



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



Εργαστήριο Φαρμακολογίας  
Διευθυντής: Καθηγητής Νικόλαος Σακελλαρίδης

---

*Διδακτορική Διατριβή*

***„ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΟΠΙΟΕΙΔΩΝ ΣΤΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΝΕΥΡΩΝΩΝ  
ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΥ„***

υπό

**ΧΡΙΣΤΙΝΑΣ ΚΟΥΤΣΩΝΑ**

Ιατρού

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

**ΛΑΡΙΣΑ, 2014**

© 2014 Χριστίνα Κουτσώνα

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

**Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:**

- 1<sup>ος</sup> Εξεταστής  
(Επιβλέπουσα)** Ευτυχία **Ασπροδίνη**  
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 2<sup>ος</sup> Εξεταστής** Νικόλαος **Σακελλαρίδης**  
Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 3<sup>ος</sup> Εξεταστής** Γεώργιος **Κωστόπουλος**  
Καθηγητής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Πατρών
- 4<sup>ος</sup> Εξεταστής** Πασχάλης-Αδάμ **Μολυβδάς**  
Καθηγητής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 5<sup>ος</sup> Εξεταστής** Αποστολία **Χατζευθυμίου**  
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 6<sup>ος</sup> Εξεταστής** Νικόλαος **Πιτσίκας**  
Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 7<sup>ος</sup> Εξεταστής** Άννα **Βασιλάκη**  
Επίκουρος Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Ευχαριστώ την καθηγήτριά μου Έφη Ασπροδίνη,  
τον Ηλία, το Βαγγέλη,  
τα αδέρφια μου Θανάση και Αντώνη.

*Χριστίνα Κουτσώνα*

**ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ/ Curriculum vitae****Personal data:**

**Name:** Christina Koutsona  
**Address:** Staufenstr. 31, 60323 Frankfurt am Main  
E-Mail: [christinakoutsona@gmx.de](mailto:christinakoutsona@gmx.de)

**Date of birth:** 02 June 1979  
**Place of birth:** Athens, Greece  
**Marital status:** Single  
**Nationality:** Greek

**Education:****High school:**

1997 High school degree, 1st High School of Kifissia, Athens, Greece

**University:**

1997-1998 Biological studies, Department of Biology, National University of Athens, Greece  
1998-2004 Medical studies, School of Medicine, University of Thessaly, Greece  
2000-2004 Research activity, Laboratory of Pharmacology, School of Medicine, University of Thessaly, Greece  
2004 Degree in Medicine, School of Medicine, University of Thessaly, Greece  
2004- current Post-graduate student in the Laboratory of Pharmacology, School of Medicine, University of Thessaly, Ass. Prof. Dr. E. Asproдини, PhD.

**Employment:**

**March 2005-June 2005:** Medical Assistant in the Department of Neuroradiology, County Hospital of Siegen, Prof. Dr. Reul:

CT und MR-Imaging of the brain and spine.

Periradicular infiltrations of the lower back under CT control.

**October 2006-February 2007:** Medical Assistant in the Department of Neuroradiology, Northwest Hospital, Frankfurt am Main, Prof. Dr. Kress:

CT of the brain and spine, MR-Imaging of the brain, spine and muscle tissue.

**June 2005-October 2006 and February 2007-June 2010:** Medical Assistant in the Department of Neurology, Northwest Hospital, Frankfurt am Main, Prof. Dr. U. Meyding-Lamadé:

Clinical Neurology, Stroke Unit, neurological Intensive Care Unit, Laboratory of clinical electrophysiology (EEG, EMG, SEP, MEP) and neurological sonography.

**June 2010-current:** Medical Assistant at the Department of Psychiatry and Psychotherapy-Psychosomatic-Medicine, Höchst Hospital, Frankfurt am Main, Priv. Doz. Dr. Grube.

### **Memberships:**

German Society of Neurology (Deutsche Gesellschaft für Neurologie), DGN.

German Society of Psychiatry and Psychotherapy, (Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie, Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde), DGPPN

### **Languages:**

German, English, Greek

### **Presentations:**

1. **C. Koutsona**, K. Enk, H.-W. Ilse, B. Kress, U. Meyding-Lamadé

90-Grad Torsion des thorakalen Myelons bei einer jungen Patientin mit Syringomyelie: kernspintomographische und elektrophysiologische Befunde. 82. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie mit Fortbildungsakademie, Nürnberg, 2009.

2. **C. Koutsona**, H. W. Ilse, B. Kress, U. Meyding-Lamadé

Arteriitis der proximalen Hirnbasisarterien (Heubner Arteriitis): Fataler Verlauf bei zwei Patienten mit meningovasculärer Neurosyphilis. Neurovaskuläres kolloquium, Therapie der Carotisstenose: Neurologische Klinik Weilmünster, März, 2009.

3. **C. Koutsona**, E. Asprodini:

Comparison of neuronal excitability between dorsal and ventral rat hippocampus: Medical School, University of Thessaly, Greece, 2001.

### **Publications:**

1. Papatheodoropoulos C, Asprodini E, Nikita I, **Koutsona C**, Kostopoulos G. Weaker synaptic inhibition in CA1 region of ventral compared to dorsal rat hippocampal slices. *Brain Res.* 2002 Sep 6;948(1-2):117-21.
2. C. Jacobi, **C. Koutsona**, U. Meyding-Lamadé Buchkapitel: Virale Enzephalitiden; Lehrbuch Neurologie: Ihr roter Faden durchs Studium nach der neuen ÄAppO, [Richard C. Dodel](#), [Thomas Klockgether](#), Wiss. Verlag-Ges., 2010.
3. **Koutsona C**, Asprodini E, Kouvaras E. and Kostopoulos G. Effects of morphine on intrinsic membrane properties of the dorsal and ventral CA1 O/A hippocampal interneurons. *In preparation.*
4. Kouvaras E., Asprodini E, **Koutsona C**, Wozniak G. and Kostopoulos G. Differentiation of intrinsic membrane properties between dorsal and ventral CA1 principal hippocampal neurons. *In preparation.*

### **Abstracts:**

1. **C. Koutsona**, E. Kouvaras and E.K. Asprodini. Effect of opioids on interneurons of the dorsal and ventral rat hippocampus, 8th International Meeting of the Hellenic Society for Basic and Clinical Pharmacology, Athens, Greece, 2014.
2. **C. Koutsona**, C. Mohs, V. Jost, U. Meyding-Lamadé. Arteriitis der proximalen Hirnbasisarterien (Heubner Arteriitis): Fataler Verlauf bei zwei Patienten mit meningovasculärer Neurosyphilis. 26. Arbeitstagung für Neurologische Intensiv- und Notfallmedizin, Leipzig, 2009.
3. **C. Koutsona**, C. Mohs, E. Güresir, B. Kress, U. Meyding-Lamadé. Luetische Pachymeningitis - eine seltene Ursache der zervikalen Querschnittslähmung. 25. Arbeitstagung für Neurologische Intensiv- und Notfallmedizin, Wiesbaden, 2008.
4. D. Czapowski, V. Jost, K. Enk, **C. Koutsona**, U. Meyding- Lamadé. Neurosyphilis - ein klinisches Chamäleon mit zunehmender Bedeutung? 25. Arbeitstagung für Neurologische Intensiv- und Notfallmedizin, Wiesbaden, 2008.
5. **C. Koutsona**, C. Mohs, V. Jost, U. Meyding-Lamade, B. Kress. Neuradiological appearance of neurosyphilis, presenting as hypertrophic pachymeningitis with spinal gumma and secondary arachnoid cyst formation. 17th Meeting of the European Neurological Society, Rhodos, Greece, 2007.
6. E. Kouvaras, E. K. Asprodini, **C. Koutsona**, G. Wosniak, C. Papatheodoropoulos, G. Kostopoulos. Differentiation of intrinsic membrane properties between dorsal

- und ventral CA1 hippocampal neurons. Abstracts for the 18th Meeting of the Hellenic Society of Neuroscience, Athens, 2003.
7. E. Kouvaras, E. K. Asproдини, **C. Koutsona**, G. Wozniak, C. Papatheodoropoulos, G. Kostopoulos. Differentiation of intrinsic membrane properties between dorsal und ventral CA1 hippocampal neurons. Abstracts for the 6th IBRO Congress of neuroscience, Prague, 2003.
  8. **C. Koutsona**, E. K. Asproдини, C. Papatheodoropoulos, G. Kostopoulos. Weaker synaptic inhibition in ventral compared to dorsal CA1 region of rat hippocampus: an *in vitro* intracellular study. Abstracts of the 2nd Panhellenic Pharmacology Conference, Athens, 2002.
  9. C. Papatheodoropoulos, , E. K. Asproдини, I. Nikita, **C. Koutsona**, G. Kostopoulos. Weaker synaptic inhibition in ventral compared to dorsal CA1 region of rat hippocampus. Abstracts for the 7th Mediterranean Epilepsy Conference, Athens, 2001.
  10. C. Papatheodoropoulos, **C. Koutsona**, E. K. Asproдини, G. Kostopoulos. Comparison of neuronal excitability between dorsal and ventral rat hippocampus. Abstracts of the 15th Annual Meeting of the Hellenic Society of Neuroscience, Rio, Patra, 2000.



**„ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΟΠΙΟΕΙΔΩΝ ΣΤΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΝΕΥΡΩΝΩΝ  
ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΥ,,**

**ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΚΟΥΤΣΩΝΑ**

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2014-05-25

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

1. **Ευτυχία Ασπροδίνη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας – (Επιβλέπουσα)
2. **Νικόλαος Σακελλαρίδης**, Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Γεώργιος Κωστόπουλος**, Καθηγητής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Πατρών

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η διερεύνηση των ανατομικών δομών και των λειτουργιών του ιπποκάμπου έχει αναδείξει τη διαφοροποίηση της κοιλιακής και της ραχιαίας μοίρας του. Διαφορές βρέθηκαν σε επίπεδο λειτουργίας πυραμιδικών νευρώνων και νευρωνικών κυκλωμάτων, καθώς και σε επίπεδο δράσης νευροδιαβιβαστών και νευρορυθμιστών, μεταξύ των οποίων τα οπιοειδή. Σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν η διερεύνηση του ρόλου του ρεύματος  $I_h$  των ενδονευρώνων της CA1 περιοχής στη διαφοροποίηση του κοιλιακού και ραχιαίου ιπποκάμπου και της δράσης των οπιοειδών στο ρεύμα αυτό σε συνθήκες καθήλωσης ρεύματος.

Διενεργήθηκαν ενδοκυττάριας *in vitro* καταγραφές από ενδονευρώνες του ορίου σκάφης/στιβάδας πολυμόρφων κυττάρων και από πυραμιδικούς νευρώνες της CA1 περιοχής. Οι ενδονευρώνες αναγνωρίστηκαν με ηλεκτροφυσιολογικά κριτήρια. Οι παθητικές μεμβρανικές ιδιότητες των ενδονευρώνων του κοιλιακού και του ραχιαίου ιπποκάμπου δε διέφεραν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ των δύο μοιρών. Η εφαρμογή παρατεταμένου υπερπολωτικού παλμού ηλεκτρικού ρεύματος στους ενδονευρώνες των δύο μοιρών του ιπποκάμπου ανέδειξε διαφορές ανάμεσα στους ενδονευρώνες του κοιλιακού και του ραχιαίου ιπποκάμπου. Οι ενδονευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου επέδειξαν μεγαλύτερη υπερπόλωση για υπερπολωτικό ρεύμα ίσης έντασης σε σχέση με τους ενδονευρώνες του ραχιαίου ιπποκάμπου, διαφορετική κινητική του ρεύματος  $I_h$  και διαφορετικά χαρακτηριστικά εκπόλωσης αναπήδησης. Η μορφίνη (30  $\mu\text{M}$ ) μείωσε σημαντικά το  $I_h$ , υπερπόλωσε το δυναμικό ηρεμίας και μετέβαλε τα χαρακτηριστικά της εκπόλωσης αναπήδησης στους περισσότερους ενδονευρώνες. Σε έναν ενδονευρώνα παρατηρήθηκε εκπόλωση του δυναμικού ηρεμίας και ενίσχυση του  $I_h$ . Η μορφίνη μείωσε, επίσης, τη συχνότητα των αυθόρμητων δυναμικών ενεργείας στο δυναμικό ηρεμίας και τον αριθμό δυναμικών ενεργείας κατά την εφαρμογή παρατεταμένου εκπολωτικού παλμού.

Τα ευρήματα υποστηρίζουν την υπόθεση ότι οι ενδονευρώνες της κοιλιακής και της ραχιαίας μοίρας του ιπποκάμπου παρουσιάζουν ενδογενείς διαφορές. Επιπλέον, υπογραμμίζουν τη δυνατότητα των οπιοειδών να διαδραματίζουν ρυθμιστικό ρόλο στα κυκλώματα του ιπποκάμπου και να επηρεάζουν τη διεγερσιμότητα των ενδονευρώνων του κοιλιακού και του ραχιαίου ιπποκάμπου.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### 1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1.	Ανατομία του ιπποκάμπου	1
1.2.	Προβλητικοί νευρώνες του ιδίως ιπποκάμπου	4
1.3.	Προβλητικοί νευρώνες της οδοντωτής έλικας	4
1.4.	Ενδονευρώνες του ιπποκάμπου	4
1.4.1.	Chandelier («είδει πολυελαίου») ή αξο-αξονικοί ενδονευρώνες	5
1.4.2.	Καλαθοφόροι ενδονευρώνες	6
1.4.3.	O-LM Ενδονευρώνες ή ενδονευρώνες με δενδρίτες στη στιβάδα των πολυμόρφων κυττάρων και άξονες στη βοθριώδη-μοριακή στιβάδα	6
1.4.4.	Διστιβαδωτοί και τριστιβαδωτοί ενδονευρώνες	7
1.4.5.	Ενδονευρώνες των οπίων οι άξονες εξέρχονται των ορίων των διαφόρων υποδιαιρέσεων του ιπποκάμπου («back-projection neurons»)	7
1.4.6.	Ενδονευρώνες IS-1: Ενδονευρώνες που νευρώνουν ενδονευρώνες, τύπου 1 (interneuron-specific interneurons 1)	8
1.4.7.	Διαφοροποίηση των ενδονευρώνων του ιδίως ιπποκάμπου κατά μήκος του επιμήκους άξονα	8
1.5.	Οπιοειδή	10
1.5.1.	Οπιοειδή και ιππόκαμπος	11
1.5.2.	Προέλευση των ενδορφινών που δρουν στον ιππόκαμπο	13
1.5.3.	Υποδοχείς των οπιοειδών και συστήματα δεύτερου μεταβιβαστή	15
1.6.	Τασεοεξαρτώμενοι διάλυλοι καλίου (καθυστερημένος ανορθωτής)	20
1.7.	Διάλυλοι GIRK	21
1.8.	Ρεύμα I <sub>h</sub>	22
1.9.	Κοιλιακός και ραχιαίος ιππόκαμπος	27
1.10.	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	28

### 2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ .....	29
2.1.1.	Πειραματόζωα και προετοιμασία των εγκεφαλικών τομών .....	29
2.1.2.	Θάλαμος καταγραφής .....	30
2.1.3.	Ενδοκυττάρειες καταγραφές .....	30
2.1.4.	Νευροφαρμακολογία <i>in vitro</i> .....	33
2.1.5.	Στατιστική μελέτη .....	33
2.2.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	34
2.2.1.	- Ηλεκτροφυσιολογικός χαρακτηρισμός των ενδονευρώνων του ορίου πολύμορφης στιβάδας/σκάφης ( <i>stratum oriens/alveus interneurons</i> ή <i>O/A interneurons</i> ) της περιοχής CA1 του ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου. - Προσδιορισμός των παθητικών και ενεργητικών ιδιοτήτων της νευρωνικής μεμβράνης και σύγκριση με τους πυραμιδικούς νευρώνες της περιοχής CA1 του ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου. ....	34
2.2.1.1.	Βασικές μεμβρανικές ιδιότητες .....	34
2.2.1.2.	Δυναμικά ενεργείας .....	39
2.2.1.3.	Μεσαία και αργά μεταϋπερπολωτικά δυναμικά στους O/A ενδονευρώνες .....	43
2.2.2.	Διαφορές στη διεγερσιμότητα των O/A ενδονευρώνων της CA1 περιοχής σε ραχιαίο και κοιλιακό ιππόκαμπο - Επίδραση της μορφίνης στις ιδιότητες και τη διεγερσιμότητα των O/A ενδονευρώνων της περιοχής CA1 του ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου. ....	48
2.2.2.1.	Επίδραση της μορφίνης στις παθητικές ιδιότητες των O/A ενδονευρώνων της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου .....	48
2.2.2.2.	Επίδραση της μορφίνης στις ενεργητικές ιδιότητες των O/A ενδονευρώνων της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου .....	50
2.2.2.3.	Απόκριση των O/A ενδονευρώνων σε παρατεταμένο υπερπολωτικό παλμό ηλεκτρικού ρεύματος αυξανόμενης έντασης – Επίδραση της μορφίνης 30 $\mu\text{M}$ στο ρεύμα $I_h$ και στα χαρακτηριστικά της εκπόλωσης αναπήδησης ( <i>rebound depolarization</i> ). ....	50
2.2.2.4.	Απόκριση των O/A ενδονευρώνων σε παρατεταμένο εκπολωτικό παλμό ηλεκτρικού ρεύματος αυξανόμενης έντασης – Επίδραση της μορφίνης 30 $\mu\text{M}$ στη διεγερτικότητα των O/A ενδονευρώνων .....	69
2.3.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	75

2.3.1. Συνοπτική παρουσίαση των ευρημάτων και σχολιασμός .....	75
2.3.2. Λειτουργική σημασία των αποτελεσμάτων .....	79
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	80
ABSTRACT .....	81
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	82

## 1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

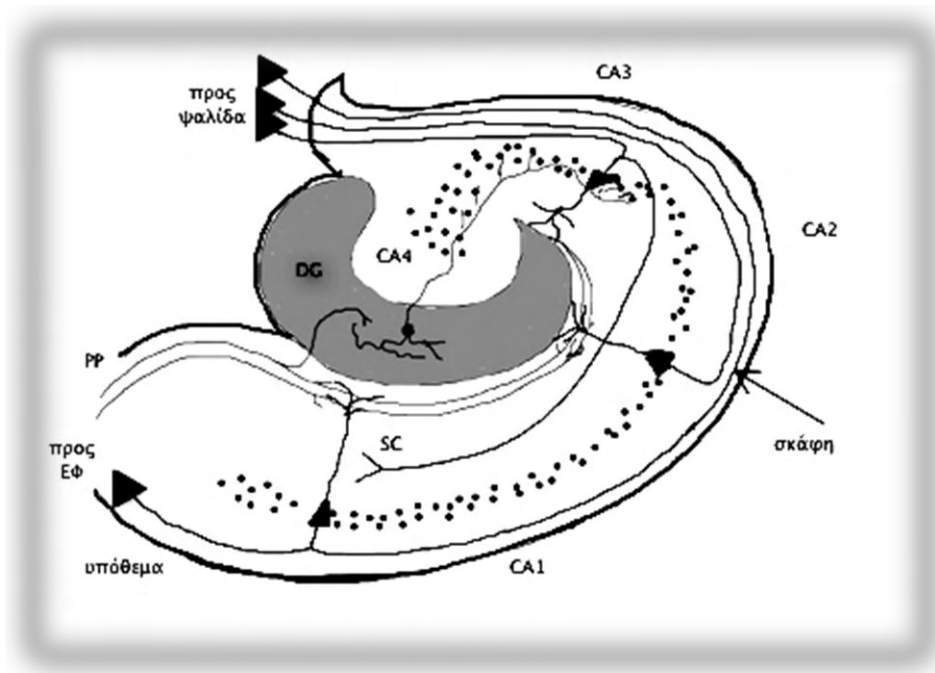
### 1.1. Ανατομία του ιπποκάμπου

Ο **ιππόκαμπος** αποτελεί μέρος του αρχαιοφλοιού του εγκεφάλου. Στον άνθρωπο βρίσκεται στην έσω επιφάνεια του κροταφικού λοβού. Έχει επίμηκες σχήμα και εκτείνεται μέχρι το ουραίο άκρο του μεσολοβίου, όπου λεπτύνεται και αποτελεί ένα λεπτό πέταλο φαιάς ουσίας, το **φαιό ένδυμα του μεσολοβίου**. Στη ραχιαία επιφάνεια του ιπποκάμπου υπάρχει μια μυελίνη ταινία, η **παρυφή του ιπποκάμπου** (fimbria), η οποία κάτω από το μεσολόβιο μεταπίπτει στην **ψαλίδα** (fornix). Η ψαλίδα παριστάνει καμπύλη γύρω από το θάλαμο και καταλήγει στα μαστία (30).

Σε μετωπιαία διατομή του ιπποκάμπου διακρίνονται τα εξής μέρη (Εικόνα Α): το **Αμμώνειο κέρασ** (Cornu Ammonis ή CA) ή αλλιώς **ιδίως ιππόκαμπος** (hippocampus proper) και η **οδοντωτή έλικα** (dentate gyrus). Ο φλοιός του ιπποκάμπου καλύπτεται από λευκή ουσία, τη **σκάφη του ιπποκάμπου** (alveus). Η **οδοντωτή έλικα** εντοπίζεται κάτω από την παρυφή του ιπποκάμπου. Το Αμμώνειο κέρασ μαζί με την οδοντωτή έλικα, το υπόθεμα και τον ενδορρινικό φλοιό αναφέρονται ως **ιπποκάμπειος σχηματισμός** (hippocampal formation ή region) (30).

Το Αμμώνειο κέρασ μπορεί να υποδιαιρεθεί σε τέσσερα μέρη ανάλογα με το μέγεθος και την πυκνότητα των πυραμιδικών (προβλητικών) νευρώνων (30). Το **πεδίο CA1** περιέχει μικρούς πυραμιδικούς νευρώνες. Το **πεδίο CA2** περιέχει μια στενή, πυκνή στιβάδα μεγάλων πυραμιδικών νευρώνων. Το **πεδίο CA3** περιέχει ευρεία χαλαρή στιβάδα μεγάλων πυραμιδικών νευρώνων. Το **πεδίο CA4** περιέχει χαλαρή τελική στιβάδα πυραμιδικών νευρώνων και ονομάζεται και **πολυμορφική στιβάδα** (polymorphic ή hilar region ή απλά **hilus**) (61).

Η θέση του ιπποκάμπου σε σχέση με άλλες ανατομικές δομές και σε κάποιο βαθμό η εσωτερική του οργάνωση παρουσιάζει διαφορές ανάμεσα στα διάφορα είδη, με τον ιππόκαμπο των κατώτερων θηλαστικών να είναι εξαιρετικά πιο αναπτυγμένος σε

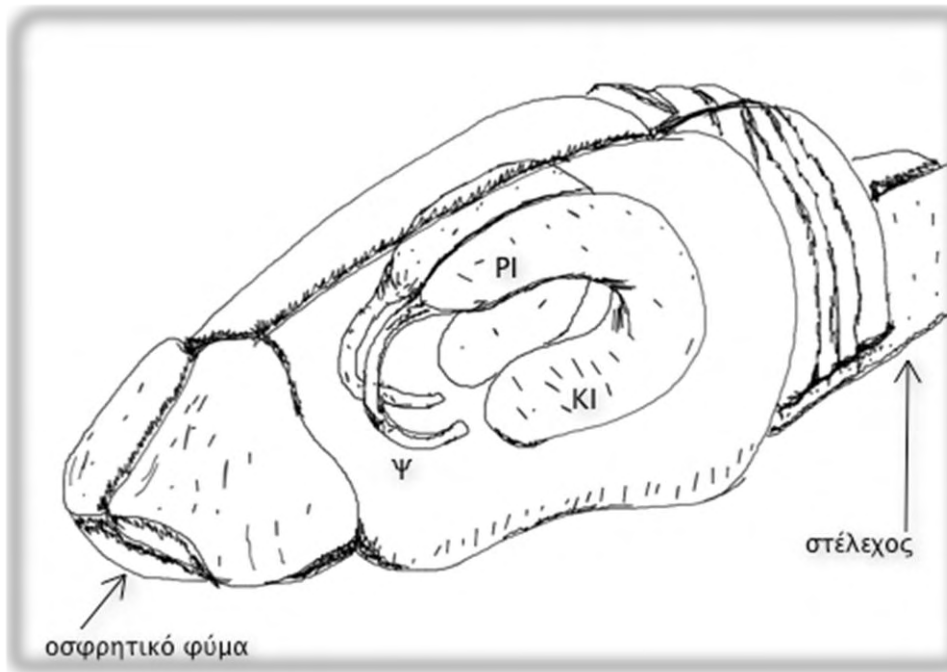


Εικόνα Α: Σχηματική αναπαράσταση εγκάρσιας τομής του ιπποκάμπου στον άνθρωπο. Με γκρίζο χρώμα απεικονίζεται η οδοντωτή έλικα (DG), η οποία παριστάνει πέταλο που περιβάλλει την CA4, η οποία μεταπίπτει στην CA3. Στην οδοντωτή έλικα απεικονίζεται κοκκώδης νευρώνας, οι βρυώδεις ίνες του οποίου καταλήγουν στη CA3. Οι μαύρες κουκκίδες αντιστοιχούν στο σύνολό τους στην πυραμιδική στιβάδα με τις υποδιαίρέσεις της (CA1, CA2, CA3). Η CA1 μεταπίπτει αριστερά στο υπόθεμα του ιπποκάμπου. Οι άξονες των πυραμιδικών πορεύονται στην σκάφη προς την ψαλίδα και αποτελούν τις απαγωγές ίνες του ιπποκάμπου. Οι παλίνδρομες παράπλευρες ίνες των πυραμιδικών της CA1 πορεύονται στη σκάφη προς τον ενδορρινικό φλοιό (ΕΦ), ενώ οι παράπλευρες ίνες του Schaffer (SC) των πυραμιδικών της CA3 πορεύονται στην ακτινωτή στιβάδα και δίνουν συνάψεις στους πυραμιδικούς νευρώνες της CA1. PP: Οδός της διάτρητης ουσίας, δίνει συνάψεις στους άνω δενδρίτες των πυραμιδικών νευρώνων και στους δενδρίτες των κοκκωδών νευρώνων της οδοντωτής έλικας.

σχέση με του ανθρώπου (61). Η παρούσα συζήτηση θα εστιαστεί πρωτίστως στα τρωκτικά, μιας και αυτά αποτελούν τη συνήθη ομάδα ειδών που χρησιμοποιείται για πειραματικούς σκοπούς. Στα τρωκτικά ο ιππόκαμπος μπορεί να θεωρηθεί ως μια κυλινδρική δομή, της οποίας ο επιμήκης άξονας σχηματίζει ημικύκλιο γύρω από το θάλαμο (Εικόνα Β). Ο ένας πόλος του ιπποκάμπου βρίσκεται εγγύς του κροταφικού κέρατος της πλαγίας κοιλίας και ονομάζεται κροταφικός ή κοιλιακός πόλος, ενώ ο άλλος πόλος βρίσκεται εγγύς του διαφράγματος και ονομάζεται διαφραγματικός ή ραχιαίος πόλος, επειδή εντοπίζεται ραχιαίως του κοιλιακού πόλου.

Τόσο ο ιδίως ιππόκαμπος όσο και η οδοντωτή έλικα έχουν τρεις στιβάδες νευρώνων. Στον ιδίως ιππόκαμπο διακρίνονται οι εξής στιβάδες (61):

- η στιβάδα των πολύμορφων νευρώνων (*stratum oriens*),
- η στιβάδα των πυραμιδικών νευρώνων (*stratum pyramidale*),



Εικόνα Β: Σχηματική αναπαράσταση εγκεφάλου επιμύου, στον οποίο -πέρα από τις εξωτερικές δομές- απεικονίζεται στο εσωτερικό του ο ιππόκαμπος άμφω. Ο ιππόκαμπος έχει πεταλοειδή μορφή με τους πόλους σε ρυγχαία κατεύθυνση. Ο κροταφικός πόλος θα ονομάζεται κοιλιακός ιππόκαμπος (ΚΙ) και ο διαφραγματικός πόλος ραχιαίος ιππόκαμπος (ΡΙ). Ψ: ψαλίδα. Η σήμανση του οσφρητικού φύματος και του στελέχους δίνει τη φορά του προσθιοπίσθιου άξονα του σχεδιαγράμματος.

- η μοριώδης στιβάδα, η οποία υποδιαιρείται στην ακτινωτή (*stratum radiatum*) και τη βοθριώδη (*stratum lacunosum-moleculare*).

Η οδοντωτή έλικα περιλαμβάνει τις εξής στιβάδες:

- την περιοχή ανάμεσα στην οδοντωτή έλικα και τη CA3 είναι το πολυμορφικό πεδίο της οδοντωτής έλικας (*polymorphic* ή *hilar region* ή απλά *hilus*), η οποία ισοδυναμεί με το πεδίο CA4,
- την κοκκιώδη στιβάδα (*stratum granulosum*) και
- τη μοριώδη στιβάδα (*stratum moleculare*).



## 1.2. Προβλητικοί νευρώνες του ιδίως ιπποκάμπου

Οι προβλητικοί νευρώνες του ιδίως ιπποκάμπου είναι οι πυραμιδικοί νευρώνες, οι οποίοι προσομοιάζουν στους πυραμιδικούς νευρώνες του νεοφλοιού, παρόλο που είναι κάπως μικρότερου μεγέθους. Είναι η πολυπληθέστερη ομάδα νευρώνων του ιπποκάμπου. (30, 61).

## 1.3. Προβλητικοί νευρώνες της οδοντωτής έλικας

Οι προβλητικοί νευρώνες της οδοντωτής έλικας είναι οι κοκκώδεις νευρώνες. Ο όρος «κοκκώδης» είναι περιγραφικός και δεν υπαινίσσεται κάποιου είδους λειτουργική ομοιότητα με τους κοκκώδεις νευρώνες άλλων εγκεφαλικών περιοχών. (30, 61).

## 1.4. Ενδονευρώνες του ιπποκάμπου

Οι ενδονευρώνες του ιπποκάμπου είναι ανασταλτικοί, GABAεργικοί νευρώνες (GABA: γ/ αμινοβουτυρικό οξύ). Ανάλογα με τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά, και συγκεκριμένα με κριτήριο τη διακλάδωση των αξόνων και των δενδριτών, αλλά και τις διασυνδέσεις τους, οι ενδονευρώνες διακρίνονται στις εξής κατηγορίες (19):

- I. **Chandelier ή αξο-αξονικοί ενδονευρώνες**
- II. **Καλαθοφόροι νευρώνες**
- III. **Ενδονευρώνες που νευρώνουν πυραμιδικούς νευρώνες**

### a. **Οδοντωτή έλικα**

- Ενδονευρώνες με δενδρίτες στο πολυμορφικό πεδίο και ανιόντες άξονες (HIPV νευρώνες).
- Ενδονευρώνες στο όριο του πολυμορφικού πεδίου με ανιόντες άξονες και δενδρίτες (HICAP νευρώνες).
- Ενδονευρώνες με άξονες και δενδρίτες στη μοριώδη-βοθριώδη στιβάδα (MOPP νευρώνες).
- Ενδονευρώνες του πολυμορφικού πεδίου που προβάλλουν στο Αμμόναιο κέρασ και το υπόθεμα.
- Ενδονευρώνες με άγνωστες απαγωγές συνδέσεις.

### b. Αμμώνειο κέρασ

- Ενδονευρώνες με δενδρίτες στη στιβάδα των πολυμόρφων κυττάρων και άξονες στη βοθριώδη-μοριακή στιβάδα (oriens-lacunosum/moleculare νευρώνες ή O-LM ενδονευρώνες) των οποίων οι άξονες καταλήγουν σε σύζευξη με προσαγωγές ίνες από το συνειρμικό οσφρητικό φλοιό (19, 20, 50).
- Διστιβαδωτοί και τριστιβαδωτοί ενδονευρώνες (bistratified and trilaminar neurons) της ακτινωτής στιβάδας και της στιβάδας των πολύμορφων νευρώνων.
- Ενδονευρώνες με άξονες και δενδρίτες στην ακτινωτή στιβάδα.
- Ενδονευρώνες της μοριώδους-βοθριώδους στιβάδας.
- Ενδονευρώνες των οποίων οι άξονες εξέρχονται των ορίων των διαφόρων υποδιαίρεσεων του ιπποκάμπου („back-projection neurons“).

## IV. Ενδονευρώνες που νευρώνουν ενδονευρώνες

Στη διεθνή βιβλιογραφία χαρακτηρίζονται ενδονευρώνες IS (interneuron specific) και διακρίνονται τρεις κατηγορίες (IS1, IS2, IS3) (7, 19, 20, 26).

Στην παρούσα εργασία έγιναν ενδοκυττάρια καταγραφές από ενδονευρώνες της στιβάδας των πολυμόρφων κυττάρων της CA1 περιοχής, οπότε παρακάτω θα αναφερθούν αναλυτικά τα είδη των ενδονευρώνων, που απαντώνται στη στιβάδα αυτή. Δίνεται βάση στη συνδεσμολογία και όχι στη μορφολογία των ενδονευρώνων.

### 1.4.1. Chandelier («είδει πολυελαίου») ή αξο-αξονικοί ενδονευρώνες.

Τα κυτταρικά σώματά τους εντοπίζονται συνήθως στην πυραμιδική στιβάδα ή κοντά σε αυτή, θεωρείται ωστόσο, ότι ενδοκυττάρια καταγραφές από ενδονευρώνες της στιβάδας των πολυμόρφων κυττάρων είναι δυνατό να προέρχονται από αξο-αξονικούς ενδονευρώνες. Οι δενδρίτες τους εξαπλώνονται σε όλες τις στιβάδες της CA1 και δέχονται συνάψεις από όλες της σημαντικές προσαγωγές οδούς της CA1 (19). Οι άξονες δίνουν συνάψεις αποκλειστικά στην έκφυση του άξονα των πυραμιδικών νευρώνων.

Οι αξο-αξονικοί ενδονευρώνες είναι σε μεγάλο ποσοστό ανοσοθετικοί για την παρβαλβουμίνη (19).

Σε ενδοκυττάρια ηλεκτροφυσιολογικές έρευνες σε συνθήκες καθήλωσης ρεύματος οι αξο-αξονικοί ενδονευρώνες επέδειξαν διπλές δυναμικών ενεργείας και το φαινόμενο προσαρμογής κατά τη διάρκεια παρατεταμένου εκπολωτικού παλμού ρεύματος (δηλαδή μείωση της συχνότητας και τελικά παύση των δυναμικών ενεργείας πριν τον τερματισμό του εκπολωτικού παλμού).

#### **1.4.2. Καλαθοφόροι ενδονευρώνες**

Οι καλαθοφόροι ενδονευρώνες που απαντώνται στη στιβάδα των πολυμόρφων κυττάρων της CA1 περιοχής ονομάζονται και πυραμιδικοί-καλαθοφόροι νευρώνες λόγω της διάταξης των δενδριτών εν είδει πυραμίδας. Όπως και οι αξο-αξονικοί ενδονευρώνες δέχονται συνάψεις από όλες της σημαντικές προσαγωγές οδούς της CA1. Δίνουν συνάψεις στους πυραμιδικούς νευρώνες και, συγκεκριμένα, στην περισωματική περιοχή. Κάποιοι καλαθοφόροι ενδονευρώνες δίνουν συνάψεις και σε ενδονευρώνες, οι οποίοι έχουν αναγνωριστεί ως καλαθοφόροι ή αξο-αξονικοί ενδονευρώνες (19).

Οι καλαθοφόροι ενδονευρώνες είναι ανοσοθετικοί α) για την παρβαλβουμίνη ή β) για την χολοκυστοκινίνη ή γ) τη χολοκυστοκινίνη και το αγγειοδραστικό σπλαχνικό πεπτίδιο (19, 26).

Σε ενδοκυττάρια ηλεκτροφυσιολογικές έρευνες σε συνθήκες καθήλωσης ρεύματος οι καλαθοφόροι ενδονευρώνες επέδειξαν δυναμικά ενεργείας σχετικά μικρής διάρκειας, μεγάλο μεθυπερπολωτικό δυναμικό (AHP), φαινόμενο προσαρμογής κατά τη διάρκεια παρατεταμένου εκπολωτικού παλμού ρεύματος (δηλαδή μείωση της συχνότητας και τελικά παύση των δυναμικών ενεργείας πριν τον τερματισμό του εκπολωτικού παλμού) (9). Επιπλέον, βρέθηκε ότι ταλαντώνονται σε συχνότητες που εμπίπτουν στους θήτα ( $4-10\text{ s}^{-1}$ ) και γάμμα ρυθμούς ( $25-40\text{ s}^{-1}$ ), αλλά και σε συχνότητες των  $200\text{ s}^{-1}$  (19).

#### **1.4.3. O-LM Ενδονευρώνες ή ενδονευρώνες με δενδρίτες στη στιβάδα των πολυμόρφων κυττάρων και άξονες στη βοθριώδη-μοριακή στιβάδα**

Οι ενδονευρώνες αυτοί έχουν κυτταρικά σώματα που εντοπίζονται στη στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων και είναι ανοσοθετικοί για τη σωματοστατίνη, κάποιοι και για το νευροπεπτίδιο Υ. Σε πολλές μελέτες (21, 50) (μορφολογικές και ηλεκτροφυσιολογικές) τονίζεται η χωρική εγγύτητα των αξονικών απολήξεων των

ενδονευρώνων αυτών με τις νευρικές απολήξεις των διεγερτικών ινών της (έξω) οδού της διάτρητης ουσίας. Τόσο οι O-LM ενδονευρώνες όσο και η έξω οδός της διάτρητης ουσίας (η οποία φέρει εγκεφαλινεργικές ίνες, βλ. παρακάτω) δίνουν συνάψεις στους άπω δενδρίτες των πυραμιδικών νευρώνων (50).

Σε ηλεκτροφυσιολογικές έρευνες οι ενδονευρώνες αυτοί επέδειξαν σχετικά «μεγάλο I<sub>h</sub>» και δυναμικά ενεργείας ασβεστίου. Επίσης, επέδειξαν ταλάντωση σε συχνότητα που ενέπιπτε στο θ ρυθμό (4-10 s<sup>-1</sup>) (19).

#### **1.4.4. Διστιβαδωτοί και τριστιβαδωτοί ενδονευρώνες**

Τα κυτταρικά σώματα εντοπίζονται στην πυραμιδική στιβάδα ή στο όριο σκάφης/στιβάδας των πολυμόρφων κυττάρων.

Οι τριστιβαδωτοί ενδονευρώνες χωρίζονται σε οριζόντιους και ακτινωτούς. Οι άξονές τους εξέρχονται του ιπποκάμπου, πιθανώς προβάλλουν στο διάφραγμα (19). Δίνουν συνάψεις σε δενδρίτες πυραμιδικών νευρώνων και δενδρίτες απροσδιορίστου προελεύσεως. Επίσης, παρατηρούνται σχετικά συχνά συνάψεις σε σώματα πυραμιδικών νευρώνων. Οι βασικές προσαγωγές ίνες των οριζόντιων τριστιβαδωτών ενδονευρώνων είναι οι παράπλευρες αξονικές ίνες των πυραμιδικών της CA1 περιοχής.

Οι διστιβαδωτοί ενδονευρώνες έχουν άξονες που περιορίζονται στην ακτινωτή στιβάδα και δίνουν συνάψεις σε δενδρίτες των πυραμιδικών νευρώνων στην ακτινωτή στιβάδα. Εξαιρετικά σπάνιες είναι οι συνάψεις που δίνουν σε σώματα των πυραμιδικών νευρώνων. Οι άξονές τους ακολουθούν την πορεία των παράπλευρων ινών του Schaffer. Οι βασικές προσαγωγές ίνες που δέχονται είναι συνδεσμικές ίνες και παράπλευρες αξονικές ίνες των πυραμιδικών της CA1 περιοχής.

Σε ηλεκτροφυσιολογικές έρευνες οι διστιβαδωτοί ενδονευρώνες επέδειξαν δυναμικά ενεργείας μεγαλύτερης διάρκειας σε σχέση με τους καλαθοφόρους καθώς και το φαινόμενο της προσαρμογής (9).

#### **1.4.5. Ανασταλτικοί νευρώνες των οποίων οι άξονες εξέρχονται των ορίων των διαφόρων υποδιαίρεσεων του ιπποκάμπου („back-projection neurons“)**

Οι νευρώνες αυτοί, ανεξάρτητα με την εντόπιση του κυτταρικού σώματος σε συγκεκριμένη υποδιαίρεση του ιπποκάμπου (CA1 έως CA3-4), έχουν άξονες που δίνουν συνάψεις σε άλλες υποδιαίρεσεις του ιπποκάμπου. Τα κυτταρικά σώματα και οι

δενδρίτες των „back-projection neurons“ βρίσκονται στη στιβάδα των πολυμόρφων κυττάρων, ενώ οι άξονες πορεύονται στη στιβάδα των πολυμόρφων κυττάρων, την πυραμιδική και την ακτινωτή. Οι προσαγωγές ίνες που δέχονται είναι κυρίως παράπλευρες αξονικές ίνες των πυραμιδικών της CA1 περιοχής.

Είναι ανοσοθετικοί για τη σωματοστατίνη, την καλβιδίνη, το νευροπεπτίδιο Υ και τη συνθάση του νιτρικού οξέως. Σε ηλεκτροφυσιολογικές έρευνες οι νευρώνες αυτοί επέδειξαν σχετικά «μικρό I<sub>h</sub>» και υπερπόλωση συνεπεία διέγερσης συνδεδεσμένων ινών (19).

#### **1.4.6. Ενδονευρώνες IS-1: Ενδονευρώνες που νευρώνουν ενδονευρώνες, τύπου 1 (interneuron-specific interneurons 1)**

Η πλειονότητα αυτών των ενδονευρώνων απαντάται στη CA1 περιοχή του ιπποκάμπου. Τα κυτταρικά σώματα βρίσκονται στην πυραμιδική, την ακτινωτή και τη στιβάδα των πολυμόρφων κυττάρων. Οι δενδρίτες εξαπλώνονται κατά κύριο λόγο στην ακτινωτή στιβάδα και δίνουν δενδροδενδριτικές εφραπτικές συνάψεις μεταξύ τους. Οι άξονές τους πορεύονται στην ακτινωτή στιβάδα και είναι ανοσοθετικοί για την καλρετίνη. Δίνουν συνάψεις σε σώματα και δενδρίτες ανοσοθετικών για καλβιδίνη ενδονευρώνων, οι οποίοι νευρώνουν δενδρίτες πυραμιδικών νευρώνων. Έχει βρεθεί ότι είναι ανοσοθετικοί για την εγκεφαλίνη (7, 20). Άλλοι συναπτικοί στόχοι των ενδονευρώνων είναι ενδονευρώνες IS-1 και, κατά δεύτερο λόγο, καλαθοφόροι ενδονευρώνες ανοσοθετικοί για το αγγειοδραστικό σπλαχνικό πεπτίδιο. Ενδονευρώνες ανοσοθετικοί για την παρβαλβουμίνη (μεταξύ των οποίων και καλαθοφόροι) δεν δέχονται συνάψεις από τους ενδονευρώνες IS-1. Διεγερτικές προσαγωγές ίνες των ενδονευρώνων IS-1 είναι οι συνδεδεσμένες ίνες και ενδεχομένως η οδός της διάτρητης ουσίας (20, 26).

