

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
Διευθυντής: Καθηγητής Ν. Σακελλαρίδης



ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΔΙΕΓΕΡΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΝΕΥΡΩΝΩΝ ΤΟΥ
ΡΑΧΙΑΙΟΥ ΚΑΙ ΚΟΙΛΙΑΚΟΥ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΥ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ
ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΘΕΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΚΑ

ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ ΚΟΥΒΑΡΑΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2006

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1	Δομή και στοιβάδες του ιπποκάμπου	4
1.1.1	Ενδονευρώνες του ιπποκάμπου	7
1.1.2	Συνδεσμολογία - τοπικό κύκλωμα.....	8
1.1.3	Προσαγωγές και απαγωγές συνδέσεις του ιπποκάμπου.....	9
1.2	Λειτουργίες του ιπποκάμπου	11
1.3	Ασθένειες σχετιζόμενες με τον ιπποκάμπο	14
1.4	Διαφοροποίηση ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου	17
1.5	Νευρωνική διεγερσιμότητα	22
1.6	Χρώση πυραμιδικών νευρώνων	30
1.7	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	32

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

2.1.1	Πειραματόζωα	33
2.1.2	Προετοιμασία των τομών του εγκεφάλου	33
2.1.3	Θάλαμος καταγραφής	34
2.1.4	Ενδοκυττάρειες καταγραφές	34
2.1.5	Νευροφαρμακολογία in vitro	36
2.1.6	Στατιστική μελέτη	36
2.1.7	Ιστολογία	36
2.1.8	Πρωτόκολλο χρώσης τομών	37

2.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.2.1	Βασικές μεμβρανικές ιδιότητες	41
2.2.2	Αγωγιμότητα I_h	42
2.2.3	Δυναμικό ενέργειας	46
2.2.4	Επαναλαμβανόμενες εκφορτίσεις	50
2.2.5	Μετα-υπερπολωτικά δυναμικά	54

	3
2.2.6	Μετα-εκπολωτικό δυναμικό 59
2.2.7	Συναπτικά δυναμικά 62
2.2.8	Ψηφιακή φωτογράφιση 68
2.3	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ
2.3.1	Παθητικές μεμβρανικές ιδιότητες 72
2.3.2	Επαναλαμβανόμενες εκφορτίσεις 73
2.3.3	Μετα-υπερπολωτικά δυναμικά 75
2.3.4	Μετασυναπτικά διεγερτικά δυναμικά 77
2.3.5	Λειτουργική σημασία των αποτελεσμάτων 78
2.4	ΠΕΡΙΛΗΨΗ 80
2.5	ABSTRACT 81
2.6	BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 82

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

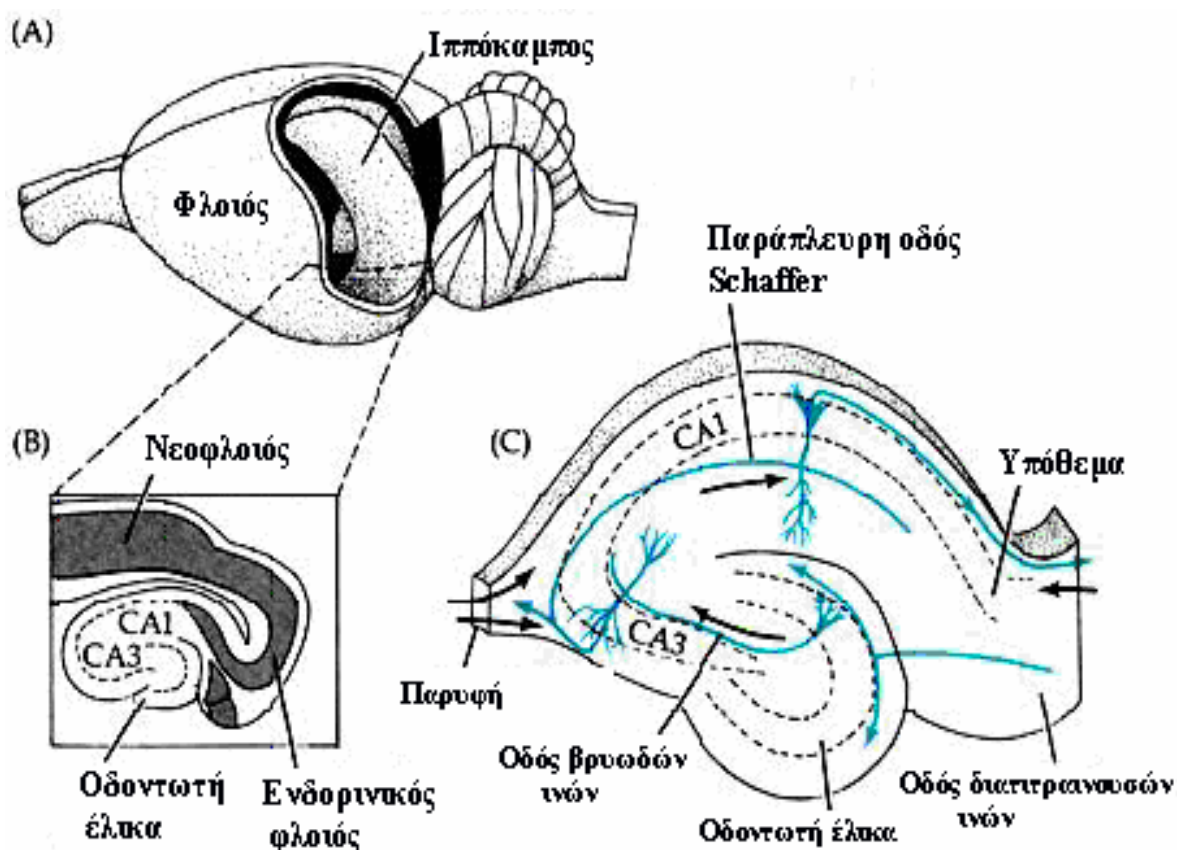
Ο ιππόκαμπος σχηματισμός είναι δομή του πρόσθιου εγκεφάλου και αποτελεί τμήμα του στεφανιαίου συστήματος. Η διακριτή και εύκολα αναγνωρίσιμη μακροσκοπικά μορφή του σε συνδυασμό με την εξαιρετικά οργανωμένη στοιβαδωτή του δομή, σε ιστολογικό επίπεδο, αποτέλεσε σημαντικό παράγοντα που προσέλκυσε το ερευνητικό ενδιαφέρον. (Shepherd, 1998). Από τη δεκαετία του 1950 και μετά, με αφορμή δημοσίευση αναφορικά με το περιστατικό του ασθενούς H.M, ο οποίος υποβλήθηκε σε εγχείρηση αφαίρεσης του ιπποκάμπεου σχηματισμού και των περιβαλλόντων ιστών (Scoville and Milner, 1957), αναγνωρίστηκε ο σημαντικός του ρόλος σε κάποιες μορφές μνήμης και μάθησης. Επιπλέον, θεωρείται σημαντική η συμμετοχή του ιπποκάμπεου σε παθολογικές καταστάσεις όπως στην πρόκληση επιληπτικών κρίσεων, στην εμφάνιση σχιζοφρένειας και της νόσου του Parkinson. Με βάση τα παραπάνω η μελέτη των νευρώνων του ιπποκάμπεου κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική.

1.1 Δομή και στοιβάδες του ιπποκάμπεου

Η τρισδιάστατη απεικόνιση της θέσης του ιπποκάμπεου σχηματισμού παρουσιάζεται στην εικόνα 1. Στον επίμυ ο ιπποκάμπεος σχηματισμός καταλαμβάνει ένα μεγάλο μέρος του πρόσθιου εγκεφάλου. Συγκεκριμένα, ο ιπποκάμπεος σχηματισμός αποτελεί τμήμα του έσω τοιχώματος του εγκεφάλου και εμφανίζεται ως μία επιμηκυσμένη δομή η οποία ομοιάζει με το σχήμα του γράμματος C και εκτείνεται οπισθίως του διαφράγματος και αφού κυρτωθεί καταλήγει στον κροταφικό λοβό. Για το λόγο αυτό διακρίνεται σε ραχιαίο και κοιλιακό ή οπίσθιο και πρόσθιο αντίστοιχα, όσον αφορά τον άνθρωπο.

Όσον αφορά την εσωτερική δομή του ιπποκάμπεου σχηματισμού αυτή διαφοροποιείται σε τρία μορφώματα: την οδοντωτή έλικα (Dentate Gyrus), το Αμμώνιο κέρασ (Cornu Ammonis) ή κυρίως ιππόκαμπεο, που διακρίνεται στις περιοχές CA1 και CA3, και το υπόθεμα (Subiculum). Η οδοντωτή έλικα αποτελείται από τρεις στοιβάδες : την κοκκιώδη στοιβάδα που περιέχει τα κύρια κύτταρα της οδοντωτής έλικας με σφαιρικό σώμα, την μοριώδη στοιβάδα όπου εκτείνονται οι δενδρίτες των κοκκιωδών κυττάρων και την πολυμορφική

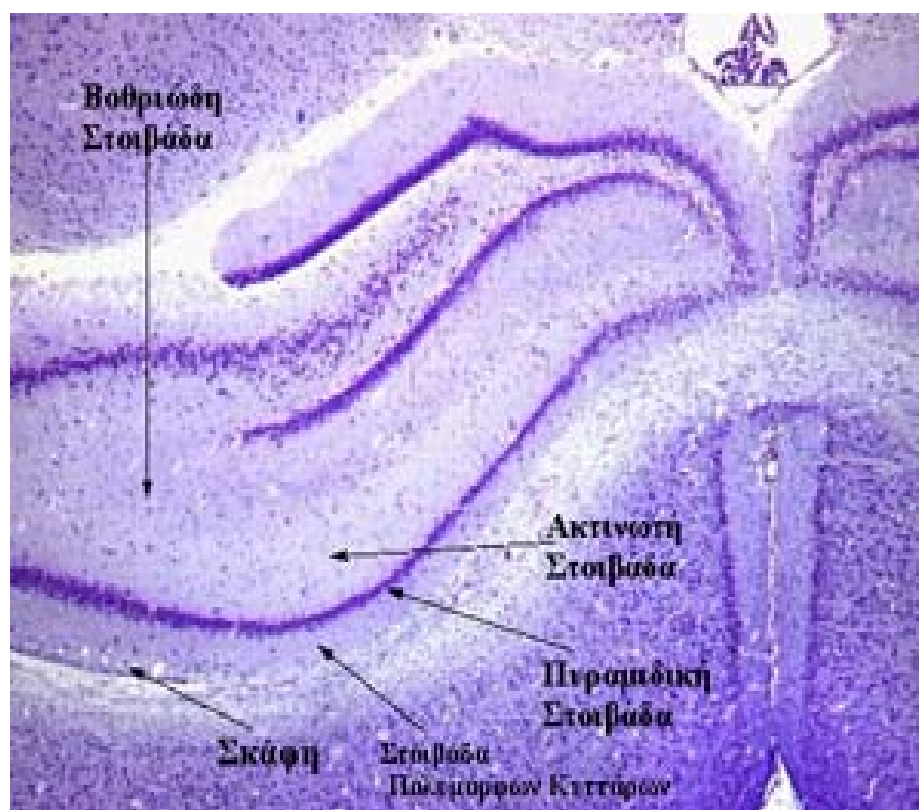
στοιβάδα που περιέχει κύτταρα διάφορης μορφολογίας που συνάπτονται μόνο τοπικά. Το Αμμώνιο κέρασ διακρίνεται στις εξής στοιβάδες: α) την σκάφη μία μικρού εύρους στοιβάδα που διατρέχεται από εισερχόμενες και κυρίως εξερχόμενες αξονικές ίνες οι οποίες σχηματίζουν αρχικά την παρυφή και εν συνεχεία την ψαλίδα, β) την στοιβάδα των πολυμόρφων κυττάρων στην οποία βρίσκονται οι βασικοί δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων του ιπποκάμπου γ) τη πυραμιδική στοιβάδα, που περιλαμβάνει τα κυτταρικά σώματα των πυραμιδοειδών νευρώνων, των κυρίως νευρώνων του Αμμώνιου κέρατος, δ) την ακτινωτή και ε) την βοθριώδη-μοριακή στοιβάδα, οι οποίες περικλείουν τμήματα κορυφαίων δενδριτών των πυραμιδοειδών κυττάρων (τους εγγύς και τους άπω κορυφαίους δενδρίτες, αντίστοιχα) εικόνα 2.



Εικόνα 1: Α) Απεικόνιση του εγκεφάλου αρουραίου όπου παρουσιάζεται η θέση του ιπποκάμπου στη δομή. Β) Εγκάρσια τομή όπου απεικονίζεται ο ιππόκαμπος και οι περιβάλλουσες περιοχές. Γ) Σχεδιάγραμμα εγκάρσιας τομής του ιπποκάμπου με το τρισυναπτικό κύκλωμα

Η πυραμιδική στοιβάδα διακρίνεται επιμέρους σε τρεις υποπεριοχές από τα όρια της οδοντωτής έλικας ως το υπόθεμα : τις CA3, CA2, και CA1 κατά σειρά. Οι περιοχές αυτές περιέχουν πυραμιδικά κύτταρα που εμφανίζουν διαφορετική ηλεκτροφυσιολογική συμπεριφορά. Για παράδειγμα τα κύτταρα της CA3 μετά από διέγερση απαντούν μόνο με ριπές δυναμικών ενέργειας (Wong and Prince, 1978) ενώ τα κύτταρα της CA1 και με επαναλαμβανόμενες εκφορτίσεις (Schwartzkroin, 1975).

Αξίζει να αναφερθεί ότι στον ιπποκάμπειο σχηματισμό θεωρείται ότι ανήκουν και άμεσα γειτονικές δομές όπως ο ενδορινικός φλοιός, το προ-υπόθεμα και το παρά-υπόθεμα.

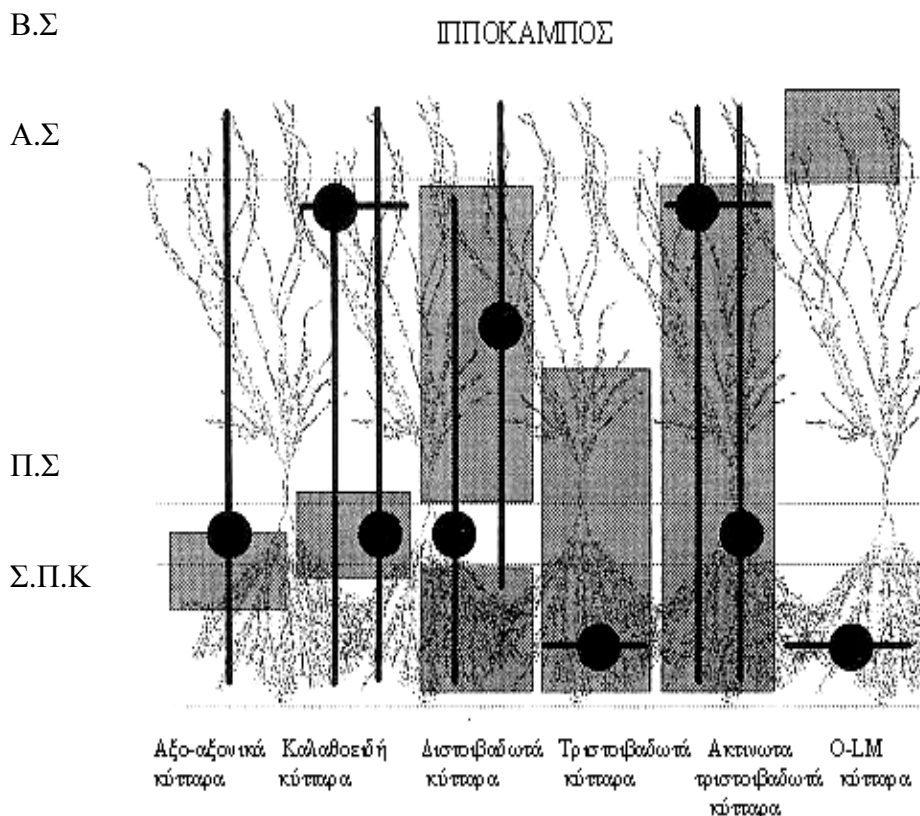


Εικόνα 2: Στοιβαδωτή δομή εγκάρσιας τομής του ιπποκάμπειου σχηματισμού εμποτισμένη με τη χρώση Nissl. Λόγω της συγκεκριμένης μεθόδου χρώσεως διακρίνεται η πυραμιδική στοιβάδα που περιέχει τα κυτταρικά σώματα των νευρώνων του ιπποκάμπου ([Http://www.synapses.meg.edu/anatomy](http://www.synapses.meg.edu/anatomy)).

1.1.1 Ενδονευρώνες του ιπποκάμπου

Οι ενδονευρώνες είναι νευρικά κύτταρα με που συνθέτουν και απελευθερώνουν γ-αμινοβουτυρικό οξύ ως νευροδιαβιβαστή προκαλώντας υπερπόλωση της μετασυναπτικής μεμβράνης. Το αξονικό τους δίκτυο περιορίζεται τοπικά και η δενδριτική τους κατασκευή στερείται ακανθών. Ωστόσο, με τη χρησιμοποίηση νέων μεθόδων ηλεκτροφυσιολογικής καταγραφής σήμανσης και χρώσης ανιχνεύθηκαν ενδονευρώνες που δε φέρουν τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά (Buckmaster and Soltesz, 1996). Εντούτοις, οι ενδονευρώνες του ιπποκάμπου, με ελάχιστες εξαιρέσεις, εμφανίζουν τα κλασικά χαρακτηριστικά των ενδονευρώνων (Freund and Buzsaki, 1996).

Οι κυριότεροι ενδονευρώνες της οδοντωτής έλικας διακρίνονται σε δύο κατηγορίες : α) τα καλαθοφόρα κύτταρα των οποίων τα κυτταρικά σώματα εντοπίζονται στο όριο μεταξύ της κοκκιώδους και πολυμορφικής στοιβάδας και νευρώνουν τα κοκκιώδη κύτταρα, β) τα αξο-αξονικά κύτταρα που εντοπίζονται στη πολυμορφική στοιβάδα και νευρώνουν τη ζώνη εκκίνησης των αξόνων κοκκιωδών κυττάρων. Όσον αφορά το Αμμώνιο κέρας διακρίνονται έξι κατηγορίες ενδονευρώνων οι κυριότερες των οποίων είναι οι εξής τρεις: α) καλαθοειδή κύτταρα που εντοπίζονται στην πυραμιδική στοιβάδα και σχηματίζουν πολλαπλές συνάψεις στα σώματα των πυραμιδικών κυττάρων, β) αξο-αξονικά κύτταρα στα όρια της πυραμιδικής στοιβάδας που νευρώνουν τη ζώνη εκκίνησης των αξόνων πυραμιδικών κυττάρων, γ) διστοιβαδωτά κύτταρα τα οποία συνάπτονται τόσο σε κορυφαίους όσο και σε βασικούς δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων. Οι δενδρίτες των ενδονευρώνων και των τριών κατηγοριών διακλαδίζονται τόσο στην ακτινωτή όσο και στην στοιβάδα των πολύμορφων κυττάρων (Freund and Buzsaki, 1996) Εικόνα 3.



Εικόνα 3: Τοπογραφική κατανομή των ενδονευρώνων του ιπποκάμπου. Β.Σ : Βοθριώδη Στοιβάδα, Α.Σ : Ακτινωτή Στοιβάδα, Π.Σ: Πυραμιδική Στοιβάδα, Σ.Π.Κ: Στοιβάδα Πολυμόρφων Κυττάρων.

1.1.2 Συνδεσμολογία - τοπικό κύκλωμα

Η συνδεσμολογία του τοπικού δικτύου του ιπποκάμπειου σχηματισμού, που έχει επικρατήσει να αναφέρεται ως τρισυναπτικό κύκλωμα, είναι γνωστή, σε γενικές γραμμές, από την εποχή του Ramon y Cajal (1911) και απεικονίζεται στο σχήμα 1. Συγκεκριμένα, νευρώνες της στοιβάδας II του ενδορινικού φλοιού χορηγούν άξονες που σχηματίζουν την οδό των διατιτραίνουσών ιών, η οποία διατρέχει το υπόθεμα και τερματίζει τόσο σε νευρώνες της οδοντωτής έλικας όσο και σε νευρώνες της περιοχής CA3. Επιπλέον, από τα κύτταρα της οδοντωτής έλικας άγονται άξονες που σχηματίζουν την οδό των βρωδών ιών και νευρώνουν κύτταρα της CA3 περιοχής. Τα κύτταρα της CA3 περιοχής χορηγούν τους άξονες της οδού Schaffer που καταλήγουν να νευρώνουν τα πυραμιδοειδή κύτταρα της CA1 περιοχής. Τέλος τα κύτταρα της CA1 νευρώνουν κύτταρα του

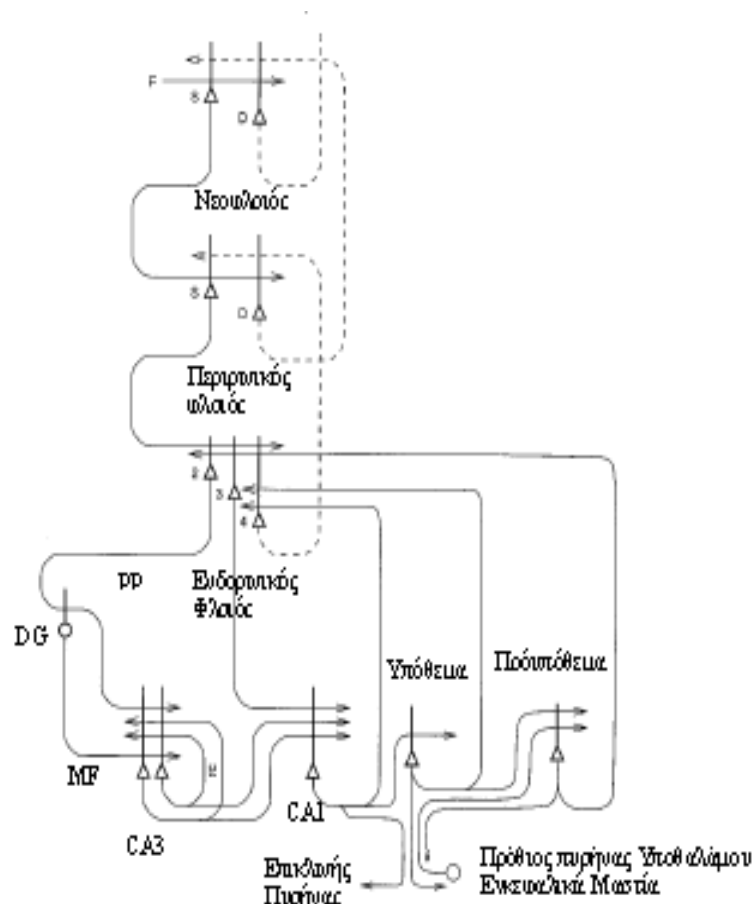
υποθέματος και των εν τω βάθει στοιβάδων του ενδορινικού φλοιού. Το κύκλωμα ολοκληρώνεται με τη σύνδεση των κυττάρων των εν τω βάθει στοιβάδων του ενδορινικού φλοιού με τις επιφανειακές στοιβάδες. Πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι από τη στοιβάδα III του ενδορινικού φλοιού εκφύονται άξονες που νευρώνουν απευθείας τα πυραμιδικά κύτταρα της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου. Επιπλέον κύτταρα τόσο της CA1 όσο και της CA3 περιοχής αναπτύσσουν παράπλευρους νευράξονες που καταλήγουν σε νευρώνες της ίδιας περιοχής, αντιστοίχως (Shepherd et al., 1998).

Όσον αφορά την τοπογραφική οργάνωση των αξόνων της οδού Schaffer μετά από μελέτες με τη χρησιμοποίηση ορθόδρομου ιχνηθέτη προέκυψε ότι νευράξονες που εκφύονται από κύτταρα της CA3 περιοχής που βρίσκονται πλησίον της οδοντωτής έλικας καταλήγουν σε νευρώνες της CA1 περιοχής που βρίσκονται ραχιαία σε σχέση με το σημείο έγχυσης του ιχνηθέτη. Αντίθετα, νευράξονες που εκφύονται από κύτταρα της CA3 που βρίσκονται πλησίον της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου καταλήγουν σε νευρώνες της CA1 που βρίσκονται κοιλιακά σε σχέση με το σημείο έγχυσης του ιχνηθέτη (Ishizuka et al., 1990).

1.1.3 Προσαγωγές και απαγωγές συνδέσεις του ιπποκάμπου

Οι προσαγωγές και απαγωγές νευρικές ίνες του ιπποκάμπου διέρχονται είτε διαμέσου του ενδορινικού φλοιού είτε διαμέσου της ψαλίδας. Τμήμα της συνδεσμολογίας του ιπποκάμπου ιδιαίτερα με περιοχές του νεοφλοιού παρουσιάζονται στην εικόνα 4. Οι περισσότερες προσαγωγείνες προέρχονται από τον ενδορινικό φλοιό. Ο τελευταίος δέχεται ίνες από διάφορες περιοχές του φλοιού του εγκεφάλου όπως τον προαπιοειδή φλοιό, το μετωπιαίο φλοιό και την κάτω μοίρα του κροταφικού φλοιού. Ο ενδορινικός φλοιός δέχεται νευρικές ίνες και από υποφλοιώδεις περιοχές όπως τον πρόσθιο πυρήνα του θαλάμου και το αμυγδαλοειδές σώμα. Ίνες που εκφύονται από την έλικα του προσαγωγίου φθάνουν στον ενδορινικό φλοιό μέσω του προσαγωγίου. Στον ιπποκάμπο καταλήγουν και νευρικές ίνες προερχόμενες από την περικοιλιακή και έξω περιοχή του ιπποκάμπου και από τον υπερμάστιο πυρήνα. Επιπλέον, μέσω της ψαλίδας απολήγουν νευρικές ίνες προερχόμενες από τον έσω πυρήνα του διαφράγματος και τον πυρήνα της διαγώνιας ταινίας. Τέλος, μονοαμινεργικές ίνες καταλήγουν στον ιπποκάμπο προερχόμενες από το μεσοσκελιαίο πυρήνα, τον άνω

κεντρικό πυρήνα της ραφής, το ραχιαίο πυρήνα της ραφής, το ραχιαίο πυρήνα της καλύπτρας και τον υπομέλανα τόπο (Nieuwenhuys et al., 1983).



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση συνδέσεων του ιπποκάμπου με φλοιώδης και υποφλοιώδεις περιοχές. Όπου DG η οδοντωτή έλικα, PP η οδός των διατριπαινουσών ινών, MF οι βρυώδεις ίνες.

Όσον αφορά τις απαγωγές ίνες, αυτές απολήγουν στην έξω μοίρα του διαφράγματος, την έσω μοίρα του επικλινούς πυρήνα, τον πρόσθιο οσφρητικό πυρήνα την έσω μοίρα του μετωπιαίου φλοιού, την ευθεία έλικα, το αμυγδαλοειδές σώμα, καθώς και διάφορες περιοχές του φλοιού όπως περιοχές του έσω κροταφικού φλοιού, την οπίσθια μοίρα του έσω μετωπιαίου φλοιού, την οπισθοσπλήνια και οπίσθια περιοχή της έλικας του προσαγωγίου. Επίσης νευρικές ίνες άγονται ετερόπλευρα και καταλήγουν να νευρώνουν τον ιππόκαμπο του αντίθετου ημισφαιρίου.

1.2 Λειτουργίες του ιπποκάμπου

Η πιο γνωστή και ευρέως αποδεκτή λειτουργία του ιπποκάμπου σχετίζεται με τη μνήμη και κατά συνέπεια τη μάθηση. Είναι πλέον γνωστό ότι βλάβη σε περιοχές του ιπποκάμπου σχηματισμού σχετίζονται με την ανάπτυξη αμνησιακού συνδρόμου που χαρακτηρίζεται από ολική ή σχεδόν ολική πρόδρομη αμνησία, δηλαδή αδυναμία ανάπτυξης μνήμης για γεγονότα που τοποθετούνται χρονικά μετά το συμβάν που προκάλεσε τη βλάβη. Συχνά όμως η πρόδρομη αμνησία συνοδεύεται και από παλίνδρομη αμνησία δηλαδή απώλεια μνήμης για γεγονότα που συνέβησαν πριν την πρόκληση βλάβης. Μάλιστα, μνήμες που αφορούν γεγονότα που χρονικά κατατάσσονται πλησιέστερα με τη στιγμή της βλάβης επηρεάζονται σε μεγαλύτερο βαθμό (Anagnostaras et al., 2001).

Αρχικά η συμμετοχή που αποδόθηκε στον ιππόκαμπο όσον αφορά την δημιουργία γεγονότων μνήμης εντοπίστηκε στη δυνατότητα εδραίωσης της μνήμης. Θεωρήθηκε ότι ο ιππόκαμπος λειτουργεί ως ένας παροδικός χώρος αποθήκευσης της μακρόχρονης μνήμης προτού αυτή αποθηκευτεί μόνιμα σε κάποια άλλη περιοχή του εγκεφαλικού φλοιού. Για παράδειγμα αισθητικές πληροφορίες απαραίτητες για την αναγνώριση κάποιου προσώπου μεταφέρονται στον ιππόκαμπο όπου υφίστανται επεξεργασία για χρονικό διάστημα ημερών ή εβδομάδων και εν συνεχεία μεταφέρονται ενδεχομένως στην περιοχή του οπτικού φλοιού που σχετίζεται με την αναγνώριση προσώπων. Εναλλακτικά θεωρήθηκε ότι η λειτουργία του ιπποκάμπου μπορεί να είναι πιο απλουστευμένη χρησιμεύοντας όχι για την επεξεργασία της μακρόχρονης μνήμης αλλά σαν ένας χώρος προσωρινής αποθήκευσης γενικευμένων πληροφοριών προτού την μεταφορά τους προς αποθήκευση σε κάποιο άλλο τμήμα του εγκεφάλου (Principals of Neural Science, 1992).

Ωστόσο, η συμμετοχή του ιπποκάμπου στη λειτουργία της μνήμης δεν περιορίζεται πλέον μόνο στα ανωτέρω αναφερθέντα στοιχεία. Θεωρείται πλέον ότι ο ιππόκαμπος συμμετέχει και στο σχηματισμό της μνήμης που σχετίζεται με αυτοβιογραφικά γεγονότα. Ως γνωστό η μνήμη διαιρείται σε έκδηλη μνήμη, που μας παρέχει πληροφορίες για το περιβάλλον και τον κόσμο και την άδηλη μνήμη με την οποία αποκτούμε κινητικές ή αντιληπτικές ικανότητες που ωστόσο είναι απρόσιτες στη συνείδηση. Η έκδηλη μνήμη υποδιαιρείται περαιτέρω σε μνήμη που αφορά αυτοβιογραφικά γεγονότα (Episodic) και σε μνήμη που αφορά

τεκμηριωμένη γνώση (Semantic) (Tulving and Markowitsch, 1998). Η μνήμη που αφορά αυτοβιογραφικά γεγονότα είναι το μοναδικό είδος μνήμης που τη στιγμή της ανάκλησης είναι προσανατολισμένη προς το παρελθόν (Eldridge et al., 2000). Αφορά δηλαδή την ανάκληση εμπειριών που σχετίζονται με πρόσωπα, καταστάσεις και γεγονότα του άμεσου ή απώτερου παρελθόντος ενός ατόμου. Κατά συνέπεια αυτού του είδους η μνήμη σχετίζεται άμεσα με την συγκράτηση εμπειριών που έλαβαν μέρος σε συγκεκριμένη χωροχρονική διάσταση. Δεδομένου ότι η μάθηση επιτυγχάνεται με τη συσσώρευση συνακόλουθων συνειρμών που προκύπτουν από πολλαπλές εμπειρίες, που όμως παρέχουν την ίδια βασική πληροφορία, η μνήμη γεγονότων σχετίζεται άμεσα με την μάθηση και απόκτηση γνώσης. Για παράδειγμα μετά από αριθμό δοκιμασιών με σκοπό την εκμάθηση σε πηθικούς της συσχέτισης μεταξύ πρωτοεμφανιζόμενων εικόνων και διαφόρων κινητικών αποκρίσεων βρέθηκε ότι μετά την επίτευξη του στόχου της εκμάθησης νευρώνες του ιπποκάμπου εμφάνιζαν αυξημένη και διαφοροποιημένη δραστηριότητα ανάλογα του διακριτού (discriminative) ερεθίσματος που κάθε φορά εφαρμοζόταν (Cahusac et al., 1993). Βέβαια δεδομένου ότι μέσα από την εμπειρική μνήμη είναι δυνατή η απόσπαση πληροφοριών που δύναται να λειτουργήσουν ως στοιχεία που θα προστεθούν στην μνήμη που αφορά την τεκμηριωμένη γνώση, μπορεί να θεωρηθεί ότι ο ιππόκαμπος μπορεί να συμβάλλει έμμεσα και σε αυτού του είδους τη μνήμη (Eichenbaum, 2003). Ωστόσο, ακόμα και για την εμπειρική μνήμη ισχύει ότι εξελίσσεται μια διαδικασία παγίωσης με αποτέλεσμα μετά από κάποιο χρονικό διάστημα ο ιππόκαμπος να μη θεωρείται απαραίτητος και ακόμα και καταστροφή του ιπποκάμπου να μην επηρεάζει την ανάκληση της (Rempel-Clower et al., 1996).

Όσον αφορά τη λειτουργία του ιπποκάμπου στα ζώα αρχικά επικρατούσε η άποψη ότι σχετιζόταν με την με ένα είδος μνήμης που ονομάστηκε χωρική μνήμη. Συγκεκριμένα με *in vivo* εξωκυττάρειες καταγραφές από νευρώνες της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου αρουραίου βρέθηκε ότι όταν το πειραματόζωο αφηνόταν να κινηθεί ελεύθερα σε ανοιχτό πεδίο, εβρισκόμενο σε συγκεκριμένο σημείο καταγραφόταν διέγερση υψηλής συχνότητας συγκεκριμένων νευρώνων. Όταν το πειραματόζωο άλλαζε θέση στο χώρο τα συγκεκριμένα κύτταρα παρέμεναν ανενεργά, ενώ κάποιοι άλλοι νευρώνες διεγείρονταν αυτή τη φορά (O'Keefe and Dostrovsky, 1971). Παρόμοιες μελέτες οδήγησαν στον χαρακτηρισμό των κυττάρων του ιπποκάμπου ως κύτταρα χώρου. Κατ'επέκταση

η συγκεκριμένη περιοχή του πεδίου όπου υπήρχε ενεργοποίηση κάποιων νευρώνων ονομάστηκε χωρικό πεδίο.

