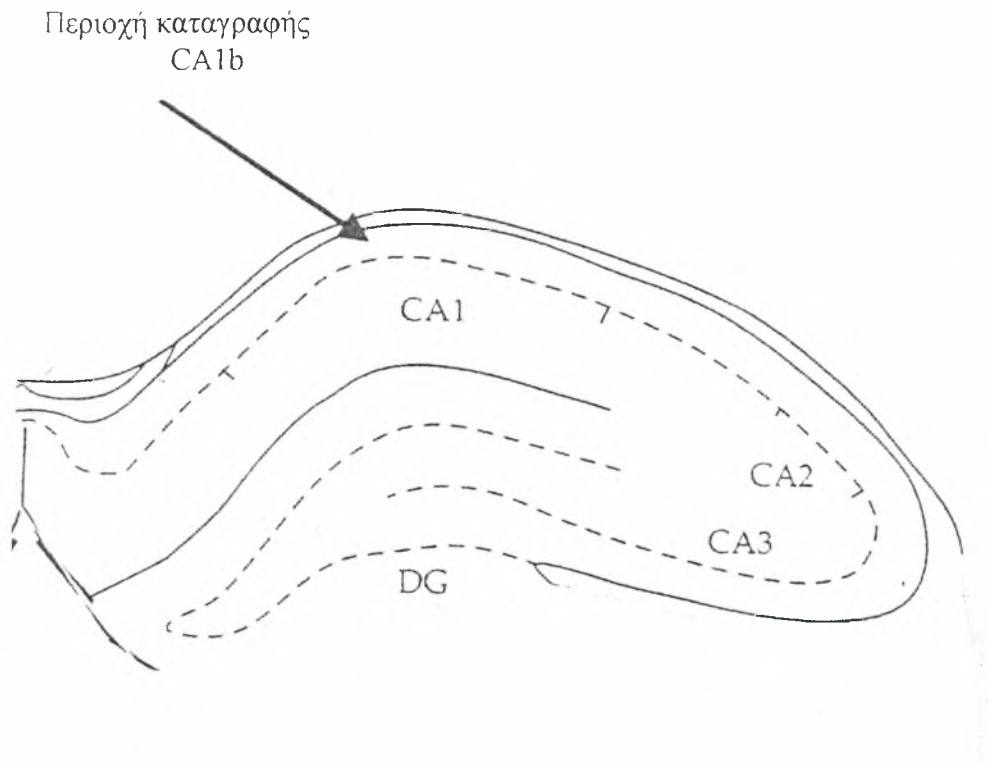
Η αντίσταση εισόδου του κυττάρου (Input resistance,  $R_i$ ) θεωρείτο ως το μέγεθος της απόκλισης του δυναμικού από την σταθερή κατάσταση (steady state) μετά την εφαρμογή υπερπολωτικού ρεύματος, δεδομένου ότι η γέφυρα ήταν εξισορροπημένη επαρκώς, οπότε ίσχυε η σχέση:

$$R_i = V_m / I_0$$

Η εξισορρόπηση της γέφυρας πραγματοποιείτο μετά την τοποθέτηση του μικροηλεκτροδίου στην επιφάνεια της τομής του ιστού με τη βοήθεια στερεοσκοπίου.

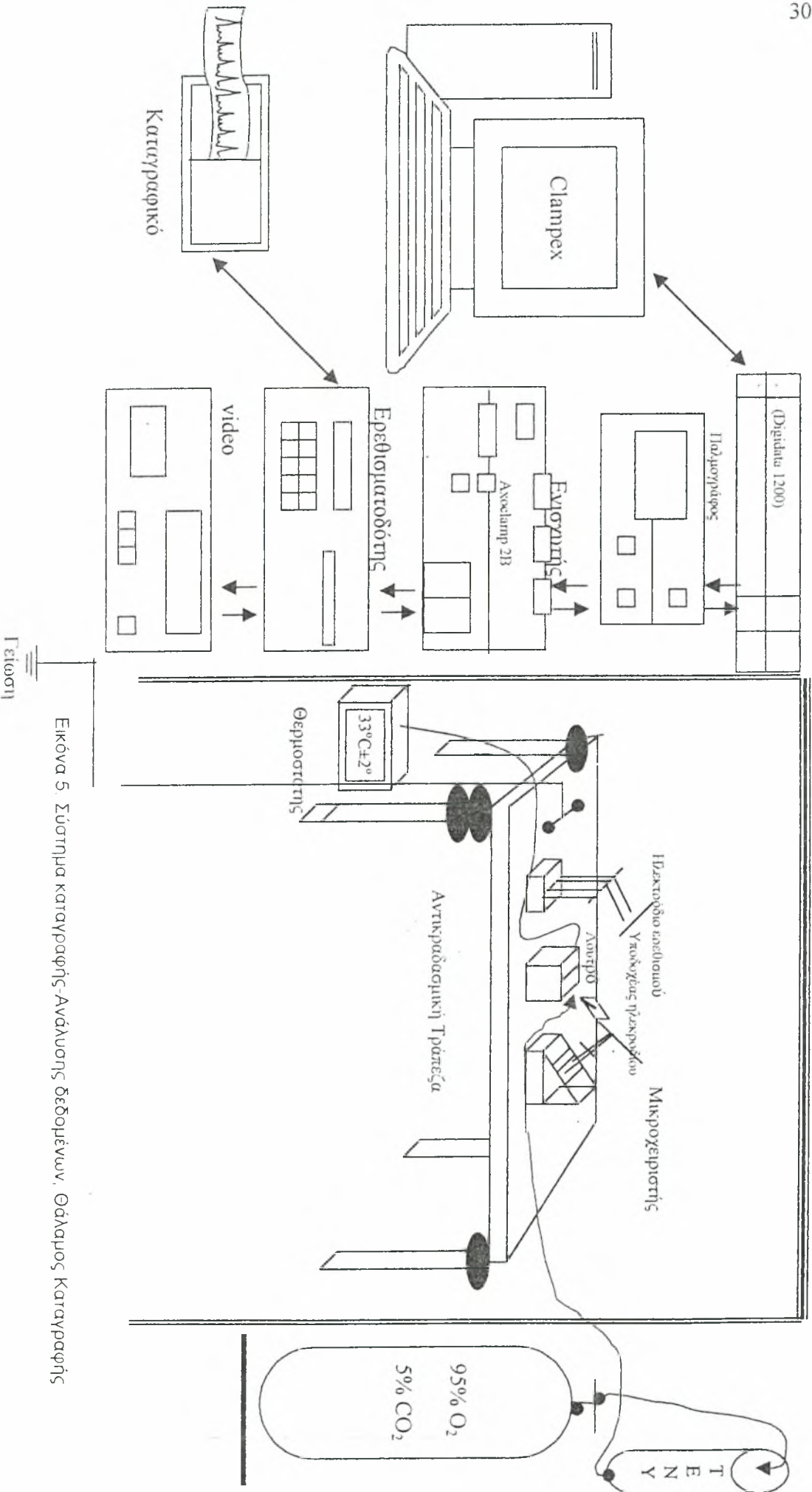
Το μικροηλεκτρόδιο προωθούνταν έως ότου διατρύπούσε τη μεμβράνη ενός νευρώνα. Μεταβολή του δυναμικού της μεμβράνης προς την υπερπολωτική κατεύθυνση δήλωνε την είσοδο του μικροηλεκτροδίου στο εσωτερικό του νευρώνα. Υπερπολωτικοί παλμοί ρεύματος διάρκειας 10 ms και συχνότητας 100 Hz, χορηγούνταν δια μέσου του μικροηλεκτροδίου στο εσωτερικό του νευρώνα, παρέχοντας τη δυνατότητα μέτρησης της αντίστασης της μεμβράνης καθόλη τη διάρκεια των πειραμάτων.

Οι καταγραφές πραγματοποιούνταν σε νευρώνες που παρουσίαζαν αφενός σταθερό δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης περισσότερο υπερπολωμένο πλέον του  $-60$  mV και αφετέρου δυναμικά ενέργειας με πλάτος μεγαλύτερο από 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 4. Σχεδιάγραμμα τομής του εγκεφάλου όπου φαίνεται η περιοχή καταγραφής.

***Καθός Faraday***



Εικόνα 5 Σύστημα καταγραφής-Ανάλυσης δεδομένων. Θάλαμος Καταγραφής

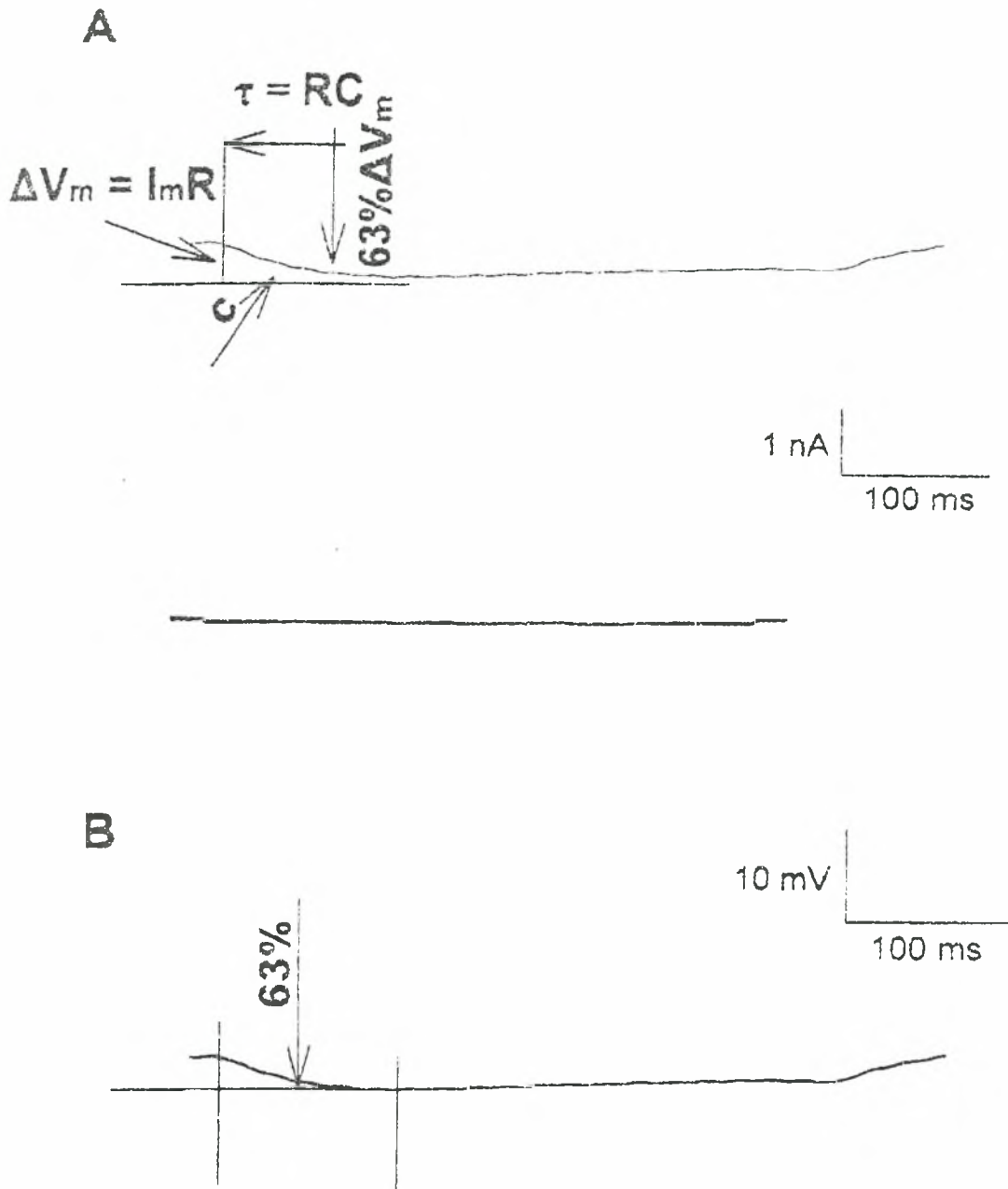
Ρεύμα DC (Direct Current) διοχετεύονταν δια μέσου του μικροηλεκτροδίου σε έναν προενισχυτή (με ενίσχυση 0.1x) και αναπαριστούνταν συνεχώς σε παλμογράφο (τύπου HAMEG HM-305) με σκοπό τη συνεχή παρακολούθηση των αποκρίσεων του δυναμικού της μεμβράνης ως αποτέλεσμα της εφαρμογής του ρεύματος. Επιπλέον, καταγράφονταν σε καταγραφικό χάρτου για συνεχόμενη καταγραφή του πειράματος και αποθηκεύονταν σε κασσέτα ενός μαγνητικού μέσου εγγραφής (DTR 1204 digital tape recorder) που παρείχε δυνατότητα ανάλυσης των δεδομένων μετά το τέλος του πειράματος. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε ενισχυτής για τη διοχέτευση ρεύματος στο νευρώνα μέσω του μικροηλεκτροδίου καταγραφής. Η διάρκεια και συχνότητα των παλμών του διοχετεύομενου ρεύματος καθοριζόταν από ένα ερεθισματοδότη (M-8 A.M.P.I), ενώ η τιμή του αυξομειωνόταν χειροκίνητα μέσω ενός ρυθμιζόμενου εντολέα βήματος.

Όλα τα δεδομένα λήφθηκαν, καταγράφηκαν, αποθηκεύτηκαν και αναλύθηκαν με τη βοήθεια ενός προσωπικού Η/Υ που ήταν συνδεδεμένος με ένα σύστημα Digidata 1200 (Axon Instruments) και χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Pclamp 7.0 (Axon Instruments).

## 6. Συναπτική διέγερση

Το ηλεκτρόδιο ερεθισμού τοποθετήθηκε στην ακτινωτή στοίβαδα, και σε σταθερή απόσταση από το σημείο καταγραφής από όπου διέρχονται οι παράπλευροι άξονες Schaffer (Εικόνα 6). Το ηλεκτρόδιο ερεθισμού ήταν κατασκευασμένο από μακρύ διπολικό μεταλλικό ανοξειδωτο σύρμα επενδεδυμένο με τεφλόν εκτός από το τελευταίο άκρο του. Μέσω του ηλεκτροδίου ερεθισμού διαβιβάζονταν αυξανόμενες τιμές της τάσης (1-20V) έως την εμφάνιση στην οθόνη του παλμογράφου των υποουδικών και ουδικών μετασυναπτικών δυναμικών.

## ΧΡΟΝΙΚΗ ΣΤΑΘΕΡΑ



Εικόνα 7. Υπολογισμός της χρονικής σταθεράς. Α. Η απόκριση του δυναμικού μεμβράνης ( $\Delta V_m$ ) μετά από εφαρμογή ορθογώνιας ώσης ρεύματος. Η πραγματική μορφή της απόκρισης (c). Ο χρόνος που απαιτείται για να επιτευχθεί το 63% της τελικής τάσης καλείται χρονική σταθερά της μεμβράνης ( $\tau$ ). Β. Υπολογισμός της χρονικής σταθεράς στους πυραμιδοειδείς νευρώνες του ιπποκάμπου.

## 7. Υπολογισμός σταθεράς χρόνου

Η σταθερά χρόνου για τη φόρτιση της μεμβράνης, καθορίστηκε από το χρόνο που χρειάστηκε η διαφορά δυναμικού να φθάσει στο 63% της θεωρητικής τιμής του.

Η εκθετική φύση της καμπύλης φόρτισης ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων κατάλληλα προσαρμοσμένη. Μικρά υπερπολωτικά ρεύματα (παλμοί ορθογώνιας μορφής με ένταση 0.05 nA και διάρκεια 300 ms) χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να καθοριστεί το  $\tau$  ούτως ώστε να αποτραπούν σημαντικές αλλαγές της καμπύλης φόρτισης από τασεοεξαρτώμενους διαύλους ιόντων (Εικόνα 7).

## 8. Ιστολογία

Μετά την ολοκλήρωση της καταγραφής των ηλεκτροφυσιολογικών ιδιοτήτων των νευρώνων του ιπποκάμπου έγινε ενδοκυτταρική ιοντοφόρηση βιοκυτίνης για περίπου σαράντα (40) λεπτά με εφαρμογή αφενός συνεχούς υπερπολωτικού ρεύματος πλάτους, (0,5 nA, και αφετέρου ορθογώνιου παλμού ρεύματος πλάτους 0,5 nA και διάρκειας 1 sec). Μετά την ενδοκυττάρια ιοντοφόρηση της βιοκυτίνης, οι τομές παρέμειναν περαιτέρω για 30-60 λεπτά στο καταγραφικό λουτρό. Στη συνέχεια, οι τομές τοποθετήθηκαν για 24 ώρες σε 4°C, σε γυάλινα τρυβλία Petri, σε διάλυμα 4% παραφολμαλδεϋδης 0,1 M φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (PBS, pH 7,2). Αυτές οι τομές κόπηκαν περαιτέρω με τη βοήθεια μικροτόμου σε λεπτότερες τομές πάχους 80-100  $\mu\text{m}$ .

Οι τομές επώασθησαν σε ατομικά ιστολογικά πηγαδάκια (χωρητικότητας 1ml) σε διάλυμα 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  σε 0,4% Triton X-100 PBS για 12 λεπτά για την εξουδετέρωση του ενδογενούς υπεροξειδάσης και αφαίρεση των μη ειδικών ενεργών συστατικών του περιβάλλοντος της τομής, καθώς και για την αύξηση της διαπερατότητας των τομών. Ακολούθησε ημίωρη επώαση των τομών ανά δέκα (10) λεπτά, σε διάλυμα 0,4% Triton X-100 PBS. Με

αυτόν τον τρόπο απομακρύνθηκε η περίσσεια του  $H_2O_2$ . Οι τομές επώασθηκαν σε ατομικά ιστολογικά πηγαδάκια με το σύμπλεγμα αβιδίνης-βιοτίνης (avidin-biotin-horseradish peroxidase, ABC kit Standard, Vector Labs., Vectastain), σε διάλυμα 0,4% Triton X-100 PBS (προετοιμασία του διαλύματος έγινε 30 λεπτά πριν τη χρήση). Η επώαση διήρκεσε περίπου 3 ώρες, ενώ τα ιστολογικά πηγαδάκια ήταν τοποθετημένα σε ανακινούμενο δίσκο. Στη συνέχεια ξεπλύθηκαν αλεπάλληλα με 0,4% Triton X-100 PBS και οπτικοποιήθηκαν οι νευρώνες των τομών με ειδική αντίδραση μέσα στα πηγαδάκια με επώαση διάρκειας 3-6 λεπτά σε διάλυμα 0,03% υπεροξειδίου και 0.1% DAB (τετραχλωρο-διαμινοβενζιδίνη) διαλύματος Tris (pH 7,2).

Όλη η ιστολογική διαδικασία έγινε σε συνθήκες θερμοκρασίας δωματίου. Οι τομές τοποθετήθηκαν σε επιζελατινωμένες αντικειμενοφόρες πλάκες και αφέθηκαν να στεγνώσουν για 24 ώρες. Ακολούθησε ιστολογικός καθαρισμός διάρκειας ενός λεπτού σε ξυλένιο. Τελικώς, οι τομές καλύφθηκαν με καλυπτρίδες με σταθεροποιητή DPX. Η εξέταση έγινε με την βοήθεια του μικροσκοπίου (Olympus CH 20) και η φωτογράφιση των τομών έγινε με ψηφιακή κάμερα στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Λάρισας.

Θεωρείται χρήσιμο για τον αναγνώστη να γίνει συνοπτική περιγραφή της μεθόδου αβιδίνης – βιοτίνης (μέθοδος ABC; Hsu, et al., 1981), που χρησιμοποιήθηκε σ' αυτήν τη μελέτη.

1. Η δέσμευση του ABC στη βιοκυτίνη μετά από την ενδοκυττάρια ιοντοφόρηση της στο νευρώνα. Το ABC αποτελείται από τη γλυκοπρωτεΐνη αβιδίνη και μεγάλο αριθμό μορίων υπεροξειδάσης πολλαπλώς ενωμένων με μόρια βιοτίνης. Η αβιδίνη παρουσιάζει μεγάλη συγγένεια με τη μικρού μοριακού βάρους βιοτίνης. Η αβιδίνη διαθέτει τέσσερις θέσεις δέσμευσης για τη βιοτίνη. Τουλάχιστον μία από τις θέσεις αυτές μένει κενή, έτσι ώστε το ABC να προσδένεται στη βιοτίνη που είναι ενωμένη με τη βιοκυτίνη (βιοτίνη – λυσίνη) του νευρώνα. Με τον τρόπο αυτό δεσμεύονται, τελικά, μόρια υπεροξειδάσης στις προς αναζήτηση αντιγονικές θέσεις.

2. Ανίχνευση των αντιγονικών θέσεων με την προσθήκη της 3,3'-διαμινοβενζιδίνης (3,3'-diaminobenzidine, DAB). Η DAB είναι χρωμογόνος ένωση που, όταν οξειδώνεται από υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) με την καταλυτική δράση της δεσμευμένης υπεροξειδάσης στα μόρια της βιοτίνης του

ABC, παράγει ένα αδιάλυτο, καφέ χρώματος και ηλεκτρονικώς πυκνό ίζημα. Το ίζημα αυτό είναι δυνατόν να παρατηρηθεί τόσο με το οπτικό όσο και με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και επομένως, και η θέση των προς εξέταση ουσιών.

Η μέθοδος ABC άρχισε να χρησιμοποιείται αντί της μεθόδου σεσημασμένου αντισώματος υπεροξειδάσης – αντιυπεροξειδάσης (μέθοδος PAP) στις αρχές της δεκαετίας του 1980 γιατί είναι περισσότερο ευαίσθητη και ειδική (Sternberger, et al., 1978; Hsu et al., 1983). Κατά συνέπεια είναι δυνατή η ανίχνευση αντιγόνου (στην περίπτωση της παρούσας διατριβής ήταν η βιοκυτίνη μετά την ενδοκυτταρική ιοντοφόρηση), που υπάρχει σε μικρές ποσότητες στον ιστό και μείωση του χρόνου επώασης του.

## 9. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Τα δεδομένα εκφράστηκαν με τον μέσο όρο  $\pm$  τοπικό σφάλμα του μέσου όρου (S.E.M.). 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  $n$  καθορίζεται ως ο αριθμός των νευρώνων.



## ΤΡΙΤΟ ΜΕΡΟΣ

### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### Εισαγωγή

Η ροή πληροφοριών κατά μήκος των νευρώνων και μεταξύ τους επιτυγχάνεται μέσω ηλεκτρικών και χημικών σημάτων. Η μετάδοση ηλεκτρικών σημάτων είναι πάρα πολύ σημαντική για την ταχεία μεταφορά πληροφοριών σε μεγάλες αποστάσεις. Όλα τα ηλεκτρικά σήματα - δυναμικά υποδοχέων, συναπτικά δυναμικά και δυναμικά ενέργειας – 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 δίαυλοι εν ηρεμία είναι συνήθως ανοιχτοί και δεν επηρεάζονται σημαντικά από εξωγενείς παράγοντες, όπως είναι το δυναμικό μεμβράνης. Οι δίαυλοι αυτοί είναι σημαντικοί κυρίως για τη διατήρηση του δυναμικού ηρεμίας, δηλαδή του ηλεκτρικού δυναμικού εκατέρωθεν της μεμβράνης όταν δεν λαμβάνει σήματα.

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  $-70$  mV.

## Ιδιότητες της μεμβράνης των πυραμιδοειδών νευρώνων της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου.

### 1. Παθητικές ιδιότητες μεμβράνης

Οι παθητικές ηλεκτρικές ιδιότητες των νευρώνων είναι σταθερές και δεν αλλάζουν κατά τη διάρκεια της μετάδοσης ηλεκτρικών σημάτων. Εξετάσθηκαν οι τρεις παθητικές ιδιότητες:

- α. δυναμικό μεμβράνης εν ηρεμία
- β. αντίσταση εισόδου του κυττάρου
- γ. χρονική σταθερά της μεμβράνης

Οι παθητικές αυτές ιδιότητες, διαδραματίζουν κύριο ρόλο στην 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 έναν δενδρίτη θα εξελιχθεί σε εκπόλωση που θα υπερβεί ή όχι τον ουδό, στη 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 ενέργειας μετά τη δημιουργία του και **επομένως μπορούν να επηρεάσουν με αυτόν τον τρόπο τη διεγερσιμότητα των νευρώνων.**

#### 1.1 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 δυναμικό εν ηρεμία. Το δυναμικό αυτό καθορίζεται από εν ηρεμία διαύλους ιόντων.

Συγκεντρώθηκαν δεδομένα από 33 πυραμιδοειδείς νευρώνες της ραχιαίας και της κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου. Το δυναμικό μεμβράνης εν ηρεμία δεν παρουσίασε διαφορά ανάμεσα σε πυραμιδοειδείς νευρώνες της ραχιαίας ( $-64,17 \pm 0,65$  mV,  $n = 21$ ) και κοιλιακής μοίρας ( $-63,84 \pm 0,82$  mV,  $n = 12$ ) του ιπποκάμπου (Πίνακας 1,  $p > 0,05$ ).

## 1.2 Αντίσταση εισόδου

Η σχέση 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,  $\Delta V$ , είναι:

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

Έτσι, από δύο κύτταρα που δέχονται τα ίδια συναίπτικα 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 διεγερσιμότητα του.**

Επίσης, σε έναν εξιδανικευμένο σφαιρικό νευρώνα χωρίς αποφυάδες, η αντίσταση εισόδου εξαρτάται τόσο από την πυκνότητα των διαύλων εν ηρεμία 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. Για την μέτρηση της αντίστασης εισόδου του κυττάρου έγινε καταγραφή των μεταβολών του δυναμικού της μεμβράνης μετά από διοχέτευση υπερπολωτικών ώσεων ρεύματος στο κυτταρικό σώμα του. Στους

περισσότερους νευρώνες, η σχέση μεταξύ του μεγέθους του αρνητικού ρεύματος και της υπερπόλωσης σταθερής κατάστασης είναι γραμμική. Δημιουργείται έτσι μια σχέση ρεύματος και τάσης η οποία ορίζει την αντίσταση εισόδου του νευρώνα,  $R_i$ .