#### **1.4.7. Διαφοροποίηση των ενδονευρώνων του ιδίως ιπποκάμπου κατά μήκος του επιμήκους άξονα**

Σύμφωνα με ευρήματα ερευνών ανοσοϊστοχημείας η κατανομή των ενδονευρώνων κατά μήκος του επιμήκους άξονα του ιπποκάμπου με κριτήριο την ανοσοθετικότητά τους σε πρωτεΐνες που δεσμεύουν το ασβέστιο και νευροπεπτίδια παρουσιάζει τα εξής χαρακτηριστικά (56):

- η αριθμητική πυκνότητα των ανοσοθετικών στην καλρετινίνη ενδονευρώνων είναι σημαντικά μεγαλύτερη στον κοιλιακό ιππόκαμπο σε σχέση με τον ραχιαίο ιππόκαμπο.
- η αριθμητική πυκνότητα των ανοσοθετικών ενδονευρώνων στη συνθάση του οξειδίου του αζώτου είναι σημαντικά μεγαλύτερη στην οδοντωτή έλικα και την περιοχή CA3 του κοιλιακού ιπποκάμπου.
- η αριθμητική πυκνότητα των ανοσοθετικών ενδονευρώνων στη σωματοστατίνη είναι σημαντικά μεγαλύτερη στην οδοντωτή έλικα και την περιοχή CA1 του κοιλιακού ιπποκάμπου.
- η αριθμητική πυκνότητα των ενδονευρώνων που είναι ανοσοθετικοί στη παρβαλβουμίνη, τη χολοκυστοκινίνη και το αγγειοδραστικό σπλαχνικό πεπτίδιο ήταν παρόμοια στην κοιλιακή και τη ραχιαία μοίρα.
- Στον κοιλιακό ιππόκαμπο η αναλογία των παραπάνω υποειδών ενδονευρώνων διαφέρει σε CA1 και CA3, ενώ στο ραχιαίο ιππόκαμπο είναι παρόμοια στις περιοχές CA1 και CA3 (Nomura T. et al, 1997).

Είναι λοιπόν αξιοπρόσεκτο, πως ενώ υπάρχουν σαφή στοιχεία από μορφολογικές έρευνες που εδραιώνουν τις διαφορές του πληθυσμού των ενδονευρώνων στον κοιλιακό και το ραχιαίο ιππόκαμπο, δεν υπάρχουν (επαρκή) στοιχεία για τα ηλεκτροφυσιολογικά χαρακτηριστικά των ενδονευρώνων του κοιλιακού ιπποκάμπου. Για παράδειγμα, αν συνοψιστούν τα παραπάνω στοιχεία για τους ενδονευρώνες της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου φαίνεται ότι ενδονευρώνες όπως οι καλαθοφόροι (ανοσοθετικοί για παρβαλβουμίνη, χολοκυστοκινίνη ή το αγγειοδραστικό σπλαχνικό πεπτίδιο) και οι αξο-αξονικοί (ανοσοθετικοί για παρβαλβουμίνη) παρουσιάζουν παρόμοια αριθμητική πυκνότητα σε κοιλιακό και ραχιαίο ιππόκαμπο. Αντίθετα, ενδονευρώνες όπως οι IS-1 (ανοσοθετικοί σε καλρετινίνη) και οι O-LM ενδονευρώνες (ανοσοθετικοί σε σωματοστατίνη) παρουσιάζουν μεγαλύτερη αριθμητική πυκνότητα στον κοιλιακό ιππόκαμπο.

*Επειδή α) οι ανοσοθετικοί σε καλρετινίνη ενδονευρώνες φέρονται ως βασικοί φορείς ανοσοθετικότητας σε εγκεφαλίνη (9), β) οι O-LM ενδονευρώνες δίνουν συνάψεις στα ίδια σημεία με τις εγκεφαλινεργικές ίνες της έξω οδού της διάτρητης ουσίας (19) και γ) οι πρώτοι δίνουν συνάψεις στους δεύτερους (19), είναι λογική η υπόθεση ότι η δράση των οπιοειδών διαφέρει σε κοιλιακό και ραχιαίο ιππόκαμπο.*

Αυτό υποστηρίζουν και έρευνες που κατέδειξαν ότι η έγχυση οπιοειδών στον κοιλιακό αλλά όχι στο ραχιαίο ιππόκαμπο *in vivo* οδηγεί σε επιληπτική κρίση (35).

*Έτσι, ενδιαφέρον παρουσιάζει, πέρα από τον ηλεκτροφυσιολογικό χαρακτηρισμό των ενδονευρώνων του κοιλιακού ιπποκάμπου, η διερεύνηση της δράσης εξωγενών οπιοειδών στους ενδονευρώνες αυτούς.*

Στην επόμενη ενότητα αναφέρονται στοιχεία για τη δράση των οπιοειδών στον ιππόκαμπο.

## 1.5. Οπιοειδή

Τα εξωγενή οπιοειδή (όπιο, μορφίνη) είναι εδώ και αιώνες γνωστά για την αναλγητική και ευφορική τους δράση. Το όπιο αναφέρεται στην αρχαιότητα ως ουσία που καταλύει τον σωματικό και ψυχικό πόνο. Το 19<sup>ο</sup> αιώνα ανακαλύφθηκε αρχικά η μορφίνη και εν συνεχεία η κωδεΐνη, ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ευρέως ως αναλγητικά και κατασταλτικά (λάβδανο). Η ηρωίνη παρασκευάστηκε το 1898 ως θεραπευτικό μέσο ενάντια στον εθισμό από τη μορφίνη, μέχρι που έγινε σαφές, ότι με τη χορήγηση της ηρωίνης απλά αντικαθίσταται ο εθισμός στη μορφίνη με ένα νέο εθισμό, αυτόν στην ηρωίνη (8). Ο εθισμός στα οπιοειδή αναγνωρίστηκε ως κλινική οντότητα σταδιακά στην ολότητά του με όλες τις ιατρικές και κοινωνικές συνέπειες και η χορήγηση των οπιοειδών για μη ιατρικούς λόγους απαγορεύτηκε.

Σήμερα τόσο η χρησιμότητα των οπιοειδών στην ιατρική όσο και τα πολυδιάστατα προβλήματα που προκύπτουν από την κατάχρηση και τον εθισμό παραμένουν αδιαμφισβήτητα δεδομένα στην ιατρική και την κοινωνία.

Αυτό που έχει αλλάξει τα τελευταία τριάντα χρόνια είναι η κατανόηση του τρόπου δράσης τους και τα επιστημονικά δεδομένα για τα ενδογενή οπιοειδή και τους υποδοχείς τους.

Η πολυπλοκότητα του συστήματος των ενδογενών οπιοειδών (αλλιώς: ενδορφινών) έγινε γνωστή με την ανακάλυψη πληθώρας διαφορετικών ενδογενών οπιοειδών και των υποδοχέων τους, με τη διαλεύκανση του τρόπου σύνθεσής τους στον εγκέφαλο και τη συγγένειά τους με άλλες ουσίες (π.χ. ACTH), καθώς και τη μελέτη των διαφορετικών λειτουργιών τους (2).

Η ανακάλυψη ότι τα οπιοειδή δρουν μέσω ειδικών υποδοχέων και όχι μέσω έμμεσης επίδρασής τους στα επίπεδα των μονοαμινών και της χολοκυστοκινίνης έγινε τη δεκαετία του 1970 (2, 24) και αποτέλεσε σταθμό στην έρευνα για τη δράση των

οπιοειδών. Η επιστημονική κοινότητα οδηγήθηκε στο λογικό συμπέρασμα ότι, για να υπάρχουν υποδοχείς στους οποίους προσδένονται εξωγενή οπιοειδή, πρέπει να υπάρχουν και ενδογενή οπιοειδή. Έτσι ανακαλύφθηκαν οι ενδορφίνες, όπως ονομάζονται στη διεθνή βιβλιογραφία τα ενδογενή οπιοειδή (2, 5). Τα ενδογενή οπιοειδή αναφέρονται στον Πίνακα Α.

Πρόδρομα μόρια των ενδορφινών είναι η προοπιομελανοκορτίνη (της β-ενδορφίνης αλλά και της ACTH), η προεγκεφαλίνη (της μεθ- και λευ-εγκεφαλίνης) και η προδουνορφίνη (της δουνορφίνης Α, της δουνορφίνης Β και της νέο-ενδορφίνης) (2, 5).

Βασικοί υποδοχείς των οπιοειδών είναι οι μ-, δ- και κ- υποδοχείς, με τους βασικούς υποτύπους μ<sub>1</sub>, μ<sub>2</sub>, δ<sub>1</sub>, δ<sub>2</sub>, κ<sub>1</sub>, και κ<sub>2</sub>. Από φαρμακοδυναμική άποψη, η δράση των οπιοειδών μετά από ενεργοποίηση των μ- και δ- υποδοχέων είναι παρόμοια, ενώ μέσω ενεργοποίησης των κ- υποδοχέων παρατηρούνται εντελώς διαφορετικές δράσεις. Σε γενικές γραμμές η συγγένεια των ενδογενών οπιοειδών για τους υποδοχείς τους δεν είναι ιδιαίτερα ισχυρή, με αποτέλεσμα μία ουσία να μπορεί να προσδεθεί σε δύο ή περισσότερα είδη υποδοχέων (2). Πάντως οι εγκεφαλίνες παρουσιάζουν συγκριτικά μεγαλύτερη συγγένεια για τους δ- υποδοχείς, οι δουνορφίνες για τους κ- υποδοχείς, ενώ οι ενδομορφίνες για τους μ- υποδοχείς (70). Οι σ υποδοχείς δεν θεωρούνται πλέον οπιοειδείς, γιατί η ναλοξόνη δε δρα ανταγωνιστικά σε αυτούς (2). Επιπλέον αναφέρεται πληθώρα υποειδών των τριών βασικών υποδοχέων των οπιοειδών, που δεν θα απασχολήσουν στην προκειμένη μελέτη (π.χ. ε-, ι-, λ- και ζ- υποδοχείς). Στους οπιοειδείς υποδοχείς ανήκει και ο NOP1 (πρώην ORL-1) στον οποίο προσδένεται η νοσισεπτίνη ή ορφανίνη FQ (2).

### 1.5.1. Οπιοειδή και ιππόκαμπος

Η αναλγητική δράση των οπιοειδών βασίζεται στην ενεργοποίηση υποδοχέων που βρίσκονται στο νωτιαίο μυελό και το στέλεχος (κυρίως στη φαιά ουσία περί τον υδραγωγό) (44). Η ψυχευφορική και εθιστική δράση τους ωστόσο θεωρείται ότι βασίζεται στην ενεργοποίηση υποδοχέων τους στον ιππόκαμπο, ο οποίος αποτελεί τμήμα του λιμπικού συστήματος (49). Η δράση των οπιοειδών στον ιππόκαμπο έχει λοιπόν μελετηθεί διεξοδικά, καθώς η κατανόηση των μηχανισμών που οδηγούν στην έξη, έχει μεγάλη κλινική σημασία.

Κατά πρώτον, έχει ιδιαίτερη σημασία το γεγονός, ότι ενώ στις υπόλοιπες δομές του κεντρικού νευρικού συστήματος τα οπιοειδή δρουν ανασταλτικά, στον ιππόκαμπο



προκαλείται διέγερση των προβλητικών νευρώνων, που μπορεί να οδηγήσει σε επιληπτική κρίση (35). Η δράση αυτή εξηγείται ως το αποτέλεσμα της αναστολής των ανασταλτικών νευρώνων (GABA-εργικών ενδονευρώνων) μέσω των οπιοειδών, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε διέγερση των προβλητικών νευρώνων (πυραμιδικών νευρώνων) μέσω άρσης της αναστολής (στη διεθνή βιβλιογραφία disinhibition, σε ακριβή μετάφραση «δυσαναστολή») (10, 14, 51).

Η δυσαναστολή που προκαλούν τα οπιοειδή στον ιππόκαμπο ήταν γνωστή από πολλά χρόνια.

<b>Ενδογενή οπιοειδή πεπτίδια</b>		
<b><u>Από την προεγκεφαλίνη:</u></b>	<b><u>Από την προδουνορφίνη:</u></b>	<b><u>Από την προοπιομελανοκορτίνη</u></b>
Μεθ-εγκεφαλίνη	Λευ-μορφίνη	α Ενδορφίνη
Λευ-εγκεφαλίνη	Δυνορφίνη Α (έξι τύποι)	γ Ενδορφίνη
Μεθ-εγκεφαλίνη-αργ-φαι	β Νεοενδορφίνη	β Ενδορφίνη (1-26)
Μεθ-εγκεφαλίνη-αργ-γλυ-λευ	α Νεοενδορφίνη	β Ενδορφίνη (1-27)
Μεθορφαμίδη	Δυνορφίνη Β	β Ενδορφίνη (1-31)
BAM 12	Δυνορφίνη 32 (ΑΒ)	
BAM 18		
BAM 22		
Πεπτίδιο Ε		
Αμιδορφίνη		
Πεπτίδιο F		
<b><u>Από την προορφανίνη:</u></b>		
<i>Νοσισεπτίνη ή ορφανίνη FQ</i>		
<b><u>Χωρίς αναγνωρισμένο πρόδρομο μόριο:</u></b>		
<i>Ενδομορφίνη 1, Ενδομορφίνη 2</i>		

Πίνακας Α: Τα ενδογενή οπιοειδή πεπτίδια σε κατάταξη με κριτήριο το πρόδρομο μόριο, από το οποίο προέρχονται (5). Οι αριθμοί υποδηλώνουν το πλήθος των αμινοξέων των πεπτιδίων. Μεθ: μεθειονίνη, λευ: λευκίνη, αργ: αργινίνη, γλυ: γλυκίνη.

Τελευταία πληθαίνουν οι ενδείξεις, ότι η δυσαναστολή νευρώνων μέσω των οπιοειδών αποτελεί βασικό μηχανισμό της δράσης τους σε διάφορα κυκλώματα (μεγάλος πυρήνας της ραφής, κοιλιακή καλύπτρα, φαιά ουσία περί τον υδραγωγό, 53). Επιπλέον υπάρχουν στοιχεία ότι τα οπιοειδή εξασκούν και άμεση διεγερτική δράση (π.χ. στον ιππόκαμπο) ενισχύοντας τα NMDA-εξαρτώμενα EPSP (47).

Η σημασία της δράσης των οπιοειδών στον ιππόκαμπο γίνεται κατανοητή, αν θεωρήσει κανείς τα φαινόμενα, τα οποία παρατηρούνται κατά τη χρόνια χρήση ή την κατάχρησή τους, ως φαινόμενα που σχετίζονται άμεσα με τη λειτουργία της μνήμης. Η ανάπτυξη της αντοχής στα οπιοειδή, της έξης, της χαρακτηριστικής συμπεριφοράς craving και, τελικά, το φαινόμενο της υποτροπής μετά από επιτυχή απεξάρτηση ακόμα και αν μεσολαβήσουν χρόνια από την τελευταία έκθεση στην ουσία πιστεύεται ότι σχετίζονται με την πλαστικότητα των συνάψεων του ιπποκάμπου και το ρόλο του στη λειτουργία της μνήμης (50). Φυσικά μελετώνται και άλλες δομές ως τόπος δράσης των οπιοειδών προκειμένου να εξηγηθούν τα παραπάνω φαινόμενα, όπως για παράδειγμα οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες του λιμπικού συστήματος και δομές του στελέχους (45). Υπάρχουν όμως στοιχεία, ότι ένας ακέραιος ιππόκαμπος είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την ανάπτυξη έξης (49).

Αντίστροφα, το γεγονός ότι τα οπιοειδή επιδρούν τόσο εκτενώς στα κυκλώματα του ιπποκάμπου φαίνεται λογικό, αφού είναι ευρέως γνωστό, ότι ερεθίσματα που προκαλούν ευφορία –προφανώς μέσω έκκρισης ενδορφινών- ενισχύουν το σχηματισμό μνημονικών εγγραμμάτων (49).

Προκειμένου να διερευνηθεί η σχέση των οπιοειδών με φαινόμενα όπως τα παραπάνω, έχουν διεξαχθεί διεθνώς πειράματα με αντικείμενο τη δράση των οπιοειδών στις παθητικές και ενεργητικές ιδιότητες των νευρώνων του ιπποκάμπου (41), τη δράση των οπιοειδών στους διαύλους της κυτταρικής μεμβράνης των νευρώνων του ιπποκάμπου γενικότερα (10, 48), στη συναπτική δραστηριότητα των ενδονευρώνων και των πυραμιδικών νευρώνων (36, 69), στους μηχανισμούς του LTD (long term depression) (68) και LTP (long term potentiation) (69), στις ταλαντώσεις των ενδονευρώνων και τους χαρακτηριστικούς ρυθμούς  $\theta$  του ιπποκάμπου (50). Επίσης, έχουν διερευνηθεί η εντόπιση των υποδοχέων των οπιοειδών στον ιππόκαμπο τόσο σε κυτταρικό όσο και υποκυτταρικό επίπεδο (12, 27), αλλά και η προέλευση των ενδογενών οπιοειδών, που δρουν στον ιππόκαμπο (21).

### **1.5.2. Προέλευση των ενδορφινών που δρουν στον ιππόκαμπο**

Έχουν χρησιμοποιηθεί ανοσοϊστοχημικές μέθοδοι για να αναγνωριστούν οι εγκεφαλινεργικές ίνες που καταλήγουν σε δομές του ιπποκάμπου και οι νευρώνες του ιπποκάμπου που περιέχουν εγκεφαλίνη (7,21).

Σε ό,τι αφορά στον ιδίως ιππόκαμπο, οι εξωγενείς προσαγωγές ίνες που περιέχουν εγκεφαλίνη προέρχονται:

- από την οδοντωτή έλικα (βρυώδεις ίνες, οι οποίες προβάλλουν στη CA3, 21)
- από το συνειρμικό οσφρητικό φλοιό (έξω οδός της διάτρητης ουσίας, 21)
- από τον ενωτικό πυρήνα του θαλάμου (κροταφοαμμωνική οδός, με την οποία συνενώνεται η έξω οδός της διάτρητης ουσίας και μαζί αποτελούν τη βασικότερη διεγερτική προσαγωγό οδό στην περιοχή CA1, 50).

Σχετικά με τους νευρώνες του ιδίως ιπποκάμπου που περιέχουν εγκεφαλίνη, τα δεδομένα συγκλίνουν στο συμπέρασμα ότι πρόκειται αποκλειστικά για ενδονευρώνες (7). Στην περιοχή CA1 εντοπίστηκαν ανοσοθετικοί για εγκεφαλίνη ενδονευρώνες σε όλες τις στιβάδες, αν και ήταν λιγότερα αριθμητικά σε σχέση με τους ανοσοαρνητικούς για εγκεφαλίνη ενδονευρώνες. Οι άξονες των ανοσοθετικών για εγκεφαλίνη ενδονευρώνων εντοπίστηκαν επίσης σε όλες τις στιβάδες, αλλά περισσότερο στη στιβάδα των πολυμόρφων κυττάρων (*str. oriens*) και έδιναν πάντα συμμετρικές (δηλ. ανασταλτικές) συνάψεις (7).

Για την καλύτερη κατανόηση του ρόλου των ανοσοθετικών για εγκεφαλίνη ενδονευρώνων στη ρύθμιση της διεγερσιμότητας των κυκλωμάτων του ιπποκάμπου εξετάστηκε με ανοσοϊστοχημεία η παρουσία άλλων δεικτών σε αυτούς τους ενδονευρώνες και στους μετασυναπτικούς τους στόχους. Κλασικά εξετάζεται με ανοσοϊστοχημεία η παρουσία ασβεστιοδεσμευτικών πρωτεϊνών, όχι γιατί ενδιαφέρει η λειτουργία των πρωτεϊνών αυτών, αλλά γιατί η παρουσία τους χαρακτηρίζει λειτουργικά διαφορετικούς ενδονευρώνες. Επίσης εξετάζεται για τον ίδιο λόγο η ύπαρξη διαφόρων νευροπεπτιδίων. Παρατηρήθηκε ότι οι ανοσοθετικοί για εγκεφαλίνη ενδονευρώνες ήταν επίσης ανοσοθετικοί για την καλρετινίνη και τον αγγειοδραστικό σπλαχνικό παράγοντα και ότι οι ανοσοθετικοί για την καλρετινίνη και τον αγγειοδραστικό εντερικό παράγοντα ενδονευρώνες (ανοσοθετικοί για εγκεφαλίνη ή μη) ήταν συναπτικός στόχος των ανοσοθετικών για εγκεφαλίνη ενδονευρώνων σε όλες τις στιβάδες της περιοχής CA1 (7). Ειδικά στη στιβάδα των πολυμόρφων κυττάρων, ο συναπτικός στόχος των ανοσοθετικών για εγκεφαλίνη ενδονευρώνων ήταν ενδονευρώνες ανοσοθετικοί για τη σωματοστατίνη.

Σύμφωνα με τα παραπάνω στοιχεία και αφού είναι γνωστή η συνδεσμολογία των ενδονευρώνων με συγκεκριμένο προφίλ ανοσοθετικότητας στις

ασβεστιοδεσμευτικές πρωτεΐνες (19) εξήχθη το συμπέρασμα, ότι οι ανοσοθετικοί για εγκεφαλίμη ενδονευρώνες του ιπποκάμπου δίνουν συνάψεις σε ανοσοθετικούς και ανοσοαρνητικούς για εγκεφαλίμη ενδονευρώνες. Αυτοί οι ανοσοαρνητικοί για εγκεφαλίμη ενδονευρώνες δίνουν με τη σειρά τους συνάψεις στους δενδρίτες πυραμιδικών νευρώνων (7).

Το ενδεχόμενο κάποιοι πυραμιδικοί νευρώνες να αποτελούν συναπτικό στόχο των ανοσοθετικών για εγκεφαλίμη ενδονευρώνων δεν έχει αποκλειστεί, αλλά είναι λιγότερο πιθανό (7).

### 1.5.3. Υποδοχείς των οπιοειδών και συστήματα δεύτερου μεταβιβαστή

Σε αντίθεση με την πληθώρα των ενδορφινών και των εξωγενών οπιοειδών, οι σαφώς αναγνωρισμένες υποομάδες των οπιοειδών υποδοχέων είναι μόλις τρεις: οι μ-, οι δ- και οι κ- υποδοχείς (2). Η εντόπισή τους στο κεντρικό νευρικό σύστημα έχει μελετηθεί με ραδιοϊστοχημικές και ανοσοϊστοχημικές μελέτες (12, 27, 44, 67). Εδώ θα αναφερθεί η εντόπιση τους στον ιππόκαμπο και, συγκεκριμένα στις στιβάδες της περιοχής CA1, επειδή στην περιοχή αυτή διενεργήθηκε η προκειμένη μελέτη.

- Οι μ- υποδοχείς της CA1 περιοχής εντοπίζονται στην πλειονότητά τους στην πυραμιδική και πολύμορφη στιβάδα και, κατά δεύτερο λόγο, στη βοθριώδη-μοριακή στιβάδα (50). Βρίσκονται πάνω σε ενδονευρώνες και, κατά κύριο λόγο, είναι μεμβρανικοί υποδοχείς. Σε υποκυτταρικό επίπεδο εντοπίζονται στους άξονες, στις τελικές απολήξεις, στο σώμα και στους δενδρίτες των ενδονευρώνων. Χαρακτηρίζουν κυρίως ενδονευρώνες που δίνουν συνάψεις σε σώματα πυραμιδικών νευρώνων (στην πυραμιδική στιβάδα) και εντοπίζονται σπανιότερα σε ενδονευρώνες που δίνουν συνάψεις στους άπω κορυφαίους δενδρίτες των πυραμιδικών νευρώνων (στη βοθριώδη-μοριακή στιβάδα) (64). Σε περιορισμένο βαθμό απαντώνται σε ανοσοθετικούς για την καλρετινίνη και τον αγγειοδραστικό σπλαχνικό παράγοντα ενδονευρώνες, οι οποίοι δίνουν συνάψεις σε άλλους ενδονευρώνες (49). Οι ενδονευρώνες που έχουν μ- υποδοχείς είναι συχνά ανοσοθετικοί για την παραλβουμίνη και συνήθως αρνητικοί για τη χολοκυστοκινίνη. Εξάλλου, ενδονευρώνες με μ- υποδοχείς ήταν συχνά ανοσοθετικοί για τη σωματοστατίνη και το νευροπεπτίδιο-Υ, στην περίπτωση αυτή επρόκειτο για ενδονευρώνες με μορφολογικά χαρακτηριστικά

O-LM ενδονευρώνων, οι οποίοι έδιναν συνάψεις σε άπω δενδρίτες των πυραμιδικών νευρώνων (49).

*Η ενεργοποίηση των μ- υποδοχέων οδηγεί σε άμεση υπερπόλωση των ενδονευρώνων (μετασυναπτικοί μ- υποδοχείς) και αναστολή της απελευθέρωσης του GABA από τις τελικές απολήξεις (προσυναπτικοί μ- υποδοχείς).*

- Οι δ- υποδοχείς της CA1 περιοχής απαντώνται σε αντίθεση με τους μ- υποδοχείς όχι μόνο στην κυτταρική μεμβράνη, αλλά και σε ενδοκυττάρια θέσεις, όπως το κυτόπλασμα και τα βακουόλια των τελικών απολήξεων (10, 12, 41, 49, 64). Σε ανοσοϊστοχημικές μελέτες παρατηρήθηκε, ότι η πλειονότητα των δ- υποδοχέων εντοπίζεται σε θετικούς για το GABA νευρώνες, δηλ. ενδονευρώνες, ενώ μικρό ποσοστό δ- υποδοχέων απαντήθηκε σε πυραμιδικούς νευρώνες. Είναι ακόμη αμφιλεγόμενο αν υπάρχουν δ- υποδοχείς σε πυραμιδικούς νευρώνες ή αν στις άνωθεν μελέτες εντοπίστηκαν εξωγενείς προσαγωγές εγκεφαλινεργικές νευρικές οδοί, οι οποίες λανθασμένα αναγνωρίστηκαν ως άξονες των πυραμιδικών νευρώνων. Γεγονός παραμένει ότι, παρόλη την εκτενή έρευνα με ηλεκτροφυσιολογικές μεθόδους, δεν αποκαλύφθηκε δράση των οπιοειδών στους πυραμιδικούς νευρώνες της CA1 περιοχής που να οφείλεται στην ενεργοποίηση δ- υποδοχέων (40). Οι δ- υποδοχείς απαντώνται στην πολύμορφη στιβάδα της περιοχής CA1 σε μεγαλύτερη πυκνότητα από ό,τι στις άλλες στιβάδες και στον κοιλιακό ιππόκαμπο σε μεγαλύτερη πυκνότητα από ό,τι στον ραχιαίο ιππόκαμπο. Στη δε πολύμορφη στιβάδα και τη σκάφη η συντριπτική πλειονότητα των ενδονευρώνων με δ- υποδοχείς είναι θετικοί για GABA. Όπως οι μ- υποδοχείς έτσι και οι δ- υποδοχείς εντοπίζονται στο σώμα (ωστόσο κυρίως ενδοκυτταρίως), στους δενδρίτες, στους άξονες και τις τελικές απολήξεις (12).

*Η ενεργοποίηση των δ- υποδοχέων ενισχύει τη δράση διεγερτικών προσαγωγών ινών (παράπλευρες ίνες του Schaffer, έξω οδός της διάτρητης ουσίας και συνδεσμικές ίνες) στη CA1 περιοχή και επηρεάζει έμμεσα τη χρονική και τοπική άθροιση των μετασυναπτικών δυναμικών στους δενδρίτες των πυραμιδικών νευρώνων μέσω προσυναπτικής δράσης στους ενδονευρώνες (64).*

- Οι κ- υποδοχείς της CA1 περιοχής απαντώνται σε ενδονευρώνες και μάλιστα στην πολύμορφη, στην πυραμιδική και την ακτινωτή στιβάδα (27). Σχετικά με την παρουσία τους σε πυραμιδικούς νευρώνες τα ανατομικά στοιχεία δεν είναι ξεκάθαρα, χωρίς ωστόσο να αποκλείουν το ενδεχόμενο αυτό. Η πλειονότητα των κ- υποδοχέων βρίσκεται στην πολύμορφη στιβάδα και σε μεγαλύτερη

πυκνότητα στον κοιλιακό ιππόκαμπο. Επίσης κ- υποδοχείς βρίσκονται στην πυραμιδική στιβάδα και, πολύ αραιότερα, στην ακτινωτή στιβάδα. Οι κ- υποδοχείς βρίσκονται σε μετασυναπτικές και προσυναπτικές δομές. Όπως και οι δ- υποδοχείς εντοπίζονται σε μεμβρανικές και ενδοκυττάριας θέσεις (27). Ενδιαφέρον για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της προκειμένης μελέτης παρουσιάζει η αναφορά, ότι οι κ- υποδοχείς –σε αντίθεση με τους μ- και δ- υποδοχείς- ενισχύουν το ρεύμα I<sub>h</sub> στο μεγάλο πυρήνα της ραφής. Πρόκειται για την πρώτη αναφορά σε ενίσχυση του I<sub>h</sub> μέσω ενεργοποίησης οπιοειδών υποδοχέων και, μάλιστα, μέσω διαφορετικού μηχανισμού: όχι μέσω επίδρασης στην αδενυλική κυκλάση, αλλά μέσω κινητοποίησης ασβεστίου από τις ενδοκυττάριας αποθήκες. Το ερώτημα είναι, αν μια τέτοια δράση των κ- υποδοχέων υπάρχει και στον ιππόκαμπο. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί, ότι οι δ- και οι κ- υποδοχείς συνδέονται προς σχηματισμό ετεροδιμερών στον ιππόκαμπο. Η ενεργοποίηση των ετεροδιμερών αυτών έχει αποτελέσματα πανομοιότυπα με αυτά της ενεργοποίησης των δ- υποδοχέων (27).

*Σε αντίθεση με τα ερευνητικά αποτελέσματα για τους μ- υποδοχείς και τους δ- υποδοχείς, για τους κ- υποδοχείς υπάρχουν ηλεκτροφυσιολογικά ευρήματα που καταδεικνύουν την μετασυναπτική παρουσία τους σε πυραμιδικούς νευρώνες της περιοχής CA1 (40). Τα στοιχεία είναι, όμως, περιορισμένα και περαιτέρω ερεύνα για το ρόλο των κ- υποδοχέων στους ενδονευρώνες και πυραμιδικούς νευρώνες του ιπποκάμπου είναι απαραίτητη.*

Από τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι η παρουσία των ενδορφινών στον ιππόκαμπο είναι αμυδρή σε σχέση με την εκτεταμένη παρουσία των οπιοειδών υποδοχέων. Επίσης, οπιοειδείς υποδοχείς απαντώνται σε υποκυτταρικές δομές και, γενικά, σε σημεία που δεν απαντώνται ενδορφίνες (12, 44). Αυτό εξηγείται προς το παρόν με τις εξής υποθέσεις: ότι κάποιοι υποδοχείς είναι μη λειτουργικοί, δηλαδή παρασκευάζονται σε ένα σημείο για να μεταφερθούν σε άλλο ή πρόκειται για υποδοχείς που βρίσκονται σε στάδιο ανακύκλωσης. Δεύτερον, ότι οι ενδορφίνες διαχέονται σε μεγάλη απόσταση από το σημείο έκλυσής τους (12). Τρίτον, ότι κάποιες ενδογενείς ουσίες που δρουν αγωνιστικά στους οπιοειδείς υποδοχείς δεν έχουν ακόμη αναγνωρισθεί.

Εδώ σημειώνεται ότι λειτουργικοί υποδοχείς των οπιοειδών βρέθηκαν και στα νευρογλοία, αλλά δεν θα αναφερθούν, επειδή η παρούσα μελέτη αφορά στη δράση των οπιοειδών σε ενδονευρώνες (12).

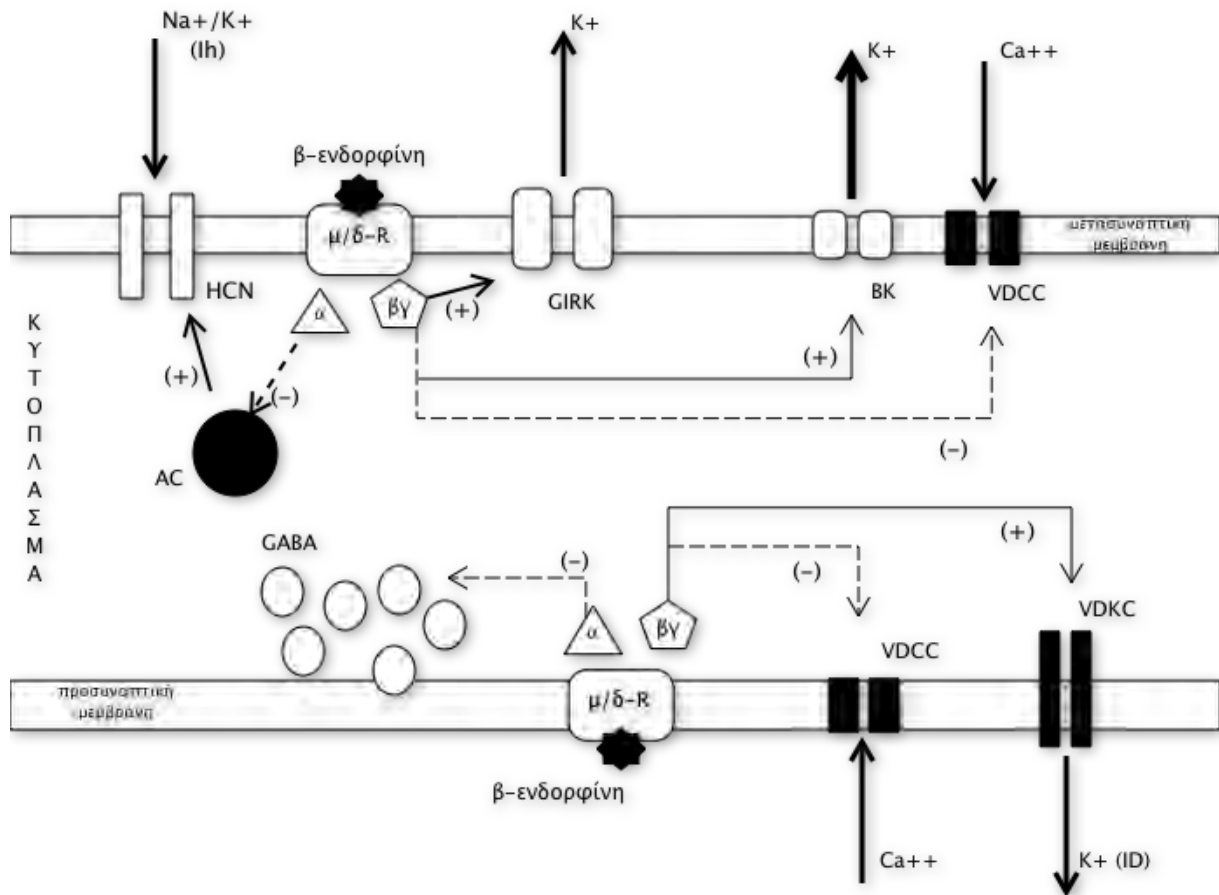
Οι υποδοχείς των οπιοειδών ανήκουν στην υπερικογένεια των μεμβρανικών υποδοχέων που συνδέονται με  $G_{i/o}$  πρωτεΐνες, οι οποίες στην πλειονότητα των περιγεγραμμένων περιπτώσεων είναι ευαίσθητες στην τοξίνη του κοκκύτη. Σύνδεση με G πρωτεΐνες μη ευαίσθητες στην τοξίνη του κοκκύτη έχει επίσης περιγραφεί. Μετά τη σύνδεση του οπιοειδούς στον υποδοχέα του, προκαλείται διάσπαση της G πρωτεΐνης σε  $G_{\alpha}$  και  $\beta/\gamma$  υποομάδα.

Η  $G_{\alpha}$  υπομονάδα οδηγεί αφενός σε αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης με ποικίλες διαδοχικές δράσεις και αφετέρου σε αναστολή της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστή (χολοκυστοκινίνης, GABA κ.α.) από την τελική απόληξη. Η αντίθετη δράση στην αδενυλική κυκλάση (ενίσχυση) έχει επίσης παρατηρηθεί (οσφρητικός φλοιός, πρωτογενείς προσαγωγές ίνες).

Η  $\beta/\gamma$  υπομονάδα ενεργοποιεί τους διαύλους GIRK, τους ασβεστιοεξαρτώμενους διαύλους καλίου μεγάλης αγωγιμότητας (BK) και τους τασεοεξαρτώμενους διαύλους καλίου (καθυστερημένος ανορθωτής). Αντίθετα, αναστέλλει τους τασεοεξαρτώμενους διαύλους ασβεστίου.

Αυτές οι δράσεις των οπιοειδών (Εικόνα Γ) είναι τεκμηριωμένες και θα απασχολήσουν στη θεώρηση των αποτελεσμάτων της προκείμενης μελέτης.

Άλλες δράσεις των οπιοειδών ενέχουν την επίδραση σε ενδοκυττάρια συστήματα όπως αυτό της φωσφοϊνοσιτόλης (IP3), της διακυλογλυκερόλης, της πρωτεϊνικής κυκλάσης C, κ.α. Η εκτεταμένη θεώρηση της διεθνούς βιβλιογραφίας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα οπιοειδή ανήκουν στις ουσίες που δύνανται να επιδράσουν σε όλα τα διαφορετικά συστήματα δεύτερων μεταβιβαστών, πράγμα που υπογραμμίζει τη σημασία τους στη ρύθμιση της λειτουργίας των νευρωνικών κυκλωμάτων. Μάλιστα έχει ειπωθεί, πως η δράση των οπιοειδών δεν εξαρτάται από τη σύζευξή τους με



Εικόνα Γ: Ρύθμιση των ρευμάτων ιόντων μέσω της δράσης των ενδογενών οπιοειδών στους μετασυναπτικούς και προσυναπτικούς υποδοχείς τους. Το σχεδιάγραμμα αναφέρεται σε δράσεις που έχουν παρατηρηθεί σε διαφορετικά είδη νευρώνων του ΚΝΣ, οι οποίες εδώ παρουσιάζονται συνοπτικά σε έναν υποθετικό νευρώνα. Απεικονίζονται οι μ- και δ- υποδοχείς.

Οι μ-/δ- υποδοχείς (μ-/δ- R) ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων που συνδέονται με G πρωτεΐνες και μετά την πρόσδεση της β-ενδορφίνης η Gα υπομονάδα διασπάται από τη βγ υπομονάδα. Η Gα υπομονάδα αναστέλλει την αδενυλική κυκλάση (AC) με συνακόλουθη μείωση του ρεύματος Ih (η AC δρα ενισχύοντας το Ih, άρα αναστολή της οδηγεί σε μείωσή του). Επίσης, η αναστολή της AC είναι ένας από τους μηχανισμούς, που προκαλούν μείωση της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστή σε προσυναπτικό επίπεδο. Άλλοι προσυναπτικοί μηχανισμοί εξυπηρετούνται από τη βγ υπομονάδα και είναι η μείωση των ρευμάτων ασβεστίου και η αύξηση των ρευμάτων καλίου μέσω επίδρασης στους τασεοεξαρτώμενους διαύλους ασβεστίου (VDCC: voltage dependent calcium channels) και καλίου (VDKC: voltage dependent potassium channels), αντιστοίχως. Σε μετασυναπτικό επίπεδο, η βγ υπομονάδα ενεργοποιεί τους διαύλους GIRK (= G- protein coupled inwardly rectifying potassium channels) και τους διαύλους BK (= big conductance potassium channels). GABA: γ- αμινοβουτυρικό οξύ, ID: delayed rectifier, HCN: hyperpolarization activated and cyclic-nucleotide-gated non-selective cation channels.

συγκεκριμένο μεταβιβαστή, αλλά από το είδος των νευρώνων που μελετώνται, καθώς σε διαφορετικούς τύπους νευρώνων παρατηρήθηκε εκ διαμέτρου αντίθετη δράση των οπιοειδών μέσω επίδρασης π.χ. στην αδενυλική κυκλάση (70).



Η πρόσδεση των οπιοειδών στους υποδοχείς τους οδηγεί στην απελευθέρωση ασβεστίου από τις ενδοκυττάρια αποθήκες καθώς και σε διαδοχικές αντιδράσεις που οδηγούν στην ενδοκύττωση των υποδοχέων και την έκφραση mRNA (3). Αναφερόμαστε εδώ στην οξεία δράση των οπιοειδών, καθώς στη χρόνια δράση τους ή στην οξεία δράση σε ήδη χρονίως εκτεθειμένα κύτταρα παρατηρούνται περίπλοκα φαινόμενα απευαισθητοποίησης και αντιρρόπησης (3, 70).

Ειδικά για τη μορφίνη μπορεί να ειπωθεί ότι δεν οδηγεί σε σημαντική ενδοκύττωση υποδοχέων όπως συμβαίνει με ειδικούς οπιοειδείς αγωνιστές, όπως το DAMGO και το DPDPE (70).

Στις επόμενες παραγράφους θα αναφερθούν λεπτομέρειες σχετικά με διαύλους ρευμάτων ιόντων που ρυθμίζονται από τη δράση των οπιοειδών στον ιππόκαμπο.

### **1.6. Τασεοεξαρτώμενοι δίαυλοι καλίου (καθυστερημένος ανορθωτής)**

Έχει παρατηρηθεί ότι τα οπιοειδή ενισχύουν ένα τασεοεξαρτώμενο ρεύμα καλίου το οποίο είναι ευαίσθητο στη δενδροτοξίνη και το 4AP (70). Το ρεύμα αυτό είναι γνωστό ως  $I_D$  και χαρακτηρίζεται ως καθυστερημένος ανορθωτής (delayed rectifier). Ο δίαυλος του ρεύματος  $I_D$  κατά πάσα πιθανότητα σχετίζεται με το γονίδιο Shaker και βρίσκεται σε προσυναπτική θέση. Η οικογένεια των τασεοεξαρτωμένων διαύλων καλίου, στην οποία ανήκει ο εν λόγω δίαυλος, έχει κλωνοποιηθεί και αριθμεί πολλά μέλη. Η ανακάλυψη της ρύθμισης του διαύλου από τα οπιοειδή βασίστηκε στην παρατήρηση, ότι η δενδροτοξίνη και το 4AP αποτρέπουν τη μείωση της έκλυσης νευροδιαβιβαστή από τα οπιοειδή. Οι  $\mu$ - υποδοχείς συνδέονται με τον δίαυλο του  $I_D$  μέσω του συστήματος του αραχιδονικού οξέος. Ο ρόλος του  $I_D$  είναι σημαντικός στη μείωση της έκλυσης νευροδιαβιβαστή στον ιππόκαμπο από τις τελικές νευρικές απολήξεις, επειδή εκεί δεν παρατηρείται ανασταλτική επίδραση των οπιοειδών στους προσυναπτικούς τασεοεξαρτωμένους διαύλους ασβεστίου (34). Έχει δε βρεθεί στον ιππόκαμπο ότι και η δυνορφίνη μέσω ενεργοποίησης  $\kappa$ - υποδοχέων ενισχύει το ρεύμα των τασεοεξαρτωμένων διαύλων καλίου (70).