Οπτικά στοιχεία του περιβάλλοντος είναι απαραίτητα για την ενεργοποίηση νευρώνων του ιπποκάμπου. Για παράδειγμα κατά την τοποθέτηση ενός πειραματόζωου σε λαβύρινθο σχήματος σταυρού, στους τοίχους του οποίου υπήρχαν οπτικά στοιχεία (cues), παρατηρήθηκε, ως αναμενόμενα, διέγερση νευρώνων της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου. Συγκεκριμένοι, διαφορετικοί νευρώνες διεγείρονταν κάθε φορά που το πειραματόζωο βρισκόταν σε διαφορετικό τμήμα του λαβύρινθου όπου υπήρχε ένα συγκεκριμένο οπτικό στοιχείο. Όταν εν συνεχεία ο λαβύρινθος περιστράφηκε κατά 90 μοίρες και ο επίμυς βρισκόταν σε σημείο του λαβύρινθου όπου υπήρχε οπτικό στοιχείο καταγράφηκε διέγερση των συγκεκριμένων νευρώνων που είχαν και προηγουμένως ενεργοποιηθεί από το ίδιο οπτικό στοιχείο, ανεξαρτήτως της πραγματικής θέσης του πειραματόζωου στο χώρο (Tanila et al., 1997a). Όταν εκτός των οπτικών στοιχείων στους τοίχους τοποθετήθηκαν και οπτικά στοιχεία στο έδαφος και επαναλήφθηκε η περιστροφή του λαβυρίνθου καταγράφηκαν νευρώνες που ουσιαστικά επισήμαναν την μετατόπιση των στοιχείων στους τοίχους, νευρώνες που πυροδοτούνταν αναγνωρίζοντας οπτικά στοιχεία του εδάφους και νευρώνες που ενεργοποιούνταν αναγνωρίζοντας τα οπτικά στοιχεία και των δύο ειδών (Tanila et al., 1997a). Η παραπάνω μελέτη αλλά και αρκετές άλλες οδήγησαν στην επισήμανση ότι η λειτουργία νευρώνων του ιπποκάμπου δεν περιορίζεται στην απλή αναγνώριση του χώρου, αλλά σχηματίζουν μια σύνθεση διαφόρων στοιχείων του περιβάλλοντος που λειτουργεί ως ένα είδος γνωστικής επεξεργασίας. Από πειραματικές μελέτες διαπιστώθηκε ότι υπάρχουν νευρώνες του ιπποκάμπου των οποίων η διέγερση εξαρτάται από τη θέση του ζώου στο χώρο και από συγκεκριμένο οσφρητικό ερέθισμα (Wood et al., 1999). Με βάση ανάλογα πειράματα προέκυψε η διαπίστωση ότι τα κύτταρα του ιπποκάμπου πειραματόζωων συμμετέχουν σε κάποια μορφή πολυτροπικής αναπαράστασης και ταυτόχρονης συσχέτισης διαφόρων στοιχείων του περιβάλλοντος. Κατά συνέπεια η περιγραφή του ιπποκάμπου των πειραματόζωων ως ένας χωρικός χάρτης του περιβάλλοντος δεν επαρκεί. Αντίθετα ο ιπποκάμπος μπορεί να θεωρηθεί ως μια δομή του εγκεφάλου που συμβάλει στη γνωστική επεξεργασία συσχετιζόμενων στοιχείων του περιβάλλοντος (Sweatt, 2004).

1.3 Ασθένειες σχετιζόμενες με τον ιπποκάμπο

Ο ιπποκάμπος είναι μια σημαντική περιοχή του εγκεφάλου για τη ρύθμιση του stress. Συμμετέχει στη ρύθμιση του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων και είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος στη νευροτοξική δράση των αυξημένων επιπέδων των γλυκοκορτικοειδών μετά από επαναλαμβανόμενα γεγονότα που προκαλούν stress (Sapolski, 2000). Μάλιστα μετά από έρευνες σε πειραματόζωα βρέθηκε ότι έκθεση σε στρεσογόνες καταστάσεις είχε ως αποτέλεσμα την πρόκληση καταστροφών σε νευρώνες του ιπποκάμπου (Sapolski, 1996).

Κατά την αρχική φάση της αντίδρασης του οργανισμού σε καταστάσεις stress παρατηρείται άμεση διέγερση του προμετωπιαίου φλοιού ενεργοποιώντας διαδικασίες που σχετίζονται με λήψη αποφάσεων και παράλληλα αυξάνεται η έκκριση μονοαμινών σε περιοχές όπως το κοιλιακό ραβδωτό σώμα (ventral striatum), το αμυγδαλοειδές σώμα και στον ίδιο τον προμετωπιαίο φλοιό (Moghaddam., 2002). Σε μία δεύτερη φάση εμπλέκεται ο ιπποκάμπος διεγείροντας τον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου. Συγκεκριμένα, έρευνες σε επίμυες έδειξαν ότι ο βασικός πυρήνας της τελικής ταινίας δεχόμενος ώσεις από τον κοιλιακό ιπποκάμπο και το υπόθεμα ενεργοποιεί εν συνεχεία νευροενδικρινείς κυτταρικές περιοχές του παρακοιλιακού πυρήνα του υποθαλάμου (Sawchenko and Swanson, 1983; Cullinan., 1993). Ο συγκεκριμένος πυρήνας μετά τη διέγερση του εκκρίνει τις ορμόνες CRH (corticotrophin-releasing-hormone) και AVP (arginine-vasopressin) στην πυλαία κυκλοφορία της υπόφυσης (Whitnall, 1993) με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της ACTH η οποία ρυθμίζει την έκκριση των γλυκοκορτικοειδών του φλοιού των επινεφριδίων. Βέβαια η διέγερση του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων ρυθμίζεται και από άλλες δομές όπως το αμυγδαλοειδές σώμα, τον πυρήνα της ραφής, τον βασικό πυρήνα της τελικής ταινίας, τον υπομέλανα τόπο (Herman and Cullinan, 1997). Η CA1 περιοχή του ιπποκάμπου, καθώς και το υπόθεμα μπορούν να επηρεάσουν τη διεγερσιμότητα των νευρώνων του παρακοιλιακού πυρήνα του υποθαλάμου ρυθμίζοντας την λειτουργία των ανασταλτικών GABA-εργικών νευρώνων που συνάπτονται σε αυτούς (Herman et al., 2002).

Ένας μεγάλος αριθμός προκλινικών ερευνών έδειξε ότι τα ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα του stress ή έκθεση του ιπποκάμπου σε γλυκοκορτικοειδή δύναται να προκαλέσουν βλάβες στον ιπποκάμπο δεδομένου του μεγάλου αριθμού

υποδοχέων κορτικοστεροειδών στον ιππόκαμπο (Sapolsky,2000). Έρευνες σε πειραματόζωα έδειξαν ότι κάτω από συνθήκες stress προέκυπταν δομικές αλλαγές σε νευρώνες του ιπποκάμπου όπως: δενδριτική αναδιάρθρωση (Wooley et al., 1990), ατροφία του κορυφαίου δενδρίτη (Magarinos et al.,1996), αλλαγή της δομής των συναπτικών απολήξεων (Magarinos et al., 1997), καταστροφή νευρώνων (Mizoguchi, 1992).

Σημαντική είναι η συμμετοχή του ιπποκάμπου στην πρόκληση εστιασμένων επιληπτικών κρίσεων του κροταφικού λοβού. Τόσο ο ενδορινικός φλοιός όσο και το αμυγδαλοειδές σώμα μπορούν επίσης να αποτελέσουν εστίες ανάπτυξης τέτοιων κρίσεων οι οποίες σχετίζονται με την πρόκληση εγκεφαλικών βλαβών γνωστών ως σκλήρωση του κροταφικού λοβού (Falconer et al., 1964). Είναι ωστόσο σημαντικό να αναφερθεί ότι σε *in vitro* μελέτη τομής εγκεφάλου αρουραίου που συμπεριέλαβε και τις τρεις προαναφερθείσες δομές, μετά από τον φαρμακολογικό αποκλεισμό των GABA υποδοχέων, προκλήθηκε αυθόρμητη νευρωνική διέγερση που έφερε τα ενδοκυττάρια χαρακτηριστικά επιληπτικής κρίσης και με εστία διέγερσης την περιοχή CA2/CA3 του ιπποκάμπου. Η διέγερση στη συνέχεια επεκτεινόταν και προς τις γειτονικές περιοχές (Stoop et al., 2000).Ένας από τους πιο σημαντικούς μηχανισμούς έναρξης κρίσεων σε μοντέλα επιληψίας κροταφικού λοβού σε πειραματόζωα είναι η ελαττωμένη συναπτική αναστολή (Olsen and Avoli.,1997). Παρότι προγενέστερες έρευνες έδειξαν αυξημένη αντοχή των GABAεργικών κυττάρων, σε σχέση με τα πυραμιδικά κύτταρα, όσον αφορά κυτταρικές απώλειες οφειλόμενες σε επιληπτικές κρίσεις (Babb et al., 1989), πρόσφατα ευρήματα κατέδειξαν GABAεργικούς ενδονευρώνες ιδιαίτερα ευαίσθητους σε καταστροφή, τόσο στην περιοχή της οδοντωτής έλικας όσο και της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου (Houser and Escaplez, 1996, Houser, 1999). Επιπλέον, ελαττωμένη συναπτική αναστολή μπορεί να προκύψει και από λειτουργική αποσύνδεση των ενδονευρώνων από εισερχόμενες διεγερτικές νευρικές ώσεις. Υπό αυτές τις συνθήκες οι ενδονευρώνες καθίστανται αδρανείς (Sloviter, 1987, 1991). Βεβαίως, και η ενδογενής διεγερσιμότητα ομάδων πυραμιδικών νευρώνων μπορεί να συμβάλλει στην αυξημένη υπερδιεγερσιμότητα των δομών του στεφαναίου συστήματος σε περιπτώσεις επιληπτικών κρίσεων του κροταφικού λοβού. Για παράδειγμα σε μοντέλο επιληψίας με πιλοκαρπίνη βρέθηκε αυξημένη ενδογενής διεγερσιμότητα με τη μορφή ριπών σε κύτταρα της CA1 περιοχής του εγκεφάλου (Sanabria et al.,

2001). Το φαινόμενο αυτό φαίνεται να οφείλεται στην de novo εμφάνιση διαύλων ασβεστίου υψηλού ουδού. Εξάλλου, έχει παρατηρηθεί ότι μετά από την αρχική κυτταρική καταστροφή μετά από επιληπτική κρίση προκύπτουν νέες συναπτικές συνδέσεις των βρυωδών ιών σε κύτταρα της μοριώδους στοιβάδας της οδοντωτής έλικας (Houser, 1999). Η παρατηρηθείσα προκαλούμενη αξονική διακλάδωση σε κύτταρα της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου, μετά από επιληπτικές κρίσεις, βρέθηκε ότι συμβάλει και στην επαναλαμβανόμενη διέγερση κοκκιωδών κυττάρων και κατά συνέπεια σε αυξημένα επίπεδα διέγερσης (Wuarin and Dudek, 1996) που μπορεί να συμβάλει σε επιρρέπεια προς επιληπτικές κρίσεις (Avoli et al., 2002).

Ένας μεγάλος αριθμός μελετών όπου χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές ερευνητικές προσεγγίσεις συγκλίνουν στο συμπέρασμα ότι ο ιπποκάμπος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της σχιζοφρένειας. Μελέτες μαγνητικής τοπογραφίας (MRI) κατέδειξαν ελάττωση του μεγέθους του ιπποκάμπου (Wright et al., 2000) καθώς και αλλαγές στο σχήμα του (Csernasky, 2002). Μάλιστα ελαττωμένος όγκος ιπποκάμπου παρατηρήθηκε και σε πρόδρομες περιπτώσεις και αλλά και σε ασθενείς σε αρχικό στάδιο εμφάνισης σχιζοφρένειας δείχνοντας ότι η εμπλοκή του ιπποκάμπου δεν είναι δευτερεύουσας σημασίας στην εξέλιξη της νόσου (Joyal et al., 2002). Επιπλέον, έρευνες με τη χρησιμοποίηση τομογραφίας εκπομπής ποζιτρονίων έδειξαν αλλαγές στην μεταβολική δραστηριότητα κυττάρων του ιπποκάμπου (Medoff et al., 2001), ενώ μετά από έρευνες σε επίπεδο υποδοχέων βρέθηκαν αλλαγές τόσο στους γλουταμινεργικούς ιονοτροπικούς υποδοχείς όσο και σε GABAεργικούς, νικοτινικούς και σεροτονινεργικούς υποδοχείς (Simpson et al., 1998; Freedman et al., 2000, Law and Deakin, 2001, East et al., 2002). Όσον αφορά τα ανατομικά ευρήματα παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στο εσωτερικό κύκλωμα και τις απαγωγές συνδέσεις του ιπποκάμπου και ιδιαίτερα προς το προμετωπιαίο φλοιό (Harisson et al., 2004).

Δεδομένης της συμμετοχής του ιπποκάμπου στις λειτουργίες της μνήμης και μάθησης η επίδραση της νόσου του Alzheimer στον δομή αυτή του στεφανιαίου συστήματος είναι σημαντική. Η περιοχή της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου είναι από τις πρώτες που επηρεάζονται από αυτή την ασθένεια αφού παρατηρείται σχηματισμός ενός μεγάλου αριθμού νευροινδιακών μορφωμάτων που καθιστούν τα νευρικά κύτταρα δυσλειτουργικά (Hyman et al., 1986). Επιπλέον, σε ιστό

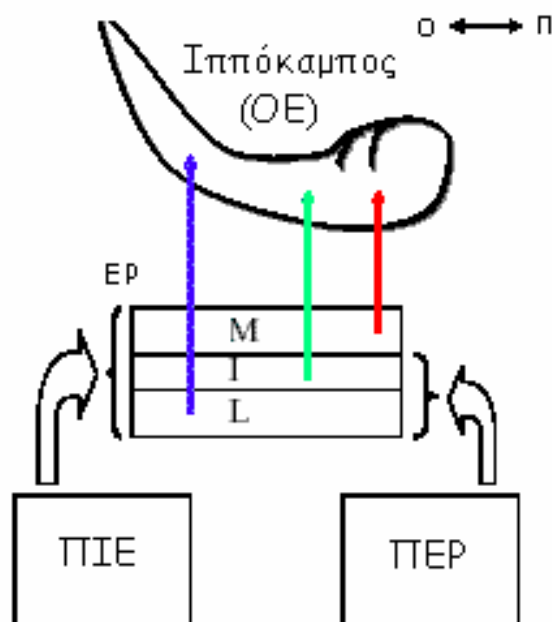
ασθενών με Alzheimer, βρέθηκε ελάττωση κατά 21% του αριθμού των συνάψεων στην μοριώδη στοιβάδα της οδοντωτής έλικας σε σχέση με τμήματα ιστού από άτομα που δεν είχαν εμφανίσει την ασθένεια. Η ελάττωση αυτή ενδέχεται να έχει υποεκτιμηθεί αν ληφθεί υπόψη η παρατηρούμενη, κατά 26%, μείωση του εύρους της μοριώδους στοιβάδας σε ασθενείς με Alzheimer, γεγονός που αυξάνει την συναπτική πυκνότητα στην περιοχή (Scheff et al., 1993). Μία πιθανή εξήγηση για την ελαττωμένη συναπτική πυκνότητα στην περιοχή του ιπποκάμπου, καθώς και σε άλλες περιοχές του φλοιού που επηρεάζονται από την Alzheimer, προκύπτει από την μελέτη των Markesbery and Carney, 1999, στην οποία βρέθηκε αυξημένη οξειδωση λιπαρών οξέων σε νευρώνες του εγκεφάλου ασθενών με Alzheimer σε σχέση με υγιή άτομα ίδιας ηλικίας. Η αυξημένη οξειδωση έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή δραστικών κυτταροπλασματικών ουσιών που μπορούν να προκαλέσουν πρωτεϊνική αποικοδόμηση.

1.4 Διαφοροποίηση ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου

Όπως προαναφέρθηκε ο ιπποκάμπος διακρίνεται με βάση τον προσανατολισμό του στο χώρο σε ραχιαίο και κοιλιακό ή οπίσθιο και πρόσθιο αντίστοιχα, όσον αφορά τον εγκέφαλο των πρωτεύοντων. Ωστόσο, όπως προκύπτει από έρευνες η παραπάνω διάκριση του ιπποκάμπου υφίσταται και σε λειτουργικό επίπεδο γεγονός που απορρέει από μια γενικότερη διαφοροποίηση μεταξύ των δύο ακραίων περιοχών του ιπποκάμπου.

Σε ανατομικό επίπεδο έχουν παρατηρηθεί διαφορές ως προς τη συνδεσμολογία του κοιλιακού και του ραχιαίου ιπποκάμπου. Για παράδειγμα, έρευνες σχετικά με την τοπογραφική οργάνωση των συνδέσεων μεταξύ του ενδορινικού φλοιού και της οδοντωτής έλικας κατέδειξαν ότι ο πλευρικός ενδορινικός φλοιός νευρώνει το ραχιαίο τμήμα της οδοντωτής έλικας, ο ενδιάμεσος ενδορινικός φλοιός νευρώνει το παρακείμενο τμήμα της οδοντωτής έλικας και τέλος ο διάμεσος ενδορινικός φλοιός το κοιλιακό τμήμα της οδοντωτής έλικας (Dolorfo and Amaral, 1998; Εικόνα 5). Σημειώνεται ότι κάθε μία από τις προαναφερθείσες περιοχές του ιπποκάμπου δέχονται διαμέσου του περιρινικού και μεταρινικού φλοιού ξεχωριστές ομάδες προσαγωγών νευρικών ινών από διάφορες φλοιώδεις και υποφλοιώδεις περιοχές. Πληροφορίες προερχόμενες από τον αισθητικό φλοιό διοχετεύονται κυρίως στον πλευρικό και ενδιάμεσο

ενδορινικό φλοιό (Dolorfo and Amaral, 1998) Μόνο οσφρητικές πληροφορίες φαίνεται να κατανέμονται εξίσου και στις τρεις περιοχές του ενδορινικού φλοιού (Kosel et al., 1981). Η τοπογραφική οργάνωση που προαναφέρθηκε ισχύει και για τις απαγωγές νευρικές ίνες. Νευράξονες που εκβάλλουν από την κοιλιακή και ραχιαία CA1 περιοχή του ιπποκάμπου, καθώς και από το υπόθεμα, καταλήγουν στην διάμεση και πλευρική περιοχή του ενδορινικού φλοιού αντίστοιχα (Van Groen and Wyss, 1990). Από το σημείο αυτό διαμέσου του περιρινικού φλοιού η πληροφορία καταλήγει σε περιοχές του αισθητικού φλοιού από όπου και ξεκίνησε (Insausti, 1997). Επιπλέον, τοπογραφική διάταξη ακολουθούν και οι συνδέσεις του ιπποκάμπου με υποφλοιώδεις περιοχές. Επί παραδείγματι, η ραχιαία, ενδιάμεση και κοιλιακή περιοχή του ιπποκάμπου προβάλλουν σε διαφορετικές υποπεριοχές του πλευρικού διαφράγματος. Κάθε μια από αυτές τις υποπεριοχές νευρώνουν διαφορετικές περιοχές του υποθαλάμου (Risold and Swanson, 1997). Αντίστοιχη τοπογραφική διάταξη ισχύει και για τις συνδέσεις μεταξύ του ενδορινικού φλοιού και του αμυγδαλοειδούς σώματος. Η πλευρική περιοχή του αμυγδαλοειδούς σώματος συνδέεται αμφίδρομα με την πλευρική περιοχή του ενδορινικού φλοιού, ενώ περιοχές της αμυγδαλής που συνδέονται στενότερα με περιοχές του υποθαλάμου και οσφρητικές περιοχές (φλοιώδης, διάμεσος και κεντρικός πυρήνας του αμυγδαλοειδούς σώματος) νευρώνουν τον διάμεσο ενδορινικό φλοιό. Τέλος θα πρέπει να αναφερθεί ότι υπάρχει και άμεση σύνδεση της αμυγδαλής με τον κοιλιακό ιππόκαμπο (van Groen and Wyss, 1990). Όσον αφορά το τοπικό κύκλωμα του ιπποκάμπου έχει αναφερθεί ότι η σύσταση των ενδονευρών του ραχιαίου ιπποκάμπου διαφέρει από αυτή του κοιλιακού. Η επίπτωση της διαφορετικότητας αυτής στην ηλεκτροφυσιολογική συμπεριφορά και διεγερσιμότητα των δύο περιοχών του ιπποκάμπου δεν έχει μέχρι στιγμής αξιολογηθεί (Nomura et al., 1997).



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση τοπογραφικής σύνδεσης περιοχών του ενδορινικού φλοιού με την οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου. ΟΕ, οδοντωτή έλικα, ΠΙΕ παραιπποκάμπια έλικα, ΠΕΡ περιρινικός φλοιός, ΕΡ ενδορινικός φλοιός, Μ διάμεσος, Ι ενδιάμεσος, Λ πλευρικός ενδορινικός φλοιός, Ο οπίσθιος, Π πρόσθιος ιππόκαμπος.

Η διαφοροποίηση ραχιαίου-κοιλιακού ιπποκάμπου ισχύει και για τα συστήματα μονοαμινικών νευρώνων. Οι ντοπαμινεργικές, νοραδρενεργικές και σεροτονινεργικές ίνες που ξεκινούν από την κοιλιακή καλυπτική περιοχή, τον υπομέλανα τόπο, και τον πυρήνα της ραφής προβάλλουν, με μεγαλύτερη πυκνότητα, στον κοιλιακό (πρόσθιο) ιππόκαμπο (Gage and Thompson.,1980). Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζονται και από μεταγενέστερη μελέτη προκειμένου για τον προσδιορισμό των επιπέδων νευροδιαβιβαστών και νευρορρυθμιστικών ουσιών κατά τον ραχιαίο-κοιλιακό άξονα. Σύμφωνα με αυτή οι συγκεντρώσεις της νοραδρεναλίνης, της ντοπαμίνης, και της σεροτονίνης παρουσίασαν σημαντική αύξηση στον κοιλιακό σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα τον ραχιαίο ιππόκαμπο. Μάλιστα τα επίπεδα της σεροτονίνης και νοραδρεναλίνης βρέθηκαν ιδιαίτερα αυξημένα στην CA1 και CA3 περιοχές του ιπποκάμπου. Όσον αφορά την ντοπαμίνη η συγκέντρωση της ήταν ιδιαίτερα χαμηλή σε όλο τον ιππόκαμπο

(Hortnangl et al., 1991). Στην ίδια μελέτη αυξημένα επίπεδα στο κοιλιακό τμήμα του υποκάμπτου παρατηρήθηκαν και για το γ-αμινοβουτυρικό οξύ όπως και για το γλουταμικό οξύ. Αντίθετα, η συγκέντρωση της ταυρίνης βρέθηκε αυξημένη στον ραχιαίο υποκάμπτου, ενώ τα επίπεδα του ασπαρτικού, της γλυκίνης και του νευροπεπτιδίου Υ βρέθηκαν αμετάβλητα. Εξάλλου, σε άλλη έρευνα αυξημένα βρέθηκαν τα επίπεδα του νευροπεπτιδίου της σωματοστατίνης στην περιοχή του κοιλιακού υποκάμπτου και ιδιαίτερα στην CA1 περιοχή αυτού (Buckmaster., 1994).

Η διαφοροποίηση μεταξύ ραχιαίου και κοιλιακού υποστηρίζεται και από ηλεκτροφυσιολογικά ευρήματα. Για παράδειγμα, ηλεκτροφυσιολογική μελέτη στη CA1 περιοχή του εγκεφάλου πειραματοζώων που είχαν υποστεί γενικευμένη (global) ισχαιμία κατέδειξε τον κοιλιακό υποκάμπτου περισσότερο ανθεκτικό στις προκαλούμενες κυτταρικές αλλαγές (Ashton et al., 1989). Εκτός αυτού, ο ουδός πρόκλησης επιληπτικού τύπου εκφορτίσεων στην CA1 περιοχή βρέθηκε χαμηλότερος στην κοιλιακή περιοχή του υποκάμπτου (Racine et al., 1977). Επιπρόσθετα, σε *in vitro* έρευνα τομών υποκάμπτου στις οποίες η αναστολή είχε αρθεί, βρέθηκε ότι ο κοιλιακός υποκάμπτου εμφανίζει αυξημένη ευαισθησία στην ανάπτυξη επιληπτοειδών εκφορτίσεων σε σχέση με τον ραχιαίο (Borck et al., 1999). Προς την ίδια κατεύθυνση τείνουν και τα ευρήματα μελέτης σε πειραματόζωα που υποβλήθηκαν σε ηλεκτρικό ερεθισμό νευρώνων. Με βάση κλίμακα μέτρησης της έντασης των προκαλούμενων κρίσεων βρέθηκε ότι ο ηλεκτρικός ερεθισμός της κοιλιακής περιοχής του υποκάμπτου προκαλεί σημαντικά περισσότερο έντονες κρίσεις απ' ότι ο ραχιαίος υποκάμπτου (Becker et al., 1997). Επιπλέον, μετά από διέγερση των παράπλευρων ινών του Schaffer και ενδοκυττάρια καταγραφή από πυραμιδικούς νευρώνες της CA1 περιοχής, ο ραχιαίος υποκάμπτου βρέθηκε να παρουσιάζει μεγαλύτερα επίπεδα μετασυναπτικής αναστολής σε σχέση με τον κοιλιακό (Paratheodoropoulos et al., 2001). Τέλος, μετά την εφαρμογή κατάλληλου πρωτοκόλλου για την πρόκληση μετασυναπτικής ενδυνάμωσης στην CA1 περιοχή του υποκάμπτου, ο βαθμός της μετασυναπτικής ενδυνάμωσης βρέθηκε αυξημένος στον ραχιαίο υποκάμπτου (Paratheodoropoulos and Kostopoulos, 2000, Maruki et al., 2001).

Οι προαναφερθείσες αναφορές στις διαφορές των δύο μοιρών του υποκάμπτου σε επίπεδο ανατομίας, νευροχημείας, και ηλεκτροφυσιολογίας αντανακλούν στην διαφοροποίηση του υποκάμπτου σε λειτουργικό επίπεδο. Η εστιασμένη νεύρωση

του ραχιαίου ιπποκάμπου από περιοχές του αισθητικού φλοιού (οπτική, ακουστική, σωματοαισθητική) επιτρέπει στην περιοχή αυτή του εγκεφάλου το συνδυασμό των διαφόρων αισθητικών πληροφοριών προκειμένου για τη δημιουργία ενός είδους γνωστικού χάρτη του περιβάλλοντος καθιστώντας το ρόλο του κεντρικής σημασίας για την εκτέλεση δοκιμασιών χωρικής μάθησης (Moser et al., 1993). Επιπλέον, παρότι κύτταρα που εμπλέκονται στο σχηματισμό χωρικής μνήμης έχουν εντοπιστεί και στους δύο πόλους του ιπποκάμπου, τα κύτταρα του κοιλιακού τμήματος είναι σημαντικά λιγότερα αριθμητικά και παρουσιάζουν μικρότερο εύρος χωρικών πεδίων (Jung et al., 1994). Καταστροφή του ραχιαίου ιπποκάμπου, σε αντίθεση με καταστροφή του κοιλιακού, προκαλεί σημαντική μείωση της ικανότητας σχηματισμού χωρικής μνήμης η οποία είναι ανάλογη με την έκταση της βλάβης η οποία προκλήθηκε (Moser et al., 1993, 1995). Αντίθετα, ο κοιλιακός ιπποκάμπος, βάσει της διαφορετικής του συνδεσμολογίας και ιδιαίτερα με την περιοχή του αμυγδαλοειδούς πυρήνα, θεωρείται υπεύθυνος για την ανάπτυξη μνήμης αποστροφής όπως προκύπτει από συμπεριφορικές μελέτες όπως πειράματα παθητικής αποφυγής (passive avoidance response) (Lorenzini et al., 1997). Επιπλέον, ο κοιλιακός ιπποκάμπος λόγω των συνδέσεων του με περιοχές του υποθαλάμου, ενέχεται στην ρύθμιση του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων που ενεργοποιείται από διάφορα περιβαλλοντικά ερεθίσματα (Moser and Moser., 1998). Έρευνες σε πρωτεύοντα ενισχύουν την χρησιμότητα του οπίσθιου (ραχιαίου) ιπποκάμπου στην επεξεργασία πληροφοριών σχετικά με το χώρο, ενώ αποδίδουν στον πρόσθιο (κοιλιακό) συμμετοχή στον καθορισμό ή την απομνημόνευση κινήσεων στο χώρο (Colombo et al., 1998). Στον άνθρωπο μελέτη με τη χρησιμοποίηση λειτουργικής μαγνητικής τομογραφίας (fMRI) έδειξε ότι ο πρόσθιος ιπποκάμπος χρησιμεύει στην καταγραφή νέων εμπειριών, η οποία εκφράζεται με την καταγραφή διαφοροποίησης μεταξύ του προσδοκώμενου και ενός πρωτοεμφανιζόμενου στοιχείου-ερεθίσματος. Ως προσδοκώμενο ορίζεται η πρόβλεψη με βάση την πρόσφατη εμπειρία. Στην ίδια μελέτη ο ραχιαίος ιπποκάμπος βρέθηκε ότι ενεργοποιείται προκειμένου για την εξοικείωση με νέα ερεθίσματα (Strange, 1999).

1.5 Νευρωνική διεγερσιμότητα

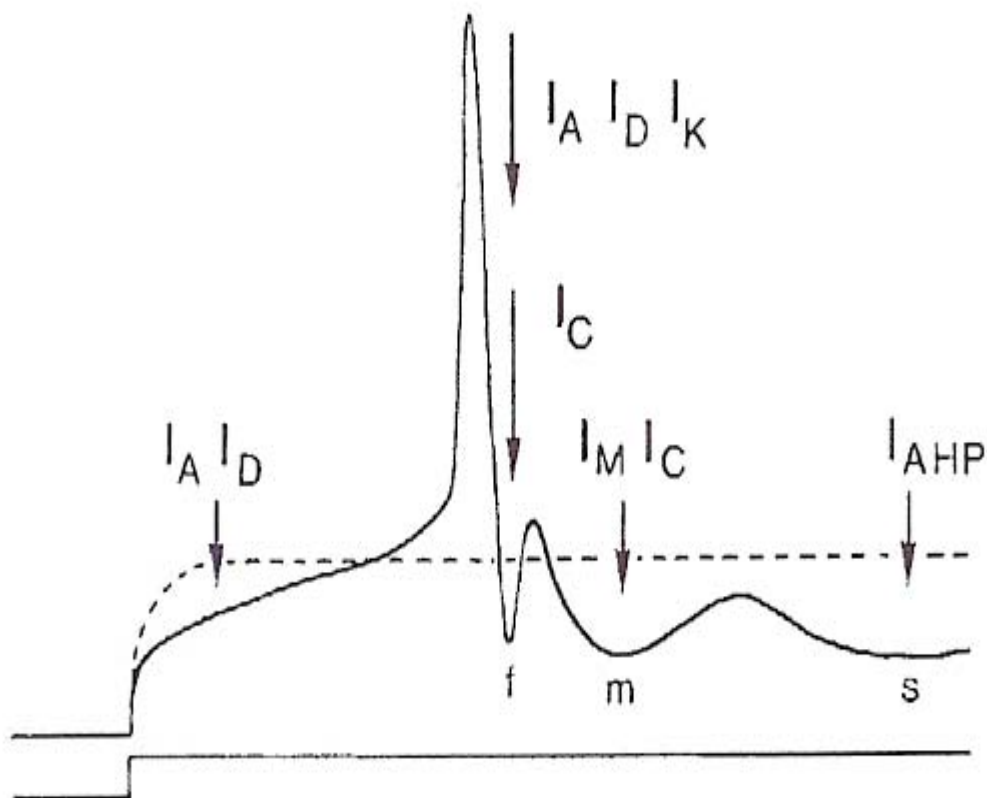
Η επικοινωνία μεταξύ των νευρώνων και η μεταφορά σημάτων μεταξύ περιοχών του εγκεφάλου γίνεται μέσω των δυναμικών ενέργειας τα οποία δημιουργούνται στη ζώνη εκκίνησης των νευρώνων, μεταδίδονται κατά μήκος του νευρικού άξονα και με τη μεσολάβηση των συνάψεων διαδίδονται στα γειτονικά κύτταρα.

Η δημιουργία δυναμικών ενέργειας καθορίζεται από την κίνηση ιόντων διαμέσου ειδικών διαύλων που εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη. Στις μεμβράνες απαντώνται δύο είδη διαύλων: οι διάυλοι εν ηρεμία, και οι διάυλοι που ενεργοποιούνται αποκρινόμενοι σε διάφορα σήματα, όπως για παράδειγμα η αλλαγή της τιμής του δυναμικού της μεμβράνης. Οι διάυλοι εν ηρεμία συμβάλλουν στον καθορισμό της τιμής της διαφοράς δυναμικού εκατέρωθεν της κυτταρικής μεμβράνης των νευρώνων. Η διαφορά αυτή δυναμικού διατηρείται σταθερή όσο το κύτταρο δεν δέχεται συναπτικά ερεθίσματα και ονομάζεται δυναμικό ηρεμίας του κυττάρου. Στο σχηματισμό του δυναμικού ηρεμίας συμμετέχουν ως επί των πλείστων δύο είδη ιόντων: τα ιόντα Na^+ και K^+ . Η κατανομή των ιόντων εκατέρωθεν της κυτταρικής μεμβράνης καθορίζεται με βάση την ηλεκτροχημική βαθμίδωση του κάθε ιόντος. Με βάση την βαθμίδωση αυτή η κυτταροπλασματική πλευρά του κυττάρου φέρει μικρότερο αριθμό θετικά φορτισμένων ιόντων από την εξωκυττάρια πλευρά με αποτέλεσμα η διαφορά του δυναμικού, μεταξύ των δύο πλευρών να είναι αρνητική. Η μετακίνηση των ιόντων διαμέσου αυτών διαύλων είναι παθητική και η συνολική μετακίνηση φορτίων εκατέρωθεν της μεμβράνης εξισορροπείται προκειμένου το δυναμικό της μεμβράνης να είναι σταθερό. Εν τούτοις, η μόνιμη διαρροή ιόντων θα είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του δυναμικού ηρεμίας λόγω ελάττωσης της συγκέντρωσης των ιόντων στο εσωτερικό του κυττάρου. Το γεγονός αυτό αποτρέπεται με τη λειτουργία μίας αντλίας νατρίου-καλίου που μετακινεί τα δύο αυτά ιόντα αντίθετα από τη φορά των ηλεκτροχημικών τους κλίσεων. Η τιμή του δυναμικού ηρεμίας είναι διαφορετική για κάθε είδος νευρώνα και ιδιαίτερα σημαντική τόσο όσον αφορά την αυθόρμητη δραστηριότητα του κυττάρου όσο και στην ρύθμιση της απάντησης του κάθε νευρώνα στα διαφορετικά εισερχόμενα σήματα (Shepherd, 1998).

