



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Εργαστήριο Φαρμακολογίας

Διδακτορική Διατριβή

**„ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΟΠΙΟΕΙΔΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΝΕΥΡΩΝΕΣ ΤΟΥ
ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΥ ΕΠΙΜΥΟΣ„**

υπό

ΝΙΚΗΣ ΠΙΠΠΙΔΟΥ

Ιατρού

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

ΛΑΡΙΣΑ, 2015

© 2015 Νίκη Πιπτίδου

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

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

**1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπουσα)**

Ευτυχία **Ασπροδίνη**
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

2^{ος} Εξεταστής

Ιωάννης **Παρναβέλας**
Καθηγητής, Dept. of Cell and Developmental Biology University College
London, UK

3^{ος} Εξεταστής

Γεώργιος **Κωστόπουλος**
Καθηγητής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Πατρών

4^{ος} Εξεταστής

Αικατερίνη **Ψαροπούλου**
Καθηγήτρια Φυσιολογίας, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και
Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

5^{ος} Εξεταστής

Γεώργιος **Χατζηγεωργίου**
Καθηγητής Νευρολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

6^{ος} Εξεταστής

Μαρία **Ιωάννου**
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

7^{ος} Εξεταστής

Κωνσταντίνος **Μπονώτης**
Λέκτορας Ψυχιατρικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ την καθηγήτριά μου Ε. Ασπροδίνη,
τον Ηλία, το Βαγγέλη, την Αγγελική
τον Κυριάκο, τον Σάββα, τους γονείς μου.

Νίκη Πιππίδου

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Πιππίδου Νίκη MD, MSc, PhD

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο: Πιππίδου Νίκη του Ιωάννη
Διεύθυνση: Τσιμισκή 137
Τ.Κ.54621 Θεσσαλονίκη
Τηλ. Επικοινωνίας: 6973048831
Ημ. Γέννησης: 05 Μαΐου 1979
Οικ. κατάσταση: Έγγαμη, μητέρα ενός παιδιού

ΣΠΟΥΔΕΣ

Πτυχίο Ιατρικής: Φεβρουάριος 2006 Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
Μεταπτυχιακές σπουδές: Ιανουάριος 2011 Μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής». Διπλωματική εργασία με τίτλο «Επίδραση οπιοειδών φαρμάκων στην ανοσοϊστοχημική έκφραση του GABA στο ραχιαίο υπόκαμπο, συγκριτική μελέτη διαφορετικών τεχνικών μονιμοποίησης». Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Ε. Ασπροδίνη, Αν. Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
Διδακτορική διατριβή: Οκτώβριος 2015
«Διερεύνηση της επίδρασης οπιοειδών φαρμάκων σε νευρώνες του υποκάμπου επίμυος», Επιβλέπουσα: Ε. Ασπροδίνη, Αν. Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Τμ. Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Η έρευνα επιχορηγήθηκε από το πρόγραμμα υποτροφιών του ΕΣΠΑ «Ηράκλειτος II».
Ξένες γλώσσες: Αγγλικά, Γερμανικά

ΕΡΓΑΣΙΑ

Υπηρεσία Υπαίθρου:

Αύγουστος 2006 - Μάιος 2008

Υπηρεσία Υπαίθρου στο Κέντρο Υγείας Αμυνταίου (τρίμηνη εκπαίδευση στο Γενικό Νοσοκομείο Φλώρινας).

Απασχόληση στον ιδιωτικό τομέα:

Οκτ. 2009 – Ιούλιος 2011

Παροχή ιατρικών υπηρεσιών ως εφημερεύων ιατρός στην ιδιωτική κλινική αποθεραπείας και αποκατάστασης «Ευεξία», και στην ιδιωτική ψυχιατρική κλινική «Ασκληπιείον».

Ειδίκευση στην Ψυχιατρική:

Ιούλιος 2011 – Σεπτέμβριος 2011 Ψυχιατρικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης, Υπηρεσία εξαρτήσεων ΙΑΝΟΣ.

Σεπτέμβριος 2011- Σεπτέμβριος 2012 Ψυχιατρικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης Β' Πανεπιστημιακή Ψυχιατρική Κλινική, τμήμα οξέων περιστατικών.