### **1.7. Δίαυλοι GIRK**

Και τα τρία είδη υποδοχέων των οπιοειδών ( $\mu$ -,  $\delta$ - και  $\kappa$ -) ενισχύουν το ρεύμα καλίου που εκρέει από τους GIRK διαύλους (70). Οι δίαυλοι GIRK (G- coupled inwardly

rectifying potassium channels) απαντώνται ευρέως στο κεντρικό νευρικό σύστημα και αποτελούν μια μεγάλη και καλά χαρακτηρισμένη οικογένεια διαύλων (28, 46). Οι οπιοειδείς υποδοχείς που ενεργοποιούν τους διαύλους GIRK είναι συνδεδεμένοι με μία G πρωτεΐνη ευαίσθητη στην τοξίνη του κοκκύτη και θεωρείται ότι η βγ υπομονάδα ευθύνεται για την ενεργοποίηση των διαύλων GIRK (70).

Οι διαύλοι GIRK έχουν κλωνοποιηθεί και έχουν βρεθεί τέσσερις υπότυποι: οι GIRK1, GIRK2, GIRK3 και GIRK4 (28). Τα κλωνοποιημένα μόρια σχηματίζουν λειτουργικούς διαύλους καλίου που έχουν τη δομή ετεροπολυμερών. Οι τρεις πρώτοι υπότυποι απαντώνται σε όλο το κεντρικό νευρικό σύστημα σε ευρεία κατανομή, ενώ ο τέταρτος υπότυπος στην καρδιά. Στον εγκέφαλο ανοσοϊστοχημικές μελέτες τοποθετούν τους διαύλους GIRK σε μετασυναπτικές δομές (δενδρίτες, δενδριτικές άκανθες και σώματα) (15). Διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του δυναμικού ηρεμίας των νευρώνων και είναι συνδεδεμένοι με υποδοχείς πολλών νευροδιαβιβαστών και νευρορυθμιστών (GABA, νοραδρεναλίνη, σεροτονίνη, οπιοειδή, αδενοσίνη κ.α.), δίνοντας τη δυνατότητα στις ουσίες αυτές να επηρεάσουν ποικιλοτρόπως τη διεγερσιμότητα των νευρώνων και τη μεταβίβαση πληροφοριών σε σύνθετα νευρωνικά κυκλώματα (15, 28, 46).

Από την ενεργοποίηση των διαύλων GIRK, η οποία προκαλείται μετά την πρόσδεση του GABA στους υποδοχείς GABA<sub>B</sub>, προκύπτουν τα αργά ανασταλτικά μετασυναπτικά δυναμικά στον ιππόκαμπο (slow IPSPs) (6). Έτσι, έχει παρατηρηθεί ότι τα οπιοειδή επηρεάζουν τη συναπτική δραστηριότητα τροποποιώντας τη δράση του GABA στους διαύλους GIRK (48). Παράλληλα, μέσω της ρύθμισης των διαύλων GIRK τα οπιοειδή αλληλεπιδρούν με άλλα συστήματα νευροδιαβιβαστών, όπως οι κατεχολαμίνες και η σεροτονίνη. Στην εικόνα Δ παρουσιάζεται ο τρόπος που επιδρούν τα οπιοειδή και το GABA στους διαύλους GIRK, με σκοπό να καταδειχτεί πόσο στενά αλληλοεπηρεάζονται τα δύο συστήματα νευροδιαβίβασης/νευρορύθμισης. Επιπλέον, παρουσιάζεται εκ νέου η επίδραση των οπιοειδών στο ρεύμα I<sub>h</sub>, γιατί τα δύο αυτά είδη διαύλων (διαύλοι του I<sub>h</sub> και GIRK) εντοπίζονται στους ενδονευρώνες της στιβάδας των πολυμόρφων κυττάρων (O/A ενδονευρώνες), οι οποίοι αποτελούν αντικείμενο αυτής της μελέτης.

Ενώ οι ανατομικές μελέτες υποστηρίζουν την εντόπιση των διαύλων GIRK κυρίως στους πυραμιδικούς νευρώνες, οι ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες έχουν καταδείξει εδώ και πολλά χρόνια την ύπαρξη διαύλων καλίου σε μετασυναπτικές δομές ενδονευρώνων της CA1 περιοχής, οι οποίοι παρουσιάζουν χαρακτηριστικά εσωτερικής

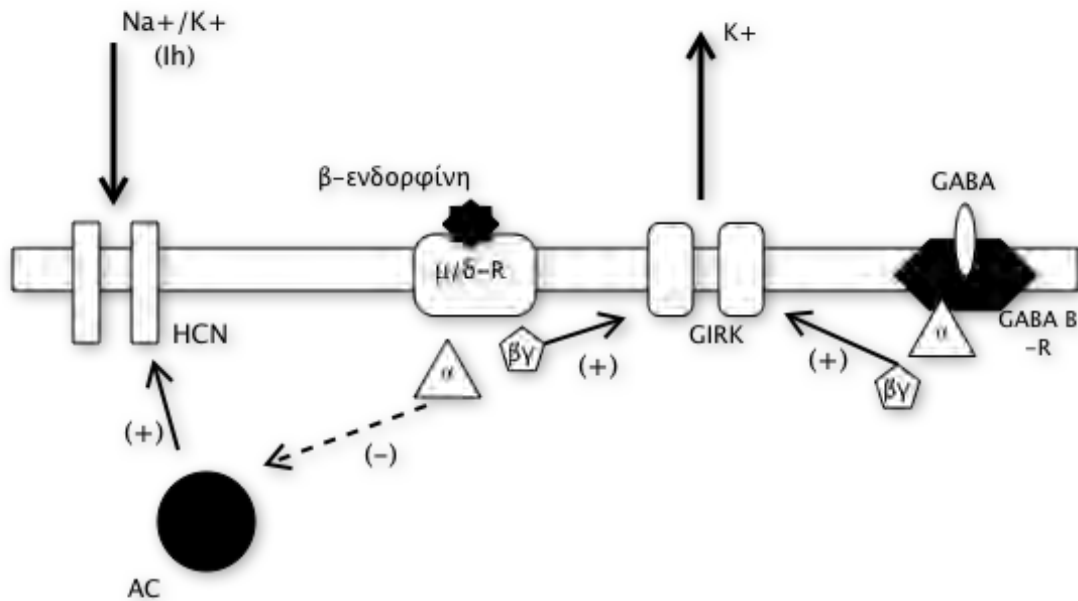
ανόρθωσης (inward rectification), ενεργοποιούνται από τον αγωνιστή baclofen των υποδοχέων GABA<sub>B</sub>, απενεργοποιούνται από το βάριο και το καΐσιο και η λειτουργία τους ρυθμίζεται από τους νευροδιαβιβαστές/νευρορρυθμιστές που αναφέρονται παραπάνω, ούτως ώστε θεωρείται δεδομένο ότι οι διάυλοι GIRK υπάρχουν στους ενδονευρώνες της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου (18, 65). Υπενθυμίζεται, ότι στις ανοσοϊστοχημικές μελέτες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, μέσω των οποίων αποδείχτηκε η ευρεία δενδριτική κατανομή των GIRK στον ιππόκαμπο, είναι δύσκολο να αναγνωριστεί εάν οι δενδρίτες που απεικονίζονται ανήκουν σε πυραμιδικούς νευρώνες ή ενδονευρώνες, γιατί για το σκοπό της αναγνώρισης χρησιμοποιούνται έμμεσες ενδείξεις (ύπαρξη δενδριτικών ακάνθων, μορφολογία των συνάψεων).

Από τη μελέτη της δράσης των οπιοειδών στους ενδονευρώνες της περιοχής CA1 με ηλεκτροφυσιολογικά πειράματα καθήλωσης τάσης έχει προκύψει ότι μέσω της ενεργοποίησης των διαύλων GIRK από οπιοειδείς αγωνιστές εμφανίζονται ρεύματα εκροής που μπλοκάρονται από βάριο, αντιστρέφονται στο E<sub>K</sub> και προκαλούν συνολική μείωση της αντίστασης μεμβράνης των ενδονευρώνων, παρόλο που τα οπιοειδή ταυτόχρονα αναστέλλουν το ρεύμα I<sub>h</sub>, γεγονός που από μόνο του αυξάνει την αντίσταση της μεμβράνης (65). Δηλαδή κατά την ταυτόχρονη δράση των οπιοειδών στο ρεύμα I<sub>h</sub> και στο ρεύμα καλίου των διαύλων GIRK στους ενδονευρώνες της στιβάδας των πολυμόρφων κυττάρων της CA1 περιοχής (βλ. εικόνα Δ), η αύξηση της αγωγιμότητας (ή μείωση της αντίστασης), που προκύπτει από την ενεργοποίηση των GIRK, υπερσχύει της μείωσης της αγωγιμότητας (ή αύξησης της αντίστασης), που προκύπτει από την αναστολή του I<sub>h</sub>. Τα αποτελέσματα της δράσης των οπιοειδών στο ρεύμα εκροής καλίου μιμήθηκε το baclofen, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι εμπλέκονται διάυλοι GIRK (65).

## 1.8. Ρεύμα I<sub>h</sub>

Το ρεύμα I<sub>h</sub> παρουσιάζει ευρεία κατανομή στο νευρικό σύστημα και την καρδιά και ήταν γνωστό και ηλεκτροφυσιολογικά χαρακτηρισμένο πολύ πριν κλωνοποιηθούν οι διάυλοι που το εξυπηρετούν (60).

Οι χαρακτηριστικές βιοφυσικές ιδιότητες του I<sub>h</sub> οδήγησαν στην εκτεταμένη μελέτη της δράσης του στην καρδιά και τους νευρώνες, γιατί από νωρίς θεωρήθηκε πιθανό ότι λόγω της ανώμαλης συμπεριφοράς του, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη



Εικόνα Ψ: Μετασυναπτική δράση των οπιοειδών στους ενδονευρώνες του ιπποκάμπου, μέσω των  $\mu$ - και  $\delta$ -υποδοχέων ( $\mu/\delta$ -R). Μέσω της αναστολής της αδενυλικής κυκλάσης (AC) από την  $\beta\gamma$  υπομονάδα αναστέλλεται το ρεύμα  $I_h$ . Η  $\beta\gamma$  υπομονάδα ενεργοποιεί τους διαύλους καλίου GIRK. Οι ίδιοι διάυλοι ενεργοποιούνται στους ενδονευρώνες από το GABA, μέσω της δράσης του στους μετατροπικούς υποδοχείς  $GABA_B$ . GIRK: G- protein coupled inwardly rectifying potassium channels, GABA:  $\gamma$ -αμινοβουτυρικό οξύ, HCN: hyperpolarization activated and cyclic-nucleotide-gated non-selective cation channels.

ρυθμογένεση και την ολοκλήρωση των πληροφοριών σε σύνθετα νευρωνικά κυκλώματα (38, 39, 60). Στη μη αναμενόμενη συμπεριφορά του κατά τη μεταβολή του δυναμικού μεμβράνης των κυττάρων στα οποία μελετήθηκε, οφείλει τα ονόματα  $I_Q$  και  $I_F$  (queer current και funny current), όμως τελικά επικράτησε στο όνομα  $I_h$ , επειδή ενεργοποιείται κατά την υπερπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης (hyperpolarization current) (60). Στο εξής αναφερόμαστε στο  $I_h$ , όπως αυτό μελετήθηκε και χαρακτηρίστηκε στο κεντρικό νευρικό σύστημα.

Το  $I_h$  ενεργοποιείται κατά την υπερπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης, η ενεργοποίηση είναι αργή και δεν παρατηρείται χρονικά εξαρτημένη αδρανοποίησή του για χρόνο κλάσης των μερικών δευτερολέπτων (πρακτικά το ρεύμα  $I_h$  δεν αδρανοποιείται). Χαρακτηριστικό της αργής ενεργοποίησης του  $I_h$  σε συνθήκες καθήλωσης ρεύματος είναι η κοιλιάδα («sag»), η οποία παρατηρείται στην

κυματομορφή του δυναμικού μεμβράνης που προκύπτει συνεπεία υπερπολωτικού παλμού ρεύματος και οφείλεται στη μερική εκπόλωση της μεμβράνης κατά τη διάρκεια του υπερπολωτικού παλμού μετά την ενεργοποίηση του ρεύματος  $I_h$  (αναλυτικά στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων) (37, 38). Η απενεργοποίηση του  $I_h$  συμβαίνει μετά την άρση της υπερπόλωσης και παρουσιάζει την ίδια κινητική με την ενεργοποίηση, γι' αυτό σε συνθήκες καθήλωσης τάσης παρατηρείται μετά το πέρας του υπερπολωτικού παλμού τάσης ένα ουραίο ρεύμα (tail current). Σε συνθήκες καθήλωσης ρεύματος μετά το πέρας του υπερπολωτικού παλμού ρεύματος εμφανίζεται η εκπόλωση αναπήδησης (rebound depolarization), η οποία στους ιπποκάμπειους νευρώνες αποδίδεται κατά περίπου δύο τρίτα στην αργή απενεργοποίηση του  $I_h$  (το υπόλοιπο ένα τρίτο αποδίδεται σε τασεοεξαρτώμενους διαύλους ασβεστίου) (63).

Το ρεύμα  $I_h$  είναι ένα μικτό ρεύμα κατιόντων (νατρίου/καλίου). Παρόλο που είναι μικτό, οι δίαυλοι δεν είναι διαπερατοί για οποιαδήποτε κατιόντα. Μετά την ενεργοποίησή του συνεπεία υπερπόλωσης της μεμβράνης παρατηρείται εισροή κατιόντων νατρίου και καλίου και αυτή είναι μια ιδιότητα που το καθιστά ξεχωριστό. Το ρεύμα  $I_h$  μπλοκάρεται από το εξωκυττάριο καίσιο και το ZD 7288 (άλλες ουσίες δε χρησιμοποιούνται ευρέως ως ανταγωνιστές και γι' αυτό δεν αναφέρονται) (22, 60, 65).

*Το ρεύμα  $I_h$  διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση του δυναμικού ηρεμίας των νευρώνων (37, 65), στην αποτροπή υπερβολικής υπερπόλωσης, στην πρόκληση εκπόλωσης αναπήδησης (16), στη ρυθμογένεση (39), στο αργό μεθυπερπολωτικό δυναμικό (slow AHP), στη διαμόρφωση του σχήματος των μετασυναπτικών δυναμικών κατά τη διαδικασία της συναπτικής ολοκλήρωσης, η οποία εκτυλίσσεται στο δενδριτικό δέντρο του μετασυναπτικού νευρώνα, και στη ρύθμιση της έκλυσης νευροδιαβιβαστών από τις νευρικές απολήξεις (60, 65).*

Πριν από σχετικά λίγα χρόνια κλωνοποιήθηκαν οι δίαυλοι που το εξυπηρετούν και επιβεβαιώθηκε η άποψη πολλών ερευνητών, ότι πρόκειται για ξεχωριστή οικογένεια τασεοεξαρτώμενων διαύλων κατιόντων (57). Οι δίαυλοι ονομάστηκαν HCN (hyperpolarization activated and cyclic-nucleotide-gated non-selective cation channels) και μέχρι στιγμής αναγνωρίστηκαν τέσσερα γονίδια που κωδικοποιούν τέσσερις διαφορετικούς ισότυπους των HCN μονομερών (HCN1, HCN2, HCN3, HCN4). Κάθε μονομερές αποτελείται από έξι διαμεμβρανικά τμήματα με έναν μεμβρανικό πόρο μεταξύ πέμπτου και έκτου διαμεμβρανικού τμήματος και θέση πρόσδεσης κυκλικού νουκλεοτιδίου στο κυτοπλασματικό C-άκρο (C terminal). Τα μονομερή σχηματίζουν *in vivo* ομο- και ετερομερείς διαύλους (57).

Στη CA1 περιοχή του ιπποκάμπου εντοπίστηκαν με ανοσοϊστοχημικές μελέτες HCN δίαυλοι σε όλες τις στιβάδες (4, 57). Τη μεγαλύτερη αριθμητική πυκνότητα παρουσιάζουν οι HCN1 και HCN2 υπομονάδες, ενώ οι HCN3 και HCN4 υποομάδες εντοπίζονται μόνο στην πυραμιδική στιβάδα και στιβάδα των βοθριωδών-μοριακών κυττάρων και σε μικρή αριθμητική πυκνότητα. Τη μεγαλύτερη αριθμητική πυκνότητα παρουσιάζουν οι HCN1 και HCN2 στη στιβάδα των βοθριωδών-μοριακών κυττάρων και των πολυμόρφων κυττάρων. Εδώ σημειώνεται από πλευράς μας το γεγονός ότι η μεγαλύτερη πυκνότητα των HCN διαύλων στην περιοχή CA1 είναι στις στιβάδες με τη μεγαλύτερη παρουσία ενδογενών οπιοειδών (στη στιβάδα των βοθριωδών-μοριακών κυττάρων δίνουν συνάψεις οι εγκεφαλινεργικές ίνες της έξω οδού της διάτρητης ουσίας/κροταφοαμμωνικής οδού και στη στιβάδα των πολυμόρφων κυττάρων απαντώνται τα σώματα των O/A ενδονευρώνων που είναι ανοσοθετικοί στην εγκεφαλίνη, βλ. παράγραφο 1.5.2.).

Οι δίαυλοι HCN παρατηρούνται ως επί το πλείστον σε μετασυναπτικές δομές (σώματα και δενδρίτες), αν και τα τελευταία χρόνια παρουσιάζονται στοιχεία που υποστηρίζουν την ύπαρξή τους σε προσυναπτικές δομές (4).

Η εξάρτηση των διαύλων HCN από το δυναμικό της κυτταρικής μεμβράνης ρυθμίζεται από τη δραστηριότητα της αδενυλικής κυκλάσης. Νευροδιαβιβαστές και νευρορυθμιστές όπως η σεροτονίνη, νοραδρεναλίνη, ισταμίνη που ενισχύουν τη δραστηριότητα της αδενυλικής κυκλάσης, ενεργοποιούν ή ενισχύουν το ρεύμα  $I_h$  (23, 60). Αυτό επιτυγχάνεται με τη μετατόπιση (shift) της καμπύλης ενεργοποίησης του  $I_h$  προς πιο θετικές τιμές κατά περίπου 10 mV, σε ό,τι αφορά στην εξάρτηση ενεργοποίησης από το δυναμικό μεμβράνης. Δεν παρατηρούνται μεταβολές στην κλίση της καμπύλης και στη σχέση δυναμικού/ρεύματος σε συνθήκες πλήρους ενεργοποίησης. Με αντίστροφο μηχανισμό δρούν νευροδιαβιβαστές ή νευρορυθμιστές που αναστέλλουν το  $I_h$  (οπιοειδή, αδενοσίνη, σε μερικούς νευρώνες σεροτονίνη) στην καμπύλη ενεργοποίησης, δηλαδή προκαλώντας shift κατά περίπου 10 mV προς πιο αρνητικές τιμές (25).

Στους ενδονευρώνες της στιβάδας των πολυμόρφων κυττάρων της CA1 περιοχής βρέθηκε ότι το  $I_h$  έχει ένα δυναμικό αναστροφής (reversal potential) γύρω στα -30 mV, έναν ουδό ενεργοποίησης γύρω στα -52 mV και ένα δυναμικό ημιμέγιστης ενεργοποίησης γύρω στα -73 mV. Σε συνθήκες καθήλωσης ρεύματος η αναστολή του ρεύματος  $I_h$  από το ZD 7288 οδήγησε σε σημαντική υπερπόλωση του ενδονευρώνα, σε

μείωση της συχνότητας των αυθόρμητων δυναμικών ενεργείας, σε αύξηση της αντίστασης εισόδου των ενδονευρώνων και στην εξάλειψη της εκπόλωσης αναπήδησης (37).

Σε μία άλλη μελέτη των ιδίων ερευνητών ερευνήθηκαν οι επιδράσεις των οπιοειδών σε συνθήκες καθήλωσης τάσης και συγκρίθηκε η δράση τους με εκείνη του ZD 7288. Αναμενόμενα -βάσει της μέχρι τότε βιβλιογραφίας- βρέθηκε αρνητική ρύθμιση του  $I_h$  από τα οπιοειδή, το μέγεθος της οποίας, ωστόσο, ήταν εμφανές μόνο μετά την πλήρη αναστολή των διαύλων GIRK μέσω χορήγησης βαρίου. Η ταυτόχρονη ενεργοποίηση των διαύλων GIRK και αναστολή του  $I_h$  από τα οπιοειδή οδήγησε σε συνολική μείωση της αντίστασης της κυτταρικής μεμβράνης των ενδονευρώνων. Στη συγκεκριμένη μελέτη δε διενεργήθηκε διερεύνηση της δράσης των οπιοειδών σε συνθήκες καθήλωσης ρεύματος.

Στη μέχρι τώρα βιβλιογραφία δεν αναφέρονται επαρκή στοιχεία για την επίδραση των οπιοειδών στο ρεύμα  $I_h$  των ενδονευρώνων της CA1 περιοχής σε συνθήκες καθήλωσης ρεύματος. Παλαιότερες μελέτες κατέδειξαν ότι οι οπιοειδείς αγωνιστές υπερπολώνουν τους ενδονευρώνες της CA1 περιοχής και καταστέλλουν τη συναπτική δραστηριότητα (συνθήκες καθήλωσης τάσης) (65) και ότι οι οπιοειδείς αγωνιστές δεν επιδρούν στους προσυναπτικούς διαύλους ασβεστίου των ίδιων ενδονευρώνων (συνθήκες καθήλωσης τάσης) (34).

*Λόγω του σημαντικού ρόλου του ρεύματος  $I_h$  στη ρύθμιση της διεγερσιμότητας των ενδονευρώνων της CA1, οι οποίοι με τη σειρά τους επηρεάζουν τη διεγερσιμότητα των νευρωνικών κυκλωμάτων του ιπποκάμπου, είναι ενδιαφέρουσα η περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης των οπιοειδών στο ρεύμα  $I_h$  με ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές σε συνθήκες καθήλωσης ρεύματος, ούτως ώστε να ερευνηθεί το λειτουργικό αποτέλεσμα της αναστολής του ρεύματος  $I_h$  στη συνολική διεγερσιμότητα των ενδονευρώνων.*

## **1.9. Κοιλιακός και ραχιαίος ιππόκαμπος**

Στις παραπάνω ενότητες έχει ήδη γίνει αναφορά στη διαφοροποίηση του κοιλιακού από το ραχιαίο ιππόκαμπο (παράγραφος 1.4.7.). Τα μέχρι τώρα στοιχεία υποστηρίζουν ότι κοιλιακός και ραχιαίος ιππόκαμπος αποτελούν ξεχωριστές μεταξύ

τους λειτουργικές μονάδες (17), με διαφορετικές προσαγωγές και απαγωγές οδούς (55), διαφορές στη διεγερσιμότητα των πυραμιδικών νευρώνων που προκύπτουν από διαφορές στη συναπτική αναστολή τους (59). Ακόμη και η λειτουργίες τους πιθανολογείται πως είναι διαφορετικές (17).

Για παράδειγμα η αμυγδαλή, ο επικλινής πυρήνας και ο ραχιαίος υποθάλαμος συνδέονται με δομές του κοιλιακού ιπποκάμπου, ενώ τα μαστία συνδέονται με το ραχιαίο ιππόκαμπο. Η αμφίδρομη σύνδεση του ιπποκάμπου με τον ενδορρινικό φλοιό παρουσιάζει τοπογραφική οργάνωση. Οι απαγωγές ίνες του κοιλιακού ιπποκάμπου προβάλλουν στη μέση μοίρα του ενδορρινικού φλοιού, ενώ του ραχιαίου ιπποκάμπου στην πλάγια μοίρα του ενδορρινικού φλοιού. Οι προσαγωγές ίνες του ιπποκάμπου από τον ενδορρινικό φλοιό ακολουθούν παρόμοια τοπογραφική οργάνωση. Συνολικά φαίνεται ότι ο κοιλιακός ιππόκαμπος συνδέεται με δομές που σχετίζονται με συναισθηματικές και ενδοκρινικές πληροφορίες, σε αντίθεση με τον ραχιαίο ιππόκαμπο, ο οποίος συνδέεται με δομές που σχετίζονται με την επεξεργασία εξωτερικών ερεθισμάτων (55). Με βάση τα δεδομένα αυτά αποκτούν ιδιαίτερη σημασία τα ευρήματα που καταδεικνύουν την εντονότερη παρουσία του συστήματος των οπιοειδών στον κοιλιακό από ό,τι στο ραχιαίο ιππόκαμπο.

Ο ραχιαίος ιππόκαμπος θεωρείται η έδρα της μνήμης στο χώρο, αφού η συντριπτική πλειονότητα των νευρώνων χώρου („place cells“: νευρώνες που πυροδοτούν δυναμικά ενεργείας όταν τα τρωκτικά λαμβάνουν συγκεκριμένη θέση στο χώρο, σχηματίζοντας ένα αντιπροσωπευτικό χάρτη του χώρου στον ιππόκαμπο του ζώου) εντοπίζονται στον ραχιαίο ιππόκαμπο. Λίγοι νευρώνες χώρου απαντώνται στον κοιλιακό ιππόκαμπο, του οποίου ο ρόλος στη χωρική μνήμη δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος (55).

Η διαφορά στη διεγερσιμότητα του κοιλιακού από τον ραχιαίο ιππόκαμπο παρατηρήθηκε σχετικά νωρίς και μάλιστα μέσω της έγχυσης οπιοειδών στον κοιλιακό και ραχιαίο ιππόκαμπο επιμύων *in vivo* (35). Με το πρωτόκολλο αυτό παρατηρήθηκε επιληπτική δραστηριότητα μόνο στον κοιλιακό ιππόκαμπο. Εν συνεχεία διενεργήθηκαν πολλές μελέτες με αντικείμενο τη διαφορά στη διεγερσιμότητα του κοιλιακού και του ραχιαίου ιπποκάμπου. Αναφέρθηκε ασθενέστερη GABAεργική αναστολή των ιδίων νευρώνων και ασθενέστερη μακροπρόθεσμη ενίσχυση (LTP: long-term potentiation) των διεγερτικών συνάψεων στους πυραμιδικούς νευρώνες της CA1 περιοχής (42, 59).

*Από τα παραπάνω τίθεται το ερώτημα, αν τα ενδογενή οπιοειδή ευθύνονται έστω και μερικώς για τη διαφορά στη διεγερσιμότητα του κοιλιακού και του ραχιαίου*



*ιπποκάμπου ή αν η διαφορετική δράση των εξωγενών οπιοειδών σε κοιλιακό και ραχιαίο ιππόκαμπο απλά ανακλά την ενδογενή διαφορά στη διεγερσιμότητα των νευρώνων των δύο μοιρών του ιπποκάμπου. Μια προσέγγιση στην ερώτηση αυτή είναι η διερεύνηση της δράσης των οπιοειδών στους ενδονευρώνες του ιπποκάμπου, οι οποίοι έχουν αναγνωριστεί ως φορείς εγκεφαλινών και οπιοειδών υποδοχέων.*

Μέχρι στιγμής, ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές από τους ενδονευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου είναι εξαιρετικά σπάνιες για τεχνικούς λόγους.

### **1.10. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Σκοπός της εργασίας είναι η διερεύνηση της δράσης των οπιοειδών στο ρεύμα  $I_h$  και γενικότερα στη διεγερσιμότητα των ενδονευρώνων που εντοπίζονται στο όριο της στιβάδας πολυμόρφων κυττάρων/σκάφης (O/A ενδονευρώνες) της CA1 περιοχής του ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου μέσω ενδοκυτταρίων ηλεκτροφυσιολογικών καταγραφών σε συνθήκες καθήλωσης ρεύματος.

Επιμέρους σκοπός είναι η σύγκριση των παθητικών και ενεργητικών ιδιοτήτων των O/A ενδονευρώνων του ραχιαίου με του κοιλιακού ιπποκάμπου και ο ηλεκτροφυσιολογικός χαρακτηρισμός των O/A ενδονευρώνων του κοιλιακού ιπποκάμπου.

## 2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 2.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Η πειραματική διαδικασία περιελάμβανε την προετοιμασία των εγκεφαλικών τομών επίμυος για ενδοκυττάρια *in vitro* ηλεκτροφυσιολογική καταγραφή με αιχμηρό ηλεκτρόδιο, την ενδοκυττάρια καταγραφή *in vitro* σε συνθήκες καθήλωσης ρεύματος και τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων.

#### 2.1.1. Πειραματόζωα και προετοιμασία των εγκεφαλικών τομών

Ως πειραματόζωα χρησιμοποιήθηκαν νεαροί (βάρους περίπου 350 γρ.) αρσενικοί επίμυες Wistar. Οι επίμυες φυλάχτηκαν σε κλωβούς ανά ομάδες 3-4 πειραματοζώων σε σταθερή θερμοκρασία ( $22 \pm 2$  °C), σταθερής έντασης περιοδικό φωτισμό (12 ώρες φως και 12 ώρες σκοτάδι) και με ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό.

Τα πειραματόζωα αναισθητοποιήθηκαν βαθέως με αιθέρα σε ειδικό θάλαμο και θυσιάστηκαν με καρατόμηση. Ακολούθησε η ταχεία παρασκευή και εξαγωγή του εγκεφάλου και η εμβάπτισή του σε διαρκώς οξυγονωμένο τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό θερμοκρασίας οριακά άνω του σημείου πήξης του. Κατόπιν, εξήχθησαν οι δύο ιππόκαμποι του εγκεφάλου και με τη χρήση μικροτόμου McIlwain αποκτήθηκαν εγκάρσιες τομές ιπποκάμπου πάχους 500 μM. Για την απόκτηση τομών κοιλιακού ιπποκάμπου χρησιμοποιήθηκε το ουραίο τέταρτο ( $\frac{1}{4}$ ) του ιπποκάμπου, ενώ για την απόκτηση τομών ραχιαίου ιπποκάμπου το ρυγχαίο ήμισυ ( $\frac{1}{2}$ ) του ιπποκάμπου. Η όλη διαδικασία απόκτησης των τομών διεξήχθη σε 3-5 λεπτά, με σκοπό να μην εκφυλιστεί ο ζωντανός ιστός.

Ακολούθως οι τομές του ιπποκάμπου τοποθετήθηκαν στο θάλαμο καταγραφής, όπου επώαστηκαν σε σταθερές συνθήκες για μία ώρα μέχρι την έναρξη της καταγραφής.

### 2.1.2. Θάλαμος καταγραφής

Οι τομές του ιπποκάμπου τοποθετήθηκαν αμέσως σε θάλαμο τύπου διεπιφάνειας (interface type chamber) πάνω σε διηθητικό χαρτί διαβρεγμένο σε βαθμό κορεσμού με οξυγονωμένο (με αέριο μίγμα 95% οξυγόνου και 5% διοξειδίου του άνθρακα) και διαρκώς ανανεούμενο τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Έτσι, η κάτω επιφάνεια των τομών, η οποία ήταν σε επαφή με το διηθητικό χαρτί, ήταν υγρή, ενώ η άνω επιφάνεια των τομών διατηρείτο νωπή μέσω επώασης σε υδρατμούς που προέρχονταν από οξυγονωμένο, θερμαινόμενο απιονισμένο ύδωρ.

Πιο συγκεκριμένα, ο θάλαμος τύπου διεπιφανείας (interface type chamber) αποτελείται από τα εξής τμήματα: την έδρα, στην οποία τοποθετείται το διηθητικό χαρτί που υποδέχεται τον ιστό, και τη δεξαμενή απιονισμένου ύδατος, πάνω στην οποία βρίσκεται η έδρα. Το απιονισμένο ύδωρ διατηρείται σε σταθερή θερμοκρασία 33 °C με θερμοστάτη. Τα σωληνάκια που φέρουν το τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό στη διεπιφάνεια του θαλάμου διέρχονται από τη δεξαμενή του θερμαινόμενου απιονισμένου ύδατος, όπου ακολουθούν ελικοειδή πορεία και έτσι η θερμοκρασία του τεχνητού εγκεφαλονωτιαίου υγρού εξισώνεται με αυτή του του απιονισμένου ύδατος (33 °C). Επιπλέον, το απιονισμένο ύδωρ κορέννυται με αέριο μίγμα οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακος σε αναλογία 95% προς 5% και έτσι το οξυγόνο μεταφέρεται με τους υδρατμούς στο ζωντανό ιστό.

Η σύσταση του τεχνητού εγκεφαλονωτιαίου υγρού ήταν η εξής (σε mM): 124 NaCl; 4 KCl; 2 MgSO<sub>4</sub>; 2 CaCl<sub>2</sub>; 1,25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 26 NaHCO<sub>3</sub>; 10 γλυκόζη σε pH 7,4.

Το τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό ήταν ο φορέας του φαρμάκου που χορηγήθηκε στις τομές του ιπποκάμπου.

Ο θάλαμος καταγραφής είναι τοποθετείται σε αντικραδασμική τράπεζα και κλωβό Faraday για τον περιορισμό μηχανικού και ηλεκτρικού θορύβου, αντίστοιχα, κατά τη διάρκεια των καταγραφών.

### 2.1.3. Ενδοκυττάρειες καταγραφές

Για τις ενδοκυττάρειες καταγραφές χρησιμοποιήθηκε αιχμηρό ηλεκτρόδιο παρασκευασμένο από υάλινο τριχοειδές διαμέτρου 1,2 mm, που στο εσωτερικό του έφερε μικροϊνες. Η παρασκευή του ηλεκτροδίου έγινε με τη χρήση εξολκέα Brown flaming, μοντέλο P-97, Sutter Instruments, California. Μετά την παρασκευή του το

αιχμηρό ηλεκτρόδιο πληρωνόταν με διάλυμα 2M οξεικού καλίου και είχε ωμική αντίσταση 80-120 MΩ.

Η καταγραφή έγινε από πυραμιδικούς νευρώνες και ενδονευρώνες του ορίου σκάφης/στιβάδας πολυμόρφων κυττάρων (O/A ενδονευρώνες: str. oriens/alveus interneurons) της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου.

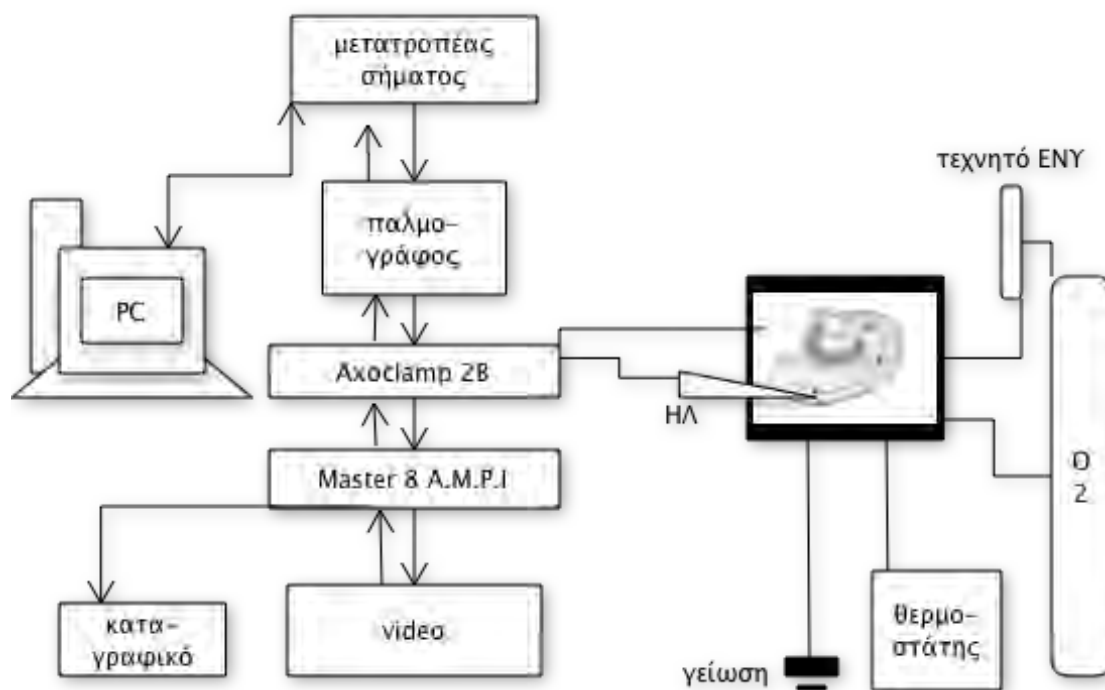
Για την τοποθέτηση του αιχμηρού ηλεκτροδίου στην περιοχή CA1 χρησιμοποιήθηκαν μικροχειριστές (Narishige Japan, μοντέλο M-P1), στερεοσκόπιο Nikon (μοντέλο SMZ-U/UW10/A/24) και πηγή ψυχρού φωτισμού (Nikon Optical Fiber Light Source).

Μέσω του αιχμηρού ηλεκτροδίου έγινε, μετά τη διείδυσή του στους υπό μελέτη νευρώνες, η καταγραφή δυναμικών μεμβράνης του νευρώνα και η χορήγηση παλμών ηλεκτρικού ρεύματος στο εσωτερικό του νευρώνα ταυτοχρόνως. Για την εξασφάλιση μικρής ολικής αντίστασης μεταξύ νευρώνα και καλωδίου που καταλήγει στον τελεστικό ενισχυτή χρησιμοποιήθηκε ο headstage Axoclamp HS-2A, Axon-Instruments Inc., ούτως ώστε το δυναμικό που προσδιορίστηκε να είναι ίσο με το δυναμικό της μεμβράνης του νευρώνα. Ως τελεστικός ενισχυτής για τη επίτευξη καθήλωσης ρεύματος και παραγωγή ηλεκτρικού ερεθίσματος χρησιμοποιήθηκε ο Axoclamp 2A, Axon-Instruments Inc.. Συνοπτικά, με τις λειτουργίες „output offset“, „bridge modus“ και „capacitance neutralization“ επιτεύχθηκε η αντιστάθμιση της διαφοράς δυναμικού μεταξύ ηλεκτροδίου και ηλεκτρολυτικού διαλύματος, η αντιστάθμιση της υψηλής ολικής αντίστασης του ηλεκτροδίου καταγραφής και η αντιστάθμιση της χωριακής αντίστασης σε διάφορα σημεία του κυκλώματος και, ίδιως, του ηλεκτροδίου.

Για την παραγωγή παλμών ηλεκτρικού ρεύματος συγκεκριμένων χαρακτηριστικών και το συγχρονισμό του παλμογράφου με την έναρξη του ερεθισμού (trigger) χρησιμοποιήθηκε ο ερεθισματοδότης Master 8 A.M.P.I.. Το αναλογικό σήμα (απόκριση δυναμικού μεμβράνης) μετατράπηκε σε ψηφιακό μέσω μετατροπέα σήματος (Digidata 1200, Axon Instruments Inc.) και μεταφέρθηκε σε Η/Υ, όπου αποθηκεύτηκε και αναλύθηκε με τη χρήση του λογισμικού pCLAMP 5.03. Κατά τη διάρκεια της καταγραφής η απόκριση της μεμβράνης του νευρώνα στον ηλεκτρικό ερεθισμό παρακολουθείτο σε αναλογικό παλμογράφο (HAMEG HM-305) και καταγράφηκε σε κασέτες εικόνας- ήχου (DTR 1204 digital tape recorder) και σε χαρτί με τη χρησιμοποίηση ενός καταγραφικού (Astromed, DASH IV, Model XL). Όλα τα προαναφερθέντα μηχανήματα καθώς και ο θάλαμος καταγραφής με τα επιμέρους

στοιχεία του είχαν γείωση για την αποφυγή ηλεκτρικού θορύβου. Το κύκλωμα παρουσιάζεται στην εικόνα Ε.

Όλοι οι νευρώνες που συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα ανάλυση επέδειξαν σταθερό δυναμικό μεμβράνης κατά τη διάρκεια της *in vitro* ενδοκυττάριας καταγραφής με αιχμηρό ηλεκτρόδιο. Η ενδοκυττάρια χορήγηση εκπολωτικού σταθερού ηλεκτρικού ρεύματος (DC) διαμέσου του αιχμηρού ηλεκτροδίου καταγραφής πυροδοτούσε υψηλής συχνότητας συστοιχίες δυναμικών ενεργείας μέχρι το τέλος της ενδοκυττάριας καταγραφής ως απόδειξη της βιωσιμότητας των νευρώνων στις εν λόγω πειραματικές συνθήκες.



Εικόνα Ε. Η συνδεσμολογία του κυκλώματος που χρησιμοποιήθηκε για τις ενδοκυττάριας καταγραφές σε συνθήκες καθήλωσης ρεύματος. Ο θάλαμος καταγραφής αντιπροσωπεύεται σχηματικά από το ζωντανό ιστό. Στη CA1 στιβάδα βρίσκεται τοποθετημένο το αιχμηρό ηλεκτρόδιο (ΗΛ), η θερμοκρασία του ιστού διατηρείται σταθερή με θερμοστάτη. Το αέριο μίγμα  $O_2/CO_2$  ( $O_2$ ) οξυγονώνει το απιονισμένο ύδωρ της δεξαμενής καταγραφής και το τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό (τεχνητό ΕΝΥ). Το σήμα που καταγράφεται μεταφέρεται στον ενισχυτή Axoclamp 2B με ενσωματωμένο headstage. Ως ερεθισματοδότης χρησιμοποιείται ο Master 8 A.M.P.I.. Το σήμα παρακολουθείται σε παλμογράφο και μεταφέρεται μετά την ψηφιακή μετατροπή του σε Η/Υ.

#### **2.1.4. Νευροφαρμακολογία *in vitro***

Για να μελετηθεί η δράση των οπιοειδών στον ιππόκαμπο χρησιμοποιήθηκε διάλυμα υδροχλωρικής μορφίνης τελικής συγκέντρωσης 5  $\mu\text{M}$  και 30  $\mu\text{M}$ . Ως ανταγωνιστής της δράσης της μορφίνης χρησιμοποιήθηκε η ναλοξόνη σε διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 50  $\mu\text{M}$  και 100  $\mu\text{M}$ . Φορέας των φαρμάκων ήταν το τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό.

#### **2.1.5. Στατιστική μελέτη**

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσος όρος  $\pm$  τυπικό σφάλμα μέσου όρου. Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το Student t-test. Για σύγκριση τιμών που προήλθαν από το ίδιο δείγμα χρησιμοποιήθηκε το Student t-test κατά ζεύγη (paired), ενώ για σύγκριση τιμών που προήλθαν από διαφορετικά δείγματα χρησιμοποιήθηκε η απλή (unpaired) μορφή του Student t-test. Ως  $n$  ορίστηκε το πλήθος των τιμών.