Η τιμή του δυναμικού ηρεμίας στα πυραμιδικά κύτταρα της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου βρίσκεται στα -65 mV, ενώ η τιμή του ουδού για την πρόκληση δυναμικών ενέργειας είναι 10-15 mV πιο εκπολωμένη (-55 mV).

Σύμφωνα με το μοντέλο των Hodgkin και Huxley η ακολουθία των γεγονότων κατά τη διάρκεια ενός δυναμικού ενέργειας είναι η ακόλουθη: εκπόλωση της μεμβράνης συνεπάγεται το ταχύ άνοιγμα διαύλων Na^+ με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός ρεύματος νατρίου προς το εσωτερικό του κυττάρου. Το ρεύμα αυτό προκαλεί μία περαιτέρω εκπόλωση με αποτέλεσμα το άνοιγμα περισσότερων διαύλων νατρίου και ούτω καθεξής. Κατά τη φάση εκπόλωσης ωστόσο, οι διάυλοι νατρίου απενεργοποιούνται προοδευτικά και από κάποια τιμή του δυναμικού της μεμβράνης και μετά ανοίγουν τασεοελεγχόμενοι διάυλοι καλίου. Μέσω των διαύλων αυτών άγεται θετικό ρεύμα προς το εξωτερικό του κυττάρου προκαλώντας υπερπόλωση της μεμβράνης. Εν συνεχεία ακολουθεί μία υπερπόλωση γνωστή ως μετα-υπερπόλωση που διακρίνεται σε τρεις φάσεις: μια ταχεία πρώτη φάση (f-AHP), μία ενδιάμεση δεύτερη (m-AHP) και μία αργή τρίτη φάση (s-AHP). Η υπερπόλωση των δύο τελευταίων φάσεων λειτουργεί αθροιστικά, μετά από κάθε δυναμικό ενέργειας, και καθίσταται σημαντική, όσον αφορά τη λειτουργία του κυττάρου, μόνο μετά από αλληπάλληλες εκφορτίσεις (Madisson and Nicoll, 1984). Η ακολουθία των γεγονότων κατά τη διάρκεια ενός δυναμικού ενέργειας σε ένα πυραμιδικό νευρώνα του ιπποκάμπου είναι περισσότερο πολύπλοκη. Κατά την αρχική φάση εκπόλωσης λόγω του ρεύματος νατρίου ($I_{\text{Na}, i}$) ενεργοποιείται ένα ρεύμα καλίου, περίπου στα -60 mV, το I_A το οποίο παραμένει ανοιχτό μέχρι η μεμβράνη του κυττάρου να επαναπολωθεί στα -60 mV. Το ρεύμα αυτό αφενός καθυστερεί την φάση ανόδου του δυναμικού ενέργειας, αφετέρου συμμετέχει στην επαναπόλωση του δεδομένου ότι η χρησιμοποίηση αναστολέα του διαύλου αυτού προκαλεί διέγερση του δυναμικού ενέργειας (Storm, 1987a). Ένα δεύτερο ρεύμα καλίου ενεργοποιείται κατά τη φάση ανόδου του δυναμικού ενέργειας. Ονομάζεται I_D , ενεργοποιείται περίπου στα -70 mV και ομοίως αντιτίθεται στην εκπόλωση της μεμβράνης κατά την φάση ανόδου, ενώ συνεχίζει να υφίσταται και κατά την αρχική φάση επαναπόλωσης (Storm., 1988a). Σε αυτή τη φάση συμμετέχει και το ρεύμα καλίου $I_{K (DR)}$. Το τετρααιθυλαμμώνιο (TEA) είναι αναστολέας του διαύλου του ρεύματος αυτού, το οποίο ενεργοποιείται περίπου στα -40 mV (Rudy, 1988), ωστόσο με πειράματα τεχνικής καθήλωσης τάσεως προέκυψε ότι εμφανίζει μέγιστη ενεργοποίηση σε

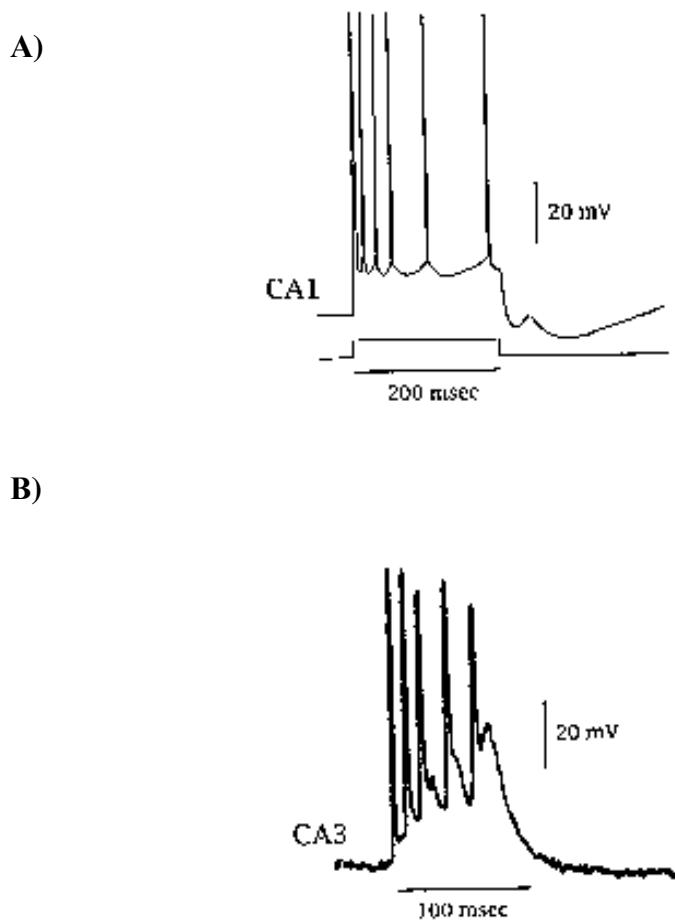
πιο θετικές τιμές διαφοράς δυναμικού από τα -20 mV (Storm, 1990). Κατά τα τελευταία δύο τρίτα της φάσης επαναπόλωσης ενεργοποιείται ένα ρεύμα καλίου ιδιαίτερα σημαντικό για την επαναφορά του δυναμικού στην αρχική του τιμή, που επιπλέον συμβάλλει και στη φάση μετα-υπερπόλωσης του δυναμικού της μεμβράνης. Το ρεύμα αυτό προκύπτει από το άνοιγμα των υψηλής αγωγιμότητας διαύλων καλίου BK και ονομάζεται I_C . Για την ενεργοποίησή του είναι απαραίτητη τόσο η εκπόλωση της μεμβράνης όσο και η αύξηση των επιπέδων του ενδοκυττάριου ασβεστίου (Brown and Griffith, 1983 a, 1983b). Το I_C συμμετέχει τόσο στην επαναπόλωση του δυναμικού του κυττάρου όσο και κατά την ταχεία φάση του μεταυπερπολωτικού δυναμικού (f-AHP) (Storm, 1990; Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση ενός μονήρους δυναμικού ενεργείας, μετά την εφαρμογή ορθογώνιου εκπολωτικού, παλμού όπου σημειώνεται με βέλη η ενεργοποίηση των αγωγιμοτήτων που καταγράφονται κατά τη διάρκεια των διαφόρων φάσεων του. Η διακεκομμένη γραμμή αναπαριστά την παθητική απάντηση της μεμβράνης του κυττάρου κατά την πλήρη απουσία ενεργών ιοντικών αγωγιμοτήτων (Storm, 1990).

Η ηλεκτροφυσιολογική συμπεριφορά των πυραμιδικών νευρώνων διαφόρων υποπεριοχών του ιπποκάμπου διαφέρει. Για παράδειγμα τα κύτταρα της CA3

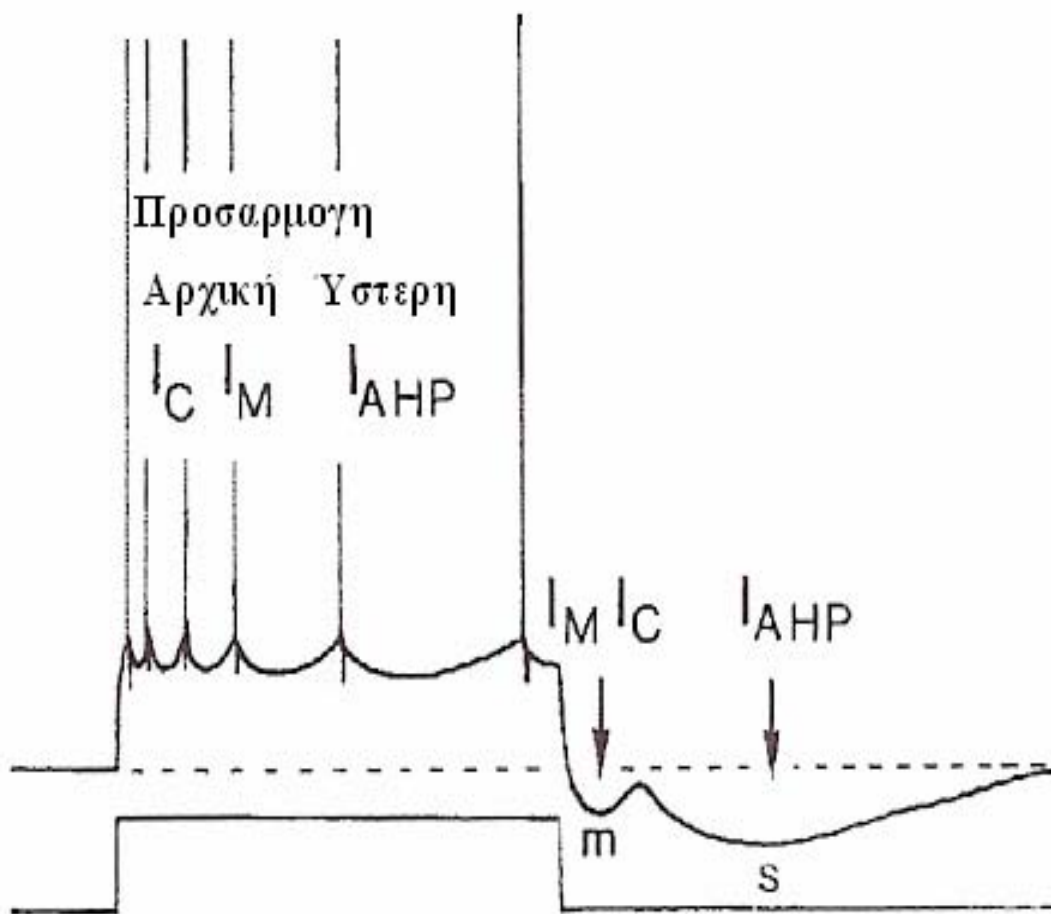
περιοχής απαντούν σε διέγερση μόνο με ριπές εκφορτίσεων, ενώ τα κύτταρα CA1 περιοχής και με επαναλαμβανόμενες εκφορτίσεις. Έχει αναφερθεί ότι η CA1 περιοχή χωρίζεται σε υποπεριοχές (CA1a, CA1b, και CA1c) οι οποίες περιλαμβάνουν πυραμιδικούς νευρώνες με διακριτή ηλεκτροφυσιολογική δραστηριότητα. Συγκεκριμένα, οι πυραμιδικοί νευρώνες της περιοχής CA1b απαντούν μόνο με επαναλαμβανόμενες εκφορτίσεις, ενώ αντίθετα, οι νευρώνες των περιοχών CA1a και CA1c μπορούν να απαντήσουν και με ριπές (Masukawa et al., 1982; Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Α) απάντηση νευρώνα της CA1 περιοχής σε ορθογώνιο εκπολωτικό παλμό με επαναλαμβανόμενες εκφορτίσεις. Β) απάντηση νευρώνα της CA3 περιοχής σε ορθογώνιο εκπολωτικό παλμό με ριπή δυναμικών ενέργειας.

Ένα άλλο χαρακτηριστικό των κυττάρων του ιπποκάμπου είναι ότι εμφανίζουν προσαρμογή κατά τη διάρκεια εφαρμογής εκπολωτικού παλμού μεγάλης διάρκειας. Δηλαδή, παρατηρείται μία προοδευτική ελάττωση της

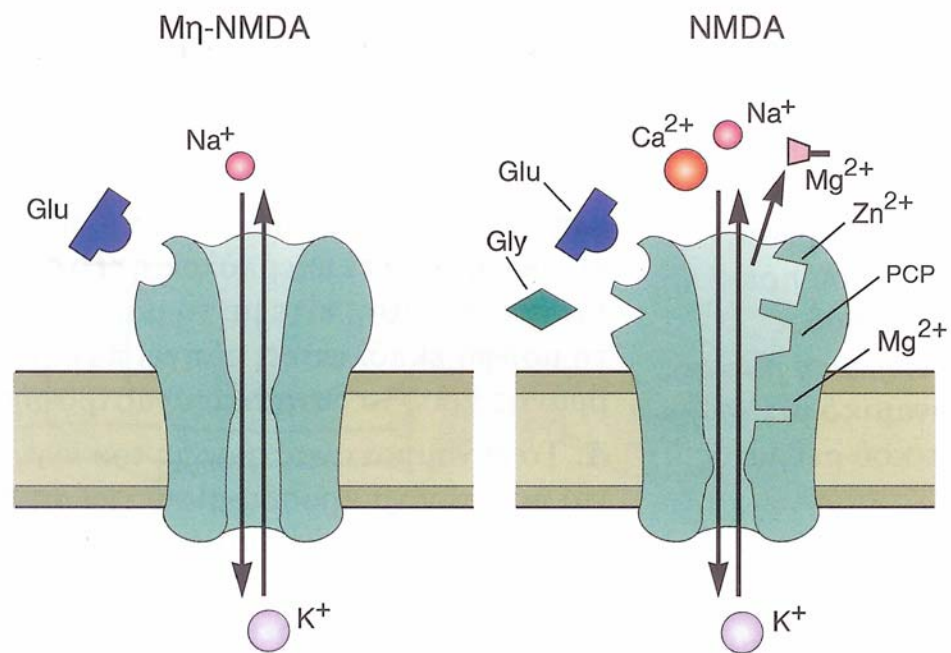
συχνότητας εμφάνισης εκφορτίσεων. Επιπλέον, από κάποιο χρονικό σημείο και μετά παρατηρείται παύση των εκφορτίσεων ανεξαρτήτως της συνεχιζόμενης εφαρμογής εκπολωτικού παλμού (εξοικείωση) (Madisson and Nicoll., 1984). Η συμπεριφορά αυτή των νευρώνων του ιπποκάμπου οφείλεται στην μεσαίας διάρκειας (m-AHP) και στην αργή φάση του μετα-υπερπολωτικού δυναμικού (s-AHP; Εικόνα 8). Στην εμφάνιση του μετα-υπερπολωτικού δυναμικού μεσαίας διάρκειας συμβάλλει καθοριστικά μία αγωγιμότητα καλίου (I_M) που ενεργοποιείται μετά από εκπόλωση της μεμβράνης πάνω από την τιμή των -60 mV. Για την ενεργοποίηση του διαύλου μέσω του οποίου άγεται το ρεύμα I_M δεν είναι απαραίτητη η παρουσία ιόντων ασβεστίου όπως ισχύει για τα BK κανάλια του ρεύματος I_c (Halliwell and Adams, 1982). Επιπλέον, ο δίαυλος είναι ευαίσθητος στην παρουσία ακετυλοχολίνης και άλλων μουσκαρινικών αγωνιστών οι οποίοι αναστέλουν το ρεύμα αυτό (Brown and Adams, 1980). Παρότι το ρεύμα I_M ενεργοποιείται από μονήρη δυναμικά ενέργειας, λόγω της αργής κινητικής του διαύλου δεν συμβάλλει ουσιαστικά στην επαναπόλωση του κυττάρου (Storm., 1989). Αντίθετα, αποτελεί τον κύριο παράγοντα διαμόρφωσης του m-AHP, το οποίο προκαλεί μία αρχική προσαρμογή των εκφορτίσεων του κυττάρου και παράλληλα λειτουργεί ως παράγοντας εξασθένησης εκπολωτικών υποουδικών ερεθισμάτων (Storm, 1990). Στην εμφάνιση της αργής φάσης του μετα-υπερπολωτικού δυναμικού (s-AHP) κύριο ρόλο κατέχει το ρεύμα καλίου I_{AHP} . Ο δίαυλος του συγκεκριμένου ρεύματος είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος στην παρουσία των ιόντων ασβεστίου και ενεργοποιείται μετά από εκπόλωση που προκαλεί την είσοδο ιόντων ασβεστίου στο κύτταρο. Το συγκριτικά μεγάλο χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μέχρι την ενεργοποίηση του διαύλου μπορεί να οφείλεται στην κινητική του διαύλου, ή/και στο χρονικό διάστημα που απαιτείται για την ενεργοποίηση την διαύλων ασβεστίου, την απελευθέρωση ιόντων ασβεστίου από ενδοκυττάρια αποθήκες και την διάχυση των ιόντων ασβεστίου στην περιοχή των διαύλων του I_{AHP} (Storm, 1990). Το s-AHP προκαλεί την διακοπή των εκφορτίσεων του κυττάρου (εξοικείωση) και συμβάλλει και στην ύστερη φάση της προσαρμογής που παρουσιάζουν τα πυραμιδικά κύτταρα. Το s-AHP αποτελεί έναν ιδιαίτερα σημαντικό μηχανισμό ρύθμισης της λειτουργία του κυττάρου και ο δίαυλος του I_{AHP} αποτελεί στόχο ρύθμισης διαφόρων νευροδιαβιβαστών και νευροπεπτιδίων όπως: σεροτονίνη, νοραδρεναλίνη, ντοπαμίνη, ακετυλοχολίνη, αδενوسίνη, ισταμίνη (Storm et al., 1990).



Εικόνα 8. Σχηματική αναπαράσταση συνεχόμενων εκφορτίσεων, μετά την εφαρμογή ορθογώνιου εκπολωτικού παλμού σε νευρώνα της CA1 περιοχής. Με βέλη σημειώνεται η ενεργοποίηση των αγωγιμοτήτων που καταγράφονται κατά τη διάρκεια της μετα-υπερπόλωσης και στις φάσεις της προσαρμογής (Storm, 1990b).

Τα πυραμιδικά κύτταρα του ιπποκάμπου είναι διεγερτικά κύτταρα που συνθέτουν και εκλύουν ως νευροδιαβιβαστή το γλουταμινικό οξύ. Το γλουταμινικό προκαλεί μέσω μετασυναπτικών υποδοχέων διεγερτικά συναπτικά δυναμικά (EPSPs) που εκπολώνουν την μετασυναπτική κυτταρική μεμβράνη. Υπάρχουν δύο τύποι μετασυναπτικών υποδοχέων γλουταμινικού: οι ιοντοτρόποι υποδοχείς, που ελέγχουν άμεσα διαύλους ιόντων, και οι μεταβολοτρόποι

υποδοχείς που ελέγχουν διαύλους ιόντων μέσω συστημάτων δεύτερων μηνυμάτων. Οι ιοντοτρόποι υποδοχείς διακρίνονται σε υποδοχείς NMDA- (ενεργοποιούνται από το ανάλογο αμινοξέος N-μεθυλο-D-ασπαρτικό οξύ) και μη NMDA ή AMPA (ενεργοποιούνται από AMPA, α-αμινο-3-υδροξυ-5-μεθυλο-ισοξαζολο-προπιονικό οξύ). Οι υποδοχείς AMPA διεγείρονται γρηγορότερα είναι διαπερατοί σε ιόντα καλίου και νατρίου και αποτελούν την κυρίαρχη συνιστώσα του EPSP. Οι υποδοχείς NMDA ενεργοποιούνται αργότερα, ωστόσο λόγω της διαπερατότητας τους και σε ιόντα ασβεστίου είναι ιδιαίτερα σημαντικοί στην ενεργοποίηση ασβεστιοεξαρτώμενων ενζύμων και συστημάτων δεύτερων αγγελιοφόρων στο μετασυναπτικό κύτταρο (Shepherd., 1998; Εικόνα 9) .Ο διάυλος NMDA, σε αντίθεση με το διάυλο AMPA, ελέγχεται ταυτόχρονα από το γλουταμινικό οξύ και από την τάση της μεμβράνης του κυττάρου αφού σε τιμές πλησίον του δυναμικού ηρεμίας φράσσεται από ιόντα μαγνησίου με αποτέλεσμα να συμβάλλει ελάχιστα στη μετασυναπτική εκπόλωση, ενώ όταν η μεμβράνη του κυττάρου εκπολωθεί απομακρύνονται τα ιόντα Mg^{+2} ο διάυλος γίνεται διαπερατός για τα ιόντα K^+, Na^+, Ca^{+2} με αποτέλεσμα την περαιτέρω εκπόλωση του κυττάρου. Ο διάυλος έχει θέσεις πρόσδεσης για ένα μεγάλο αριθμό ουσιών και ιόντων όπως ο ψευδάργυρος. Απαραίτητη για τη λειτουργία του διαύλου είναι η παρουσία γλυκίνης, ενώ η λειτουργία του αναστέλλεται από τη πρόσδεση ουσιών όπως η ψευδαισθησιογόνος ουσία φαινοκυκλιδίνη (PCP) και από το MK801. Όσον αφορά τη δομή του διαύλου NMDA έχει βρεθεί ότι είναι ένα ετερομερές-πενταμερές σύμπλοκο πρωτεϊνών. Απαραίτητη προϋπόθεση για τη λειτουργία του διαύλου είναι η παρουσία της υπομονάδας NMDARI (NR1), ενώ η δομή του διαύλου συμπληρώνεται με την παρουσία τεσσάρων υπομονάδων της οικογένειας NMDAR2 (NR2) η οποία αποτελείται από τις υπομονάδες NMDAR2A-NMDAR2D. Οι υπομονάδες της οικογένειας NR2 θεωρούνται ρυθμιστικές όσον αφορά τη λειτουργία του διαύλου και αναλόγως τη σύνθεσης των υπομονάδων μεταβάλλονται και οι ιδιότητες του διαύλου (Ozawa et al., 1998; Hollmann and Heinemann, 1994). Οι διάυλοι NMDA έχουν εντοπιστεί σε όλες τις περιοχές του εγκεφάλου και ιδιαίτερα στο πρόσθιο εγκέφαλο. Τα υψηλότερα επίπεδα σε ολόκληρο τον εγκέφαλο παρατηρούνται στην στοιβάδα CA1 του ιπποκάμπου (Monaghan et al., 1989).



Εικόνα 9: Οι ιοντοτρόποι υποδοχείς διακρίνονται στους υποδοχείς NMDA και μη NMDA (AMPA). Ο διάυλος NMDA φέρει θέσεις πρόσδεσης για διάφορες ουσίες. Βλ. κείμενο (Kandel et al., 1999).

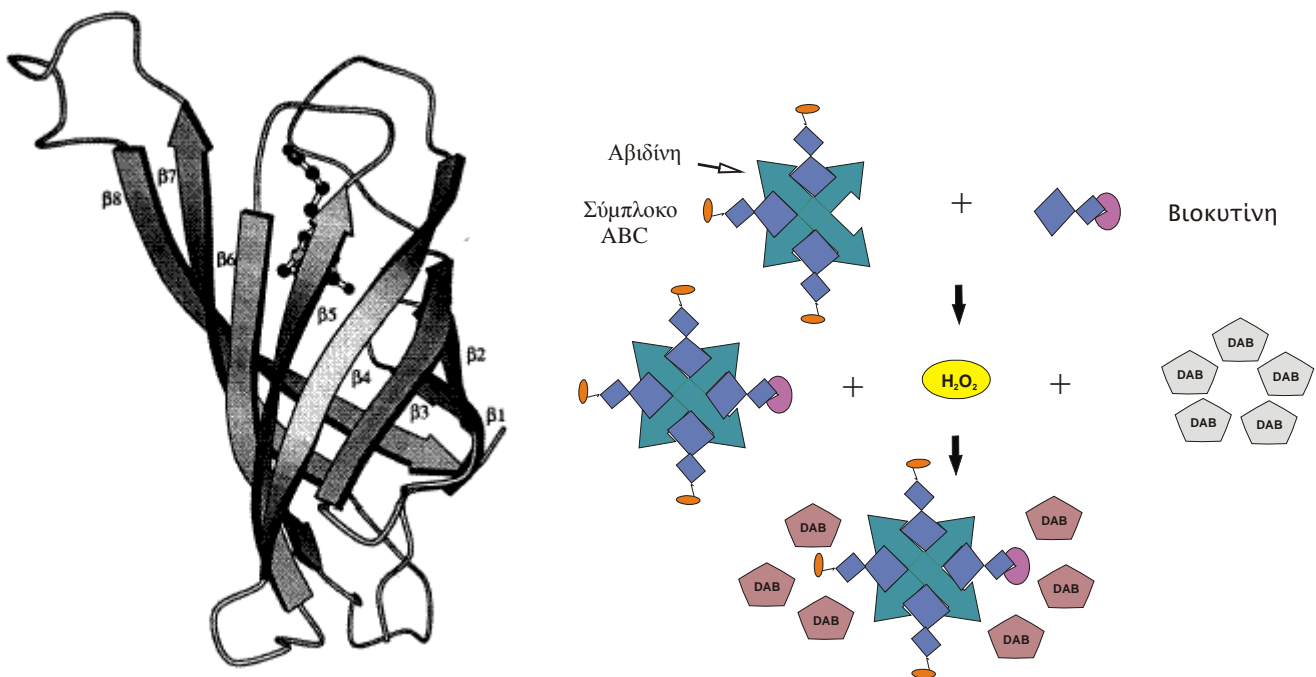
Ενδοκυττάρια καταγραφή από πυραμιδικό νευρώνα της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου μετά από διέγερση των παράπλευρων ιών του Schaffer εμφανίζει την κυματομορφή της Εικόνας . Όπως προκύπτει και από την εικόνα η αρχική μετασυναπτική διέγερση του νευρώνα που οδηγεί σε δυναμικό ενέργειας ακολουθείται από υπερπόλωση της μεμβράνης που διακρίνεται σε δύο φάσεις: μία γρήγορη (fast inhibitory postsynaptic potential, f-IPSP) και μία αργή (slow inhibitory postsynaptic potential, s-IPSP). Τα δυναμικά αυτά οφείλονται στην έκλυση του νευροδιαβιβαστή γ-αμινοβουτυρικό (GABA) από ενδονευρώνες της CA1 περιοχής που νευρώνονται από ίνες της οδού Schaffer και διεγείρομενοι εκλύουν GABA σε πυραμιδικούς νευρώνες. Ο ανασταλτικός αυτός νευροδιαβιβαστής ενεργοποιεί δύο είδη μετασυναπτικών υποδοχέων. Τους υποδοχείς GABA_A, που είναι ιοντοτρόποι και ελέγχουν άμεσα ένα διάυλο χλωρίου, και τους GABA_B, που είναι μεταβολοτρόποι και μέσω δευτέρων αγγελιοφόρων ενεργοποιούν ένα διάυλο καλίου (Shepherd, 1998).

1.6 Χρώση πυραμιδικών νευρώνων

Όπως προαναφέρθηκε η πυραμιδική στιβάδα της CA1 περιοχής του υποκάμπου μπορεί να διακριθεί στις υποπεριοχές CA1a, CA1b και CA1c. Η ηλεκτροφυσιολογική συμπεριφορά των πυραμιδικών νευρώνων της CA1b περιοχής βρέθηκε ότι διαφέρει από την αντίστοιχη συμπεριφορά των πυραμιδικών νευρώνων των δύο άλλων περιοχών. Επιπλέον, η διαφοροποίηση στο είδος των εκφορτίσεων (επαναλαμβανόμενες εκφορτίσεις - ριπές) που καταγράφονται από την πυραμιδική στιβάδα της CA1 περιοχής μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι 10% των νευρώνων της στιβάδας αυτής είναι καλαθοκύτταρα (ενδονευρώνες), των οποίων η ηλεκτροφυσιολογική δραστηριότητα είναι διαφορετική από αυτή των πυραμιδικών νευρώνων. Προκειμένου, λοιπόν, να συγκριθούν οι ραχιαίοι και κοιλιακοί πυραμιδικοί νευρώνες όσον αφορά τη διεγερσιμότητα τους κρίνεται απαραίτητη η πιστοποίηση της επακριβούς θέσης καταγραφής κατά μήκος της CA1 πυραμιδικής στιβάδας, καθώς και το είδος (πυραμιδικός/ενδονευρώνας) του καταγραφομένου κυττάρου. Επιπρόσθετα, η αρχιτεκτονική δομή ενός νευρώνα είναι σημαντική αφού αποτελεί το μέσον διεκπεραίωσης και ολοκλήρωσης των ηλεκτρικών σημάτων του νευρώνα, μπορεί να επηρεάσει το βαθμό και την έκταση της ολοκλήρωσης εισερχομένων πληροφοριών, και να συμβάλλει στη τροποποίησή τους. Πολύτιμο εργαλείο προς αυτή την κατεύθυνση αποτελεί η χρώση με ενδοκυττάρια έγχυση βιοκνίνης.

Η συγκεκριμένη μέθοδος επιτρέπει την οπτικοποίηση νευρώνων, οι οποίοι έχουν προηγουμένως μελετηθεί ηλεκτροφυσιολογικά (Horikawa and Armstrong, 1988). Το μικρό μοριακό βάρος της βιοκνίνης δεν επηρεάζει σημαντικά την αντίσταση των ηλεκτροδίων καταγραφής και επομένως δεν παρεμποδίζει την ενδοκυττάρια καταγραφή. Συγκεκριμένα, γίνεται ενδοκυττάρια ιοντοφόρηση του μορίου της βιοκνίνης (βιοτίνη-λυσίνη) και αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφυσιολογική μελέτη του κυττάρου, ο ιστός μονιμοποιείται και συζεύγνυται με ένα σύμπλοκο αβιδίνης και βιοτίνης-HRP (Horseradish peroxidase). Η αβιδίνη (68,000 MW) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που εμφανίζει τον υψηλότερο βαθμό συγγένειας ($10^{15}M^{-1}$) που έχει μέχρι στιγμής βρεθεί στη φύση μεταξύ συνδέτη (ligand) και πρωτεΐνης, όσον αφορά την σύνδεση της με τη βιταμίνη βιοτίνη. Το μόριο της αβιδίνης είναι ένα τεταρτομερές μόριο του οποίου κάθε μονομερές (Εικόνα 10) σχηματίζει μια εντελώς εξειδικευμένη θέση

σύνδεσης με ένα μόριο βιοτίνης ή οποιασδήποτε βιοτυνιλωμένης πρωτεΐνης αντίστοιχα (Livnah et al., 1993). Η αναλογία των συστατικών του συμπλόκου που χρησιμοποιείται είναι τέτοια ώστε διατηρείται πάντα μία ελεύθερη θέση στο μόριο της αβιδίνης για την επιλεκτική πρόσδεση ενός μορίου βιοτίνης, όπως αυτό που περιέχεται στο μόριο της βιοκυτίνης που χρησιμοποιήθηκε για τη σύμπτωση του νευρώνα. Στη συνέχεια, για την οπτικοποίηση του νευρώνα προστίθεται μία χρωμογόνος ένωση μαζί με υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η χρωμογόνος ένωση οξειδώνεται από υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) με την καταλυτική δράση της δεσμευμένης υπεροξειδάσης στα μόρια της βιοτίνης του συμπλόκου και παράγεται ένα αδιάλυτο, καφέ χρώματος και ηλεκτρονικώς πυκνό ίζημα (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Α. Απεικόνιση της δομής του μονομερούς του μορίου της αβιδίνης. Β. Αναπαράσταση του τρόπου σύνδεσης του τετραμερούς μορίου της αβιδίνης με το μικρού μοριακού βάρους μόριο της βιοτίνης στο σύμπλοκο ABC.

1.7 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Με βάση τα παραπάνω, σκοπό της παρούσας εργασίας αποτελεί η διερεύνηση των κυτταρικών μηχανισμών που διέπουν την αυξημένη διεγερσιμότητα που παρατηρείται στην κοιλιακή σε σχέση με τη ραχιαία μοίρα της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου, που μπορεί να αποβεί χρήσιμη στην κατανόηση των διαφορετικών ρόλων που διαδραματίζουν οι δύο μοίρες του ιπποκάμπου τόσο σε φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού όσο και σε παθολογικές καταστάσεις.

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Η συλλογή των πειραματικών δεδομένων συνίσταται στην προετοιμασία των τομών για ενδοκυττάρια *in vitro* καταγραφή, την έγχυση βιοκυτίνης στο εσωτερικό των νευρώνων του ιπποκάμπου, και τέλος την ιστοχημική επεξεργασία τομών του εγκεφάλου του πειραματοζώου. Αναλυτικά οι μεθοδολογίες που χρησιμοποιήθηκαν έχουν ως εξής:

2.1.1 Πειραματόζωα: Τα πειράματα διεξήχθησαν σε αρσενικούς επίμυες της σειράς Wistar. Τα ζώα (βάρους περίπου 350gr) τοποθετούνται σε κλωβούς ανά ομάδες 3-4 πειραματοζώων. Οι συνθήκες διαβίωσης περιλαμβάνουν σταθερής έντασης περιοδικό φωτισμό (12 ώρες φως, 12 ώρες σκοτάδι), σταθερή θερμοκρασία δωματίου (22 ± 2) °C και ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό.