Σεπτέμβριος 2012 – Σεπτέμβριος 2014 Ψυχιατρικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης, Κοινοτικό Κέντρο Ψυχικής Υγείας Κεντρικού Τομέα. Εκπαίδευση σε ατομική συμβουλευτική, γνωστική συμπεριφορική, ψυχαναλυτική, οικογενειακή, βραχεία δυναμική εντατική και ομαδική ψυχοθεραπεία όπως επίσης και εκπαίδευση σε τμήμα ανηλίκων.

Οκτώβριος 2015 – σήμερα Εκπαίδευση στη Νευρολογία, στο Γενικό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης ΑΧΕΠΑ, Α' Πανεπιστημιακή Νευρολογική Κλινική.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ – ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Ν. Πιππίδου, Ν. Νικολαΐδης, Γ. Γαρύφαλλος. Παρουσίαση διαγνωστικής εξέλιξης περιστατικού με έναρξη ψυχοπαθολογίας στην παιδική ηλικία. Αναρτημένη ανακοίνωση, 3^ο Συνέδριο Βιοψυχοκοινωνικής Προσέγγισης στην Ιατρική Περίθαλψη, The Met Hotel, Θεσσαλονίκη, 28-30 Μαρτίου 2013.
2. Δ. Μπαλάρης, Ν. Πιππίδου, Ν. Νικολαΐδης, Γ. Γαρύφαλλος. Επιπτώσεις του στίγματος της ψυχικής νόσου στην αποτελεσματική διαχείριση παραμελημένου περιστατικού σχιζοφρένειας παρανοϊκού τύπου. Αναρτημένη ανακοίνωση, 3^ο Συνέδριο Βιοψυχοκοινωνικής Προσέγγισης στην Ιατρική Περίθαλψη, The Met Hotel, Θεσσαλονίκη, 28-30 Μαρτίου 2013.
3. Ν. Πιππίδου, Α. Γιαννακοπούλου, Ι. Δωρή, Ε. Κουβαράς, Γ. Κουκούλης, και Ε. Ασπροδίνη. Επίδραση της φεντανύλης στην ανοσοϊστοχημική έκφραση του GABA στον ιππόκαμπο – συγκριτική μελέτη διαφορετικών μεθόδων μονιμοποίησης. Αναρτημένη ανακοίνωση, 8ο Συνέδριο Ελληνική Εταιρεία Επιληψίας, Ξενοδοχείο Electra Palace, Θεσσαλονίκη, 18-20 Οκτωβρίου, 2013.
4. Ν. Pippidou, E. Kouvaras, O. Sinani, I.-D. Papageorgiou, A. Kantikou, G. Koukoulis and E. Asproдини. GABA immunohistochemistry in the rat hippocampus-comparison between perfusion and immersion fixation. Proceedings of the 26th Meeting of the Hellenic Society for Neurosciences Jointly with FP7 REGPOT NEUROSIGN, page 88, Eugenides Foundation, Athens, November 29-December 1, 2013.
5. E. Kouvaras, N. Pippidou, A. Kantikou and E.K. Asproдини. A single in vivo exposure to fentanyl induces long-lasting reduction of GABAergic inhibition in the CA1 area of the ventral hippocampus. 8th Congress of the Society for Basic and Clinical Pharmacology with the participation of the British Pharmacological Society, The Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens (BRFAA), Athens, 23-25 May, 2014.
6. E. Kouvaras, N. Pippidou, A. Kantikou, G. Koukoulis and E.K. Asproдини. In vitro slice preparation - relating function to labelling. 8th Congress of the Society for Basic and Clinical Pharmacology with the participation of the British Pharmacological Society, The Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens (BRFAA), Athens, 23-25 May, 2014.