Στην παρούσα μελέτη η αντίσταση εισόδου των πυραμιδοειδών 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 300 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 ( $45,92 \pm 4,99 \text{ M}\Omega$ ,  $n = 17$ ) και του κοιλιακού ( $46,28 \pm 6,24 \text{ M}\Omega$ ,  $n = 12$ ;  $p > 0,05$ ) ιππόκαμπου (Πίνακας 1).

Τα αποτελέσματα αυτά είναι συγκρίσιμα με τα αποτελέσματα άλλων ερευνητών (Staff et al., 2000).

### **1.3 Χρονική σταθερά της μεμβράνης**

Η χρονική σταθερά της μεμβράνης  $\tau$ , δηλαδή το γινόμενο της αντίστασης επί την χωρητικότητα της μεμβράνης, είναι ο χρόνος οποίος απαιτείται για να επιτευχθεί το 63% της τελικής τάσης. Η χρονική σταθερά  $\tau$  επιτρέπει να προσδιορισθεί η χρονική εξέλιξη του συναπτικού δυναμικού και επομένως επηρεάζει τη χρονική άθροιση, δηλαδή τη διεργασία άθροισης διαδοχικών συναπτικών επιδράσεων στο ίδιο σημείο του μετασυναπτικού κυττάρου. Οι νευρώνες με μεγάλη χρονική σταθερά έχουν μεγαλύτερη ικανότητα χρονικής άθροισης από τους νευρώνες με μικρότερη χρονική σταθερά. Συνεπώς, όσο μεγαλύτερη είναι η χρονική σταθερά τόσο

μεγαλύτερη είναι και η πιθανότητα δύο διαδοχικές ώσεις από έναν διεγερτικό προσυναπτικό νευρώνα να προστεθούν για να οδηγήσουν την κυτταρική μεμβράνη στον ουδό δημιουργίας ενός δυναμικού ενέργειας.

Στην παρούσα μελέτη η χρονική σταθερά της μεμβράνης  $\tau$  υπολογίστηκε από τη μικρότερη καμπύλη φόρτισης με την εφαρμογή μικρού πλάτους (0,05 nA) αρνητικού παλμού ρεύματος (διαρκείας 300 ms) όπως προτάθηκε από τον Rall (1977). Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο η εξασθένηση της καταγραφόμενης τάσης σε οποιοδήποτε σημείο της μεμβράνης μπορεί κατά προσέγγιση να ισούται με τις πρώτες μόνο τιμές άπειρων σειρών εκθετικών εξασθενήσεων με διαφορετική χρονική σταθερά μεμβράνης (Rall, 1977).

Χρησιμοποιώντας αυτή την αναλυτική μέθοδο του  $\tau$  της μεμβράνης, δεν βρέθηκε καμία στατιστική διαφορά στην παραπάνω παθητική ιδιότητα ανάμεσα σε νευρώνες του ραχιαίου ( $22,11 \text{ ms} \pm 1,13$   $n = 17$ ) και του κοιλιακού ( $19,32 \text{ ms} \pm 0,87$   $n = 12$ ) ιπποκάμπου (Πίνακας 1,  $p > 0,05$ ).

ΠΑΘΗΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ					
ΡΑΧΙΑΙΟΣ $n = 21$			ΚΟΙΛΙΑΚΟΣ $n = 12$		
Ri (M $\Omega$ )	Ταυ (ms)	RMP (mV)	Ri (M $\Omega$ )	Ταυ (ms)	RMP (mV)
45,92 $\pm$ 4,99	22,11 $\pm$ 1,13	- 64,17	46,28 $\pm$ 6,24	19,32 $\pm$ 0,87	- 63,85

Πίνακας 1: Σύγκριση των παθητικών ιδιοτήτων της μεμβράνης των πυραμιδοειδών νευρώνων του ιπποκάμπου της περιοχής CA1 και στις δυο μούρες ( $p > 0,05$ ).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης που αφορούν τις παθητικές ιδιότητες της μεμβράνης είναι συγκρίσιμα με αυτά της διεθνούς βιβλιογραφίας όπως φαίνεται παρακάτω.

Staff et al., 2000 RMP = 66,2  $\pm$  1,1 mV Ri = 55,4  $\pm$  3,7 M $\Omega$   $\tau$  = 40,3  $\pm$  3,2 ms

Yaari et al., 2000 RMP = 64,3  $\pm$  3,8 mV Ri = 28,4  $\pm$  9,2 M $\Omega$   $\tau$  = 13,7  $\pm$  5,2 ms

Yaari et al., 1994	RMP = $69,9 \pm 5,3$ mV	Ri = $29,3 \pm 10,4$ M $\Omega$	
Mason, 1993	RMP = $63,4 \pm 4$ mV	Ri = $34 \pm 9$ M $\Omega$	$\tau = 14 \pm 3$ ms

## 2. Ενεργητικές ιδιότητες της μεμβράνης των πυραμιδοειδών νευρώνων

Οι ιδιότητες των νευρώνων του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) εξαρτώνται από τον αριθμό και την κατανομή των ιοντικών δίαυλων, που βρίσκονται στην μεμβράνη των νευρώνων. Αυτοί οι ιοντικοί δίαυλοι καθορίζουν τον τρόπο με τον οποίο οι νευρώνες ανταποκρίνονται σε ηλεκτρικά ερεθίσματα και είναι υπεύθυνοι για το ρυθμό πυροδότησης των νευρώνων και επομένως για τη διεγερσιμότητα τους (Llinas and Yarom, 1981a; Llinas and Yarom, 1981b; Jahnsen and Llinas, 1984; Llinas, 1988). Στο ΚΝΣ οι πληροφορίες κωδικοποιούνται από νευρώνες ως αριθμός και/ή συχνότητα των δυναμικών ενέργειας. Επίσης, η ταχύτητα και αποτελεσματικότητα της νευρωνικής επεξεργασίας όπως και ο έλεγχος της απελευθέρωσης των νευροδιαβιβαστών και των επαναλαμβανομένων πυροδοτήσεων καθορίζεται από μηχανισμούς που ρυθμίζουν την επαναπόλωση των δυναμικών ενέργειας.

Το δυναμικό ενέργειας παράγεται από τη μετακίνηση ιόντων που διαπερνούν τη μεμβράνη δια μέσου τασεοελεγχόμενων διαύλων. Η κίνηση αυτή είναι εφικτή μόνον όταν οι δίαυλοι έχουν ανοίξει και μεταβάλλει την κατανομή των φορτίων εκατέρωθεν της μεμβράνης. Η εισροή  $\text{Na}^+$  και, σε ορισμένες περιπτώσεις  $\text{Ca}^{2+}$  εκπολώνει τη μεμβράνη στη συνέχεια η εκροή  $\text{K}^+$  την επαναπολώνει αποκαθιστώντας την αρχική κατανομή φορτίου. Μια ομάδα τασεοελεγχόμενων διαύλων ανοίγουν κυρίως όταν το δυναμικό μεμβράνης προσεγγίζει τον ουδό του δυναμικού ενέργειας και έτσι οι δίαυλοι αυτοί έχουν σημαντικότερες επιπτώσεις στις ριπές δυναμικών που δημιουργούνται από τον νευρώνα.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν ορισμένες ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες των πυραμιδοειδών νευρώνων της περιοχής CA1 του ιπποκάμπτου

σε μία προσπάθεια να **διερευνηθεί η διεγερσιμότητα των νευρώνων αυτών.**

## 2.1 Σχέση ρεύματος-τάσης

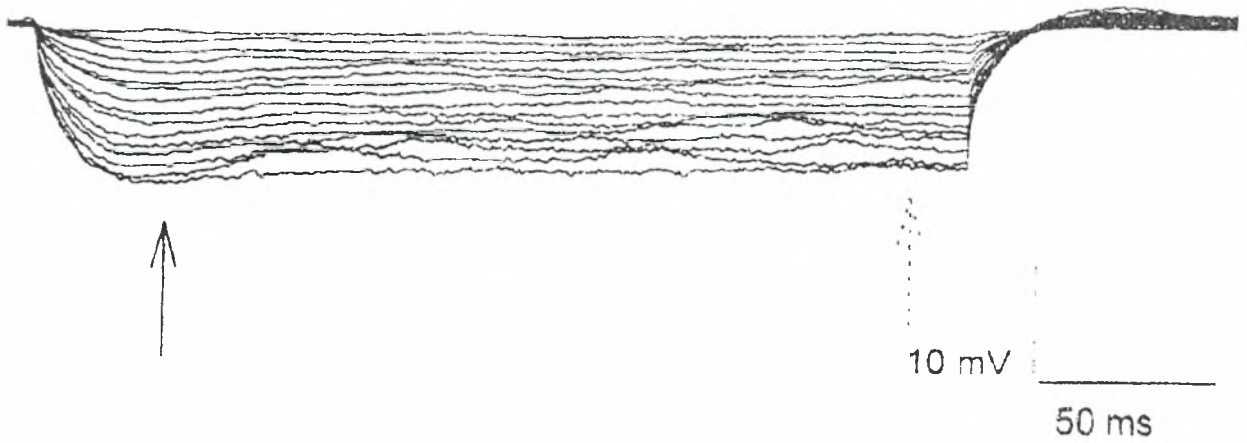
Διοχετεύοντας στο νευρώνα κλιμακωτές υπερπολωτικές ώσεις ρεύματος μακράς διάρκειας, μπορούμε να προσδιορίσουμε τη σχέση ρεύματος και τάσης του νευρώνα. Κλιμακωτές αυξήσεις των προς τα έσω ώσεων ρεύματος προκαλούν κατ'αναλογία κλιμακωτές και συμμετρικές μεταβολές του δυναμικού μεμβράνης. Η καμπύλη της τάσης και του ρεύματος (I-V) η οποία προκύπτει, εάν παραστήσουμε γραφικά το δυναμικό σταθερής κατάστασης ως συνάρτηση του εισαγόμενου ρεύματος, είναι στις περισσότερες περιπτώσεις γραμμική. Σημειωτέον ότι η κλίση της καμπύλης I-V ορίζει συγχρόνως την αντίσταση εισόδου του νευρώνα.

Στη διάρκεια των πειραμάτων έγιναν καταγραφές από πυραμιδοειδείς νευρώνες της **ραχιαίας και της κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου** σε παρόμοια επίπεδα δυναμικών μεμβράνης ( $-65$  mV). Για τη δημιουργία της καμπύλης τάσης-ρεύματος εφαρμόσθηκε στους νευρώνες αυτούς σειρά υπερπολωτικών ορθογώνιων παλμών διάρκειας 300 ms και αυξανόμενου πλάτους (από  $-0,05$  έως και  $-0,8$  nA).

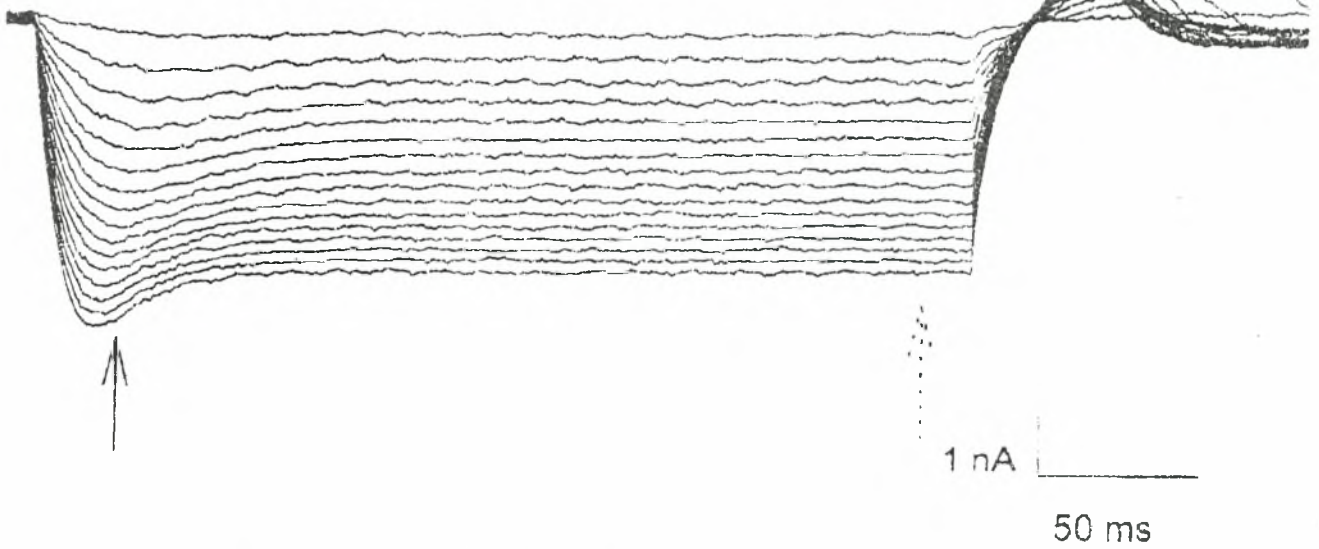
Οι κυματομορφές που προέκυψαν από την εφαρμογή αυτών των παλμών ήταν παρόμοιες μεταξύ των νευρώνων της ραχιαίας και κοιλιακής μοίρας (Εικόνα 8). Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ανόρθωση του δυναμικού της μεμβράνης (sag), περίπου 30-40 ms μετά την έναρξη του ορθογώνιου παλμού, η οποία εκφράσθηκε ως η διαφορά ανάμεσα στο δυναμικό της μεμβράνης στη σταθερή κατάσταση (steady state, Εικόνα 8, διακεκομμένο βέλος) και στο δυναμικό της μεμβράνης στην κορυφή (peak, Εικόνα 8, συνεχόμενο βέλος). Η ανόρθωση του δυναμικού της μεμβράνης απεικονίζεται στη γραφική παράσταση της σχέσης ρεύματος – τάσης (Εικόνα 9) στην οποία φαίνεται ότι η διαφορά μεταξύ του δυναμικού στην κορυφή και του δυναμικού στη σταθερή κατάσταση αυξάνει βαθμιαία με την υπερπόλωση, γεγονός που υποδηλώνει την ενεργοποίηση τασεοεξαρτώμενων διαύλων. Οι δίαυλοι αυτοί

PAXIAIA MOIPA

A



B

KOILIAKH MOIPA

Εικόνα 8. Η σχέση ρεύματος - τάσης στους πυραμιδοειδείς νευρώνες της ραχιαίας μούρας (A) και της κοιλιακής μούρας (B) του ιπποκάμπου. Τα βέλοι εμφανίζουν αντίστοιχα και στις δύο κυματομορφές την κορυφή (συνεχής γραμμή) και τη σταθερή κατάσταση (διακεκομμένη γραμμή). Το δυναμικό της μεμβράνης ήταν περίπου  $-65$  mV.



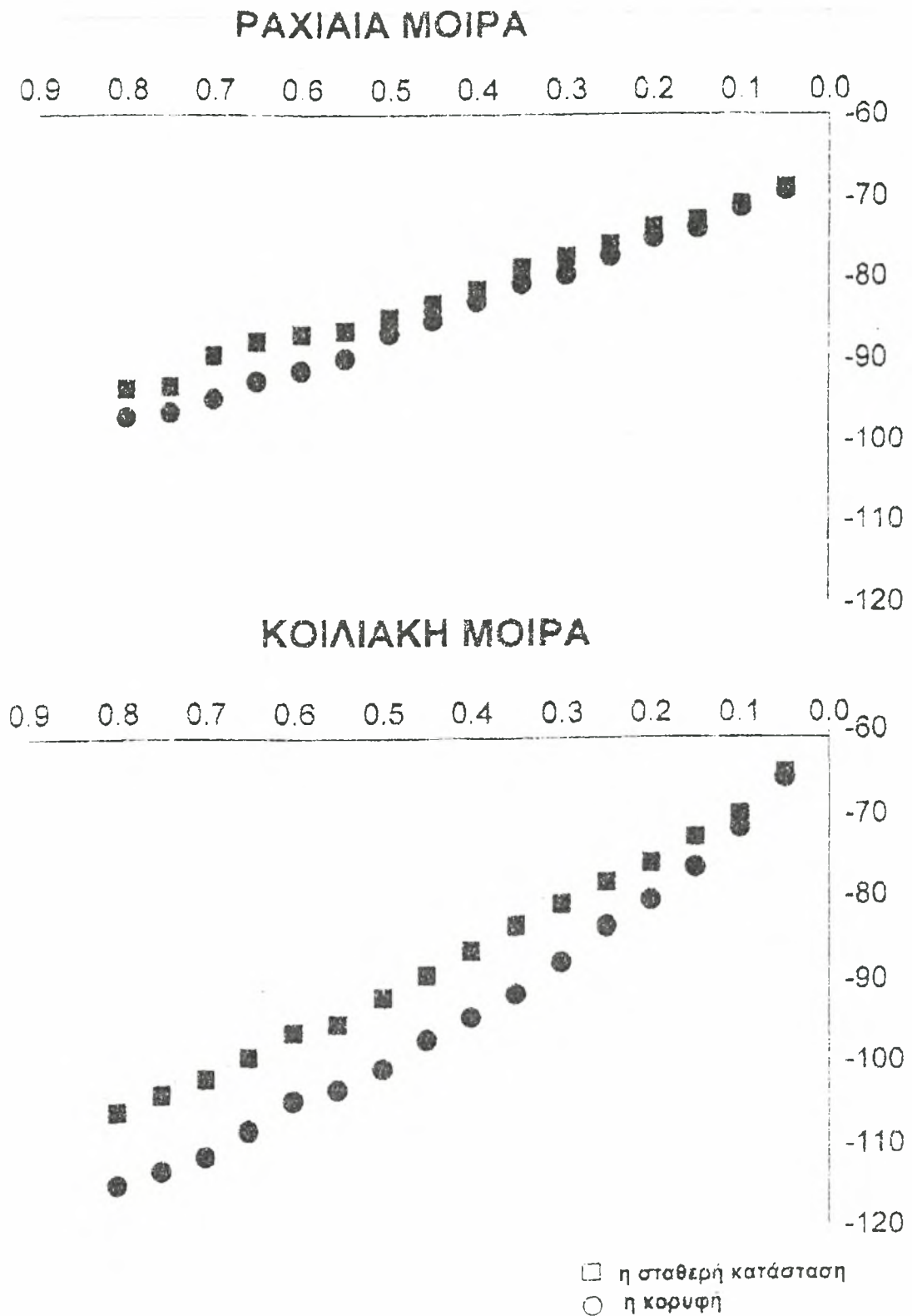
αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως δίαυλοι «ακανόνιστης επανόρθωσης» (anomalous rectifier,  $I_Q$ ) (Katz, 1949). Αρχικά οι δίαυλοι αυτοί περιγράφηκαν στα καρδιακά κύτταρα και τους δόθηκε ο όρος «βηματοδότης» ή  $I_f$  καθότι φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία και τον έλεγχο της αυθόρμητης δραστηριότητας (ταλαντώσεις) της καρδιάς (Brown et al., 1977) και του θαλάμου (Pape, 1996).

Στο νευρικό σύστημα για πρώτη φορά παρατηρήθηκαν οι δίαυλοι αυτοί στους πυραμιδοειδείς νευρώνες της περιοχής CA1 του ιππόκαμπου (Halliwell and Adams, 1982) με ουδό της ενεργοποίησης περίπου  $-80$  mV. Περαιτέρω έρευνες έχουν μέχρι τώρα αποκαλύψει την ύπαρξη παρόμοιων  $I_f$  διαύλων σε αρκετούς νευρώνες των θηλαστικών οι οποίοι είναι γνωστοί ως  $I_h$  ή  $I_Q$  (Bobker and Williams, 1989; Crepel and Penit-Soria, 1986; Kubota, et al., 1985; Mayer and Westbrook, 1989; McCormick and Pape, 1990a,b; Pape and McCormick, 1989; Takahashi, 1990).

Ο πληθυσμός των «ακανόνιστων επανορθώσεων» των διαύλων που έχει περιγραφεί έως τώρα είναι αρκετά εκτεταμένος. Μεταξύ αυτών πολλοί είναι δίαυλοι  $K^+$  των οποίων η αγωγιμότητα είναι αυξημένη στην κατεύθυνση εισροής απ' ότι της εκροής του ρεύματος (Costanti and Galvan, 1983; Sha, et al., 1987; Stanfield, et al., 1985). Ένα άλλο είδος ακανόνιστων επανορθώσεων παράγεται από μη ειδικούς κατιονικούς διαύλους διαπερατούς κυρίως σε  $Na^+$  και  $K^+$  (Di Francesco, et al., 1986; Halliwell and Adams, 1982; Spain, et al., 1987).

Οι δίαυλοι  $I_h$  (πρωτογενής όρος  $I_Q$ ) θεωρείται ότι συνεισφέρουν στο δυναμικό ηρεμίας των νευρώνων της περιοχής CA1 και ασκούν, ως εκ τούτου, μερικό έλεγχο της κυτταρικής ανταπόκρισης στην παραγωγή των διεγέρσεων. Πράγματι, είναι γνωστό ότι η ενεργοποίηση του ρεύματος καλίου  $I_h$  στους δένδριτες των πυραμιδοειδών νευρώνων της περιοχής CA1 μπορεί να τροποποιήσει διάφορες παραμέτρους της κυτταρικής μεμβράνης (αντίσταση εισόδου, χρονική σταθερά, δυναμικό ηρεμίας) (Gasparini and DiFrancesco, 1997), την μεταϋπερπόλωση μέσης διάρκειας (m-AHP, MacCaferrri et al., 1993) και να μεταβάλλει τη συναπτική δραστηριότητα (Magee, 1998).

Μία σημαντική συνέπεια αυτού του ευρήματος είναι ότι το  $I_h$  ίσως να σχετίζεται με τη μεταβίβαση σήματος ανάμεσα στους νευρώνες της περιοχής CA3 και CA1, και κατά συνέπεια με τη ροή πληροφοριών στον



Εικόνα 9. Γραφική παράσταση της σχέσης ρεύματος - τάσης στους πυραμιδοειδείς νευρώνες του πτεροκάμπτου. Α. Ραχιαίας μοίρας Β. Κοιλιακής μοίρας. Τα δυναμικά της μεμβράνης ήταν περίπου  $-65$  mV.

ιππόκαμπο (Gasparini, 1997). Αξίζει ίσως να σημειωθεί ότι διάφοροι νευροδιαβιβαστές τροποποιούν το  $I_h$  τόσο σε πυραμιδοειδούς όσο και ενδονευρώνες της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου (Colino, et al., 1993).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η ενεργοποίηση των διαύλων  $I_h$  μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα εκφόρτισης των νευρώνων και να **προάγει τη νευρωτική διεγερσιμότητα**.

Ο λειτουργικός ρόλος των διαύλων  $I_h$  συνοψίζεται στα εξής:

- Έλεγχος των ρυθμικών ταλαντώσεων
- Διατήρηση του δυναμικού ηρεμίας της μεμβράνης σε αυξημένες (εκπολωτικές τιμές)
- Συνεισφορά στην παραγωγή μεταϋπερπόλωσης

Προκειμένου να ποσοτικοποιηθεί το αποτέλεσμα της ενεργοποίησης αυτών των διαύλων υπολογίσθηκε ο λόγος του δυναμικού στη σταθερή κατάσταση προς το δυναμικό στην κορυφή (sag ratio) (Εικόνα 9). Η τιμή του λόγου για τη ραχιαία μοίρα βρέθηκε ( $0,838 \pm 0,018$ ,  $n = 18$ ) και για την κοιλιακή μοίρα ( $0,805 \pm 0,042$ ,  $n = 12$ ). Δεν διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο τιμές ( $p > 0,05$ ).

## 2.2 Μονήρες δυναμικό ενέργειας

Τα δυναμικά ενέργειας είναι τελικά προϊόντα της συναπτικής ολοκλήρωσης. Το μονήρες δυναμικό ενέργειας καθώς και τα δυναμικά (εκπολωτικά και υπερπολωτικά) που έπονται του δυναμικού ενέργειας παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες για τον τρόπο με τον οποίο ο νευρώνας επεξεργάζεται τα εισερχόμενα σήματα.

Μονήρη δυναμικά ενέργειας προκλήθηκαν μέσω σύντομου εκπολωτικού παλμού ρευματικού διάρκειας 3 –10 ms σε δυναμικό μεμβράνης περίπου – 65 mV. Το πλάτος του δυναμικού ενέργειας των πυραμιδοειδών νευρώνων της κοιλιακής μοίρας ήταν  $80,57 \pm 1,92$  mV ( $n = 7$ ) και το πλάτος του δυναμικού ενέργειας των πυραμιδοειδών νευρώνων της ραχιαίας μοίρας

89,71 ± 1,99 mV (n = 7) του ιπποκάμπου. Μετρήθηκαν επίσης ο χρόνος ανόδου (rise time), ο χρόνος καθόδου (decay time) και εμβαδόν των δυναμικών ενέργειας.