## 2.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

**2.2.1. Ηλεκτροφυσιολογικός χαρακτηρισμός των ενδονευρώνων του ορίου πολύμορφης στιβάδας/σκάφης (stratum oriens/alveus interneurons ή O/A interneurons) της περιοχής CA1 του ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου.**

- Προσδιορισμός των παθητικών και ενεργητικών ιδιοτήτων της νευρωνικής μεμβράνης και σύγκριση με τους πυραμιδικούς νευρώνες της περιοχής CA1 του ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου.

### 2.2.1.1. Βασικές μεμβρανικές ιδιότητες

Διεξήχθησαν ενδοκυττάρειες καταγραφές *in vitro* από συνολικά εικοσιοκτώ νευρώνες ( $n = 28$ ). Η διείσδυση του αιχμηρού ηλεκτροδίου στους νευρώνες αυτούς έγινε είτε στην πυραμιδική στιβάδα της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου ( $n = 14$ ), είτε στο όριο της σκάφης με την πολύμορφη στιβάδα της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου ( $n = 14$ ) υπό οπτικό έλεγχο μέσω οπτικού μικροσκοπίου και οι ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές είχαν τυπικά χαρακτηριστικά καταγραφών από κυτταρικά σώματα και όχι από δενδρίτες.

Από τους 28 νευρώνες οι δώδεκα ( $n = 12$ ) ήταν νευρώνες του ραχιαίου ιπποκάμπου. Έξι ( $n = 6$ ) από αυτούς εντοπίστηκαν στην πυραμιδική στιβάδα και έξι ( $n = 6$ ) στο όριο σκάφης/πολύμορφης στιβάδας. Οι υπόλοιποι δεκαέξι νευρώνες ( $n = 16$ ) εντοπίστηκαν στον κοιλιακό ιπποκάμπο, οκτώ ( $n = 8$ ) στην πυραμιδική στιβάδα και οκτώ ( $n = 8$ ) στο όριο σκάφης/πολύμορφης στιβάδας. Για την παρασκευή εγκάρσιων ως προς τον επιμήκη άξονα τομών ραχιαίου ιπποκάμπου χρησιμοποιήθηκε το ραχιαίο  $\frac{1}{2}$  του ιπποκάμπου και για την παρασκευή κοιλιακών εγκάρσιων τομών το κοιλιακό  $\frac{1}{4}$  του ιπποκάμπου.

Στην πυραμιδική στιβάδα του ιπποκάμπου βρίσκονται τα κυτταρικά σώματα των πυραμιδικών νευρώνων, οι οποίοι αποτελούν τυπικό αντικείμενο των ηλεκτροφυσιολογικών πειραμάτων που εστιάζονται στον ιπποκάμπο και ως εκ τούτου οι νευρώνες αυτοί είναι από ηλεκτροφυσιολογικής άποψης εκτενώς περιγεγραμμένοι. Επίσης οι πυραμιδικοί νευρώνες είναι - λόγω του μεγέθους τους και της πυκνότητας τους στην εν λόγω στιβάδα - σχετικά εύκολο να διεισδυθούν από το αιχμηρό ηλεκτρόδιο μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η ηλεκτροφυσιολογική καταγραφή.

Στο όριο της σκάφης με την πολύμορφη στιβάδα βρίσκονται τα κυτταρικά σώματα ενδονευρώνων, οι οποίοι ονομάζονται ενδονευρώνες σκάφης/πολύμορφης στιβάδας (στη διεθνή βιβλιογραφία: str. oriens/alveus interneurons ή απλά O/A interneurons) και αποτελούν ένα ετερογενή πληθυσμό. Όπως αναφέρεται και στη διεθνή βιβλιογραφία, έτσι και στην παρούσα έρευνα ήταν αρκετά επίπονο να εντοπιστούν και να διεισδυθούν νευρώνες στην περιοχή αυτή. Ο λόγος είναι το μικρό σχετικά μέγεθος των νευρώνων και η μικρή πυκνότητα στη διάταξή τους (9, 19, 62).

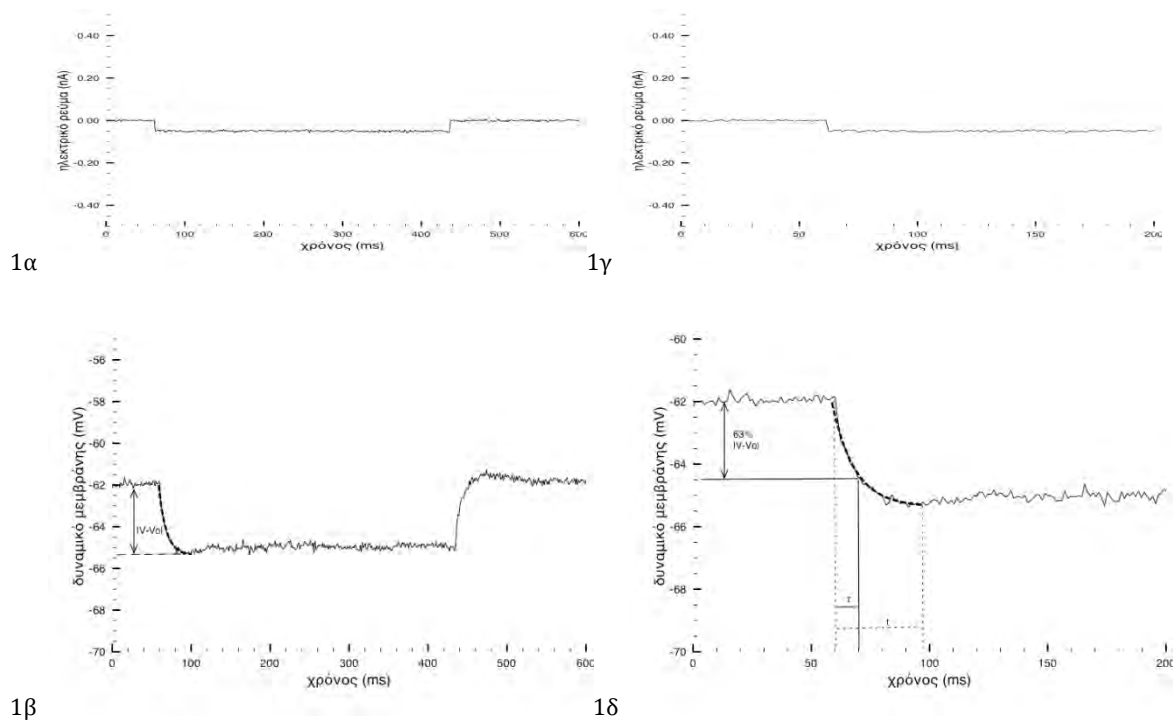
Παρόλο που η ηλεκτροφυσιολογική μελέτη των O/A ενδονευρώνων δεν είναι τόσο εκτενής όσο αυτή των πυραμιδικών νευρώνων, υπάρχουν στη διεθνή βιβλιογραφία επαρκείς αναφορές στα ηλεκτροφυσιολογικά χαρακτηριστικά τους και – προ πάντων – στις διαφορές τους από τους πυραμιδικούς νευρώνες, που επιτρέπουν την αναγνώρισή τους με βάση ηλεκτροφυσιολογικά κριτήρια σε συνδυασμό με τη θέση του κυτταρικού τους σώματος στο όριο της σκάφης με την πολύμορφη στιβάδα (9, 54, 62).

Στην παρούσα εργασία, τόσο οι παθητικές ιδιότητες των νευρώνων του ορίου σκάφης/στιβάδας πολύμορφων κυττάρων, όσο και τα χαρακτηριστικά των δυναμικών ενεργείας, που πυροδοτούνταν σε αυτούς μέσω ενδοκυττάριας εφαρμογής εκπολωτικών παλμών ηλεκτρικού ρεύματος, είχαν συγκρίσιμες τιμές με αυτές που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία ως χαρακτηριστικές για τους ενδονευρώνες της στιβάδας str. oriens/alveus της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου. Οι ιδιότητες αυτές διέφεραν από τις αντίστοιχες τιμές που προέκυψαν από τις ενδοκυττάριας καταγραφές σε πυραμιδικούς νευρώνες (Πίνακας 1).

Με βάση τα παραπάνω έγινε η αναγνώριση των νευρώνων που διεισδύθηκαν στο όριο σκάφης/πολύμορφης στιβάδας ως O/A ενδονευρώνων.

Ο προσδιορισμός των παθητικών ιδιοτήτων της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων έγινε με την εφαρμογή μακρού (480 ms), τετράγωνου υπερπολωτικού παλμού ηλεκτρικού ρεύματος αυξανόμενης έντασης (από 0,05 nA μέχρι 1,15 nA, αύξηση εύρους παλμού ανά 0,1 nA) σε συνθήκες καθήλωσης ρεύματος. Η αλληλουχία των συνολικά 12 παλμών εφαρμόστηκε πέντε φορές κατ' επανάληψη και κατόπιν εξήχθη μέσω ηλεκτρονικής επεξεργασίας με το λογισμικό clampfit η συνισταμένη των υπερπολωτικών αποκρίσεων της κυτταρικής μεμβράνης σε κάθε ηλεκτρικό παλμό, με σκοπό να μετριάσει η επίδραση του μηχανικού και ηλεκτρικού θορύβου στον





Εικόνα 1. Ενδοκυττάρια καταγραφή από O/A ενδονευρώνα της περιοχής CA1 του κοιλιακού ιπποκάμπου. Στα 1α και 1β απεικονίζεται ολόκληρη η καταγραφή, στα 1γ και 1δ μεγεθύνονται η αρχή του ηλεκτρικού παλμού και της απόκρισης της μεμβράνης για μεγαλύτερη ευκρίνεια: η εφαρμογή τετράγωνου υπερπολωτικού ηλεκτρικού παλμού (1α) εκλύει απόκλιση του δυναμικού μεμβράνης από το δυναμικό ηρεμίας προς πιο υπερπολωτικές τιμές (1β). Το εύρος της υπερπόλωσης για συγκεκριμένη ένταση ηλεκτρικού παλμού (εδώ 0,05 nA) καθορίζεται από την αντίσταση εισόδου  $R_i$ . Η διακεκομμένη γραμμή (1γ, 1δ) παριστάνει εκθετική συνάρτηση πρώτου βαθμού που προσεγγίζει ικανοποιητικά (fit) την εξέλιξη του δυναμικού μεμβράνης από την αρχή εφαρμογής του ηλεκτρικού παλμού μέχρι την επίτευξη του τελικού δυναμικού  $V$ . Η εκθετική συνάρτηση βρέθηκε με τη χρήση ηλεκτρονικού λογισμικού και όλη η διαδικασία προσδιορισμού της χρονικής σταθεράς  $\tau$  ήταν αυτοματοποιημένη. Η απεικόνιση των τιμών  $\tau$ ,  $t$ , 63%  $|V-V_0|$  (1δ) εξυπηρετεί την κατανόηση του συνημμένου κειμένου.

προσδιορισμό των τιμών των παθητικών ιδιοτήτων. Η απόκριση της κυτταρικής μεμβράνης νευρώνα σε τετράγωνο υπερπολωτικό παλμό ηλεκτρικού ρεύματος (Εικόνα 1α) σε συνθήκες καθήλωσης ρεύματος συνίσταται σε υπερπολωτική απόκλιση του δυναμικού της μεμβράνης  $V$  από το δυναμικό ηρεμίας της  $V_0$ , που τερματίζεται μετά το τέλος του ηλεκτρικού παλμού (Εικόνα 1β). Η απόκλιση του δυναμικού μεμβράνης  $V$  από το δυναμικό ηρεμίας  $V_0$  κατά την εφαρμογή ηλεκτρικού παλμού εντάσεως  $I$  οφείλεται στη συμπεριφορά της κυτταρικής μεμβράνης του νευρώνα ως ωμικής αντίστασης  $R$  και το εύρος της απόκλισης δυναμικού  $|V-V_0|$  καθορίζεται από την αντίσταση εισόδου  $R_i$ , η οποία προσδιορίζεται με βάση το νόμο του Ohm:

$$R_i = |V-V_0|/I,$$

όπου  $V$  το τελικό δυναμικό της μεμβράνης κατά τη διάρκεια εφαρμογής του ηλεκτρικού παλμού,  $V_0$  το δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης,  $I$  η ένταση του ηλεκτρικού παλμού σε απόλυτη τιμή και  $R_i$  η αντίσταση εισόδου. Δεδομένου ότι η ένταση του εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού ρεύματος αναφέρεται σε nA και η απόκλιση του δυναμικού μεμβράνης μετράται σε mV, η αντίσταση εισόδου προσδιορίζεται σε MΩ.

Με την εφαρμογή του υπερπολωτικού ηλεκτρικού παλμού η τελική υπερπολωτική απόκλιση του δυναμικού μεμβράνης από το δυναμικό ηρεμίας της επιτυγχάνεται όχι αμέσως, αλλά μετά από συγκεκριμένο χρόνο  $t$ , λόγω της συμπεριφοράς της κυτταρικής μεμβράνης ως πυκνωτή (Εικόνα 1δ). Συνολικά, η κυτταρική μεμβράνη συνδυάζει χαρακτηριστικά πυκνωτή  $C$  και ωμικής αντίστασης  $R$  και από αυτή την άποψη μπορεί να χαρακτηριστεί στα πλαίσια μελέτης των χαρακτηριστικών αυτών ως κύκλωμα RC. Ο χρόνος  $t$  (Εικόνα 1δ) που απαιτείται για να επιτευχθεί η τελική απόκλιση του δυναμικού  $|V-V_0|$ , όπως αυτή περιγράφηκε παραπάνω, εξαρτάται ως εκ τούτου από τη χωρητικότητα του πυκνωτή  $C$ . Η δε αύξηση του εύρους της απόκλισης του δυναμικού μεμβράνης μέχρι να επιτευχθεί η τελική απόκλιση  $|V-V_0|$  παριστάνει καμπύλη γραμμή (Εικόνα 1γ, 1δ), που προσεγγίζεται στις πειραματικές συνθήκες από καμπύλη εκθετικής συνάρτησης πρώτου βαθμού (Εικόνα 1γ, 1δ, διακεκομμένη γραμμή), από την οποία εξάγεται η χρονική σταθερά της μεμβράνης  $\tau$  (τ, εικόνα 1δ). Η εύρεση της εκθετικής συνάρτησης πρώτου βαθμού που προσεγγίζει ικανοποιητικά (fit) την καμπύλη του δυναμικού που καταγράφεται πειραματικά γίνεται με τη χρήση ηλεκτρονικού λογισμικού. Η χρονική σταθερά της μεμβράνης  $\tau$  είναι ο χρόνος στον οποίο επιτυγχάνεται το 63% της τελικής απόκλισης  $|V-V_0|$  και προσδιορίζεται σε ms.

Πρέπει να σημειωθεί, ότι για τον προσδιορισμό των παρακάτω τιμών για την αντίσταση εισόδου  $R_i$  και τη χρονική σταθερά  $\tau$  της κυτταρικής μεμβράνης χρησιμοποιήθηκε υπερπολωτικός ηλεκτρικός παλμός έντασης 0,05 nA (Εικόνα 1α, 1β), προς αποφυγή ενεργοποίησης τασεοεξαρτώμενων διαύλων κατιόντων. Οι ηλεκτρικοί παλμοί μεγαλύτερης έντασης χρησιμοποιήθηκαν για προσδιορισμό του ρεύματος  $I_h$ , που περιγράφεται στο δεύτερο κεφάλαιο.

Το δυναμικό ηρεμίας των O/A ενδονευρώνων ( $n = 14$ ) ήταν κατά μέσο όρο  $-62,6 \pm 1,4$  mV (μέσος όρος και τυπικό σφάλμα μέσου όρου αντιστοίχως), χωρίς στατιστικά

σημαντική διαφορά κατά μήκος του επιμήκη άξονα του ιπποκάμπου ( $-64,7 \pm 1,9$  mV στον ραχιαίο ιπποκάμπο,  $n = 6$ , έναντι  $-61,0 \pm 1,9$  mV στον κοιλιακό,  $n = 8$ ,  $p > 0,05$ ). Η αντίσταση εισόδου  $R_i$  έτεινε να είναι μεγαλύτερη στους O/A ενδονευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου. Συγκεκριμένα οι O/A ενδονευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου επέδειξαν αντίσταση εισόδου  $R_i$   $73,3 \pm 8,0$  MΩ,  $n = 8$ , έναντι των O/A ενδονευρώνων του ραχιαίου ιπποκάμπου που επέδειξαν αντίσταση εισόδου  $R_i$  ίση με  $58,8 \pm 7,4$  MΩ,  $n = 6$ . Η διαφορά δεν έφτανε στατιστικά σημαντικό επίπεδο, ( $p > 0,05$ ). Αντίθετα, η χρονική σταθερά μεμβράνης ( $\tau$ ) έτεινε να είναι μικρότερη στους O/A ενδονευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου σε σχέση με τους O/A ενδονευρώνες του ραχιαίου ιπποκάμπου ( $13,4 \pm 2,2$  ms,  $n = 8$ , έναντι  $18,2 \pm 2,9$  ms,  $n = 6$ ,  $p > 0,05$ ). Συνολικά, οι O/A ενδονευρώνες που μελετήθηκαν ( $n = 14$ ) επέδειξαν αντίσταση εισόδου  $R_i$  ίση με  $67,1 \pm 5,7$  MΩ και χρονική σταθερά μεμβράνης ( $\tau$ ) ίση με  $15,5 \pm 1,8$  ms. Τα παραπάνω αποτελέσματα απεικονίζονται στον Πίνακα 1.

	O/A ενδονευρώνες ραχιαίου ιπποκάμπου ( $n = 6$ )	O/A ενδονευρώνες κοιλιακού ιπποκάμπου ( $n = 8$ )	O/A ενδονευρώνες συνολικά ( $n = 14$ )	Πυραμιδικοί νευρώνες ( $n = 13$ )
Δυναμικό ηρεμίας (mV)	$-64,7 \pm 1,9$	$-61,0 \pm 1,9$	$-62,6 \pm 1,4$	$-65,9 \pm 1,4$
Αντίσταση εισόδου $R_i$ (MΩ)	$58,8 \pm 7,4$	$73,3 \pm 8,0$	$67,1 \pm 5,7^*$	$48,9 \pm 4,7^*$
Χρονική σταθερά μεμβράνης $\tau$ (ms)	$18,2 \pm 2,9$	$13,4 \pm 2,2$	$15,5 \pm 1,8$	$14,2 \pm 1,8$

Πίνακας 1: Παθητικές ιδιότητες O/A (str. oriens/alveus) ενδονευρώνων και πυραμιδικών νευρώνων της περιοχής CA1 του ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου. Οι O/A ενδονευρώνες των δυο περιοχών είχαν συγκρίσιμο δυναμικό ηρεμίας. Η αντίσταση εισόδου των κοιλιακών O/A ενδονευρώνων ήταν υψηλότερη από αυτή των ραχιαίων, η διαφορά ωστόσο δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Η χρονική σταθερά της μεμβράνης ( $\tau$ ) ήταν χαμηλότερη στους κοιλιακούς O/A ενδονευρώνες σε σύγκριση με τους ραχιαίους, ούτε σε αυτή την περίπτωση επρόκειτο για στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι πυραμιδικοί νευρώνες είχαν παρόμοια χρονική σταθερά  $\tau$  με τους O/A ενδονευρώνες. Το δυναμικό ηρεμίας των πυραμιδικών νευρώνων δεν ήταν διαφορετικό από αυτό των O/A ενδονευρώνων σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο, αν και ήταν πιο χαμηλό. Η αντίσταση εισόδου  $R_i$  ήταν στους πυραμιδικούς νευρώνες πιο χαμηλή από ό,τι στους O/A ενδονευρώνες, η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική (\*:  $p$  value  $< 0,05$ ).

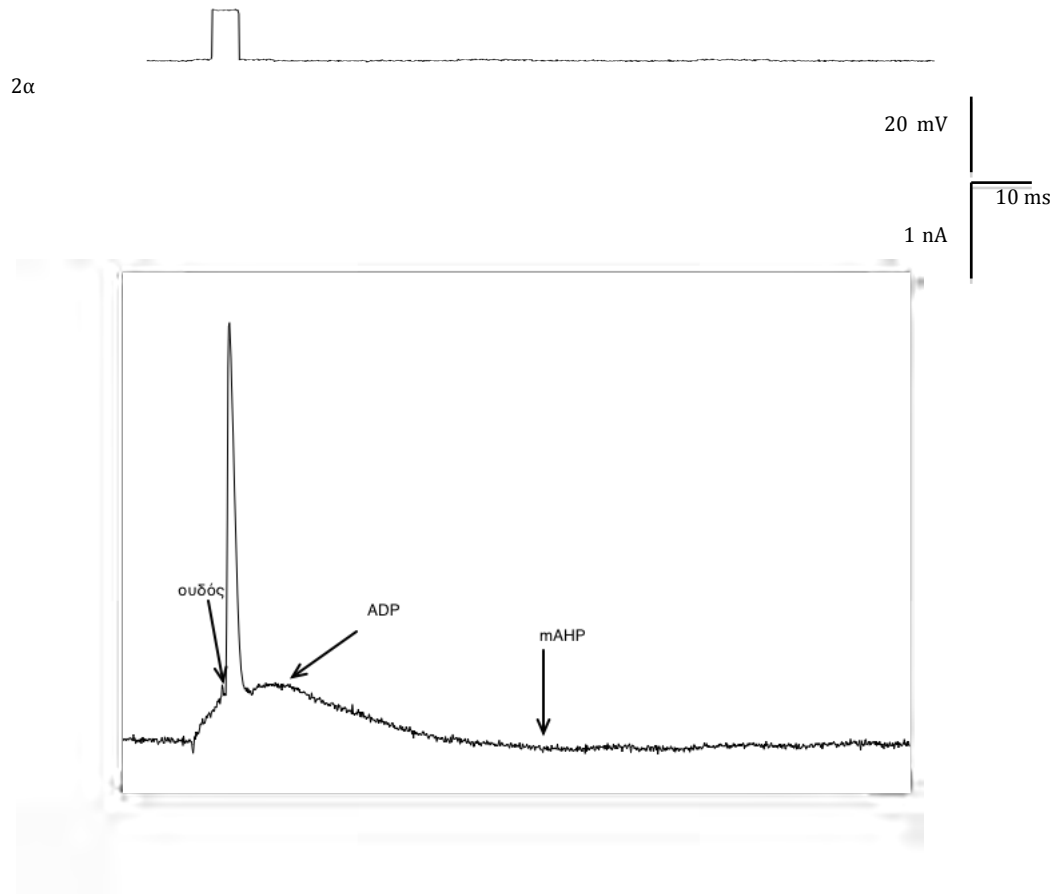
Το δυναμικό ηρεμίας των O/A ενδονευρώνων ήταν σχετικά θετικότερο σε σχέση με το δυναμικό ηρεμίας των πυραμιδικών νευρώνων, δηλ.  $-62,6 \pm 1,4$  mV στους O/A ενδονευρώνες,  $n = 14$ , έναντι  $-65,9 \pm 1,4$  mV στους πυραμιδικούς νευρώνες,  $n = 13$ . Η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική ( $p > 0,05$ ), αλλά κινούνταν στην ίδια κατεύθυνση με τις βιβλιογραφικές αναφορές (9, 54). Απεναντίας η διαφορά στην αντίσταση εισόδου  $R_i$  μεταξύ των O/A ενδονευρώνων και των πυραμιδικών νευρώνων έφτασε σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο ( $p < 0,05$ ), με την αντίσταση εισόδου  $R_i$  να είναι μεγαλύτερη στους O/A ενδονευρώνες ( $67,1 \pm 5,7$  MΩ,  $n = 14$ ) από ό,τι στους πυραμιδικούς νευρώνες ( $48,9 \pm 4,7$  MΩ,  $n = 13$ ). Η σχετικά υψηλή αντίσταση εισόδου

είναι γνωστό χαρακτηριστικό των ενδονευρώνων (9). Η χρονική σταθερά  $\tau$  ήταν παρόμοια στις δύο ομάδες νευρώνων ( $15,5 \pm 1,8$  ms στους O/A ενδονευρώνες,  $n = 14$ , έναντι  $14,2 \pm 1,8$  ms στους πυραμιδικούς νευρώνες,  $n = 13$ ,  $p > 0,05$ ).

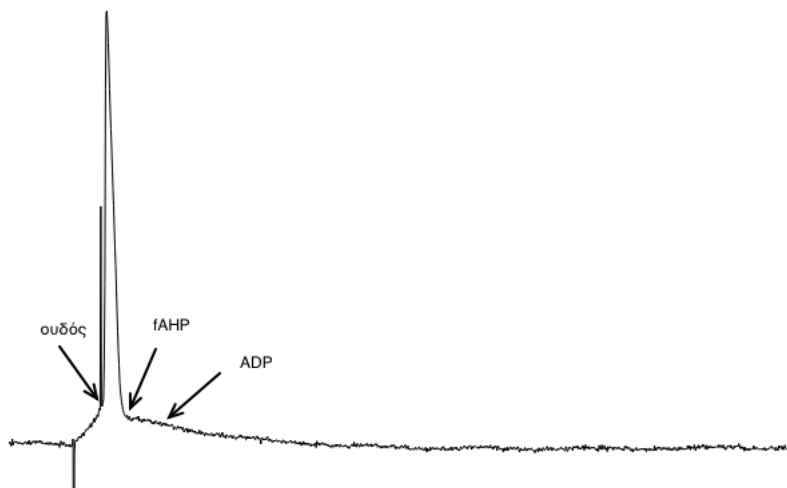
### 2.2.1.2. Δυναμικά ενεργείας

Η μελέτη των χαρακτηριστικών των δυναμικών ενεργείας των νευρώνων έγινε μέσω χορήγησης βραχέος (3 ή 5 ms) εκπολωτικού παλμού ηλεκτρικού ρεύματος αυξανόμενου εύρους με σκοπό τον προσδιορισμό του ουδού έκλυσης δυναμικού ενεργείας και τη συνακόλουθη πυροδότηση μονήρους δυναμικού ενεργείας δια ουδικού ερεθισμού της μεμβράνης (βλ. Εικόνα 2α, β και γ). Με τη χρήση ηλεκτρονικού λογισμικού προσδιορίστηκαν το ύψος των δυναμικών ενεργείας σε mV, η ημίσεια διάρκεια σε ms (HW, half width: το πλάτος του δυναμικού ενεργείας στο επίπεδο του 50% του ύψους του), ο χρόνος ανόδου σε ms (RT, rise time: ο χρόνος στον οποίο το δυναμικό ενεργείας εξελίσσεται από το 10% στο 90% του ύψους του), ο χρόνος φθίσης σε ms (DT, decay time: ο χρόνος στον οποίο το δυναμικό ενεργείας φθίνει από το 90% στο 10% του ύψους του), το γρήγορο μεθυπερπολωτικό δυναμικό ή fAHP (fast afterhyperpolarization potential) σε mV και το μεταεκπολωτικό δυναμικό ή ADP (afterdepolarization potential) σε mV (Εικόνα 2β και 2γ). Τα παραπάνω χαρακτηριστικά μετρήθηκαν σε O/A ενδονευρώνες και πυραμιδικούς νευρώνες και συγκρίθηκαν μεταξύ τους (Πίνακας 2).

Όπως έχει ήδη βρεθεί σε άλλες έρευνες, τα χαρακτηριστικά των δυναμικών ενεργείας των O/A ενδονευρώνων συνολικά διαφέρουν από αυτά των πυραμιδικών, γεγονός που επιτρέπει την αναγνώριση και τον διαχωρισμό τους με βάση ηλεκτροφυσιολογικά κριτήρια (9, 54). Αυτό ισχύει παρά το γεγονός ότι οι O/A ενδονευρώνες είναι μια εξαιρετικά ετερογενής ομάδα ως προς τη μορφολογία τους, την ιστοχημεία τους και διάφορα επιμέρους ηλεκτροφυσιολογικά χαρακτηριστικά (19).



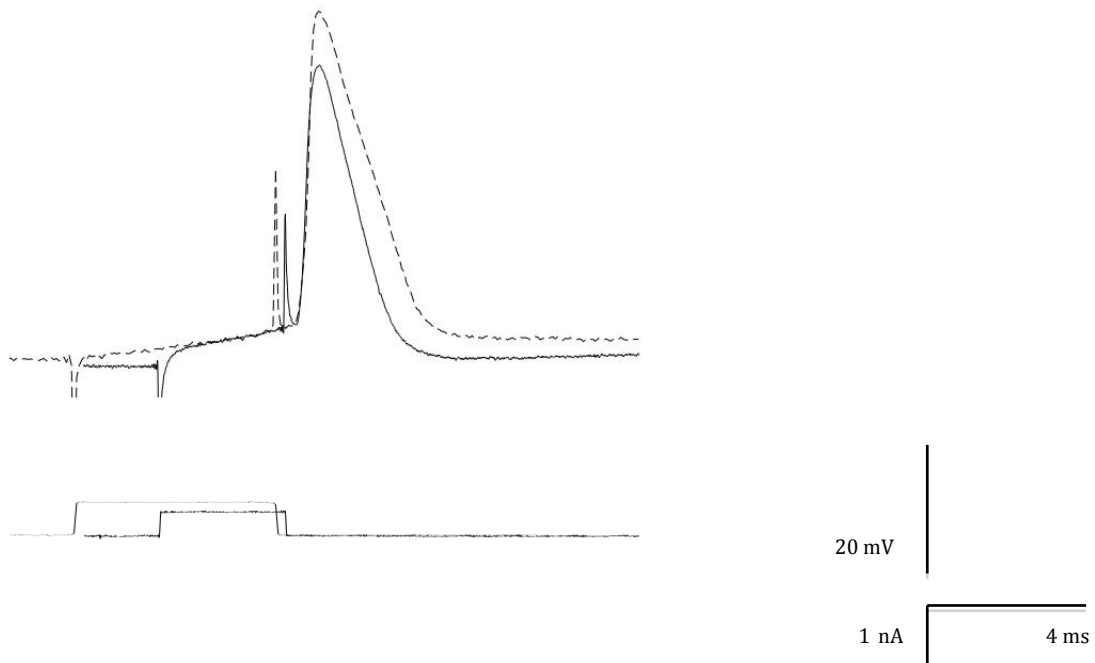
2β



2γ

Σχήμα 2. Βραχύς παλμός ηλεκτρικού ρεύματος (5 ms) πυροδοτεί μονήρες δυναμικό ενεργείας σε πυραμιδικούς νευρώνες της CA1 περιοχής του κοιλιακού (2β) και ραχιαίου (2γ) υποκάμπου. Για τον προσδιορισμό του fAHP μετράται το εύρος της υπερπόλωσης μετά το πέρας του δυναμικού ενεργείας σε σχέση με τον ουδό έκλυσης του δυναμικού ενεργείας (2γ). Για τον προσδιορισμό του ADP μετράται το εύρος της εκπολωτικής απόκλισης του δυναμικού μεμβράνης μετά το πέρας του δυναμικού ενεργείας σε σχέση με το δυναμικό ηρεμίας -πριν την εφαρμογή του παλμού (2β). Στο 2<sup>α</sup> απεικονίζεται ο τετράγωνος παλμός ηλεκτρικού ρεύματος, που οδήγησε στην εκπόλωση της μεμβράνης των δύο νευρώνων μέχρι τον ουδό έκλυσης του δυναμικού ενεργείας. Στο 2β απεικονίζεται και το mAHP (δες κείμενο παρακάτω).

Τα δυναμικά ενεργείας των Ο/Α ενδονευρώνων του έχουν μικρότερο πλάτος (Εικόνα 3, συνεχής γραμμή) από αυτά των πυραμιδικών νευρώνων του ιπποκάμπου (Εικόνα 3, διακεκομμένη γραμμή) κυρίως λόγω του βραχύτερου χρόνου φθίσης και ακολουθούνται συχνότερα από fAHP σε σχέση με τους πυραμιδικούς νευρώνες, οι οποίοι συχνά εμφανίζουν μόνο ADP (9, 32, 33, 54, 71). Οι παραπάνω βιβλιογραφικές αναφορές αφορούν στους Ο/Α ενδονευρώνες του ραχιαίου ιπποκάμπου, τα στοιχεία σχετικά με τους Ο/Α ενδονευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου είναι εξαιρετικά ελλιπή.



Εικόνα 3. Μονήρες δυναμικό ενεργείας Ο/Α ενδονευρώνα (συνεχής γραμμή, άνω κυματομορφή) και πυραμιδικού νευρώνα (διακεκομμένη γραμμή, άνω κυματομορφή) μετά από εφαρμογή τετράγωνου βραχέος (5 ms και 3 ms αντίστοιχα) παλμού ηλεκτρικού ρεύματος έντασης 5 nA και 4 nA αντίστοιχα (κάτω κυματομορφές). Το δυναμικό ενεργείας του πυραμιδικού νευρώνα έχει μακρύτερη ημίσεια διάρκεια. Αυτό οφείλεται κυρίως στο μακρύτερο χρόνο φθίσης. Το fAHP είναι μεγαλύτερο στον ενδονευρώνα. Οι συγκεκριμένοι νευρώνες έχουν συγκρίσιμα δυναμικά ηρεμίας και ουδούς. Στην απεικόνιση του δυναμικού μεμβράνης έχει κοπεί το artefact που εμφανίζεται στην αρχή της εκπόλωσης μετά την εφαρμογή του ρεύματος για λόγους οικονομίας της απεικόνισης.

Στις παρούσες πειραματικές συνθήκες μετρήθηκαν τιμές για τα χαρακτηριστικά των δυναμικών ενεργείας των υπό μελέτη νευρώνων παραπλήσιες με αυτές που αναφέρονται διεθνώς, τόσο στους Ο/Α ενδονευρώνες, όσο και στους πυραμιδικούς νευρώνες (Πίνακας 2). Ο ουδός έκλυσης δυναμικού ενεργείας στους Ο/Α ενδονευρώνες

βρισκόταν στα  $-50,3 \pm 1,8$  mV έναντι  $-57,8 \pm 1,4$  στους πυραμιδικούς νευρώνες. Αυτή η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική ( $p$  value  $< 0,05$ ). Όλοι οι δείκτες που αφορούσαν στη διάρκεια του δυναμικού ενεργείας καταδείκνυαν τη μικρότερη διάρκεια του δυναμικού ενεργείας στους O/A ενδονευρώνες σε σχέση με τους πυραμιδικούς νευρώνες, η διαφορά ήταν σε όλους τους δείκτες στατιστικά σημαντική ( $p$  value  $< 0,05$ ). Έτσι, ο χρόνος ημίσειας διάρκειας ήταν  $1,12 \pm 0,04$  ms στους O/A ενδονευρώνες έναντι  $1,56 \pm 0,11$  στους πυραμιδικούς, ο χρόνος ανόδου  $0,21 \pm 0,01$  ms έναντι  $0,31 \pm 0,02$  ms και ο χρόνος φθίσης  $1,21 \pm 0,04$  έναντι  $2,03 \pm 0,27$  ms. Τη μεγαλύτερη επίδραση στη διαμόρφωση βραχύτερου δυναμικού ενεργείας στους O/A ενδονευρώνες είχε ο βραχύτερος χρόνος φθίσης (Εικόνα 3). Το fAHP ήταν αναμενόμενα μεγαλύτερο στους O/A ενδονευρώνες σε σχέση με τους πυραμιδικούς νευρώνες ( $5,5 \pm 0,8$  mV έναντι  $2,5 \pm 0,8$  mV,  $p$  value  $< 0,05$ ) και το ADP μικρότερο στους O/A ενδονευρώνες σε σχέση με τους πυραμιδικούς νευρώνες ( $6,3 \pm 0,9$  mV έναντι  $11,5 \pm 1,6$  mV,  $p$  value  $< 0,05$ ).

	O/A ενδονευρώνες συνολικά ( $n = 12$ )	Πυραμιδικοί νευρώνες ( $n = 8$ )
Ουδός έκλυσης δυναμικού ενεργείας ( $\Delta E$ ) (mV)	$-50,3 \pm 1,8^*$	$-57,8 \pm 1,4$
Χρόνος ανόδου $\Delta E$ (ms)	$0,21 \pm 0,01^*$	$0,31 \pm 0,02$
Χρόνος φθίσης $\Delta E$ (ms)	$1,21 \pm 0,04^*$	$2,03 \pm 0,27$
Ημίσεια διάρκεια $\Delta E$ (ms)	$1,12 \pm 0,05^*$	$1,56 \pm 0,11$
Ύψος $\Delta E$ (mV)	$89,5 \pm 2,6$	$93,0 \pm 2,3$
fAHP (mV) #	$5,5 \pm 0,8^*$	$2,5 \pm 0,8$
ADP (mV) #	$6,3 \pm 0,9^*$	$11,5 \pm 1,6$

Πίνακας 2. Ενεργητικές ιδιότητες των O/A ενδονευρώνων σε σύγκριση με τους πυραμιδικούς νευρώνες. Οι πυραμιδικοί νευρώνες έχουν πιο χαμηλό ουδό και δυναμικό ενεργείας μεγαλύτερης διάρκειας όπως αυτό αντικατοπτρίζεται στο χρόνο ανόδου, φθίσης και στην ημίσεια διάρκεια. Το fAHP είναι μεγαλύτερο στους ενδονευρώνες και το ADP στους πυραμιδικούς νευρώνες. Όλες οι διαφορές είναι σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο (\*:  $p$  value  $< 0,05$ ). Το ύψος του δυναμικού ενεργείας στατιστικά δεν είναι διαφορετικό στις δύο ομάδες νευρώνων ( $p$  value  $> 0,05$ ).

#: για τους πυραμιδικούς νευρώνες  $n = 9$ .

Κατόπιν συγκρίθηκαν οι άνωθεν τιμές μεταξύ O/A ενδονευρώνων του ραχιαίου και του κοιλιακού ιπποκάμπου. Εδώ αξίζει να σημειωθεί, ότι οι O/A ενδονευρώνες είναι μία πολύ ετερογενής ομάδα νευρώνων, ώστε λόγω του σχετικά μικρού πλήθους οι διαφορές αντικατοπτρίζουν μάλλον την τυχαία διαφορετική σύσταση των δύο

δειγμάτων. Ο ουδός έκλυσης δυναμικών ενεργείας ήταν παρόμοιος στους O/A ενδονευρώνες του ραχιαίου και του κοιλιακού ιπποκάμπου ( $-52,2 \pm 2,4$  mV έναντι  $-49,0 \pm 2,8$  mV,  $p$  value  $> 0,05$ ). Η ημίσεια διάρκεια ήταν βραχύτερη στους O/A ενδονευρώνες του ραχιαίου ιπποκάμπου σε σχέση με του κοιλιακού ( $1,00 \pm 0,05$  ms έναντι  $1,20 \pm 0,05$  ms,  $p$  value  $< 0,05$ ). Το ύψος του δυναμικού ενεργείας ήταν στους O/A ενδονευρώνες του ραχιαίου ιπποκάμπου σημαντικά μεγαλύτερο από ό,τι στον κοιλιακό ιπποκάμμο ( $97,4 \pm 2,8$  mV έναντι  $83,9 \pm 2,0$  mV,  $p$  value  $< 0,05$ ). Αξίζει να σημειωθεί ότι - παρόλο που δυναμικά ενεργείας μεγάλου ύψους βρίσκονται συνήθως σε πυραμιδικούς νευρώνες - τα δυναμικά ενεργείας στους εν λόγω νευρώνες του ραχιαίου ιπποκάμπου του ορίου πολύμορφης στιβάδας/σκάφης ήταν πολύ σύντομης διάρκειας, τα περισσότερα ημίσειας διάρκειας κάτω του 1 ms, τιμές που δεν απαντώνται σε πυραμιδικούς νευρώνες και θεωρούνται χαρακτηριστικές για τους O/A ενδονευρώνες (33). Το fAHP ήταν ίδιο στους O/A ενδονευρώνες του ραχιαίου και του κοιλιακού ιπποκάμπου ( $5,6 \pm 1,2$  mV έναντι  $5,4 \pm 1,2$  mV,  $p$  value  $> 0,05$ ). Το ADP ήταν ελαφρά μεγαλύτερο στους O/A ενδονευρώνες του ραχιαίου ιπποκάμπου ( $7,8 \pm 1,4$  mV) σε σχέση με του κοιλιακού ( $5,2 \pm 1,1$  mV), η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική ( $p$  value  $> 0,05$ ).

	O/A ενδονευρώνες ραχιαίου ιπποκάμπου ( $n = 5$ )	O/A ενδονευρώνες κοιλιακού ιπποκάμπου ( $n = 7$ )
Ουδός έκλυσης δυναμικού ενεργείας ( $\Delta E$ ) (mV)	$-52,2 \pm 2,4$	$-49,0 \pm 2,8$
Ημίσεια διάρκεια $\Delta E$ (ms)	$1,00 \pm 0,05$	$1,20 \pm 0,05^*$
Ύψος $\Delta E$ (mV)	$97,4 \pm 2,8$	$83,9 \pm 2,0^*$
fAHP (mV)	$5,6 \pm 1,2$	$5,4 \pm 1,2$
ADP (mV)	$7,8 \pm 1,4$	$5,2 \pm 1,1$

Πίνακας 3. Ενεργητικές ιδιότητες των O/A ενδονευρώνων σε ραχιαίο και κοιλιακό ιπποκάμμο. Τα δυναμικά ενεργείας στον κοιλιακό ιπποκάμμο επιδεικνύουν μεγαλύτερη διάρκεια και μικρότερο ύψος (\*:  $p$  value  $< 0,05$ ). Ο ουδός, το fAHP και το ADP δεν είναι στατιστικά διαφορετικά ( $p$  value  $> 0,05$ ).

### 2.2.1.3. Μεσαία και αργά μεθυπερπολωτικά δυναμικά στους O/A ενδονευρώνες

Ο προσδιορισμός του μεσαίου (mAHP) και αργού (sAHP) μεθυπερπολωτικού δυναμικού στους O/A ενδονευρώνες έγινε μέσω πρόκλησης ριπής δυναμικών ενεργείας



δια εκπολωτικού παλμού ηλεκτρικού ρεύματος διάρκειας 104 ms (Εικόνα 4). Αμέσως μετά το τέλος της απόκρισης του δυναμικού μεμβράνης στον παλμό μετρήθηκε το mAHP. Το sAHP μετρήθηκε στα 380-400 ms μετά το τέλος του παλμού. Οι τιμές που προέκυψαν αναγράφονται στον πίνακα 3<sup>α</sup>.