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΟΠΙΟΕΙΔΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΝΕΥΡΩΝΕΣ ΤΟΥ
ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΥ ΕΠΙΜΥΟΣ**

ΝΙΚΗ ΠΙΠΠΙΔΟΥ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Ιωάννης Παρναβέλας**, Καθηγητής, Dept. of Cell and Developmental Biology University College London, UK
2. **Γεώργιος Κωστόπουλος**, Καθηγητής Φυσιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Πατρών
3. **Ευτυχία Ασπροδίνη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας – (Επιβλέπουσα)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο υποκάμπος αποτελεί μία από τις εκτενέστερα μελετημένες δομές του ΚΝΣ. Στον επίμυ ο υποκάμπος διακρίνεται στην ραχιαία και στην κοιλιακή μοίρα. Ο ραχιαίος υποκάμπος εμπλέκεται κυρίως σε γνωστικές διεργασίες (μνήμη, χωρική μνήμη και μάθηση), ενώ ο κοιλιακός σχετίζεται με το stress και το συναίσθημα. Ως προς τα ηλεκτροφυσιολογικά χαρακτηριστικά του, έχει βρεθεί ότι ο κοιλιακός υποκάμπος στον αρουραίο είναι περισσότερο διεγέρσιμος, και μάλιστα ότι η έγχυση οπιοειδών στον κοιλιακό υποκάμπο επιμύων *in vivo* προκαλεί επιληπτική δραστηριότητα, αντίθετα με έγχυση στον ραχιαίο υποκάμπο. Αντίθετα με τις υπόλοιπες δομές του ΚΝΣ, τα οπιοειδή προκαλούν στον υποκάμπο νευρωνική διέγερση η οποία μπορεί να οδηγήσει σε επιληπτική κρίση.

Έχει βρεθεί ότι η *in vivo* χορήγηση φεντανύλης επιδρά στη λειτουργία του υποκάμπου μέσω μείωσης της αναστολής των ενδονευρώνων (και της ανοσοθετικότητάς τους στο GABA). Ωστόσο, δεν έχουν γίνει αντίστοιχες μελέτες σε νευρώνες του κοιλιακού υποκάμπου. Σκοπός της εργασίας ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της *in vivo* χορήγησης φεντανύλης στην GABAεργική αναστολή σε *in vitro* παρασκεύασμα της CA1 περιοχής της κοιλιακής μοίρας του υποκάμπου. Παράλληλα, διερευνήθηκε η επίδραση της φεντανύλης στον πληθυσμό των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων στη ραχιαία και την κοιλιακή μοίρα του υποκάμπου, καθώς και η επίδραση: *i)* διαφορετικών μεθόδων μονιμοποίησης και *ii)* διαφορετικού χρόνου επώασης τομών υποκάμπου σε οξυγωνούμενο τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό στο πλήθος των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων στον υποκάμπο.

Τα αποτελέσματα της μελέτης καταδεικνύουν ότι: *i)* η χορήγηση φεντανύλης μειώνει την GABAεργική ανασταλτική διαβίβαση και τον αριθμό των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων στον κοιλιακό υποκάμπο και *ii)* ο αριθμός των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων είναι αυξημένος μετά από επώαση σε TENY σε σχέση με τον αριθμό των νευρώνων που παρατηρείται μετά από άμεση μονιμοποίηση του ιστού.

Συμπερασματικά, η παρούσα εργασία, παρέχοντας στοιχεία της επίδρασης εξωγενώς χορηγούμενης φεντανύλης στον κοιλιακό υποκάμπο, παρουσιάζει ακόμα μια πτυχή της διαφοροποίησης των δύο μοιρών του υποκάμπου και ένα ακόμα πλαίσιο ερμηνείας για να κατανοηθεί η δράση των οπιοειδών σε κοιλιακό και ραχιαίο υποκάμπο.

SUMMARY

The differentiation between the dorsal and ventral hippocampus is long known. Indeed, the hippocampal formation is differentiated along its longitudinal axis in terms of its anatomy, biochemistry and function. Electrophysiological evidence, obtained from *in vitro* slice preparations, shows that the ventral hippocampus, compared to the dorsal, exhibits enhanced susceptibility to epileptiform discharges and reduced GABAergic synaptic transmission. In addition, in contrast to the dorsal hippocampus, opioid infusion in the ventral hippocampus leads to epileptiform activity.