ΔΥΝΑΜΙΚΟ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΤΩΝ ΠΥΡΑΜΙΔΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ			
ΠΛΑΤΟΣ mV	ΧΡΟΝΟΣ.ΑΝ/ΚΑΘ	ΗΜΙΕΥΡΟΣ	ΕΜΒΑΔΟΝ
89.71 ± 1.99 mV	0,22 ± 0,01-0.97 ± 0.02	1,31 ms	86.59 ± 2.32 ms/mV
80.57 ± 1.92 mV	0,21± 0,01-0.98 ± 0.02	1,14 ms	74,94 ± 5,17ms/mV

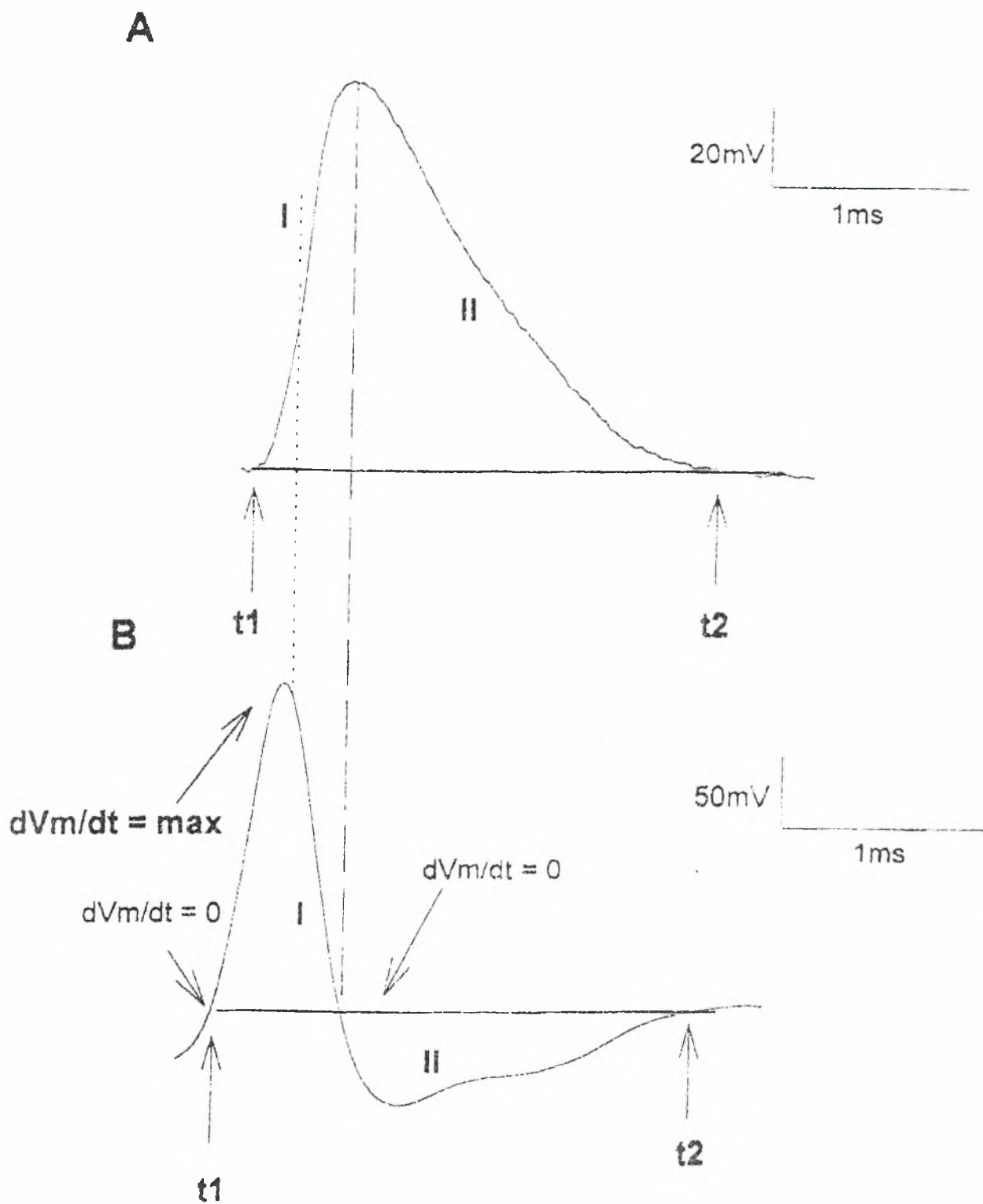
Πίνακας 3: Ιδιότητες του δυναμικού ενεργείας.

Σε καμία από τις παραπάνω παράμετρος δε βρέθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά ( $p > 0.05$ ).

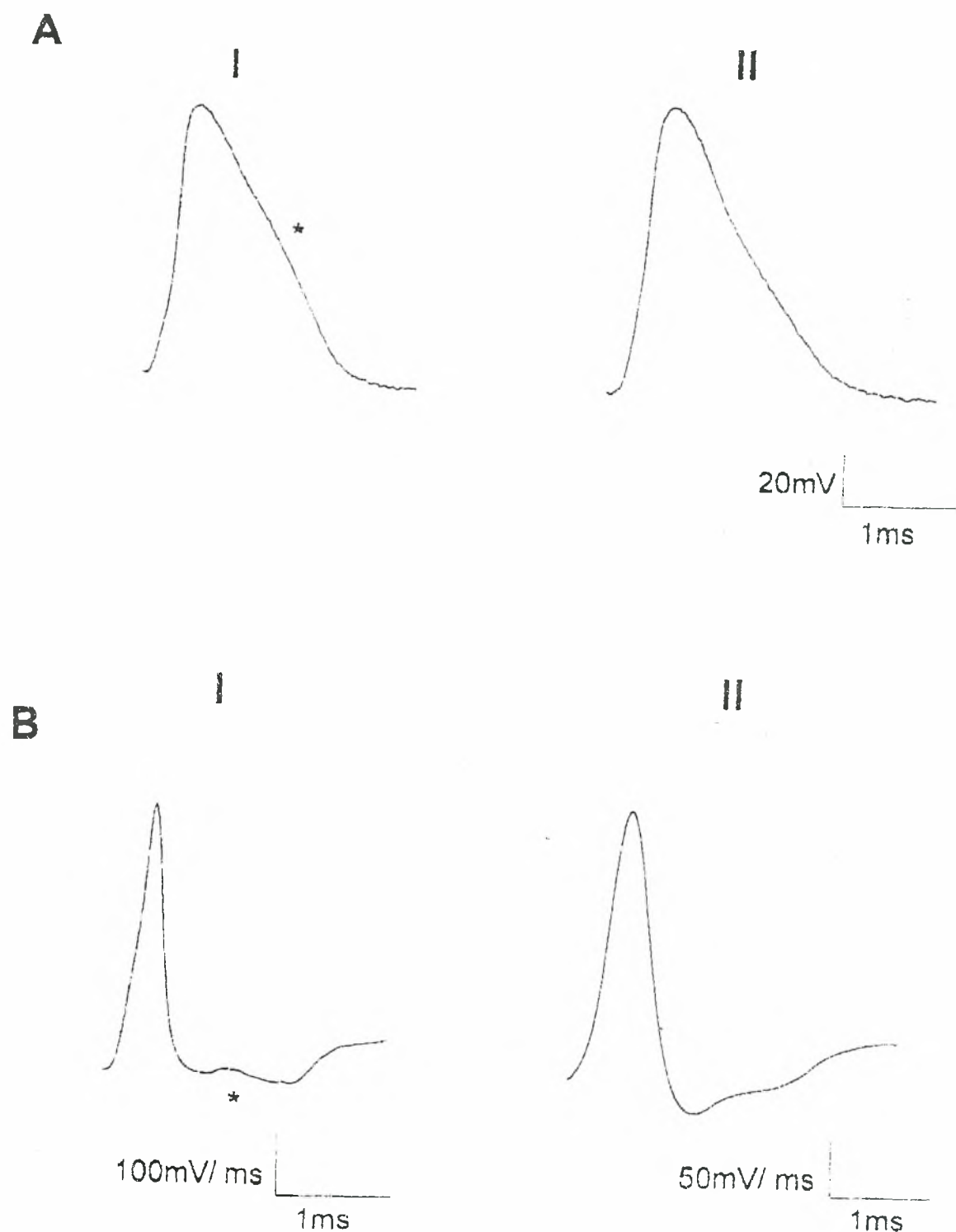
Στη συνέχεια υπολογίσθηκε η πρώτη παράγωγος του δυναμικού ενέργειας (dVm/dt), με σκοπό την περαιτέρω διερεύνηση της ύπαρξης διαφορών μεταξύ των φάσεων ανόδου και καθόδου του δυναμικού ενέργειας στις δύο μοίρες της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου.

Η πρώτη παράγωγος dVm/dt του δυναμικού ενέργειας (Εικόνα 10-BI) στη φάση ανόδου, αντιπροσωπεύει τη δραστηριοποίηση των ταχέων τασεοελεγχόμενων διαύλων νατρίου (Colbert, et al, 1997; Coombs, et al, 1957). Υπολογίσθηκε η μέγιστη τιμή του ρυθμού ανόδου (dVm/dt=max, Εικόνα 10) σε νευρώνες της ραχιαίας και της κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου. Διαπιστώθηκε ότι οι νευρώνες της ραχιαίας μοίρας χαρακτηρίζονται από αυξημένες τιμές του ρυθμού ανόδου, σε σχέση με την κοιλιακή, όμως δεν βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντικές. Συγκεκριμένα, ο ρυθμός ανόδου των νευρώνων της ραχιαίας και της κοιλιακής μοίρας ήταν  $462,29 \pm 31,81$  mV/ms (n = 7) και  $383,71 \pm 19,03$  mV/ms (n = 7), αντίστοιχα. Στη συνέχεια υπολογίστηκε η ρυθμός καθόδου με τα εξής αποτελέσματα: ραχιαία μοίρα  $-73,67 \pm 2,33$  mV/ms (n = 7), κοιλιακή μοίρα  $-4,76 \pm 4,87$  mV/ms (n = 7,  $p > 0,05$ ).

Σε ορισμένους νευρώνες (ραχιαία μοίρα n = 6/8, κοιλιακή μοίρα n = 4/10), παρατηρήθηκε ότι στη φάση καθόδου ο ρυθμός μεταβολής του



Εικόνα 10. Μεθοδολογία μέτρησης των ιδιοτήτων του μονήρους δυναμικού ενέργειας των πυραμιδοειδών νευρώνων του ιπποκάμπτου. Α. Μονήρες δυναμικό ενέργειας (I) φάση ανόδου, (II) φάση καθόδου,  $t_1$  έως  $t_2$  διάρκεια του δυναμικού ενέργειας. Β. Η πρώτη παράγωγος  $dV_m/dt$  κατά το ρυθμό ανόδου (I) και το ρυθμό καθόδου (II).



Εικόνα 11. Σύγκριση των μονήρων δυναμικών ενέργειας των νευρώνων της ραχιαίας και της κοιλιακής μοίρας. Α. Μονήρες δυναμικά ενέργειας της ραχιαίας I και της κοιλιακής II μοίρας οι οποίοι προκλήθηκαν με εφαρμογή εκτολωτικού ορθογώνιου παλμού ρεύματος με διάρκεια 3 – 10 ms. Β. Ρυθμός της μεταβολής του δυναμικού  $dV/dt$  των νευρώνων της ραχιαίας I και της κοιλιακής II μοίρας. Στους νευρώνες της ραχιαίας μοίρας παρατηρείται (\*) μια θετική επανάκαμψη

δυναμικού παρουσίασε παροδική θετική επανάκαμψη (Εικόνα 11B1\*). Πράγματι, αυτή η θετική επανάκαμψη αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία ότι σχετίζεται με τους δίαυλους ασβεστίου  $I_L$  και  $I_N$  οι οποίοι χαρακτηρίζονται από υψηλό ουδό ενεργοποίησης  $-20$  mV (Wong et al., 1979). Συνολικά τα αποτελέσματα αυτά είναι συγκρίσιμα με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας οι οποία αναφέρει τους ρυθμούς ανόδου και καθόδου για τους πυραμιδοειδείς νευρώνες της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου (Spruston et al., 2000).

### **2.3 Ταχύ μεταϋπερπολωτικό δυναμικό (f-AHP)**

Στους πυραμιδοειδείς νευρώνες του ιπποκάμπου το δυναμικό ενέργειας ακολουθείται από πολλαπλά μεταϋπερπολωτικά δυναμικά (after hyperpolarizing potential), τα οποία περιλαμβάνουν το ταχύ (fast-AHP), το μεσαίο (medium-AHP, m-AHP) και το βραδύ (slow-AHP, s-AHP) μεταϋπερπολωτικό δυναμικό (Εικόνα 12,13, Storm, 1987, 1989). Το ταχύ μεταϋπερπολωτικό δυναμικό εμφανίζεται αμέσως μετά από το δυναμικό ενέργειας, προσδιορίζεται ως ταχεία αρνητική απόκλιση από τη βασική γραμμή και διαρκεί 1-10 ms και είναι το κύριο αποτέλεσμα της ενεργοποίησης ασβεστοενεργοποιημένων καλιοεξαρτόμενων ιοντικών διαύλων  $I_c$  (Sah, 1996; Alger and Nicoll, 1980; Hotson and Prince, 1980; Schwatzkroin and Stafstrom, 1980; Gustafsson and Wingstrom, 1981; Storm, et al., 1999). Υπάρχουν μελέτες με την χρήση της μεθόδου καθήλωσης τάσεως οι οποίες δείχνουν ότι στη δημιουργία του f-AHP ενέχεται ένας παροδικός ασβεστοελεγχόμενος δίαυλος καλίου ευαίσθητος στο TEA (τετρααιθυλαμμώνιο) τόσο στην περιοχή CA3 (Zbicz and Weight, 1985) όσο και στους πυραμιδοειδείς νευρώνες της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου (Storm, 1987c; Mc Larnon, 1995; Hicks and Marrion, 1998). Η ενεργοποίηση των διαύλων αυτών σχετίζεται με την επαναπόλωση του δυναμικού ενέργειας (Lancaster and Nicoll, 1987; Yoshida et al., 1991). Έχει αναφερθεί ότι για την επαναπόλωση των δυναμικών ενέργειας και την συνεπαγόμενη πρόκληση δημιουργίας και άλλων δυναμικών ενέργειας απαιτείται η προηγηθείσα

ενεργοποίηση των μεταϋπερπολωτικών δυναμικών (Hotson and Prince, 1980; Gustafsson and Wigstrom, 1981).

Το πλάτος του f-AHP προσδιορίσθηκε μέσω του ίδιου πρωτοκόλλου που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση του μονήρους δυναμικού ενέργειας, δηλαδή μετά από την εφαρμογή ορθογώνιου παλμού ρεύματος διάρκειάς 3 – 10 ms, στο δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης των νευρώνων της ραχιαίας και της κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου. Το πλάτος του ταχέως μεταϋπερπολωτικού δυναμικού στους πυραμιδοειδείς νευρώνες του ιπποκαμπίου, υπολογίστηκε ως διαφορά του δυναμικού της μεμβράνης μεταξύ του ουδού του δυναμικού ενέργειας και της μέγιστης αρνητικής απόκλισης της κορυφής του μεταϋπερπολωτικού δυναμικού.

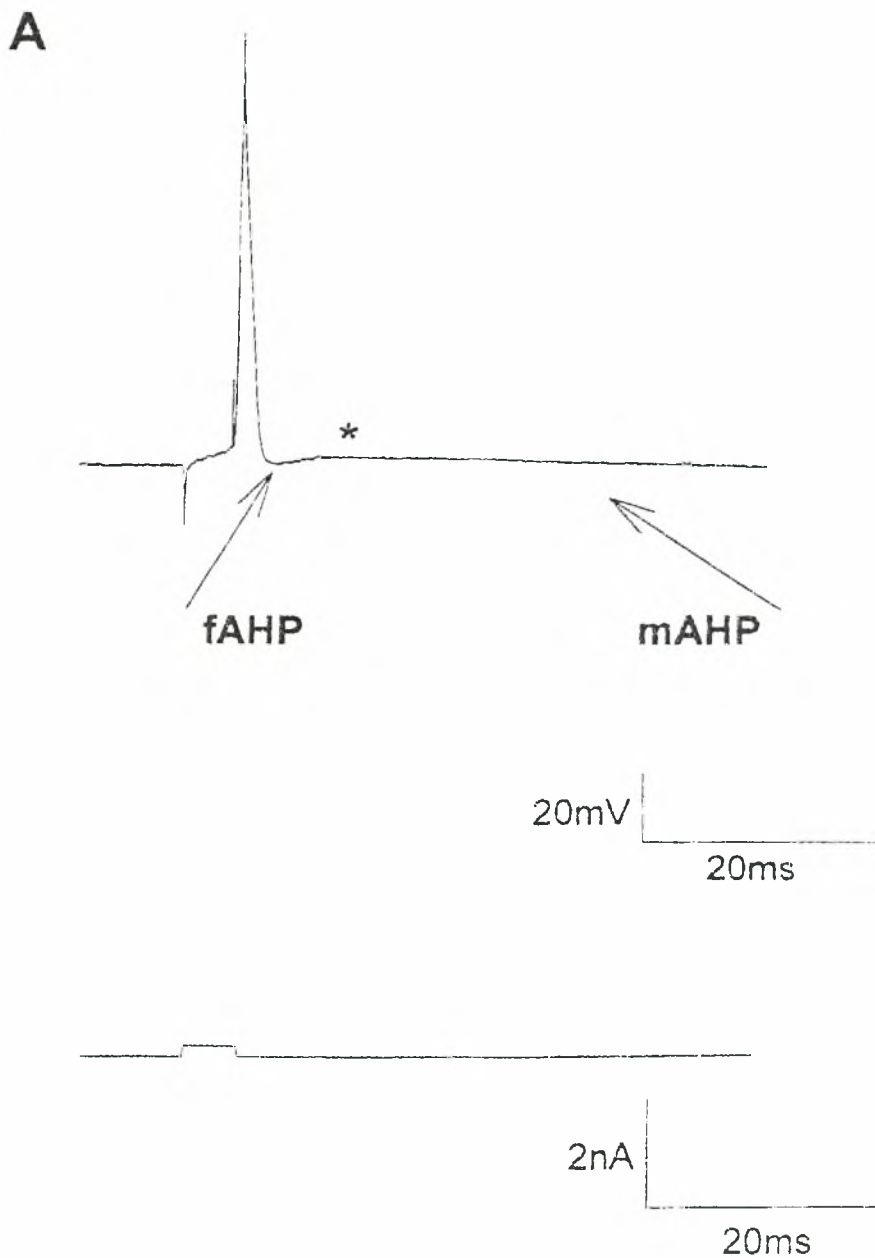
Μετρώντας στους πυραμιδοειδείς νευρώνες και στις δυο μοίρες της περιοχής CA1 του ιπποκαμπίου την πιο πάνω αναφερόμενη συνιστώσα διαπιστώθηκε ότι:

- ραχιαία μοίρα:  $-7,53 \pm 1,16$  mV, n = 16
- κοιλιακή μοίρα:  $-4,07 \pm 0,70$  mV, n = 12

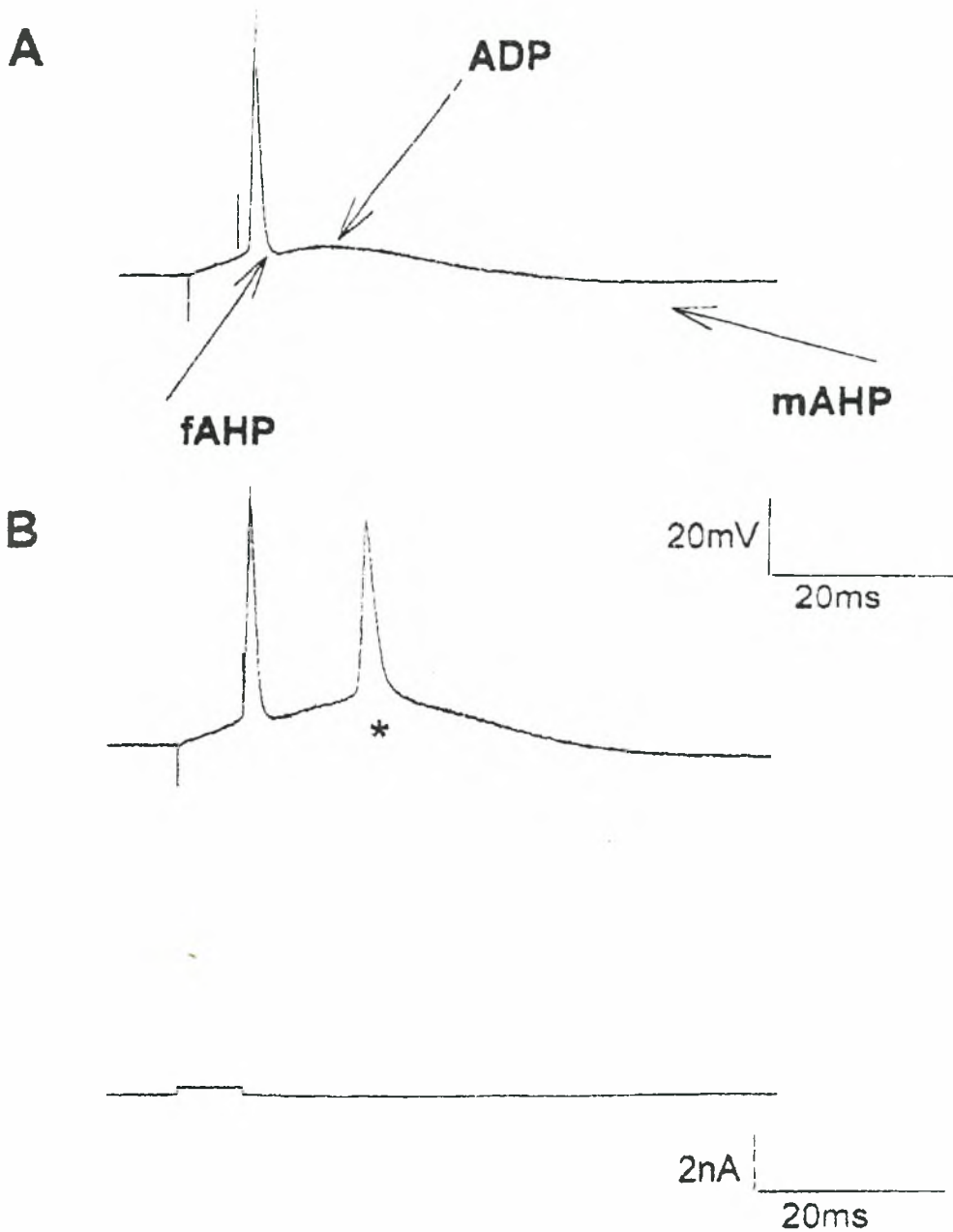
**p < 0,05**

Σύμφωνα με τα παραπάνω, το μικρότερο πλάτος του f-AHP νευρώνων της κοιλιακής μοίρας υποδηλώνει ότι η επαναπόλωση του δυναμικού ενέργειας είναι ταχύτερη και επομένως η πρόκληση επιπρόσθετων δυναμικών ενέργειας, είναι ευνοϊκότερη σε σχέση με τους νευρώνες της ραχιαίας μοίρας.



PAXIAIA MOIPA

Εικόνα 12. Μονήρες δυναμικό ενέργειας των νευρώνων της ραχιαίας μοίρας. Α. Το μονήρες δυναμικό ενέργειας ακολουθεί το μεγάλο πλάτους f-AHP και m-AHP. Το δυναμικό ενέργειας προκλήθηκε μετά από εκπολωτικό ορθογώνιο παλμό ρεύματος με διάρκεια 3 ms. Δυναμικό της μεμβράνης  $-65$  mV. Σημείωση: παρατηρείται έλλειψη του ADP (\*), βλέπε σελίδα 56).

ΚΟΙΛΙΑΚΗ ΜΟΙΡΑ

Εικόνα 13. Μονήρες δυναμικό ενέργειας των νευρώνων της κοιλιακής μοίρας. Α. Το μονήρες δυναμικό ενέργειας ακολουθεί f-AHP, με μικρό πλάτος και στη συνέχεια ακολουθεί ένα ADP. Β. Εμφάνιση δεύτερου δυναμικού ενέργειας μετά από την εφαρμογή του ίδιου πλάτους ρεύματος. Δυναμικό της μεμβράνης  $-65$  mV.

## 2.4 Μεταεκπολωτικό δυναμικό (ADP)

Στους πυραμιδοειδείς νευρώνες του ιπποκάμπου έχει παρατηρηθεί η δημιουργία μεταεκπολωτικών δυναμικών (After depolarizing potential, ADP), τα οποία παρέχουν την παρατεταμένη σωματική εκπόλωση που απαιτείται για την έναρξη των πολλαπλών αιχμών (Jensen, et al., 1994; 1996; White, et al., 1989; Wong and Prince, 1981). Υπάρχουν μερικές διαφωνίες όσον αφορά τους ιοντικούς μηχανισμούς που ενέχονται στη δημιουργία του μεταεκπολωτικού δυναμικού. Μερικές μελέτες προτείνουν την ενεργοποίηση των ιοντικών διαύλων που σχετίζονται με το  $I_{Na,p}$  (Azouz et al., 1996), ενώ άλλες θεωρούν ως σημαντικότερη την ενεργοποίηση των διαύλων που σχετίζονται με το  $I_T$  (Andreasen and Lambert, 1995; Hoffman et al., 1997; Traub et al., 1993; White et al., 1989; Wong and Prince, 1981). Πράγματι, μετά από φαρμακολογικό αποκλεισμό της εισόδου των ιόντων ασβεστίου στον νευρώνα με  $Mn^{2+}$  παρατηρήθηκε μείωση αυτού του μεταεκπολωτικού δυναμικού (Storm, 1986).

Για τη σύγκριση του ADP μεταξύ νευρώνων της ραχιαίας και της κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου έγινε προσδιορισμός τριών παραμέτρων (πλάτος, εμβαδόν και διάρκεια του ADP), χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικές προσεγγίσεις οι οποίες αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία (Hailing et al., 2001):

### 1. Μέθοδος της Βασικής Γραμμής (Εικόνα 14)

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή ορίσθηκε ως

- α. πλάτος του ADP η απόσταση μεταξύ της βασικής γραμμής και της μέγιστης τιμής της εκπόλωσης που έπεται του f-AHP
- β. εμβαδόν του ADP η επιφάνεια που ορίζεται κάτω από την καμπύλη εκπόλωσης, τους οδηγούς 1 και 2 και τη βασική γραμμή
- γ. διάρκεια του ADP ο χρόνος μεταξύ των οδηγών 1 και 2. Ο οδηγός 1 τοποθετήθηκε στο μέγιστο πλάτος του f-AHP και ο οδηγός 2 στο σημείο σύγκλισης της βασικής γραμμής με την κυματομορφή.