2.1.2 Προετοιμασία των τομών του εγκεφάλου: Τα πειραματόζωα τοποθετούνται σε αεροστεγή θάλαμο και αναισθητοποιούνται με χορήγηση αιθέρα. Εν συνεχεία το ζώο θυσιάζεται με αποκεφαλισμό, το κρανίο διανοίγεται και αποκαλύπτεται ο εγκέφαλος του ζώου. Αφού αφαιρεθούν οι μήνιγγες ο εγκέφαλος ανασηκώνεται, με τη χρήση ειδικού εργαλείου, από την κοιλιακή πλευρά του μετωπιαίου λοβού και αφού αποκοπούν τα υποκείμενα οπτικά νεύρα αφαιρείται από το κρανίο και τοποθετείται σε κρύο τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό (TENY) σύστασης (σε mM): 124 NaCl; 4 KCl; 2 MgSO₄; 2 CaCl; 1.25 NaH₂PO₄; 26 NaHCO₃; 10 γλυκόζη serH 7.4, που συνεχώς οξυγονώνεται με μείγμα αερίου σύστασης 95% O₂-5% CO₂. Κατόπιν, αποχωρίζεται ο ιπποκάμπειος σχηματισμός, και των δύο ημισφαιρίων, από τις περιβάλλουσες δομές και εν συνεχεία τοποθετείται επιμηκυσμένος στη έδρα μικροτόμου (McIlwain tissue chopper) όπου και λαμβάνονται εγκάρσιες τομές, τόσο από τη ραχιαία όσο και από την κοιλιακή μοίρα, πάχους 500 μm. Οι τομές, με τη βοήθεια πινέλου, μεταφέρονται στο λουτρό καταγραφής όπου εναποτίθενται σε ειδικό φίλτρο χαρτιού προκειμένου να συγκρατούνται οι τομές στη βάση του λουτρού κατά τη διάρκεια του πολύωρου πειράματος. Οι τομές επωάζονται σε ατμόσφαιρα κορεσμένη σε O₂ και θερμοκρασία

33°C για τουλάχιστον 1h, ενώ παράλληλα διαβρέχονται συνεχώς από οξυγονωμένο TENV. Η διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω πραγματοποιείται σε σύντομο χρονικό διάστημα (περίπου πέντε λεπτών) προκειμένου να διασφαλισθεί η βιωσιμότητα του ιστού.

2.1.3 Θάλαμος καταγραφής: Το λουτρό καταγραφής όπως περιγράφεται και στην εικόνα αποτελείται από την έδρα στην οποία τοποθετούνται οι τομές του ιστού και από τον εσωτερικό θάλαμο. Ο εσωτερικός θάλαμος πληρούται με απιονισμένο νερό που διατηρείται, κατά τη διάρκεια του πειράματος, σε σταθερή θερμοκρασία $33^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ με τη βοήθεια θερμοστάτη. Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό τοποθετείται σε ειδική γυάλινη φιάλη χωρητικότητας 500 ml, οξυγονώνεται συνεχώς και τροφοδοτεί κατά τη διάρκεια του πειράματος τις τομές του ιστού που είναι τοποθετημένες στην έδρα του λουτρού καταγραφής. Τα σωληνάκια, μέσω των οποίων τροφοδοτούνται οι τομές στο λουτρό καταγραφής με T.E.N.Y, εισέρχονται προηγουμένως στον εσωτερικό θάλαμο του λουτρού όπου και περιερίσονται με αποτέλεσμα το εγκεφαλονωτιαίο υγρό προτού να αρχίσει να διαβρέχει τον ιστό να αποκτά την ίδια θερμοκρασία με αυτή του περιβάλλοντος υγρού ($33^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Επιπλέον, το νερό στον εσωτερικό θάλαμο οξυγονώνεται συνεχώς προκειμένου με την παραγωγή υδρατμών να δημιουργείται κορεσμένη σε οξυγόνο ατμόσφαιρα πάνω από την έδρα όπου τοποθετούνται οι τομές του ιπποκάμπου.

Προκειμένου για την τοποθέτηση των μικροπιπετών στη CA1 περιοχή των τομών του ιπποκάμπου χρησιμοποιήθηκαν μικροχειριστές (Narishige Japan, μοντέλο M-P1), στερεοσκόπιο Nikon (μοντέλο SMZ-U/UW10/A/24) και πηγή φωτισμού με τεχνολογία οπτικών ινών για την παραγωγή ψυχρού φωτισμού (Nikon Optical Fiber Light Source). Όλο το σύστημα καταγραφής βρίσκεται τοποθετημένο πάνω σε ειδική αντικραδασμική τράπεζα προκειμένου τη κατά το δυνατό καλύτερη απόσβεση κραδασμών από τον περιβάλλοντα χώρο. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι όλα τα πειράματα πραγματοποιούνται σε χώρο που περιβάλλεται από κλωβό Faraday προκειμένου για τον αποκλεισμό ηλεκτρικού θορύβου που μπορεί να επηρεάσει τις μετρήσεις κατά τη διάρκεια των καταγραφών. Για τον ίδιο λόγο όλα τα ηλεκτρονικά μηχανήματα που χρησιμοποιούνται συνδέονται με γείωση.

2.1.4 Ενδοκυττάρια καταγραφές: Μετά την επώαση πραγματοποιούνται ηλεκτροφυσιολογικές ενδοκυττάρια καταγραφές με γυάλινες μικροπιπέτες που

περιέχουν διάλυμα 2M οξείκου καλίου και 2% βιοκυτίνης, αντίστασης 80-120 MΩ. Για την κατασκευή των μικροπιπετών-μικροηλεκτροδίων χρησιμοποιήθηκαν γυάλινα τριχοειδή 1,2 mm, που εσωτερικά φέρουν μικροϊνες, και ειδικός εξολκέας (Brown – flaming μοντέλο P-97 Sutter Instruments California). Η αντίσταση των ηλεκτροδίων ρυθμιζόταν να είναι τόση ώστε να μην επηρεάζονται οι ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές και ταυτόχρονα να επιτυγχάνεται η μέγιστη δυνατή έγχυση βιοκυτίνης στο νευρώνα. Η καταγραφή γίνεται από νευρώνες της CA1 περιοχής της πυραμιδικής στοιβάδας του ιπποκάμπου. Για την καταγραφή των αποκρίσεων των κυττάρων χρησιμοποιείται ερεθισματοδότης (master-8 A.M.P.I), ενισχυτής Axoclamp 2B για τη παραγωγή ηλεκτρικού σήματος (Axon Instruments) με δυνατότητα σύνδεσης με γέφυρα Wheatstone που επιτρέπει την παροχή ρεύματος διαμέσου του μικροηλεκτροδίου καταγραφής, προενισχυτής DC με εμπέδηση υψηλής εισόδου (Axoclamp HS-2A, Axon-Instruments Inc.) για την ενίσχυση του καταγραφόμενου σήματος, αναλογικός παλμογράφος (HAMEG HM-305) με σκοπό τη συνεχή παρακολούθηση των αποκρίσεων του δυναμικού της μεμβράνης, μετατροπέας σήματος (αναλογικού-ψηφιακού και αντίστροφα) (Digidata 1200, Axon Instruments) και το πρόγραμμα πρόσληψης και ανάλυσης δεδομένων pCLAMP 5.03 (Axon Instruments). Τα πειραματικά αποτελέσματα αποθηκεύονται με τη μορφή αναλογικού σήματος σε κασέτες καταγραφέα εικόνας-ήχου (DTR 1204 digital tape recorder) και σε χαρτί με τη χρησιμοποίηση ενός καταγραφικού χάρτου (Astromed, DASH IV, Model XL). Όλα τα δεδομένα λήφθηκαν, καταγράφηκαν, αποθηκεύτηκαν και αναλύθηκαν με τη βοήθεια ενός προσωπικού H/Y.

Όλα τα πειράματα με την τεχνική καθήλωσης ρεύματος πραγματοποιήθηκαν διαμέσου ενισχυτή τύπου Axoclamp 2A. Ωστόσο, κατά την παροχή ρεύματος I_0 προκύπτει πτώση τάσης κατά μήκος του ηλεκτροδίου V_e η οποία εξαρτάται από την αντίσταση του ηλεκτροδίου (R_e). Η τιμή της τάσης που καταγράφεται από τον ενισχυτή ισούται με το άθροισμα της μεταβολής του δυναμικού της μεμβράνης του κυττάρου V_m και της τάσης V_e . Προκειμένου να καταγραφεί η πραγματική τιμή του δυναμικού μεμβράνης, κατά τη διάρκεια της διοχέτευσης ρεύματος, η V_e είναι απαραίτητο να ελαχιστοποιηθεί και η απαίτηση αυτή εκπληρώνεται μέσω της λειτουργίας εξισορρόπησης της γέφυρας. Εκτός αυτού, για τη ορθή μέτρηση του δυναμικού της μεμβράνης του κυττάρου ήταν απαραίτητη η εξάλειψη μεταβολών στη μετρούμενη τιμή της διαφοράς δυναμικού οφειλόμενες σε δυναμικά σύνδεσης (junction potentials) που αναπτύσσονται στο σημείο επαφής υλικών διαφορετικής

αγωγιμότητας. Αυτό επιτυγχάνεται με την εφαρμογή ρεύματος DC αντίθετης πολικότητας μέσω ειδικού ρυθμιστή. Τέλος, η ανάπτυξη χωρικής αντίστασης σε διάφορα σημεία του συστήματος καταγραφής, και ιδιαίτερα στα γυάλινα τοιχώματα του μικροηλεκτροδίου, η οποία θα μπορούσε να λειτουργήσει κατά τη διάρκεια της καταγραφής ως φίλτρο με συνέπεια το μηδενισμό σημάτων υψηλής συχνότητας, ελαχιστοποιείται με την παροχή ρεύματος αντίθετης πολικότητας (capacitance compensation).

Οι καταγραφές πραγματοποιήθηκαν σε νευρώνες που παρουσίαζαν σταθερό δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης υπερπολωμένο πλέον του -55 mV και δυναμικά ενέργειας με πλάτος μεγαλύτερο από 75 mV. Το απόλυτο δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης μετρήθηκε ως η διαφορά μεταξύ της τιμής του δυναμικού πριν την απόσυρση του μικροηλεκτροδίου από τον νευρώνα και της τιμής αμέσως μετά. Υπερπολωτικοί παλμοί ρεύματος διάρκειας 10 ms και συχνότητας 100 Hz, χορηγήθηκαν δια μέσου του μικροηλεκτροδίου στο εσωτερικό του νευρώνα, παρέχοντας τη δυνατότητα μέτρησης της αντίστασης της μεμβράνης καθόλη τη διάρκεια των πειραμάτων.

2.1.5 Νευροφαρμακολογία in vitro: Για να μελετηθούν τα μετασυναπτικά διεγερτικά δυναμικά που οφείλονται αποκλειστικά σε διέγερση των υποδοχέων NMDA έγιναν οι παρακάτω φαρμακολογικοί χειρισμοί: χρησιμοποιήθηκε διάλυμα που περιείχε τον ανταγωνιστή των AMPA υποδοχέων, 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione disodium (CNQX) (TOCRIS, UK), τον ανταγωνιστή των GABA_A υποδοχέων bicuculline methochloride (TOCRIS, UK) και τον ανταγωνιστή των GABA_B υποδοχέων (3-aminopropyl-diethoxymethyl-phosphinic acid, CGP 35348). Οι παραπάνω ουσίες προστίθενται στο υγρό διαπότισης των τομών (TENY).

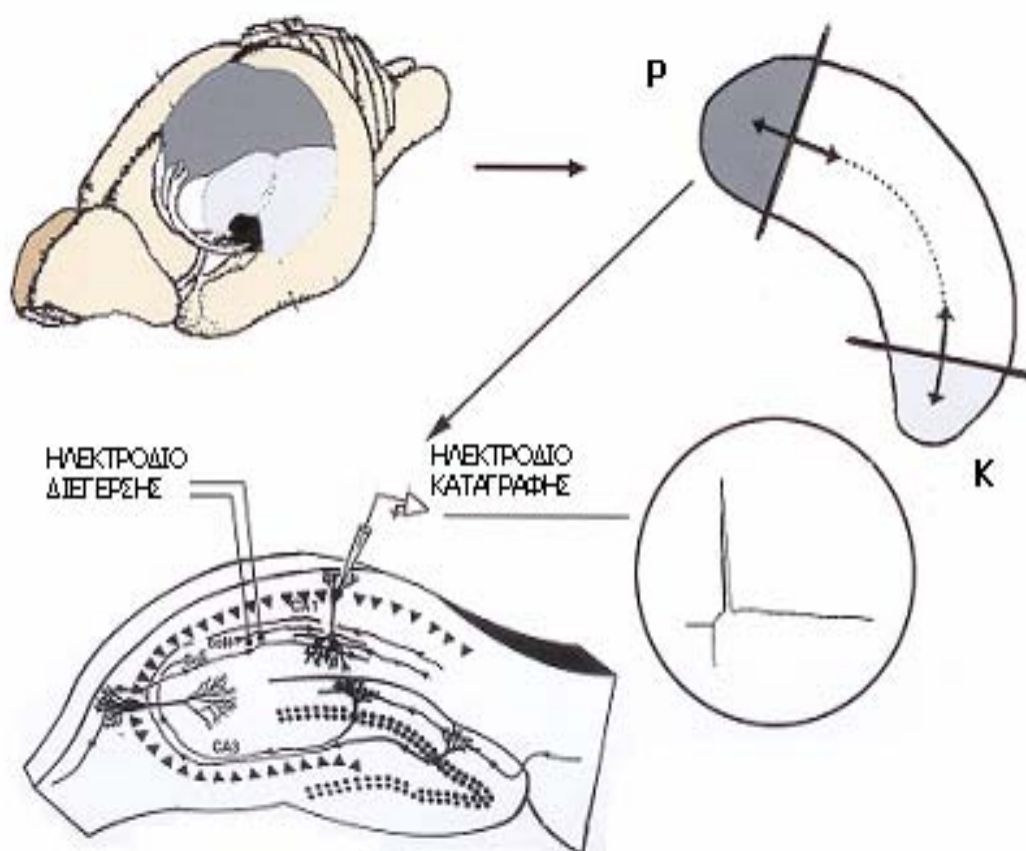
2.1.6 Στατιστική μελέτη: Τα δεδομένα εκφράστηκαν με τον μέσο όρο \pm το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (S.E.M.). Για τη σύγκριση μεταξύ των τιμών χρησιμοποιήθηκε το Student's t-test. Σημαντικά στατιστική διαφορά καθορίστηκε για τις τιμές που εμφάνιζαν $p < 0,05$. Σε όλες τις περιπτώσεις n καθορίστηκε ως ο αριθμός των νευρώνων.

2.1.7 Ιστολογία: Μετά την ολοκλήρωση της καταγραφής των ηλεκτροφυσιολογικών ιδιοτήτων των νευρώνων ακολούθησε ενδοκυτταρική

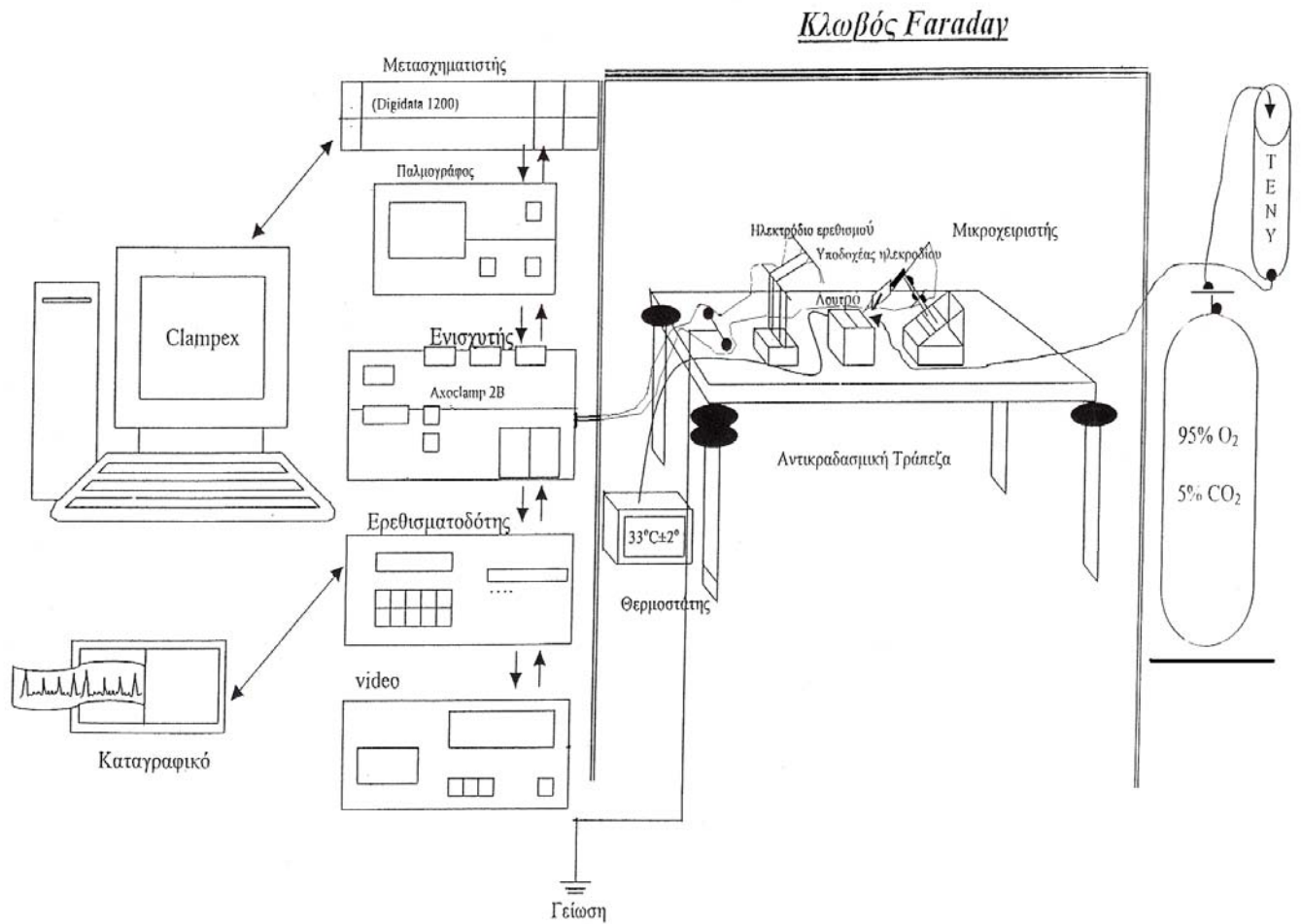
ιοντοφόρηση βιοκυτίνης με χορήγηση παλμών καθοδικού ρεύματος για περίπου 40 λεπτά (συνεχές υπερπολωτικό ρεύμα πλάτους 0,5 nA συνδυαζόμενο με παροδικό ρεύμα ορθογώνιου παλμού πλάτους 0,5 nA και διάρκειας 1 sec). Οι τομές παρέμειναν στο καταγραφικό λουτρό για 30-60 λεπτά περαιτέρω προκειμένου η βιοκυτίνη να διαχυθεί ως τους πιο απομακρυσμένους δενδρίτες.

2.1.8 Πρωτόκολλο χρώσης τομών:

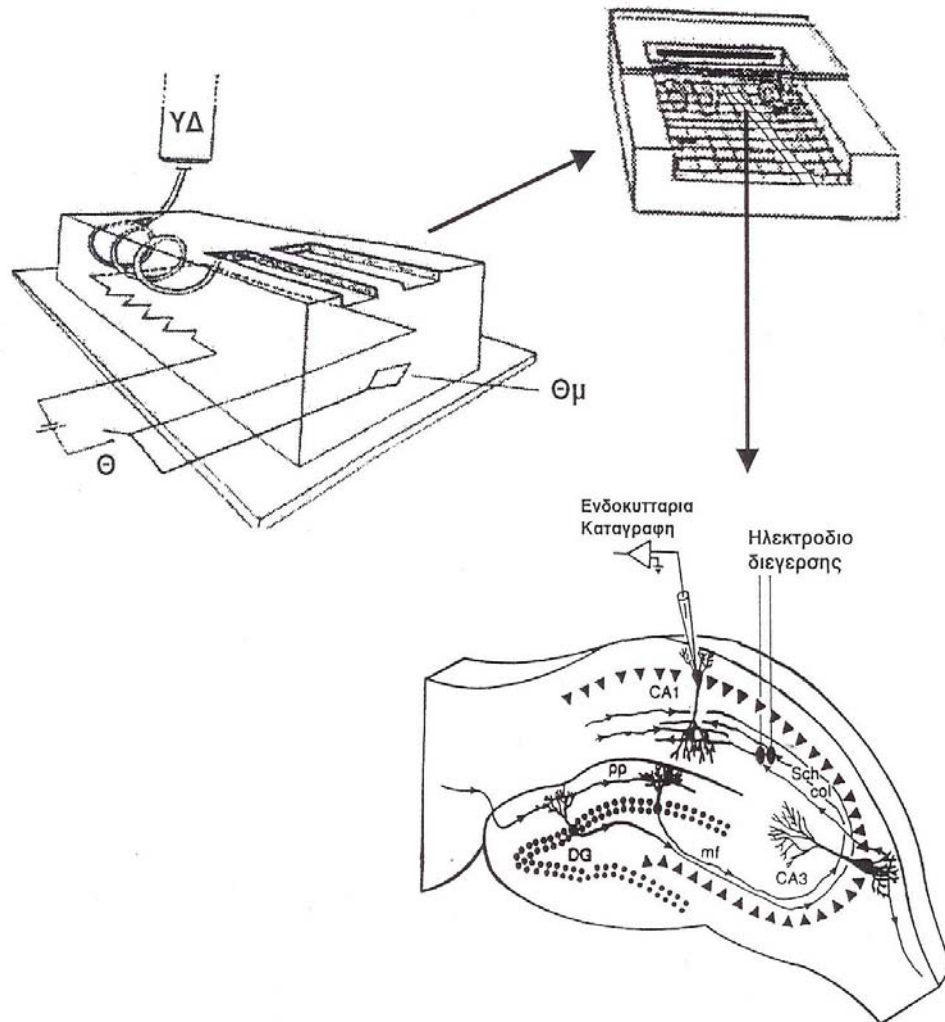
- Οι τομές τοποθετούνται για 24 ώρες σε 4° C σε γυάλινα τρυβλία Petri σε διάλυμα 4% παραφορμαλδεύδης σε 0,1 M φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (PBS, pH 7,2). Η μονιμοποίηση είναι απαραίτητη για την αποτροπή ενζυμικών ή οποιουδήποτε άλλου είδους αλλαγών που ενδεχομένως να αλλοιώσουν τη δομή του ιστού.
- Από τις αρχικές τομές προετοιμάζονται με τη βοήθεια μικροτόμου λεπτότερες τομές πάχους 80 μm.
- Οι τομές επωάζονται σε ατομικά ιστολογικά πηγαδάκια σε διάλυμα 3% H₂O₂ (12') για την εξουδετέρωση της δράσης της ενδογενούς υπεροξειδάσης και την αφαίρεση των μη ειδικών ενεργών συστατικών του περιβάλλοντος της τομής.
- Ακολουθεί ημίωρη επώαση των τομών ανά 10' σε διάλυμα 0,4% Triton X-100 PBS για την αύξηση της διαπερατότητας του ιστού και την απομάκρυνση της περίσσειας του H₂O₂.
- Οι τομές επωάζονται, για 3 ώρες σε ανακινούμενο δίσκο, με το σύστημα αβιδίνης-βιοτίνης (avidin-biotin-horseradish peroxidase, ABC kit Standard, Vector Labs., Vectastain) σε διάλυμα 0,4% Triton X-100 PBS.
- Στη συνέχεια ξεπλένονται αλληπάλληλα με 0,4% Triton X-100 PBS (3 φορές για 10' έκαστη) και γίνεται οπτικοποίηση των νευρώνων με ειδική αντίδραση σε διάλυμα 0,03% υπεροξειδίου και 0,1% τετραχλωρο-διαμινοβενζιδίνη (DAB, Fluka chemicals) διαλύματος Tris (pH 7,2), για 3-6 min.
- Οι τομές τοποθετούνται σε επιζελατινωμένες αντικειμενοφόρες πλάκες και τις αφήνουμε να στεγνώσουν για 24 ώρες.
- Ακολουθεί εμποτισμός με ξυλένιο, προκειμένου να απομακρυνθούν τα λιπίδια του ιστού.
- Τελικώς, οι τομές καλύπτονται με καλυπτρίδες χρησιμοποιώντας το σταθεροποιητή DPX.



Εικόνα 11: Μέθοδος λήψης λεπτών τομών ραχιαίας και κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου (επάνω μέρος της εικόνας). Τοποθέτηση του καταγραφικού μικροηλεκτροδίου εντός της πυραμιδικής στοιβάδας και του ηλεκτροδίου διέγερσης στην περιοχή της παράπλευρης οδού Schaffer (κάτω μέρος της εικόνας).



Εικόνα 12: Σύστημα καταγραφής-ανάλυσης δεδομένων.



Εικόνα 13: Ηλεκτροφυσιολογία του ιπποκάμπου *in vitro*. Υδατόλουτρο διπλής φάσης φιλοξενεί τις λεπτές τομές διαποτιζόμενες με θερμαινόμενο TENV υδροστατικά φερόμενο από υάλινο δοχείο (ΥΔ) (Θ=θερμοστάτης, Θμ=θερμόμετρο). Στη συγκεκριμένη τομή το καταγραφικό ηλεκτρόδιο είναι τοποθετημένο στον πυραμιδικό νευρώνα της CA1 στοιβάδας του ιπποκάμπου επίμυος και το ηλεκτρόδιο διεγερσης είναι τοποθετημένο στη περιοχή των παράπλευρων Schaffer για τη συναπτική καταγραφή.

2.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.2.1 Βασικές μεμβρανικές ιδιότητες

Το δυναμικό της μεμβράνης του κυττάρου σε κατάσταση ηρεμίας (RMP) δεν βρέθηκε να διαφέρει μεταξύ των δύο πληθυσμών κυττάρων (ραχιαίου-κοιλιακού). Συγκεκριμένα, η τιμή του δυναμικού ηρεμίας της μεμβράνης, η οποία προκύπτει όταν από την μετρούμενη τιμή του δυναμικού αφαιρεθεί η τιμή της διαφοράς δυναμικού που οφείλεται στη διαφορά αγωγιμότητας μεταξύ του ηλεκτροδίου και του εσωτερικού του κυττάρου, βρέθηκε να είναι $-63,6 \pm 0,5$ mV στα κύτταρα του κοιλιακού και $-64,5 \pm 0,5$ mV στα κύτταρα του ραχιαίου ιπποκάμπου, $p < 0,05$ (Πίνακας 1).

Για τον προσδιορισμό της αντίστασης εισόδου των κυττάρων (R_N), εφαρμόστηκε υπερπολωτικός παλμός έντασης 0,5 nA και διάρκειας 150 msec. Η αντίσταση εισόδου υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας το πηλίκο:

$$R_N = V_o / I_o$$

Όπου I_o η τιμή του εφαρμοζόμενου τετράγωνου παλμού ρεύματος και V_o η μέγιστη τιμή του δυναμικού της μεμβράνης μετά από την εκθετικής μορφής μεταβολή της τιμής τάσης της μεμβράνης ως απάντηση στο εφαρμοζόμενο ερέθισμα, η οποία δίνεται από τη σχέση:

$$V_m = V_o e^{-t/\tau}$$

Όπου $\tau = RC$ η χρονική σταθερά της μεμβράνης του κυττάρου, που αντιπροσωπεύει το χρόνο που απαιτείται για την αύξηση της τάσης της μεμβράνης του κυττάρου στο 66,3 % της μέγιστης τιμής της. Όπου R ορίζεται η τιμή της αντίστασης εισόδου και C η τιμή της χωρητικότητας της μεμβράνης του κυττάρου. Με βάση τα παραπάνω η αντίσταση εισόδου της μεμβράνης των κυττάρων του ραχιαίου ιπποκάμπου βρέθηκε να είναι $48,2 \pm 2,2$ MΩ, ενώ των κυττάρων του κοιλιακού ιπποκάμπου $53,8 \pm 3,1$ MΩ, $p < 0,05$. Επιπλέον, όσον αφορά τη σταθερά χρόνου, η τιμή της στα κύτταρα του ραχιαίου ιπποκάμπου βρέθηκε $15,6 \pm 0,6$ ms, ενώ στα κύτταρα του κοιλιακού $14,8 \pm 0,7$ ms, $p > 0,05$.

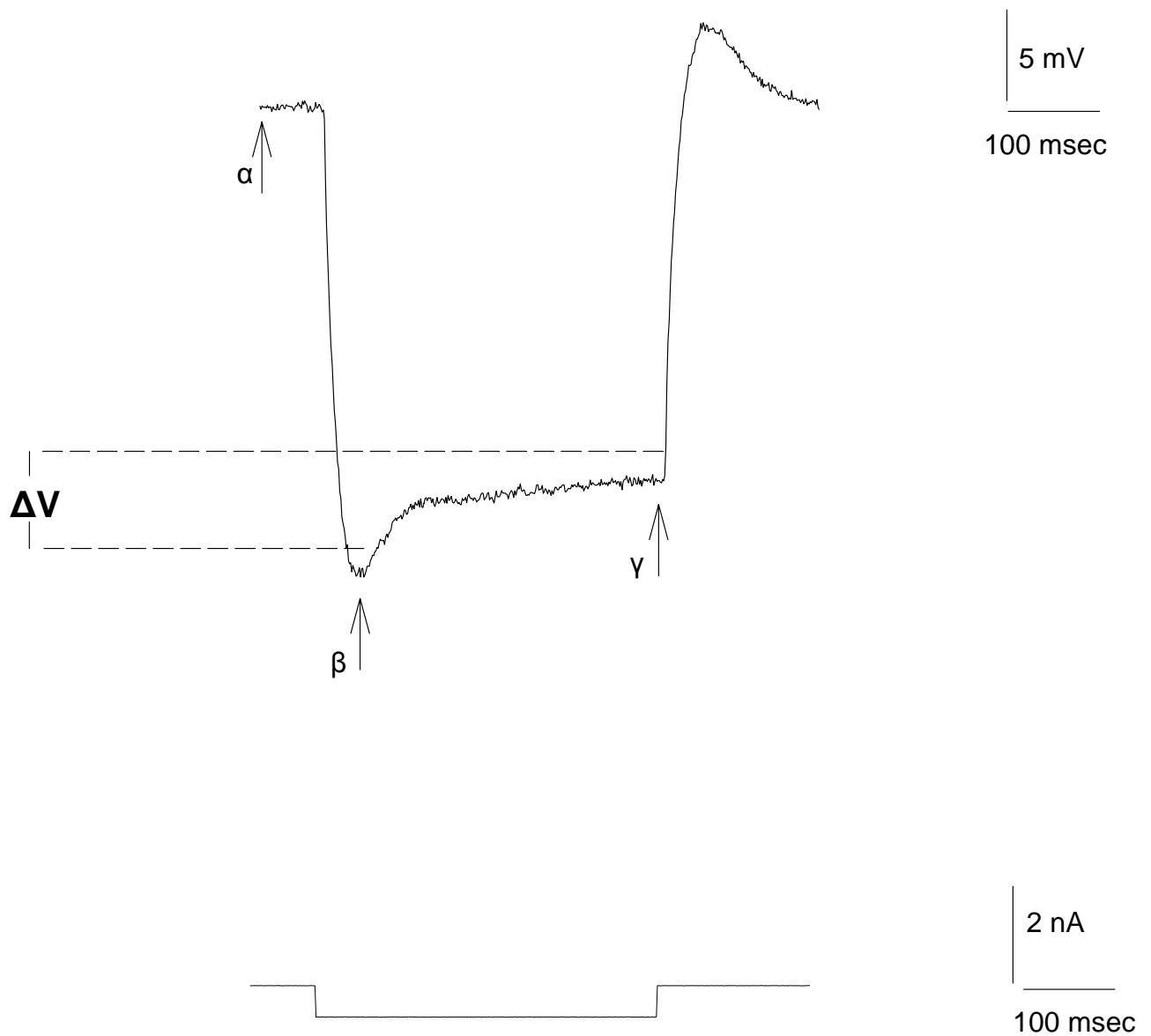
Πίνακας 1: Παθητικές μεμβρανικές ιδιότητες

	RMP (mV)	Ri (MΩ)	Σταθερά χρόνου (ms)	Ih Sag	Ih Dv
Ραχιαίος (n=65)	-64,5 ± 0,4	48,2 ± 2,2	15,7 ± 0,6	0,95 ± 0.004	4,86 ± 0,33
Κοιλιακός (n=50)	-63,7 ± 0,5	53,8 ± 3,1	14,8 ± 0,7	0,96 ± 0.004	5,14 ± 0,45

2.2.2 Αγωγιμότητα Ih

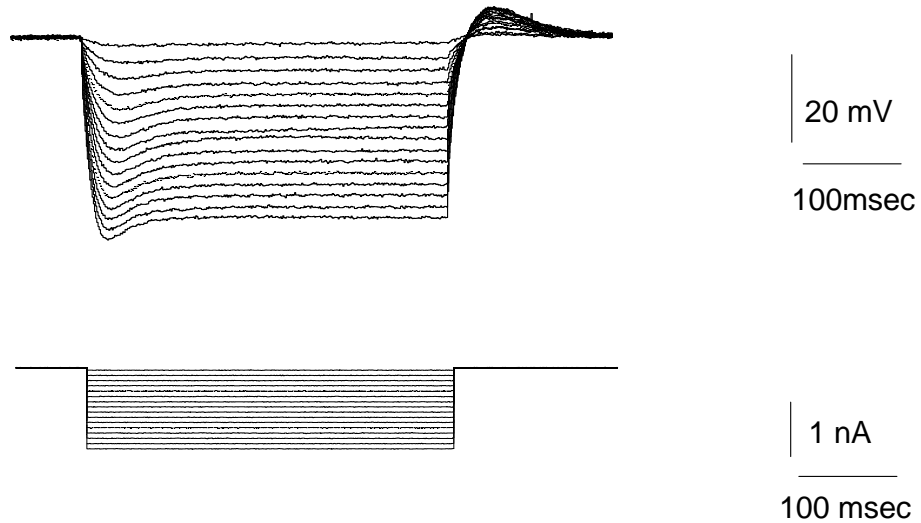
Κατά την εφαρμογή ορθογώνιου υπερπολωτικού παλμού ρεύματος έντασης -0,5 ως -1,0 nA και διάρκειας 150 msec ενεργοποιείται διάυλος που άγει ιόντα K^+ - Na^+ (διάυλος Ih ή Iq) προκαλώντας τελικά καθαρή ροή θετικών ιόντων προς το εσωτερικό του κυττάρου. Αποτέλεσμα αυτής είναι η μερική εκπόλωση της μεμβράνης του κυττάρου με αποτέλεσμα την εμφάνιση στη κυματομορφή μεταβολής της τάσης της μεμβράνης σε συνάρτηση με το χρόνο μιας ανοδικής κλίσης, αμέσως μετά τη μέγιστη τιμή υπερπόλωσης (V_{Peak}). Προκειμένου να προσδιοριστεί η επίδραση της ενεργοποίησης του διαύλου Ih υπολογίζεται η διαφορά δυναμικού $dV = V_{Peak} - V_{steady\ state}$, όπου V_{Peak} η τιμή της διαφοράς δυναμικού μεταξύ της μέγιστης αρνητικής τιμής του δυναμικού της μεμβράνης και της τιμής του δυναμικού ηρεμίας του νευρώνα και $V_{steady\ state}$ η τιμή της διαφοράς δυναμικού μεταξύ της αρνητικής τιμής στη σταθερή κατάσταση και της τιμής του δυναμικού ηρεμίας του νευρώνα (Εικόνα 14). Η τιμή της ανοδικής κλίσης που προκαλεί το ρεύμα του

διαύλου Ih αυξάνει παράλληλα με την αύξηση της έντασης του εφαρμοζόμενου υπερπολωτικού παλμού ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται και ελάττωση του χρόνου εμφάνισης της αρνητικής της μέγιστης τιμής του δυναμικού της μεμβράνης. Η μέτρηση της τιμής $dV = V_{\text{Peak}} - V_{\text{steady state}}$ πραγματοποιήθηκε σε τιμές δυναμικού πλησίον του -100 mV όπου και έχει βρεθεί ότι εμφανίζεται το 50% της μέγιστης ενεργοποίησης του διαύλου. Από τις μετρήσεις προκύπτει ότι δεν υφίσταται διαφορά μεταξύ των δύο πληθυσμών κυττάρων όσον αφορά τη γενικότερη επίδραση που προκαλεί η ενεργοποίηση του πληθυσμού των διαύλων Ih στις δύο κατηγορίες κυττάρων.