Acute exposure of brain tissue to opioids has been shown to inhibit neural activity except in the hippocampus where the net effect is excitation of pyramidal neurons. *In vitro* activation of m-opioid receptors (MOPrs), located exclusively on GABAergic interneurons, hyperpolarizes inhibitory interneurons and inhibits release of GABA from interneuronal terminals. Therefore, the excitatory response to opioids is considered to be an indirect effect, due to a disinhibitory process. We have previously shown that *in vivo* administration of fentanyl reduces GABAergic inhibition and increases excitability in the CA1 area of the dorsal hippocampus. However, the effects of opioid drugs such as fentanyl in the ventral hippocampus remain largely unknown and it has been the purposes of the present study. Concurrently, a method was developed that allowed the evaluation of the effects of fentanyl on both functional GABAergic inhibition and GABA immunoreactivity within the same dorsal/ventral hippocampal slices.

The results of the present study show reduced GABAergic inhibition 24h following fentanyl *in vivo* treatment in ventral hippocampus, accompanied by reduced GABAergic immunohistochemical localization. In addition, it was shown that immunopositive GABA neurons are more numerous in slices that had been first incubated in artificial cerebrospinal fluid compared to the ones that were fixed immediately after tissue dissection.

Although the cellular and network mechanisms involved in plastic alterations following opioid treatment are yet to be elucidated, the present work provides evidence towards the elucidation of the functional differentiation between the two hippocampal poles.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	13
1.1. Ανατομία και ιστολογία του υποκάμπου	15
1.2. Συνδέσεις του υποκάμπου.....	20
1.3. Διαφοροποίηση μεταξύ ραχιαίου και κοιλιακού υποκάμπου	25
1.4. Λειτουργικός ρόλος του υποκάμπου στον άνθρωπο	28
1.5. Υπόκαμπος και νόσοι του ανθρώπου	32
1.6. Κυτταρικοί πληθυσμοί του υποκάμπου	38
1.7. Νευροδιαβιβαστές στον υποκάμφο	44
1.8. Οπιοειδή πεπτίδια και οπιοειδικοί υποδοχείς	47
1.9. Οπιοειδή και υποκάμπος.....	54
1.10. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός GABAεργικών νευρώνων στον υποκάμφο.....	58
1.11. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	59
2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	60
2.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	60
2.1.1. Πειραματόζωα.....	60
2.1.2. Χορήγηση φεντανύλης – Πειραματικές ομάδες.....	60
2.1.3. Παρασκευή ιστού με τη μέθοδο της διήθησης με μονιμοποιητικό ολόκληρου του σώματος του ζώου (whole animal perfusion)	61
2.1.4. Παρασκευή ιστού με τη μέθοδο της μονιμοποίησης με εμβάπτιση λεπτής τομής ιστού (immersion fixation).....	63
2.1.7. Μικροσκοπία.....	68
2.1.8. Ηλεκτροφυσιολογική καταγραφή.....	68
2.1.9. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων	69
2.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	71
2.2.1 Επίδραση της φεντανύλης στον εντοπισμό των των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων.....	71
2.2.2. Επίδραση της φεντανύλης στη λειτουργία του υποκάμπου.....	89
2.2.2.1. Παθητικές και ενεργητικές ιδιότητες της κυτταρικής μεμβράνης των πυραμιδικών νευρώνων της CA1 περιοχής του κοιλιακού υποκάμπου – Επίδραση της φεντανύλης.....	89
2.2.2.2. Παθητικές ιδιότητες.....	89
2.2.2.3. Ενεργητικές ιδιότητες	96
2.2.2.4. Δυναμικά ενεργείας	98

2.2.2.5. Μεθυπερπολωτικά δυναμικά	99
2.2.2.6. Επαναλαμβανόμενες εκφορτίσεις	104
2.2.2.7. Συναπτική διέγερση των πυραμιδικών νευρώνων της CA1 περιοχής του κοιλιακού υποκάμπου – Επίδραση της φεντανύλης.	107
2.3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	112
2.3.1. Συνοπτική παρουσίαση των ευρημάτων	112
2.3.2. Επίδραση της φεντανύλης στην ανοσοθετικότητα του GABA.....	113
2.3.3. Επίδραση της φεντανύλης στη λειτουργία των νευρώνων της CA1 περιοχής.....	116
2.3.5. Λειτουργική σημασία των αποτελεσμάτων.....	118
2.4 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	120