### 2. Μέθοδος του Υποουδού (Εικόνα 14)

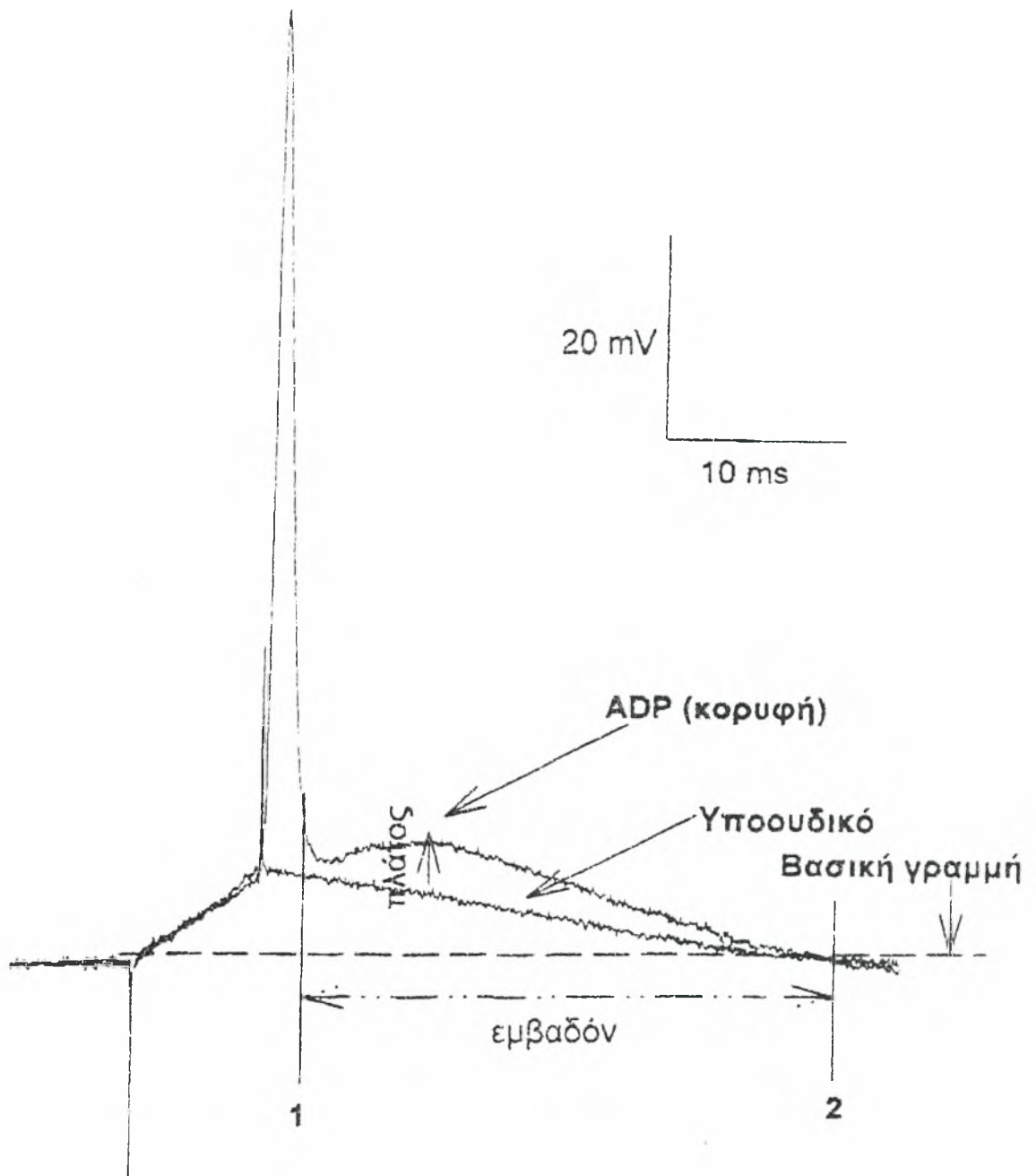
Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή ορίσθηκε ως

- α. πλάτος του ADP η μέγιστη απόσταση της υποουδικής από την ουδική κυματομορφή
- β. εμβαδόν η επιφάνεια μεταξύ της υποουδικής και ουδικής κυματομορφής που ορίζεται από τους οδηγούς 1 και 2
- γ. διάρκεια ο χρόνος μεταξύ των οδηγών 1 και 2

<b>ΠΛΑΤΟΣ</b>	<b>ΕΜΒΑΔΟΝ</b>	<b>ΔΙΑΡΚΕΙΑ</b>
<b>ΜΕΘΟΔΟΣ ΒΑΣΙΚΗΣ ΓΡΑΜΜΗΣ</b>		
<b>ΡΑΧΙΑΙΟΣ n = 18</b>		
9,09 ± 0,67mV	144,67 ± 11,79mV/ms	37,17 ± 2,41ms
<b>ΚΟΙΛΙΑΚΟΣ n = 12</b>		
9,61 ± 0,54 mV	146,94 ± 15,34 mV/ms	34,28 ± 2,41 ms
<b>ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕ ΥΠΟΥΥΔΟ</b>		
<b>ΡΑΧΙΑΙΟΣ n = 18</b>		
8,76 ± 0,51 mV	137,84 ± 11,73mV/ms	25,59 ± 1,65ms
<b>ΚΟΙΛΙΑΚΗ n = 12</b>		
9,77 ± 0,58 mV	147,28 ± 15,55mV/ms	24,47 ± 2,06ms

Πίνακας 4: Στοιχεία των μεταεκπολυτικών δυναμικών και με τις δυο μεθόδους. Για όλες τις μετρήσεις ισχύει ( $p > 0,05$ ).

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, καμμία παράμετρος που αφορά το ADP δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική. Επομένως, η διερεύνηση της ύπαρξης διαφορών μεταξύ των παραμέτρων του μεταεκπολυτικού δυναμικού (ADP) στους νευρώνες των δύο μοιρών του ιπποκάμπου, είχε ως αποτέλεσμα τον αποκλεισμό της πιθανής συμμετοχής του στην αναφερόμενη στη βιβλιογραφία αυξημένη διεγερσιμότητα των νευρώνων της κοιλιακής μούρας.



Εικόνα 14. Υπολογισμός των παραμέτρων του ADP. Μέθοδος της βασικής γραμμής (διακεκομμένη γραμμή) και του υποουδικού (υποουδική κυματομορφή).

## 2.5 Ιδιότητες των επαναλαμβανόμενων εκφορτίσεων

Υπάρχουν δύο θεμελιώδεις τρόποι πυροδοτήσης δυναμικών ενέργειας:

- α. επαναλαμβανόμενες εκφορτίσεις (repetitive firing)
- β. ριπές (bursts)

Αλλαγή από τον έναν τρόπο στον άλλο μπορεί δραστικά να τροποποιήσει τα εισερχόμενα σήματα. Αναφέρεται στην βιβλιογραφία ότι σε *in vivo* πειράματα οι πυραμιδοειδείς νευρώνες του ιπποκάμπου πυροδοτούν υψηλής συχνότητας ριπές (Kandel and Spencer 1961; Ranck and Feder 1973; Pavlides and Winson 1989; Ylinen et al., 1995). Θεωρείται δε ότι οι ριπές είναι περισσότερο σημαντικοί πληροφοριοδότες απότι η εκφόρτιση των νευρώνων με επαναλαμβανόμενα δυναμικά ενέργειας (Lisman, 1997). Οι μηχανισμοί οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την πυροδότηση δυναμικών ενέργειας με επαναλαμβανόμενες εκφορτίσεις και ριπές έχουν διερευνηθεί εκτεταμένα στην περιοχή CA1 της ραχιαίας μοίρας του ιπποκάμπου (Klein et al., 1980; Madison and Nicoll, 1984; Adams and Galvan, 1986). **Παρόλα αυτά, παραμένει εντελώς ανεξερεύνητος ο τρόπος πυροδότησης δυναμικών ενέργειας στην κοιλιακή μοίρα.**

Στην διάρκεια της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν ενδοκυττάρειες τεχνικές καταγραφής από τους πυραμιδοειδείς νευρώνες της περιοχής CA1 των δύο μοιρών του ιπποκάμπου με στόχο την **σύγκριση** της ανταπόκρισης τους μετά από εφαρμογή μακράς διάρκειας εκπολωτικού παλμού σε πυραμιδοειδείς νευρώνες της περιοχής CA1 της **ραχιαίας και κοιλιακής μοίρας** του ιπποκάμπου. Για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκαν ορθογώνιοι εκπολωτικοί παλμοί αυξανόμενου πλάτους από 0,05 nA έως και 1,0 nA και διάρκειας 500 ms.

Όταν οι πυραμιδοειδείς νευρώνες της περιοχής CA1 διεγείρονται δια μέσου εφαρμογής μακράς διάρκειας εκπολωτικού παλμού 500 ms ανταποκρίνονται με πολλαπλά δυναμικά ενέργειας τα οποία παύουν μετά από 200-300 ms. Το χαρακτηριστικό αυτό στοιχείο των πυραμιδοειδών νευρώνων του ιπποκάμπου ονομάζεται εξοικείωση. Αντίθετα, υπάρχουν και νευρώνες οι οποίοι ανταποκρίνονται με πολλαπλά δυναμικά ενέργειας καθόλη τη διάρκεια του εκπολωτικού παλμού (μη- εξοικείωση). Στην παρούσα διατριβή

μελετήθηκε κατά πόσο οι πυραμιδοειδείς νευρώνες της περιοχής CA1 των δύο μοιρών του ιπποκάμπτου εξοικειώνονται ή μη στη εφαρμογή εκπολωτικού ορθογώνιου παλμού και έγινε σύγκριση μεταξύ των δύο περιοχών του ιπποκάμπτου.

Εξετάστηκαν συνολικά  $n = 41$  πυραμιδοειδείς νευρώνες του ιπποκάμπτου της περιοχής CA1:

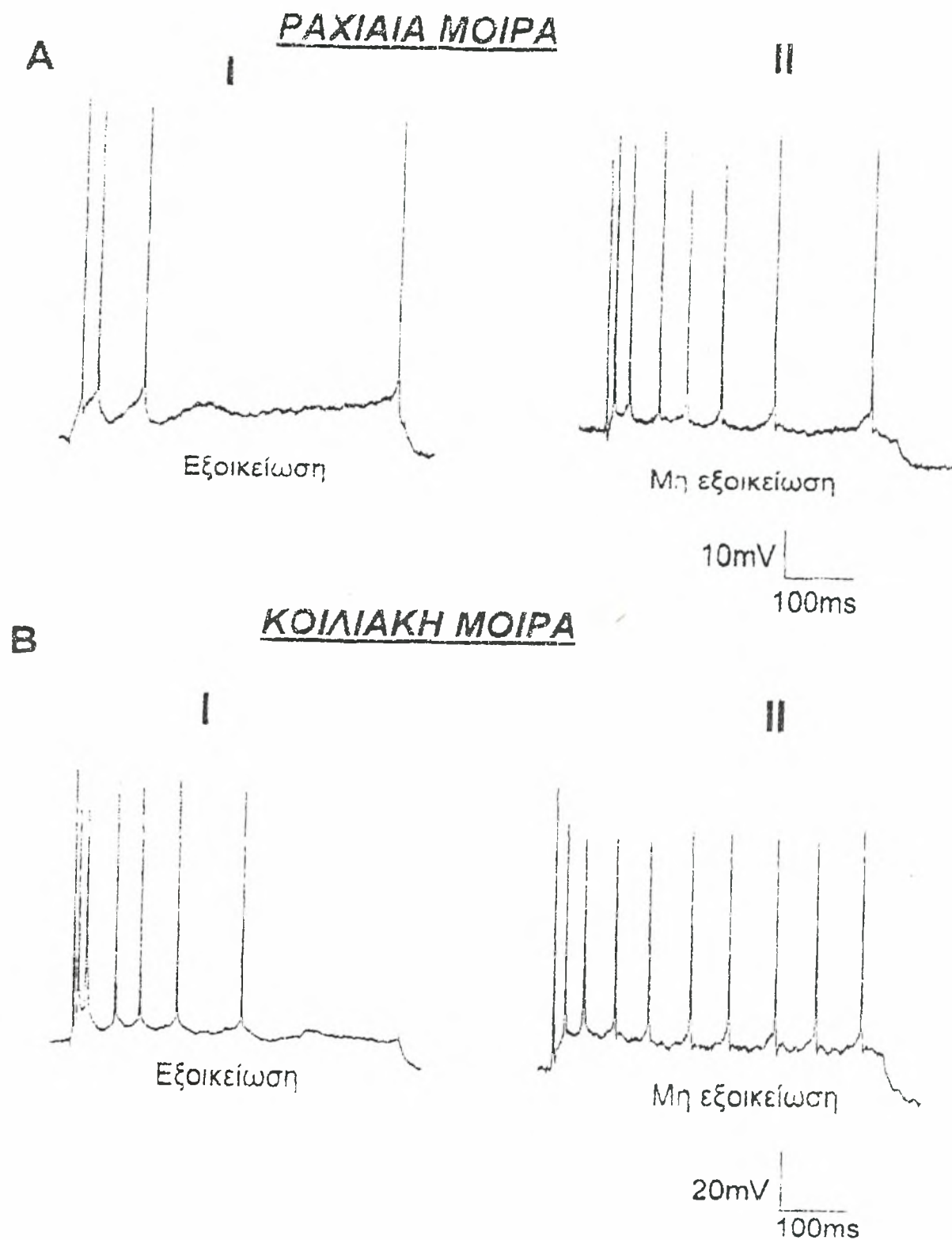
- από τους 26 νευρώνες του **ραχιαίου** ιπποκάμπτου οι 16 νευρώνες παρουσίασαν εξοικείωση μετά από εφαρμογή εκπολωτικού ρεύματος και αυτός ο αριθμός αντιπροσωπεύει το 61% των πυραμιδοειδών νευρώνων του ραχιαίου ιπποκάμπτου. Το 39% ( $n = 10$ ) των νευρώνων δεν παρουσίασαν εξοικείωση μετά από εφαρμογή του ίδιου εκπολωτικού ρεύματος (Εικόνα 15 A I και II).
- από τους 15 νευρώνες του **κοιλιακού** ιπποκάμπτου οι 9 νευρώνες παρουσίασαν εξοικείωση μετά από εφαρμογή εκπολωτικού ρεύματος και αυτός ο αριθμός αντιπροσωπεύει το 60% όλων των πυραμιδοειδών νευρώνων του κοιλιακού ιπποκάμπτου. Το 40% ( $n = 6$ ) των νευρώνων δεν παρουσίασαν εξοικείωση μετά από εφαρμογή του ίδιου εκπολωτικού ρεύματος (Εικόνα 15 B I και II).

Δείξαμε λοιπόν ότι οι πυραμιδοειδείς νευρώνες της περιοχής CA1 του ιπποκάμπτου ανταποκρίνονται στους ορθογώνιους παλμούς ρεύματος με μία αρχική εκφόρτιση δυναμικών ενέργειας, πολλές φορές ακολουθούμενη από μία περίοδο ηρεμίας. Αυξάνοντας το πλάτος του εκπολωτικού ρεύματος αυξάνεται ο αριθμός των εμφανιζόμενων δυναμικών ενέργειας των πυραμιδοειδών νευρώνων των δύο μοιρών του ιπποκάμπτου (Madison, 1983), (Εικόνα. 16). Παρατηρήθηκε ότι οι νευρώνες της κοιλιακής μοίρας παρουσίαζαν αυξημένο ρυθμό πυροδότησης σε σχέση με τους νευρώνες της ραχιαίας μοίρας. Με σκοπό την ποσοτικοποίηση αυτού του φαινομένου υπολογίσαμε τον αριθμό των δυναμικών ενέργειας όλων των νευρώνων των δύο μοιρών του ιπποκάμπτου (εξοικειούμενων και μη) κατά τη διάρκεια του παλμού μετά από εφαρμογή όλων των προαναφερθέντων πλατών ρεύματος.

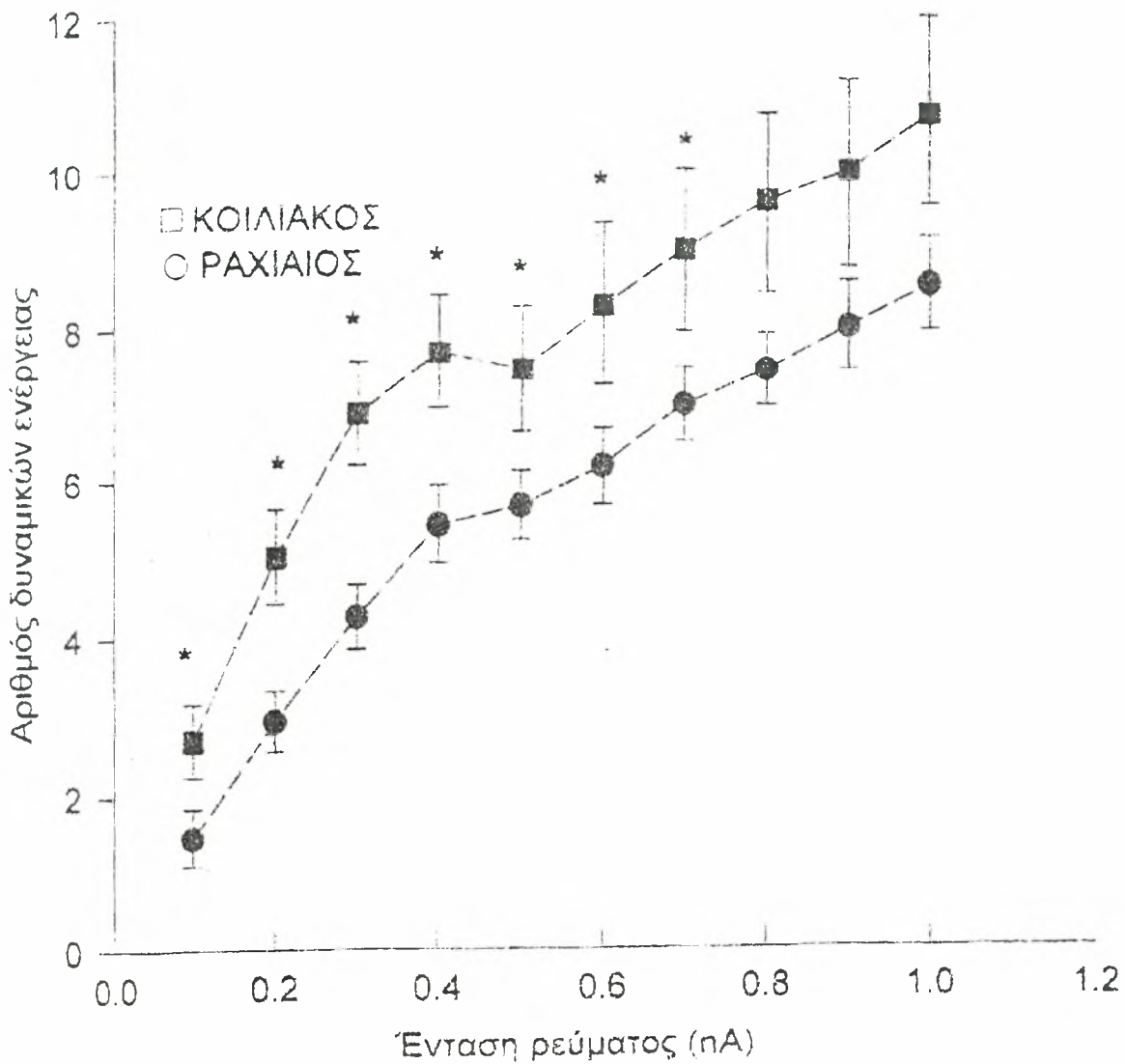
Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των νευρώνων των δύο μοιρών του ιπποκάμπου όσο αφορά τον αριθμό των εμφανιζομένων δυναμικών ενέργειας κατά τη διάρκεια του παλμού. Συγκεκριμένα, βρέθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στα πλάτη 0,05 nA έως και 0,07 nA, ενώ στα υπόλοιπα πλάτη η διαφορά δεν ήταν στατιστικώς σημαντική. Ο αυξημένος αριθμός των δυναμικών ενέργειας που παρατηρήθηκε στους νευρώνες της κοιλιακής μοίρας υποδηλώνει την **μεγαλύτερη διεγερσιμότητα των νευρώνων της κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου.**

Αναφέρεται στην βιβλιογραφία ότι στους υποδοχείς τάσης των οστρακοειδών (crustacean stretch receptors) η εξοικείωση των νευρώνων αυξάνεται δια μέσου ενδοκυττάριας έγχυσης ασβεστίου και μειώνεται δια μέσου παραγόντων οι οποίοι αναστέλλουν τους διαύλους καλίου ή την αύξηση του ενδοκυττάριας ασβεστίου (Ottoson and Swerup, 1981,1982). Αυτό σημαίνει ότι η εξοικείωση εξαρτάται από τη συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου ή την ενεργοποίηση ασβεστοελεγχόμενων διαύλων καλίου. Πράγματι, αναφέρεται από ερευνητές ότι οι ασβεστοενεργοποιημένοι δίαυλοι  $K^+$ ,  $I_{AHP}$ , ίσως συνεισφέρουν στην εξοικείωση των δυναμικών ενέργειας μετά την εφαρμογή του ρεύματος (Meech, 1978; Partridge, 1982). Αυτοί οι δίαυλοι ενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια παρατεταμένης εκπόλωσης και παραμένουν ενεργοποιημένοι καθόλη τη διάρκεια του εκπολωτικού παλμού επηρεάζοντας έτσι την εκφόρτιση των δυναμικών ενέργειας. Κατά συνέπεια η αναστολή αυτού του ρεύματος έχει σαν αποτέλεσμα αύξηση της συχνότητας της εκφόρτισης του νευρώνα. Επομένως, η αυξημένη πυροδότηση που παρατηρήθηκε στους νευρώνες της κοιλιακής μοίρας πιθανόν να οφείλεται σε μειωμένο  $I_{AHP}$ . Για να γίνει αποδεκτή η συμμετοχή του  $I_{AHP}$  στην εξοικείωση των δυναμικών ενέργειας μετά από την εφαρμογή του ρεύματος, μετρήθηκε το πλάτος των βραδέων μεταϋπερπολωτικών δυναμικών στους νευρώνες των δύο μοιρών του ιπποκάμπου. Διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά του πλάτους του s-AHP στους νευρώνες της ραχιαίας  $-7,9 \pm 0,9$  mV, ( $n = 29$ ) και της κοιλιακής  $-5,7 \pm 0,6$  mV, ( $n = 25$ ) μοίρας του ιπποκάμπου ( $p < 0,05$ ).





Εικόνα 15 Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα της εξοικείωσης (I) και της μη εξοικείωσης (II) των νευρώνων της ραχιαίας (A) και της κοιλιακής (B) μείρας του ιπποκάμπτου. Εφαρμόσθηκε καθαρικός ορθογώνιος παλμός ρεύματος με την ένταση 0.4 nA, διάρκειας 500 ms. Η τιμή του δυναμικού μεμβράνης ήταν περίπου -64 mV.

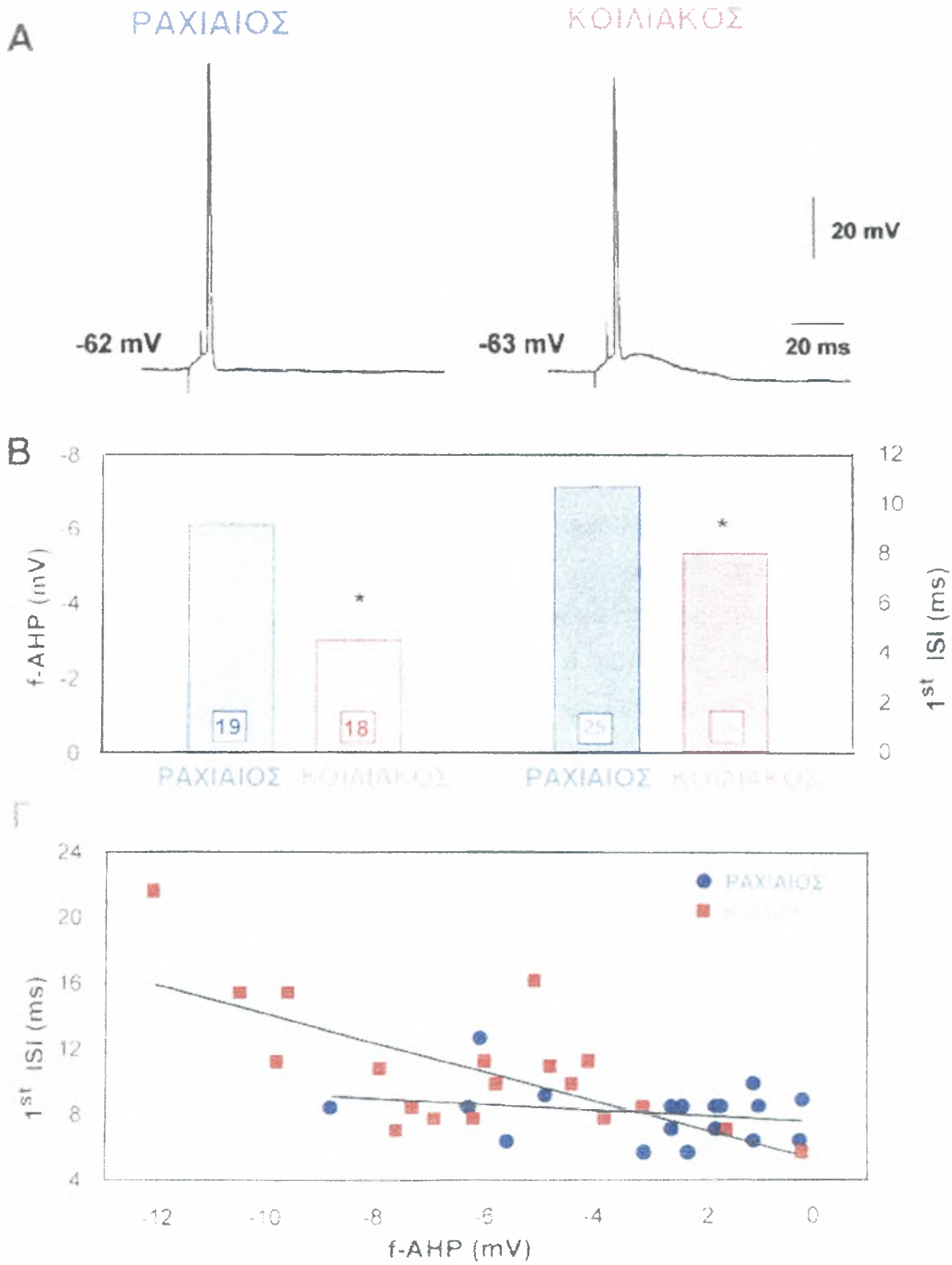


\*  $p < 0.05$  (κοιλιακή - ραχιαία)

Εικόνα16. Γραφική παράσταση του αριθμού των εμφανιζόμενων δυναμικών ενέργειας στη διάρκεια του ορθογώνιου παλμού με το αυξανόμενο πλάτος του ρεύματος που εφαρμόσθηκε στους πυραμιδοειδείς νευρώνες των δύο μοιρών της περιοχής CA1 του ιπποκάμπτου.