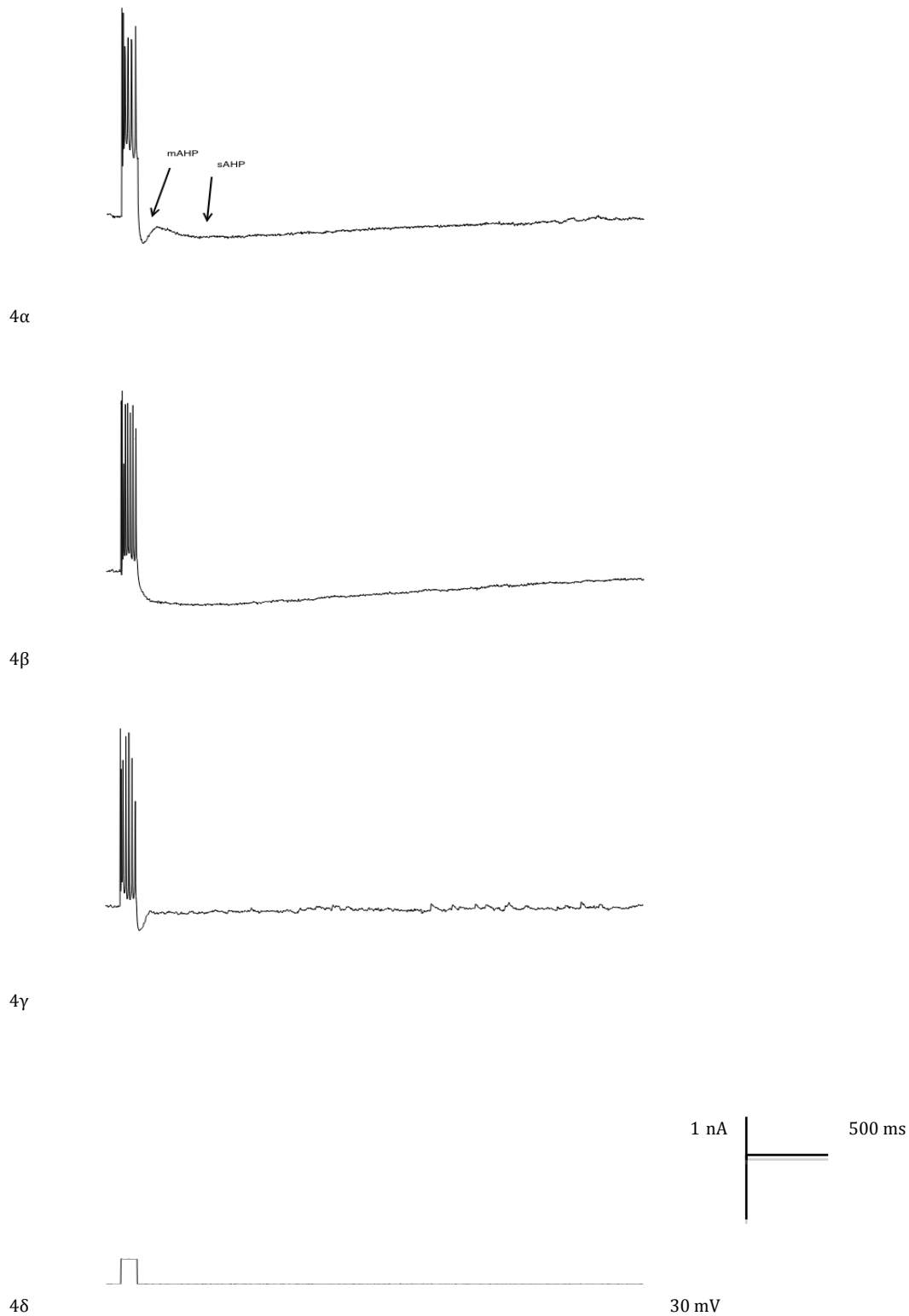
	O/A ενδονευρώνες ραχιαίου ιπποκάμπου (n = 6)	O/A ενδονευρώνες κοιλιακού ιπποκάμπου (n = 7)	O/A ενδονευρώνες ιπποκάμπου (n = 13)
mAHP (mV)	8,0 ± 0,9	8,9 ± 1,0	8,5 ± 0,7
sAHP (mV)	7,0 ± 1,8	5,9 ± 1,4	6,4 ± 1,1

Πίνακας 3<sup>α</sup>. Μευθπερπολωτικά δυναμικά στους O/A ενδονευρώνες της περιοχής CA1 του ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα mAHP και sAHP των δύο περιοχών.

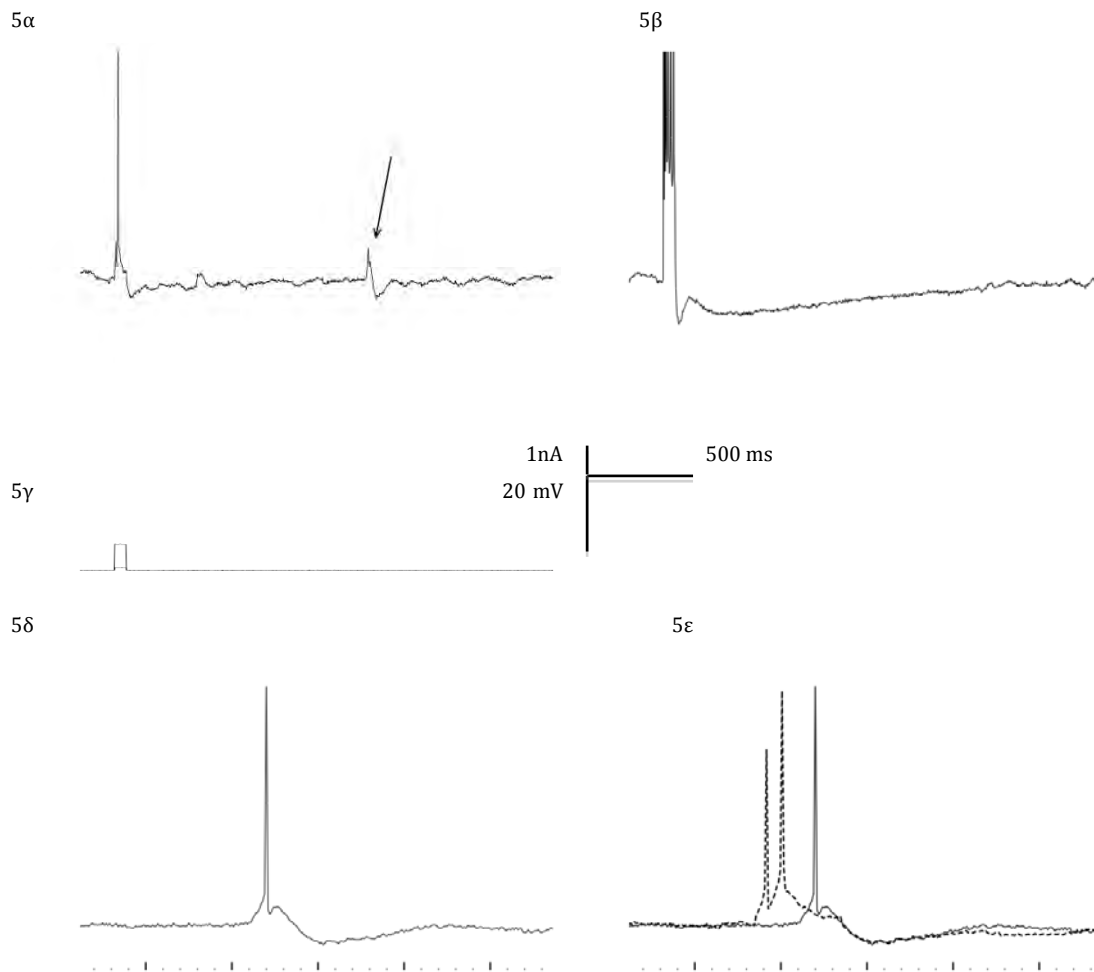
Στους O/A ενδονευρώνες του ραχιαίου και του κοιλιακού ιπποκάμπου παρατηρήθηκαν τρεις συνδυασμοί mAHP και sAHP: κάποιοι O/A ενδονευρώνες είχαν σημαντικό mAHP και sAHP, σε κάποιους υπερίσχυε το sAHP, ενώ σε άλλους το mAHP (εικόνα 4α, 4β και 4 γ, αντίστοιχα). Οι τιμές των δύο μετασυναπτικών δυναμικών κυμαίνονταν από μη μετρήσιμες έως τιμές που προσέγγιζαν ή ξεπερνούσαν τα 10 mV, με τη διακύμανση του sAHP να είναι μεγαλύτερη από ό,τι του mAHP.

Το mAHP ήταν παρόμοιο στους O/A ενδονευρώνες του ραχιαίου (n=6) και κοιλιακού (n = 7) ιπποκάμπου (8,0 ± 0,9 mV στον ραχιαίο έναντι 8,9 ± 1,0 mV στον κοιλιακό ιπποκάμμο, *p* value > 0,05). Το sAHP στους O/A ενδονευρώνες του ραχιαίου ιπποκάμπου ήταν 7,0 ± 1,8 mV και του κοιλιακού ιπποκάμπου 5,9 ± 1,4 mV, η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική (*p* value > 0,05). Συνολικά, οι O/A ενδονευρώνες του ιπποκάμπου (n=13) επεδείκνυαν mAHP εύρους 8,5±0,7mV και sAHP εύρους 6,4±1,1mV.

Στις εικόνες 4, 5 και 6 αναδεικνύεται ο ρόλος του sAHP στη διεγερσιμότητα των O/A ενδονευρώνων. Στο 4γ φαίνεται πως ο νευρώνας με το μικρό SAHP έχει ένα εξαιρετικά «ανήσυχο» δυναμικό μεμβράνης. Παρόλο που το φαινόμενο δε χαρακτηρίστηκε φαρμακολογικά, ήταν τόσο διαδεδομένο στους O/A ενδονευρώνες και ήδη περιγεγραμμένο σε έρευνες τρίτων (41), ούτως ώστε να μπορεί να ειπωθεί πως επρόκειτο όχι για θόρυβο, αλλά για αυτόματη συναπτική δραστηριότητα. Παράλληλα παρατηρούντο αυθόρμητα δυναμικά ενεργείας στο δυναμικό ηρεμίας των περισσότερων O/A ενδονευρώνων της παρούσας έρευνας. Το φαινόμενο αυτό έχει



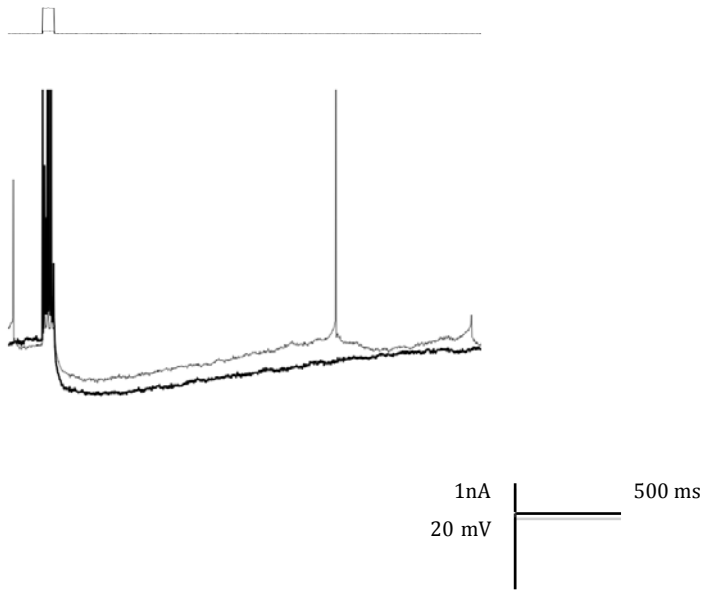
Εικόνα 4. Μέτρηση των mAHP και sAHP σε O/A ενδονευρώνες της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου. Η έκλυση ριπής δυναμικών ενεργείας επιτυγχάνεται με την εφαρμογή τετράγωνου παλμού ηλεκτρικού ρεύματος. Το mAHP μετράται αμέσως μετά το πέρας του παλμού, το sAHP 380-400 ms μετά το πέρας του παλμού. 4α: Νευρώνας με διακριτά mAHP και sAHP, από τον οποίο προκύπτει ξεκάθαρα σε ποια χρονική στιγμή απαντάται η μέγιστη τιμή των εν λόγω μεθυπερπολωτικών δυναμικών. 4β: Νευρώνας στον οποίο υπερσχύει το sAHP. 4γ: Νευρώνας στον οποίο υπερσχύει το mAHP. 4δ: Ο τετράγωνος παλμός ηλεκτρικού ρεύματος που χρησιμοποιήθηκε για την έκλυση των δυναμικών ενεργείας. Και οι τρεις κυματομορφές (4α, 4β, 4γ) προέκυψαν από παλμό έντασης 1 nA. Το μεγαλύτερο εύρος της προκληθείσας εκπόλωσης στον νευρώνα του 4α οφείλεται στη μεγαλύτερη αντίσταση εισόδου R (102 MΩ έναντι 60 και 88 MΩ). Επιστάνται η προσοχή στο „ανήσυχο“ δυναμικό μεμβράνης στο 4γ (επεξήγηση στο κείμενο).



Εικόνα 5. Λειτουργική σημασία του sAHP μέσω της επίδρασης στη διεγερσιμότητα της μεμβράνης του νευρώνα και της καταστολής της αυθόρμητης δραστηριότητας στο δυναμικό ηρεμίας. 5α: Απόκριση της μεμβράνης σε ερεθισμό με ρεύμα έντασης 0,2 nA. Τα εκλυόμενα mAHP και sAHP δεν καταστέλλουν δραστικά την αυθόρμητη δραστηριότητα της κυτταρικής μεμβράνης στο δυναμικό ηρεμίας, με αποτέλεσμα να προσεγγίζεται ο ουδός και να πυροδοτείται δυναμικό ενεργείας (βέλος). 5δ: Το δυναμικό ενεργείας του 5α (βέλος) σε μεγέθυνση, λόγω της μεγαλύτερης συχνότητας δειγματοληψίας αναδεικνύεται το ύψος του. Η σήμανση με τις παχύτερες γραμμές αναλογεί σε 100 ms, η κλίμακα του δυναμικού μεμβράνης παρέμεινε η ίδια. Πρόκειται για δυναμικό ενεργείας με fAHP και mAHP. 5ε: Ξανά το δυναμικό του 5δ. Με διακεκομμένη γραμμή η απόκριση της μεμβράνης στον ηλεκτρικό παλμό 0,2 nA από το 5α με το mAHP. Η πανομοιότυπη κινητική των υπερπολωτικών δυναμικών δείχνει ότι η υπερπόλωση μετά το αυθόρμητο δυναμικό ενεργείας είναι mAHP και όχι συναπτικό ανασταλτικό δυναμικό (IPSP). 5β: Με την εφαρμογή ηλεκτρικού παλμού έντασης 1 nA εκλύεται σημαντικά μεγαλύτερο sAHP, που καταστέλλει την αυθόρμητη δραστηριότητα του νευρώνα για πολλά ms.

μελετηθεί επίσης από τρίτους (32) και θεωρείται φαινόμενο που εξαρτάται από ενδογενή χαρακτηριστικά των O/A ενδονευρώνων (συνδυασμό δραστηριότητας μετασυναπτικών διαύλων ιόντων). Τα φαινόμενα αυτά χαρακτηρίζουν τη διεγερσιμότητα των O/A ενδονευρώνων στο δυναμικό ηρεμίας και τη δυνατότητά τους να συγχρονίζουν τη δραστηριότητα των κυκλωμάτων του ιπποκάμπου (31). Το sAHP φαίνεται στις εικόνες 5 και 6 ότι επηρεάζει σημαντικά την αυτόματη συναπτική

δραστηριότητα και τα αυθόρμητα δυναμικά ενεργείας καθιστώντας τη μεμβράνη λιγότερο διεγερσιμη για αρκετά χιλιοστά του δευτερολέπτου.



Εικόνα 6. Απόκριση O/A ενδονευρώνα της περιοχής CA1 του κοιλιακού ιπποκάμπου. Η απόκριση σε παλμό έντασης 1 nA απεικονίζεται με παχιά γραμμή, η απόκριση σε παλμό 0,2 nA με συμβατική γραμμή. Στο πάνω μέρος της εικόνας εμφανίζονται οι παλμοί, ο ένας επί του άλλου. Γίνεται εμφανής η λειτουργική σημασία του sAHP που επηρεάζει τη διεγερσιμότητα της κυτταρικής μεμβράνης για πολλά ms: ο παλμός μικρότερης έντασης οδηγεί στην εμφάνιση μικρότερου sAHP, η υπερπόλωση λήγει νωρίτερα και η μεμβράνη επανέρχεται στο δυναμικό ηρεμίας, όπου ο νευρώνας παρουσιάζει αυθόρμητη δραστηριότητα. Με τον παλμό μεγαλύτερης έντασης εμφανίζεται μεγαλύτερο sAHP και η μεμβράνη παραμένει σιωπηλή για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

## 2.2.2. Διαφορές στη διεγερσιμότητα των O/A ενδονευρώνων της CA1 περιοχής σε ραχιαίο και κοιλιακό ιπποκάμπε - Επίδραση της μορφίνης στις ιδιότητες και τη διεγερσιμότητα των O/A ενδονευρώνων της περιοχής CA1 του ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπε.

### 2.2.2.1. Επίδραση της μορφίνης στις παθητικές ιδιότητες των O/A ενδονευρώνων της περιοχής CA1 του ιπποκάμπε

Για τη διερεύνηση της επίδρασης της μορφίνης στους O/A ενδονευρώνες της περιοχής CA1 του ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπε προστέθηκε διάλυμα υδροχλωρικής μορφίνης στο τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό που τροφοδοτούσε τους O/A ενδονευρώνες. Η τελική συγκέντρωση της μορφίνης στο τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό ήταν 5  $\mu\text{M}$  ( $n = 1$ ) και 30  $\mu\text{M}$  ( $n = 7$ ). Ως ανταγωνιστής της δράσης της μορφίνης χρησιμοποιήθηκε ναλοξόνη σε τελική συγκέντρωση 50  $\mu\text{M}$  ή 100  $\mu\text{M}$  στο τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό ( $n = 2$ ).

Μελετήθηκε η επίδραση της μορφίνης στην αυθόρμητη δραστηριότητα των O/A ενδονευρώνων, στις παθητικές και ενεργητικές ιδιότητες, στη απόκριση των νευρώνων σε παρατεταμένο υπερπολωτικό και εκπολωτικό παλμό.

Συνολικά παρατηρήθηκε δράση της μορφίνης στο 75 % των O/A ενδονευρώνων (6 από τους 8) αν συνυπολογιστούν και οι δύο συγκεντρώσεις μορφίνης (5  $\mu\text{M}$  και 30  $\mu\text{M}$ ).

Στον πίνακα 4 συνοψίζονται οι παθητικές ιδιότητες των O/A ενδονευρώνων ( $n = 8$ ) πριν και κατά τη χορήγηση μορφίνης. Η στατιστική ανάλυση έγινε με Student t test κατά ζεύγη. Στον πίνακα 4 συμπεριλαμβάνονται ευρήματα από όλους τους O/A ενδονευρώνες στους οποίους χορηγήθηκε μορφίνη (και από αυτούς που δεν αποκρίθηκαν στη μορφίνη), με το ερώτημα αν παρατηρείται αύξηση του ρεύματος διαρροής και εκφύλιση των ενδονευρώνων υπό την επίδραση της μορφίνης. Συμπεριλαμβάνονται και οι δύο συγκεντρώσεις (5  $\mu\text{M}$  και 30  $\mu\text{M}$ ) μετά από στατιστικό έλεγχο για το αν επηρεάζεται αρνητικά η ακρίβεια των αποτελεσμάτων, που έδειξε ότι τα αποτελέσματα μπορούν να συμψηφιστούν. Οι O/A ενδονευρώνες επέδειξαν συνολικά σταθερό δυναμικό μεμβράνης κατά τη χορήγηση μορφίνης ( $-62,0 \pm 2,1$  mV πριν έναντι  $-63,0 \pm 2,3$  mV κατά τη διάρκεια της χορήγησης μορφίνης,  $p$  value  $> 0,05$ ). Η αντίσταση εισόδου της κυτταρικής μεμβράνης έδειξε τάση μείωσης, η οποία δεν ήταν

στατιστικά σημαντική ( $70,6 \pm 8,0$  mV πριν έναντι  $52,6 \pm 6,7$  mV κατά τη διάρκεια της χορήγησης,  $p$  value  $> 0,05$ ). Η χρονική σταθερά ταυ της μεμβράνης μειώθηκε στατιστικά σημαντικά με τη χορήγηση της μορφίνης ( $15,3 \pm 2,4$  ms πριν έναντι  $11,0 \pm 9,0$  ms, κατά τη διάρκεια της χορήγησης μορφίνης,  $p$  value  $< 0,05$ ).

	O/A ενδονευρώνες πριν τη χορήγηση μορφίνης ( $n = 8$ )	O/A ενδονευρώνες κατά τη διάρκεια χορήγησης μορφίνης ( $n = 8$ )
Δυναμικό μεμβράνης (mV)	$-62,0 \pm 2,1$	$-63,0 \pm 2,3$
Αντίσταση εισόδου (MΩ)	$70,6 \pm 8,0$	$52,6 \pm 6,7$
Χρονική σταθερά ταυ (ms)	$15,3 \pm 2,4$	$11,0 \pm 9,0$ *

Πίνακας 4: Παθητικές ιδιότητες των O/A ενδονευρώνων πριν και μετά τη χορήγηση μορφίνης. Τα ευρήματα προκύπτουν από το ίδιο δείγμα O/A ενδονευρώνων πριν και μετά τη χορήγηση του φαρμάκου, η στατιστική σύγκριση έγινε με Student t test κατά ζεύγη. Περιλαμβάνονται όλοι οι ενδονευρώνες στους οποίους χορηγήθηκε το φάρμακο, ανεξάρτητα από το αν παρατηρήθηκε κάποια δράση του φαρμάκου σε αυτούς ή όχι. Η συγκέντρωση της μορφίνης είναι  $5 \mu\text{M}$  ( $n = 1$ ) και  $30 \mu\text{M}$  ( $n = 7$ ). Απάλειψη των στοιχείων από τον ενδονευρώνα στον οποίο χορηγήθηκε η μικρότερη συγκέντρωση του φαρμάκου δεν επηρέασε τα στατιστικά αποτελέσματα. Το δυναμικό της μεμβράνης δεν άλλαξε κατά τη διάρκεια χορήγησης του φαρμάκου, η αντίσταση παρουσίασε τάση μείωσης, που δεν ήταν στατιστικά σημαντική ( $p$  value  $> 0,05$ ). Η χρονική σταθερά  $\tau$  της μεμβράνης μειώθηκε σημαντικά κατά τη διάρκεια χορήγησης της μορφίνης (\*:  $p$  value  $< 0,05$ ).

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για την αντίσταση της κυτταρικής μεμβράνης και τη χρονική σταθερά  $\tau$  από τη θεώρηση των O/A ενδονευρώνων στους οποίους παρουσιάστηκε δράση της μορφίνης (6 από τους 8) ήταν παρόμοια και δεν αναφέρονται ξεχωριστά. Εξάλλου αξίζει να αναφερθεί, ότι το δυναμικό μεμβράνης υπερπολώθηκε κατά τη χορήγηση μορφίνης σε πέντε από τους έξι O/A ενδονευρώνες σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο ( $-61,0 \pm 3,0$  mV έναντι  $-64,2$  mV,  $n = 5$ ,  $p$  value  $< 0,05$ , paired Student t test). Επειδή όμως ένας O/A ενδονευρώνας εκπολώθηκε κατά τη χορήγηση μορφίνης, στο σύνολο των O/A ενδονευρώνων δεν παρουσιάστηκε στατιστική μείωση του δυναμικού μεμβράνης παρουσία του φαρμάκου. Ο ενδονευρώνας αυτός παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και η συμπεριφορά του αναφέρεται αναλυτικά σε επόμενο κεφάλαιο. Η υπερπόλωση του δυναμικού μεμβράνης στους λοιπούς O/A ενδονευρώνες οδήγησε σε μείωση της αυθόρμητης δραστηριότητας στο δυναμικό ηρεμίας. Στο χρονικό διάστημα της μέγιστης επίδρασης της μορφίνης στον ιστό παρατηρήθηκε μείωση της συχνότητας των αυθόρμητων δυναμικών ενεργείας.

### **2.2.2.2. Επίδραση της μορφίνης στις ενεργητικές ιδιότητες των O/A ενδονευρώνων της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου**

Μελετήθηκε η επίδραση της μορφίνης στο ύψος των δυναμικών ενεργείας, την ημίσεια διάρκεια των δυναμικών ενεργείας και στο γρήγορο μεθυπερπολωτικό δυναμικό (fAHP). Συγκρίθηκαν οι παραπάνω παράμετροι σε συνολικά πέντε O/A ενδονευρώνες, πριν και κατά τη χορήγηση μορφίνης. Η στατιστική σύγκριση έγινε με Student t test κατά ζεύγη.

Σχετικά με το ύψος των δυναμικών ενεργείας δεν παρατηρήθηκε μεταβολή με την προσθήκη μορφίνης στο τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό ( $86,2 \pm 3,4$  mV έναντι  $82,8 \pm 4,3$  mV,  $n = 5$ ,  $p$  value  $> 0,05$ ). Επίσης δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ημίσεια διάρκεια των δυναμικών ενεργείας πριν και κατά τη χορήγηση μορφίνης ( $1,15 \pm 0,06$  ms έναντι  $1,31 \pm 0,07$  ms,  $n = 5$ ,  $p$  value  $> 0,05$ ). Τα στοιχεία αυτά συνηγορούν στη σταθερότητα των O/A ενδονευρώνων κατά τη διάρκεια της καταγραφής παρουσία μορφίνης στο τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό.

Το fAHP εξαλείφθηκε πλήρως στην πλειονότητα των O/A ενδονευρώνων με την προσθήκη του φαρμάκου στο τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Συνολικά 4 από τους 5 O/A ενδονευρώνες παρουσίασαν fAHP και ένας O/A ενδονευρώνας δεν παρουσίασε fAHP πριν τη χορήγηση μορφίνης ( $5,3 \pm 1,8$  mV,  $n = 5$ ). Μετά τη χορήγηση της μορφίνης μόνο ένας O/A ενδονευρώνας παρουσίασε fAHP, ενώ 4 ενδονευρώνες δεν εμφάνισαν fAHP. Η επίδραση της μορφίνης στο fAHP φαίνεται να είναι έμμεση μέσω της επίδρασης στο δυναμικό ηρεμίας, αφού το fAHP μετά τη χορήγηση της μορφίνης μετρήθηκε σε πιο υπερπολωμένο δυναμικό μεμβράνης.

Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον πίνακα 5.

### **2.2.2.3. Απόκριση των O/A ενδονευρώνων σε παρατεταμένο υπερπολωτικό παλμό ηλεκτρικού ρεύματος αυξανόμενης έντασης - Επίδραση της μορφίνης 30 $\mu$ M στο ρεύμα $I_h$ και στα χαρακτηριστικά της εκπόλωσης αναπήδησης (rebound depolarization).**

Διερευνήθηκε η απόκριση των O/A ενδονευρώνων της περιοχής CA1 του ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου στην εφαρμογή μακρού (480 ms), τετράγωνου υπερπολωτικού

παλμού ηλεκτρικού ρεύματος αυξανόμενης έντασης (από 0,05 nA μέχρι 1,15 nA, αύξηση εύρους παλμού ανά 0,1 nA) σε συνθήκες current clamp (καθήλωσης ρεύματος).

	Ο/Α ενδονευρώνες πριν τη χορήγηση μορφίνης (n = 5)	Ο/Α ενδονευρώνες κατά τη διάρκεια χορήγησης μορφίνης (n = 5)
Ύψος δυναμικού ενεργείας (mV)	86,2 ± 3,4	82,8 ± 4,3
Ημίσεια διάρκεια (ms)	1,15 ± 0,06	1,31 ± 0,07
fAHP (mV)	5,3 ± 1,8	-----

Πίνακας 5: Επίδραση της μορφίνης στις ενεργητικές ιδιότητες των Ο/Α ενδονευρώνων της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου. Δεν παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο ύψος του δυναμικού ενεργείας και στην ημίσεια διάρκεια (p value > 0,05, συζευγμένο Student t test). Για το fAHP δεν αναφέρεται μέσος όρος παρουσία μορφίνης, καθώς η μορφίνη εξάλειψε πλήρως το fAHP σε τέσσερις από πέντε ενδονευρώνες.

Η αλληλουχία των συνολικά 12 παλμών εφαρμόστηκε πέντε φορές κατ' επανάληψη και κατόπιν εξήχθη μέσω ηλεκτρονικής επεξεργασίας με το λογισμικό clampfit η συνισταμένη των υπερπολωτικών αποκρίσεων της κυτταρικής μεμβράνης σε κάθε ηλεκτρικό παλμό, με σκοπό να μετριάσει η επίδραση του μηχανικού και ηλεκτρικού θορύβου.

Στους Ο/Α ενδονευρώνες του **ραχιαίου** ιπποκάμπου έχει διαπιστωθεί ότι η κυματομορφή που προκύπτει από την εφαρμογή ενός τέτοιου ηλεκτρικού παλμού έχει τα εξής κύρια χαρακτηριστικά:

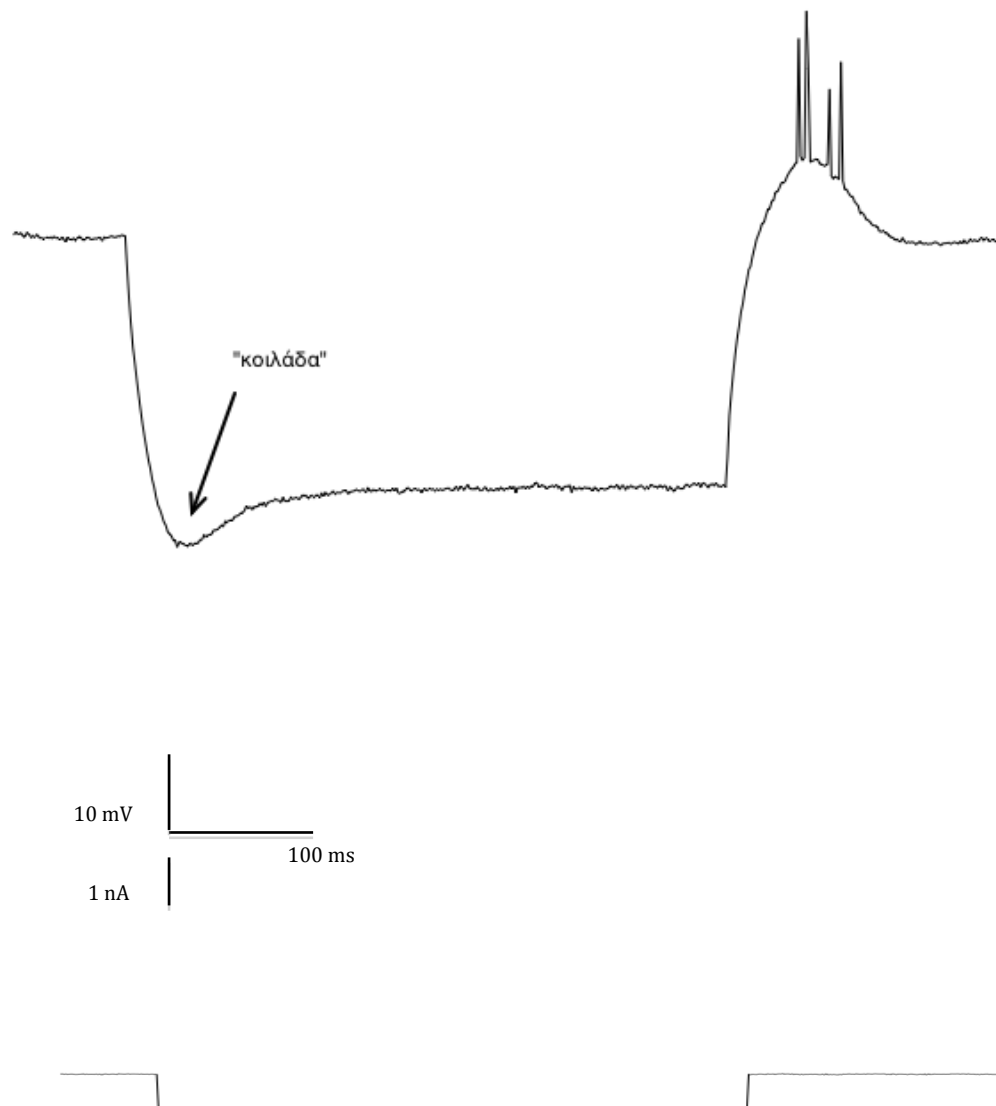
- Το εύρος της αρχικής υπερπόλωσης της νευρωνικής μεμβράνης μειώνεται παρά το γεγονός ότι η ένταση του εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού ρεύματος παραμένει σταθερή (Εικόνα 7), η δε μείωση του εύρους της υπερπόλωσης δημιουργεί την εντύπωση «κοιλιάδας» («sag») στην αρχή της κυματομορφής. Η μέγιστη διαφορά δυναμικού της κυτταρικής μεμβράνης σε σχέση με το δυναμικό ηρεμίας, που προκύπτει ως αποτέλεσμα του υπερπολωτικού παλμού ρεύματος, βρίσκεται ως εκ τούτου στον πυθμένα του «sag» και στο εξής θα αποκαλείται  $\Delta V_{peak}$ . Η μερική εκπόλωση που οδηγεί στο παραπάνω φαινόμενο οφείλεται στην αθρόα ενεργοποίηση του ρεύματος  $I_h$ , ενός μεικτού ρεύματος  $Na^+/K^+$ , το οποίο λειτουργεί ως ανώμαλος ή ανάστροφος ανορθωτής (38, 39, 60). Οι δίαυλοι του ρεύματος  $I_h$  δεν αδρανοποιούνται όσο διαρκεί ο παλμός με αποτέλεσμα η



κυτταρική μεμβράνη να είναι σταθερά υπερπολωμένη μέχρι το τέλος του ηλεκτρικού παλμού. Η διαφορά δυναμικού της κυτταρικής μεμβράνης στο τέλος του παλμού σε σχέση με το δυναμικό ηρεμίας θα αποκαλείται στο εξής  $\Delta V_{ss}$ . Η συντριπτική πλειονότητα των O/A ενδονευρώνων της περιοχής CA1 του ραχιαίου ιπποκάμπου παρουσιάζουν την εν λόγω «κοιλιάδα», που καταδεικνύει την ενεργοποίηση του ρεύματος  $I_h$ . Αναφερόμαστε σε «αθρόα ενεργοποίηση» του  $I_h$  ως αποτέλεσμα της εφαρμογής του υπερπολωτικού παλμού, γιατί το ρεύμα  $I_h$  είναι μερικώς ενεργοποιημένο και στο δυναμικό ηρεμίας (37, 59, 65).

- Αμέσως μετά το πέρας του ηλεκτρικού παλμού η κυτταρική μεμβράνη συνεχίζει για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα να εκπολώνεται εμφανίζοντας ένα «όρος», το οποίο χαρακτηρίζεται ως εκπόλωση αναπήδησης («rebound depolarization»). Ο υποκείμενος μηχανισμός της εκπόλωσης αναπήδησης έχει μελετηθεί σε συνθήκες καθήλωσης τάσης και ρεύματος στους πυραμιδικούς νευρώνες της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου (63). Αποδίδεται αφενός στην άρση της αδρανοποίησης του ρεύματος ασβεστίου  $I_T$  κατά τη διάρκεια της παρατεταμένης υπερπόλωσης της μεμβράνης και αφετέρου στο ουραίο ρεύμα (tail current) που εμφανίζεται με τη λήξη της υπερπόλωσης και την απενεργοποίηση του  $I_h$ . Το φαινόμενο αυτό έχει μελετηθεί σε πολλές κατηγορίες νευρώνων και ο υποκείμενος μηχανισμός φαίνεται να μην είναι ταυτόσημος σε όλα τα είδη νευρώνων (1, 16, 52), ούτως ώστε τα ευρήματα στους πυραμιδικούς νευρώνες της CA1 περιοχής να μην μπορούν να θεωρηθούν αποδεικτικά για τους O/A ενδονευρώνες της CA1 περιοχής.
- Ενίοτε πυροδοτούνται δυναμικά ενεργείας ως αποτέλεσμα της εκπόλωσης αναπήδησης.

Τα στοιχεία για τη συμπεριφορά του δυναμικού μεμβράνης των O/A ενδονευρώνων του **κοιλιακού** ιπποκάμπου υπό ανάλογες συνθήκες είναι ελλιπή, από όσο γνωρίζουμε εδώ παρουσιάζονται τα πρώτα ηλεκτροφυσιολογικά δεδομένα για τους ενδονευρώνες αυτούς.



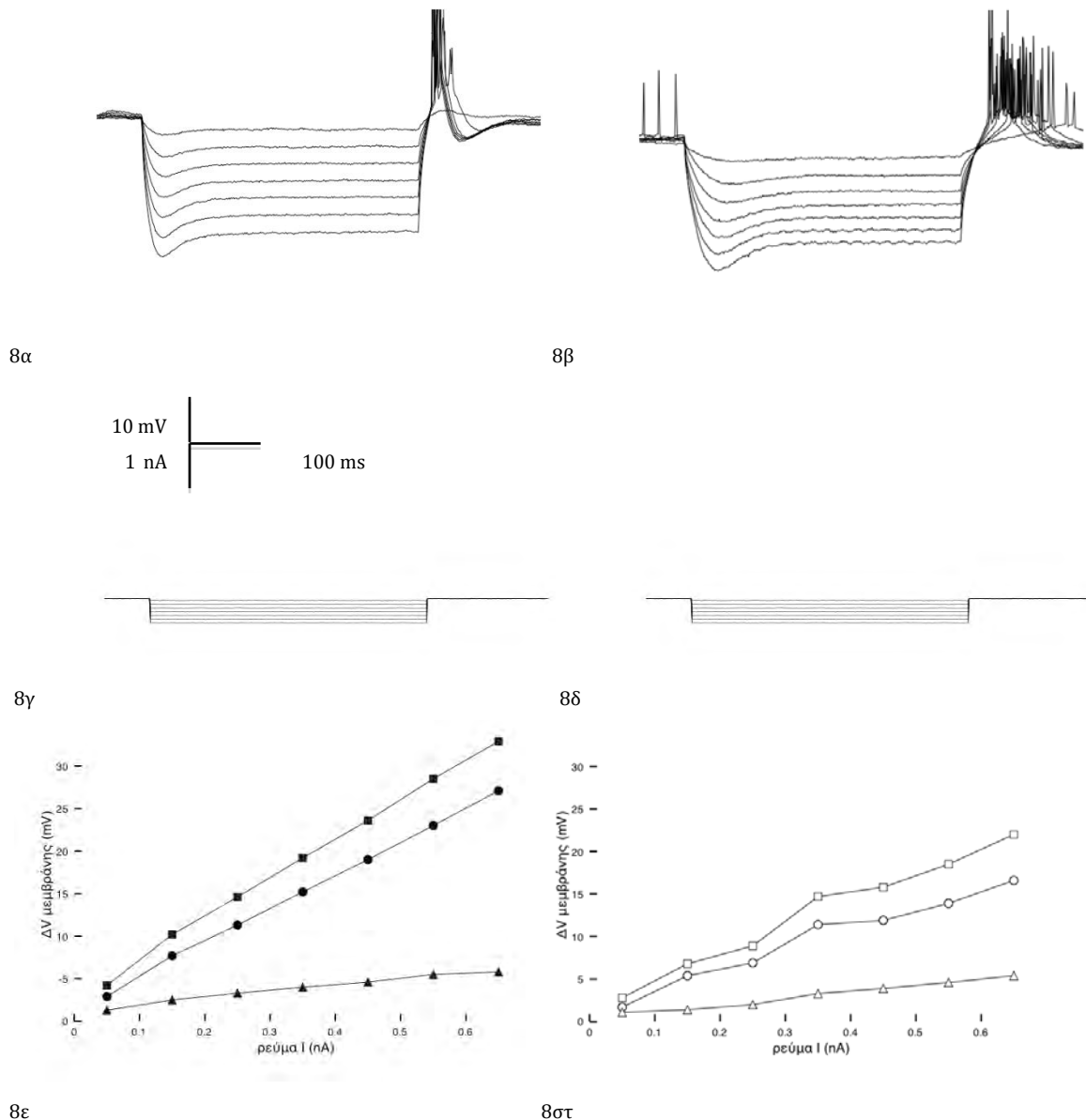
Εικόνα 7. Απόκριση του δυναμικού μεμβράνης O/A ενδονευρώνα του ραχιαίου υποκάμπου (άνω κυματομορφή) σε τετράγωνο παρατεταμένο παλμό υπερπολωτικού ηλεκτρικού ρεύματος (κάτω κυματομορφή). Μετά από την αρχική υπερπόλωση η κυματομορφή του δυναμικού μεμβράνης ανακάμπτει μερικώς λόγω της διάνοιξης των διαύλων νατρίου/καλίου ανώμαλης ανόρθωσης, που φέρουν το ρεύμα  $I_h$ . Οπτικό αποτέλεσμα είναι η «κοιλιάδα», η οποία παρατηρείται στην αρχή της υπερπόλωσης. Μετά τη μερική ανάκαμψη το δυναμικό μεμβράνης παραμένει σταθερά υπερπολωμένο μέχρι το τέλος του παλμού, γιατί οι διαύλοι δεν αδρανοποιούνται. Μετά το πέρας του παλμού παρατηρείται η εκπόλωση αναπήδησης («rebound depolarization»), που οφείλεται μερικώς στην απενεργοποίηση του  $I_h$ . Εδώ η εκπόλωση φτάνει τον ουδό και πυροδοτεί δυναμικά ενεργείας.

Οι δεκατέσσερις O/A ενδονευρώνες από τους οποίους έγιναν ενδοκυττάρειες καταγραφές εμφάνισαν σε συμφωνία με τις μέχρι τώρα βιβλιογραφικές αναφορές τη χαρακτηριστική «κοιλιάδα» στην αρχή της υπερπολωτικής απόκλισης του δυναμικού μεμβράνης, γεγονός που καταδεικνύει την ενεργοποίηση του  $I_h$ . Αυτό παρατηρήθηκε

στο 100% των O/A ενδονευρώνων του ραχιαίου ιπποκάμπου ( $n = 6$ ) και στο 100% του κοιλιακού ιπποκάμπου ( $n = 8$ ). Επίσης εμφανίστηκε σε όλους τους ενδονευρώνες εκπόλωση αναπήδησης.

Ωστόσο, η κυματομορφή που απαντήθηκε στις δύο ομάδες O/A ενδονευρώνων παρουσίασε εμφανείς διαφορές (Εικόνα 8). Στην εικόνα 8α και 8β εμφανίζεται η κυματομορφή που προκύπτει σε χαρακτηριστικό παράδειγμα O/A ενδονευρώνα του κοιλιακού και του ραχιαίου ιπποκάμπου αντίστοιχα, κατά την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος αυξανόμενης έντασης (8γ και 8δ). Στο 8ε και 8στ απεικονίζονται οι καμπύλες δυναμικού/ρεύματος (IV curves) των δύο O/A ενδονευρώνων του 8α και 8β αντίστοιχα. Οι καμπύλες δυναμικού/ρεύματος απεικονίζουν τη διαφορά δυναμικού μεμβράνης ( $\Delta V$ ) κατά την υπερπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης σε σχέση με το δυναμικό ηρεμίας ως συνάρτηση της έντασης του υπερπολωτικού ρεύματος  $I$  πριν ( $\Delta V_{peak}$ , τετράγωνα σύμβολα) και μετά ( $\Delta V_{ss}$ , κυκλικά σύμβολα) την αθρόα ενεργοποίηση του  $I_h$  στους δύο O/A ενδονευρώνες, καθώς και τη διαφορά τους ( $\Delta V_{peak-ss}$ , τρίγωνα σύμβολα).