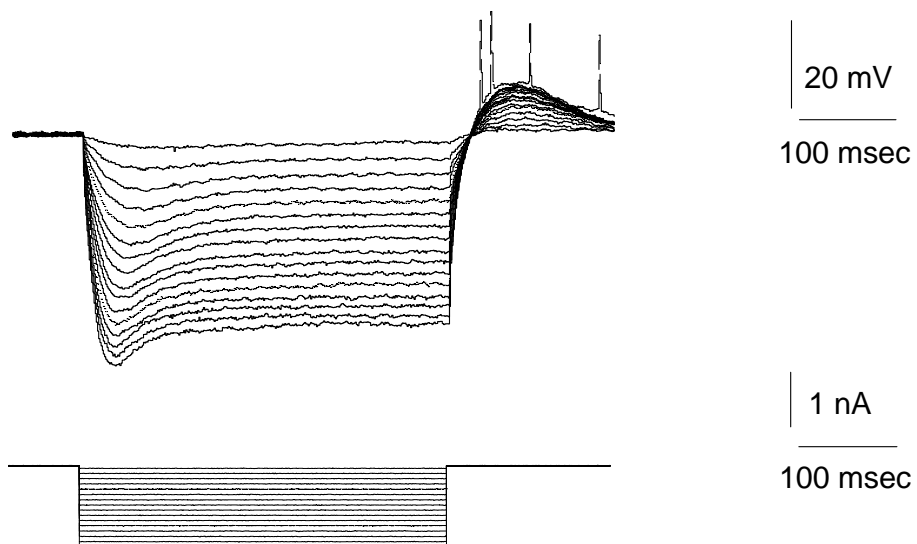


Εικόνα 14: Υπολογισμός της εκπόλωσης που προκαλεί η ενεργοποίηση του ιοντικού διαύλου I_h μετά την εφαρμογή ορθογώνιου εκπολωτικού παλμού. Όπου α το δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης του νευρώνα, β η μέγιστη τιμή υπερπόλωσης της μεμβράνης του νευρώνα μετά την εφαρμογή ορθογώνιου παλμού ρεύματος, γ η τάση της μεμβράνης του νευρώνα μετά από ενεργοποίηση του διαύλου I_h .

ΡΑΧΙΑΙΟΣ



ΚΟΙΛΙΑΚΟΣ



Εικόνα 15: μεταβολή του δυναμικού της μεμβράνης νευρώνων του ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου μετά την εφαρμογή διαδοχικών υπερπολωτικών παλμών ρεύματος. Με την αύξηση της έντασης του εφαρμοζόμενου ερεθίσματος παρατηρείται ελάττωση του χρόνου εμφάνισης της μέγιστης αρνητικής τιμής δυναμικού των νευρώνων.

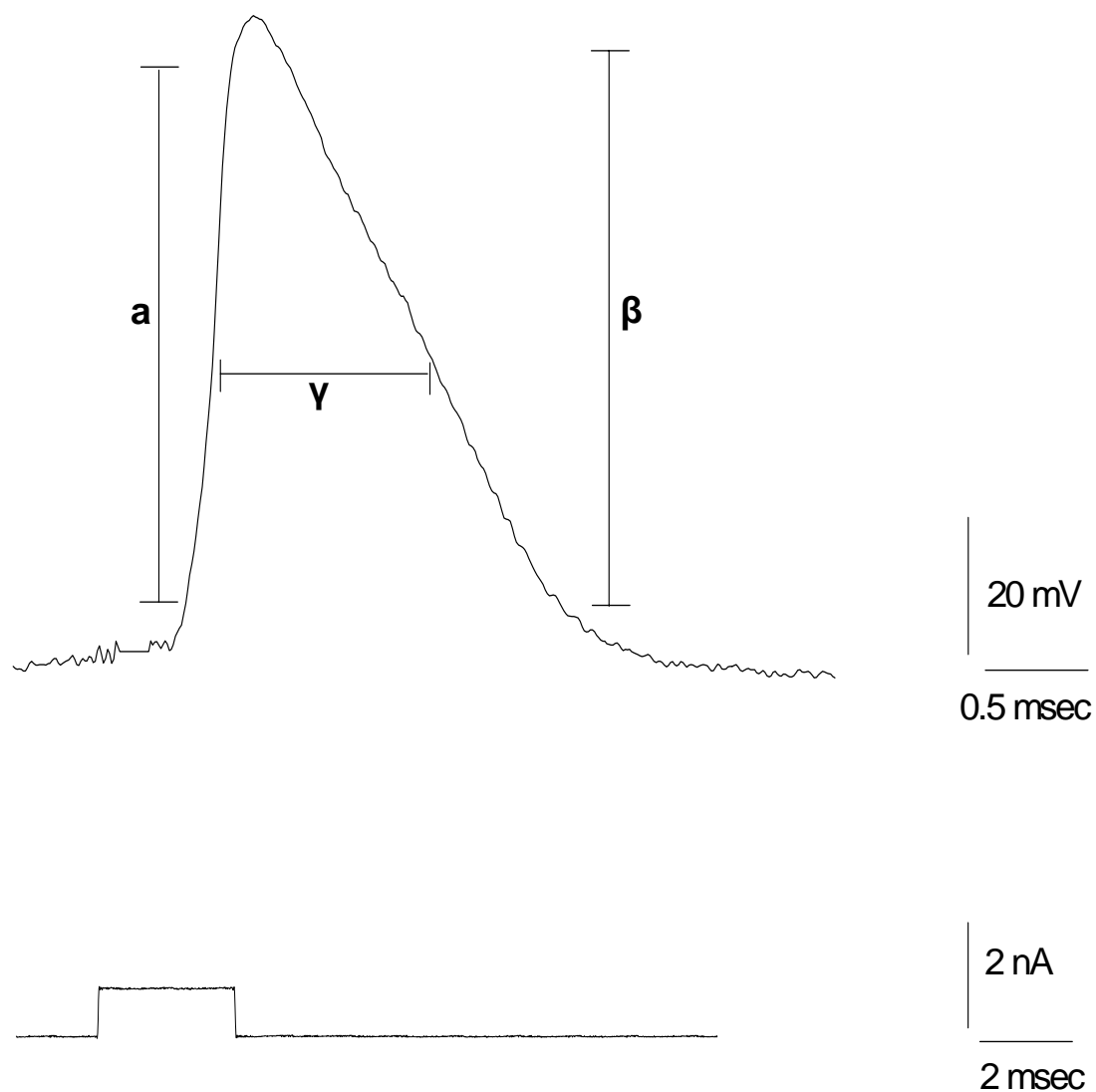
2.2.3 Δυναμικό ενέργειας

Μετά από χορήγηση ουδικού ορθογώνιου εκπολωτικού παλμού διάρκειας 5 msec και ποικίλης έντασης (εξαρτώμενης από την τιμή του δυναμικού ηρεμίας του εκάστοτε νευρώνα) προκλήθηκαν μονήρη δυναμικά ενέργειας. Με τη χρησιμοποίηση κατάλληλου λογισμικού προγράμματος (Pclamp6) μετρήθηκαν διάφορες παράμετροι της κυματομορφής του δυναμικού ενέργειας όπως: το πλάτος, που ορίζεται ως η απόλυτη τιμή της διαφοράς δυναμικού μεταξύ της βασικής γραμμής και της μέγιστης τιμής του δυναμικού ενέργειας, ο χρόνος ανόδου (ο χρόνος που απαιτείται για την μεταβολή της τιμής του δυναμικού της μεμβράνης από το 10% - 90% της μέγιστης απόλυτης τιμής του δυναμικού ενεργείας κατά τη φάση ανόδου), ο χρόνος καθόδου (ο χρόνος που απαιτείται για την μεταβολή της τιμής του δυναμικού της μεμβράνης από το 10% - 90% της μέγιστης απόλυτης τιμής του δυναμικού ενεργείας κατά τη φάση καθόδου), η ημίσεια διάρκεια του δυναμικού ενέργειας (ο χρόνος που μεσολαβεί από τη χρονική στιγμή μέτρησης του 50% της μέγιστης απόλυτης τιμής κατά τη φάση ανόδου ως το τη χρονική στιγμή μέτρησης του 50% της μέγιστης τιμής κατά τη φάσης καθόδου, Εικόνα 16).

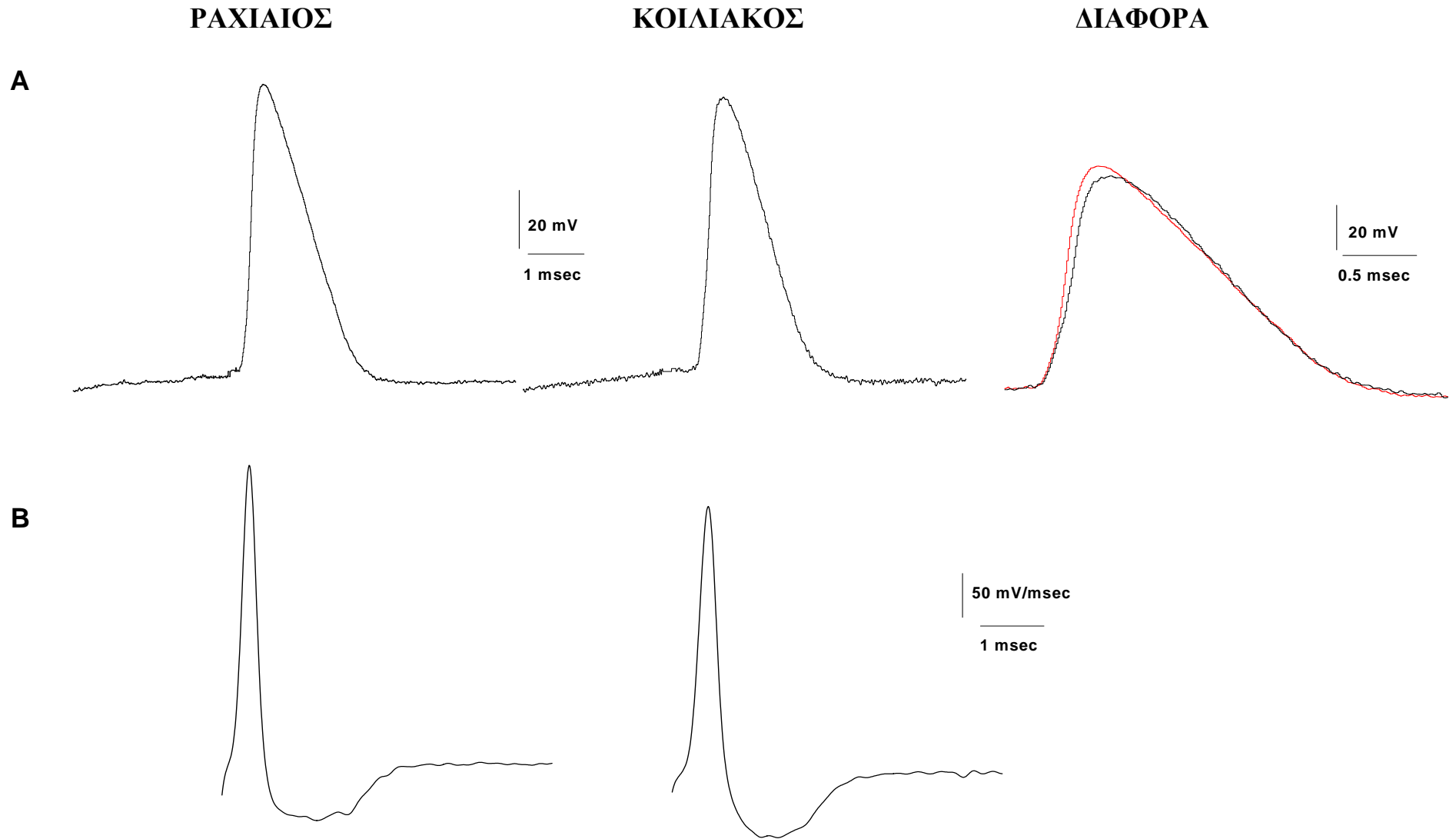
Επιπλέον, υπολογίστηκε ο ρυθμός μεταβολής (dV/dt) του δυναμικού της μεμβράνης κατά τη διάρκεια του δυναμικού ενέργειας υπολογίζοντας την πρώτη παράγωγο της μεταβολής του δυναμικού της μεμβράνης κατά τη διάρκεια του δυναμικού ενέργειας. Η φάση εκπόλωσης της μεμβράνης του δυναμικού ενέργειας αντιστοιχεί στην φάση ανόδου της κυματομορφής της πρώτης παραγώγου, η κορυφή της οποίας υποδεικνύει το χρονικό σημείο όπου η μεταβολή του δυναμικού της μεμβράνης του κυττάρου έχει λάβει τη μέγιστη τιμή της (Εικόνα 17). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί :

Πίνακας 2: Ενεργητικές μεμβρανικές ιδιότητες

	Ραχιαίος	Κοιλιακός
Μονήρη δυν. Ενέργειας		
Πλάτος (mV)	95,0 ± 1,36 (21)	90,0 ± 2,2 (20)
Χρόνος ανόδου (ms)	0,24 ± 0,01 (21)	0,29 ± 0,03* (20)
Χρόνος καθόδου (ms)	1,32 ± 0,06 (21)	1,45 ± 0,07 (20)
Διάρκεια στο μισό του μέγιστου πλάτους (ms)	1,23 ± 0,04 (21)	1,17 ± 0,05 (20)
Ρυθμός ανόδου (mV/ms)	413,5 ± 12,4 (21)	342,2 ± 17,8* (20)
Ρυθμός καθόδου (mV/ms)	-65,3 ± 2,6 (21)	-66,2 ± 2,5 (20)
AHPs		
fAHP (mV)	-5,7 ± 0,6 (38)	-3,4 ± 0,7* (24)
mAHP (mV)	-5,4 ± 0,4 (43)	-5,5 ± 0,4 (31)
sAHP (mV)	-6,8 ± 0,5 (43)	-5,1 ± 0,5* (28)



Εικόνα 16: πρόκληση δυναμικού ενέργειας μετά από εφαρμογή ορθογώνιου τετράγωνου παλμού. Όπου a ο χρόνος ανόδου, b ο χρόνος καθόδου και γ ο χρόνος ημίσειας διάρκειας του δυναμικού ενέργειας.



Εικόνα 17: α) αντιπροσωπευτικά δυναμικά ενέργειας κυττάρων του ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου, αντίστοιχα, β) απεικόνιση του ρυθμού μεταβολής του δυναμικού της μεμβράνης κατά τη διάρκεια των ανωτέρω δυναμικών ενέργεια

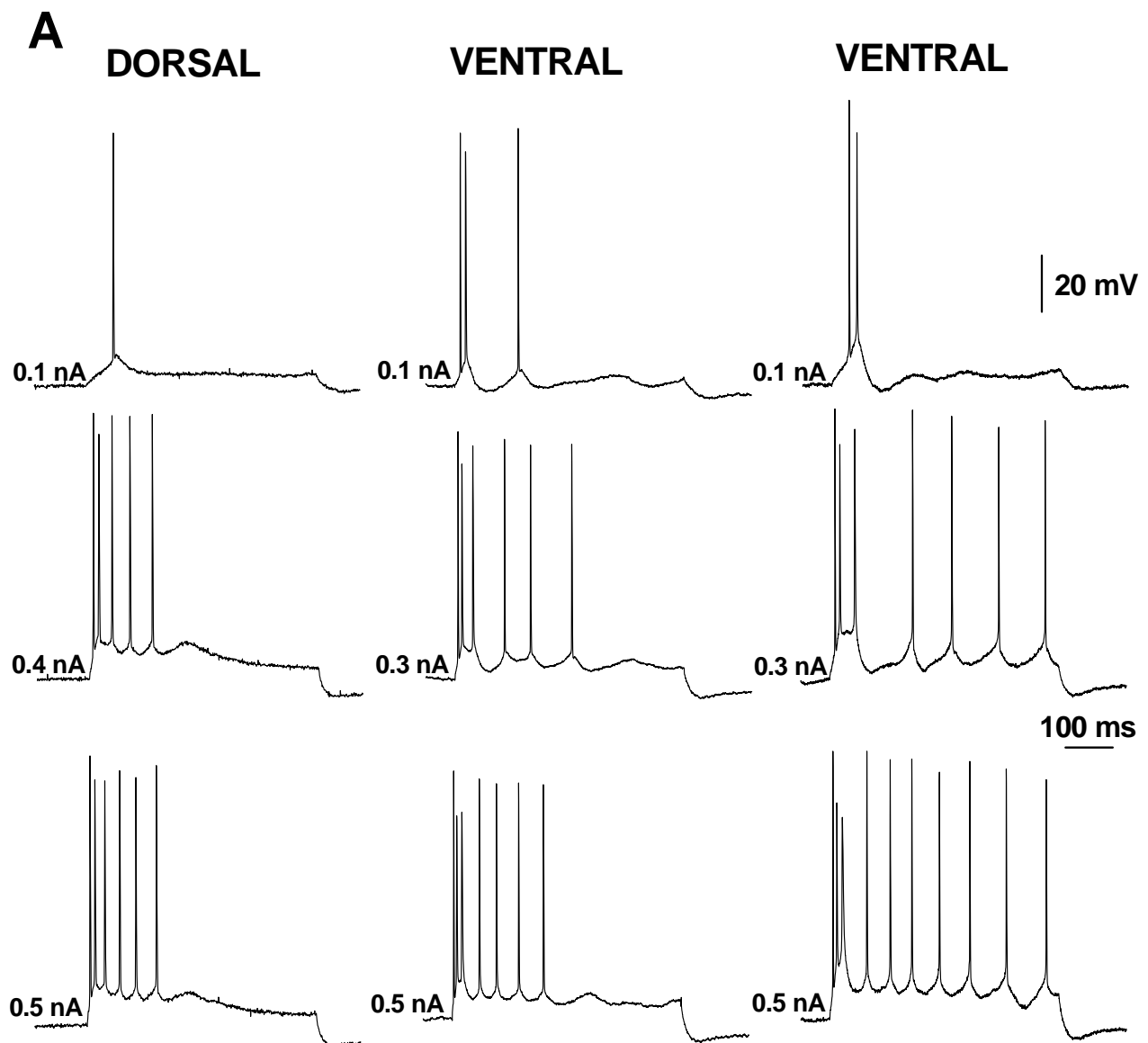
2.2.4 Επαναλαμβανόμενες εκφορτίσεις

Για την αξιολόγηση της απάντησης των πυραμιδικών νευρώνων σε εκπολωτικούς παλμούς μεγάλης διάρκειας εφαρμόστηκαν ορθογώνιοι εκπολωτικοί παλμοί διάρκειας 500 msec και αυξανόμενης έντασης από 0,1 – 1,0 nA. Οι πυραμιδικοί νευρώνες του ραχιαίου ιπποκάμπου ανταποκρίθηκαν στο εφαρμοζόμενο ερέθισμα με την εμφάνιση εξοικείωσης (accommodation), δηλαδή παύση της εμφάνισης δυναμικών ενέργειας σε ποσοστό 85% (40/47) επί των συνολικών κυττάρων. Το υπόλοιπο 15% δεν παρουσίαζε εξοικείωση με αποτέλεσμα την εμφάνιση δυναμικών ενέργειας καθόλη τη διάρκεια εφαρμογής του εκπολωτικού παλμού. Αντίθετα, στους νευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου το ποσοστό των κυττάρων που δεν παρουσίαζαν εξοικείωση (11/26) βρέθηκε να προσεγγίζει αυτό των κυττάρων που εμφάνιζαν εξοικείωση (15/26). Η αναλογία νευρώνων που παρουσίαζαν εξοικείωση προς αυτά που δεν παρουσίαζαν ήταν στατιστικά σημαντική μεταξύ νευρώνων του ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου (Chi-square test = 5,377, d.f.=1, $p < 0,05$; Εικόνα 18).

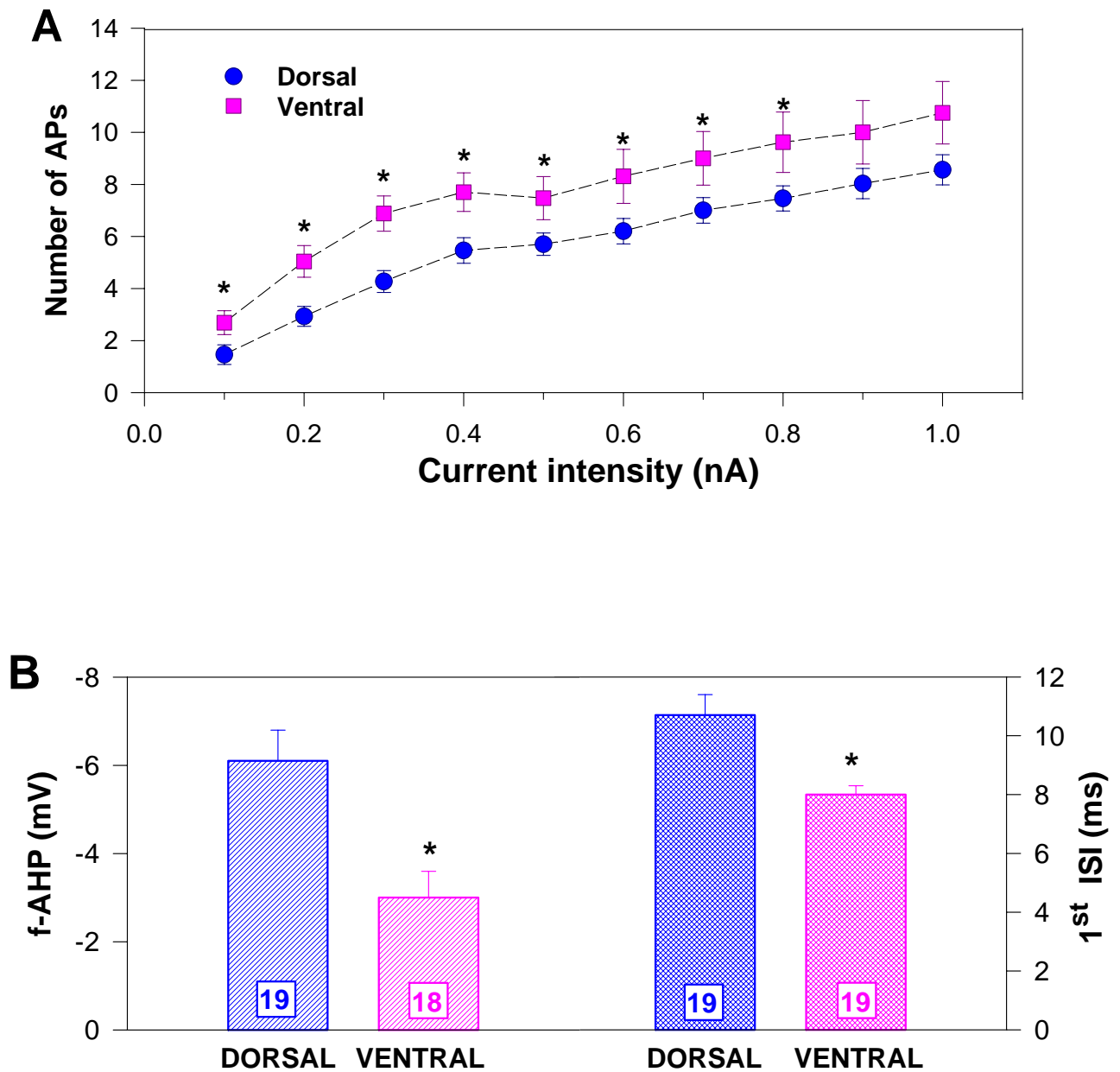
Οι πυραμιδικοί νευρώνες με βάση την απόκρισή τους σε εφαρμοζόμενο ερέθισμα διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: α) νευρώνες που αποκρίνονται με συνεχόμενα μονήρη δυναμικά ενέργειας και β) νευρώνες που αποκρίνονται με ριπές δυναμικών ενέργειας. Ως ριπή δυναμικών ενέργειας ορίζεται ομάδα 2-5 δυναμικών ενέργειας που προκαλούνται από παροδική αρχική εκπόλωση η οποία εμφανίζεται κατά τη διάρκεια μιας μακράς εκπόλωσης. Οι νευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου εμφάνιζαν ριπές δυναμικών ενέργειας σε ποσοστό (13/28) και μονήρη δυναμικά ενέργειας σε ποσοστό (15/28). Επιπλέον, από τους νευρώνες που παρουσίαζαν ριπές οι 6 στους 13 τις εμφάνιζαν σε μικρές τιμές έντασης εκπολωτικού παλμού ενώ οι υπόλοιποι σε αυξημένες τιμές ρεύματος. Αντιθέτως, οι περισσότεροι νευρώνες του ραχιαίου ιπποκάμπου, μετά την εφαρμογή εκπολωτικού παλμού, αντιδρούσαν με μονήρη δυναμικά ενέργειας και μόνο ένα μικρό ποσοστό (9/47) παρουσίαζε ριπές δυναμικών ενέργειας. Η αναλογία νευρώνων που παρουσίαζαν ριπές δυναμικών ενέργειας προς αυτά που παρουσίαζαν μονήρη δυναμικά ενέργειας ήταν στατιστικά σημαντική μεταξύ νευρώνων του ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου (Chi-square test = 5,06, d.f.=1, $p < 0,05$). Επιπλέον, 8 στους 9 ραχιαίους νευρώνες εμφάνιζαν ριπές δυναμικών ενέργειας μόνο μετά από αυξημένες τιμές εκπολωτικού ρεύματος.

Ο αριθμός των προκληθέντων δυναμικών ενέργειας που προκλήθηκαν ως απάντηση των εκπολωτικών παλμών είναι στατιστικά μεγαλύτερος στους νευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου, (student t-test, $p < 0,05$), γεγονός που συνηγορεί υπέρ της αυξημένης ικανότητας διέγερσης του σε σχέση με τον ραχιαίο μετά την εφαρμογή ίδιας έντασης και διάρκειας εκπολωτικών παλμών (Εικόνα 19).

Προς την ίδια κατεύθυνση συγκλίνουν και μετρήσεις που αφορούν το χρόνο που μεσολαβεί στην εμφάνιση μεταξύ του πρώτου και του δεύτερου δυναμικού ενέργειας. Σε νευρώνες του ραχιαίου ιπποκάμπου το χρονικό αυτό διάστημα είναι στατιστικά μεγαλύτερο απ' ό,τι σε νευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου (ραχιαίος: $11,9 \pm 0,8$ ms, $n=58$; κοιλιακός: $9,2 \pm 0,8$ ms, $n=42$, $p < 0,05$). Η αυξημένη πιθανότητα πρόκλησης δεύτερου δυναμικού ενέργειας σε νευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου μετά την εφαρμογή ορθογώνιου εκπολωτικού παλμού αποτελεί ένδειξη αυξημένης διεγερσιμότητας νευρώνων της περιοχής αυτής. Η παραπάνω διαφορά ενδέχεται να οφείλεται σε διαφορές σε αγωγιμότητες οι οποίες ενεργοποιούνται σε υποουδικά δυναμικά (π.χ. I_A , I_K , I_{NaP}) και οι οποίες ενεργώντας αθροιστικά ενδέχεται να εκπολώνουν περισσότερο τους κοιλιακούς νευρώνες, καθιστώντας τους περισσότερο διεγερσιμους. Κατά συνέπεια, ο χρόνος εμφάνισης δυναμικού ενέργειας σε νευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου ενδεχομένως να είναι μικρότερος. Ωστόσο, μετά από υπολογισμό του χρόνου εμφάνισης του πρώτου δυναμικού ενέργειας, μετρούμενου από την αρχή εφαρμογής του εκπολωτικού παλμού, δεν προέκυψε διαφορά που να δικαιολογεί την αρχική υπόθεση (ραχιαίος: $40,5 \pm 4,3$ ms, $n=54$; κοιλιακός: $32,4 \pm 3,9$, $n=48$, $p < 0,05$). Επιπλέον, καμία διαφορά δεν προέκυψε όσον αφορά την ελάχιστη απαιτούμενη ένταση ρεύματος (rheobase) για την πρόκληση του πρώτου δυναμικού ενέργειας (ραχιαίος: $0,19 \pm 0,02$ nA, $n=54$; κοιλιακός: $0,18 \pm 0,02$ nA, $n=48$, $p > 0,05$). Κατά συνέπεια, από τις παραπάνω μετρήσεις δεν φαίνεται να προκύπτει ότι η αυξημένη ικανότητα του κοιλιακού ιπποκάμπου για πρόκληση δεύτερου δυναμικού ενέργειας οφείλεται σε διαφορά υποουδικών αγωγιμοτήτων.



Εικόνα 18: Απόκριση νευρώνων του ραχιαίου και κοιλιακού υποκάμπτου μετά την εφαρμογή εκπολωτικών παλμών παρόμοιας έντασης. Και στις δύο ομάδες νευρώνων του κοιλιακού υποκάμπτου οι αποκρίσεις εγείρουν αρχικά ριπές δυναμικών ενέργειας. Η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων νευρώνων εντοπίζεται στο χρονική διάρκεια εμφάνισης δυναμικών ενέργειας.

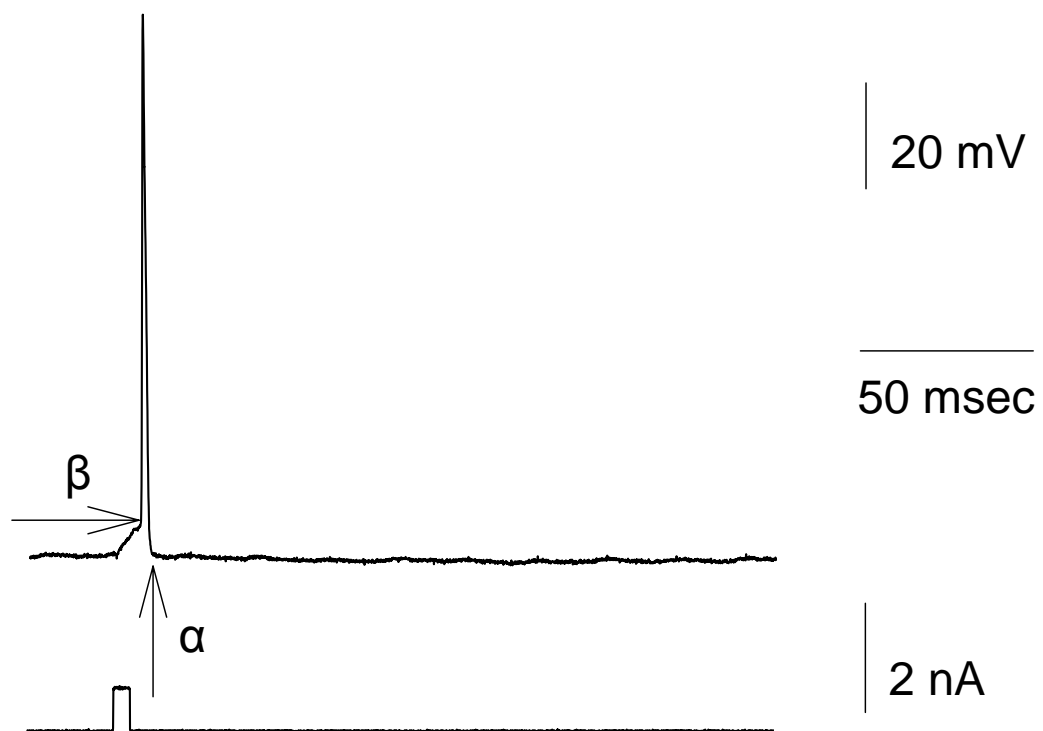


Εικόνα 19: Α) οι νευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπτου εμφανίζουν μεγαλύτερο αριθμό δυναμικών ενέργειας ως απάντηση σε ορθογώνιο εκπολωτικό παλμό μεγάλης διάρκειας. Β) το f-AHP είναι στατιστικά μικρότερο σε νευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπτου με αποτέλεσμα τη μείωση του χρόνου επανεμφάνισης ενός δεύτερου δυναμικού ενέργειας.