Μία άλλη ένδειξη της διεγερσιμότητας των νευρώνων αποτελεί το μεσοδιάστημα μεταξύ των δυναμικών ενέργειας (interspike interval, ISI). Συγκεκριμένα θεωρείται ότι η ελάττωση του ISI έχει ως επακόλουθο την αυξημένη εκφόρτιση των δυναμικών ενέργειας. Ακολουθώντας το σκεπτικό αυτό υπολογίσθηκε στις δύο μοίρες του ιπποκάμπου το ISI μετά από την εφαρμογή ορθογώνιου παλμού ρεύματος πλάτους 0,4 nA. Διαπιστώθηκε, ότι υπήρχε διαφορά στατιστικώς σημαντική μεταξύ της ραχιαίας ( $1^{\text{st}}$  ISI =  $4,9 \pm 0,34$  ms;  $n = 25$ ) και της κοιλιακής ( $1^{\text{st}}$  ISI =  $3,9 \pm 0,3$  ms;  $n = 15$ ;  $p < 0,05$ ) μοίρας της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου (Εικόνα 17). Το γεγονός του μειώμενου  $1^{\text{st}}$  ISI στους νευρώνες της κοιλιακής μοίρας σχετίζεται πιθανώς με το μικρό πλάτος του f-AHP όπως προαναφέρθηκε.

Πράγματι, αναφέρεται στη βιβλιογραφία ότι ελαττωμένη διεγερσιμότητα παρατηρείται σε νευρώνες με μεγάλο ISI και μεγάλο πλάτος του f-AHP (Emri et al., 2002; Sah, 1999). Τα παραπάνω αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι πυραμιδοειδείς νευρώνες της κοιλιακής μοίρας εμφανίζουν μεγαλύτερη διεγερσιμότητα από τους νευρώνες της ραχιαίας μοίρας της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου.



Εικόνα 17. Οι γραφικές παραστάσεις του 1<sup>st</sup> ISI των πυραμιδοειδών νευρώνων της ραχιαίας μοίρας και της κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου σε σχέση με το πλάτος των f-AHP των δυο μοιρών.

### 3. Μετασυναπτικά δυναμικά

Οι πληροφορίες τις οποίες μεταφέρει ένας νευρώνας είναι κωδικοποιημένες σε ηλεκτρικά σήματα που διατρέχουν τον νευράξονα και τη φθάνουν στη νευρική απόληξη. Στη σύναψη τα σήματα αυτά μεταφέρονται στην άλλη πλευρά της συναπτικής σχισμής από έναν ή περισσότερους χημικούς αγγελιοφόρους. Οι χημικοί αγγελιοφόροι, οι διαβιβαστές, είναι ουσίες που απελευθερώνονται από έναν νευρώνα σε μια σύναψη και που επηρεάζουν ένα άλλο κύτταρο, είτε έναν νευρώνα με συγκεκριμένο τρόπο.

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

1. Το γλουταμικό οξύ: απελευθερώνεται από τις συναπτικές απολήξεις των παράπλευρων Schaffer, διεγείρει αμφοτέρους τους πυραμιδοειδείς νευρώνες στην περιοχή CA1 και τους GABAεργικούς ανασταλτικούς ενδονευρώνες.

2. Το GABA: ο ανασταλτικός διαβιβαστής στους πυραμιδοειδείς νευρώνες του ιπποκάμπου. Το GABA απελευθερώνεται από τους ανασταλτικούς ενδονευρώνες διαμεσολαβεί ένα διφασικό IPSP ενεργοποιώντας τους GABA<sub>A</sub> και GABA<sub>B</sub> υποδοχείς: οι υποδοχείς GABA<sub>A</sub> αποτελούν διαύλους διαπερατούς από το Cl<sup>-</sup>, ενώ οι υποδοχείς GABA<sub>B</sub> συζευγνύονται με πρωτεΐνες G, και είτε αυξάνουν τη διαπερατότητα σε ιόντα K<sup>+</sup> είτε αναστέλλουν τη λειτουργία των τασεοελεγχόμενων διαύλων Ca<sup>2+</sup>. Ο έλεγχος των διαύλων GABA<sub>A</sub> επιτρέπει την εισροή Cl<sup>-</sup> στο κύτταρο, με αποτέλεσμα την υπερπόλωση της μεμβράνης. Η διάνοση των διαύλων αυτών αυξάνει την αγωγιμότητα ηρεμίας και βραχυκυκλώνει κάθε διεγερτικό ρεύμα που εισρέει στο κύτταρο. Οι δίαυλοι GABA<sub>A</sub> είναι υπεύθυνοι για το ταχύ μετασυναπτικό ανασταλτικό δυναμικό (f-IPSP) και οι δίαυλοι GABA<sub>B</sub> για το βραδύ μετασυναπτικό ανασταλτικό δυναμικό (s-IPSP).

Ο διεγερτικός διαβιβαστής των πυραμιδοειδών νευρώνων του ιπποκάμπου είναι το γλουταμινικό οξύ. Έχουν περιγραφεί διάφορες κατηγορίες μετασυναπτικών υποδοχέων του γλουταμικού οξέος. Υποδοχείς

μη-NMDA (AMPA και KAINATE) οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για ταχεία πρώιμη αιχμή EPSP (Εικόνα 19). Ο δεύτερος τύπος υποδοχέα, ο υποδοχέας NMDA, σχηματίζει έναν διάυλο διαπερατό και από τα  $\text{Ca}^{2+}$  εκτός από τα  $\text{Na}^+$  και τα  $\text{K}^+$ . Στην κατάσταση ηρεμίας, το στόμιο του διαύλου αυτού φράσσεται από ενδοκυτταρικό  $\text{Mg}^{2+}$ , το οποίο απομακρύνεται όταν η μεμβράνη εκπολώνεται. Έτσι, για να ανοίξουν οι διάυλοι-υποδοχείς NMDA απαιτείται το γλουταμινικό και εκπόλωση. Λόγω της καθυστέρησης κατά το άνοιγμα η ροή ιόντων δια μέσου του διαύλου αυτού συμβάλλει στην ύστερη συνιστώσα του EPSP. Στο φυσιολογικό δυναμικό ηρεμίας, οι υποδοχείς μη-NMDA δημιουργούν την κυρίαρχη συνιστώσα του EPSP. Η ένταση με την οποία οι NMDA υποδοχείς συμβάλουν στη συναπτική απάντηση εξαρτάται σημαντικά από τις επικρατούσες συνθήκες οφειλόμενες στον μέσω του  $\text{Mg}^{2+}$  τασεοεξαρτώμενο αποκλεισμό των διαύλων NMDA.

Η εισροή ασβεστίου δια μέσου των διαύλων-υποδοχέων NMDA θεωρείται ότι προκαλεί την εκκίνηση κυτταρικών διεγέρσεων που παρεμβαίνουν σε ορισμένους τύπους μνήμης, καθώς και ορισμένων κυτταρικών διεγέρσεων που συμμετέχουν στην εκδήλωση εγκεφαλικών βλαβών.

Οι υποδοχείς NMDA ενεργοποιούνται από το ανάλογο αμινοξέος NMDA και η δράση τους αναστέλλεται από τη φαρμακευτική ουσία 2-αμινο-5-φωσφονοβαλερικό οξύ (APV). Οι υποδοχείς μη-NMDA ενεργοποιούνται από την φαρμακευτική ουσία α-αμινο-3-υδροξυ-5-μεθυλο-ισοξαζολο-πυροπυρροϊκό οξύ (AMPA), ενώ η δράση τους αναστέλλεται από την 6-κυανο-7-νιτροκινόξαλινο-2,3-διόνη (CNQX).

Στην διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκαν δυο σειρές πειραμάτων στους πυραμιδοειδείς νευρώνες των δύο μοιρών του ιπποκάμπου με σκοπό την μελέτη του f-IPSP:

- η πρώτη περιελάμβανε την καταγραφή των μετασυναπτικών δυναμικών που προκαλούνται μετά από διέγερση των παράπλευρων του Schaffer σε συνθήκες εμποτισμού του ιστού με φυσιολογικό TENEY

- στη δεύτερη πειραματική δοκιμασία χρησιμοποιήθηκε TENY το οποίο περιείχε τους ανταγωνιστικές ουσίες των μη-NMDA και NMDA υποδοχέων καθώς και των υποδοχέων GABA<sub>B</sub>

Η ένταση του υποουδικού ερεθισμού δια μέσου της ορθόδρομης διέγερσης των παράπλευρων του Schaffer στους πυραμιδοειδείς νευρώνες της περιοχής CA1 για την πρόκληση των πολυφασικών μετασυναπτικών δυναμικών (αποτελούμενα από τα διεγερτικά EPSPs, και τα ανασταλτικά f- και s-IPSPs), ήταν παρόμοια μεταξύ ραχιαίας  $11,7 \pm 2,1$  V και κοιλιακής μοίρας  $10,8 \pm 2,6$  V.

Το πλάτος των διεγερτικών δυναμικών EPSPs που προκλήθηκαν στους πυραμιδοειδείς νευρώνες του ιπποκάμπου ήταν παρόμοιο και στις δύο μοίρες: ραχιαία  $6.2 \pm 1.5$  mV, (n=11), κοιλιακή  $7.8 \pm 2.5$  mV, (n=7). Ωστόσο, η μέγιστη τιμή του πλάτους των μετασυναπτικών ανασταλτικών δυναμικών του (f- και του s-IPSP) βρέθηκε σημαντικά μικρότερη στους νευρώνες της κοιλιακής σε σύγκριση με τους νευρώνες της ραχιαίας μοίρας, οι τιμές τους είναι οι εξής: ραχιαία f-IPSP  $11,2 \pm 1,1$  mV; s-IPSP  $10,1 \pm 0,9$  mV (n = 11), κοιλιακή f-IPSP  $5,2 \pm 0,6$  mV; s-IPSP  $6,5 \pm 1,3$  mV (n = 13) (Εικόνα 20).

Κατά τη διάρκεια της εφαρμογής των παραπάνω ανταγωνιστών μετρήθηκαν δύο επιπλέον παράμετροι f-IPSP:

α. διάρκεια του f-IPSP στο ήμισυ του μέγιστου πλάτους

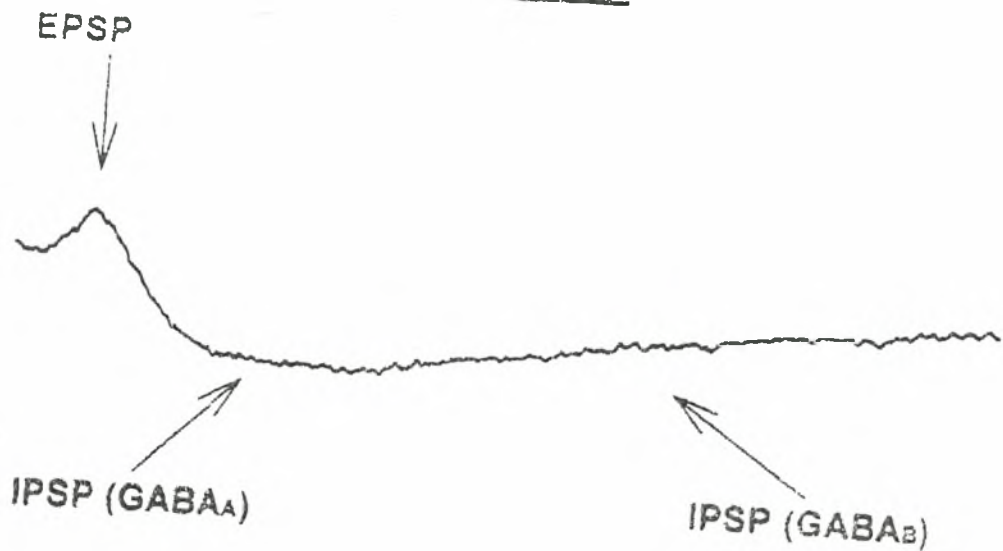
β. μέγιστη τιμή του χρόνου καθόδου (δηλαδή του χρόνου μεταξύ του σημείου του f-IPSP και του μέγιστου πλάτους του)

Το μέγιστο πλάτος και η διάρκεια του ημι-μέγιστου πλάτους f-IPSP βρέθηκε σημαντικά μικρότερη στους νευρώνες της κοιλιακής μοίρας σε σύγκριση με τους νευρώνες της ραχιαίας μοίρας: ραχιαία  $12,3 \pm 0,6$  mV;  $105,0 \pm 10,1$  ms (n = 11) και κοιλιακή  $9,7 \pm 0,7$  mV;  $54,8 \pm 5,8$  ms (n = 11) (Εικόνα 20, δεξιά). Ο χρόνος καθόδου ήταν ανάλογα μικρότερος στους νευρώνες της κοιλιακής  $20,8 \pm 1,6$  ms (n = 10) και ραχιαίας  $18,2 \pm 2,1$  ms (n= 11) μοίρας, αλλά δεν βρέθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά.

A

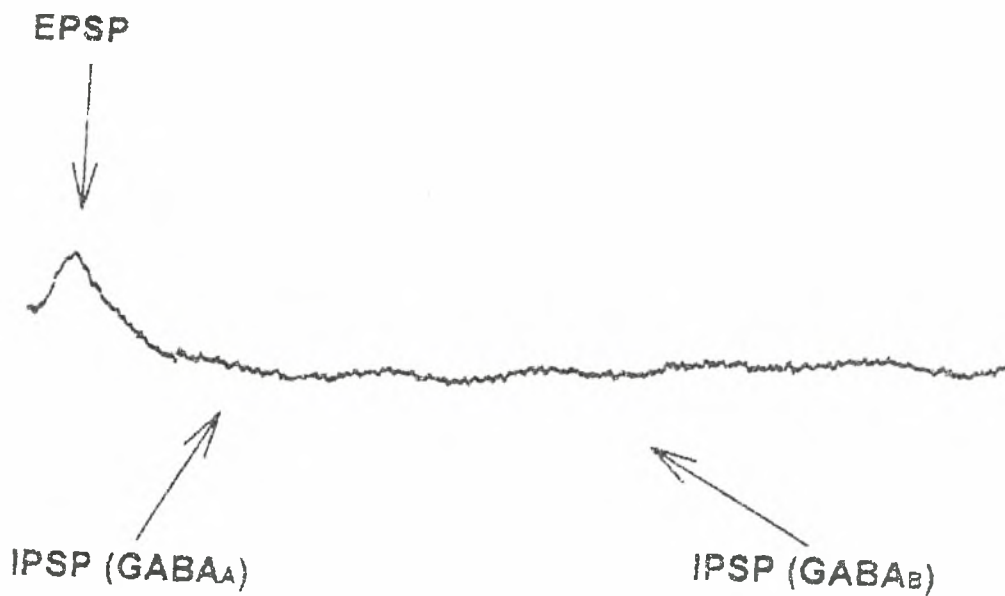
PAXIAIA MOIPA

68



10 mV  
20 ms

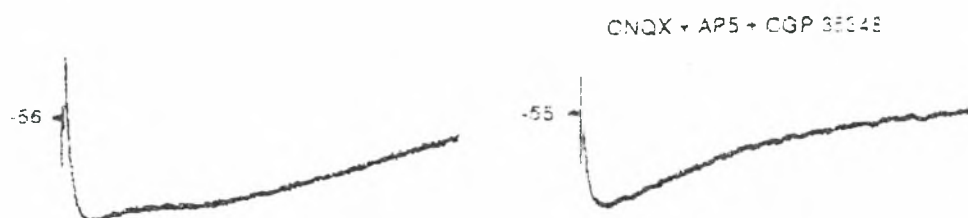
B

KOILIAKH MOIPA

Εικόνα 19. Μετασυναπτικά δυναμικά που καταγράφονται μετά από διέγερση των παράπλευρων ιών Schaffer στις δύο μοίρες της CA1 περιοχής. Α. Ραχιαία μοίρα: διεγερτικά (EPSPs) και ανασταλτικά δυναμικά (IPSPs). Β. Κοιλιακή μοίρα: μετασυναπτικά διεγερτικά δυναμικά (EPSPs) και τα ανασταλτικά δυναμικά.



## PAXIAIA MOIPA



## KOILIAKH MOIPA



Εικόνα 20. Μετασυναπτική μειωμένη αναστολή στους πυραμιδοειδείς νευρώνες της περιοχής CA1 στις τομές της κοιλιακής μοίρας σε σύγκριση με τους νευρώνες της ραχιαίας μοίρας. Καταγραφές (υπολογιζόμενες κατά μέσο όρο από 4-5 κυματομορφές) σε φυσιολογικό TBNY (αριστερά) και με την παρουσία των φαρμάκων (ανταγωνιστών των διεγερτικών υποδοχέων και των υποδοχέων GABA<sub>A</sub>, δεξιά).

## **4. Μορφολογία των πυραμιδοειδών νευρώνων**

Αναφέρεται ότι η CA1 περιοχή του ιπποκάμπου χωρίζεται σε τρεις υποπεριοχές (CA1a, CA1b και CA1c) οι οποίες αποτελούνται από πυραμιδοειδείς νευρώνες με διαφορετική για κάθε περιοχή ηλεκτροφυσιολογική συμπεριφορά (Masukawa et al., 1982). Συγκεκριμένα, οι πυραμιδοειδείς νευρώνες της περιοχής CA1b απαντούν σε εισερχόμενα ερεθίσματα μόνο με επαναλαμβανόμενες εκφορτίσεις, ενώ αντίθετα, οι νευρώνες των περιοχών CA1a και CA1c μπορούν να απαντήσουν και με ριπές (Masukawa et al. 1982). Ένα επιπλέον στοιχείο που μπορεί να εξηγήσει τη διαφοροποίηση στο είδος των εκφορτίσεων (επαναλαμβανόμενες εκφορτίσεις - ριπές) που καταγράφονται από την πυραμιδική στοιβάδα της CA1 περιοχής, είναι το γεγονός ότι 10% των νευρώνων της στοιβάδας αυτής είναι καλαθοειδή κύτταρα (basket cells), των οποίων η ηλεκτροφυσιολογική δραστηριότητα διαφέρει από αυτή των πυραμιδοειδών νευρώνων (Aika et al., 1994; Woodson et al., 1989).

Προκειμένου, λοιπόν, να γίνει σύγκριση των πυραμιδοειδών νευρώνων της ραχιαίας και της κοιλιακής μοίρας όσον αφορά τη διεγερσιμότητα τους καθίσταται απαραίτητη η πιστοποίηση αφενός της επακριβούς θέσης καταγραφής κατά μήκος της CA1 πυραμιδικής στοιβάδας και αφετέρου η φύση (πυραμιδοειδείς νευρώνας/ενδονευρώνας) του καταγραφόμενου νευρώνα.

Οι κύριοι νευρώνες του ιπποκάμπου είναι οι πυραμιδοειδείς νευρώνες και αποτελούν την πολυπληθέστερη κατηγορία νευρώνων στον ιππόκαμπο. Οι πυραμιδοειδείς νευρώνες του ιπποκάμπου είναι όμοιοι στο σχήμα με τους αντίστοιχους του φλοιού, αν και λίγο μικρότεροι όσον αφορά το εμβαδόν του κυτταρικού σώματος. Τα σώματα των πυραμιδοειδών νευρώνων είναι ταξινομημένα στη πυραμιδική στοιβάδα. Η πυραμιδική στοιβάδα σχηματίζει μία καμπυλωτή επιφάνεια, η οποία έχει πάχος μόνο δύο-τριών πυραμιδοειδών νευρώνων. Τα σώματα των νευρώνων αυτής της στοιβάδας έχουν κωνικό (πυραμιδοειδές) σχήμα, 20-40 μm στη βάση και 40-60 μm στο ύψος. Ο κάθε ένας νευρώνας έχει ένα παχύ κορυφαίο δένδριτη, με διάμετρο 5-10 μm, ο οποίος διαπερνά την

ακτινωτή στοιβάδα (Shepherd, 1990). Υπάρχουν επίσης αρκετοί βασικοί δενδρίτες, με διάμετρο 3-6  $\mu\text{m}$ , οι οποίοι διακλαδίζονται σε επιφάνεια μεγαλύτερη από 200-300  $\mu\text{m}$  συμμετέχοντας στο σχηματισμό της στοιβάδας των πολύμορφων κυττάρων. Οι κορυφαίοι εγγύς και οι άπω δενδρίτες καλύπτονται από μεγάλο αριθμό ακάνθων.

Η μορφολογία των πυραμιδοειδών νευρώνων ποικίλει βαθμιαία εντός του ιπποκαμπειαίου σχηματισμού. Ξεκινώντας την πορεία από την περιοχή CA3 στην περιοχή CA1, τα σώματα των νευρώνων μικραίνουν και οι κορυφαίοι δενδρίτες επιμηκύνονται, λεπταίνουν και γίνεται πιο συμμετρικό το σχήμα των διακλαδώσεων τους. Οι νευρώνες της περιοχής CA3 μερικές φορές ονομάζονται γιγαντιαίοι πυραμιδοειδείς νευρώνες (Shepherd, 1990).

Στην περιοχή CA1 μαζί με τους πυραμιδοειδείς νευρώνες, έχουν αναγνωρισθεί πολλοί τύποι ενδονευρώνων:

α. ένα είδος ενδονευρώνων είναι οι καλάθοειδείς νευρώνες (basket cells) με σώματα με διάμετρο 15-30  $\mu\text{m}$  οι οποίοι δίνουν αρκετούς κοντούς, παχείς δενδρίτες, με σχετικά λίγες άκανθες,

β. επίσης έχουν αναγνωρισθεί εντός του ιπποκάμπου αρκετοί μη-πυραμιδοειδείς και μη-καλάθοειδείς νευρώνες. Σε αυτούς περιλαμβάνονται οι O/A (oriens-alveus) ενδονευρώνες, οι οποίοι εντοπίζονται στην περιοχή CA1 στα όρια της πολυμορφικής στοιβάδας και σκάφης, και οι L - M ενδονευρώνες στη βοθριώδη - μοριώδη στοιβάδα ( Zhong-Sheng, 1996). Το πλήθος των ενδονευρώνων είναι άγνωστο, αν και πιθανώς είναι κατά πολύ μικρότερο αυτού των πυραμιδοειδών νευρώνων.

Χρησιμοποιώντας ηλεκτρόδια γεμισμένα με βιοκυτίνη, έγινε ενδοκυτταρική ιοντοφόρηση του νευρώνα, επιτυγχάνοντας την ηλεκτροφυσιολογική ανάλυση του και παράλληλα, δια μέσου της οπτικοποίησης του, ο λεπτομερής μορφολογικό χαρακτηρισμός του.