Κατά πρώτον, η υπερπόλωση που προκύπτει για ρεύμα ίσης έντασης είναι μεγαλύτερη στους O/A ενδονευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου από ό,τι στους ενδονευρώνες του ραχιαίου ιπποκάμπου (8α έναντι 8β και 8ε έναντι 8στ). Αυτό γίνεται εμφανέστερο για ρεύμα μεγαλύτερης έντασης και αφορά τόσο στο  $\Delta V_{peak}$  όσο και στο  $\Delta V_{ss}$ . Στην εικόνα 9 απεικονίζεται η διαφορά δυναμικού ( $\Delta V$ ) κατά την υπερπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης σε σχέση με το δυναμικό ηρεμίας ως συνάρτηση της έντασης του υπερπολωτικού ρεύματος  $I$  πριν ( $\Delta V_{peak}$ , 9α) και μετά ( $\Delta V_{ss}$ , 9β) την αθρόα ενεργοποίηση του  $I_h$  στους υπό μελέτη O/A ενδονευρώνες του κοιλιακού (μαύροι κύκλοι και τετράγωνα αντίστοιχα,  $n = 8$ ) και του ραχιαίου (άσπροι κύκλοι και τετράγωνα αντίστοιχα,  $n = 6$ ) ιπποκάμπου. Η κλίση της παλινδρόμησης στους O/A ενδονευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου (διακεκομμένες γραμμές) είναι μεγαλύτερη από την κλίση της παλινδρόμησης στους O/A ενδονευρώνες του ραχιαίου ιπποκάμπου (συνεχείς γραμμές). Η κλίση της διαφοράς τους  $\Delta V_{peak-ss}$  παραμένει, ωστόσο, η ίδια (βλ. παραδειγματικούς O/A ενδονευρώνες της εικόνας 8, 8ε έναντι 8στ) και δεν απεικονίζεται στην εικόνα 9 για λόγους ευκρίνειας. Οι τιμές των  $\Delta V_{peak}$ ,  $\Delta V_{ss}$  και  $\Delta V_{peak-ss}$  από τους O/A ενδονευρώνες που εξετάστηκαν αναφέρονται αναλυτικά στο κείμενο παρακάτω και στον πίνακα 4.



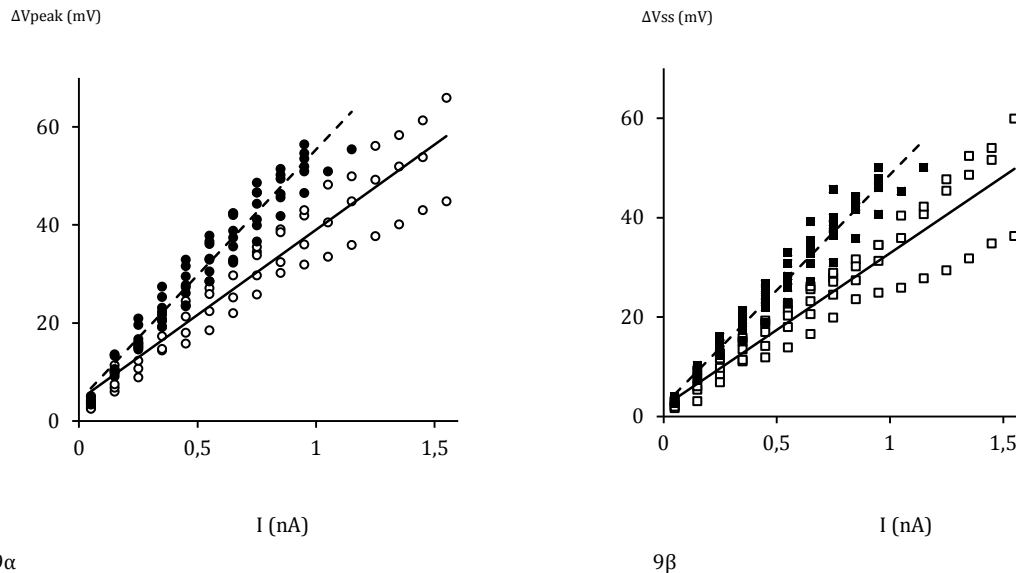
8ε

8στ

Εικόνα 8. Ενδοκυττάρια καταγραφή από O/A ενδονευρώνες του κοιλιακού (8α) ιπποκάμπου και του ραχιαίου ιπποκάμπου (8β). Στον O/A ενδονεύρωνα του κοιλιακού ιπποκάμπου η αύξηση του έντασης του ηλεκτρικού παλμού (σε βήματα των 0,1 nA) προκαλεί μεγαλύτερη υπερπόλωση (8α, 8ε) από ό,τι στον ενδονευρώνα του ραχιαίου ιπποκάμπου (8β, 8στ), η διαφορά είναι πιο εμφανής στους παλμούς μεγαλύτερης έντασης. Η εκπόλωση αναπήδησης στον κοιλιακό ιππόκαμπο οδηγεί γρηγορότερα σε δυναμικά ενεργείας, τα οποία εμφανίζονται συχνά εν ριπή και οδηγούν σε γρήγορη επαναπόλωση της μεμβράνης και τερματισμό της συστοιχίας των δυναμικών ενεργείας (ανάλυση στο κείμενο). Δυναμικό μεμβράνης O/A ενδονευρώνες στο 8α: -57 mV, στο 8β: -60 mV. 8γ και 8δ: οι ηλεκτρικοί παλμοί που εφαρμόστηκαν στους νευρώνες των 8α και 8β. Στο 8ε και στο 8στ παρουσιάζεται το εύρος της υπερπόλωσης  $\Delta V$  της κυτταρικής μεμβράνης ως συνάρτηση του ρεύματος  $I$  στον O/A κοιλιακό ενδονευρώνα του 8α και στον O/A ραχιαίου ενδονευρώνα του 8β αντίστοιχα. O/A ενδονευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου: μαύρα σύμβολα, O/A ενδονευρώνες του ραχιαίου ιπποκάμπου: λευκά σύμβολα.  $\Delta V_{peak}$ : τετράγωνα,  $\Delta V_{ss}$ : κύκλοι,  $\Delta V_{peak-ss}$ : τρίγωνα.

Κατά δεύτερον, η κινητική του ρεύματος  $I_h$  φαίνεται να είναι διαφορετική στους ενδονευρώνες του κοιλιακού σε σχέση με τους ενδονευρώνες του ραχιαίου ιπποκάμπου (Εικόνα 8). Η ποσοτικοποίηση, ωστόσο του φαινομένου αυτού απαιτεί περαιτέρω πειράματα σε συνθήκες καθήλωσης τάσης.

Κατά τρίτον, η εκπόλωση αναπήδησης εμφανίζεται γρηγορότερα μετά το πέρας του υπερπολωτικού παλμού στους O/A ενδονευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου και



Εξέλιξη του δυναμικού μεμβράνης στους O/A ενδονευρώνες του κοιλιακού (μαύροι κύκλοι και τετράγωνα,  $n = 7$ ) και του ραχιαίου (άσπροι κύκλοι και τετράγωνα,  $n = 6$ ) ιπποκάμπου της CA1 περιοχής μετά την εφαρμογή υπερπολωτικού παλμού ρεύματος αυξανόμενης έντασης. Στην εικόνα 9α απεικονίζεται το  $\Delta V_{peak}$  ως συνάρτηση του ρεύματος σε O/A ενδονευρώνες του κοιλιακού και ραχιαίου ιπποκάμπου, στην εικόνα 9β απεικονίζεται το  $\Delta V_{ss}$  ως συνάρτηση του ρεύματος σε O/A ενδονευρώνες του κοιλιακού και ραχιαίου ιπποκάμπου. Αυτό που παρατηρείται είναι ότι ρεύμα ίσης έντασης προκαλεί μεγαλύτερη υπερπόλωση στους O/A ενδονευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου (μαύροι κύκλοι και τετράγωνα) από ό,τι στους O/A ενδονευρώνες του ραχιαίου (άσπροι κύκλοι και τετράγωνα) ιπποκάμπου. Αυτό ισχύει τόσο πριν (9α) όσο και μετά (9β) την αθρόα ενεργοποίηση του ρεύματος  $I_h$  που μειώνει την υπερπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης στη διάρκεια του υπερπολωτικού παλμού ρεύματος (από  $\Delta V_{peak}$  σε  $\Delta V_{ss}$ ).

Τα δεδομένα προέρχονται από 7 κοιλιακούς και 5 ραχιαίους νευρώνες. Οι διακεκομμένες γραμμές την παλινδρόμηση του  $\Delta V$  των κοιλιακών ενδονευρώνων (9α:  $y = 51,268x + 4,0925$ ,  $R^2 = 0,95456$ ; 9β:  $y = 46,442x + 2,172$ ,  $R^2 = 0,96049$ ) και οι συνεχείς γραμμές παριστάνουν την παλινδρόμηση του  $\Delta V$  των ραχιαίων ενδονευρώνων (9α:  $y = 34,726x + 4,2474$ ,  $R^2 = 0,90495$ ; 9β:  $y = 30,858x + 2,0149$ ,  $R^2 = 0,88287$ ). Μαύροι κύκλοι:  $\Delta V_{peak}$  κοιλιακών O/A ενδονευρώνων, μαύρα τετράγωνα:  $\Delta V_{ss}$  κοιλιακών O/A ενδονευρώνων, άσπροι κύκλοι:  $\Delta V_{peak}$  ραχιαίων O/A ενδονευρώνων, άσπρα τετράγωνα:  $\Delta V_{ss}$  ραχιαίων O/A ενδονευρώνων.

τερματίζεται γρηγορότερα καταλήγοντας συχνά σε εμφανή υπερπόλωση σε σχέση με το δυναμικό ηρεμίας (Εικόνα 8).

Αναλυτικά, προσδιορίστηκαν ο μέσος όρος και το τυπικό σφάλμα μέσου όρου για τα  $\Delta V_{peak}$ ,  $\Delta V_{ss}$  και  $\Delta V_{peak-ss}$  σε O/A ενδονευρώνες του κοιλιακού ( $n = 8$ ) και του ραχιαίου ( $n = 6$ ) ιπποκάμπου, που προέκυψαν με την εφαρμογή τετράγωνου παλμού ηλεκτρικού ρεύματος έντασης 0,55 nA (πίνακας 6). Το  $\Delta V_{peak}$  στους O/A ενδονευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου ήταν ίσο με  $32,1 \pm 2,4$  mV έναντι  $24,5 \pm 1,4$  mV στους O/A

ενδονευρώνες του ραχιαίου ιπποκάμπου. Η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική ( $p$  value < 0,05). Το  $\Delta V_{ss}$  στους O/A ενδονευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου ήταν ίσο με  $26,8 \pm 2,1$  mV έναντι  $19,3 \pm 1,2$  mV στους O/A ενδονευρώνες ραχιαίου του ιπποκάμπου, και εδώ ήταν η διαφορά στατιστικά σημαντική ( $p$  value < 0,05). Αντίθετα, το  $\Delta V_{peak-ss}$  ήταν παρόμοιο ( $p$  value > 0,05) στους O/A ενδονευρώνες του κοιλιακού ( $5,3 \pm 0,6$  mV) και του ραχιαίου ιπποκάμπου ( $5,2 \pm 0,2$  mV). Φαίνεται, λοιπόν, ότι ο βαθμός ενεργοποίησης του  $I_h$  στους O/A ενδονευρώνες του κοιλιακού και του ραχιαίου ιπποκάμπου κατά τη διάρκεια του υπερπολωτικού παλμού δε διαφέρει σημαντικά ανάμεσα στους δύο πληθυσμούς O/A ενδονευρώνων, αν και από τα παραπάνω στοιχεία δε μπορεί να εξαχθεί κάποιο ασφαλές συμπέρασμα για το βαθμό ενεργοποίησης του  $I_h$  στο δυναμικό ηρεμίας.

	O/A ενδονευρώνες κοιλιακού ιπποκάμπου ( $n = 8$ )	O/A ενδονευρώνες ραχιαίου ιπποκάμπου ( $n = 6$ )
$\Delta V_{peak}$ (mV)	$32,1 \pm 2,4^*$	$24,5 \pm 1,4^*$
$\Delta V_{ss}$ (mV)	$26,8 \pm 2,1^*$	$19,3 \pm 1,2^*$
$\Delta V_{peak-ss}$ (mV)	$5,3 \pm 0,6$	$5,2 \pm 0,2$
$\Delta X_{ουδου}$ (ms)	$21,3 \pm 2,2^{*,**}$	$47,1 \pm 9,2^{*,**}$
Εκπόλωση αναπήδησης (mV)	$4,5 \pm 1,0$	$5,8 \pm 0,4$

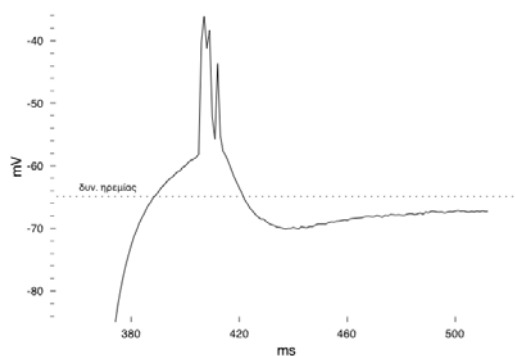
Πίνακας 6: Το  $\Delta V_{peak}$  και το  $\Delta V_{ss}$  είναι σημαντικά μικρότερο στους O/A ενδονευρώνες του ραχιαίου ιπποκάμπου σε σχέση με του κοιλιακού ιπποκάμπου, αντίθετα το  $\Delta V_{peak-ss}$  είναι παρόμοιο στους δύο πληθυσμούς. Ο χρόνος που μεσολαβεί από το πέρας του υπερπολωτικού παλμού μέχρι την πυροδότηση του πρώτου δυναμικού ενεργείας λόγω της εκπόλωσης αναπήδησης ( $\Delta X_{ουδου}$ ) ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος στον ραχιαίο ιπποκάμπο (\*\*:  $n = 4$ ). Το εύρος της εκπόλωσης αναπήδησης δεν ήταν διαφορετικό σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο. \*:  $p$  value < 0,05.

Επίσης προσδιορίστηκε ο χρόνος που μεσολαβεί από το πέρας του υπερπολωτικού παλμού μέχρι την πυροδότηση του πρώτου δυναμικού ενεργείας λόγω της εκπόλωσης αναπήδησης ( $\Delta X_{ουδου}$ ). Ο χρόνος αυτός ήταν σημαντικά μικρότερος ( $p$  value < 0,05) στους O/A ενδονευρώνες του κοιλιακού ( $21,3 \pm 2,2$  ms,  $n = 4$ ) από ό,τι του ραχιαίου ( $47,1 \pm 9,2$  ms,  $n = 4$ ) ιπποκάμπου. Το  $n$  εδώ είναι μικρότερο γιατί μόνο ένα μέρος των O/A ενδονευρώνων που εξετάστηκαν εμφάνισαν δυναμικά ενεργείας κατά την εκπόλωση αναπήδησης.

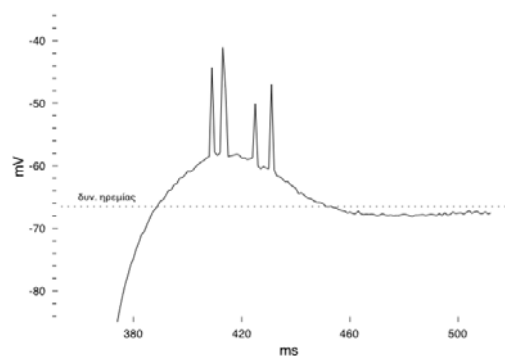
Το εύρος της εκπόλωσης αναπήδησης δεν ήταν στατιστικά διαφορετικό στους O/A ενδονευρώνες του κοιλιακού ( $n = 8$ ) και του ραχιαίου ( $n = 6$ ) ιπποκάμπου ( $4,5 \pm 1,0$

ms έναντι  $5,8 \pm 0,4$  ms αντίστοιχα,  $p$  value > 0,05). Ιδιαίτερο μικρό εύρος αναπήδησης επέδειξαν οι O/A ενδονευρώνες με μικρό ΔΧουδού, με άλλα λόγια, όσο πιο διεγέρσιμος ήταν ένας O/A ενδονευρώνας, τόσο μικρότερη εκπόλωση αναπήδησης χρειαζόταν για να πυροδοτήσει δυναμικά ενεργείας. Το εύρος εκπόλωσης αναπήδησης παρουσίαζε άμεσο συσχετισμό με το δυναμικό μεμβράνης του νευρώνα, στο οποίο τελέστηκε η μελέτη των παραπάνω παραμέτρων. Καθώς οι άνωθεν παράμετροι μελετήθηκαν σε πολλά διαφορετικά δυναμικά μεμβράνης σε κάθε νευρώνα, επιλέχθηκαν για τη στατιστική σύγκριση συγκρίσιμα δυναμικά μεμβράνης, που στις περισσότερες περιπτώσεις ήταν το δυναμικό ηρεμίας κάθε νευρώνα. Αν το δυναμικό ηρεμίας απέιχε πολύ από το μέσο όρο η νευρωνική μεμβράνη εκπολώθηκε ή υπερπολώθηκε σε άλλο δυναμικό μέσω της χορήγησης σταθερού ηλεκτρικού ρεύματος (DC) δια του ηλεκτροδίου καταγραφής.

Ενδιαφέρον εύρημα ήταν τα χαρακτηριστικά της συστοιχίας των δυναμικών ενεργείας που πυροδότησε η εκπόλωση αναπήδησης στους O/A ενδονευρώνες του κοιλιακού και ραχιαίου ιπποκάμπου. Στον κοιλιακό ιπποκάμπο το 100% (5 από τους 5) των O/A ενδονευρώνων στους οποίους παρατηρήθηκαν δυναμικά ενεργείας επέδειξε ριπή δυναμικών ενεργείας (Εικόνα 10α), ενώ 3 ενδονευρώνες δεν επέδειξαν δυναμικά



10α



10β

Εικόνα 10. Στο 10α απεικονίζεται σε μικρή κλίμακα η εκπόλωση αναπήδησης σε O/A ενδονευρώνα του κοιλιακού ιπποκάμπου, στο 10β η εκπόλωση αναπήδησης σε O/A ενδονευρώνα του ραχιαίου ιπποκάμπου. Είναι εμφανείς η γρηγορότερη εκπόλωση μετά του τέλους του υπερπολωτικού παλμού στον κοιλιακό ενδονευρώνα (σε αντιστοιχία με το μικρότερο ΔΧουδού, βλ. κείμενο), η ριπή δυναμικών ενεργείας στον κοιλιακό ενδονευρώνα σε αντίθεση με την απλή συστοιχία δυναμικών ενεργείας στον ραχιαίο ενδονευρώνα και η μεγαλύτερη και ταχύτερη υπερπόλωση (AHP) στον κοιλιακό ενδονευρώνα μετά τη λήξη της εκπόλωσης αναπήδησης.

ενεργείας. Εξάλλου, στον ραχιαίο ιππόκαμπο το 25% (1 από τους 4) των O/A ενδονευρώνων στους οποίους πυροδοτήθηκαν δυναμικά ενεργείας επέδειξε ριπή δυναμικών ενεργείας, 75% (3 από τους 4) απλές συστοιχίες δυναμικών ενεργείας (Εικόνα 10β) και 2 ενδονευρώνες δεν επέδειξαν δυναμικά ενεργείας.

Καθώς έχει αναφερθεί ήδη από τρίτους ερευνητές ότι τα οπιοειδή επηρεάζουν τη διεγερσιμότητα των ιπποκάμπειων κυκλωμάτων αναστέλλοντας τους ενδονευρώνες σε μετασυναπτικό επίπεδο και ότι μειώνουν το ρεύμα  $I_h$  στους O/A ενδονευρώνες (65), μελετήσαμε την επίδραση της μορφίνης στα χαρακτηριστικά της κυματομορφής που προκύπτει μέσω παρατεταμένης υπερπόλωσης των O/A ενδονευρώνων του ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου, συμπεριλαμβανομένων της χαρακτηριστικής κοιλιάδας και της εκπόλωσης αναπήδησης.

Η επίδραση της μορφίνης στις παραπάνω παραμέτρους μελετήθηκε σε συνολικά οκτώ O/A ενδονευρώνες, έξι στον κοιλιακό και δύο στον ραχιαίο ιππόκαμπο.

Εδώ πρέπει να τονιστεί το γεγονός, ότι η μορφίνη και γενικά τα οπιοειδή ανήκουν στην κατηγορία των νευρορυθμιστών, ούτως ώστε η δράση τους σε συνθήκες καθήλωσης ρεύματος δεν αναμενόταν να είναι τόσο εμφανής όσο αυτή των ανταγωνιστών των διαύλων που φέρουν το ρεύμα  $I_h$ , δηλ. του ZD 7288 και του καισίου (22). Η ανασταλτική δράση των οπιοειδών στο  $I_h$  στους O/A ενδονευρώνες του ιπποκάμπου έχει καταδειχτεί σε συνθήκες καθήλωσης τάσης (65), όπου είναι δυνατή η άμεση διερεύνηση της δράσης τους στο  $I_h$ , αλλά όχι η επίδραση τους στη τελική διεγερσιμότητα των O/A ενδονευρώνων, έκφραση της οποίας αποτελούν για παράδειγμα η εκπόλωση αναπήδησης και τα χαρακτηριστικά της συστοιχίας των δυναμικών ενεργείας κατά την εκπόλωση αναπήδησης.

Καταρχήν επιχειρήθηκαν η επιβεβαίωση σε συνθήκες καθήλωσης ρεύματος των ευρημάτων των καταγραφών των Lurica *et al.* που έγιναν σε καθήλωση τάσης (65) και η ανίχνευση πιθανής δράσης της μορφίνης στους O/A ενδονευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου, η οποία δεν είχε διερευνηθεί μέχρι τώρα.

Οι ενδοκυττάρειες καταγραφές σε συνθήκες καθήλωσης ρεύματος κατέδειξαν ότι η δράση της μορφίνης στους O/A ενδονευρώνες του κοιλιακού και ραχιαίου ιπποκάμπου είναι περίπλοκη και πολυδιάστατη. Παρατηρήθηκαν τόσο φαινόμενα που οφείλονταν σε άμεση επίδραση μετασυναπτικών υποδοχέων των O/A ενδονευρώνων, όσο και φαινόμενα που αποδόθηκαν σε προσυναπτική επίδραση της μορφίνης.



Παρακάτω αναφέρονται τα φαινόμενα που παρατηρήθηκαν στις ενδοκυττάρια καταγραφές από O/A ενδονευρώνες παρουσία μορφίνης. Για να ελεγχθεί αν η δράση της μορφίνης ήταν ειδική και αναστρέψιμη χρησιμοποιήθηκαν ο μη ειδικός ανταγωνιστής των οπιοειδών υποδοχέων ναλοξόνη σε συγκέντρωση 50  $\mu\text{M}$  ή 100  $\mu\text{M}$  και η μέθοδος της έκπλυσης.

Η μορφίνη σε συγκέντρωση 30  $\mu\text{M}$  αλλά όχι 5  $\mu\text{M}$  αποδείχτηκε ότι μπορεί να μειώσει, αλλά όχι να εξαλείψει τη χαρακτηριστική κοιλάδα από την κυματομορφή που προκύπτει κατά τη διάρκεια παρατεταμένου υπερπολωτικού παλμού ηλεκτρικού ρεύματος (Εικόνα 11) σε κάποιους από τους εξετασθέντες O/A ενδονευρώνες.

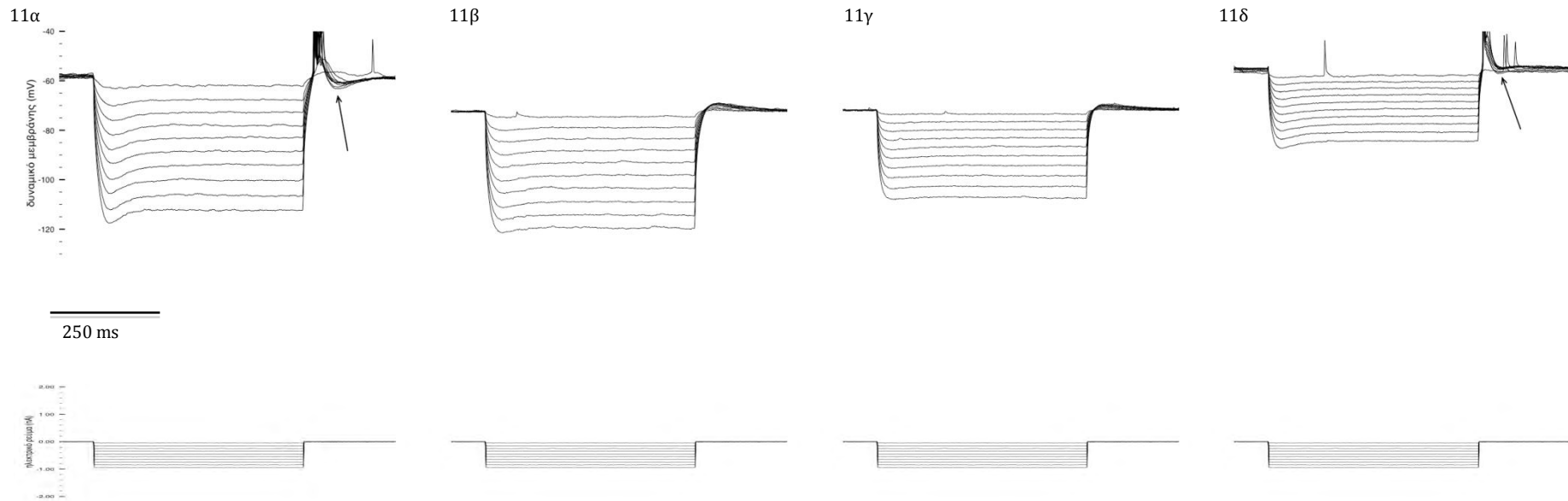
Συνολικά, στον O/A ενδονευρώνα της εικόνας 11 (ενδονευρώνας του κοιλιακού ιπποκάμπου) φαίνονται κάποιες από τις δράσεις της μορφίνης που παρατηρήθηκαν στους υπό μελέτη O/A ενδονευρώνες:

Το δυναμικό ηρεμίας υπερπολώνεται κατά 6 mV κατά τη διάρκεια χορήγησης μορφίνης 30  $\mu\text{M}$  (σύγκριση 11α με 11γ). Η χαρακτηριστική κοιλάδα στην αρχή της υπερπόλωσης μειώνεται εμφανώς, αλλά όχι ολοκληρωτικά. Η εκπόλωση αναπήδησης μειώνεται εμφανώς και δε δίνει γένεση σε δυναμικά ενεργείας. Παρόλο που το  $I_h$  μειώνεται, όπως συμπεραίνεται από τη μείωση της κοιλάδας, δεν παρατηρείται αύξηση της αντίστασης της κυτταρικής μεμβράνης (δηλ. μείωση της αγωγιμότητας της κυτταρικής μεμβράνης λόγω κλεισίματος των διαύλων του ρεύματος  $I_h$ ), αλλά εμφανής μείωση της αντίστασης, που οδηγεί στο συμπέρασμα, ότι κάποιοι άλλοι διάυλοι ανοίγουν παρουσία μορφίνης και μάλιστα η αύξηση της αγωγιμότητας από το ρεύμα που ενισχύεται υπερτερεί της μείωσης της αγωγιμότητας λόγω αναστολής του ρεύματος  $I_h$ . Το εύρημα αυτό είναι σύμφωνο με τα ευρήματα των Lupica *et al* στους O/A ενδονευρώνες της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου σε συνθήκες καθήλωσης τάσης, όπου πιθανολογείται ότι τα οπιοειδή ενεργοποιούν ένα ρεύμα καλίου που εξυπηρετείται από υποδοχείς GIRK. Καθώς τα φαινόμενα που διερευνήθηκαν (χαρακτηριστική κοιλάδα, αντίσταση κυτταρικής μεμβράνης, εκπόλωση αναπήδησης και AHP) επηρεάζονται από το δυναμικό μεμβράνης και η μορφίνη υπερπολώνει τον ενδονευρώνα, χρησιμοποιήθηκε σταθερό ρεύμα για να υπερπολωθεί το κύτταρο πριν τη χορήγηση μορφίνης και να εκπολωθεί κατά τη χορήγηση μορφίνης, ώστε να μελετηθεί η επίδραση της μορφίνης σε συγκρίσιμα δυναμικά μεμβράνης. Έτσι, είναι δυνατό να συγκριθεί η κυματομορφή του 11γ (κατά τη διάρκεια χορήγησης μορφίνης, δυναμικό μεμβράνης – 72 mV, DC = 0 nA) με την κυματομορφή του 11β (πριν τη χορήγηση μορφίνης, δυναμικό μεμβράνης – 73

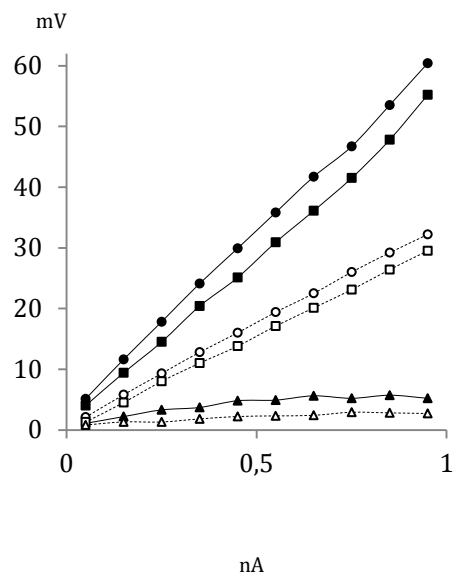
mV, DC = - 0,18 nA). Και εδώ είναι εμφανής η μείωση της αντίστασης της κυτταρικής μεμβράνης και της κοιλάδας στην αρχή της υπερπόλωσης, χωρίς ωστόσο να παρατηρείται αισθητή διαφορά στην εκπόλωση αναπήδησης. Κατόπιν εκπολώθηκε η κυτταρική μεμβράνη με σταθερό ρεύμα, για μελετηθεί η δράση της μορφίνης σε δυναμικό μεμβράνης συγκρίσιμο με το αρχικό δυναμικό ηρεμίας (11α: πριν τη χορήγηση μορφίνης, δυναμικό ηρεμίας - 58 mV, 11δ: μετά τη χορήγηση μορφίνης, δυναμικό μεμβράνης - 58 mV, DC = + 0,58 nA). Στη σύγκριση των 11α και 11δ είναι εμφανέστερη η μείωση της αντίστασης κυτταρικής μεμβράνης. Η μείωση της κοιλάδας και του AHP παρατηρούνται και εδώ.

Τα παραπάνω ευρήματα που περιγράφηκαν ποιοτικά απεικονίζονται αριθμητικά στην εικόνα 12. Στο 12α απεικονίζονται τα  $\Delta V_{peak}$ ,  $\Delta V_{ss}$  και  $\Delta V_{peak-ss}$  των 11α και 11δ ως συνάρτηση της έντασης του υπερπολωτικού ρεύματος πριν (συνεχείς γραμμές, μαύρα σύμβολα) και κατά τη διάρκεια της χορήγησης μορφίνης (διακεκομμένες γραμμές, άσπρα σύμβολα). Στο 12β απεικονίζονται τα  $\Delta V_{peak}$ ,  $\Delta V_{ss}$  και  $\Delta V_{peak-ss}$  των 11β και 11γ ως συνάρτηση της έντασης του υπερπολωτικού ρεύματος πριν (συνεχείς γραμμές, μαύρα σύμβολα) και κατά τη διάρκεια της χορήγησης μορφίνης (διακεκομμένες γραμμές, άσπρα σύμβολα). Οι καμπύλες αυτές (iv-curves) καταδεικνύουν ότι η επίδραση της μορφίνης στις εν λόγω παραμέτρους είναι μεγαλύτερη στα πιο εκπολωμένα δυναμικά.

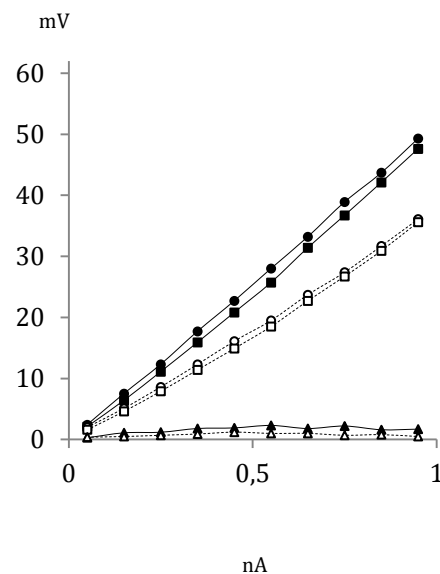
Τα ίδια φαινόμενα παρατηρήθηκαν συνολικά και στον O/A ενδονευρώνα του κοιλιακού ιπποκάμπου που παρουσιάζεται στις εικόνες 13 και 14. Οι κυματομορφές που παρουσιάζονται στις εικόνες αυτές επιδεικνύουν επιπροσθέτως μια άλλη δράση της μορφίνης σε επίπεδο κυκλώματος. Παρατηρήθηκαν στο συγκεκριμένο ενδονευρώνα κατά τη χορήγηση μορφίνης διεγερτικά συναπτικά δυναμικά, πολλά από τα οποία πυροδοτούσαν δυναμικά ενεργείας στο δυναμικό ηρεμίας του νευρώνα. Το φαινόμενο αυτό είναι λογικό, αφού ανάμεσα στους προσαγωγούς διεγερτικούς νευρώνες των O/A ενδονευρώνων της CA1 περιοχής είναι οι πυραμιδικοί νευρώνες, που ως γνωστό παρουσιάζουν αυξημένη διεγερσιμότητα παρουσία οπιοειδών (13, 14). Επίσης, προσυναπτικοί οπιοειδείς υποδοχείς εντοπίζονται σε O/A ενδονευρώνες που αναστέλλουν άλλους O/A ενδονευρώνες (19) και η ενεργοποίηση αυτών των υποδοχέων μειώνει την έκλυση του GABA, με αποτέλεσμα να υπερισχύει η διεγερτική της ανασταλτικής συναπτικής δραστηριότητας.



Εικόνα 11: Απεικονίζεται η δράση της μορφίνης 30  $\mu\text{M}$  στην απόκριση ενός O/A ενδονευρώνα της περιοχής CA1 του κοιλιακού ιπποκάμπου (άνω κυματομορφές) σε υπερπολωτικό ηλεκτρικό παλμό αυξανόμενης έντασης (κάτω κυματομορφές). Οι κλίμακες του δυναμικού μεμβράνης και του ρεύματος στο 11α ισχύουν και για τα 11β, γ και δ. Η κλίμακα του χρόνου ισχύει για όλες τις κυματομορφές. Στο 11α απεικονίζεται η απόκριση του O/A ενδονευρώνα πριν την χορήγηση μορφίνης όταν βρίσκεται στο δυναμικό ηρεμίας (Δυν. Μεμβράνης -58 mV, DC 0 nA). Είναι εμφανής η κοιλιάδα στην αρχή της υπερπόλωσης που ανακλά την αθρόα ενεργοποίηση του ρεύματος  $I_h$ . Μετά το πέρας του παλμού επέρχεται η εκπόλωση αναπήδησης με ριπή δυναμικών ενεργειάς (τυπικό εύρημα σε O/A ενδονευρώνα κοιλιακού ιπποκάμπου), που καταλήγει σύντομα σε υπερπόλωση (AHP, βέλος). Στο 11β παρουσιάζεται η απόκριση του ενδονευρώνα στον ίδιο υπερπολωτικό παλμό σε πιο υπερπολωτικό δυναμικό μεμβράνης (Δυν. Μεμβράνης -73 mV, DC -0,18 nA). Τόσο η χαρακτηριστική κοιλιάδα όσο και η εκπόλωση αναπήδησης παρουσιάζουν μικρότερο ύψος σε αυτό το δυναμικό μεμβράνης. Η αντίσταση της κυτταρικής μεμβράνης είναι μικρότερη σε αυτό το δυναμικό μεμβράνης, όπως φαίνεται από το εύρος της υπερπόλωσης στο 11β σε σχέση με το 11α, αυτό ισχύει και στην αρχή και στο τέλος του παλμού. Στο 11γ απεικονίζεται η απόκριση του O/A ενδονευρώνα σε υπερπολωτικό παλμό παρουσία μορφίνης 30  $\mu\text{M}$  στο νέο δυναμικό ηρεμίας (Δυν. Μεμβράνης - 72 mV, DC 0 nA), μετά την υπερπόλωση του νευρώνα που προκλήθηκε από τη δράση του φαρμάκου (σύγκρινε το δυν. μεμβράνης με το 11α). Η χαρακτηριστική κοιλιάδα μόλις που διακρίνεται ως απάντηση στον τελευταίο παλμό μέγιστης έντασης και η εκπόλωση αναπήδησης έχει μειωθεί δραματικά σε σύγκριση με το 11α και μόλις ορατά σε σύγκριση με το 11β. Η αντίσταση της κυτταρικής μεμβράνης μειώθηκε ορατά με τη χορήγηση του φαρμάκου. Στο 11δ ο νευρώνας εκπολώθηκε με χορήγηση εκπολωτικού ρεύματος για να μελετηθεί η δράση της μορφίνης σε δυναμικό μεμβράνης παρόμοιο με το δυναμικό ηρεμίας πριν τη χορήγηση μορφίνης (Δυν. μεμβράνης -56 mV, DC +0,58 nA). Η μείωση του εύρους της κοιλιάδας στην αρχή της υπερπόλωσης ως αποτέλεσμα της δράσης της μορφίνης παραμένει. Επισημαίνεται ότι άλλαξε εμφανώς η μορφολογία της εκπόλωσης αναπήδησης και εξαφανίστηκε το AHP (βέλος). Η μείωση της αντίστασης της κυτταρικής μεμβράνης είναι και εδώ εμφανής.



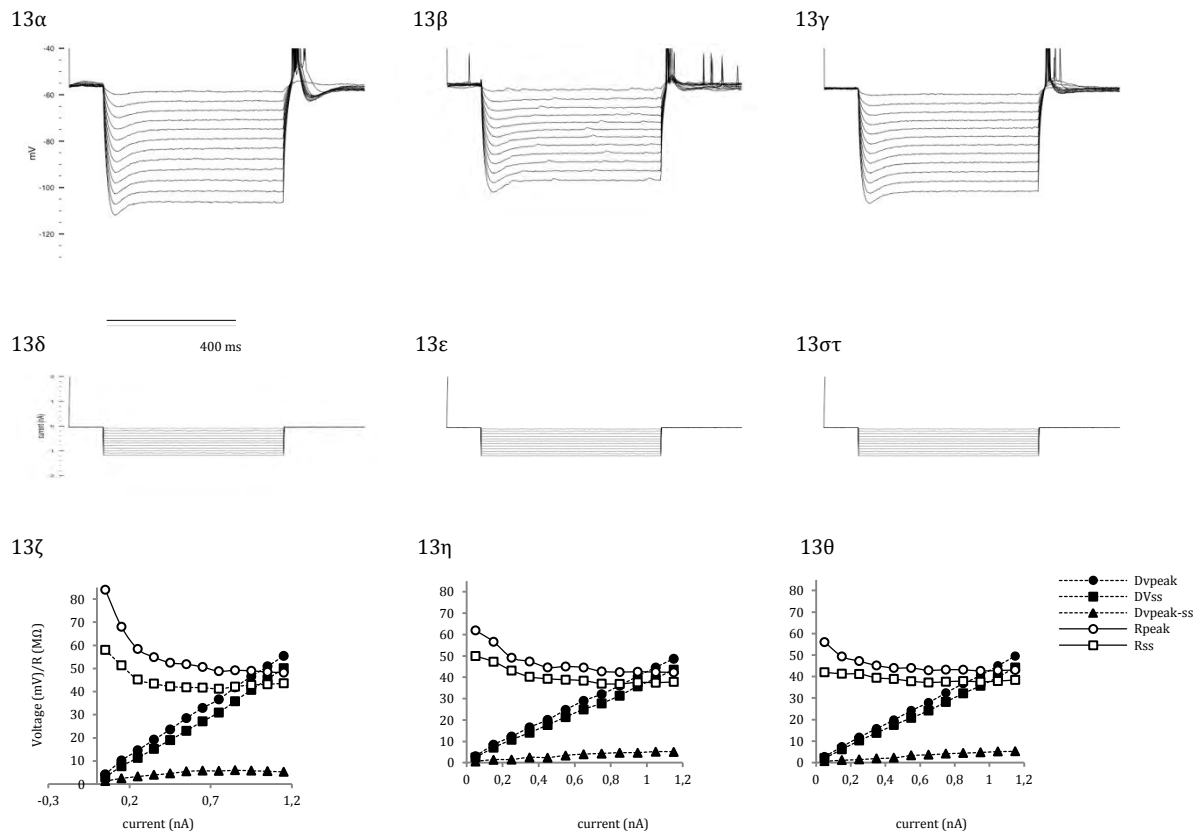
12α



12β

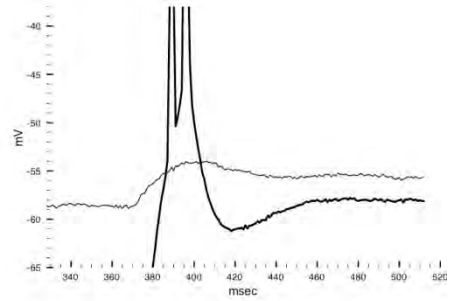
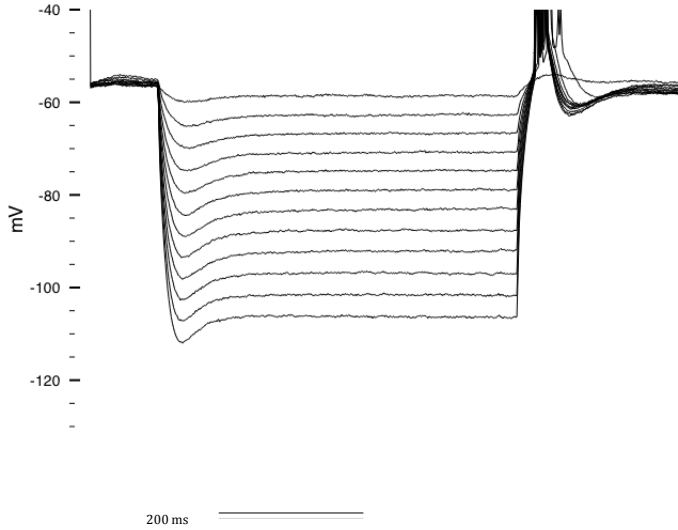
Εικόνα 12. Με συνεχείς γραμμές και μαύρα σύμβολα απεικονίζεται το δυναμικό της μεμβράνης του O/A ενδονευρώνα της εικόνας 11 ως συνάρτηση της έντασης του εφαρμοζόμενου ρεύματος πριν τη χορήγηση μορφίνης 30  $\mu$ M, με διακεκομμένες γραμμές και λευκά σύμβολα μετά τη χορήγηση μορφίνης. Οι κύκλοι αντιστοιχούν στο  $\Delta V_{peak}$ , τα τετράγωνα στο  $\Delta V_{ss}$  και τα τρίγωνα στο  $\Delta V_{peak-ss}$ . Στο 12α το δυναμικό μεμβράνης είναι -58/-56 mV (εικόνα 11α και δ) και στο 12β το δυναμικό μεμβράνης είναι -73/-72 mV (εικόνα 11β και γ). Η μείωση του  $\Delta V_{peak}$ ,  $\Delta V_{ss}$  και  $\Delta V_{peak-ss}$  είναι πιο εμφανής στα πιο εκπολωμένα δυναμικά μεμβράνης. Η εμφανής μείωση του  $\Delta V_{peak-ss}$  ανακλά τη δράση της μορφίνης στο Ih και στο 12α είναι στατιστικά σημαντική ( $p$  value < 0,05).