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ιππόκαμπος

Ο ιππόκαμπος αποτελεί μία από τις εκτενέστερα μελετημένες δομές του κεντρικού νευρικού συστήματος. Η ιδιαίτερη γεωμετρία του οδήγησε τους Αλεξανδρινούς μελετητές της ιατρικής, κατά τα Ελληνιστικά χρόνια, να του δώσουν την ονομασία «Κέρας του Άμμωνος» (Cornu Ammonis), ορολογία η οποία διατηρείται έως σήμερα, στην περιγραφή των υποπεριοχών του CA1, CA2 και CA3 (Εικ. 3). Η δομή πήρε το σημερινό της όνομα το δέκατο έκτο αιώνα από τον ανατόμο Julius Ceasar Arnazi, ως αναφορά στο θαλάσσιο ιππόκαμπο, με τον οποίο προσομοιάζει (Εικ. 1).

Παρά το γεγονός ότι βρίσκεται κάτω από τον εγκεφαλικό φλοιό, ο ιππόκαμπος δεν αποτελεί υποφλοιώδη δομή, αλλά μια αναδίπλωση του φλοιού, πολύ λιγότερο αναπτυγμένη από το νεοφλοιό που τον περιβάλλει. Για το λόγο αυτό ονομάζεται αρχαιο- ή παλαιοφλοιός. Η απλή, στιβαδωτή κυτταροαρχιτεκτονική του τον καθιστά πρόσφορο αντικείμενο μελέτης, και αυτός είναι ένας από τους λόγους για τους οποίους αποτελεί μία από τις καλύτερα μελετημένες εγκεφαλικές δομές.

Από τη δεκαετία του 1950 και ύστερα, με αφορμή δημοσίευση του περιστατικού του ασθενούς H.M., ο οποίος υποβλήθηκε σε εγχείρηση αφαίρεσης του ιπποκάμπειου σχηματισμού και των περιβαλλόντων ιστών⁹⁶, αναγνωρίσθηκε ο σημαντικός ρόλος του ιπποκάμπου στις διαδικασίες της μνήμης και της μάθησης. Έκτοτε, η έρευνα αποκάλυψε τη συμμετοχή του τόσο σε γνωστικές διεργασίες όσο και σε παθολογίες του κεντρικού νευρικού συστήματος.

Ο ιπποκάμπειος σχηματισμός αποτελεί δομή του πρόσθιου εγκεφάλου και είναι τμήμα του μεταιχμιακού ή στεφανιαίου συστήματος, το οποίο αναφέρεται και ως «συναισθηματικός εγκέφαλος». Το μεταιχμιακό σύστημα περιλαμβάνει πολλές διαφορετικές φλοιώδεις και υποφλοιώδεις εγκεφαλικές δομές, όπως οι οσφρητικοί λοβοί, η αμυγδαλή, οι πρόσθιοι θαλαμικοί πυρήνες, η ψαλίδα, η έλικα του προσαγωγίου, ο υποθάλαμος, τα μαστία, ο επικλινής πυρήνας του διαφράγματος και ο ενδορρινικός φλοιός. Πρόκειται για μια σειρά

δομών οι οποίες επιτελούν λειτουργίες σχετιζόμενες με το συναίσθημα, τη μνήμη, τη μάθηση, τη νόηση αλλά και την όσφρηση.



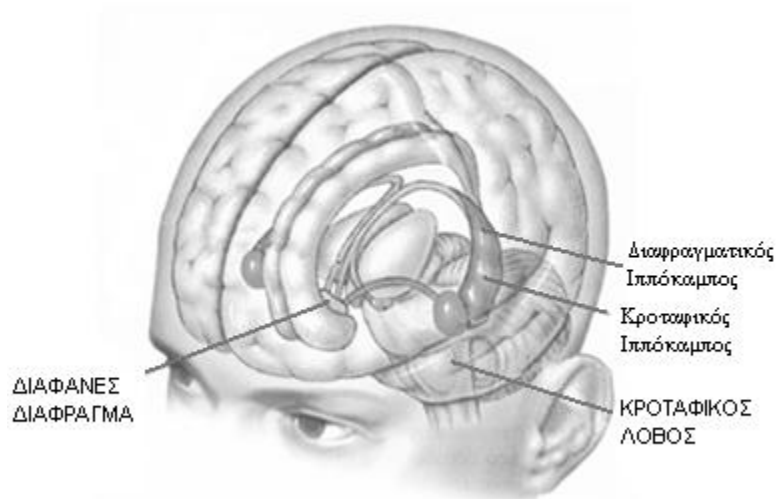
Εικόνα 1. Επάνω: Αναπαράσταση του κερασφόρου αιγυπτιακού θεού Άμμωνος, έργο της ελληνιστικής περιόδου¹¹³. Κάτω: Ανατομικό παρασκεύασμα ανθρώπινου υποκάμπου σε σύγκριση με το θαλάσσιο υποκάμπο⁵.