Συνολικά 30 νευρώνες καταγράφηκαν εντός ή πλησίον της πυραμιδικής στοιβάδας της περιοχής CA1b ιπποκάμπου εκ των οποίων ανακτήθηκαν οι 12 νευρώνες και ταξινομήθηκαν ως πυραμιδοειδείς ή μη πυραμιδοειδείς νευρώνες. Οι ανακτηθέντες νευρώνες αναγνωρίστηκαν ως πυραμιδοειδείς νευρώνες εκτός από δύο περιπτώσεις των οποίων διέφερε η μορφολογία του σώματος και ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες. Αυτοί οι δύο

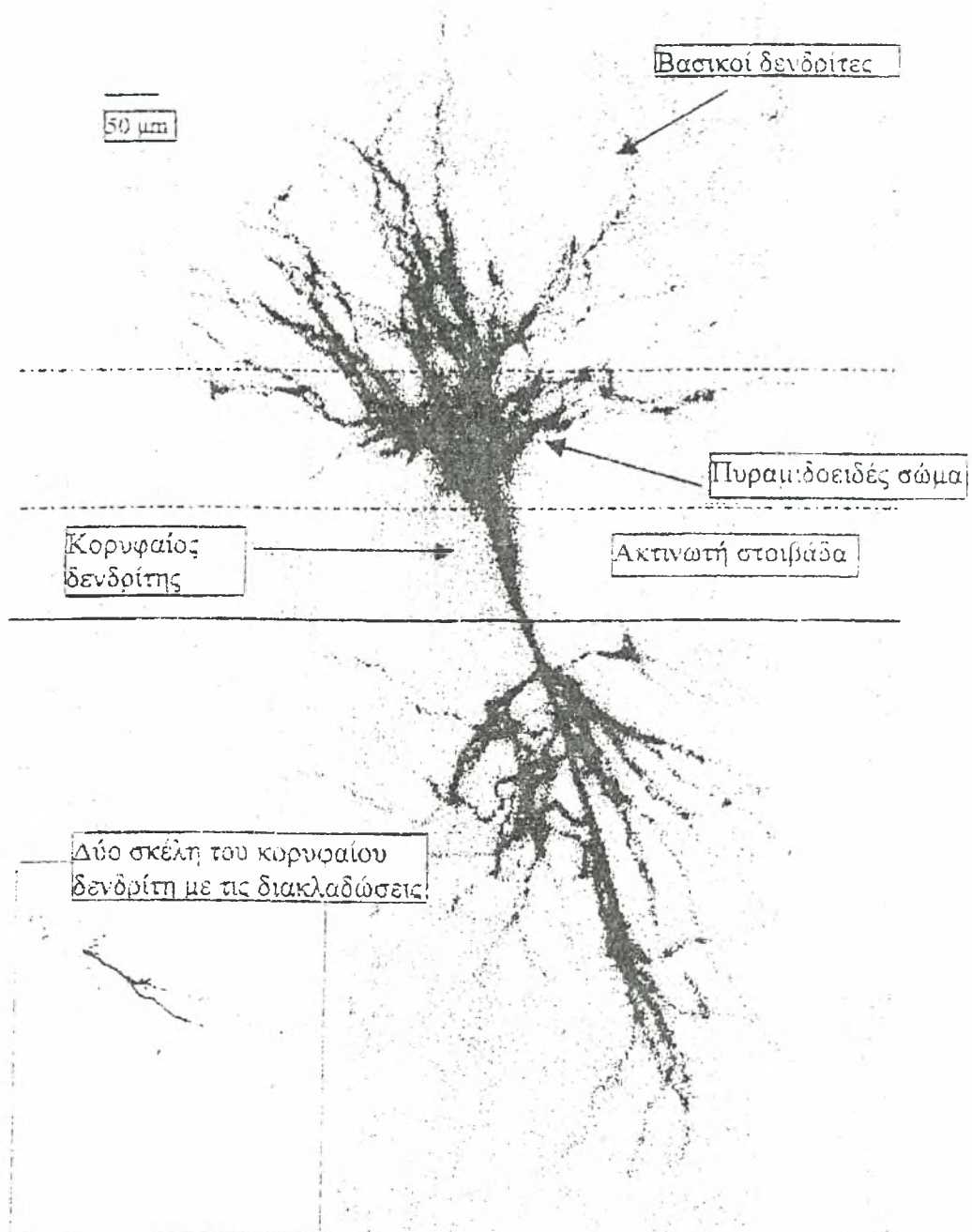
νευρώνες θεωρήθηκαν ενδονευρώνες με βάση τα ηλεκτροφυσιολογικά χαρακτηριστικά και συγκεκριμένα τη διάρκεια του ημιέυρους του μονήρους δυναμικού ενέργειας. Πράγματι, αναφέρεται στη βιβλιογραφία ότι η διάρκεια του ημιέυρους των μονήρων δυναμικών ενέργειας των πυραμιδοειδών νευρώνων είναι  $> 1.0$  ms ενώ των ενδονευρώνων είναι  $< 0.6$  ms (Zhong – Sheng, 1996).

Ποιοτικά και ποσοτικά οι δενδριτικές διακλαδώσεις ήταν όμοιες με εκείνες οι οποίες αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία (Amaral, et al, 1990; Ishizuka et al, 1995; Lorente de Nó, 1934).

Στους πυραμιδοειδείς νευρώνες της ραχιαίας μοίρας (Εικόνα 21) δεν παρατηρήθηκε διχοτόμηση του κορυφαίου δενδρίτη για τουλάχιστον 100  $\mu\text{m}$ . Αντίθετα, στους νευρώνες της κοιλιακής μοίρας σε δύο ή περισσότερα σκέλη παρόμοιας διάμετρο τα οποία διέτρεχαν την ακτινωτή στοιβάδα (Εικόνα 22) .

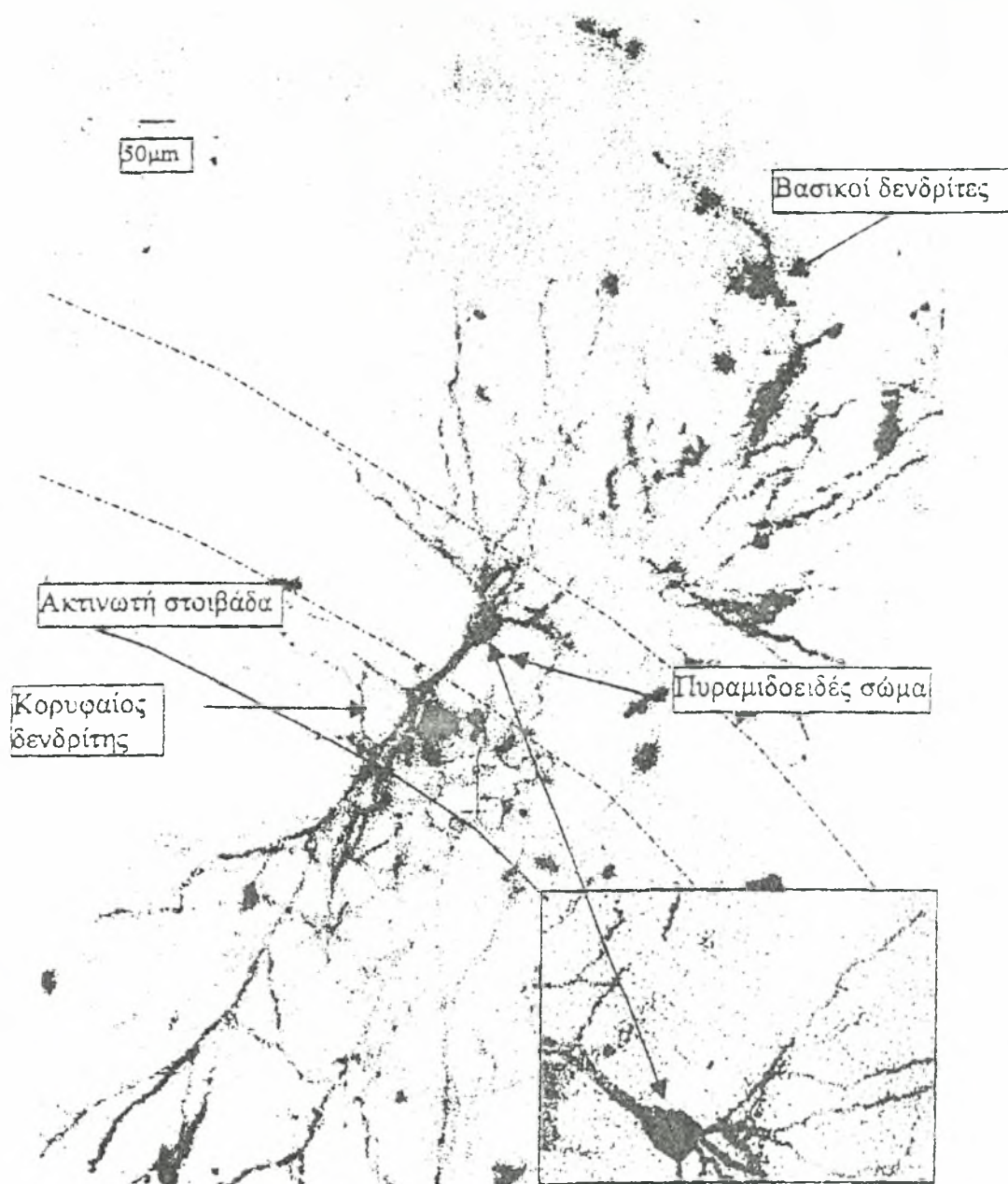
Σε όλους τους νευρώνες το βασικό δένδρο ήταν όμοιο, περίπου τρεις έως πέντε βασικοί δενδρίτες επεκτείνονταν από το κυτταρικό σώμα προς τη σκάφη και καθένας από αυτούς έδινε διακλαδώσεις. Δευτερεύουσες διακλαδώσεις των δενδριτών ήταν ορατές σε όλο το μήκος των βασικών δενδριτών. Σε αυτούς τους νευρώνες οι βασικοί δενδρίτες άγγιζαν την ιπποκάμπεια σχισμή (το τέλος της σκάφης), μερικές φορές καμπυλωτά και διέτρεχαν κατά μήκος της σχισμής για αρκετές εκατοντάδες μικρόμετρα πριν να τερματιστούν.

## PAXIALA MOIPA



Εικόνα 21: Μορφολογικά αναγνωρισμένος πυραμιδοειδής νευρώνας (πυραμδική στοιβάδα) της ραχιαίας ροίρας του ιπποκάμπου της περιοχής CA1b με τα χαρακτηρισικά που σημειώνουμε στην εικόνα. Μεταξύ των διακεκομμένων γραμμών εμφανίζεται η πυραμδική στοιβάδα του ιπποκάμπου.

## ΚΟΙΛΙΑΚΗ ΜΟΙΡΑ



Εικόνα 22: Μορφολογικά αναγνωρισμένος πυραμιδοειδής νευρώνας (πυραμιδική στοιβάδα) της κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου της περιοχής CA1b με τα χαρακτηριστικά που σημειώνουμε στην εικόνα. Μεταξύ των διακεκομμένων γραμμών εμφανίζεται η πυραμιδική στοιβάδα του ιπποκάμπου και από κάτω στη συνεχόμενη γραμμή εμφανίζεται η επόμενη στοιβάδα με πλούσιες διακλαδώσεις του πρωταρχικού κορυφαιού δενδρίτη.

## ΤΕΤΑΡΤΟ ΜΕΡΟΣ

### ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το κύριο εύρημα της παρούσας διατριβής είναι η αυξημένη διεγερσιμότητα των πυραμιδοειδών νευρώνων της κοιλιακής μοίρας, η οποία εμφανίζεται ως σημαντική μείωση της 1<sup>st</sup> ISI και μείωση του πλάτους του ταχέως μεταϋπερπολωτικού δυναμικού f-AHP, σε σύγκριση με τους νευρώνες της ραχιαίας μοίρας του ιπποκάμπου.

Ο ιπποκάμπειος σχηματισμός αποτελεί ένα από τα κύρια θέματα των μελετών τα τελευταία χρόνια λόγω της εμπλοκής του σε φυσιολογικές λειτουργίες όπως αυτή της μάθησης και της μνήμης καθώς σε παθολογικές καταστάσεις όπως η επιληψία. Μεγάλο μέρος της βιβλιογραφίας αναφέρεται στη διαφοροποίηση της διεγερσιμότητας των πυραμιδοειδών νευρώνων του ιπποκάμπου. Πράγματι, αναφέρεται σε μελέτες διαφοροποίηση της διεγερσιμότητας των πυραμιδοειδών νευρώνων μεταξύ των περιοχών CA1 και CA3 (Deuchars and Thomson, 1996; Prince et al., 1982; Jensen et al., 1994; Jensen et al., 1996), και του υποθέματος μεταξύ της περιοχής CA1 (Staff et al., 2000) αλλά και μεταξύ των πυραμιδοειδών νευρώνων κατά μήκος της στοιβάδας CA1 (υποστοίβαδες a, b,c, Prince et al., 1982). Εντούτοις, όλες οι μέχρι σήμερα μελέτες αφορούν αποκλειστικά νευρώνες της ραχιαίας μοίρας του ιπποκάμπου.

Αντίθετα, μελέτες που αφορούν τη διεγερσιμότητα των πυραμιδοειδών νευρώνων της κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου είναι ελάχιστες. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με αυξημένα επιληπτικά φαινόμενα των οποίων η συχνότητα και η διάρκεια είναι μεγαλύτερη σε τομές κοιλιακού ιπποκάμπου (Brock, 1999). Επιπλέον, βρέθηκε ότι ο κοιλιακός ιπποκάμπος είναι περισσότερο επιρρεπής στις επιληπτικές κρίσεις (Bragdon et al., 1986; Elul et al., 1964; Gilbert et al., 1985; Lee et al., 1990; Racine et al., 1977) και ότι ο αριθμός των καταγεγραμμένων εκφορτίσεων που ακολουθούν επιληπτικές κρίσεις στην κοιλιακή μοίρα του ιπποκάμπου είναι αισθητά μεγαλύτερος (Traub et al., 1993). Ο μηχανισμός

όμως της αυξημένης διεγερσιμότητας των νευρώνων της κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου παραμένει άγνωστος. Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε με σκοπό να συμπληρωθεί το επιστημονικό κενό που υπάρχει στη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με τον/τους πιθανό/πιθανούς μηχανισμούς της αυξημένης διεγερσιμότητας των πυραμιδοειδών νευρώνων της κοιλιακής μοίρας στην περιοχή CA1 του ιπποκάμπου. Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν οι ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες των πυραμιδοειδών νευρώνων της περιοχής CA1b του ιπποκάμπου (ορισμένοι από τους οποίους αναγνωρίστηκαν μορφολογικά) με τη μέθοδο της καθήλωσης του ρεύματος καθώς και οι πιθανές διαφορές που αφορούν στη συναπτική αναστολή στην περιοχή CA1 του ιπποκάμπου μεταξύ των δύο μοιρών του.

Αρχικά εξετάστηκαν οι παθητικές και οι ενεργητικές μεμβρανικές ιδιότητες των πυραμιδοειδών νευρώνων των δύο μοιρών του ιπποκάμπου. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν οι παθητικές ιδιότητες της μεμβράνης: το δυναμικό μεμβράνης εν ηρεμία, η αντίσταση εισόδου κυττάρου και η σταθερά χρόνου. Δε βρέθηκε καμμία στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους νευρώνες των δύο μοιρών. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν, ότι στις παθητικές μεμβρανικές ιδιότητες δεν οφείλεται η αυξημένη διεγερσιμότητα που παρατηρείται στους νευρώνες της κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου. Πράγματι, έχει ήδη αναφερθεί σε μελέτες ότι παρόμοιες τιμές των παθητικών ιδιοτήτων της μεμβράνης, παρατηρούνται σε γενετικά επιληπτικά ζώα (Kostopoulos et al., 1988) και σε νευρώνες της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου μετά από την πρόκληση ηλεκτρικής διέγερσης (Oliver and Miller, 1985). Τα ηλεκτροφυσιολογικά αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι οι βασικές παθητικές μεμβρανικές ιδιότητες δεν διαφέρουν ανάμεσα στους πυραμιδοειδείς νευρώνες της περιοχής CA1b των δύο μοιρών του ιπποκάμπου. Αντιθέτως, παρατηρήθηκε ότι ορισμένες ενεργητικές μεμβρανικές ιδιότητες συμβάλλουν σημαντικά στην αυξημένη διεγερσιμότητά τους.

Τα δυναμικά ενέργειας ως αποτέλεσμα της συναπτικής ολοκλήρωσης επηρεάζονται από τις παθητικές και ενεργητικές νευρωνικές ιδιότητες τις μεμβράνης. Η κατανόηση των βασικών μηχανισμών οι οποίοι διέπουν τη δημιουργία ριπών στους νευρώνες θα βοηθούσε στη διελεύκανση του ρόλου της κοιλιακής μοίρας στη διεγερσιμότητα του ιπποκάμπου σχηματισμού.



Αυτή η γνώση θα πρόσφερε επίσης πολύτιμες πληροφορίες για την λειτουργία του ιπποκάμπου στο σύνολό του.

Η κυματομορφή του μονήρους δυναμικού ενέργειας παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για τον τρόπο με τον οποίο οι νευρώνες επεξεργάζονται τις πληροφορίες που δέχονται (Storm, 1989; Jensen et al., 1996). Στην διάρκεια της δημιουργίας του δυναμικού ενέργειας η ταχεία ανοδική φάση του δυναμικού αντιστοιχεί στο χρόνο της μέγιστης ενεργοποίηση των διαύλων νατρίου. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η πρώτη παράγωγος της μεταβολής του δυναμικού  $dV/dt$  (φάση ανόδου), η οποία αντιπροσωπεύει τη δραστηριοποίηση των ταχέων τασεοελεγχόμενων διαύλων νατρίου, και έγινε σύγκριση των τιμών της ανάμεσα στους νευρώνες της ραχιαίας και της κοιλιακής μοίρας της περιοχής CA1b του ιπποκάμπου. Τα δυναμικά ενέργειας τα οποία καταγράφηκαν από τους πυραμιδοειδείς νευρώνες της ραχιαίας μοίρας παρατηρήθηκαν να έχουν πράγματι μία τάση αυξημένου ρυθμού ανόδου, όπως και ελάχιστα μικρότερο ρυθμό καθόδου από τους νευρώνες της κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου ( $p = 0,055$ ) χωρίς όμως παράμετροι να είναι στατιστικώς σημαντικοί. Επίσης παρατηρήθηκε μία εμφανής παροδική θετική επανάκαμψη του ρυθμού καθόδου στους νευρώνες της ραχιαίας μοίρας του ιπποκάμπου. Η επανάκαμψη αυτή αντανακλά μια επιβράδυνση της φάσης καθόδου του δυναμικού ενέργειας και πιθανώς δικαιολογεί το λίγο αυξημένο ημιέυρος και το αυξημένο εμβαδόν των μονήρων δυναμικών ενέργειας των νευρώνων της ραχιαίας μοίρας.

Τα υπερπολωτικά δυναμικά που ακολουθούν τα μονήρες δυναμικά ενέργειας παρουσιάζουν τρεις φάσεις έκαστη εκ των οποίων είναι αποτέλεσμα της δραστηριοποίησης των διαφόρων τύπων διαύλων καλίου. Η πρώτη εμφανιζόμενη υπερπολωτική φάση είναι η ταχεία υπερπόλωση (f-AHP), η οποία διαρκεί περίπου από 1-10 ms και οφείλεται κυρίως στην ενεργοποίηση τασεοελεγχόμενων διαύλων καλίου. Αναφέρεται ότι το f-AHP παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία στην ουσία τετρααιθυλαμμώνιο (TEA), στους ανταγωνιστές των διαύλων ασβεστίου και στην τροποποίηση της συγκέντρωσης των ιόντων καλίου στο εξωκυττάριο υγρό. Βασιζόμενοι στα παραπάνω, προτάθηκε ότι οι ιοντικοί δίαυλοι  $I_c$ ,  $I_A$ ,  $I_K$  (Storm, 1987) και ο ιοντικός δίαυλος  $I_{CT}$  (Storm, 1999) ενέχονται στην επαναπόλωση και διαμεσολαβούν στο ταχύ μεταϋπερπολωτικό δυναμικό των πυραμιδοειδών

νευρώνων του ιπποκάμπου. Συγκεκριμένα, το I<sub>CT</sub>, συμβάλλει στην ταχεία υπερπόλωση (Sah, 1996) των νευρώνων και ο χρόνος της απενεργοποίησης του υπολογίζεται περίπου 5 ms.

Ακολουθώντας το ταχύ μεταϋπερπολωτικό δυναμικό εμφανίζεται μια δεύτερη φάση με διάρκεια από μερικά έως εκατοντάδες msec (m-AHP), και στη συνέχεια ακολουθεί μια βραδεία φάση η οποία διαρκεί μέχρι και λίγα δευτερόλεπτα και απαιτεί την ενεργοποίηση ενός ασβεστοελεγχόμενου διαύλου καλίου. Αυτή η βραδεία φάση αναφέρεται συνήθως ως βραδύ μεταϋπερπολωτικό δυναμικό sAHP. Λειτουργικά, αποκλείοντας τον ανωτέρω δίαυλο ελαττώνεται η συχνότητα προσαρμογής και αυξάνεται η διεγερσιμότητα του νευρώνα. Την ικανότητα αυτή έχουν οι εξής ουσίες: η νοραδρεναλίνη, σεροτονίνη, ακετυλοχολίνη και το γλουταμικό οξύ. Αυτός ο ασβεστοελεγχόμενος δίαυλος καλίου έχει λοιπόν δύο λειτουργίες: αφενός περιορίζει τη νευρωνική συχνότητα των πυροδοτήσεων και αφετέρου είναι υπεύθυνος για τη δημιουργία του φαινομένου της συχνότητας προσαρμογής (ISI). Το γεγονός αυτό έχει εξαιρετικό ενδιαφέρον, διότι στην παρούσα διατριβή το 1<sup>st</sup> ISI των πυραμιδοειδών νευρώνων της κοιλιακής μοίρας της περιοχής CA1b του ιπποκάμπου εμφανίζονταν με μικρότερες τιμές απ' ότι στους νευρώνες της ραχιαίας μοίρας, υποδηλώνοντας αυξημένη διεγερσιμότητα των πυραμιδοειδών νευρώνων της κοιλιακής μοίρας.

Ενδοκυττάρια καταγραφές από τα σώματα των πυραμιδοειδών νευρώνων της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου έχουν δείξει ότι το 100% των νευρώνων απαντούν με επαναλαμβανόμενες πυροδοτήσεις μετά από άμεση εκπόλωση δια μέσου ενδοκυττάριας εφαρμογής ορθογώνιου παλμού ρεύματος μακράς διάρκειας (Schwartzkroing, 1978; Madison and Nicoll, 1984; Lancaster and Nicoll, 1987; Storm, 1989; Wong and Stewart, 1992; Shao et al., 1999; Staff et al., 2000). Αντίθετα, άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι μέχρι και 25% των καταγραφομένων CA1 πυραμιδοειδών νευρώνων απαντούν με ριπές, οι οποίες θεωρούνται ότι αποτελούν δείκτη αυξημένης νευρωνικής διεγερσιμότητας (Azouz et al., 1994; Jensen et al., 1994; Jensen et al., 1996; Jensen and Yaari, 1997; Sanabria et al., 2001). Αυτή λοιπόν η διαφοροποίηση στη δραστηριότητα των νευρώνων πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι οι καταγραφές προέρχονται από διαφορετικές περιοχές της CA1 πυραμιδικής στοιβάδας. Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι οι νευρώνες της

κοιλιακής μοίρας εμφανίζουν αμφότερα τα φαινόμενα της εξοικείωσης και μη εξοικείωσης μετά από εφαρμογή ορθογώνιου παλμού ρεύματος. Οι νευρώνες της ραχιαίας μοίρας εμφανίζουν και τις δύο παραπάνω αναφερόμενες ιδιότητες, αλλά σε μικρότερο ποσοστό αυτή της μη εξοικείωσης. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν αυξημένη διεγερσιμότητα των νευρώνων της κοιλιακής μοίρας σε σχέση με τη ραχιαία. Επιπλέον, οι νευρώνες της κοιλιακής μοίρας παρουσιάζουν αυξημένο αριθμό των παρατηρούμενων δυναμικών ενέργειας κατά την διάρκεια του εκπολωτικού παλμού.

Επιρόσθετα από τις μεμβρανικές ιδιότητες των πυραμιδοειδών νευρώνων της περιοχής CA1b θα μπορούσε να συμβάλλει στην αναφερόμενη στη βιβλιογραφία αυξημένη διεγερσιμότητα του κοιλιακού ιπποκάμπου και η συναπτική αναστολή. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων παρατηρήθηκε, μικρότερο πλάτος και μειωμένη διάρκεια του f-IPSP των νευρώνων της κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου. Αυτό το εύρημα πιθανώς να εξηγεί τη διαφορά στην συναπτική αναστολή ανάμεσα στις δύο μοίρες του. Σ' αυτό το γεγονός ίσως επιδρούν παράγοντες όπως ο σχετικά μικρότερος αριθμός ανασταλτικών νευρώνων ή η διαφορά σε GABA υποδοχείς (αριθμός, πυκνότητα, τη μετασυναπτική θέση ή τη συγγένεια προς το GABA). Ωστόσο, δεν υπάρχουν μέχρι τώρα διαθέσιμα στοιχεία ελαττωμένης αναστολής, παρά μόνο οι πρόσφατες παρατηρήσεις (μη δημοσιευμένες) από το Εργαστήριο Φυσιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Πατρών, οι οποίες υποδεικνύουν χαμηλότερο επίπεδο σύνδεσης ενός αγωνιστή των GABA<sub>A</sub> υποδοχέων, της μουσκιμόλης, στην περιοχή CA1 της πυραμιδικής στοιβάδας της κοιλιακής μοίρας σε σύγκριση με την αντίστοιχη περιοχή της ραχιαίας μοίρας του ιπποκάμπου. Μολονότι, η προετοιμασία των τομών από τις δύο μοίρες έγινε με τον ίδιο τρόπο, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε τη πιθανότητα της επιλεγμένης καταστροφής των σημαντικών λειτουργικά ανασταλτικών διακλαδώσεων στις τομές της κοιλιακής μοίρας, οι οποίες πιθανόν συνεισφέρουν στην διαφοροποίηση της αναστολής σε αυτή την περιοχή.

Για την καταγραφή των μορφολογικά αναγνωρισμένων πυραμιδοειδών νευρώνων χρησιμοποιήσαμε μικροηλεκτρόδια πλήρη βιοκυτίνης 1.5% (χαμηλού μοριακού βάρους, φυσικής προελεύσεως βιταμίνη). Η ποιότητα των ενδοκυττάρων καταγραφών και η μορφολογική αποτύπωση συσχετίζονται με την χρήση των μικροηλεκτροδίων με βιοκυτίνη, η οποία έχει

το πλεονέκτημα της διατήρησης του ηλεκτροφυσιολογικού χαρακτήρα των νευρώνων συγκρινόμενη με άλλες ενδοκυττάρια χρωστικές ουσίες όπως Lucifer Yellow (κίτρινη χρωστική, Horikawa and Armstrong, 1988).