Στον κοιλιακό O/A ενδονευρώνα των εικόνων 13 και 14 γίνεται προφανής και η πολυδιάστατη δράση των οπιοειδών στην εκπόλωση αναπήδησης. Η πυροδότηση δυναμικών ενεργείας κατά την εκπόλωση αναπήδησης οδηγεί σε μέσο και αργό μεθυπερπολωτικό δυναμικό τόσο πριν (εικονίδιο 14α δεξιά) όσο και κατά (εικονίδιο 14β δεξιά) τη χορήγηση μορφίνης (σύγκρινε παχιές με συμβατικές γραμμές, οι πρώτες αντιστοιχούν σε μεγαλύτερης έντασης ηλεκτρικό παλμό). Επειδή κατά τη χορήγηση μορφίνης πυροδοτούνται λιγότερα δυναμικά ενεργείας τα μεθυπερπολωτικά δυναμικά είναι μικρότερου εύρους. Αυτό είναι εμφανές στο εικονίδιο του 14γ (δεξιά), όπου συγκρίνονται οι εκπολώσεις αναπήδησης που παρατηρούνται στη μέγιστη ένταση του ηλεκτρικού παλμού πριν (διακεκομμένη γραμμή) και κατά (συνεχής γραμμή) τη χορήγηση μορφίνης. Η μείωση του εύρους της αναπήδησης και η μείωση του αριθμού

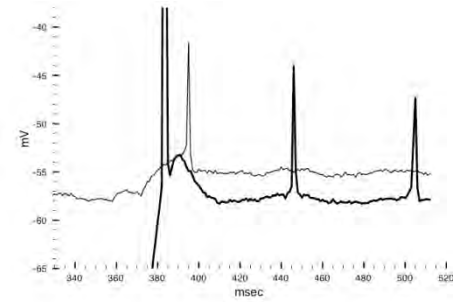
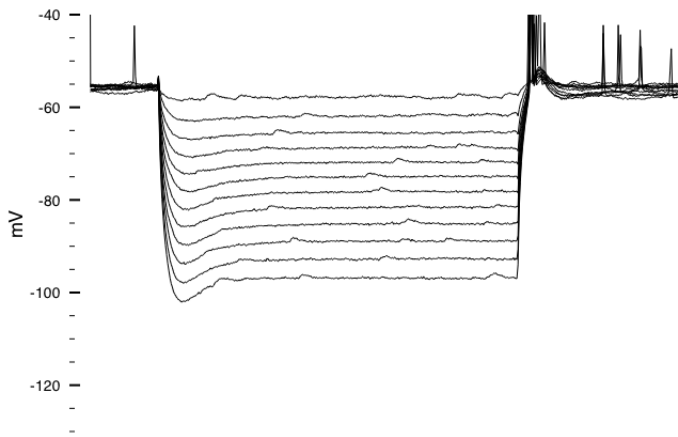


Εικόνα 13. Επίδραση της μορφίνης 30  $\mu\text{M}$  σε O/A ενδονευρώνα της περιοχής CA1 του κοιλιακού ιπποκάμπου. Στο 13α η απόκριση της κυτταρικής μεμβράνης σε υπερπολωτικούς παλμούς αυξανόμενης έντασης πριν τη χορήγηση της μορφίνης. Διακρίνεται η χαρακτηριστική κοιλιάδα στην αρχή της υπερπόλωσης, η εκπόλωση αναπήδησης με τη ριπή δυναμικών ενεργειάς και την μεθυπερπόλωση (AHP), βλ. και εικόνα 14. Στο 13β η απόκριση της κυτταρικής μεμβράνης σε υπερπολωτικούς παλμούς αυξανόμενης έντασης κατά τη διάρκεια χορήγησης μορφίνης. Η μείωση του εύρους της κοιλιάδας δεν είναι οπτικά εμφανής, ωστόσο η στατιστική ανάλυση απέδειξε μείωση του  $\Delta V_{\text{peak-ss}}$  σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο ( $p$  value < 0,05). Εμφανείς είναι αφενός η μείωση της εκπόλωσης αναπήδησης και του AHP, αλλά πολύ περισσότερο η εμφάνιση δυναμικών ενεργειάς στο δυναμικό ηρεμίας (το οποίο σημειωτέον δεν μεταβλήθηκε από το 13α στο 13β, παρόλο που αργότερα εμφανίστηκε υπερπόλωση -3 mV κατά τη διάρκεια της χορήγησης μορφίνης, μεταξύ 13β και 13γ) καθώς και η εμφάνιση διεγερτικών συναπτικών δυναμικών (EPSPs) κατά τη διάρκεια του υπερπολωτικού παλμού. Στο 13γ φαίνεται η εξάλειψη της συναπτικής δραστηριότητας (EPSPs) μετά την έκπλυση της μορφίνης. Επίσης εξαλείφονται τα δυναμικά ενεργειάς στο δυναμικό ηρεμίας. Η έκπλυση δεν ανέστρεψε τα φαινόμενα που προήλθαν από μετασυναπτική δράση της μορφίνης (κοιλιάδα, εκπόλωση αναπήδησης, AHP). Στα 13δ-στ οι υπερπολωτικοί παλμοί. Η κλίμακα του χρόνου ισχύει για όλες τις κυματομορφές. Η κάθετη γραμμή στην αρχή κάθε κυματομορφής προήλθε από τη γραφιστική επεξεργασία. Στα 13ζ-θ απεικονίζονται τα  $\Delta V_{\text{peak}}$ ,  $\Delta V_{\text{ss}}$ ,  $\Delta V_{\text{peak-ss}}$  καθώς και η αντίσταση της κυτταρικής μεμβράνης στην κοιλιάδα και πριν το τέλος του παλμού ( $R_{\text{peak}}$ ,  $R_{\text{ss}}$ ) ως συνάρτηση της έντασης του υπερπολωτικού ρεύματος. Για την επεξήγηση των συμβόλων στα 13ζ-θ, βλ. 13θ άνω δεξιά. Είναι ορατή η μείωση της αντίστασης κατά τη χορήγηση μορφίνης. Όλες οι τιμές ( $\Delta V_{\text{peak}}$ ,  $\Delta V_{\text{ss}}$ ,  $\Delta V_{\text{peak-ss}}$ ,  $R_{\text{peak}}$ ,  $R_{\text{ss}}$ ) μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά ( $p$  value < 0,05) κατά τη χορήγηση μορφίνης. Η έκπλυση δεν ανέστρεψε τις μεταβολές αυτές.

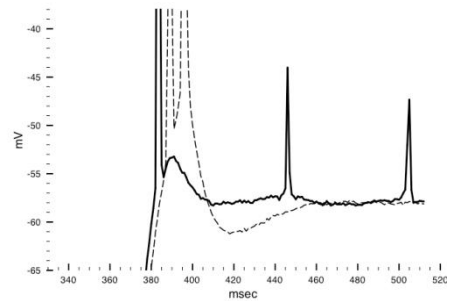
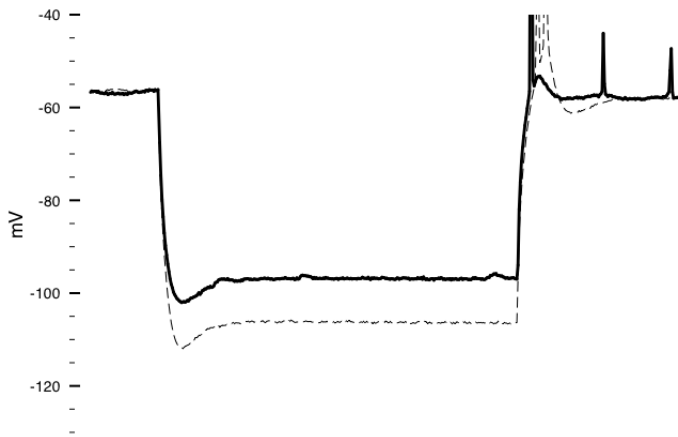
14 $\alpha$



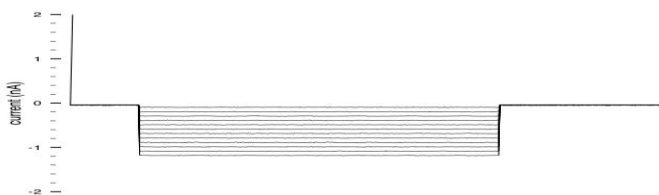
14 $\beta$



14 $\gamma$



14 $\delta$

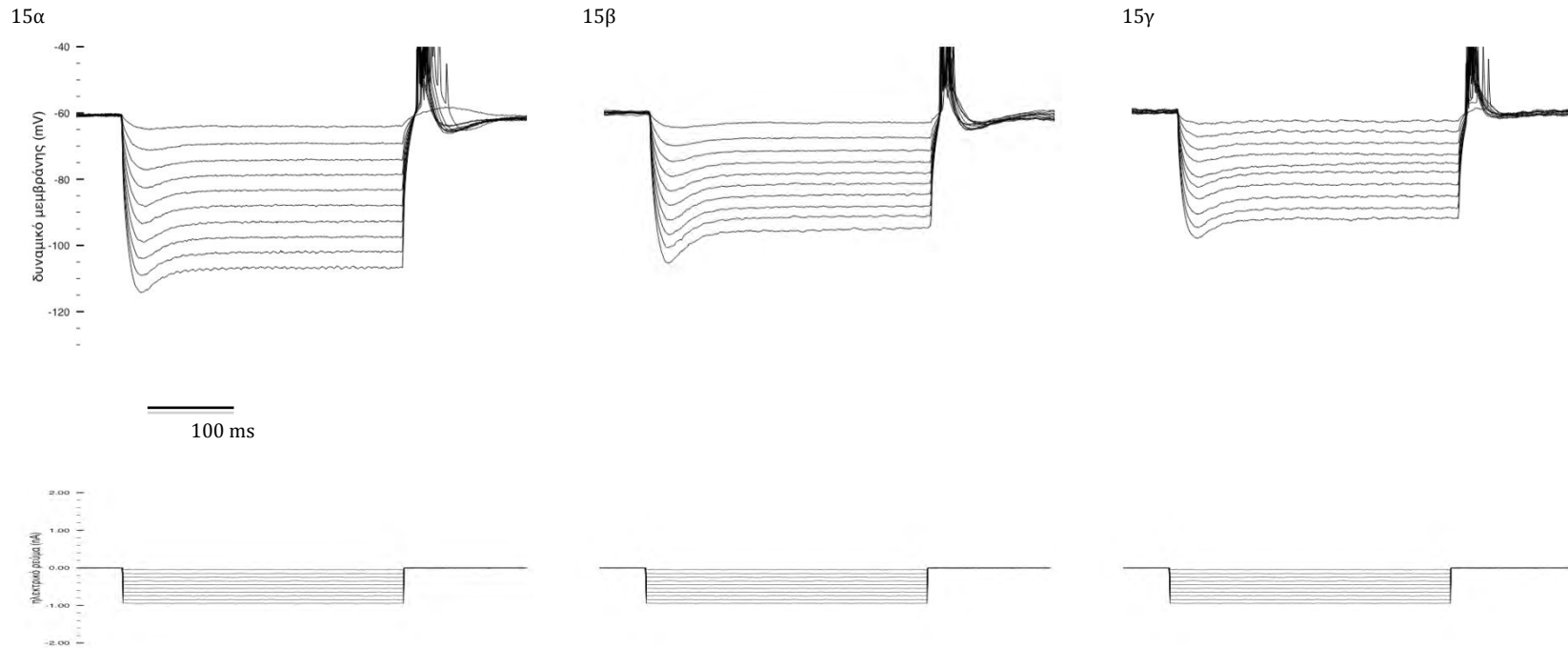


Εικόνα 14. Επίδραση της μορφίνης 30  $\mu\text{M}$  στην εκπόλωση αναπήδησης, στη ριπή δυναμικών ενεργείας και στο μεταυπερπολωτικό δυναμικό (AHP) σε O/A ενδονευρώνα του κοιλιακού ιπποκάμπου. Πρόκειται για τον ενδονευρώνα της εικόνας 13. (οι πλήρεις κυματομορφές των 14α και 14β είναι οι κυματομορφές των 13α και 13β). Στα 14α και 14β δεξιά των πλήρων κυματομορφών παρατίθεται σε μεγέθυνση η εκπόλωση αναπήδησης του πρώτου (0,55 nA, αχνή κυματομορφή) και του τελευταίου (1,05 nA, πάγια κυματομορφή) παλμού. Στο 14α δεξιά (πριν τη χορήγηση μορφίνης 30  $\mu\text{M}$ ) είναι εμφανείς η ριπή δύο δυναμικών ενεργείας και η μεθυπερπόλωση μετά το τέλος της εκπόλωσης αναπήδησης, αλλά και σε σχέση με το δυναμικό ηρεμίας, όπως φαίνεται από τη σύγκριση της κυματομορφής ως αποτέλεσμα του τελευταίου με την κυματομορφή ως αποτέλεσμα του πρώτου παλμού. Κατά τη διάρκεια χορήγησης μορφίνης (14β δεξιά, η ισορροπία γέφυρας διορθώθηκε γραφιστικά) η εκπόλωση αναπήδησης δίνει γένεση σε μονήρες δυναμικό ενεργείας με fAHP και ADP (εμφανή παρά την παράλληλη παρουσία εκπόλωσης αναπήδησης), το οποίο δε δύναται να δώσει γένεση σε δεύτερο δυναμικό ενεργείας. Η λήξη της εκπόλωσης αναπήδησης οδηγεί σε αισθητά μικρότερο AHP σε σχέση με το δυναμικό ενεργείας και με άλλη κινητική σε σχέση με το AHP του 14α. Στο 14γ απεικονίζεται η απόκριση της κυτταρικής μεμβράνης στον τελευταίο παλμό πριν (διακεκομμένη, αχνή κυματομορφή) και κατά (συνεχής, πάγια κυματομορφή) την χορήγηση μορφίνης, η ισορροπία της γέφυρας για τη δεύτερη κυματομορφή διορθώθηκε γραφιστικά, για να είναι οι κυματομορφές οπτικά συγκρίσιμες. Στο 14γ δεξιά μεγέθυνση της εκπόλωσης αναπήδησης των κυματομορφών του 13γ αριστερά. Εμφανής η μείωση της εκπόλωσης αναπήδησης, του ADP και του AHP παρουσία μορφίνης. Στο 14δ οι παλμοί του ηλεκτρικού ρεύματος. Η κλίμακα του χρόνου ισχύει για όλες τις πλήρεις κυματομορφές.

των δυναμικών ενεργείας μπορούν να εξηγηθούν με την αναστολή του ρεύματος  $I_h$  από τη μορφίνη, αν και άγνωστος παραμένει ο ρόλος άλλων διαύλων στις παρούσες συνθήκες. Το φαινόμενο της μείωσης του εύρους αναπήδησης αντιστοιχεί σε μείωση της διεγερσιμότητας του O/A ενδονευρώνα. Από την άλλη, η μείωση του μεθυπερπολωτικού δυναμικού αντιστοιχεί σε αύξηση της διεγερσιμότητας του O/A ενδονευρώνα. Το συνολικό αποτέλεσμα στη διεγερσιμότητα του ενδονευρώνα είναι δύσκολο να προσδιοριστεί.

Η πολυπλοκότητα της δράσης της μορφίνης στους νευρώνες γίνεται ακόμα πιο εμφανείς από τα ευρήματα σε νευρώνες του πυρήνα της ραφής (58) όπου η ενεργοποίηση των κ υποδοχέων οπιοειδών οδήγησε σε ενίσχυση και όχι μείωση του ρεύματος  $I_h$ . Στους O/A ενδονευρώνες του ιπποκάμπου παρατηρήθηκε μέχρι στιγμής από τρίτους ερευνητές μόνο αναστολή του ρεύματος  $I_h$  υπό την επίδραση των οπιοειδών, αλλά στις έρευνες αυτές χρησιμοποιήθηκαν μόνο  $\mu$  και  $\delta$  αγωνιστές (65). Είναι γνωστό ωστόσο, ότι υπάρχουν και κ υποδοχείς στον ιππόκαμπο (27), ούτως ώστε δεν αποκλείεται θεωρητικά μέσω ενεργοποίησης αυτών των υποδοχέων να επέρχεται ενίσχυση του ρεύματος  $I_h$  σε ενδονευρώνες στους οποίους υπερτερούν οι κ υποδοχείς.

Στην προκειμένη μελέτη παρατηρήθηκε αυτό το φαινόμενο σε έναν από τους συνολικά εννιά O/A ενδονευρώνες στους οποίους μελετήθηκε η δράση της μορφίνης, που ως γνωστό είναι μη ειδικός αγωνιστής και δρα αγωνιστικά και στους κ υποδοχείς (Εικόνα 15). Η ενίσχυση του ρεύματος  $I_h$  ήταν εμφανής παρά τη μείωση της



Εικόνα 15. Επίδραση της μορφίνης 30  $\mu\text{M}$  σε O/A ενδονευρώνες της περιοχής CA1 του κοιλιακού ιπποκάμπου. Σε αντίθεση με ό,τι παρατηρήθηκε στους άλλους O/A ενδονευρώνες κατά τη χορήγηση μορφίνης, στον συγκεκριμένο ενδονευρώνα παρατηρείται ενίσχυση του ρεύματος  $I_h$ , όπως φαίνεται από την σαφή αύξηση του βάθους της κοιλάδας στην αρχή της υπερπόλωσης στο 15β (κατά τη χορήγηση μορφίνης) σε σχέση με το 15α (πριν τη χορήγηση μορφίνης). Επίσης η μορφίνη μείωσε εμφανώς την αντίσταση της κυτταρικής μεμβράνης. Στο 15γ έχει εκπλυθεί η μορφίνη και έχει προστεθεί ναλοξόνη 100  $\mu\text{M}$  στο τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Κατά τη χορήγηση ναλοξόνης αντιστράφηκε η αύξηση του βάθους της κοιλάδας, που παρατηρήθηκε ως αποτέλεσμα της δράσης της μορφίνης (15β). Η μείωση της αντίστασης δεν αντιστράφηκε. Κάτω από τις καταγραφές απεικονίζονται οι υπερπολωτικοί παλμοί που εφαρμόστηκαν. Η κλίμακα του χρόνου ισχύει για όλες τις κυματομορφές. Ο συγκεκριμένος O/A ενδονευρώνας εκπολώθηκε κατά 5 mV κατά τη χορήγηση της μορφίνης, όπως αναμενόταν λόγω της ενίσχυσης του  $I_h$ . Οι άνωθεν κυματομορφές είναι στο ίδιο δυναμικό μεμβράνης για να είναι συγκρίσιμες οι υπό εξέταση παράμετροι, οι οποίες εξαρτώνται από το δυναμικό μεμβράνης. Αυτό έγινε με τη χορήγηση σταθερού ρεύματος (DC) για την επίτευξη συγκεκριμένου δυναμικού μεμβράνης (15α: DC = + 0,03 mV, 15β: DC = 0 mV, 15γ: DC = -0,07 mV).



αντίστασης της κυτταρικής μεμβράνης και μερικώς αντιστρεπτή μετά τη χορήγηση ναλοξόνης 100  $\mu\text{M}$ , γεγονός που αποδεικνύει ότι πρόκειται για ειδικό φαρμακολογικό φαινόμενο. Επιπλέον, ο νευρώνας αυτός εκπολώθηκε παρουσία της μορφίνης, όπως αναμένετο λόγω της αύξησης του  $I_h$ , το οποίο δρα εκπολωτικά στο δυναμικό της μεμβράνης.

Η εκπόλωση του νευρώνα αυτού με την απρόσμενη συμπεριφορά παρουσία μορφίνης ήταν ο λόγος για τον οποίο δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική υπερπόλωση επί τω συνόλω των O/A ενδονευρώνων παρουσία μορφίνης, όπως αναφέρθηκε στο ειδικό κεφάλαιο που πραγματεύτηκε τις παθητικές ιδιότητες των O/A ενδονευρώνων πριν και κατά τη χορήγηση μορφίνης.

Οι μεταβολές που προκλήθηκαν στις παραπάνω παραμέτρους από τη χορήγηση μορφίνης συνοψίζονται στον Πίνακα 7.

	O/A ενδονευρώνες πριν τη χορήγηση μορφίνης	O/A ενδονευρώνες κατά τη χορήγηση μορφίνης
$\Delta V_{\text{peak}}$ (mV) $n = 8$	$28,8 \pm 2,5$	$21,5 \pm 1,8^*$
$\Delta V_{\text{ss}}$ (mV) $n = 8$	$23,5 \pm 2,2$	$17,6 \pm 1,5^*$
$\Delta V_{\text{peak-ss}}$ (mV) $n = 7$	$5,3 \pm 0,5$	$3,6 \pm 0,3^*$

Πίνακας 7: Επίδραση της μορφίνης στα χαρακτηριστικά της απόκρισης των O/A ενδονευρώνων σε παρατεταμένο υπερπολωτικό παλμό έντασης 0,55 nA. Το  $\Delta V_{\text{peak}}$  και το  $\Delta V_{\text{ss}}$  μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά επί τω συνόλω των O/A ενδονευρώνων, οι οποίοι εξετάστηκαν πριν και κατά τη χορήγηση μορφίνης. Προκειμένου να εξεταστεί στατιστικά η επίδραση της μορφίνης στο  $\Delta V_{\text{peak-ss}}$  (που ανακλά έμμεσα και την αναστολή του  $I_h$ ) αποκλείστηκε ο ενδονευρώνας της εικόνας 15, αφού στον ενδονευρώνα η μορφίνη είχε την ακριβώς αντίθετη επίδραση. Το αποτέλεσμα που προέκυψε ήταν στατιστικά σημαντικό. Ο μέσος όρος και το τυπικό σφάλμα του  $\Delta V_{\text{peak-ss}}$  συμπεριλαμβανομένου του ενδονευρώνα της εικόνας 15 βρίσκονται στο κείμενο.

\*:  $p$  value < 0,05, Student t test κατά ζεύγη.

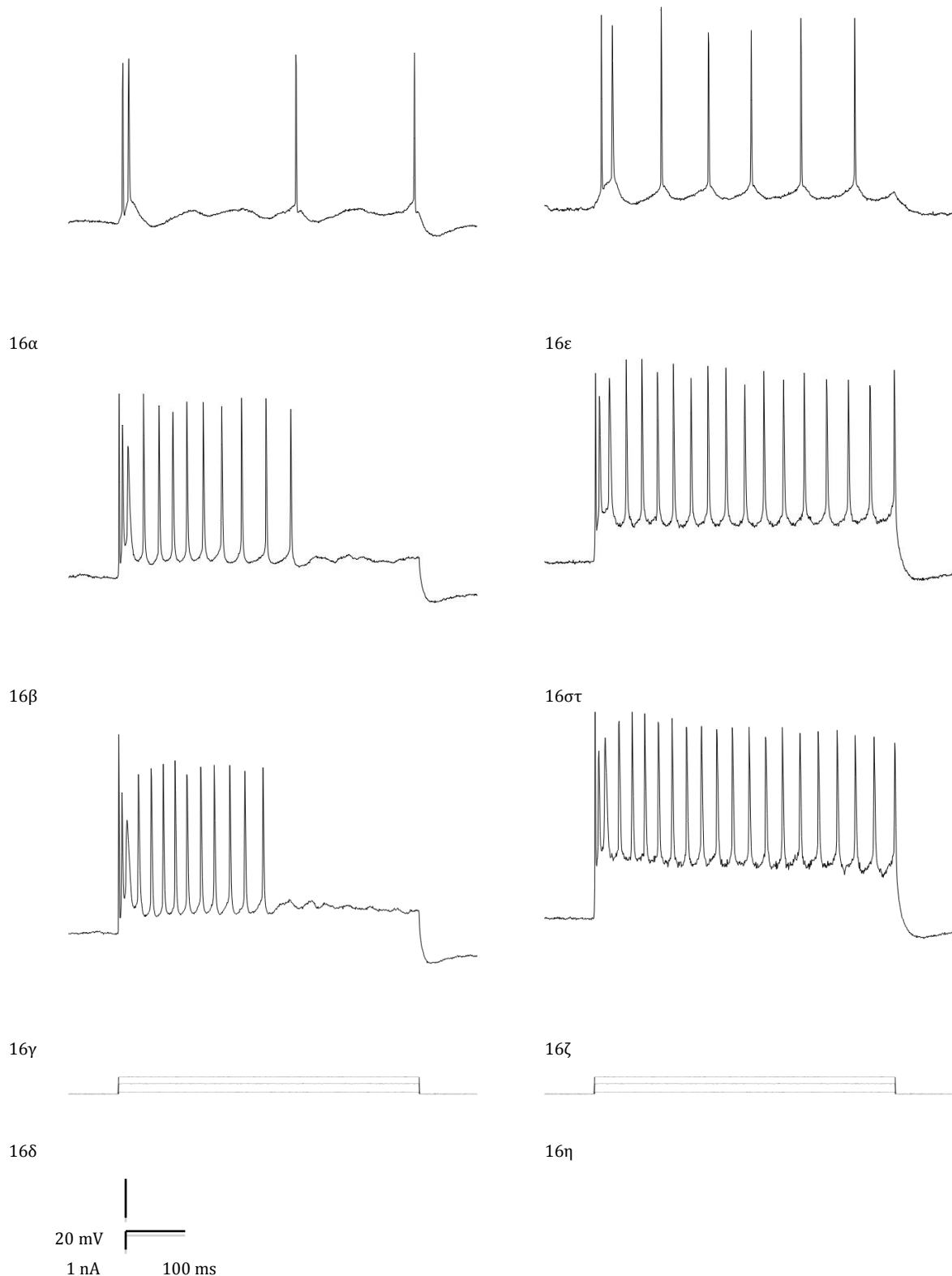
Συνολικά εξετάστηκαν οκτώ O/A ενδονευρώνες πριν και κατά τη χορήγηση μορφίνης. Το  $\Delta V_{\text{peak}}$  και το  $\Delta V_{\text{ss}}$  μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά ( $p$  value < 0,05, Student t test κατά ζεύγη) στο σύνολο των O/A ενδονευρώνων. Συγκεκριμένα για το  $\Delta V_{\text{peak}}$  ο μέσος όρος και το τυπικό σφάλμα πριν τη μορφίνη ήταν  $28,8 \pm 2,5$  mV έναντι  $21,5 \pm 1,8$  mV κατά τη χορήγηση της μορφίνης. Το  $\Delta V_{\text{ss}}$  ήταν  $23,5 \pm 2,2$  mV πριν και  $17,6 \pm 1,5$  mV κατά τη χορήγηση της μορφίνης. Το  $\Delta V_{\text{peak-ss}}$ , που ανακλά έμμεσα τη δράση της μορφίνης στο  $I_h$ , ήταν  $5,3 \pm 0,5$  mV πριν και  $3,9 \pm 0,4$  mV κατά τη χορήγηση της μορφίνης, το αποτέλεσμα δεν ήταν στατιστικά σημαντικό ( $p$  value > 0,05, Student t

test κατά ζεύγη), αν και έτεινε στο επίπεδο της στατιστικής σημαντικότητας. Μετά την εξαίρεση όμως του O/A ενδονευρώνα της εικόνας 15 για φυσιολογικούς λόγους, αφού επέδειξε αντίστροφη ρύθμιση του ρεύματος I<sub>h</sub> παρουσία μορφίνης, η διαφορά του ΔV<sub>peak-ss</sub> πριν και κατά τη χορήγηση μορφίνης ( $5,3 \pm 0,5$  mV έναντι  $3,6 \pm 0,3$  mV αντίστοιχα) έγινε στατιστικά σημαντική ( $p$  value < 0,05, Student t test κατά ζεύγη).

#### **2.2.2.4. Απόκριση των O/A ενδονευρώνων σε παρατεταμένο εκπολωτικό παλμό ηλεκτρικού ρεύματος αυξανόμενης έντασης – Επίδραση της μορφίνης 30 μM στη διεγερσιμότητα των O/A ενδονευρώνων**

Η απόκριση των νευρώνων σε παρατεταμένο εκπολωτικό παλμό αποτελεί δείκτη της διεγερσιμότητάς τους. Με την εφαρμογή παρατεταμένων εκπολωτικών παλμών αυξανόμενης έντασης το δυναμικό της μεμβράνης των νευρώνων φτάνει τον ουδό και πυροδοτείται συστοιχία δυναμικών ενεργείας. Στην πλειονότητα των πυραμιδικών νευρώνων της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου παρατηρείται το φαινόμενο της προσαρμογής (accommodation ή adaptation), κατά το οποίο η συχνότητα της συστοιχίας των δυναμικών ενεργείας κατά τη διάρκεια του εκπολωτικού παλμού προοδευτικά μειώνεται, μέχρι την παύση των δυναμικών ενεργείας πριν τη λήξη του παλμού.

Σε ό,τι αφορά τους ενδονευρώνες της CA1 περιοχής, τα δεδομένα ήταν ελάχιστα πριν την ευρεία επικράτηση της συνδυασμένης ηλεκτροφυσιολογικής και ιστολογικής μελέτης τους. Πολύ σωστά παρατηρήθηκε, ότι η πληθώρα των ιστολογικών ευρημάτων ερχόταν σε αντίθεση με τα ελάχιστα ηλεκτροφυσιολογικά δεδομένα (62). Αρχικά, επιχειρήθηκε η αναγνώρισή τους σχεδόν αποκλειστικά με ηλεκτροφυσιολογικά κριτήρια, με αποτέλεσμα να χαρακτηρίζονται ως ενδονευρώνες μόνο οι νευρώνες, των οποίων οι ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες (και ιδίως η διεγερσιμότητα) απείχαν σημαντικά από αυτές των πυραμιδικών νευρώνων. Χρησιμοποιήθηκε ευρέως ο όρος «fast spiking interneurons» (ταχέως πυροδοτούντες ενδονευρώνες) για περιγραφεί το φαινόμενο πυροδότησης υψηλής συχνότητας ακολουθίας δυναμικών ενεργείας χωρίς προσαρμογή (μείωση) της συχνότητας ή παύση των δυναμικών ενεργείας. Με τη διάδοση του συνδυασμού ηλεκτροφυσιολογικών και ιστολογικών μεθόδων για την αναγνώριση των ενδονευρώνων βρέθηκε ότι και οι ενδονευρώνες παρουσιάζουν το



Εικόνα 16: η αριστερή στήλη (16α, β, γ και δ) αντιστοιχεί σε έναν O/A ενδονευρώνα, η δεξιά στήλη (16ε, στ, ζ, η) σε ένα δεύτερο O/A ενδονευρώνα. Τα κάτω ίχνη και στις δύο στήλες απεικονίζουν τους τετράγωνους εκπολωτικούς παλμούς ρεύματος που χορηγήθηκαν στους νευρώνες. Από πάνω προς τα κάτω (α έως γ και ε έως η) απεικονίζονται οι αποκρίσεις των δύο O/A ενδονευρώνων σε ρεύμα αυξανόμενης έντασης (0,1 nA; 0,6 nA; 1 nA). Γίνεται εμφανές πώς η αύξηση της έντασης του ρεύματος αλλάζει τη συχνότητα εκφόρτισης των νευρώνων. Και οι δύο νευρώνες εμφάνιζαν ριπή δυναμικών ενεργειάς στην αρχή του παλμού, συμπεριφορά που σχετιζόταν με εντονότερη προσαρμογή (πιθανώς λόγω αυξημένης εισροής ασβεστίου). Με την πρόοδο του χρόνου μειωνόταν η συχνότητα εκφόρτισης σε κάθε παλμό, μέχρι την παύση της εκφόρτισης (στον νευρώνα αριστερά). Ο νευρώνας με την εντονότερη προσαρμογή (αριστερά) εμφανίζει και μεγαλύτερο sAHP.

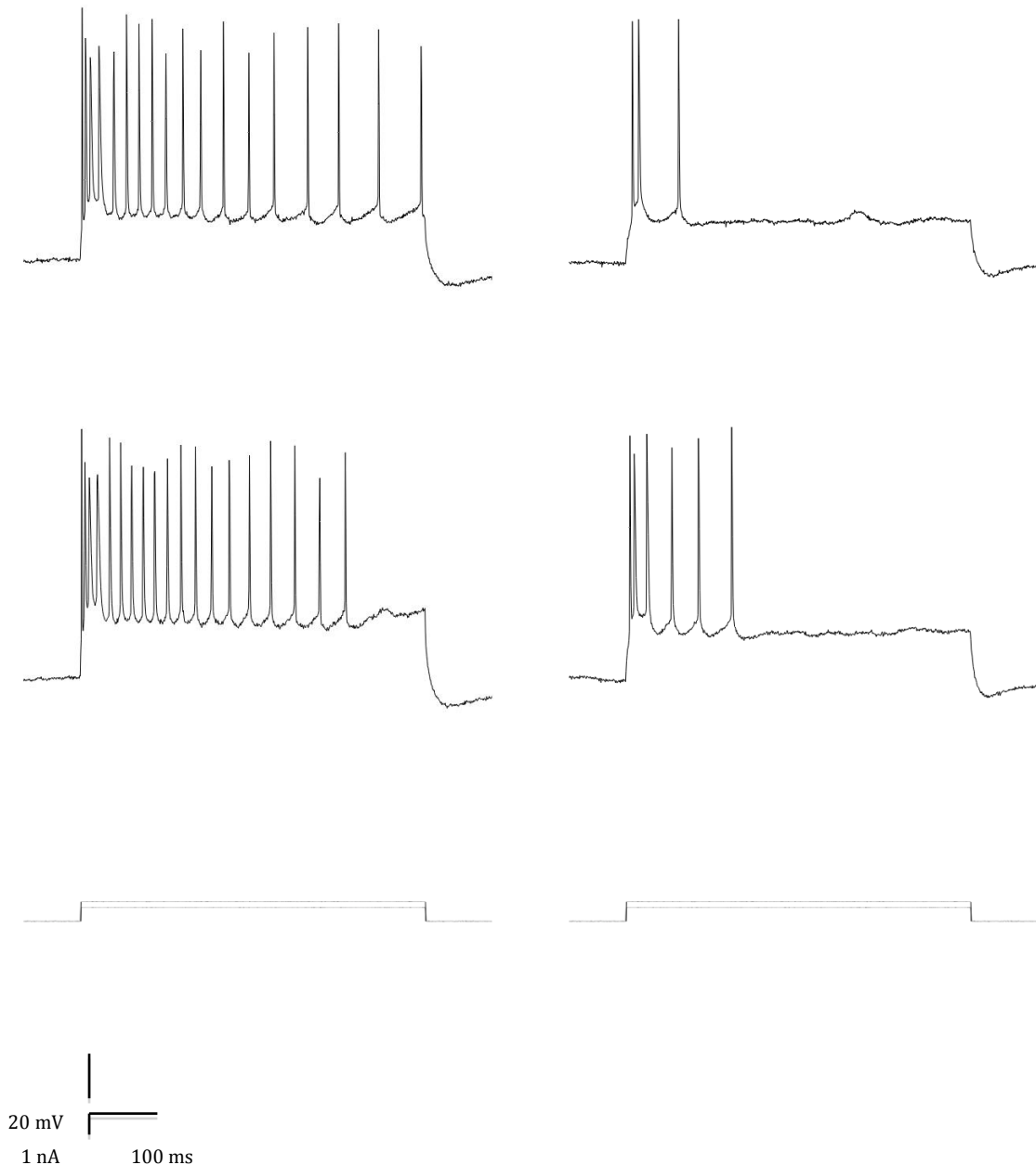
φαινόμενο προσαρμογής κατά τη διάρκεια παρατεταμένου εκπολωτικού παλμού και μάλιστα στην πλειονότητα τους (9). Το πρότυπο πυροδότησης δυναμικών ενεργείας συνεπεία εφαρμογής παρατεταμένου εκπολωτικού παλμού δεν χαρακτηρίζει τις ξεχωριστές μορφολογικές κλάσεις των ενδονευρώνων, με άλλα λόγια διαφορετικοί ως προς τη μορφολογία τους ενδονευρώνες μπορούν να παρουσιάσουν το ίδιο πρότυπο πυροδότησης και αντίστροφα. Μάλιστα, είναι δυνατό και ένας συγκεκριμένος ενδονευρώνας να παρουσιάζει διαφορετικό πρότυπο πυροδότησης σε διαφορετικές συνθήκες, για παράδειγμα σε διαφορετικό δυναμικό μεμβράνης (9). Τα ευρήματα αυτά αναφέρθηκαν και σε πειράματα στους O/A ενδονευρώνες της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου.

Σε εναρμόνιση με τα παραπάνω ευρήματα στην προκειμένη μελέτη οι O/A ενδονευρώνες κατέδειξαν στο σύνολό τους το φαινόμενο της προσαρμογής (εικόνα 16). Δε βρέθηκαν ταχέως πυροδοτούντες ενδονευρώνες στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες. Η συμπεριφορά τους, ωστόσο, διέφερε από αυτή των πυραμιδικών νευρώνων. Συγκεκριμένα, ο αριθμός των δυναμικών ενεργείας κατά τη διάρκεια παλμού 500 ms και έντασης 0,1 nA ήταν κατά μέσο όρο 14,1 στους O/A ενδονευρώνες ( $n = 13$ , τυπικό σφάλμα = 1,4), ενώ στους πυραμιδικούς νευρώνες 7,2 ( $n = 12$ , τυπικό σφάλμα = 1,1). Η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική ( $p$  value < 0,05).

Προσαρμογή με την έννοια της μείωσης της συχνότητας δυναμικών ενεργείας παρουσίασε το 100% των O/A ενδονευρώνων.

Κατόπιν μελετήθηκε η επίδραση της μορφίνης στα χαρακτηριστικά της συστοιχίας των δυναμικών ενεργείας στους O/A ενδονευρώνες. Προέκυψε μείωση του αριθμού των δυναμικών ενεργείας κατά τη διάρκεια εκπολωτικού παλμού 500 ms και ενίσχυση του φαινομένου της προσαρμογής (πίνακας 8).

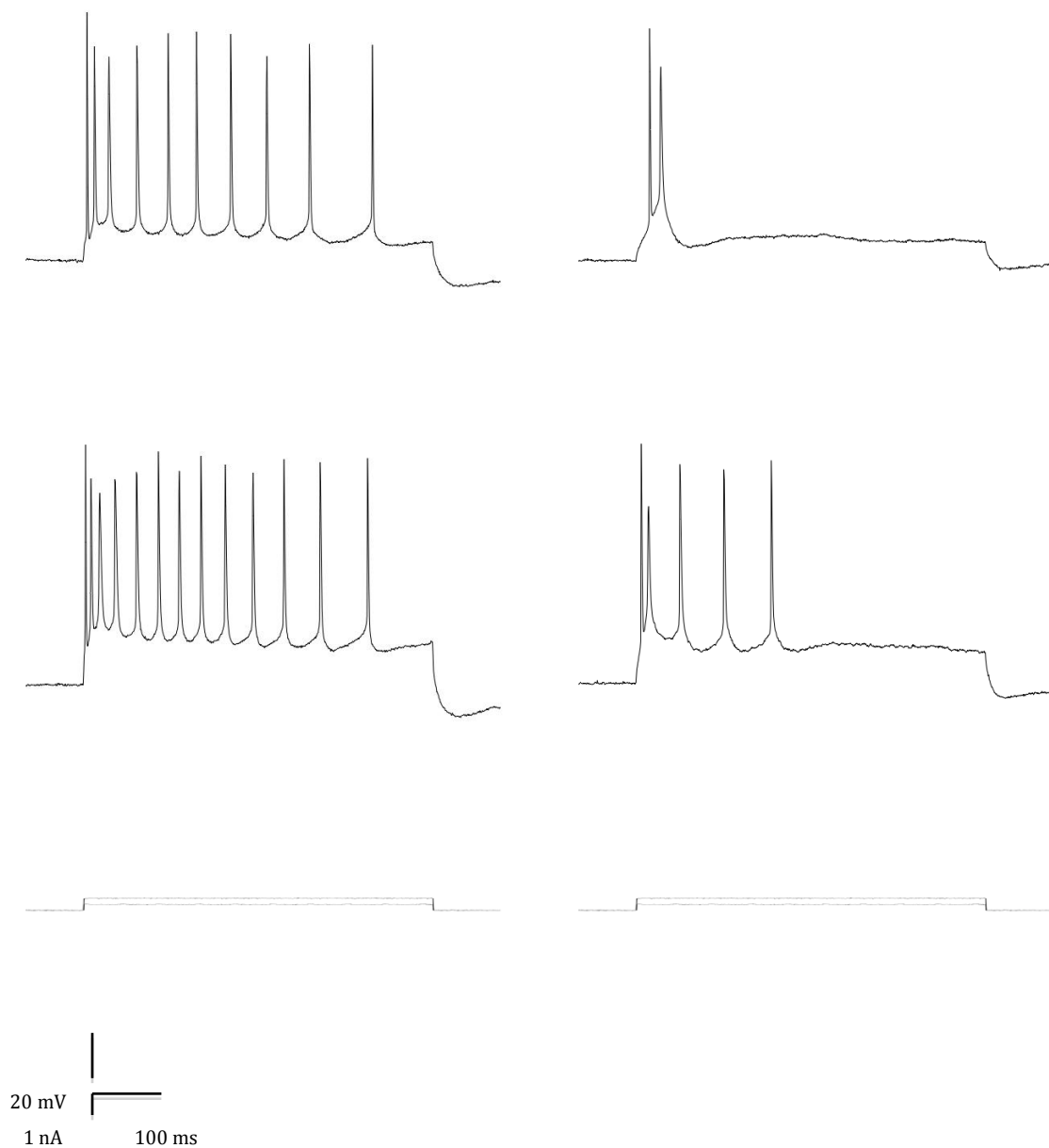
Ο μέσος όρος των δυναμικών ενεργείας κατά τη διάρκεια του εκπολωτικού παλμού των 500 ms πριν τη χορήγηση μορφίνης ήταν  $14,8 \pm 2,7$  δυναμικά ενεργείας, ενώ κατά τη χορήγηση μορφίνης μόνο  $5,3 \pm 0,9$  δυναμικά ενεργείας, η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική ( $p$  value < 0,05). Ένα μέτρο που χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση του φαινομένου προσαρμογής είναι η σύγκριση της συχνότητας πυροδότησης δυναμικών ενεργείας στην αρχή και στο τέλος του παλμού.