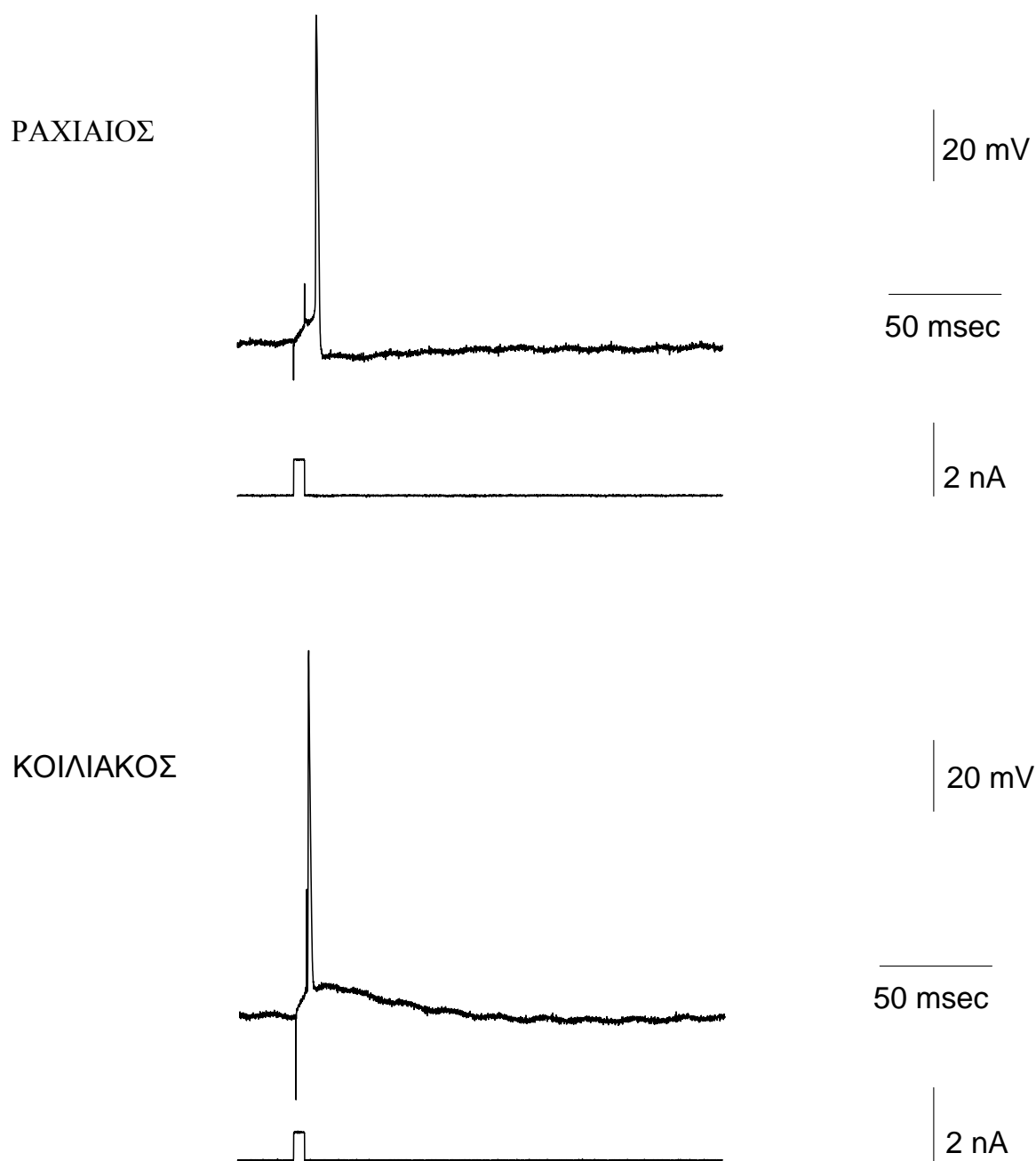
2.2.5 Μετα-υπερπολωτικά δυναμικά

Την επαναπόλωση της μεμβράνης μετά την εμφάνιση δυναμικών ενέργειας διαδέχονται τρία μετα-υπερπολωτικά δυναμικά τα οποία βάσει του χρόνου εμφάνισης του μέγιστου πλάτους τους περιγράφονται ως ταχύ-, μεσαίο- και αργό- μετα-υπερπολωτικό δυναμικό (fast-, f-AHP, medium-, m-AHP, και slow-, s-AHP afterhyperpolarization, αντίστοιχα). Το f-AHP διαδέχεται την επαναπόλωση της μεμβράνης του κυττάρου μετά το δυναμικό ενέργειας. Για την μελέτη του χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο του εκπολωτικού παλμού διάρκειας 5 msec. Το πλάτος του f-AHP υπολογίστηκε ως η διαφορά μεταξύ της ελάχιστης τιμής δυναμικού που καταγράφεται αμέσως μετά το δυναμικό ενέργειας και της τιμής δυναμικού του ουδού του νευρώνα (Εικόνα 20). Όπως προκύπτει από τις τιμές που ακολουθούν, το f-AHP είναι στατιστικά μεγαλύτερο στα πυραμιδικά κύτταρα του ραχιαίου ιπποκάμπου από ότι στα κύτταρα του κοιλιακού ιπποκάμπου (ραχιαίος: $-5,7 \pm 0,6$ mV, $n=38$; κοιλιακός: $-3,4 \pm 0,4$ mV $n=24$; $p < 0,05$; Εικόνα 21). Η μικρότερη τιμή του f-AHP που παρατηρήθηκε στους νευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου εξηγεί, τουλάχιστον εν μέρει, την αυξημένη επιρρέπεια των νευρώνων του κοιλιακού ιπποκάμπου για πρόκληση δεύτερου δυναμικού ενέργειας, καθώς όσο μεγαλύτερη είναι η υπερπόλωση που έπεται του δυναμικού ενέργειας τόσο μεγαλύτερης έντασης και διάρκειας εκπόλωση απαιτείται για την πρόκληση δυναμικού ενέργειας.

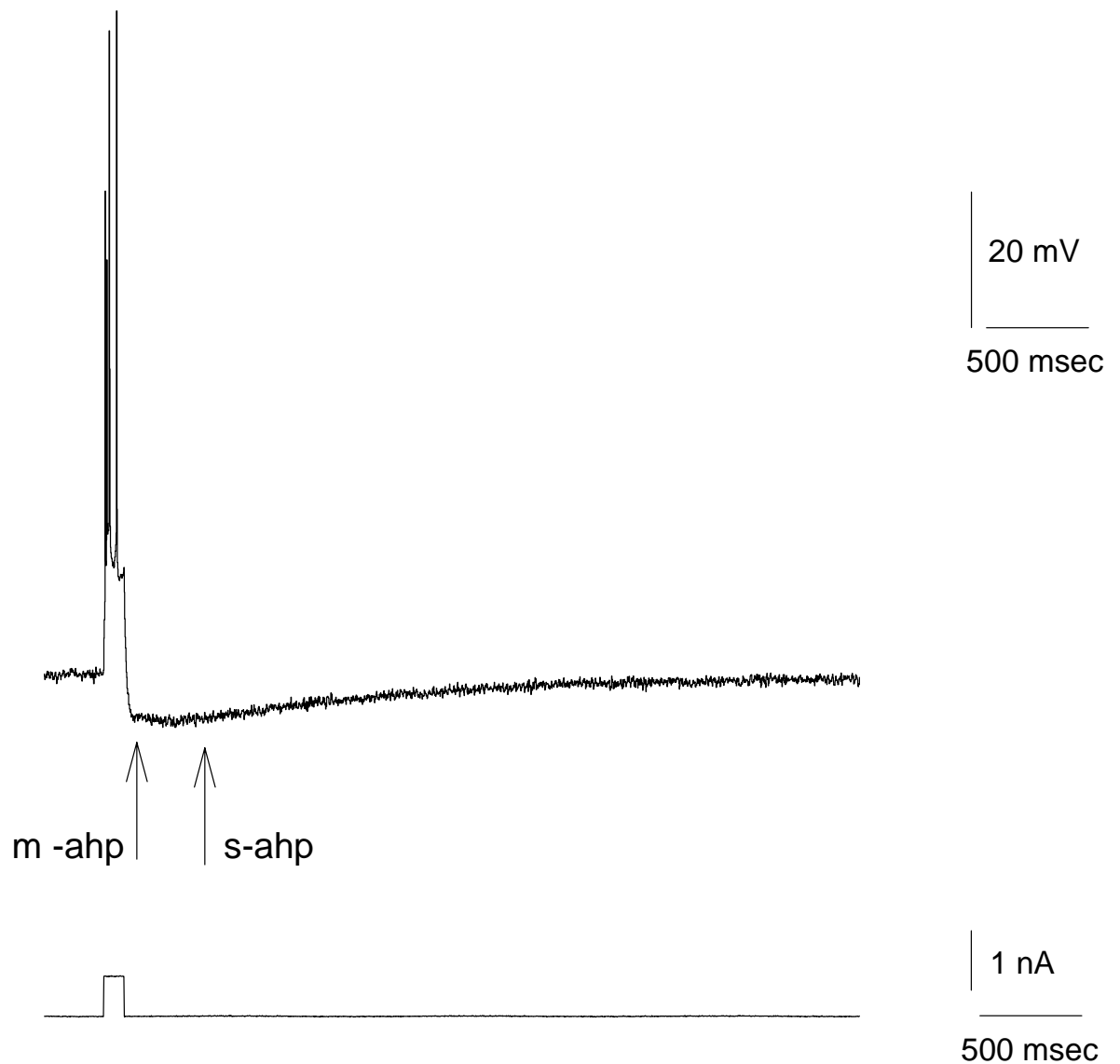
Όπως προαναφέρθηκε, του δυναμικού ενέργειας έπονται δύο ακόμη μετα-υπερπολωτικά δυναμικά: το m-AHP που διαρκεί 50-100 msec και το s-AHP που διαρκεί περισσότερο από 1 sec. Ωστόσο, και τα δύο μετα-υπερπολωτικά δυναμικά καθίστανται ευδιάκριτα μόνο μετά από ακολουθία δυναμικών ενέργειας οπότε και γίνεται άθροιση των αντιστοιχών μετα-υπερπολωτικών αγωγιμοτήτων του κάθε μονήρους δυναμικού ενέργειας. Κατά συνέπεια, για το υπολογισμό τους εφαρμόστηκε ορθογώνιος εκπολωτικός παλμός διάρκειας 150 msec και αυξανόμενης έντασης από 0,1-0,8 nA. Τόσο το m-AHP όσο και το s-AHP υπολογίστηκαν στο δυναμικό ηρεμίας ως η διαφορά μεταξύ της μέγιστης τιμής μετα-υπερπόλωσης, και της τιμής του δυναμικού της βασικής γραμμής, στα 350 και 850 msec, αντίστοιχα, από την αρχή του εκπολωτικού παλμού. (Εικόνα 22). Το s-AHP βρέθηκε στατιστικά μεγαλύτερο στα κύτταρα του ραχιαίου ιπποκάμπου (ραχιαίος: $-6,6 \pm 0,5$ mV $n=43$; κοιλιακός: $-5,1 \pm 0,5$ mV $n=31$; $p < 0,05$). Το m-AHP, παρότι μεγαλύτερο στα κύτταρα του ραχιαίου ιπποκάμπου, δεν βρέθηκε στατιστικά διαφορετικό (ραχιαίος: $-5,4 \pm 0,4$ mV $n=43$; κοιλιακός: $-5,5 \pm 0,3$ mV $n=31$, $p > 0,05$; Εικόνα 23).



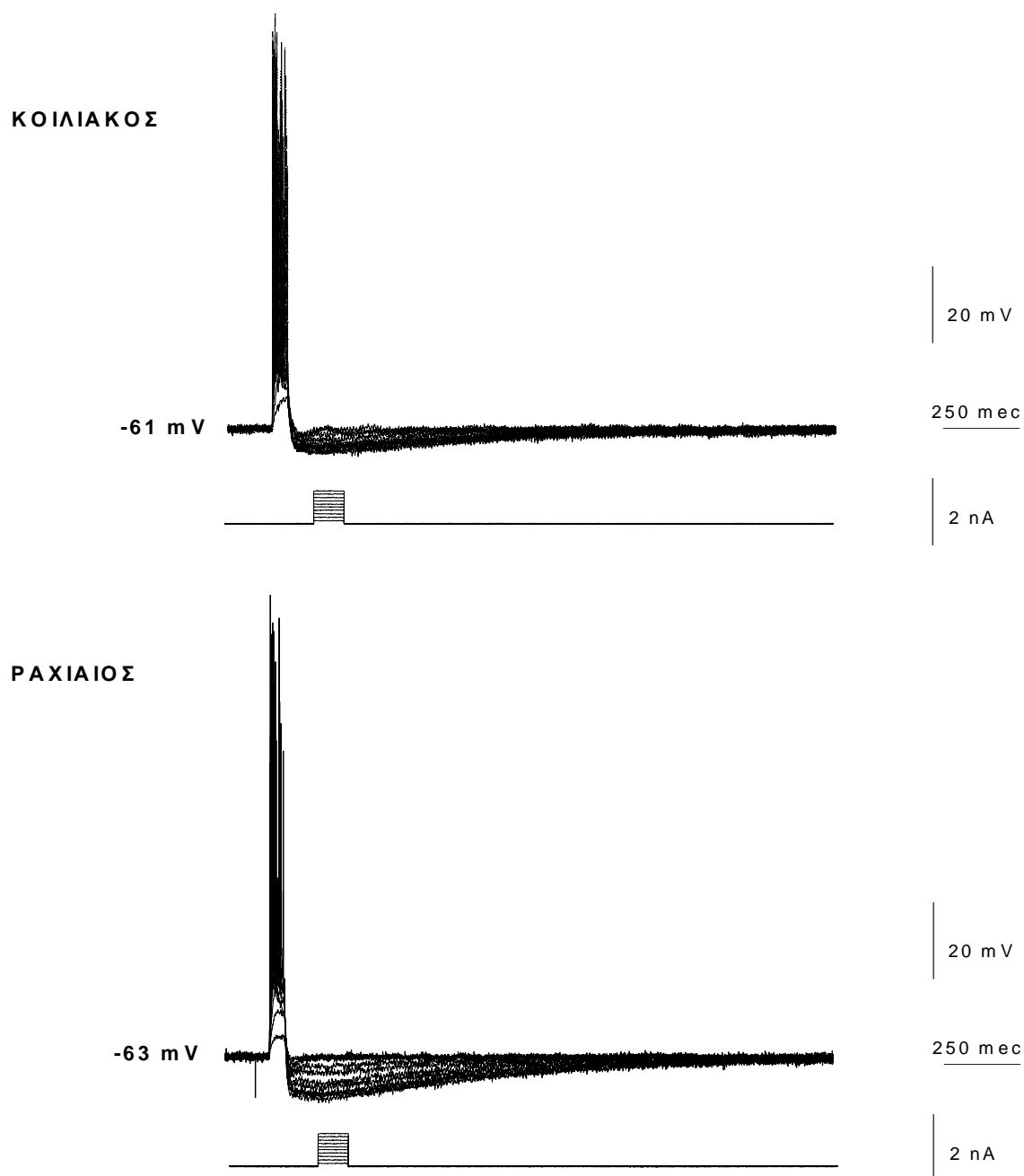
Εικόνα 20: Το πλάτος του f-ahr υπολογίζεται από τη διαφορά της τιμής του δυναμικού στο κατώτερο σημείο επαναπόλωσης (βέλος α) και της τιμής του δυναμικού στον ουδό (βέλος β).



Εικόνα 21: Αντιπροσωπευτικές κυματομορφές νευρώνων του ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου. Η τιμή του $f\text{-ahr}$ είναι συγκριτικά μεγαλύτερη σε νευρώνες του ραχιαίου ιπποκάμπου.



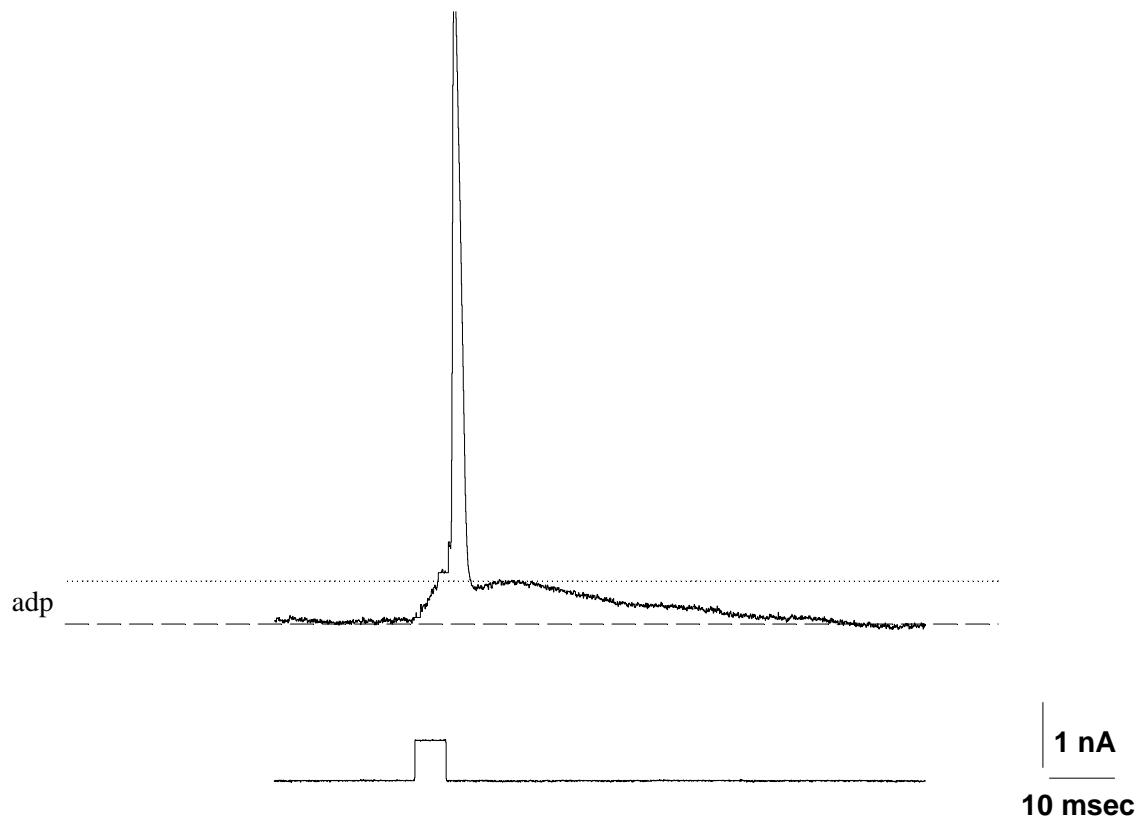
Εικόνα 22: Το πλάτος του μετα-υπερπολικού δυναμικού υπολογίζεται ως η διαφορά μεταξύ της μέγιστης τιμής μετα-υπερπόλωσης και της τιμής του δυναμικού ηρεμίας (βασική γραμμή). Τα βέλη υποδεικνύουν τη χρονική στιγμή κατά την οποία καταγράφεται η μέγιστη τιμή των m-ahp και s-ahp, αντίστοιχα.



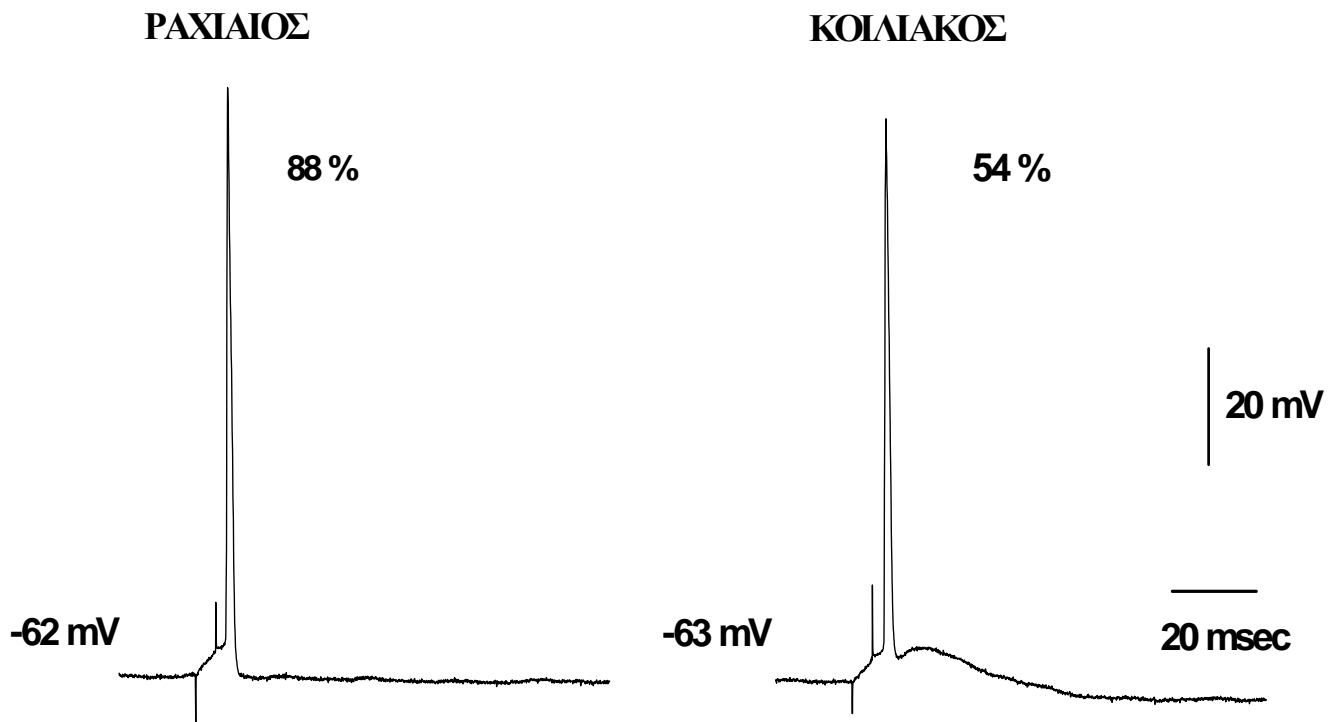
Εικόνα 23: Αύξηση του αριθμού των προκληθέντων δυναμικών ενέργειας έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του πλάτους των μετα-υπερπολωτικών δυναμικών. Ο κοιλιακός ιππόκαμπος εμφανίζει στατιστικά μικρότερες τιμές του πλάτους του s-ahr, αλλά όχι του m-ahr.

2.2.6 Μετα-εκπολωτικό δυναμικό

Μετά την εκδήλωση ενός δυναμικού ενέργειας και την εμφάνιση του μετα-υπερπολωτικού δυναμικού f-AHP, της επαναπόλωσης του δυναμικού της μεμβράνης έπεται ένα μετα-εκπολωτικό δυναμικό που ονομάζεται ADP (afterdepolarization). Το τελευταίο μετρήθηκε ως η διαφορά της τιμής του δυναμικού μεταξύ της μέγιστης τιμής μετα-εκπόλωσης και της τιμής του δυναμικού της βασικής γραμμής (Εικόνα 24). Δε βρέθηκε διαφορά στο πλάτος του μετα-εκπολωτικού δυναμικού μεταξύ των δύο μοιρών του ιπποκάμπου (ραχιαίος: $6,3 \pm 0,8$ mV; κοιλιακός: $5,9 \pm 0,6$ mV; $p > 0,05$ mV). Ωστόσο, κατέστη δυνατή η διάκριση του μετα-εκπολωτικού δυναμικού σε δύο χαρακτηριστικούς τύπους: το παθητικό ADP που εξασθενεί μονοτονικά (παθητικά) προς το δυναμικό ηρεμίας και το ενεργητικό του οποίου η εκπόλωση είναι μεγαλύτερη ως προς το πλάτος και τη διάρκεια και η παρουσία του σχετίζεται με την ανάπτυξη ριπών (Jensen et al., 1996). Οι δύο αυτοί τύποι ADP χαρακτηρίζονται από διαφορετικές τιμές διάρκειας (μετρούμενη από τη χρονική στιγμή της μέγιστης τιμής του f-ahr ως τη στιγμή που το δυναμικό της μεμβράνης επανέρχεται στην τιμή του δυναμικού ηρεμίας) και σταθεράς χρόνου (ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ των 2/3 της μέγιστης τιμής του ADP ως τη χρονική στιγμή τιμή κατά την οποία επανέρχεται η τιμή του δυναμικού στο δυναμικό ηρεμίας). Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι τόσο η διάρκεια όσο και η σταθερά χρόνου του ενεργητικού ADP (διάρκεια: $47,9 \pm 2,1$ ms; σταθερά χρόνου: $31,1 \pm 1,5$ ms; $n=18$) είναι στατιστικώς μεγαλύτερη από τις αντίστοιχες του παθητικού ADP (διάρκεια: $32,7 \pm 1,1$ ms; σταθερά χρόνου: $22,2 \pm 0,8$ ms; $n=28$). Το ποσοστό των νευρώνων που του κοιλιακού ιπποκάμπου που εμφανίζουν ενεργητικό ADP (15/23, 52%) σε σχέση με τους νευρώνες του ραχιαίου ιπποκάμπου (9/43, 21%) είναι σημαντικά μεγαλύτερο (Chi-square test = 4.441, d.f.=1, $p < 0.05$). Κατά συνέπεια, η εμφάνιση ενεργητικού μεταεκπολωτικού δυναμικού σχετίζεται με την περιοχή καταγραφής αφού οι νευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου παρουσιάζουν μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης ADP γεγονός που συνδέεται με την αυξημένη δυνατότητα τους να παρουσιάζουν ριπές δυναμικών ενέργειας.



Εικόνα 24: Το μεταεκπλωτικό δυναμικό υπολογίζεται ως η διαφορά δυναμικού μεταξύ της μέγιστης (θετικότερης) τιμής του μεμβρανικού δυναμικού αμέσως μετά το f-ahr (στικτή γραμμή) και της τιμής του δυναμικού της βασικής γραμμής (διακεκομένη γραμμή).



Εικόνα 25: Σε ποσοστό 88% επί του συνόλου των νευρώνων του ραχιαίου ιπποκάμπου δεν παρατηρείται μεταεκπολωτικό δυναμικό. Αντίθετα, 54% των νευρώνων του κοιλιακού ιπποκάμπου εμφανίζει μεταεκπολωτικό δυναμικό.

2.2.7 Συναπτικά δυναμικά

Διέγερση των ινών Schaffer με χορήγηση ορθογώνιων παλμών συχνότητας 50 Hz και αυξανόμενης έντασης προκλήθηκαν τυπικές μετασυναπτικές απαντήσεις στις οποίες διακρίνονται ένα διεγερτικό μετασυναπτικό δυναμικό (excitatory postsynaptic potential, EPSP), οφειλόμενο στη διέγερση υποδοχέων AMPA και NMDA, και ένα διφασικό ανασταλτικό υπερπολωτικό δυναμικό (inhibitory postsynaptic potential, ipsp), οφειλόμενο στη διέγερση υποδοχέων GABA_A και GABA_B. Προκειμένου να μελετηθεί το EPSP που οφείλεται στην ενεργοποίηση υποδοχέων τύπου NMDA χρησιμοποιήθηκαν ανταγωνιστές των υποδοχέων AMPA, GABA_A, GABA_B. (Εικόνες 26, 27).

Με τη χρησιμοποίηση του λογισμικού προγράμματος Clampfit 6 υπολογίστηκαν διάφορες παράμετροι του διεγερτικού μετασυναπτικού δυναμικού όπως: το πλάτος (η απόλυτη μετρούμενη τιμή της εκπόλωσης με σημείο αναφοράς τη βασική γραμμή), ο χρόνος ανόδου (ο χρόνος που απαιτείται για την μεταβολή της τιμής του δυναμικού της μεμβράνης από το 10% - 90% της μέγιστης απόλυτης τιμής του μετασυναπτικού διεγερτικού δυναμικού κατά τη φάση ανόδου), ο χρόνος καθόδου (ο χρόνος που απαιτείται για την μεταβολή της τιμής του δυναμικού της μεμβράνης από το 10% 90% της μέγιστης απόλυτης τιμής του μετασυναπτικού διεγερτικού δυναμικού κατά τη φάση καθόδου), η ημίσεια διάρκεια (ο χρόνος που μεσολαβεί από τη χρονική στιγμή μέτρησης του 50% της μέγιστης απόλυτης τιμής της φάσης ανόδου ως τη χρονική στιγμή μέτρησης του 50% της μέγιστης τιμής της φάσης καθόδου), το εμβαδόν (η επιφάνεια που οριοθετείται από τη γραμμή της καμπύλης του μετασυναπτικού δυναμικού και τα σημεία που τέμνεται με τον άξονα της βασικής γραμμής), η διάρκεια (ο χρόνος που ορίζεται από τα δύο σημεία τομής του μετασυναπτικού δυναμικού με τη βασική γραμμή), ο χρόνος κορύφωσης (ο χρόνος από την έναρξη μέτρησης της καταγραφής μέχρι το σημείο που το μετασυναπτικό δυναμικό φθάνει τη μέγιστη τιμή του; Εικόνα 26).

Όπως προκύπτει από τις μετρήσεις, το πλάτος και το εμβαδόν του μετασυναπτικού δυναμικού είναι στατιστικά μεγαλύτερο στους νευρώνες του ραχιαίου απ' ότι στους νευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου. Αντίθετα, η διάρκεια του μετασυναπτικού δυναμικού, ο χρόνος ανόδου, η ημίσεια διάρκεια και ο χρόνος κορύφωσης βρέθηκαν στατιστικά μεγαλύτερες στους νευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου. Όσον αφορά το χρόνο καθόδου είναι μεγαλύτερος στους νευρώνες του

κοιλιακού ιπποκάμπου χωρίς ωστόσο η στάθμη σημαντικότητας να είναι μικρότερη του 0,05. Επιπλέον, υπολογίσθηκε ο ουδός εκφόρτισης των νευρώνων ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου. Για τον ακριβή προσδιορισμό του σημείου επίτευξης του ουδού χρησιμοποιήθηκε η τρίτη παράγωγος της κυματομορφής του δυναμικού ενέργειας όπως έχει περιγραφεί σε προγενέστερη μελέτη (Henze and Buzsaki, 2001). Με βάση τα παραπάνω, οι τιμές του ουδού για τους νευρώνες του ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου είναι αντίστοιχα: $-50,7 \pm 0,76$ mV (n=8), $-530 \pm 0,66$ mV (n=8), $p < 0.05$. Κατά συνέπεια, οι νευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου εμφανίζουν χαμηλότερες τιμές ουδού πρόκλησης δυναμικών ενέργειας από ότι οι νευρώνες του ραχιαίου ιπποκάμπου (Εικόνα 28).

ΚΟΙΛΙΑΚΟΣ

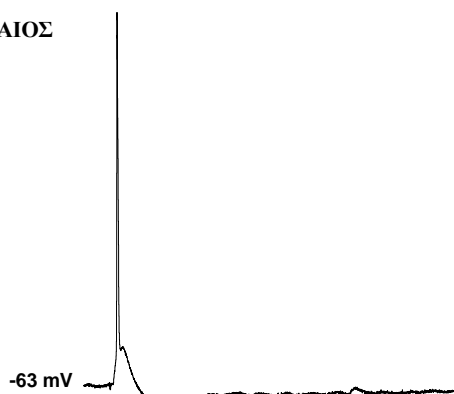
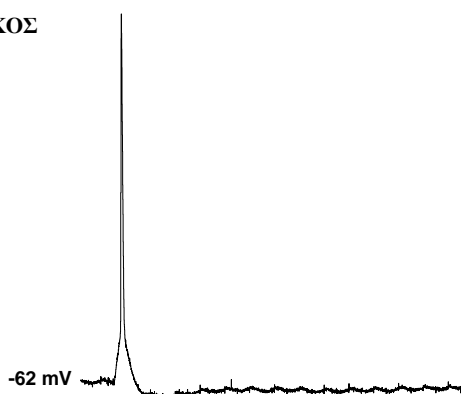
ΠΑΧΙΑΙΟΣ



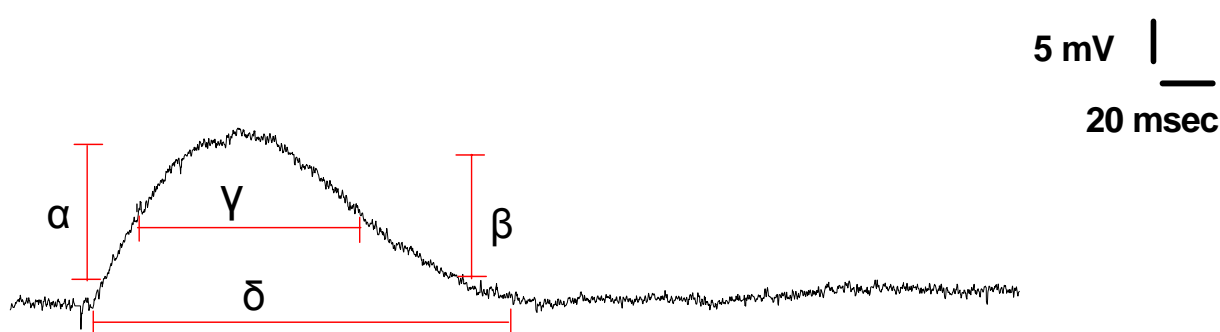
10 mV
50 msec

ΚΟΙΛΙΑΚΟΣ

ΠΑΧΙΑΙΟΣ



10 mV
50 msec

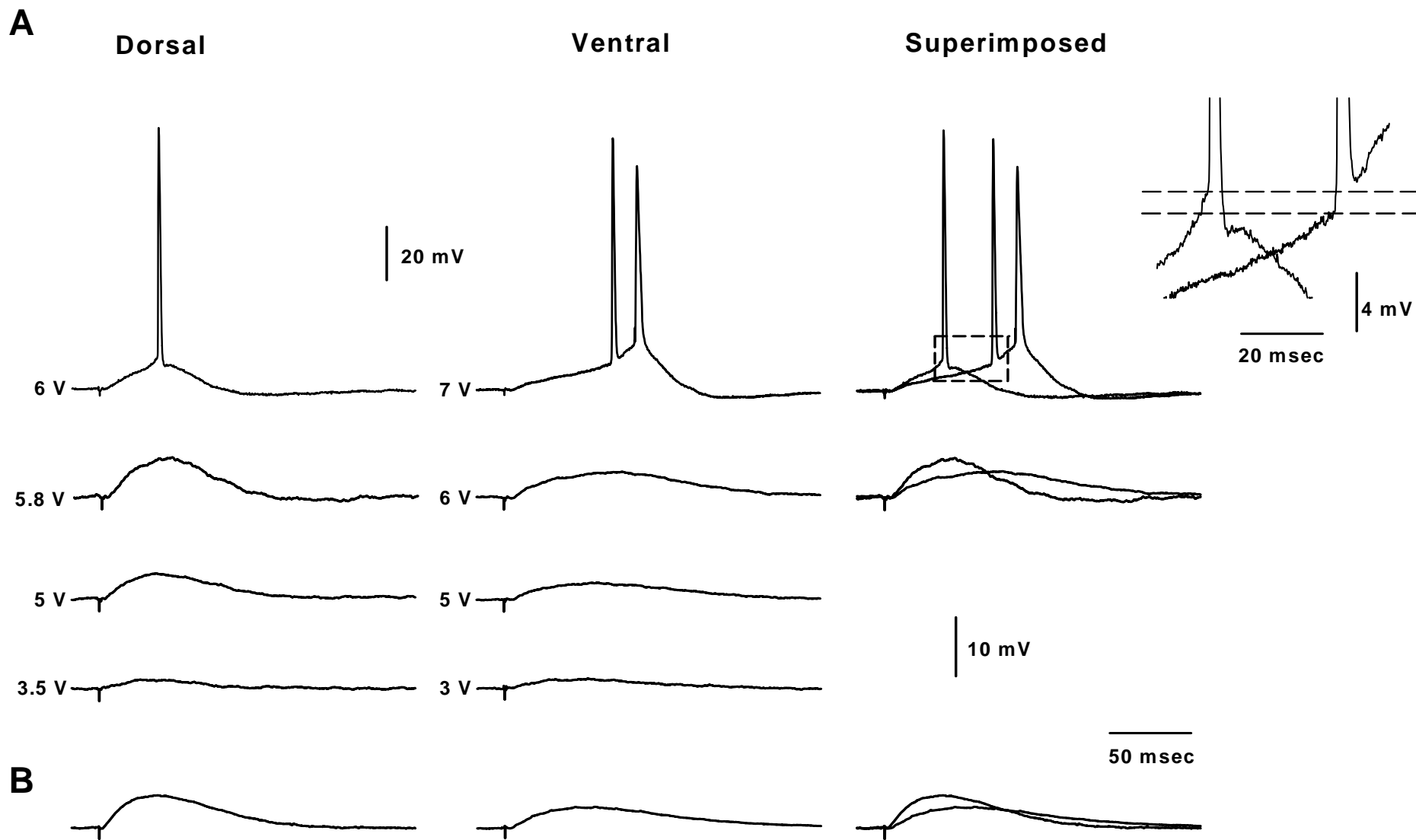


Εικόνα 26: Τυπικές κυματομορφές υποουδικών και ουδικών συναπτικών απαντήσεων μετά από ερεθισμό των ινών Schaffer (επάνω μέρος της εικόνας). Μέτρηση των χαρακτηριστικών του NMDA-διαμεσολαβούμενου EPSP σε νευρώνες ιπποκάμπου παρουσία ανταγωνιστών των υποδοχέων AMPA, GABA_A και GABA_B (κάτω μέρος της εικόνας).