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν αναγνωρισμένοι πυραμιδοειδείς νευρώνες του ιπποκάμπου σύμφωνα με ήδη υπάρχουσες μελέτες στη βιβλιογραφία (Greene et al., 1997; Deuchars and Thomson, 1996; Zhong - Sheng Hang, 1996; Zachary Mainen, 1996). Η δενδριτική μορφολογική ανάλυση των πυραμιδοειδών νευρώνων στην κοιλιακή και στη ραχιαία μοίρα της περιοχής CA1, αποκάλυψε ότι στην κοιλιακή μοίρα οι νευρώνες εμφανίζονται με επιπλέον παράπλευρους κλάδους προερχόμενους από τον κύριο κορυφαίο δενδρίτη. Αυτό υποδηλώνει ότι πιθανώς η παραπάνω διαφορά είναι υπεύθυνη για τη διαφορετική ικανότητα εκφόρτισης των νευρώνων των δύο μοιρών του ιπποκάμπου. Πράγματι, αναφέρεται στη βιβλιογραφία ότι καθώς αυξάνει η μεμβρανική δενδριτική επιφάνεια μεγαλώνει και η τάση των νευρώνων να ανταποκρίνονται με ριπές (Mainen and Sejnowski, 1996). Τα μέχρι στιγμής ανατομικά δεδομένα τα οποία θα μπορούσαν να υποστηρίξουν την υπόθεση της διαφορετικής διαμόρφωσης των διακλαδώσεων στην διεγερσιμότητα των νευρώνων ανάμεσα στη ραχιαία και την κοιλιακή μοίρα του ιπποκάμπου δεν είναι ακόμα επαρκή και αποσαφηνισμένα.

Η βασική συμβολή του ιπποκάμπου είναι η παροχή μιας ισχυρής μνήμης του περιβάλλοντος, που είναι ζωτικής σημασίας για την ερμηνεία του συναισθήματος. Εν τούτοις, ενώ ο ραχιαίος ιππόκαμπος θυμάται τα “ξερά” γεγονότα με το κοιλιακό τμήμα του ιπποκάμπου ενδέχεται να συμβάλει καθοριστικά στη διαμόρφωση της συγκινησιακής γεύσης αυτών των γεγονότων.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής συμπληρώνουν και ενισχύουν τα ευρήματα που αφορούν τη διαφοροποίηση μεταξύ ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου και παρέχουν το φυσιολογικό υπόστρωμα για την ερμηνεία της αυξημένης επιρρεπείας του κοιλιακού ιπποκάμπου προς επιληπτοειδή δραστηριότητα.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη ενδοκυττάρια *in vitro* καταγραφή και σύγκριση των παθητικών και ενεργητικών ιδιοτήτων της μεμβράνης των πυραμιδοειδών νευρώνων της ραχιαίας και κοιλιακής μοίρας της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου.

Οι παθητικές ιδιότητες της μεμβράνης των πυραμιδοειδών νευρώνων στη ραχιαία και στην κοιλιακή μοίρα εμφανίζουν παρόμοιες τιμές.

Διαπιστώθηκε αυξημένη διεγερσιμότητα των νευρώνων της κοιλιακής μοίρας σε σχέση με τους νευρώνες της ραχιαίας μοίρας της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου.

Η αυξημένη αυτή διεγερσιμότητα φαίνεται να οφείλεται στις παρακάτω ενεργητικές ιδιότητες της μεμβράνης:

- α. Στο μειωμένο πλάτος του f-AHP των νευρώνων της κοιλιακής μοίρας
- β. Στο μειωμένου 1<sup>st</sup> ISI στους νευρώνες της κοιλιακής μοίρας
- γ. Στον αυξημένο αριθμό των εμφανιζόμενων δυναμικών ενέργειας στους διάρκειας ορθογώνιου παλμού 500 ms

Επιπλέον πραγματοποιήθηκε μορφολογική ταυτοποίηση των πυραμιδοειδών νευρώνων της ραχιαίας και της κοιλιακής μοίρας της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου με την βοήθεια ιστοκυτταροχημικής μεθόδου.

Τα ευρήματα αυτά εξηγούν, τουλάχιστον εν μέρει, την αυξημένη **διεγερσιμότητα των νευρώνων της κοιλιακής μοίρας** της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου που αναφέρεται στη βιβλιογραφία.

## ABSTRACT

### Excitability of CA1 principal hippocampal neurons: an in vitro intracellular study.

Recent reports have acknowledged the existence of functional differentiation along the longitudinal axis of the hippocampus, the ventral part being more prone to epileptogenesis.

The aim of the present study was to investigate the membrane properties and firing characteristics of principal neurons of dorsal (DH) and ventral hippocampus (VH) that might account for this differentiation.

Intracellular recordings were made from CA1 pyramidal neurons of DH and VH hippocampus. Resting membrane potential (DH:  $-64,17 \pm 0,65$  mV; VH:  $-63,84 \pm 0,82$  mV), input resistance (DH:  $45,92 \pm 4,99$  M $\Omega$ ; VH:  $46,28 \pm 6,24$  M $\Omega$ ), and time constant (DH:  $22,11 \pm 1,13$  ms; VH:  $19,32 \pm 0,87$  ms) did not differ between DH (n=21) and VH (n=12) neurons. Action potential (AP) parameters were measured from single AP's elicited by brief current pulse (3-10ms) in DH (n=7) and VH (n=7) neurons. Peak amplitude (DH:  $89,71 \pm 1,99$  mV; VH:  $80,57 \pm 1,92$  mV), rise time (DH:  $0,22 \pm 0,01$  ms; VH:  $0,21 \pm 0,01$  ms), decay time (DH:  $0,97 \pm 0,02$  ms; VH:  $0,98 \pm 0,02$  ms), half width (DH:  $1,31 \pm 0,07$  ms; VH:  $1,14 \pm 0,03$  ms). However, fast afterhyperpolarizations (fAHP) following AP's were significantly weaker in VH ( $-4,07 \pm 0,7$  mV) compared to DH ( $-7,53 \pm 1,16$  mV) neurons ( $p < 0,05$ ). Moreover, the 1<sup>st</sup> interspike interval (ISI; DH:  $4,9 \pm 0,34$  ms, n=25; VH:  $3,9 \pm 0,3$  ms, n=15) of a train of AP's elicited by a depolarizing current pulse (500ms, 0.4nA), as well as the number of AP's within the pulse (DH:  $6,8 \pm 0,9$ ; VH:  $12,1 \pm 0,2$ ), was significantly different between the two groups of neurons ( $p < 0,05$ ).

The data suggest that the weaker fAHP in VH could underlie its higher neuronal excitability as expressed by the shorter ISI. These findings confirm and extend previous evidence for functional differentiation between DH and VH and explain, to some extent, the relatively higher tendency of VH toward epileptiform activity.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

1. Adams. R.D., Victor, M., Ropper, A.H. (1995) Principles of neurology. Sixth edition, Mc Graw-Hill, Health professions division.
2. Aika, Y., Ren, J.Q., Kosaka, K., Kosaka, T.,(1994) Quantitative analysis of GABA-like-immunoreactive and parvalbumin-containing neurons in the CA1 region of the rat hippocampus using a stereological method, the dissector. *Exp.Brain Res.*, **99**, 267-276.
3. Alger, B. (1991) Gating of GABAergic inhibition in hippocampal pyramidal cells. *Ann.N.Y. Acad.Sci.*, **627**, 249-263.
4. Alger B.E. and Nicoll R.A. (1980) Epileptiform burst afterhyperpolarization: A calcium-dependent potassium potential in hippocampal CA1 pyramidal cells, *Scien.*, **210**, 1122-1124.
5. Alger B.E. and Nicoll R.A. (1982) Feed-forward dendritic inhibition in rat hippocampal pyramidal cells studied in vitro, *J. Physiol.*, **328**, 105-123.
6. Alcon D.L. (1989) Memory storage and neural system. *Sci. Am.*, **261**, 42-50.
7. Alcon D.L., D.G. Amaral, M.F. Bear, T.J. Caren, N.J. Cohen, J.F. Disterhoft, H. Eichenbaum, S. Golski, and L.K. Gorman (1991) Learning and memory. FESN Study group. *Brain Res. Rev.*, **16**, 193-200.
8. Ali, AB., Deuchars, J., Pawelzik, H., Thomson, A.M. (1998) CA1 pyramidal to basket and bistratified cell EPSPs: dual intracellular recordings in rat hippocampal slices. *J. Physiol.*, **507**, 201-17.
9. Alonso-DeFlorida, F. and Delgado, J.M.R. (1958) Lasting behavioural and EEG changes in cats induced by prolonged stimulation of the amygdala. *Am.J. Physiol.*, **193**, 223-229.
10. Amaral, D.G., Ishizuka, N., and Clainborne, B.J.(1990) Neurons, numbers and the hippocampal network. *Prog. Brain Res.*, **83**, 1-11.
11. Amaral, D.G. and Witter, MP. (1989) The three dimensional organization of the hippocampal formation. A review of anatomical data. *Neurosci.*,**31**, 571-591.
12. Amaral, D.G. (1978) A golgi study of cell types in the hillar region of the hippocampus in the rat. *J.Comp.Neur.*, **182**, 851-914
13. Andersen, P. (1975) Organization of hippocampal neurons and their interconnections, *Hippocampus*, **1**, 155-175.
14. Andersen, M. and Lambert, J.D.C. (1995) Regenerative properties pyramidal cell dendrites in area CA1 of the rat hippocampus. *J.Physiol.*,**483**, 421-441.

15. Andersen, P., Storm, J., Wheal, H.V. (1987) Threshold of action potentials evoked by synapses on the dendrites of pyramidal cells in the rat hippocampus in vitro. *J. Physiol.*, **383**, 509-526.
16. Arabadzisz, D., A. Ylien, Z. Emri (2002) Increased inter-spike intervals and fast after-hyperpolarization of action potential in rat hippocampal pyramidal cells accompanied with altered calbindin immunoreactivity 10-12 months after global forebrain ischemia. *Neurosci. Lett.*, **331**, 103-106.
17. Azouz, R., Jensen, M.S. and Yari, Y. (1996) Ionic basis of spike after-depolarisation and burst generation in adult rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *J. Physiol.*, **492**, 211-223.
18. Azouz, R., Morten, S. Jensen and Yari, Y. (1994) Muscarinic modulation of intrinsic burst firing in rat hippocampal neurons. *Europ. J. Neurosci.*, **6**, 961-966.
19. Baldissera F. and Gustafsson B. (1970) Time course and potential dependence of the membrane conductance change during the afterhyperpolarization in the cat's a-motoneurons. *Brain Research*, **17**, 365-368.. First interval firing.
20. Baldissera F. and Gustafsson B. (1974a). Firing behaviour of a neurone model based on the afterhyperpolarization conductance time course. First interval firing. *Acta physiologica scandinavica*, **91**, 528-544.
21. Baldissera F. and Gustafsson B. (1974b). Firing behaviour of a neurone model based on the afterhyperpolarization conductance time course and algebraical summation. Adaptation and steady state firing. *Acta physiologica scandinavica*, **92**, 27-47.
22. Bartesaghi, R., Geesi, T., Sperti, L. (1979) Activation of pyramidal neurons by intrinsic longitudinal connections in the hippocampus. *Boll. Soc. Ital. Biol.*, **24**, 2555-60.
23. Bayer S.. (1985) Hippocampal region in the rat nervous system vol. 1, forebrain and midbrain. G. Paxinos, ed. *New York Academic Press*, 335-352.
24. Becker A., Letzel, K., Letzel, U. and G. Grecksch (1997) Kindling of the dorsal and the ventral hippocampus: effects on learning performance in rats. *Physiol. Behaviour.*, **62**, 1265-1271.
25. Beckstead R.M. (1979) Afferents connections of the entorhinal area in the rat as demonstrated by retrograde cell labelling with horseradish peroxidase. *Brain Res.*, **152**, 249-264.
26. Behr, J., Empson, R.M., Schmitz, D., Gloveli, T., Heinemann. U. (1996) Electrophysiological properties of rat subicular neurons in vitro. *Neurosci. Lett.*, **220**, 41-44.



27. Benardo, L.S., Masukawa, L.M., Prince, D.A. (1982) Electrophysiology of isolated hippocampal pyramidal dendrites. *J. Neurosci.*, **2**, 1614-1622.
28. Bikson M, Baraban SC, Durand DM (2002), Conditions sufficient for nonsynaptic epileptogenesis in the CA1 region of hippocampal slices, *J. Neurophysiol*, **87**, 62-71.
29. Bilkey, D.K. and Schwartzkroin, P.A. (1990) Variation in electrophysiology and morphology of hippocampal CA3 pyramidal cells. *Brain. Res.*, **514**, 77-83.
30. Blackstad T. (1956) Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination. *J.Comp.Neur.*, **105**. 417-528.
31. Blackstad T.W. 1958. On the termination of some afferents to the hippocampus and fascia dentate, *Acta Anatomica*, **35**, 202-214.
32. Blasco-Ibanez, JM., Freund, TF. (1995) Synaptic input of horizontal interneurons in stratum oriens of the hippocampal CA1 sub field: structural basis of feed-back activation. *Eur. J. Neurosci.*, **10**, 2170-80.
33. Blumcke I., Becker A.J., Klein C., Scheiwe C., Lie A.A., Beck H., Waha A., Friedl M.G., Kuhn R., Emson P., Elger C., Wiestler O.D. (2000) Temporal lobe epilepsy associated up- regulation of metabotropic glutamate receptors: correlated changes in mGluR1 m RNA and protein expression in experimental animals and human patients. *J. Neuropath Exp Neurol.*, **59**, 1-10.
34. Bobker, D.H. and Williams, J. T. (1989) Serotonin augments the cationic current I<sub>h</sub> in central neurons. *Neuron.*, **2**, 1533-1540.
35. Borck, C. and Jefferys, G. (1999) Seizure-like events in disinhibited ventral slices of adult rat hippocampus., *J. Neurophysiol.*, **82**, 2130-2142.
36. Bragdon, A.C., Taylor, D.M. and Wilson, W.A. (1986) Potassium- induced epileptiform activity in area CA3 varies markedly along the septo-temporal axis of the rat hippocampus. *Brain Res.*, **378**, 169-173.
37. Bragin A., Wilson C.L. and Engel J. Jr. (2002) Increased afterdischarge threshold during kindling in epileptic rats. *Exp. Brain Res.*, **1**, 30-37.
38. Brown, D.A., Gahwiler, B.H., Griffith, W.H. and Halliwell, J.V.(1990) Membrane currents in hippocampal neurons. *Progr. Brain. Res.*, **83**, 141-160.
39. Brown H. F., Giles W. Noble S. J. (1977) Membrane currents underlying activity in frog sinus venous, *J. Physiol. Lond.*, **271**, 783-816.
40. Brown, T.H., Fricke, R.A. and Perkel, D.H. (1981) Passive electrical constants in three classes of hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.*, **62**, 812-826.

41. Brun, V.H., Otnass, M.K., Molden, S., Steffenach, H.A., Witter, M.P., Moser, M.B., Moser, E.I. (2002) Place cells and place recognition maintained by direct entorhinal - hippocampal circuitry. *Science*, **296**, 2243-6.
42. Busney, M., Eichenbaum, H. (1996) Conservation of hippocampal memory function in rats and humans. *Nature*, **379**, 255-257.
43. Canning, K.J., Leung, L.S. (1997) Lateral entorhinal, perirhinal, and amygdala-entorhinal transition projections to hippocampal CA1 and dentate gyrus in the rat: a current source density study. *Hippocampus*, **6**, 643-55.
44. Chen, Q.X. and Wong, R.K.S. (1991) Intracellular  $Ca^{2+}$  suppressed transients potassium current in hippocampal neurons. *J. Neurosci.*, **11**, 337-343.
45. Cherubini, E., Rovira, C., Ben-Ari, Y., Nistri, A., (1990) Effects of kainate on the excitability of rat hippocampal neurones. *Epilepsy Res.*, **5**, 18-27.
46. Christie, B.R., Eliot, L.S., Ito, K., Miyakawa, H. and Johnston, D. (1995) Different  $Ca^{2+}$  channels in soma and dendrites of hippocampal pyramidal neurons mediate spike-induced  $Ca^{2+}$  influx. *J. Neurophysiol.*, **73**, 2553-2557.
47. Cohen N. J. and H. Eichenbaum (1993) Memory amnesia and hippocampal system. *MIT Press Cambridge*.
48. Colino A., Halliwell JV (1993) Carbachol potentiates Q current and activates a calcium-dependent non-specific conductance in rat hippocampus in vitro, *Eur J. Neurosci.*, **5**, 1198-1209.
49. Costanti, A., and Galvan, M., (1983) Fast inward - rectifying current accounts for anomalous rectification in olfactory cortex neurons. *J. Physiol. Lond.*, **335**, 153 - 178.
50. Crepel, R. and Penit - Soria, J. (1986) Inward rectification and low threshold calcium conductance in rat cerebellar Purkinje cells. *J. Physiol. Lond.*, **372**, 1- 23.
51. Deacon T.W., Eichenbaum H.E., Rosenberg P., Ekman K.W. (1983) Afferent connection of the perirhinal cortex in the rat. *J Comp. Neurol.*, **220**, 168-190.
52. DiFrancesco D. (1991) The contribution of the "pacemaker" current  $I_f$  to generation of spontaneous activity in rabbit sino-atrial node myocytes. *J. Physiol. Lond.*, **434**, 23-40.
- Dolorfo, C.L., Amaral, D.G. (1998) Entorhinal cortex of the rat: topographic organization of cells of origin of the perforant path projection to the dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.*, **1**, 25-48.
54. Eichenbaum, H. (2000) Hippocampus: mapping or memory? *Curr. Biol.*, **10**, 785-787.
55. Eichenbaum, H. (1999) The hippocampus: The shock of the new. *Curr. Biol.*, **9**, 482-484.

56. Eichenbaum, H., Schoenbaum, G., Young, B., Bunsey, M. (1996) Functional organization of the hippocampal memory system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13500-13507.
57. Elul R. (1964) Regional differences in the hippocampus of the rat. I. Specific discharge patterns of the dorsal and the ventral hippocampus and their generalized seizures. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, **16**, 470-488.
58. Esclapez, M., Hirsch, J.C., Khazipov, R., Ben-Ari, Y. and Bernard, C. (1997) Operative GABAergic inhibition in hippocampal CA1 pyramidal neurons in experimental epilepsy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 12151-12156.
59. Finch, D.M., Nowlin, N.L. and Babb, T.L. (1983) Demonstration of axonal projections of neurons in the rat hippocampus and subiculum by intracellular injection of HRP. *Brain Res.*, **271**, 201-216.
60. Fisher, R.S. (1989) Animal models of the epilepsies. *Brain Res. Rev.*, **14**, 245-278.
61. Frankenhaeuser, B. (1968) The ionic currents and the nervous impulse in myelinated nerve. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **18**, 97-105.
62. French, C.R., Sah, P., Buckett, K.J., Gage, P.W. (1990) A voltage dependent persistent sodium current in mammalian hippocampal neurons. *J. Gen. Physiol.*, **95**, 1139-1157.
63. Freund, T.F. and Buzaski, G. (1996) Interneurons of hippocampus. *Hippocampus*, **6**, 347-470.
64. Fricker, D., Verheugen, J.A., and Miles, R., (1999) Cell-attached measurements of the firing threshold of rat hippocampal neurons. *J. Physiol*, **3**, 791-804.
65. Fujita, Y. (1975) Two types of depolarising after-potential in hippocampal pyramidal cells of rabbits. *Brain Res.*, **94**, 435-446.
66. Funahashi, M., Higuchi, H., Miyawaki, T., Shimada, M., Matsuo, R., (2001) Propofol suppresses a hyperpolarization - activated inward current in rat hippocampal CA1 neurons. *Neurosci. Lett.* **3**, 177-80.
67. Gasparini, S., DiFrancesco, D. (1997) Action of the hyperpolarization - activated current (I<sub>h</sub>) blocker ZD 7288 in hippocampal CA1 neurons. *Pflugers Arch.*, **435**, 99-106.
68. Gho, M., King, AE., Ben- Ari, Y., Cherubini, E. (1986) Kainate reduces two voltage - dependent potassium conductance's in rat hippocampal neurons in vitro. *Brain Res.*, **385**, 411-414.
69. Gilbert, M., Racine, R.J. and Smith, G.K. (1985) Epileptiform burst responses in ventral vs. dorsal hippocampal slices. *Brain Res.*, **361**, 389-391.
70. Glaser G.H. (1980) Treatment of intractable temporal lobe - limbic epilepsy by temporal lobectomy. *Annals of Neur.*, 455-459.

71. Gloveli, T., Schmitz, D., Empson, R.M., Dugladze, T., Heinemann, U. (1997) Morphological and electrophysiological characterization of layer III cells of the medial entorhinal cortex of the rat. *Neurosci.*, **3**, 629-48.
72. Goddard, G.V.(1967) Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. *Nature*, **241**,1020-1021.
73. Gol A.M. and G.M. Faibish (1967) Effects of human hippocampal ablation. *J. Neurosurg.*, **26**, 390-398.
74. Gothelf, D., Soreni, N., Nachman, R.P., Tyano, S., Yehuda, H., Orly, R. and Weizman, A. (2000) Evidence for the involvement of the hippocampus in the pathophysiology of schizophrenia. *Europ. Neuropsychopharm.*, **10**, 389-3995.
75. Green J.D. (1964) The hippocampus, *Physiol.Rev.*, **44**, 561-608.
76. Greene, J.R.T. and Totterdell S. (1997) Morphology and distribution of electrophysiologically defined classes of pyramidal and non pyramidal neurons in rat ventral subiculum in vitro. *J. Comp. Neurol.*, **380**, 395- 408.
77. Haas H.L. and J.G.R. Jefferys (1984) Low calcium field burst discharges of CA1 pyramidal neurons in rat hippocampal slices. *J.Physiol. (Lond.)*, **354**, 185-201.
78. Hailing, Su., Gil, Alroy, Eilon, D., Kirson, and Yoel Yaari, (2001) Extracellular calcium modulates persistent sodium current- dependent burst-firing hippocampal pyramidal neurons., *J. Neurosci.*, **12**, 4173-4182.
79. Halasy, K., Buhl, E.H., Lorinczi, Z., Tamas, G., Somogyi, P. (1996) Synaptic target selectivity and input of GABAergic basket and bistratified interneurons in the CA1 area of the rat hippocampus., *Hippocampus*, **3**, 306-29.
80. Halliwell, J. V. and Adams, P.R. (1982) Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Res.*, **250**,71 -92.
81. Hara H., Onodera H., Kogure K., Akaike N. (1990) The regional difference of neuronal susceptibility in the dentate gyrus to hypoxia. *Neurosci. Lett.*, **115**, 189-194.
82. Harris, K.D., Hirase, H., Leinekugel, X., Henze, D.A., Buzsaki, G. (2001) Temporal interaction between single spikes and complex spike bursts in hippocampal pyramidal cells. *Neuron*, **32**, 141-149.
83. Harris, E., Witter, M.P.Weinstein, G.,Stewart, M. (2001) Intrinsic connectivity of the rat subiculum: I. Dendritic morphology and patterns of axonal arborisation by pyramidal neurons. *J. Comp. Neurol.*, **435**, 490-505.
84. Haring, J.H., Davis, J.N. (1985) Differential distribution of locus coeruleus projections to the hippocampus formation: anatomical and biochemical evidence. *Brain Res.*, **1-2**, 366-9.
85. Hauser, W.A. and Hesdorffer, D.C. (1990) In: *Epilepsy: frequency, causes and consequences*. New York: Demos Publ.

86. Heinemann, U., Schmitz, D., Eder, C., Gloveli, T. (2000) Properties of entorhinal cortex projection cells to the hippocampal formation. *Ann N.Y Acad Sci.*, **911**,112-26.
87. Hicks, G.A. and Marrion, N.V. (1998) Ca<sup>2+</sup> dependent inactivation of large conductance Ca<sup>2+</sup> activated K<sup>+</sup> (BK) channels in rat hippocampal neurones produced by pore block from an associated particle. *J. Physiol.*,**508**, 721-734.
88. Hirschberg Birgit, Maylie James, Adelman John P., Marrion Neil V., (1999), Gating properties of single SK channels in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Biophysical Journal*, **77**, 1905-1913.
89. Hoffman, D.A., Magee, J.C., Colbert, c. and Johnston, D. (1997) K<sup>+</sup> channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Nature.*, **387**, 869-875.
90. Hock B. and Busney M. (1998) Differential effects of dorsal and ventral hippocampal lesions. *J Neurosci.*, **17**, 7027-7032.
91. Horel J. (1994) Some comments on the special cognitive function claimed for the hippocampus. *Cortex*, **30**, 269-280.
92. Horikawa, K. and Armstrong, W.E.,(1988) A versatile means of intracellular labelling : injection of biocytin and its detection with avidin conjugates. *J. Neurosci.Meth.*,**25**,1-11.
93. Insusati R., D.G. Amaral and W.M. Cowan The enthorhinal cortex of the monkey: (1987) III Subcortical afferents *J. Comp. Neurol.*, **264**, 396-408.
94. Ishizuka, N., Cowan, W.M., and Amaral, D.G., (1995) A quantitative analysis of the dendritic organization of pyramidal cells in the rat hippocampus. *J.Comp.Neurol.*,**362**,17-45.
95. Ishizuka, N., Weber, J., Amaral, DG. (1990) Organization of hippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J. Comp. Neurol.*, **4**, 580-623.
96. Jarrard, LE. (1995) What dos the hippocampus really does? *Behaviour.. Brain. Res.*, **71**, 1-10.
97. Jeffreys J.G.R. and H.L. Haaw (1982) Synchronizes bursting of CA1 pyramidal cells in the absence of synaptic transmission. *Nature*, **300**, 448-450.
98. Jensen, M.S., Azouz, R., Yaari, Y. (1996) Spike after-depolarization and burst generation in adult rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *J. Physiol.*, **492**, 199-210.
99. Jones, R.S.G. and Heinemann, U.(1988) Verapamil blocks the afterhyperpolarization but not the spike frequency accommodation of rat CA1 pyramidal cells in vitro. *Brain. Res.*, **462**, 367-374.