Εικόνα 17: Επίδραση της μορφίνης στην απόκριση O/A ενδονευρώνα σε παρατεταμένο τετράγωνο εκπολωτικό παλμό. Αριστερά η απόκριση πριν την χορήγηση του φαρμάκου σε παλμούς (υψηλής) έντασης 0,7 nA και 1 nA (από πάνω προς τα κάτω), δεξιά η απόκριση του ίδιου νευρώνα κατά τη χορήγηση του φαρμάκου σε παλμούς έντασης 0,7 nA και 1 nA (από πάνω προς τα κάτω). Μειώνονται δραστικά ο αριθμός δυναμικών ενεργείας και το sAHP.

Συγκεκριμένα συγκρίνεται το αντίστροφο του χρονικού μεσοδιαστήματος μεταξύ πρώτου και δεύτερου δυναμικού ενεργείας της συστοιχίας (στον πίνακα 8: συχνότητα πρώτου μεσοδιαστήματος σε  $s^{-1}$ ) με το αντίστροφο του χρονικού μεσοδιαστήματος μεταξύ προτελευταίου και τελευταίου δυναμικού ενεργείας της συστοιχίας (στον πίνακα 8: συχνότητα τελευταίου μεσοδιαστήματος σε  $s^{-1}$ ). Πριν τη χορήγηση της μορφίνης, η συχνότητα πρώτου μεσοδιαστήματος ήταν στατιστικά σημαντικά

διαφορετική από τη συχνότητα τελευταίου μεσοδιαστήματος ( $0,180 \pm 0,035 \text{ s}^{-1}$  έναντι  $0,027 \pm 0,003 \text{ s}^{-1}$ ,  $p \text{ value} < 0,05$ ). Κατά τη χορήγηση της μορφίνης η συχνότητα πρώτου



Εικόνα 18: Επίδραση της μορφίνης στην απόκριση O/A ενδονευρώνα σε παρατεταμένο τετράγωνο εκπολωτικό παλμό. Αριστερά η απόκριση πριν την χορήγηση του φαρμάκου σε παλμούς (χαμηλής και μέσης) έντασης 0,3 nA και 0,6 nA (από πάνω προς τα κάτω), δεξιά η απόκριση του ίδιου νευρώνα κατά τη χορήγηση του φαρμάκου σε παλμούς έντασης 0,3 nA και 0,6 nA (από πάνω προς τα κάτω). Μειώνονται δραστικά ο αριθμός δυναμικών ενεργείας και το sAHP.

μεσοδιαστήματος δεν ήταν στατιστικά σημαντικά διαφορετική από τη συχνότητα τελευταίου μεσοδιαστήματος ( $0,092 \pm 0,029 \text{ s}^{-1}$  έναντι  $0,018 \pm 0,001 \text{ s}^{-1}$ ,  $p \text{ value} > 0,05$ ). Δηλαδή, ενώ οι O/A ενδονευρώνες παρουσία μορφίνης έπαυαν νωρίτερα να πυροδοτούν δυναμικά ενεργείας, η προσαρμογή με την έννοια της σταδιακής μείωσης της συχνότητας των δυναμικών ενεργείας μειώθηκε. Η σύγκριση της συχνότητας του πρώτου μεσοδιαστήματος πριν και κατά τη χορήγηση μορφίνης, αλλά και της συχνότητας του τελευταίου μεσοδιαστήματος πριν και κατά τη χορήγηση μορφίνης δεν απέφερε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα ( $p \text{ value} > 0,05$ ).

	O/A ενδονευρώνες πριν τη χορήγηση μορφίνης $n = 4$	O/A ενδονευρώνες κατά τη χορήγηση μορφίνης $n = 4$
Αριθμός των δυναμικών ενεργείας	$14,8 \pm 2,7^*$	$5,3 \pm 0,9^*$
Συχνότητα πρώτου μεσοδιαστήματος ( $\text{s}^{-1}$ )	$0,180 \pm 0,035^{**}$	$0,092 \pm 0,029$
Συχνότητα τελευταίου μεσοδιαστήματος ( $\text{s}^{-1}$ )	$0,027 \pm 0,003^{**}$	$0,018 \pm 0,001$

Πίνακας 8: Επίδραση της μορφίνης στην απόκριση των O/A ενδονευρώνων σε εκπολωτικό παλμό 500 ms. Ένταση του παλμού: 0,1 nA. Ο αριθμός των δυναμικών ενεργείας κατά τη διάρκεια του παλμού μειώθηκε στατιστικά σημαντικά μετά την προσθήκη μορφίνης 30  $\mu\text{M}$  στο τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Επίσης, οι συχνότητες του πρώτου και του τελευταίου μεσοδιαστήματος πριν τη χορήγηση μορφίνης ήταν στατιστικά διαφορετικές μεταξύ τους.  $*** p \text{ value} < 0,05$ .

## 2.3. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

### 2.3.1. Συνοπτική παρουσίαση των ευρημάτων και σχολιασμός

Τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής επιδεικνύουν την επίδραση της μορφίνης στη διεγερσιμότητα των O/A ενδονευρώνων της CA1 περιοχής του κοιλιακού και του ραχιαίου ιπποκάμπου. Πρόκειται για τα πρώτα στοιχεία της επίδρασης οπιοειδών στους O/A ενδονευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου σε ενδοκυττάρια ηλεκτροφυσιολογική μελέτη *in vitro* (στη διεθνή βιβλιογραφία δεν αναφέρονται μέχρι στιγμής ενδοκυττάρια καταγραφές από ενδονευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου *in vitro*), και για την πρώτη μελέτη της επίδρασης των οπιοειδών στη δράση του ρεύματος I<sub>h</sub> σε O/A ενδονευρώνες σε συνθήκες καθήλωσης ρεύματος, από όσο γνωρίζουμε. Μέχρι στιγμής στον υπάρχουν αντίστοιχα πειράματα σε συνθήκες καθήλωσης ρεύματος σε πυραμιδικούς νευρώνες του ιπποκάμπου (60) και σε συνθήκες καθήλωσης τάσης σε O/A ενδονευρώνες του ιπποκάμπου (65).

#### **A) Χαρακτηριστικά της δράσης του ρεύματος I<sub>h</sub> στους O/A ενδονευρώνες του κοιλιακού και του ραχιαίου ιπποκάμπου.**

Καταρχήν, καταδείχτηκε ότι η ενεργοποίηση του ρεύματος I<sub>h</sub> κατά τη διάρκεια παρατεταμένου ηλεκτρικού παλμού δε διαφέρει σημαντικά στους O/A ενδονευρώνες του κοιλιακού και του ραχιαίου ιπποκάμπου. Αυτό προέκυψε από τη σύγκριση του εύρους της χαρακτηριστικής κοιλιάδας στην υπερπολωτική απόκλιση του δυναμικού μεμβράνης των νευρώνων κατά τη διάρκεια του παλμού. Το γεγονός ότι το εύρος της κοιλιάδας της υπερπολωτικής απάντησης είναι δηλωτικό για την παρουσία του ρεύματος I<sub>h</sub> είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία (22, 23, 38, 60). Ωστόσο, οι ενδονευρώνες των δύο περιοχών επέδειξαν διαφορετικά χαρακτηριστικά ως προς το συνολικό εύρος της υπερπόλωσης συνεπεία χορήγησης υπερπολωτικού παλμού, την κινητική του ρεύματος I<sub>h</sub> και τη μορφολογία της εκπόλωσης αναπήδησης.

#### **B) Επίδραση της μορφίνης στο ρεύμα I<sub>h</sub> στους O/A ενδονευρώνες του ιπποκάμπου.**

Η προσθήκη της μορφίνης (30 μM) στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό οδήγησε σε μερική αναστολή του ρεύματος I<sub>h</sub> με μείωση του εύρους της κοιλιάδας στην υπερπολωτική απόκριση των νευρώνων. Η ανάστροφη σχέση της μείωσης της κοιλιάδας με το βαθμό ενεργοποίησης του I<sub>h</sub> έχει τεκμηριωθεί σε πειράματα με τη χρήση



ανταγωνιστών των διαύλων του Ih, όπως το ZD 7288 (22). Σε αντίθεση με την επίδραση του ZD 7288, το οποίο είναι ανταγωνιστής των διαύλων του Ih και μπλοκάρει πλήρως το Ih, η μορφίνη οδήγησε σε μερική ελάττωση του Ih. Η μορφίνη ανήκει στους νευρορυθμιστές που δρουν στο Ih μέσω επίδρασης στην αδενυλική κυκλάση (70).

Η μείωση του Ih είναι συμβατή με την υπερπόλωση που παρατηρήθηκε στους περισσότερους O/A ενδονευρώνες υπό την επίδραση της μορφίνης, καθώς έχει αποδειχτεί ότι το ρεύμα Ih συμβάλλει σε σημαντικό ποσοστό στη ρύθμιση του δυναμικού ηρεμίας. Άλλοι παράγοντες που συμβάλλουν στο δυναμικό ηρεμίας των ενδονευρώνων του ιπποκάμπου είναι οι δίαυλοι διαρροής («leakage») καλίου, οι δίαυλοι GIRK και τασεοεξαρτώμενοι δίαυλοι ασβεστίου (29). Παράλληλα με την υπερπόλωση των O/A ενδονευρώνων παρουσιάστηκε και μείωση της συχνότητας των αυθόρμητων δυναμικών ενεργείας στο δυναμικό ηρεμίας στους περισσότερους O/A ενδονευρώνες.

Η μείωση του Ih συνοδεύεται με μείωση της αντίστασης του νευρώνα, ενώ θα αναμενόταν αύξηση της αντίστασης λόγω μείωσης της αγωγιμότητας της μεμβράνης. Το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί σε πειράματα τρίτων με οπιοειδείς αγωνιστές σε συνθήκες καθήλωσης τάσης (65), οι οποίοι το ερμήνευσαν με το επιχείρημα ότι τα οπιοειδή ενεργοποιούν το ρεύμα καλίου των διαύλων GIRK. Η μείωση της αντίστασης της μεμβράνης με τη χορήγηση μορφίνης που παρατηρήθηκε στην παρούσα έρευνα ενισχύει την υπόθεση ότι τα οπιοειδή ενεργοποιούν ένα ρεύμα καλίου στους O/A ενδονευρώνες του ιπποκάμπου. Η ενίσχυση ενός τέτοιου ρεύματος είναι συμβατή και με την υπερπόλωση της μεμβράνης των O/A ενδονευρώνων.

Σε ένα O/A ενδονευρώνα του κοιλιακού ιπποκάμπου παρατηρήθηκε το αντίθετο αποτέλεσμα στο Ih μετά τη χορήγηση μορφίνης: το εύρος της χαρακτηριστικής κοιλάδας αυξήθηκε και το δυναμικό μεμβράνης εκπολώθηκε, και τα δύο φαινόμενα συμβατά με αύξηση του Ih. Η αντίσταση της μεμβράνης μειώθηκε, παραπέμποντας σε αύξηση της αγωγιμότητας συμβατή με την ενίσχυση του Ih. Η ενίσχυση του ρεύματος Ih συνεπεία της δράσης της μορφίνης δεν είναι παράδοξη. Παρόμοια δράση των οπιοειδών έχει παρατηρηθεί στους νευρώνες του μεγάλου πυρήνα της ραφής και οφείλεται στην ενεργοποίηση κ υποδοχέων (58). Το γεγονός ότι μέχρι σήμερα δεν περιγράφηκε στον ιππόκαμπο, ίσως να οφείλεται στο ότι στις έρευνες που εστίασαν στη δράση των οπιοειδών στο Ih των ενδονευρώνων του ιπποκάμπου χρησιμοποιήθηκαν μ και δ αγωνιστές. Η μορφίνη, που χρησιμοποιήθηκε εδώ, είναι μη ειδικός αγωνιστής και δρα και στους κ υποδοχείς. Επιπλέον, οι κ υποδοχείς είναι περισσότεροι στον κοιλιακό ιππόκαμπο, ο οποίος μέχρι τώρα δεν αποτέλεσε αντικείμενο των ερευνών της δράσης

των οπιοειδών στο Ih. Τέλος, δεν αποκλείεται η ενδυνάμωση του Ih να οφείλεται στη δράση της μορφίνης σε μ ή δ υποδοχείς, αφού σε συγκεκριμένα είδη νευρώνων, η ενεργοποίηση των υποδοχέων αυτών οδηγεί σε ενίσχυση και όχι αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης, αφού κάτι τέτοιο έχει παρατηρηθεί σε νευρώνες άλλων δομών (70). Η ερμηνεία αυτή είναι λιγότερο πιθανή, αφού όλα τα μέχρι τώρα στοιχεία στη βιβλιογραφία συντείνουν στο συμπέρασμα, πως η ενεργοποίηση των μ και οι δ υποδοχέων στον ιππόκαμπο οδηγεί στην αναστολή στη αδενυλική κυκλάσης. Ό,τι ερμηνεία και να έχει το εν λόγω φαινόμενο, υπογραμμίζει την πολυπλοκότητα της επίδρασης των οπιοειδών στα κυκλώματα του ιπποκάμπου.

### **Γ) Επίδραση της μορφίνης στην εκπόλωση αναπήδησης στους O/A ενδονευρώνες του ιπποκάμπου.**

Επιπλέον, η επίδραση της μορφίνης στο Ih στους O/A ενδονευρώνες είχε ως αποτέλεσμα τη μεταβολή των χαρακτηριστικών της εκπόλωσης αναπήδησης μετά τη λήξη του παρατεταμένου υπερπολωτικού παλμού: οι νευρώνες επεδείκνυαν κατά κανόνα λιγότερα δυναμικά ενεργείας και μικρότερο AHP μετά την εκπόλωση αναπήδησης.

Τα άνωθεν χαρακτηριστικά της εκπόλωσης αναπήδησης και η μεταβολή τους μέσω φαρμακολογικών χειρισμών έχουν ερευνηθεί εκτενώς σε πολλά είδη νευρώνων (1, 16, 63). Ο λόγος για την εκτεταμένη έρευνα είναι ότι παρέχουν πληροφορίες για τη διεγερσιμότητα των νευρώνων γενικά, αλλά και τη δυνατότητα μετατροπής της συναπτικής αναστολής των νευρώνων (η οποία προσομοιώνεται από τον υπερπολωτικό παλμό) σε ενίσχυση της εξόδου (output) των νευρώνων, μέσω της εκφόρτισης των νευρώνων κατά τη διάρκεια εκπόλωσης αναπήδησης (1). Πιθανολογείται ότι οι υποκείμενοι μηχανισμοί της εκπόλωσης αναπήδησης εμπλέκονται στη βηματοδοτική δραστηριότητα συγκεκριμένων νευρώνων (1) και ως εκ τούτου η μελέτη των μηχανισμών αυτών στους ενδονευρώνες του ιπποκάμπου έχει ιδιαίτερη σημασία για την κατανόηση των ταλαντώσεων, οι οποίες παρατηρούνται στον ιππόκαμπο και επηρεάζονται από τη δραστηριότητα των ενδονευρώνων (31).

Η εκπόλωση αναπήδησης στους πυραμιδικούς νευρώνες της CA1 περιοχής οφείλεται σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες (63) σε αλληλεπίδραση των ρευμάτων  $I_T$  και Ih. Τα ρεύματα αυτά διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εκπόλωση αναπήδησης και σε άλλες δομές του εγκεφάλου (1, 16, 52). Στους O/A ενδονευρώνες της CA1 περιοχής η εκπόλωση αναπήδησης δεν έχει χαρακτηριστεί φαρμακολογικά. Τα ευρήματα της

παρούσας έρευνας υποστηρίζουν την υπόθεση ότι το Ih διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εκπόλωση αναπήδησης, αλλά ο ρόλος άλλων διαύλων (π.χ. διαύλων I<sub>T</sub>) δεν έχει διαλευκανθεί.

#### **Δ) Προσυναπτική δράση της μορφίνης στους O/A ενδονευρώνες του ιπποκάμπου.**

Εκτός από τις προαναφερθείσες μετασυναπτικές δράσεις της μορφίνης στους O/A ενδονευρώνες του ιπποκάμπου παρατηρήθηκαν στην παρούσα εργασία και προσυναπτικές δράσεις, παρόλο που το πρωτόκολλο δεν ήταν εξειδικευμένο για τη μελέτη των δράσεων αυτών. Έτσι, σε έναν O/A ενδονευρώνα του κοιλιακού ιπποκάμπου καταγράφηκαν πολλαπλά διεγερτικά συναπτικά δυναμικά με συνακόλουθη αύξηση της συχνότητας των δυναμικών ενεργείας στο δυναμικό ηρεμίας του νευρώνα. Η αυξημένη διεγερτική συναπτική δραστηριότητα ήταν αναστρέψιμη μετά την έκπλυση της μορφίνης, ούτως ώστε να μπορεί να θεωρηθεί ειδικό αποτέλεσμα της δράσης της μορφίνης. Η συναπτική διέγερση O/A ενδονευρώνων, όπως στην περίπτωση του εν λόγω O/A ενδονευρώνα, μπορεί να χρησιμεύει στη δυσαναστολή των πυραμιδικών νευρώνων, εάν παρατηρείται σε O/A ενδονευρώνες που αναστέλλουν άλλους ενδονευρώνες, που με τη σειρά τους δίνουν συνάψεις σε πυραμιδικούς νευρώνες, ή στον έλεγχο της δυσαναστολής των πυραμιδικών νευρώνων, εάν οι O/A ενδονευρώνες που διεγείρονται δίνουν συνάψεις απευθείας σε πυραμιδικούς νευρώνες. Επειδή οι O/A ενδονευρώνες δίνουν συνάψεις σε χιλιάδες νευρώνες (19), πιθανός είναι ο συνδυασμός και των δύο φαινομένων.

#### **Ε) Επίδραση της μορφίνης στη διεγερσιμότητα των O/A ενδονευρώνων του ιπποκάμπου**

Τέλος, η χορήγηση της μορφίνης στους O/A ενδονευρώνες οδήγησε στη μείωση του αριθμού των δυναμικών ενεργείας που πυροδοτήθηκαν μέσω παρατεταμένου εκπολωτικού παλμού ηλεκτρικού ρεύματος. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο λόγω της περιγραφής της δράσης του ZD 7288 (ανταγωνιστή του Ih) στους πυραμιδικούς νευρώνες του ιπποκάμπου. Ο ZD 7288 οδήγησε στο ίδιο πρωτόκολλο επίσης σε μείωση του αριθμού των δυναμικών ενεργείας, το φαινόμενο αυτό ερμηνεύτηκε με βάση την υπερπόλωση των νευρώνων συνεπεία της αναστολής του Ih. Καθώς όμως η μορφίνη και γενικότερα τα οπιοειδή επιδρούν σε πληθώρα διαύλων που θα μπορούσαν να εμπλέκονται στο συγκεκριμένο φαινόμενο (BK δίαυλοι,

τασσεοεξαρτώμενοι δίαυλοι ασβεστίου και καλίου, I<sub>h</sub> κ.α.), απαιτούνται περαιτέρω φαρμακολογικοί χειρισμοί για την εξαγωγή συμπερασμάτων. Το αποτέλεσμα, ωστόσο, είναι σαφές: χορήγηση μορφίνης οδηγεί σε μείωση της διεγερσιμότητας των O/A ενδονευρώνων.

### **2.3.2. Λειτουργική σημασία των αποτελεσμάτων**

Εδώ είναι σκόπιμο να υπογραμμιστεί για άλλη μια φορά το γεγονός, ότι οι O/A ενδονευρώνες είναι μία ετερογενής ομάδα νευρώνων: υπάρχουν ενδονευρώνες που αναστέλλουν πυραμιδικούς νευρώνες και ενδονευρώνες που αναστέλλουν ενδονευρώνες, επίσης υπάρχουν ενδονευρώνες που εκλύουν ενδορφίνες και άλλοι που είναι μετασυναπτικός στόχος των ενδορφινών αυτών.

Η ετερογένεια των ευρημάτων της παρούσης έρευνας μετά τη χορήγηση μορφίνης στους O/A ενδονευρώνες οδηγεί στο συμπέρασμα ότι διεισδύθηκαν O/A ενδονευρώνες με διαφορετικό προφίλ οπιοειδών υποδοχέων και διαφορετική θέση στη συνδεσμολογία του ιπποκάμπου. Επιπλέον, η μελέτη των ηλεκτροφυσιολογικών χαρακτηριστικών των O/A ενδονευρώνων του κοιλιακού και του ραχιαίου ιπποκάμπου έδειξε ότι οι ενδονευρώνες αυτοί διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τα χαρακτηριστικά της δράσης του ρεύματος I<sub>h</sub>.

Εν κατακλείδι μπορεί να ειπωθεί, ότι η διαφορές στη δράση του I<sub>h</sub> στους O/A ενδονευρώνες σε κοιλιακό και ραχιαίο ιππόκαμπο, σε συνδυασμό με την ετερογένεια της δράσης των οπιοειδών στους O/A ενδονευρώνες, παρουσιάζουν ακόμη μία πτυχή της διαφοροποίησης των δύο μοιρών του ιπποκάμπου και ένα ακόμη πλαίσιο ερμηνείας για να κατανοηθεί η ήδη γνωστή διαφοροποίηση της δράσης των οπιοειδών σε κοιλιακό και ραχιαίο ιππόκαμπο.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η διερεύνηση των ανατομικών δομών και των λειτουργιών του ιπποκάμπου έχει αναδείξει τη διαφοροποίηση της κοιλιακής και της ραχιαίας μοίρας του. Διαφορές βρέθηκαν σε επίπεδο λειτουργίας πυραμιδικών νευρώνων και νευρωνικών κυκλωμάτων, καθώς και σε επίπεδο δράσης νευροδιαβιβαστών και νευρορρυθμιστών, μεταξύ των οποίων τα οπιοειδή. Σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν η διερεύνηση του ρόλου του ρεύματος  $I_h$  των ενδονευρώνων της CA1 περιοχής στη διαφοροποίηση του κοιλιακού και ραχιαίου ιπποκάμπου και της δράσης των οπιοειδών στο ρεύμα αυτό σε συνθήκες καθήλωσης ρεύματος.

Διενεργήθηκαν ενδοκυττάριας *in vitro* καταγραφές με αιχμηρό ηλεκτρόδιο από ενδονευρώνες του ορίου σκάφης/στιβάδας πολυμόρφων κυττάρων και από πυραμιδικούς νευρώνες της CA1 περιοχής. Οι ενδονευρώνες αναγνωρίστηκαν με ηλεκτροφυσιολογικά κριτήρια. Οι παθητικές μεμβρανικές ιδιότητες δε διέφεραν στους ενδονευρώνες του κοιλιακού και του ραχιαίου ιπποκάμπου. Η εφαρμογή παρατεταμένου υπερπολωτικού παλμού ηλεκτρικού ρεύματος στους ενδονευρώνες των δύο μοιρών του ιπποκάμπου ανέδειξε διαφορές ανάμεσα στους ενδονευρώνες του κοιλιακού και του ραχιαίου ιπποκάμπου. Οι ενδονευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου επέδειξαν μεγαλύτερη υπερπόλωση για υπερπολωτικό ρεύμα ίσης έντασης σε σχέση με τους ενδονευρώνες του ραχιαίου ιπποκάμπου, διαφορετική κινητική του ρεύματος  $I_h$  και διαφορετικά χαρακτηριστικά εκπόλωσης αναπήδησης. Η μορφίνη (30  $\mu\text{M}$ ) μείωσε σημαντικά το  $I_h$ , υπερπόλωσε το δυναμικό ηρεμίας και μετέβαλε τα χαρακτηριστικά της εκπόλωσης αναπήδησης στους περισσότερους ενδονευρώνες. Σε έναν ενδονευρώνα παρατηρήθηκε εκπόλωση του δυναμικού ηρεμίας και ενίσχυση του  $I_h$ . Η μορφίνη μείωσε, επίσης, τη συχνότητα των αυθόρμητων δυναμικών ενεργείας στο δυναμικό ηρεμίας και τον αριθμό δυναμικών ενεργείας κατά την εφαρμογή παρατεταμένου εκπολωτικού παλμού.

Τα ευρήματα υποστηρίζουν την υπόθεση ότι οι ενδονευρώνες της κοιλιακής και της ραχιαίας μοίρας του ιπποκάμπου παρουσιάζουν ενδογενείς διαφορές. Επιπλέον, υπογραμμίζουν τη δυνατότητα των οπιοειδών να διαδραματίζουν ρυθμιστικό ρόλο στα κυκλώματα του ιπποκάμπου και να επηρεάζουν τη διεγερσιμότητα των ενδονευρώνων του κοιλιακού και του ραχιαίου ιπποκάμπου.

## ABSTRACT

The extended research in the structural and functional features of the hippocampus has revealed the differentiation of the dorsal and the ventral hippocampus in terms of electrophysiological characteristics of the principal neurons, anatomical characteristics of the network and differential role of the neurotransmitters and neuromodulators, including the opioids. Aim of the present study was to investigate the role of the I<sub>h</sub> current of the CA1 interneurons in the functional differentiation of the dorsal and the ventral hippocampus and to examine the effect of morphine on this current under current clamp conditions.

Intracellular recordings were obtained *in vitro* from CA1 interneurons of the oriens/alveus border and pyramidal neurons. The interneurons were recognized as such according to electrophysiological criteria. The passive membrane properties of the interneurons of the dorsal and the ventral hippocampus were similar. The response of the interneurons to a sustained hyperpolarizing electrical pulse was different in the dorsal and the ventral hippocampus. The interneurons of the ventral hippocampus showed a stronger hyperpolarization in response to a current pulse of given intensity compared to the interneurons of the dorsal hippocampus, the kinetics of the I<sub>h</sub> current seemed to be different and the characteristics of the rebound depolarization were distinct between the two populations. Morphine (30 μM) reduced the activation of the I<sub>h</sub> current, hyperpolarized the interneurons and changed the characteristics of the rebound depolarization. In one interneuron the drug caused a depolarization of the resting membrane potential and an augmentation of the I<sub>h</sub> current. Moreover, morphine decreased the frequency of the spontaneous action potentials at resting membrane potential of the interneurons and the number of the action potentials elicited by a sustained depolarizing pulse.

These findings substantiate the hypothesis that the interneurons of the dorsal and the ventral hippocampus may be intrinsically different. Furthermore, they confirm the complexity of the modulatory role of the opioids in the network of the hippocampus and extend the already existing evidence that opioids can reduce the excitability of the interneurons of the dorsal and the ventral hippocampus.

**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Aizenman C. D., Linden D. J., Regulation of the rebound depolarization and spontaneous firing patterns of deep nuclear neurons in slices of rat cerebellum. *Journal of Physiology*, 1999; 82: 1697-1709.
2. Akil H, Owens C., Gutstein H., Taylor L., Curran E., Watson S., Endogenous opioids: overview and current issues. *Drug and Alcohol Dependence*, 1998; 51: 127-140.
3. Alvarez V. A., Arttamangkul S., Dang V., Salem A., Whistler J. L., von Zastrow M., Grandy D. K., Williams J. T.,  $\mu$ -opioid receptors: ligand-dependent activation of potassium conductance, desensitization and internalization. *The Journal of Neuroscience*, 2002; 22(13): 5769-5776.
4. Aponte Y., Lien C.-C., Reisinger E., Jonas P., Hyperpolarization-activated cation channels in fast-spiking interneurons of rat hippocampus. *Journal of Physiology*, 2006; 574 (1): 229-243.
5. Barchas J. D., Evans C., Elliott G., Berger P., Peptide neuroregulators: the opioid system as a model. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 1985; 58: 579-596.
6. Bettler B., Kaupmann K., Mosbacher J., Gassmann M., Molecular structure and physiological functions of GABA<sub>B</sub> receptors. *Physiological Reviews*, 2004; 84: 835-867.
7. Blasco-Ibáñez, Martínez-Guijarro F. J., Freund T. F. Enkephalin-containing interneurons are specialized to innervate other interneurons in the hippocampal CA1 region of the rat and guinea-pig. *European Journal of Neuroscience*, 1998; 10: 1784-1795.
8. Brownstein M. J., A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *PNAS*, 1993, 90: 5391-5393.
9. Buhl E. H., Szilagyí T., Halasy K., Somogyi P., Physiological properties of anatomically identified basket and bistratified cells in the CA1 area of the rat hippocampus in vitro. *Hippocampus*, 1996; 6: 294-305.
10. Capogna M., Gähwiler B. H., Thompson S. M., Mechanism of  $\mu$ -opioid receptor-mediated presynaptic inhibition in the rat hippocampus. *Journal of Physiology*, 1993; 470: 539-558.
11. Cobb S. R., Buhl E. H., Halasy K., Paulsen O., Somogyi P., Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature*, 1995; 378: 75-78.

12. Commons K. G., Milner T. A. Localization of delta opioid receptor immunoreactivity in interneurons and pyramidal cells in the rat hippocampus. *The Journal of Comparative Neurology*, 1997; 381 373-387.
13. Derrick B. E., Weinberger S. B., Martinez Jr. J. L. Opioid receptors are involved in an NMDA receptor-independent mechanism of LTP induction at hippocampal mossy fiber-CA3 synapses. *Brain Research Bulletin*, 1991; 27 (2): 219-223.
14. Dingledine R., Possible mechanisms of enkephalin actions on hippocampal CA1 pyramidal neurons. *The Journal of Neuroscience*, 1981; 9: 1022-1035.
15. Drake C., Bausch S. B., Milner T., Chavkin C., GIRK1 Immunoreactivity is present predominantly in dendrites, dendritic spines and somata in the CA1 region of the hippocampus. *PNAS*, 1997; 94: 1007-1012.
16. Engbers J. D. T. Anderson D., Tadayonnejad R., Mehaffey H., Molineux M. L. Turner R. W., Distinct roles for  $I_T$  and  $I_H$  in controlling the frequency and timing of rebound spike responses. *Journal of Physiology*, 2011; 589 (22): 5391-5413.
17. Fancelow M., Dong H.-W., Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*, 2010; 65 (1): 7-19.
18. Fraser D. D., MacVicar B. A., Low-threshold transient calcium current in rat hippocampal lacunosum-moleculare interneurons: kinetics and modulation by neurotransmitters. *The Journal of Neuroscience*, 1991; 11 (9): 2812-2820.
19. Freund T. F., Buszáki G., Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 1996; 6: 347-370.
20. Freund T. F., Gulyás A. I., Inhibitory control of GABAergic interneurons in the hippocampus. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 1997; 75: 479-487.
21. Füzezi M., Rácz B., Eliás B., Halasy K. Enkephalinergic nerve terminals target inhibitory interneurons in the rat hippocampus. *NeuroReport*, 1997; 8: 2471-2475
22. Gasparini S., DiFrancesco D., Action of the hyperpolarization-activated current ( $I_h$ ) blocker ZD 7288 in hippocampal CA1 neurons. *European Journal of Physiology*, 1997; 435: 99-106.
23. Gasparini S., DiFrancesco D., Action of serotonin on the hyperpolarization-activated cation current ( $I_h$ ) in rat CA1 hippocampal neurons. *European Journal of Neuroscience*, 2011; 11: 3093-3100.



24. Goldstein A., Lowney L.I., Pal B. K., Stereospecific and nonspecific interactions of the morphine congener levorphanol in subcellular fractions of mouse brain. *PNAS*, 1971; 68: 1742-1747.
25. Grudt T.J., Williams J.T. Opioid Receptors and the Regulation of Ion Conductances. *Reviews in the Neurosciences*, 1995; 6: 279-286.
26. Gulyás A. I., Hájos N., Freund T. F., Interneurons containing calretinin are specialized to control other interneurons in the rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 1996; 16 (10): 3397-3411.
27. Halasy K., Rász B., Maderspach K., Kappa opioid receptors are expressed by interneurons in the CA1 area of the rat hippocampus: a correlated light and electron microscopic immunochemical study. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 2000; 19: 233-241.
28. Hibino H, Inanobe A., Furutani K., Murakami S., Findlay I., Kurachi Y., Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiological Reviews*, 2010; 1: 291-366.
29. Jonas P., Bischofberger J., Fricker D., Miles R. Fast in, fast out – temporal and spatial signal processing in hippocampal interneurons. *TRENDS in Neurosciences*, 2004; 27 (1): 30-40.
30. Kahle W., Taschenatlas der Anatomie, Band 3: Nervensystem und Sinnesorgane. 8. korrigierte Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart- New York, 2002.
31. Klausberger T., Magill P. J., Márton L. F., Roberts J. D. B., Cobden P. M., Buzsáki G., Somogyi P., Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons *in vivo*. *Nature* 2003; 421: 844-848.
32. Lacaille J.-C., Müller A. L., Kunkel D. D., Schwartzkroin P. A. Local circuit interactions between oriens/alveus interneurons and CA1 pyramidal cells in hippocampal slices: electrophysiology and morphology. *The Journal of Neuroscience*, 1987, 7 (7): 1979-1993.
33. Lacaille J.-C., Williams S. Membrane properties of interneurons in stratum oriens-alveus of the CA1 region of rat hippocampus *in vitro*. *Neuroscience*, 1990; 36 (2): 349-359
34. Lambert N. A., Wilson W. A., High-threshold Ca<sup>2+</sup> currents in rat hippocampal interneurons and their selective inhibition by activation of GABA<sub>B</sub> receptors. *Journal of Physiology*, 1996; 492 (1): 115-127.

35. Lee P. H. K., Obie J., Hong J.-S. Opioids induce convulsions and wet dog shakes in rats: Mediation by hippocampal mu, but not delta or kappa opioid receptors. *The Journal of Neuroscience*, 1989; 9 (2): 692-697.
36. Lupica C. R.,  $\delta$  and  $\mu$  enkephalins inhibit spontaneous GABA-mediated IPSCs via a cyclic AMP-independent mechanism in the rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 1995; 15(1): 737-749.
37. Lupica C. R., Bell J. A., Hoffman A. F., Watson P., Contribution of the hyperpolarization-activated current (I<sub>h</sub>) to membrane potential and GABA release in hippocampal interneurons. *Journal of Neurophysiology*, 2001; 86: 261-268.
38. Maccaferri G., Properties of the hyperpolarization-activated current in rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *Journal of Neurophysiology*, 1993; 69:(6) 2129-2136.
39. Maccaferri G., McBain C. J., The hyperpolarization-activated current (I<sub>h</sub>) and its contribution to pacemaker activity in rat CA1 hippocampal stratum oriens-alveus interneurons. *Journal of Physiology*, 1996; 497: 119-130.
40. Madamba S., Schweitzer P., Siggins G. R. Dynorphin selectively augments the M-current in hippocampal CA1 neurons by an opiate receptor mechanism. *Journal of Neurophysiology*, 1999; 82: 1768-1775.
41. Madison D.V., Nicoll R.A., Enkephalin hyperpolarizes interneurons in the rat hippocampus, *Journal of Physiology*, 1988; 398: 123-130.
42. Maggio N., Segal M., Differential modulation of long-term depression by acute stress in the rat dorsal and ventral hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 2009; 29 (27): 8633-8638.
43. Mansour A., Hoversten M. T., Taylor L. P., Watson S. J., Akil H. The cloned  $\mu$ ,  $\delta$  and  $\kappa$  receptors and their endogenous ligands: Evidence for two opioid peptide recognition cores. *Brain Research*, 1995; 700: 89-98.
44. Mansour A., Fox C. A., Akil H., Watson S. J. Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *TRENDS in Neurosciences*, 1995; 18: 22-29.
45. Margolis E. B., Hjelmstad G. O., Bonci A., Fields H. L.,  $\kappa$ -opioid agonists directly inhibit midbrain dopaminergic neurons. *The Journal of Neuroscience*, 2003; 23 (31): 9981-9986.

46. Mark M. D., Herlitze S., G-protein mediated gating of inward-rectifier K<sup>+</sup> channels. *European Journal of Biochemistry*, 2000; 267: 5830-5836.
47. McBain C. J., DiChiara T. J., Kauer J. A., Activation of metabotropic glutamate receptors differentially affects two classes of hippocampal interneurons and potentiates excitatory synaptic transmission. *The Journal of Neuroscience*, 1994; 14 (7): 4433-4445.
48. McQuiston A. R., Effects of  $\mu$ -opioid receptor modulation on GABA<sub>B</sub> receptor synaptic function in hippocampal CA1. *Journal of Neurophysiology*, 2007; 97: 2301-2311.
49. McQuiston A. R., Layer selective presynaptic modulation of excitatory inputs to hippocampal CA1 by  $\mu$ -opioid receptor activation. *Neuroscience*, 2008; 151 (1): 209-221.
50. McQuiston A. R. Mu Opioid receptor activation normalizes temporo-ammonic pathway driven inhibition in hippocampal CA1. *Neuropharmacology*, 2011; 60 (2-3): 472-479.
51. McQuiston A. R., Saggau P., Mu-opioid receptors facilitate the propagation of excitatory activity in rat hippocampal area CA1 by disinhibition of all anatomical layers. *Journal of Neurophysiology*, 2003; 90:1936-1948.
52. Molineux M. L., McRory J. E., McKay B. E., Hamid J., Mehaffey W. H., Rehak R., Snutsch T. P. Zamponi G. W., Turner R. W., Specific T-type calcium channel isoforms are associated with distinct burst phenotypes in deep cerebellar nuclear neurons. *PNAS*, 2006; 103 (14): 5555-5560.
53. Morgan M. M., Clayton C. C. Defensive behaviors evoked from the ventrolateral periaqueductal gray of the rat: comparison of the opioid and GABA disinhibition. *Behavioral Brain Research*, 2005; 164 (1): 61-66.
54. Morin F., Beaulieu C. Lacaille J. C. Membrane properties and synaptic currents evoked in CA1 interneuron subtypes in rat hippocampal slices. *Journal of Neurophysiology*, 1996; 76:1-16.
55. Moser M.-B., Moser E. I. Functional Differentiation in the Hippocampus. *Hippocampus*, 1998; 8:608-619.
56. Nomura T., Fukuda T., Aika Y., Heiyman C. W., Emson P. C., Kobayashi T., Kosaka T., Distribution of nonprincipal neurons in the rat hippocampus, with special reference to their dorsoventral difference. *Brain Research*, 1997; 751 (1): 64-80.

57. Notomi T, Shigemoto R. Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1-4, in the rat brain. *Journal of Comparative Neurology*, 2004; 471(3):241-76.
58. Pan Z. Z.,  $\kappa$ -opioid receptor-mediated enhancement of the hyperpolarization-activated current (Ih) through mobilization of intracellular calcium in rat nucleus raphe magnus. *Journal of Physiology*, 2003; 548 (3): 765-775.
59. Papatheodoropoulos C., Asproдини E., Nikita I., Koutsona C., Kostopoulos G., Weaker synaptic inhibition in CA1 region of ventral compared to dorsal hippocampal slices. *Brain Research*, 2002; 948: 117-121.
60. Pape H.-C. QUEER CURRENT AND PACEMAKER: The Hyperpolarization-Activated Cation Current in Neurons. *Annual Reviews in Physiology*, 1996; 58: 299-327.
61. Shepherd G. M. The synaptic organization of the brain. Oxford University Press, 2004.
62. Sik A., Penttonen M., Ylinen A., Buzsáki G. Hippocampal CA1 interneurons: an in vivo intracellular study. *The Journal of Neuroscience*, 1995; 15 (10): 6651-6665.
63. Surges .R, Sarvari M., Steffens M., Els T. Characterization of rebound depolarization in hippocampal neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006; 348: 1343-1349.
64. Svoboda K. R., Adams C. E., Lupica C. R., Opioid receptor subtype expression defines morphologically distinct classes of hippocampal interneurons. *The Journal of Neuroscience*, 1999; 19 (1): 85-95.
65. Svoboda K. R., Lupica C. R., Opioid inhibition of hippocampal interneurons via modulation of potassium and hyperpolarization-activated cation (Ih) currents. *The Journal of Neuroscience*, 1998; 18 (18): 7084-7098.
66. Takigawa T., Alzheimer C., Interplay between activation of GIRK current and deactivation of Ih modifies temporal integration of excitatory input in CA1 pyramidal cells. *Journal of Neurophysiology*, 2003; 89: 2238-2244.
67. Tempel A., Zukin R. S., Neuroanatomical patterns of the  $\mu$ ,  $\delta$ , and  $\kappa$  opioid receptors of rat brain as determined by quantitative in vitro autoradiography. *PNAS*, 1987; 84: 4308-4312.
68. Wagner J. J., Etemad L. R., Thompson A. M. Opioid-mediated facilitation of long term depression in rat hippocampus. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2001; 296: 776-881.

69. Wagner J. J., Terman G. W., Chavkin C. Endogenous dynorphins inhibit excitatory neurotransmission and block LTP induction in the hippocampus. *Nature*, 1993; 363 (6428): 451-454.
70. Williams J. T., MacDonald J. C., Manzoni O., Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiological Reviews*, 2001; 81 (1): 299-343.
71. Zhang L., McBain C. J., Potassium conductances underlying repolarization and afterhyperpolarization in rat CA1 hippocampal interneurons. *Journal of Physiology*, 1995; 488 (3): 661-672.

#### Επιπρόσθετη βιβλιογραφία:

- Dougherty KA, Islam T, Johnston D. Intrinsic excitability of CA1 pyramidal neurones from the rat dorsal and ventral hippocampus. *J Physiol*, 2012; 590: 5707-5722.
- Dougherty KA, Nicholson DA, Diaz L, Buss EW, Neuman KM, Chetkovich DM, Johnston D. Differential expression of HCN subunits alters voltage-dependent gating of *h*-channels in CA1 pyramidal neurons from dorsal and ventral hippocampus. *Journal of Neurophysiology*, 2013; 109: 1940-1953.
- Maccaferri G. Straum oriens horizontal interneurone diversity and hippocampal network dynamics. *J Physiol*, 2005; 73-80.
- Marcelin B, *et al.* Differential dorso-ventral distributions of Kv4. 2 and HCN proteins confer distinct integrative properties to hippocampal CA1 pyramidal cell distal dendrites. *Journal of Biological Chemistry*, 2012; 17656-17661.
- Piskorowski RA, Chevaleyre V. Delta-Opioid Receptors Mediate Unique Plasticity onto Parvalbumin-Expressing Interneurons in Area CA2 of the Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 2013; 33 (36):14567-14578.
- Zemankovics R, Káli S, Paulsen O, Freund TF, Hájos N. Differences in subthreshold resonance of hippocampal pyramidal cells and interneurons: the role of h-current and passive membrane characteristics. *J Physiol*, 2010; 588: 2109-2132.