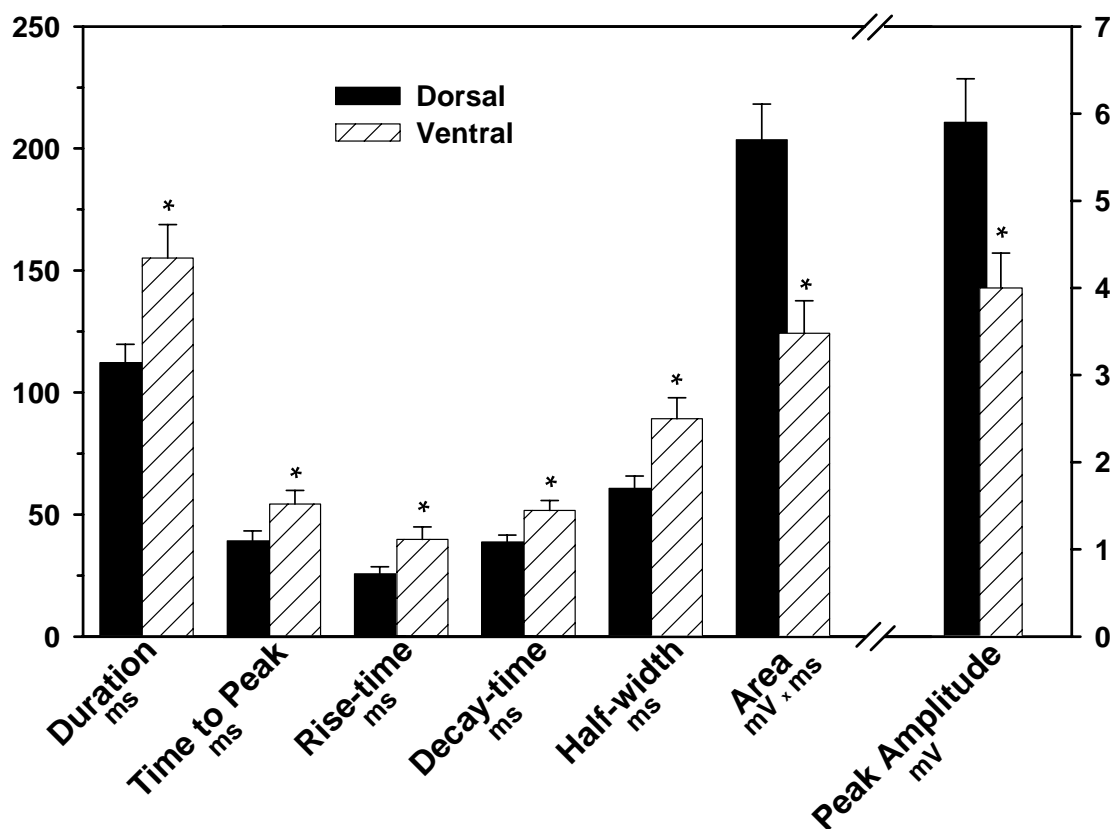
Εκπόνηση : Βαγγέλης Κουβαράς

Πίνακας 3. Χαρακτηριστικά του NMDA-διαμεσολαβούμενου EPSP νευρώνων του ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου.

	Δυναμικό Μεμβράνης (mV)	Αντίσταση Εισόδου (ΜΩ)	Χαρακτηριστικά του Διεγερτικού Μετασυναπτικού Δυναμικού							Εμβαδόν (mVxms)
			Ουδός (mV)	Πλάτος (mV)	Διάρκεια (ms)	Χρόνος μέγιστου πλάτους (ms)	Χρόνος ανόδου (ms)	Χρόνος καθόδου (ms)	Διάρκεια στο ήμισυ του μέγιστου πλάτους (ms)	
Ραχιαίος (n=8)	-59,6 ± 0,7	40,7 ± 3,3	-50,7 ± 0,8	5,9 ± 0,5	112,2 ± 7,6	39,3 ± 4,0	25,7 ± 2,9	38,8 ± 2,8	60,7 ± 5,1	203,6 ± 14,6
Κοιλιακός (n=8)	-60,3 ± 0,7	49,8 ± 4,6	-53,0 ± 0,7	4,0 ± 0,4	155,1 ± 13,7	54,3 ± 5,6	39,8 ± 5,1	51,7 ± 4,1	89,3 ± 8,5	124,3 ± 13,3
<i>p</i>	0,52	0,142	0,039	0,011	0,016	0,048	0,03	0,022	0,012	0,001



Εικόνα 27: Α) χαρακτηριστικές διεγερτικές NMDA-διαμεσολαβούμενες μετασυναπτικές κυματομορφές νευρώνων του ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου. Β) Υπο-οδικές συναπτικές απαντήσεις που προκύπτου μετά από ψηφιακή άθροιση συναπτικών απαντήσεων που προέρχονται από οκτώ διαφορετικούς νευρώνες.



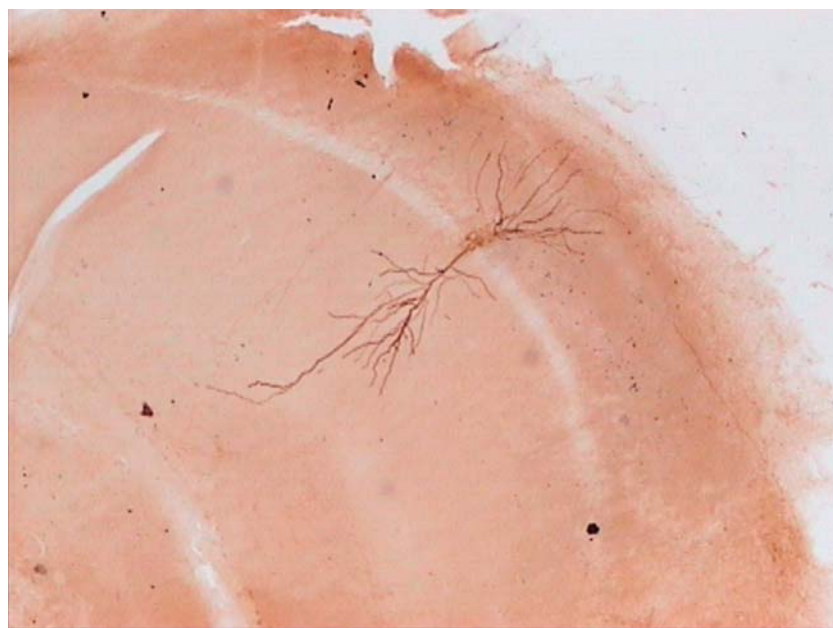
Εικόνα 28: Ιστόγραμμα των χαρακτηριστικών του NMDA-διαμεσολαβούμενου EPSP σε νευρώνες του ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου.

2.2.8 Ψηφιακή φωτογράφιση

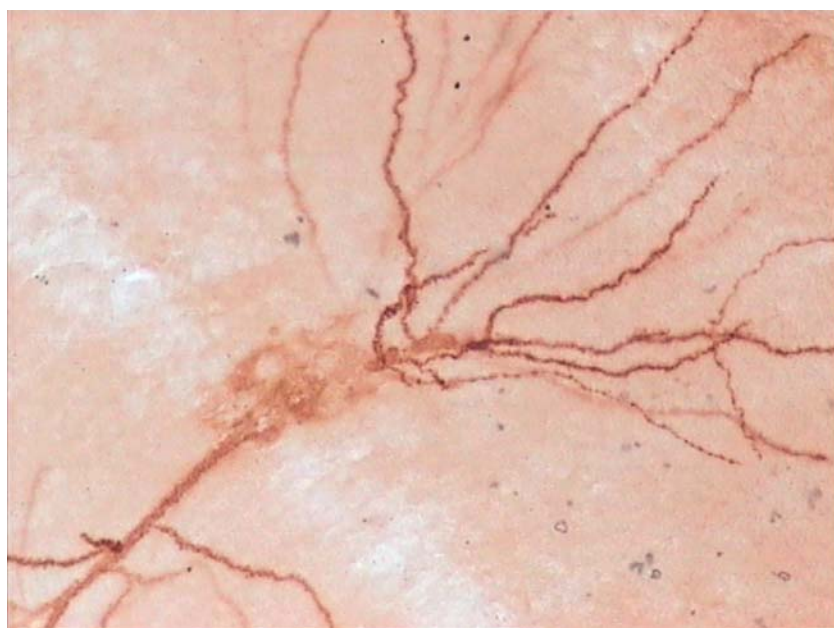
Χρησιμοποιήθηκε ο ακόλουθος εξοπλισμός:

- Φωτογραφική μηχανή και κάμερα Sony Exwave HAD model no SSC-DC58AP στο εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του ΠΓΝΛ και Sony Hyper HAD στο εργαστήριο Ανατομικής του τμήματος Κτηνιατρικής του Α.Π.Θ.
- Μικροσκόπιο Zeiss Axiolab τεσσάρων φακών Zeiss Achromat.
- Πρόγραμμα PCTV Vision, Version 1.96 1999-2000. Τα αρχεία που δημιουργήθηκαν είναι έγγραφα εικόνας “.tif”, ύψους 1200 X πλάτους 1600 pixels, με ανάλυση 100X100 dpi.

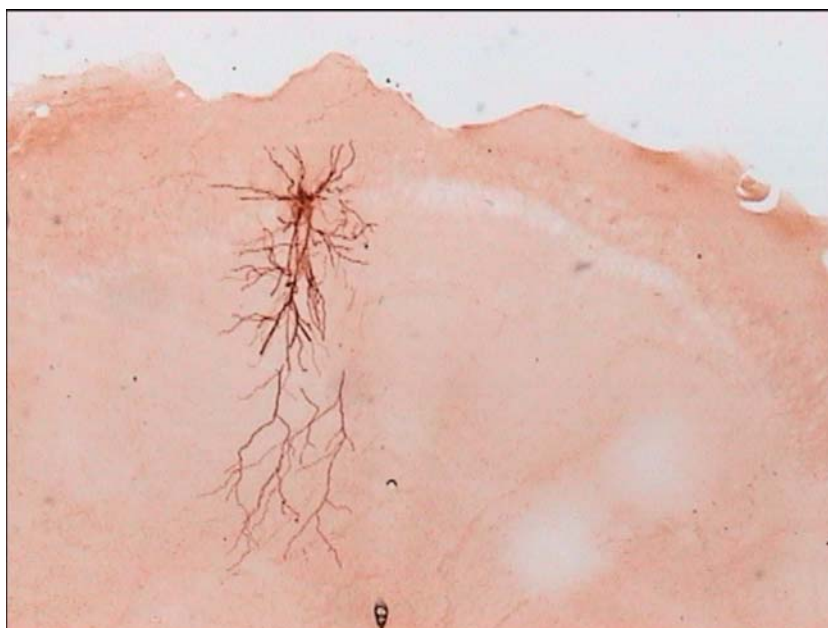
Η φωτογράφιση είναι σημαντική για τη δημιουργία αρχείου που θα επιτρέψει την παρατήρηση των κυττάρων χωρίς τον κίνδυνο φθοράς ή θραύσης του πρωτότυπου παρασκευάσματος εξαιτίας της συνεχούς χρήσης.

350 μ m

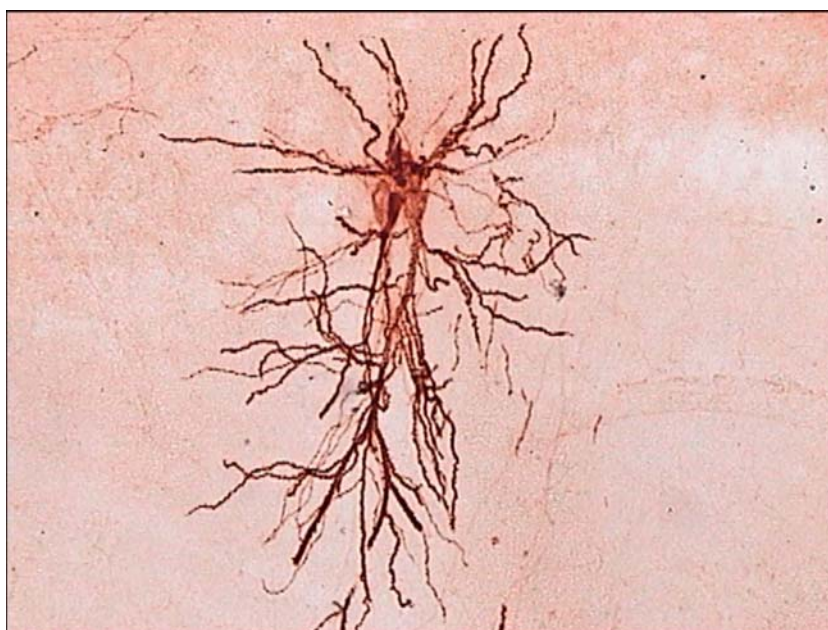
Εικόνα 29: Φωτογραφία νευρώνα του ραχιαίου υποκόλπου. Διακρίνεται η πυραμιδική στοιβάδα όπου εντοπίζεται το σώμα του νευρώνα και οι χαρακτηριστικές διακλαδώσεις του κορυφαίου και των βασικών δενδριτών. Μεγέθυνση 4X.



Εικόνα 30: Ο παραπάνω νευρώνας σε μεγαλύτερη μεγέθυνση (20X).

350 μm

Εικόνα 31: Φωτογραφία νευρώνα του κοιλιακού ιπποκάμπου. Μεγέθυνση 4X.

140 μm

Εικόνα 32: Ο παραπάνω νευρώνας σε μεγαλύτερη μεγέθυνση (10X). Διακρίνονται τα σώματα και τμήμα της δενδριτικής κατασκευής δύο επιπλέον πυραμιδικών νευρώνων.

0 μm



Εικόνα 33: Φωτογραφία νευρώνα του ραχιαίου υποκάμπου (10X). Διακρίνονται το σώμα, ο κορυφαίος και οι βασικοί δενδρίτες καθώς και διακλαδώσεις αξονικών απολήξεων.

2.3 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκαν ιδιότητες της μεμβράνης νευρώνων του ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου καθώς και μετασυναπτικά διεγερτικά δυναμικά με σκοπό τη διερεύνηση της διεγερσιμότητας των νευρώνων μεταξύ των δυο αυτών περιοχών του ιπποκάμπου. Με βάση τα αποτελέσματα προκύπτουν σημαντικές διαφορές όσον αφορά την καταγραφόμενη απόκριση μετά την εφαρμογή εκπολωτικού ρεύματος στο σώμα των νευρώνων. Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα που προκύπτουν συνοψίζονται στα εξής:

1. Οι νευρώνες και των δύο πληθυσμών νευρώνων παρουσιάζουν παρόμοιες παθητικές μεμβρανικές ιδιότητες.

2. Οι νευρώνες του ραχιαίου ιπποκάμπου εμφανίζουν μεγαλύτερο ρυθμό εκπόλωσης από νευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου.

3. Ο αριθμός των προκαλούμενων δυναμικών ενέργειας μετά την εφαρμογή κατάλληλου εκπολωτικού ρεύματος είναι μεγαλύτερος σε νευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου. Επιπλέον, οι νευρώνες του ραχιαίου ιπποκάμπου παρουσίαζαν σε μεγάλο εξοικείωση (accommodation) μετά την εφαρμογή του εκπολωτικού παλμού σε αντίθεση με τους νευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου που μόνο ένα τμήμα του συνολικού πληθυσμού ανταποκρινόταν κατά αυτόν τον τρόπο.

4. Οι νευρώνες του ραχιαίου ιπποκάμπου αποκρίνονται, ως επί των πλείστον, με μονήρη δυναμικά ενέργειας ενώ ένα σημαντικό ποσοστό του πληθυσμού των νευρώνων του κοιλιακού ιπποκάμπου αποκρίνονται με ριπές δυναμικών ενέργειας.

5. Ο χρόνος του μεσοδιαστήματος μεταξύ του πρώτου και δεύτερου δυναμικού ενέργειας βρέθηκε σημαντικά μικρότερος στα κύτταρα του κοιλιακού ιπποκάμπου.

6. Το πλάτος τόσο του γρήγορου όσο και του αργού μετα-υπερπολωτικού δυναμικού βρέθηκε σημαντικά μικρότερο σε νευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου.

2.3.1 Παθητικές μεμβρανικές ιδιότητες

Το δυναμικό μεμβράνης σε κατάσταση ηρεμίας καθώς και η αντίσταση εισόδου δε βρέθηκαν να διαφέρουν μεταξύ των δύο πληθυσμών κυττάρων. Το ίδιο ισχύει και για τη σταθερά χρόνου της μεμβράνης των νευρώνων. Στα πυραμιδικά κύτταρα της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου και σε κατάσταση ηρεμίας των νευρώνων είναι ενεργοποιημένος ένας διάυλος που άγει ιόντα K^+ - Na^+ γνωστός ως Ih. Μπλοκάρισμα του διαύλου αυτού με Cs^{2+} προκαλεί υπερπόλωση της μεμβράνης της τάξεως των 4 mV περίπου γεγονός που

καταδεικνύει την σημαντική συνεισφορά του συγκεκριμένου διαύλου στην διεγερσιμότητα των νευρώνων της CA1 περιοχής (Maccaferri et al., 1993). Επιπλέον, έχει προταθεί ότι η παρουσία των διαύλων Ih στους δενδρίτες ελαττώνει σημαντικά τη δενδριτική διεγερσιμότητα δεδομένου ότι προκαλεί τοπική μείωση της αντίστασης εισόδου και κατά συνέπεια ελάττωση του πλάτους των διεγερτικών μετασυναπτικών δυναμικών, καθώς και της άθροισης τους κατά τη συναπτική ολοκλήρωση (Magge, 1998). Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση του ιοντικού διαύλου Ih στους νευρώνες του ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου μετρήθηκε το πηλίκιο της τιμής του δυναμικού στη σταθερή κατάσταση προς την τιμή του δυναμικού της μεγαλύτερης μετρούμενης τιμής εκπόλωσης οφειλόμενης στην αγωγιμότητα του διαύλου Ih. Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα δεν παρατηρήθηκαν καμία διαφορά μεταξύ των δύο πληθυσμών νευρώνων που θα μπορούσε να εξηγήσει, τουλάχιστον μερικώς, διαφορές στη διεγερσιμότητάς τους.

2.3.2 Επαναλαμβανόμενες εκφορτίσεις

Όπως προαναφέρθηκε, εφαρμογή εκπολωτικού ρεύματος μεγάλης διάρκειας σε νευρώνες του ραχιαίου ιπποκάμπου έχει ως αποτέλεσμα την εξοικείωση της πλειοψηφίας των νευρώνων στο ερέθισμα και κατά συνέπεια τη παύση της εμφάνισης δυναμικών ενέργειας. Αντίθετα, το ποσοστό των νευρώνων του κοιλιακού ιπποκάμπου που εμφανίζουν εξοικείωση είναι σημαντικά μικρότερο. Είναι γνωστό ότι υπεύθυνο για την εμφάνιση εξοικείωσης στα πυραμιδικά κύτταρα του ιπποκάμπου είναι ένα ασβεστιο-εξαρτούμενο ρεύμα καλίου το οποίο ενεργοποιείται βραδέως και εμφανίζει την μέγιστη τιμή του μεταξύ 400-700 msec, το I_{AHP} (Lancaster and Nicoll, 1986). Η ένταση του ρεύματος αυξάνεται με το αριθμό των δυναμικών ενέργειας δεδομένου ότι κατά τη διάρκεια ενός δυναμικού ενέργειας ενεργοποιούνται διάυλοι ασβεστίου. Κατά συνέπεια, όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των δυναμικών ενέργειας τόσο περισσότερο ενδοκυττάριο ασβέστιο θα ελευθερωθεί και άρα θα είναι διαθέσιμο για την ενεργοποίηση του I_{AHP} (Madison and Nicoll, 1982, 1984). Ενεργοποίηση του συγκεκριμένου διαύλου θα έχει ως αποτέλεσμα αφενός την εμφάνιση υπερπόλωσης αφετέρου την ελάττωση της αντίστασης του κυττάρου. Και τα δύο αυτά γεγονότα ανθίστανται στην περαιτέρω εκπόλωση του κυττάρου με αποτέλεσμα την εμφάνιση εξοικείωσης. Δεδομένης της στατιστικά μεγαλύτερης τιμής της μετα-υπερπόλωσης s-AHP, οφειλόμενης στο ρεύμα I_{AHP} , που μετρήθηκε στους νευρώνες του ραχιαίου ιπποκάμπου εξηγείται επαρκώς το μεγαλύτερο ποσοστό νευρώνων του ραχιαίου ιπποκάμπου που εμφανίζουν εξοικείωση.

Οι δύο πληθυσμοί νευρώνων διαφέρουν και ως προς την ικανότητα τους να εκδηλώνουν ριπές δυναμικών ενέργειας. Περίπου το ήμισυ του πληθυσμού των νευρώνων του κοιλιακού ιπποκάμπου αποκρίνονται μετά από εκπολωτικό ερέθισμα με μια τυπική ριπή που ορίζεται ως 3-5 δυναμικά ενέργειας που εμφανίζονται κατά τη διάρκεια μια τοπικής εκπόλωσης (Mason, 1993). Επιπλέον, είναι δυνατή η περαιτέρω διάκριση των νευρώνων που απαντούν με ριπές σε *borderline bursters* και *grade I bursters* σύμφωνα με την ταξινόμηση που προτάθηκε από προγενέστερη έρευνα (Jensen et al., 1994). Σύμφωνα με αυτή τη ταξινόμηση διακρίνονται τέσσερις κατηγορίες νευρώνων που απαντούν με ριπές: οι *borderline bursters* που αποκρίνονται με ριπές μόνο μετά τη εφαρμογή υπερουδικού μακράς διάρκειας ρεύματος, οι *grade I bursters* που απαντούν με ριπές μετά την εφαρμογή ρεύματος μακράς διάρκειας και ουδικής έντασης αλλά με μονήρη δυναμικά ενέργειας σε μικρής διάρκειας παλμούς, οι *grade II bursters* που απαντούν με ριπές όχι μόνο μετά από μακράς αλλά και μετά βραχείας διάρκειας εκπολωτικών παλμών ουδικής έντασης, *grade III bursters* που αποκρίνονται με ριπές τόσο αυθόρμητα όσο και μετά από οποιοδήποτε υπερουδικό εκπολωτικό ρεύμα. Αντίθετα, οι νευρώνες του ραχιαίου ιπποκάμπου αποκρίνονται σε εκπολωτικούς παλμούς ως επί το πλείστον με μονήρη δυναμικά ενέργειας. Μόνο ένα μικρό ποσοστό των νευρώνων του ραχιαίου ιπποκάμπου αποκρίνεται με ριπές δυναμικών ενέργειας οι οποίες μπορούν να ταξινομηθούν στην κατηγορία των *borderline bursters*. Δεδομένου ότι οι ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες των νευρώνων του κοιλιακού ιπποκάμπου (δυναμικό ηρεμίας, αντίσταση εισόδου, πλάτος δυναμικών ενέργειας) ήταν παρόμοιες με αυτές των κυττάρων του ραχιαίου ιπποκάμπου και εντός των φυσιολογικών τιμών για πυραμιδικά κύτταρα του ιπποκάμπου το ενδεχόμενο η αυξημένη συχνότητα κυττάρων του κοιλιακού ιπποκάμπου που απαντούν με ριπές να οφείλεται σε τραυματισμό τους κατά την διεϊσδυση του μικροηλεκτροδίου, αποκλείεται. Σύμφωνα με προγενέστερες έρευνες, σημαντικός παράγοντας για την εκδήλωση ριπής δυναμικών ενέργειας είναι η εμφάνιση μετα-εκπόλωσης που ακολουθεί το δυναμικό ενέργειας (Wong and Prince, 1981; Jensen et al., 1994, 1996). Είναι δυνατή η διάκριση δύο τύπων μετα-εκπόλωσης ADP: η παθητική και η ενεργητική βασιζόμενη στη διάρκεια και τη χρονική σταθερά καθόδου του ADP. Με βάση αυτή τη διάκριση μόνο νευρώνες με ενεργό ADP μπορούν να εμφανίσουν ριπές δυναμικών ενέργειας, (Jensen et al., 1996). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμφωνούν με τα παραπάνω δεδομένου ότι ένα σημαντικό μεγαλύτερο ποσοστό των νευρώνων του κοιλιακού ιπποκάμπου εμφανίζουν ενεργητικό μετα-εκπολωτικό δυναμικό σε σχέση με τους νευρώνες του ραχιαίου ιπποκάμπου.

Έχουν διατυπωθεί διαφορετικές απόψεις όσον αφορά την ιοντική αγωγιμότητα στην οποία οφείλεται το ADP. Ορισμένες μελέτες αναφέρουν ότι οφείλεται κυρίως σε διαύλους ασβεστίου (Andreasen and Lambert, 1995; Magge and Carruth, 1999), ενώ άλλες ότι οφείλεται σε ένα διάυλο νατρίου το I_{NaP} (Jensen et al., 1994, 1996). Ωστόσο, ενδέχεται να υπάρχουν πολλαπλοί μηχανισμοί που μπορεί να επηρεάσουν τον τρόπο με τον οποίο ένας νευρώνας αποκρίνεται στα εισερχόμενα νευρωνικά σήματα. Κατά συνέπεια, η οφειλόμενη στην αγωγιμότητα νατρίου μετα-εκπόλωση που έπεται του δυναμικού ενέργειας δεν είναι ο μόνος παράγοντας που μπορεί να προκαλέσει την εμφάνιση ριπής δυναμικών ενέργειας. Σημαντικό ρόλο φαίνεται να διαδραματίζει η αναλογία μεταξύ αγωγιμοτήτων που προκαλούν εκπόλωση και αυτών που προκαλούν υπερπόλωση και εντοπίζονται στον δενδριτικό σχηματισμό του νευρώνα (Magge and Garruth, 1999; Jensen et al., 1996). Σημαντικός παράγοντας στη διαδικασία αυτή θεωρείται η ύπαρξη ενός διαύλου καλίου, του I_A , του οποίου η πυκνότητα εμφάνισης αυξάνεται με κατεύθυνση από το σώμα προς τους δενδρίτες (Hoffman et al., 1997; Magee and Garruth, 1999). Όταν η συνολική αγωγιμότητα καλίου είναι ανέπαφη η ενεργοποίηση εκπολωτικών αγωγιμοτήτων (Na^+ , Ca^{++}) είναι μικρή και ο νευρώνας αποκρίνεται μόνο με μονήρη δυναμικά ενέργειας. Όταν ο αριθμός των διαύλων καλίου που μπορούν να ενεργοποιηθούν ελαττωθεί τότε είναι δυνατή η ταχεία και παρατεταμένη ενεργοποίηση αγωγιμοτήτων που προκαλούν εκπόλωση της μεμβράνης και αυξάνεται η πιθανότητα ο νευρώνας να ανταποκριθεί με ριπές δυναμικών ενέργειας. Ο χρόνος που μεσολαβεί από την εφαρμογή εκπολωτικού ρεύματος μέχρι την εμφάνιση του πρώτου δυναμικού ενέργειας εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από αγωγιμότητες καλίου που ενεργοποιούνται σε υποουδικές τιμές του δυναμικού της μεμβράνης όπως η αγωγιμότητα I_A (Storm, 1990). Κατά συνέπεια, η μέτρηση του χρόνου αυτού μπορεί να είναι ενδεικτική του εάν η διαφοροποίηση μεταξύ ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου, όσον αφορά την εκπόλωση με ριπές ή με μονήρη δυναμικά ενέργειας, οφείλεται σε διαφορές σε αγωγιμότητες όπως αυτή του διαύλου I_A . Ωστόσο, δεν προέκυψε καμία διαφορά τόσο όσον αφορά το χρόνο για την εμφάνιση του δυναμικού ενέργειας όσο και την απαιτούμενη ένταση του ρεύματος για την πρόκληση του δυναμικού ενέργειας.

2.3.3 Μετα-υπερπολωτικά δυναμικά

Μετρήθηκε το πλάτος των μετα-υπερπολωτικών δυναμικών: fAHP, mAHP, και sAHP που μπορούν να επηρεάσουν τον τρόπο εκπόλωσης των πυραμιδικών κυττάρων του ιπποκάμπου.

Η γρήγορη μετα-υπερπόλωση (fAHP) που έπεται του δυναμικού ενέργειας εμφανίζεται ως συνέχεια της επαναπόλωσης της μεμβράνης του νευρικού κυττάρου. Το μετα-υπερπολωτικό αυτό δυναμικό μπορεί να επηρεάσει τη συχνότητα εμφάνισης των δυναμικών ενέργειας δεδομένου ότι συμβάλει στην παράταση του χρόνου ανερεθιστότητας, δηλαδή του χρονικού διαστήματος κατά το οποίο διέγερση του νευρώνα με ουδικό ρεύμα δεν προκαλεί την εμφάνιση δυναμικού ενέργειας. Κατά συνέπεια, το fAHP αυξάνει το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ δύο διαδοχικών δυναμικών ενέργειας μειώνοντας έτσι τη συχνότητα εκφόρτισης του κυττάρου (Sah, 1996). Τα ευρήματά μας συγκλίνουν με τα παραπάνω συμπεράσματα. Οι πυραμιδικοί νευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου εμφανίζουν σημαντικά μικρότερες τιμές του γρήγορου μετα-υπερπολωτικού δυναμικού συγκριτικά με τους νευρώνες του ραχιαίου ιπποκάμπου με αποτέλεσμα και η μετρούμενη τιμή του χρονικού διαστήματος που μεσολαβεί μεταξύ του πρώτου και του δεύτερου δυναμικού ενέργειας να είναι και αυτή σημαντικά μικρότερη.

Επιπλέον, μετρήθηκε το πλάτος των μέσης και μεγάλης διάρκειας μεταυπερπολωτικών δυναμικών mAHP και sAHP αντίστοιχα. Τα δυναμικά αυτά καθίστανται ευδιάκριτα μετά από μακράς διάρκειας εκπολωτικού παλμού οπότε και λαμβάνει χώρα άθροιση των αντιστοιχών μετα-υπερπολωτικών αγωγιμοτήτων του κάθε μονήρους δυναμικού ενέργειας. Όσον αφορά το mAHP δεν βρέθηκε διαφορά μεταξύ νευρώνων του κοιλιακού και ραχιαίου ιπποκάμπου. Αντίθετα, το πλάτος του sAHP βρέθηκε να είναι σημαντικά μικρότερο στους νευρώνες του κοιλιακού σε σύγκριση με τους νευρώνες του ραχιαίου ιπποκάμπου. Το sAHP όπως προαναφέρθηκε μπορεί να καθορίσει την εμφάνιση ή όχι του φαινομένου της εξοικείωσης των πυραμιδικών νευρώνων ως απάντηση στο εφαρμοζόμενο ερέθισμα. Επιπλέον, μπορεί να επηρεάσει τον τρόπο απάντησης του νευρώνα στα εισερχόμενα ερεθίσματα δεδομένου ότι η αγωγιμότητα του διαύλου I_{AHP} είναι δυνατό να επηρεασθεί από διάφορους νευροδιαβιβαστές (Storm, 1990). Για παράδειγμα, νευροδιαβιβαστές όπως η νοραδρεναλίνη, η σεροτονίνη και η ντοπαμίνη έχουν βρεθεί ότι ελαττώνουν την αγωγιμότητα του I_{AHP} (Madison and Nicoll, 1982, 1984; Malenka and Nicoll, 1986; Andrade and Nicoll, 1987). Έχει επιπλέον βρεθεί ότι υφίσταται μία βαθμίδωση συγκέντρωσης με κατεύθυνση αύξησης από τον ραχιαίο προς τον κοιλιακό ιπποκάμφο όσον αφορά τους τρεις προαναφερθέντες νευροδιαβιβαστές (Hortnagl et al., 1991). Εκτός αυτού, οι απολήξεις νευρώνων που εκλύουν νορεπινεφρίνη και σεροτονίνη είναι πολυπληθέστερες στους νευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου (Gage and Thompson, 1980). Κατά συνέπεια, η επίδραση αυτών των νευροδιαβιβαστών αναμένεται να είναι περισσότερο έντονη στους

νευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου γεγονός που δικαιολογεί και την αυξημένη τιμή του πλάτους του sAHP στους νευρώνες του ραχιαίου ιπποκάμπου.