100. Jung, H., Staff, N.P. and Spruston, N. (2001) Action potential bursting in subicular pyramidal neurons is driven by a calcium tail current *J. Neurosci.*, **21**, 3312-3321.
101. Jung M.W. and S.I. Wiener, and B.L. Mc Naughton (1994) Comparison of spatial firing characteristics of units in dorsal and ventral hippocampus of the rat. *J.Neurosci.*,**14** 7347-7356.
102. Kandel E.R., J.H. Schwartz and T.M. Jessel (1999) Neuroscience and behaviour, Μετάφραση Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
103. Kandel, E.R. and Spencer, W.A. (1961) Electrophysiology of hippocampal neurons . II. After potentials and repetitive firing. *J. Neurophysiol.*, **24**, 243-259.
104. Katz B. (1949) Les constantes electriques de la membrane du muscle *Arch. Sci. Physiol.*, **3**, 285-299.
105. Kawaguchi Y., Hama K., (1987a) Two subtypes of non - pyramidal cells in rat hippocampal formation identified by intracellular recording and HRP injection. *Brain Res.*,**411**, 190-195.
106. Kawaguchi Y., Hama K., (1987b) Fast spiking non-pyramidal cells in the hippocampal CA3 region, dentate gyrus and subiculum of rats. *Brain Res.*, **425**,351-355.
107. Kohler, C. (1985) Intrinsic projections of the retrohippocampal region in the rat brain. The subicular complex. *J. Comp. Neurol.*, **4**, 504-22.
108. Kohler C., L.W. Swanson, L. Haglund and J. Y. Wu 1985, Histochemistry and prozection of the tuber mammilary nucleus in the rat, *Neurosci.*,**16**, 85-110.
109. Konnerth, A., Lux, H.D. and Heinemann, U.(1986) Ionic properties of burst generation in hippocampal pyramidal cell somata in vitro. In U. Heinemman, M. Klee, E. Neher and W. Singer (Eds.), Calcium Electrogenesis and Neuronal Functioning, *Springer-Verlag, Berlin*,368-374.
110. Krichmar JL, Nasuto SJ, Scorcioni R., Washington SD, Ascoli GA (2002) Effects of dendritic morphology on CA3 pyramidal cell electrophysiology: a simulation study. *Brain Res*, **941**, 11-28.
111. Kubota M., Nakamura M., and Tsukahara N. (1985) Ionic conductance associated with electrical activity of guinea-pig red nucleus neurons in vitro, *J. Physiol. Lond*, **362**, 161-171.
112. Lacaille, JC., Schwartzkroin, PA. (1988a) Stratum locunosum-moleculare interneurons of hippocampal CA1 region. Intracellular response characteristics, synaptic responses and morphology., *J. Neurosci.*, **8**, 1400-10.

113. Lacaille, J. and Williams S. (1990) Membrane properties of interneurons in stratum oriens-alveus of the CA1 region of rat hippocampus *in vitro*. *Neurosci.*, **36**, 349-359.
114. Lacaille, J.C., Mueller A., Kunkel D.D., Schwartzkroin P.A. (1987) Local circuit interactions between oriens-alveus interneurons and CA1 pyramidal cells in hippocampal slices: electrophysiology and morphology. *J. Neurosci.*, **7**, 1979-1993.
115. Lacey M. G. and North R.A. (1988) An inward current activated by hyperpolarization ( $I_h$ ) in rat substantia nigra zona compacta neurones in vitro (Abstract), *J.Physiol. Lond.*, **406**, 18.
116. Lancaster, B. and Nicoll, R.A. (1987) Properties of two calcium-activated hyperpolarizations in rat hippocampal neurons. *J. Physiol.*, **389**, 187- 203.
117. Lanthorn, T., Storm, J. and Anderson, P.(1984) Current to frequency transduction in CA1 hippocampal pyramidal cells; slow prepotentials dominate the primary range firing., **53**, 431-443.
118. Lee P.H., C.N. Xie, D.V. Lewis, W.A. Wilson, C.L. Mitchell and J.S. Hong (1990) Opioid-induced epileptiform bursting in hippocampal slices: higher susceptibility in ventral than dorsal hippocampus. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **253**, 545-551.
119. Lerner-Natoli M., Rondouin, G., Baldy-Moulinier, M. (1984) Hippocampal kindling in the rat: intrastructural differences. *J.Neurosci. Res.*, **12**, 101-111.
120. Leung, L.W. (1979) Potentials evoked by alvear tract in hippocampal CA1 region of rats. Topographical projection, component analysis and correlation with unit activities. *J. Neurophysiol*, **6**, 1557-70.
121. Leurberg, S. (1979) Commissural and intrinsic connections of the rat hippocampus. *J.Comp. Neurol.*, **4**, 685-708.
122. Lisman J.E. (1997) Bursts as unit of neural information: making unreliable synapses reliable. *Trends Neurosci.*, **1**, 38-43.
123. Logothetis, J. (1988) Νευρολογία. Βιβλίο για φοιτητές της ιατρικής.
124. Lorente De Nó, R.,(1934) Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *J. Psychol. Neurol.*, **46**,113-177.
125. Mac Caferrri G., Mangoni M., Lazzari A, Di Francesco D. (1993) Properties of the hyperpolarization-activated current in rat hippocampal CA1 pyramidal cells, *J.Neurophysiol.*, **69**, 2129-2136.
126. Madison D.V. and Nicoll R.A. (1982). Noradrenaline blocks accommodation of pyramidal cell discharge in the hippocampus. *Nature*, **299**, 636-638.
127. Madison D.V. and Nicoll R.A. (1983). Adaptation of action potential frequency in hippocampal pyramidal cells is regulated by calcium-activated

- potassium conductance and M-current. *Society of Neuroscience Abstracts*, **9**, 601.
128. Madison, D.V. and Nicoll, R.A. (1984) Control of repetitive discharge of rat CA1 pyramidal neurons in vitro. *J. Physiol.*, **354**, 319-331.
129. Magee, J.C. (1999) Dendritic Ih normalizes temporal summation in hippocampal CA1 neurons. *Nat. Neurosci.*, **2**, 508-514.
130. Magee, J.C. (1998) Dendritic hyperpolarization-activated currents modify the integrative properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurosci.*, **18**, 1-12.
131. Magee, J.C., Cook, E.P. (2000) Somatic EPSP amplitude is independent of synapse location in hippocampal pyramidal neurons. *Nat. Neurosci.*, **3**, 849-851.
132. Magee, J.C. and Carruth, M. (1999) Dendritic voltage-gated ion channels regulate the action potential firing mode of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.*, **82**, 1895-1901.
133. Magee, J.C., Hoffman, D., Colbert, C. and Johnston, D. (1998) Electrical and calcium signalling in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Annu. Rev. Physiol.*, **60**, 327-346.
134. Magee, J.C. and Johnston, D. (1995) Characterization of single voltage-gated Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channels in apical dendrites of rat CA1 pyramidal neurons. *J. Physiol.*, **487**, 67-90.
135. Mangan, P.S., Rempe, D.A. and Lothman E.W. (1995) Changes in inhibitory neurotransmission in the CA1 region and dentate gyrus in a chronic model of temporal lobe epilepsy. *J. Neurophysiol.*, **74**, 829-840.
136. Mason, A. (1993) Electrophysiology and burst firing of rat subicular pyramidal neurons in vitro: a comparison with area CA1. *Brain Res.*, **600**, 174-178.
137. Mason, A. and Larkman, A. (1990) Correlations between morphology and electrophysiology of pyramidal neurons in slices of rat visual cortex. *Electrophysiology. J. Neurosci.*, **10**, 1415-142.
138. Masukawa, I.M., Benardo, L.S., Prince D.A. (1982) Variations in electrophysiological properties of hippocampal neurons in different sub fields. *Brain Res.*, **242**, 341-344.
139. Mayer M. L., Westbrook G.L. (1983) A voltage-clamp analysis of inward (anomalous) rectification in mouse spinal sensory ganglion neurons. *J. Physiol. Lond.*, **340**, 19-45.
140. Mc Cormick D.A., Pape H.C. (1990a), Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones, *J. Physiol. Lond.*, **431**, 291-318.



141. Mc Cormick D.A., Pape H.C. (1990b) Noradrenergic and serotonergic modulation of a hyperpolarization-activated cation current in thalamic relay neurones, *J.Physiol. Lond.*, **431**, 319-342.
142. Mc Donald R.J. and N.M. White (1995b) Hippocampal and non hippocampal contributions to place learning in rats. *Behav.Neurosci.*, **109**, 579-593.
143. Mc Donald R.J. and N.M. White 1995b, Hippocampal and non-hippocampal contributions to place learning in rats, *Behavioural Neurosci.*, **109**, 579-593.
144. Mc Larnon, J.G. (1995) Inactivation of a high conductance calcium dependent potassium current in rat hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.*, **193**, 5-8.
145. Mc Namara J.O., Bonhaus D.W. and Shin C. (1993) The kindling model of epilepsy. In: *Epilepsy: models, mechanisms and concepts* (Schwartzkroin P.A., ed) pp 27-47. Cambridge, UK: Cambridge UP.
146. Mc Namara J.O. (1984) Kindling: an animal model of complex partial epilepsy. *Ann. Neurol. (suppl.)*, **16**, 72-76.
147. Morten, S., Jensen, Azouz, R. and Yaari, Y. (1994) Variant firing patterns in rat hippocampal pyramidal cells modulated by extracellular potassium. *J. Neurophysiol.*, **71**, 833-839.
148. Mickus, T., Jung, H. and Spruston, N. (1999) Properties of slow, cumulative sodium channels inactivated in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Biophys. J.*, **76**, 846-860.
149. Milner B. (1985) Memory and the human brain. In: *How we know*. Shaffo M. (ed). *San Francisco: Harper and Row*.
150. Milner B. (1972) Disorders of learning and memory after temporal lobe lesions in man. *Clin.Neurosurg.*, **19**, 421-446.
151. Mishkin, M. and Appenzeller T. (1986) The anatomy of memory. *Scient. Amer.*, **62**, 248.
152. Mishkin, M., (1978) Memory in monkeys severely impaired by combined but not separate removal of the amygdala and hippocampus. *Nature.*, **273**, 297-298.
153. Moser, E., Moser, M.B., Andersen, P. (1993) Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal, hippocampal lesions but hardly present following ventral lesions. *J. Neurosci.*, **13**, 3916-3925.
154. Moser M.B., and E.I. Moser (1998) Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus* **8** , 608-619
155. Nadel L. (1968) Dorsal and ventral hippocampus lesions and behaviour. *Physiol. Behav.*, **3**, 891-900.
156. Nicoll R.A. and Alger B.E (1981) A simple chamber for recording from submerged brain slices. *Journal of Neuroscience Methods*, **4**, 153-156.

157. Nieuwenhuys R., Voogd J. and Chr. van Huijzen (1983) Το κεντρικό Νευρικό Σύστημα του Ανθρώπου. Σύνοψη και Ατλαντας. Μετάφραση και απόδοση στα Ελληνικά, Καραμανλίδης Αζαρίας.
158. Nyakas, C., Luiten, P.G., Spencer, D.G., Traber, J. (1987) Detailed projection patterns of septal and diagonal band efferent to the hippocampus in the rat with emphasis on innervations of CA1 and dentate gyrus. *Brain Res Bull.*, **4**, 533-45.
159. Oliver, M.W. and Miller, J.J (1985) Alterations of inhibitory processes in the dentate gyrus following kindling- induced epilepsy. *Exp. Brain Res.*, **57**, 443-447.
160. Ottoson D. and Swerup C. (1981) Ionic basis of adaptation in crustacean stretch receptor. *J.Physiol.*, **317**, 26-27.
161. Ottoson D. and Swerup C. (1982) Studies on the role of calcium in adaptation of the crustacean stretch receptor. Effects of intracellular injection of calcium, EGTA, and Tea. *Brain Research*, **244**, 337-341.
162. Pachard M.G., R. Hirsh and N.M. White, 1989, Differential effects of fornix and caudate nucleus lesions on two radial maze tasks: evidence for multiple memory systems, *J Neurosci.*, **9**, 1465-1472.
163. Papageorgiou K.Th., Zis V., Sfagos K., Tsakanikas K. (1993) Νευρολογία A/B τόμος. Επιστημονικές Εκδόσεις «Παρισιάνου»
164. Pape H.C. (1996) Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons, *Annu.Rev.Physiol.*, **58**, 299-327.
165. Pasquier, D.A., Reinoso-Suarez, F. (1987) The topographic organization of hypothalamic and brain stem projections to the hippocampus. *Brain Res Bull.*, **4**, 373-89.
166. Pawelzik, H., Hughes DI, Thomson AM, (2002) Physiological and morphological diversity of immunocytochemically defined parvalbumin- and cholecystokinin-positive interneurons in CA1 of the adult rat hippocampus. *J Comp Neurol*, **443**, 347-367.
167. Pike, F.G., Goddard, R.S., Suckling, J.M., Ganter, P., Kasthuri, N., Paulsen, O. (2000) Distinct frequency preferences of different types of rat hippocampal neurons in response to oscillatory input currents. *J. Physiol.*, **529**, 205-213.
168. Pitkanen A., M. Pikkarainen, N. Nurminen and A. Ylinen (2000) Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex and postrhinal cortex in rats. A review. *Ann. NY Acad. Sci.*, **911**, 369-391.
169. Poucent B., Thinus-Blanc C., Muller R.U. (1994) Place cells in the ventral hippocampus of rats. *Neuro Report*, **5**, 2045-2048.

170. Quigg M., Bertram E.H., Jackson T. (1997) Longitudinal distribution of hippocampal atrophy in mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.*, **27**, 101-110.
171. Racine R., P.A. Rose and W.M. Burnham (1977) Alter discharge thresholds and kindling rates in dorsal and ventral hippocampus and dentate gyrus. *Can.J.Neurol.Sci.*, **4**, 273-278.
172. Rainnie D., Asproдини E., Shinnick-Gallagher P. (1993) Intracellular recordings from morphologically identified neurons of the basolateral amygdala. *J Neurophysiol.*, **69**,
173. Raley-Susman KM, Hass IS, Cottrell JE, Newman RB, Chambers G, Wang J. (2001), Sodium influx blockade and hypoxic damage to CA1 pyramidal neurons in rat hippocampal slices. *J. Neurophysiol.*, **86**, 2715-2726.
174. Remondes, M., Schuman, EM.(2002) Direct cortical input modulates plasticity and spiking in CA1 pyramidal neurons. *Nature*, **416**, 736-40.
175. Risold. P.Y. and L.W. Swanson (1996) Structural evidence from functional domains in the rat hippocampus. *Scien.* **272**, 1484-1488.
176. Rolls E. (2000) Hippocampo-cortical and cortico-cortical back projections. *Hippocampus*, **10**, 380-388.
177. Room P. and Groenewegen H.J. (1986) Connections of the parahippocampal cortex I. Cortical afferents. *J. Comp. Neurol.*, **251**, 415-450.
178. Sah P. (1996), Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *Trends Neurosci.*, **19**, 150-154.
179. Sah M. and Haylett D.G. (1999) Calcium entry via both L- and N-type Ca<sup>2+</sup> channels contributes to the activation of the slow afterhyperpolarization in cultured rat hippocampal pyramidal neurons, *J.Physiol. (Lond.)*, **35**, 515.
180. Saunders, RC. and Rosene, DL. (1988) A comparison of the efferents of the amygdala and the hippocampal formation in the Rhesus Monkey: I convergence in the entorhinal, prorrhinal and perirrhinal cortices. *J. Comp.Neurol.*, **271**, 153-184.
181. Schwartzkroin, P.A. (1977) Further characteristics of hippocampal CA1 cell's in vitro. *Brain. Res.*, **128**, 53-68.
182. Schwartzkroin, P.A. and Mathers L.H. (1978) Physiological and morphological identification of a non-pyramidal cell type. *Brain. Res.*, **157**, 1-10.
183. Schwartzkroin, P.A. and Kunkel D.D. (1985) Morphology of identified interneurons in the CA1 regions of guinea pig hippocampus. *J. Comp. Neurol.*, **232**, 205-218.

184. Schwartzkroin, P.A. and Mueller, A.L. (1987) Electrophysiology of hippocampal neuron. In E.G. Jones and A.Peters (Eds), *Cerebral Cortex*, **6**, 295-343.
185. Scoville W.B. (1954) The limbic lobe in man. *J.Neurosurg.*, **11**, 64-66.
186. Sepherd J. (1990) The synaptic organization of the brain. Oxford, University Press, 3-th edition, page 348.
187. Shah A.K., Cohen I. S., Daytner N. B. (1987) Background  $K^+$  current in isolated canine cardiac Purkinje myocytes, *Biophys. J.*, **52**, 519-525.
188. Shao, L.R., Halvorsrud R., Graham L.B. and Storm J.F.(1999) The role of BK-type  $Ca^{2+}$  dependent  $K^+$  channels in spike broadening during repetitive firing in rat hippocampal pyramidal cells. *J.Physiol.*, **521**,135-146.
189. Shapiro, M.L., Eichenbaum, H.(1999) Hippocampus as a memory map: synaptic plasticity and memory encoding by hippocampal neurons. *Hippocampus*, **9**, 365-384.
190. Shin C. and J.O. McNamara (1994) Mechanism of epilepsy. *Annu Rev.Med.*, **45**, 379-389.
191. Sinnamon H.M., Freniere S., Kootz J. (1978) Rat hippocampus and memory for places of changing significance. *J Comp Physiol Psychol.*, **92**, 142-155.
192. Spain W. J., Schwindt P. C., Crill W. E. (1987) Anomalous rectification in neurons from cat sensorimotor cortex in vitro, *J. Neurophysiol.*, **57**, 1555-1576.
193. Squire L.R. (1987) Memory and brain. *New York, Oxford University Press*.
194. Squire L.R. and C.B. Care (1991) The hippocampus memory and space hippocampus, **3**, 269-271.
195. Staff, N.P., Jung, Hae-Yoon, Thiagarajan, T., Yao, M. and Spruston, N. (2000) Resting and active properties of pyramidal neurons in subiculum and CA1 if rat hippocampus. *J. Neurophysiol.*, **84**, 2395-2408.
196. Stanfield P. R. Nakajima Y., Yamaguchi K., (1985) Substance P raises neuronal excitability by reducing inward rectification, *Nature Lond.*, **315**, 498-501.
197. Sternberger, N.H., Itoyama, Y., Kies, M.W., Webster,H., deF. (1978) Immunocytochemical method to identify basic protein in myelin- forming oligodendrocytes of newborn rat C.N.S. *J. Neurocytol.*, **2**, 251-263.
198. Stevens R. and Cowey A. (1973) Effects of dorsal and ventral hippocampal lesions on spontaneous alternation, learned and probability learning in rats. *Brain Res.*, **52**, 203-224.
199. Steward, O. (1976) Topographic organization of the projections from the entorhinal area to the hippocampal formation of the rat. *J. Comp. Neurol.*, **3**, 285-314.

200. Steward M. and Wong R.K. (1993) Intrinsic properties and evoked responses of guinea pig subicular neurons in vitro. *J. Neurophysiol.*, **70**, 232-245.
201. Storm J.F. (1987a). Action potential repolarization and a fast after-hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells, *J.Physiol.*, **385**, 733-759.
202. Storm J.F. (1987b). Intracellular injection of Ca<sup>2+</sup> chelator inhibits spike repolarization in hippocampal neurons. *Brain Research*, **435**, 387-392.
203. Storm J.F. (1989). An after-hyperpolarization of medium duration in rat hippocampal pyramidal cells. *J.Physiol.*, **409**, 171-190.
204. Storm J.F. (1990). Potassium currents in hippocampal pyramidal cells. *Progress in Brain Research*, **83**, 161-187.
205. Strange, B.A., Fletcher, P.C., Henson, R.N.A., Friston, K.J. and Dolan, R.J. (1999) Segregating the functions of human hippocampus. *Neurobiol.*, **96**, 4034-4039.
206. Swanson L.W. and W.M. Cowan (1977) An autobiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J. Comp. Neurol.*, **172**, 49-84.
207. Swanson, L.W., Sawchenko, P.E., Cowan, W.M. (1981) Evidence for collateral projections by neurons in Ammons horn , the dentate gyrus and the subiculum: a multiple retrograde labelling study in the rat. *J. Neurosci.*, **5**, 548-59.
208. Swanson, L.W. (1977) The anatomical organization of septo-hippocampal projections. *Ciba Found Symp.*, **58**, 25-48.
209. Swanson, L.W. (1982) Normal hippocampal circuitry, *Neurosci.Res.*, **20**, 624-637.
210. Takahashi T. (1990) Inward rectification in neonatal rat spinal motoneurons, *J.Physiol. Lond.*, **423**, 47-62.
211. Taube, J.S. (1993) Electrophysiological properties of neuron in rat subiculum in vitro. . *ExpBrain Res.*, **96**, 304-318.
212. Thierry, A.M., Gioanni, Y., Degenetais, E., Glowinski, J. (2000) Hippocampal-prefrontal cortex pathway: anatomical and electrophysiological characteristics. *Hippocampus*, **10**, 411-419.
213. Tokimasa T., Sugiyama K., Akasu T., Muteki T., (1990) Volatile anaesthetics inhibit a cyclic AMP-dependent sodium-potassium current in cultured sensory neurones of bullfrog, *Br. J. Pharmacol.*, **101**, 190-192.
214. Traub R.D. and Miles R. (1991) Neuronal networks of the hippocampus . Cambridge: Cambridge UP.
215. Tulving E. and Schacter D.L. (1990) Priming and human memory systems. *Science*, **247**, 301-306.

216. Velumian A.A. and Carlen P.L.(1999) Differential control of three after-hyperpolarizations in rat hippocampal neurones by intracellular calcium buffering. *J. Physiol.*, **517**, 201-216.
217. Vida Impre, Frotscher Michael (1999), A hippocampal interneuron associated with the mossy fibres system, submitted directly (*Track II*) to the PNAS office, **97**, 1275-1280.
218. Vlachos, I.D., (1989) Στοιχεία φυσιολογικής και κλινικής νευροανατομικής σημειολογίας. Προπτυχιακή εκπαίδευση.
219. White, G., Lovinger, D.M. and Weight, F.F. (1989) Transient low-threshold  $Ca^{2+}$  current triggers burst firing through an afterdepolarizing potential in an adult mammalian neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **86**, 6802-6806.
220. Williams P., L. Banmister, M. Berry, P. Collins, J. Dussek and M. Ferguson, 1995, The hippocampal formation, In: Grays's anatomy 38th edition, London: Churchill Livingstone, 1123-1131.
221. Williams, S.R. and Stuart, G.J.(1999) Mechanisms and consequences of action potential burst firing in rat neocortical pyramidal neurons. *J. Physiol.*, **521**, 467-482.
222. Witter, M.P., (1989) Connectivity of rat hippocampus, *Neur. and Neurobiol.*, **10**.
223. Woodson, W., Nitecka,L., Ben-Ari, Y. (1989) Organization of the GABA-ergic system in the rat hippocampal formation: a quantitative immunocytochemical study. *J.Camp.Neurol.* **280**, 254-271.
224. Wong, R.K.S. and Prince, D.A. (1981) After potential generation in hippocampal pyramidal neurons. *J.Neurophysiol.*, **45**, 86-97.
225. Wong, R.K.S., Prince, D.A. and Basaum, A.I. (1979) Intradendritic recordings from hippocampal neurons. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 986-990.
226. Wu C. and Leung L.S. (1997) Partial hippocampal kindling decreases efficacy of presynaptic GABA<sub>B</sub> autoreceptors CA1. *J. Neurosci.*, **23**, 9261-9269.
227. Yoshida A., Oda M. and Ikemoto Y. (1991) Kinetics of the  $Ca^{2+}$  and  $K^{+}$  channel in rat hippocampal-neurons, *Jap.J.Neurosci.*, **41**, 297-315.
228. Yoshida, K., Oka, H. (1995) Topographical projections from the medial septum-diagonal band complex to the hippocampus: a retrograde tracing study with multiple fluorescent dyes in rat. *Neurosci. Res.*, **3**, 199-209.
229. Zalutsky R.A. and Nicoll R.A. (1990) Comparison of two forms of long-term potentiation in single hippocampal neurons. *Science*, **248**, 1619-1624.

230. Zbicz, K.L. and Weight, F.F. (1985) Transient voltage and calcium - dependent outward currents in hippocampal CA3 pyramidal neurons. *J.Neurophysiol.*, **53**, 1038-1058.
231. Zhong-Sheng, H. (1996) Morphological heterogeneity of non-pyramidal neurons in the CA1 region of rat hippocampus. *Neurosci. Res.*, **25**, 51-65.
232. Zola-Morgan, S. and L.R. Squire (1985) Medial temporal lesions in monkey Impair memory in a variety of tasks sensitive to human amnesia. *Behaviour. Neurosci.*, **100**, 165-170.
233. Zola-Morgan, S. and L.R. Squire and D.G. Amaral (1989a) Lesions of amygdala that spare the adjacent cortical regions do not impair memory of exacerbate the impairment following lesions of the hippocampal formation. *J.Neurosci.*, **9**, 1922-1936.
234. Zola-Morgan, S. and L.R. Squire, D.G. Amaral and N. Suzuki (1986b) Lesions of entorhinal and parahippocampal cortex that spare the amygdala and hippocampal formation reduce severe memory impairment. *J.Neurosci.*, **9**, 4355-4370.