2.3.4 Μετασυναπτικά διεγερτικά δυναμικά

Όπως προαναφέρθηκε ο διάυλος NMDA συμβάλλει στη διεγερτική νευροδιαβίβαση σε πολλές περιοχές του εγκεφάλου. Χαρακτηριστικά του υποδοχέα NMDA είναι ότι: 1) στο δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης είναι κλειστός λόγω της παρουσίας των ιόντων μαγνησίων, 2) σημαντική ποσότητα εξωκυττάριου ασβεστίου εισέρχεται στο εσωτερικό του κυττάρου μέσω του διαύλου μετά από εκπόλωση της μεμβράνης με αποτέλεσμα τη ενεργοποίηση διαφόρων μονοπατιών δευτέρων μηνυτόρων που ρυθμίζουν διαδικασίες όπως νευρωνική πλαστικότητα (Impey et al., 1999) και κυτταρική επιβίωση (Grewal et al., 1999). Αναλόγως της σύνθεσης των υπομονάδων του διαύλου και ιδιαίτερα των υπομονάδων της οικογένειας NR2 είναι δυνατή η τροποποίηση της ευαισθησίας του διαύλου στην επίδραση των ιόντων Mg^{2+} και η αλλαγή της κινητικής του διαύλου (Monyer, 1994). Σύμφωνα με μελέτη αύξηση του αριθμού υποδοχέων NMDA του τύπου NR1-NR2B στη περιοχή του πρόσθιου εγκεφάλου πειραματόζωων συνδέεται με αύξηση της δυνατότητας μάθησης και ενδυνάμωση της μνήμης όπως προκύπτει από την ενδυνάμωση της LTP της οδού Schaffer-CA1 (Tang et al., 1999). Το εύρημα αυτό ενισχύεται από την εξειδικευμένη σύνδεση της RasGRF1 με την υπομονάδα NR2B (Krapivinsky et al., 2003). Η RasGRF1 εξαρτάται από το σύμπλοκο ασβέστιο-καλμοδουλίνης και είναι υπεύθυνη για τη διέγερση του μονοπατιού ERK που θεωρείται απαραίτητο για διαδικασίες συναπτικής πλαστικότητας όπως η μακροχρόνια ενδυνάμωση (Impey et al., 1999). Η παρεμπόδιση της σύνδεσης της RasGRF1 με την υπομονάδα NR2B (και όχι της NR1) μπορεί να εμποδίσει την ενεργοποίηση του μονοπατιού ERK. Εξάλλου, In vitro μελέτη επισήμανε την μεγαλύτερη διάρκεια του EPSP του οφειλόμενου σε υποδοχείς NMDA του τύπου NR1-NR2B σε σύγκριση με EPSP που οφείλεται σε υποδοχείς NMDA του τύπου NR1-NR2A (Monyer, 1994). Κατά συνέπεια, η αυξημένη διάρκεια του EPSP αυξάνει την πιθανότητα της σύμπτωσης με ένα δεύτερο EPSP με αποτέλεσμα την άθροιση τους γεγονός που μπορεί να συμβάλλει στην αύξηση της πλαστικότητας (Tang et al., 1999). Αντίθετα, υποδοχείς NMDA με σύνθεση υπομονάδων NR1-NR2A εμφανίζουν υψηλότερες τιμές μετασυναπτικού ρεύματος (EPSC) από ότι υποδοχείς με σύνθεση NR1-NR2B (Chen et al., 1999). Η διαφοροποίηση των ιδιοτήτων του υποδοχέα NMDA αναλόγως της σύνθεσης των υπομονάδων αντανακλά και σε λειτουργική διαφοροποίηση όπως όσον αφορά τη συναπτική πλαστικότητα. Κατά συνέπεια, υποδοχείς με σύνθεση NR1-NR2B συμβάλλουν

στην πρόκληση μετασυναπτικής καταστολής (Long term depression, LTD), ενώ υποδοχείς με σύνθεση NR1-NR2A στην πρόκληση μετασυναπτικής ενδυνάμωσης (Long term potentiation, LTP) (Erreger et al., 2005; Liu et al., 20004; Massey et al., 2004).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας οι νευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου εμφανίζουν μεγαλύτερης διάρκειας NMDA-διαμεσολαβούμενα μετασυναπτικά δυναμικά, ενώ οι νευρώνες του ραχιαίου μεγαλύτερου πλάτους μετασυναπτικά δυναμικά. Με βάση τις προαναφερθείσες μελέτες η διαφοροποίηση των αποτελεσμάτων ενδέχεται να αντανακλά τη διαφορετική σύνθεση των υπομονάδων των υποδοχέων NMDA. Κατά συνέπεια, ενδέχεται οι νευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου να εμφανίζουν αυξημένο αριθμό υποδοχέων NMDA με σύνθεση NR1-NR2B σε σχέση με τους νευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου. Το συμπέρασμα αυτό μπορεί να υποστηριχτεί και από ηλεκτροφυσιολογικά ευρήματα σύμφωνα με τα οποία ο βαθμός της μετασυναπτικής ενδυνάμωσης στην CA1 περιοχή βρέθηκε αυξημένος στον ραχιαίο ιππόκαμπο (Paratheodoropoulos and Kostopoulos, 2000, Maruki et al., 2001).

2.3.5 Λειτουργική σημασία των αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν ότι οι νευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου επεξεργάζονται κατά διαφορετικό τρόπο τα εισερχόμενα σήματα από ότι οι νευρώνες του ραχιαίου ιπποκάμπου και αποκρίνονται συχνότερα με ριπές δυναμικών ενέργειας σε εισερχόμενα ερεθίσματα. Οι ριπές των δυναμικών ενέργειας θεωρούνται ως σημαντικές και πληροφοριακά εμπλουτισμένες μονάδες νευρωνικής διαβίβασης καθώς και ως περισσότερο αξιόπιστος τρόπος για τη μετάδοση σημάτων από ότι τα μονήρη δυναμικά ενέργειας (Lisman, 1997). Επιπρόσθετα, ο ιππόκαμπος δέχεται νευρωνικές πληροφορίες από περιοχές που ενέχονται στην επεξεργασία αισθητικών πληροφοριών του εσωτερικού περιβάλλοντος και πληροφοριών συναισθηματικής φύσεως (Amaral and Witter, 1995). Κατά συνέπεια, η αυξημένη δυνατότητα των νευρώνων του κοιλιακού ιπποκάμπου να αποκρίνονται με ριπές δυναμικών ενέργειας ενδέχεται να αντανακλά την ανάγκη για αξιόπιστη διαβίβαση πληροφοριακά εμπλουτισμένων νευρικών ώσεων.

Εκτός αυτού, τα ευρήματα της εργασίας επιβεβαιώνουν την αυξημένη διεγερσιμότητα των νευρώνων του κοιλιακού ιπποκάμπου που έχει προταθεί από προγενέστερες μελέτες υποδεικνύοντας διαφορές τόσο στις ιδιότητες της κυτταρικής μεμβράνης όσο και στα διεγερτικά μετασυναπτικά δυναμικά ως υπεύθυνες για αυτή. Μετά από μελέτες τόσο σε πειραματόζωα (Cavalheiro et al., 1991), όσο και σε ανθρώπους (Mathern et al., 1995)

βρέθηκε ότι ο ιππόκαμπος ενέχεται στην πρόκληση και μετάδοση επιληπτικών κρίσεων. Κάτω από τέτοιες συνθήκες παθολογίας του εγκεφάλου είναι δυνατή η αλλαγή της ομοιόστασης αυτού. Αλλαγές σε ιοντικές συγκεντρώσεις όπως του ασβεστίου (Su et al., 2001), του καλίου [K^+]ο (Jensen et al., 1994) ή αλλαγές στο εξωκυττάριο pH (Church and Baimbridge, 1991) είναι δυνατό να αυξήσουν την πιθανότητα εμφάνισης ριπών σε νευρώνες που αποκρίνονται ως επί το πλείστον με μονήρη δυναμικά ενέργειας. Κατά συνέπεια, κάτω από τέτοιες συνθήκες οι νευρώνες του κοιλιακού ιπποκάμπου αναμένεται να είναι πολύ περισσότερο επιρρεπείς στην πρόκληση ριπών δυναμικών ενέργειας από ότι νευρώνες του ραχιαίου ιπποκάμπου και ενδεχομένως να λειτουργούν ως εστίες πρόκλησης επιληπτικών κρίσεων.

2.4 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν τη λειτουργική διαφοροποίηση κατά μήκος του επιμήκους άξονα του ιπποκάμπου. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι η κοιλιακή μοίρα είναι περισσότερο διεγερσιμη και επιρρεπής σε επιληπτογένεση σε σχέση με τη ραχιαία μοίρα. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση των παθητικών και ενεργητικών μεμβρανικών ιδιοτήτων και των ηλεκτροφυσιολογικών χαρακτηριστικών εκφόρτισης των νευρώνων του ραχιαίου και του κοιλιακού ιπποκάμπου τα οποία θα μπορούσαν να ευθύνονται για την προαναφερθείσα διαφοροποίηση.

Ενδοκυττάρια καταγραφές πραγματοποιήθηκαν από πυραμιδικούς νευρώνες της CA1 περιοχής της ραχιαίας και της κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου. Οι παθητικές ιδιότητες, δηλαδή το δυναμικό ηρεμίας, η αντίσταση εισόδου και η χρονική σταθερά τ δεν διέφεραν μεταξύ των νευρώνων των δύο μοιρών του ιπποκάμπου. Παρομοίως, δεν βρέθηκαν διαφορές στις παραμέτρους των δυναμικών ενεργείας που προκλήθηκαν με σύντομους εκπολωτικούς τετράγωνους παλμούς. Συγκεκριμένα, το πλάτος, ο χρόνος ανόδου, ο χρόνος καθόδου, το εύρος στο ήμισυ του μέγιστου πλάτους, καθώς και η μέγιστη θετική και αρνητική κλίση δεν βρέθηκαν να διαφέρουν μεταξύ των νευρώνων της ραχιαίας και της κοιλιακής μοίρας. Αντίθετα, η ταχεία υπερπόλωση (fAHP) η οποία έπεται του δυναμικού ενεργείας διέφερε σημαντικά μεταξύ των νευρώνων των δύο πληθυσμών. Επιπλέον, το πρώτο μεσοδιάστημα αλληλουχίας δυναμικών ενεργείας (δηλαδή το διάστημα ανάμεσα στο πρώτο και το δεύτερο δυναμικό ενεργείας), η οποία προκλήθηκε με παρατεταμένο εκπολωτικό παλμό (500 ms, 0.4 nA), καθώς και ο αριθμός των δυναμικών ενεργείας που προκλήθηκαν κατά της διάρκεια της εκπόλωσης διέφεραν σημαντικά μεταξύ των νευρώνων του ραχιαίου και του κοιλιακού ιπποκάμπου.

Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η αυξημένη διεγερσιμότητα η οποία παρατηρείται στους πυραμιδικούς νευρώνες της κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου πιθανώς να οφείλεται, τουλάχιστον εν μέρει, στο μικρότερο fAHP το οποίο με τη σειρά του οδηγεί σε μικρότερο πρώτο μεσοδιάστημα. Επομένως, η παρούσα μελέτη επιβεβαιώνει την ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία λειτουργικής διαφοροποίησης του ιπποκάμπου.

2.5 ABSTRACT

Recent reports have acknowledged the existence of functional differentiation along the longitudinal axis of the hippocampus, the temporal part being more prone to epileptogenesis. The aim of the present study was to investigate the membrane properties and firing characteristics of neurons of septal (SH) and temporal (TH) hippocampus that might account for this differentiation.

Intracellular recordings were made from CA1 pyramidal neurons of SH and TH hippocampus. Resting membrane potential, input resistance, and tau did not differ between SH and TH neurons. Action potential (AP) parameters were measured from single APs elicited by a brief current pulse in SH and TH neurons. Similar to passive membrane properties, peak amplitude, rise time, decay time, half width, positive and negative maximum slopes of single action potentials did not differ between the two populations. Conversely, fast afterhyperpolarizations (fAHP) following APs differed significantly between SH and TH neurons. Moreover, the 1st interspike interval of a train of APs elicited by a depolarizing current pulse (500 ms, 0.4 nA), as well as the number of APs within the pulse, was different between the two groups of neurons.

These data suggest that the decreased ISI in TH neurons may be due to reduced fAHPs and could contribute to the greater excitability observed in this region of the hippocampus. They, therefore, confirm and extend the already existing evidence for the functional segregation of the hippocampus, and may explain the higher tendency of TH neurons for epileptiform activity.

2.6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Amaral D.G., and Witter M.P.** (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neurosci.* 31: 571-591.
2. **Andrade R, Nicoll RA.** (1987) Pharmacologically distinct actions of serotonin on single pyramidal neurones of the rat hippocampus recorded in vitro. *J Physiol.* 394:99-124.
3. **Anagnostaras S.G., Gale G.D. and Fanselow M.S.** (2001). Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. *Hippocampus* 11: 8-17.
4. **Andreasen M., Lambert L.D.C.** (1995). The excitability of CA1 pyramidal cell dendrites is modulated by a local Ca^{2+} -dependent K^+ conductance. *Brain Research* 698: 193-203.
5. **Ashton D, Reid K, Willems R, Wauquier A.** (1986). N-methyl-D-aspartate and hypoxia induced Ca^{2+} -changes in the CA1 region of the hippocampal slice. *Brain Res.* 15;385(1):185-8.
6. **Avoli M., D'Antuono M., Louvel Jr., Köhling R., Biagini G., Pumain R., D'Arcangelo G., Tancredi V.** (2002). Network and pharmacological mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system in vitro. *Progress in Neurobiology* 68: 167–207.
7. **Babb T.L., Pretorius J.K., Kupfer W.R., Crandall P.H.** (1989). Glutamate decarboxylase-immunoreactive neurons are preserved in human epileptic hippocampus. *J. Neurosci.* 9: 2562–2574.
8. **Becker A, Letzel K, Letzel U, Grecksch G.** (1997). Kindling of the dorsal and the ventral hippocampus: effects on learning performance in rats. *Physiol Behav.* (6):1265-71.
9. **Borck C., and Jefferys J.G.** (1999). Seizure-like events in disinhibited ventral slices of adult rat hippocampus. *J. Neurophysiol.* 82: 2130-2142.
10. **Brown D.A. and Adams P.R.** (1980). Muscarinic suppression of a novel sensitive K^+ current in a vertebrate neuron. *Nature (Lond).*, 283: 673-676.
11. **Brown D.A. and Griffith W.H.** (1983a). Calcium activated outward current in voltage clamped hippocampal neurones of the guinea pig. *J Physiol (Lond)*, 337: 287-301.
12. **Brown D.A. and Griffith W.H.** (1983b). Persistent slow inward calcium current in voltage clamped hippocampal neurones of the guinea pig. *J. Physiol (Lond)*, 337: 303-320.
13. **Buckmaster P.S., Kunkel D.D., Robbins R.J. and Schwartzkroin P.A.** (1994). Somatostatin-immunoreactivity in the hippocampus of mouse, rat, guinea pig, and rabbit. *Hippocampus* 4: 167-180.
14. **Buckmaster P.S. and Soltész I** (1996). Neurobiology of hippocampal interneurons : A workshop review. *Hippocampus* 6: 330-339.
15. **Cahusac P.M., Rolls E.T., Miyashita Y, Niki H.** (1993). Modification of the responses of hippocampal neurons in the monkey during the learning of a conditional spatial response task. *Hippocampus.* 3(1): 29-42.
16. **Cavallero E.A., Leite J.P., Bortolotto Z.A., Turski W.A., Ikonomidou C and Turski L.** (1991). Long term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia* 32: 778-782.
17. **Chen N., Luo T., Raymond L.A.** (1999). Subtype-Dependence of NMDA Receptor Channel Open Probability. *J. Neurosci* 19(16): 6844-6854.

18. **Church J., Braimbridge K.G.** (1991). Exposure to high-pH medium increases the incidence and extend of dye coupling between rat hippocampal CA1 pyramidal neurons *in vitro*. *J. Neurosci* 11: 3289-3295.
19. **Colombo M, Fernandez T, Nakamura K, Gross CG.** (1998). Functional differentiation along the anterior-posterior axis of the hippocampus in monkeys. *J Neurophysiol.* 80(2):1002-5.
20. **Cullinan, W.E. Herman J.P. Watson S.J.** (1993). Ventral subicular interaction with the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence for a relay in the bed nucleus of the stria terminalis. *J. Comp. Neurol.* 332:1–20.
21. **Heydebrand G, Miller J.P., Miller M.I.** (2002) Hippocampal deformities in schizophrenia characterized by high dimensional brain mapping. *Am J Psychiatry* 159:2000–2006.
22. **Dolorfo C.L., Amaral D.G.** (1998). Entorhinal cortex of the rat: topographic organization of the cells of origin of the perforant path projection to the dentate gyrus. *J Comp Neurol.* 17;398(1):25-48.
23. **East S.Z., Burnet PWJ, Kerwin RW, Harrison P.J.** (2002) An RT-PCR study of 5-HT₆ and 5-HT₇ receptor mRNA expression in the hippocampal formation and dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia. *Schizophr Res* 57:15–26.
24. **Eichenbaum H.** (2003). How does the hippocampus contribute to memory. *Trends in Cognitive Sciences.* 7: 427-429.
25. **Eldridge L.L., Knowlton B.J, Furmanski C.S., Bookheimer S.Y. and Engel S.A.** (2000). Remembering episodes: a selective role of the hippocampus during retrieval. *Nature neurosci* 3 (11): 1149-1152.
26. **Erreger K., Dravid S.M., Banke T.G., Wyllie D.J.A., Traynelis S.F.** (2005). Subunit-rpefic gating controls rat NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA channel kinetics and synaptic signaling profiles. *J Physiol* 53 (345-358).
27. **Falconer M.A., Serafetinides E.A., Corsellis J.A.N.** (1964). Etiology and pathogenesis of temporal lobe epilepsy. *Arch. Neurol.* 10: 232–248.
28. **Freedman R, Adams C, Leonard S** (2000) The 7-nicotinic acetylcholine receptor and the pathology of hippocampal interneurons in schizophrenia. *J Chem Neuroanat* 20:299–306.
29. **Freund T.F. and Buzsaki G** (1996b). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6: 345-470.
30. **Gage F.H., Thompson R.G.** (1980). Differential distribution of norepinephrine and serotonin along the dorsal-ventral axis of the hippocampal formation. *Brain Res Bull.* 1980 (6):771-3.
31. **Grewal S.S., York R.D., and Stork P.J.** (1999). Extracellular-signal regulated kinase signaling in neurons. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9: 544-553.
32. **Halliwel J.V. and Adams P.R.** (1982). Voltage clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Res.*, 250: 71-92.
33. **Harrison P.J.** (2004). The hippocampus in schizophrenia: a review of the neuropathological evidence and its pathophysiological implications. *Psychopharmacology* 174: 151-162.
34. **Herman J.P. Cullinan W.E.** (1997). Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo pituitary adrenocortical axis. *Trends Neurosci.* 20: 78–84.
35. **Herman, J.P. Tasker J.G., Ziegler D.R., Cullinan W.E.** (2002). Local circuit regulation of paraventricular nucleus stress integration: glutamate–GABA connections. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 71: 457–468.
36. **Hoffman D.A., Magee J.C., Colbert C.M., Johnston D.** (1997). K⁺ channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Nature.* 1997 387:851 853.

38. **Horikawa K. and Armstrong W.E.** (1988). A versatile means of intracellular labeling: injection of biocytin and iys detection with avidin conjugates. *J. Neurosci. Methods.* 25: 1-11.
39. **Hortnagl H., Berger M.L., Sperk G., and Pifl C.** (1991). Regional heterogeneity in the distribution of neurotransmitter markers in the rat hippocampus. *Neurosci.* 45: 261-272.
40. **Houser C.R., Escaplez M.,** (1996). Vulnerability and plasticity of the GABA system in the pilocarpine model of spontaneous recurrent seizures. *Epilepsy Res.* 26, 207–218.
41. **Houser C.R.** (1999). Neuronal loss and synaptic reorganization in temporal lobe epilepsy. In: Delgado-Escuetta, A.V., Wilson, W.A., Olsen, R.W., Porter, R.J. (Eds.), *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies.* Advances in Neurology, vol. 79, third ed. Lippincott/Williams &Wilkins, Philadelphia, pp. 743–761.
42. **Hyman B, Van Hoesen G, Kromer L, Damasio A.** (1986). Perforant pathway changes and memory impairment of Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 20:472–81.
43. **Insausti R, Herrero M.T., Witter M.P.** (1997). Entorhinal cortex of the rat: cytoarchitectonic subdivisions and the origin and distribution of cortical efferents. *Hippocampus.* 7(2):146-83.
44. **Ishizuka N., Weber J., and Amaral. D.G.** (1990). Organization of intrahippocampal projections originating from Ca3 pyramidal cells in the rat. *J. Comp. Neurol.* 295: 580-623.
45. **Impey S., Obrietan K., and Storm D.R.** (1999). Making new connections: role of ERK/MAP kinase signaling in neuronal plasticity. *Neuron* 23: 11-14.
46. **Jensen M.S., Azouz R., and Yaari Y.** (1994). Variant firing patterns in rat hippocampal pyramidal cells modulated by extracellular potassium. *J. Neurophysiol.* 71: 831-839.
47. **Jensen M.S., Azouz R., and Yaari Y.** (1996). Spike after-depolarization and burst generation in adult rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *J. Physiol.* 492: 199-210.
48. **Joyal C.C., Laakso M.P., Tiihonen J, Syv_lahti E, Vilkmann H, Laakso A, Alakare B, R_kk_l_inen V, Raimo KR, Kietala S, Hietala J** (2002) A volumetric MRI study of the entorhinal cortex in first episode neuroleptic-na_ve schizophrenia. *Biol Psychiatry* 51:1005–1007.
49. **Jung M.W., Wiener S.I., and McNaughton B.L.**(1994). Comparison of spatial firing characteristics of units in dorsal and ventral hippocampus of the rat. *J. Neurosci.* 14: 7347-7356.
50. **Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M.,** (1997). *Νευροεπιστήμη και Συμπεριφορά. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.*
51. **Kosel K.C., Van Hoesen G.W., West J.R.** (1981). Olfactory bulb projections to the parahippocampal area of the rat. *J Comp Neurol.*20;198(3):467-82.
52. **Krapivinsky G., Krapivinsky L., Manasian Y., Ivanov A., Tyzio R., Pellegrino C., Ben-Ari Y., Clapham D.E., Medina I.** (2003). The NMDA receptor is coupled to the ERK pathway by a direct interaction between NR2B and RasGRF1. *Neuron* 40: 775–784.
53. **Lancaster B., and Nicoll R.A.** (1986). Properties of two calcium-activated hyperpolarizations in rat hippocampal neurons. *J. Physiol* 389: 187-203.
54. **Lisman E.J.** (1997). Bursts as a unit of neural information: making unreliable synapses reliable. *Trends Neurosci.* 20: 38-43.
55. **Liu L., Wong T.P., Pozza M.F., Lingenhoehl K., Wang Y., Sheng M., Auberson Y.P., & Wang Y.T.** (2004). Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science* 304, 1021-1024.

56. **Livnah O, Bayer E.A., Wilchek M, Sussman J.L.** (1993). Three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 5076-5080.
57. **Lorenzini CG, Baldi E, Bucherelli C, Sacchetti B, Tassoni G.** (1997). 2-Deoxy-D-galactose effects on passive avoidance memorization in the rat. *Neurobiol Learn Mem.* 68(3):317-24.
58. **Law A.J., Deakin J.F.W.** (2001) Asymmetrical reductions of hippocampal MDAR1 glutamate receptor mRNA in the psychoses. *NeuroRep* 12:2971–2974.
59. **Maccaferri G, Mangoni M, Lazzari A, DiFrancesco D** (1993). Properties of the hyperpolarization-activated current in rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *J. Neurophysiol* 69: 2129-2136.
60. **Madison D.V., and Nicoll R.A.** (1984). Control of the repetitive discharge of rat CA1 pyramidal neurons in vitro. *J. Physiol.* 354: 319-331.
61. **Madison D.V., and Nicoll R.A.** (1982). Noradrenaline blocks accommodation of pyramidal cell discharge in the hippocampus. *Nature.* 1982 (5884):636-8.
62. **Magarinos A.M., Verdugo J.M., McEwen B.S.** (1997). Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 1402-1408.
63. **Magarinos A.M., McEwen B.S., Flugge G., Fuchs E.** (1996). Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. *J. Neurosci.* 16: 3534–3540.
64. **Magee J.C.** (1998). Dendritic hyperpolarization-activated currents modify the integrative properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 18: 7613-7624.
65. **Magge J.C., Carruth M.** (1999). Dendritic voltage-gated ion channels regulate the action potential firing mode of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurophysiol* 82: 1895-1901.
66. **Malenka RC, Nicoll RA.** (1986) Dopamine decreases the calcium-activated afterhyperpolarization in hippocampal CA1 pyramidal cells. *Brain Res.* 379(2):210-5.
67. **Markesbery W.R., Carney J.M.** (1999). Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 9:133–46.
68. **Maruki K, Izaki Y, Nomura M, Yamauchi T.** (2001). Differences in paired-pulse facilitation and long-term potentiation between dorsal and ventral CA1 regions in anesthetized rats. *Hippocampus.* 11(6):655-61.
69. **Mason A.** (1993). Electrophysiology and burst-firing of rat subicular pyramidal neurons in vitro: a comparison with area CA1. *Brain Research* 600: 174-178.
70. **Massey P.V., Johnson B.E., Moulton P.R., Auberson Y.P., Brown M.W., Molnar E, Collingridge G.L. & Bashir Z.I.** (2004). Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in cortical long-term potentiation and long-term depression. *J. Neurosci* 24: 7821-7828.
71. **Masukawa L.M., Benardo L.S., and Prince D.A.** (1982). Variations in electrophysiological properties of hippocampal neurons in different subfield. *Brain Res.* 242: 341-344.
72. **Mathern G.W., Babb T.L., Pretorius J.K., Melendez M. and Levesque M.F.** (1995). The pathophysiologic relationships between lesion pathology, intracranial ictal EEG onsets and hippocampal neuron losses in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research* 21: 133-147.
73. **Medoff D.R., Holcomb H.H., Lahti A.C., Tamminga C.A.** (2001). Probing the human hippocampus using rCBF: contrasts in schizophrenia. *Hippocampus* 11:543–550.

74. **Moghaddam B.**, (2002). Stress activation of glutamate neurotransmission in the prefrontal cortex: implications for dopamine-associated psychiatric disorders. *Biol. Psychiatry* 51: 775–787.
75. **Monyer H., Burnashev N., Laurie D.J., Sakmann B., Seeburg P.H.** (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12 (3): 529-40.
76. **Moser E., Moser M.B., and Andersen P.** (1993). Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *J. Neurosci.* 13: 3916-3925.
77. **Moser M.B., Moser E.I., Forrest E, Andersen P, Morris R.G.** (1995) Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(21):9697-701.
78. **Moser M.B., and Moser E.I.** (1998). Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus* 8: 608-619.
79. **Mizoguchi K., Kunishita T., Chui D.H., Tabira T.** (1992). Stress induces neuronal death in the hippocampus of castrated rats. *Neurosci. Lett.* 138: 157– 160.
80. **Nieuwehuys R., Voogd J. van Juijzen Chr.** (1983). Το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα του Ανθρώπου, Σύνοψη και Άτλας. Μετάφραση Α. Καραμανλίδης. Εκδόσεις Κυριακίδη.
81. **Nomura T, Fukuda T, Aika Y, Heizmann C.W., Emson P.C., Kobayashi T, Kosaka T.** (1997). Laminar distribution of non-principal neurons in the rat hippocampus, with special reference to their compositional difference among layers. *Brain Res.* 764(1-2):197-204.
82. **O’Keefe J. and Dostrovsky J** (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely moving rat. *Brain Res.* 34: 171-175.
83. **Olsen R.W., Avoli M.,** (1997). GABA and epileptogenesis. *Epilepsia* 38:399–407.
84. **Papathodoropoulos C., and Kostopoulos G.** (2000). Decreased ability of rat temporal hippocampal CA1 region to produce long-term potentiation. *Neurosci. Lett.* 279: 177-180.
85. **Papathodoropoulos C., Asprodini E., Nikita I., Koutsona C., and Kostopoulos G.** (2002). Weaker synaptic inhibition in CA1 region of ventral compared to dorsal rat hippocampal slices. *Brain Res.* 948:117-21.
86. **Racine R, Rose P.A, Burnham W.M.** (1977). Afterdischarge thresholds and kindling rates in dorsal and ventral hippocampus and dentate gyrus. *Can J Neurol Sci.* 4(4):273-8.
87. **Rempel-Clower N.L., Zoal S.M., Squire L.R., Amaral D.G.** (1996). Three cases of enduring memory impairment after bilateral damage limited to the hippocampal formation. *J.Neurosci*16: 5233-5255.
88. **Risold P.Y., Swanson L.W.** (1997). Connections of the rat lateral septal complex. *Brain Res Brain Res Rev.* 24(2-3):115-95.
89. **Rudy B.** (1988). Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience* 25: 729-749.
90. **Sah P.** (1996). Ca(2+)-activated K+ currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *Trends Neurosci.* 19(4):150-4.
91. **Sanabria E.R.G., Hailing S., Yaari Y.,** 2001. Initiation of network bursts by Ca2+-dependent intrinsic bursting in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J. Physiol. (London)* 532: 205–216.
92. **Sapolsky R.M.,** (1996). Why stress is bad for your brain. *Science* 273: 749– 750.
93. **Sapolsky R.M.,** (2000). Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch. Gen. Psychiatry* 57: 925– 935.
94. **Sawchenko P.E. Swanson, L.W.** (1983). The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *J. Comp. Neurol.* 218: 121–144.

95. **Scheff S.W., Price D.A.** (1993). Synapse loss in the temporal lobe in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 33:190–9.
96. **Schwartzkroin P.A.**, (1975). Characteristics of CA1 neurons recorded intracellularly in the hippocampal in vitro slice preparation. *Brain Res.* 85: 423-436.
97. **Scoville W.B. and Milner B.** (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Psychiatry* 20: 11-21.
98. **Shepherd G.M.** (1998). *The Synaptic Organization of the Brain*. 4th Edition, Oxford University Press.
99. **Simpson M.D.C., Slater P, Deakin J.F.W.** (1998) Comparison of glutamate and gamma-aminobutyric acid uptake binding sites in frontal and temporal lobes in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 44:423–427.
100. **Sloviter R.S.** (1987). Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy. *Science* 235: 73–76.
101. **Sloviter R.S.**, (1991). Permanently altered hippocampal structure, excitability, and inhibition after experimental status epilepticus in the rat: the “dormant basket cell” hypothesis and its possible relevance to temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 1: 41–66.
102. **Stoop R. and Pralong E.** (2000). Functional connections and epileptix spread between hippocampus, entorhinal cortex and amygdala in a modified horizontal slice preparation of the rat brain. *Europ J Neurosci* 12: 3651-3663.
103. **Storm J.F.** (1987). Action potential repolarization and a fast after-hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol.*385:733-59.
104. **Storm J.F.** (1988) Temporal integration by a slowly inactivating K⁺ current in hippocampal neurons. *Nature.* 24;336(6197):379-81.
105. **Storm J.F.** (1989). An after hyperpolarization of medium duration in rat hippocampal pyramidal cells. *Biophys. J.*, 51: 65a.
106. **Storm J.F.** (1990). Potassium currents in hippocampal pyramidal neurons. *Progress in Brain Res*, 83 (12): 161-187.
107. **Strange B, Dolan R.** (1999). Functional segregation within the human hippocampus. *Mol Psychiatry.*4(6):508-11.
108. **Su H., Alroy G., Kirson E.D., AND Yaari Y.** (2001). Extracellular calcium modulates persistent sodium current-dependent burst-firing in hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurosci.*, 21(12): 4173-4182.
109. **Sweat D.J.** (2004). Hippocampal function in cognition. *Psychopharmacology* 174: 99-110.
110. **Tang Y., Shimizu E., Dube G.R., Rampon C., Kerchner G.A., Zhuo M., Guosong L., Tslen J.Z.** (1999). Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Letters to Nature* 401: 63-69.
111. **Tanila H, Shapiro M.L., Eichenbaum H.** (1997a). Discordance of spatial representations in ensembles of hippocampal place cells. *Hippocampus* 7: 613-623.
112. **Tyving E and Markowitsch H.J.** (1998). Episodiv and Declarative memory: role of the hippocampus. *Hippocampus* 8: 198-204.
113. **van Groen T, Wyss J.M.**(1990). Extrinsic projections from area CA1 of the rat hippocampus: olfactory, cortical, subcortical, and bilateral hippocampal formation projections. *J Comp Neurol.* 15;302(3):515-28.
114. **Wood E.R., Dudchenko P.A, Eichenbaum H.** (1999). The global record of memory in hippocampal neuronal activity. *Nature* 397: 613-616.
115. **Wong R.K.S and Prince D.A.** (1978). Participation of calcium spikes during intrinsic burst firing in hippocampal neurons. *Brain Res.* 159: 385-390.
116. **Wong R.K.S and Prince D.A.** (1981). Afterpotential generation in hippocampal pyramidal cells. *J Neurophysiol.* 45(1):86-97.

117. **Woolley C.S., Gould E., McEwen B.S.** (1990). Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons. *Brain Res.* 531: 225–231.
118. **Wright I.C., Rabe-Hesketh S, Woodruff P.W., David A.S., Murray R.M., Bullmore E.T.** (2000). Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 157(1):16-25.
119. **Wuarin, J.P. Dudek, F.E.** (1996). Electrographic seizures and new recurrent excitatory circuits in the dentate gyrus of hippocampal slices from kainate-treated epileptic rats. *J. Neurosci.* 16: 1–11.