1.1. Ανατομία και ιστολογία του ιπποκάμπου

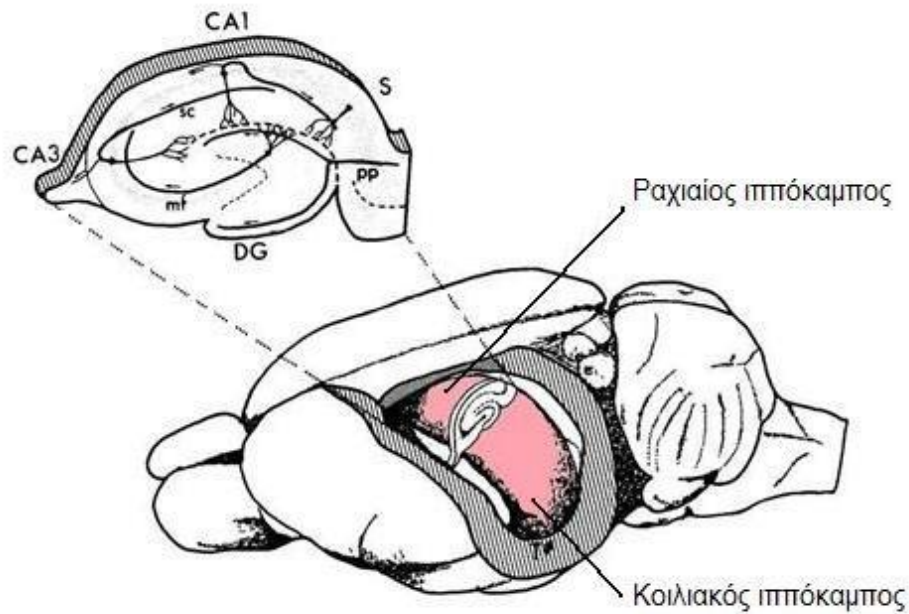
Μπορούμε να φανταστούμε το σχήμα του ιπποκάμπου ως δύο ραβδόμορφους σχηματισμούς οι οποίοι έχουν κυρτωθεί σε σχήμα C και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν μαζί έτσι ώστε στο ένα τους άκρο να έρχονται σε επαφή και στη συνέχεια να απομακρύνονται ο ένας από τον άλλο (Εικ. 2, 3).

Η δομή εκτείνεται από το διαφανές διάφραγμα κοντά στη μέση γραμμή, πορεύεται κατά μήκος της οροφής της πλάγιας κοιλίας και, αφού κυρτωθεί, κατευθύνεται προς τα κάτω και έξω και καταλήγει στον κροταφικό λοβό. Στο άνθρωπο διακρίνεται σε πρόσθιο ή κροταφικό (temporal) και οπίσθιο ή διαφραγματικό (septal) ιππόκαμπο. Οι αντίστοιχες περιοχές του ιπποκάμπου του επίμουσ ονομάζονται κοιλιακός (ventral) και ραχιαίος (dorsal) ιππόκαμπος.

Η εσωτερική δομή του ιδίως ιπποκάμπου, σε τομή κάθετη ως προς τον άξονα κάθε ενός από τους δύο ραβδόμορφους σχηματισμούς, διαφοροποιείται σε τρία μορφώματα: την Οδοντωτή Έλικα (Dentate Gyrus), τον Κυρίως Ιππόκαμπο ή Αμμώνιο Κέρα (Cornu Ammonis) και το Υπόθεμα (Subiculum) (Εικ. 3 και 4).



Εικόνα 2. Η θέση του ιπποκάμπου στον ανθρώπινο εγκέφαλο. Σημειώνονται οι θέσεις του διαφραγματικού και κροταφικού τμήματος του ιπποκάμπου¹¹⁶

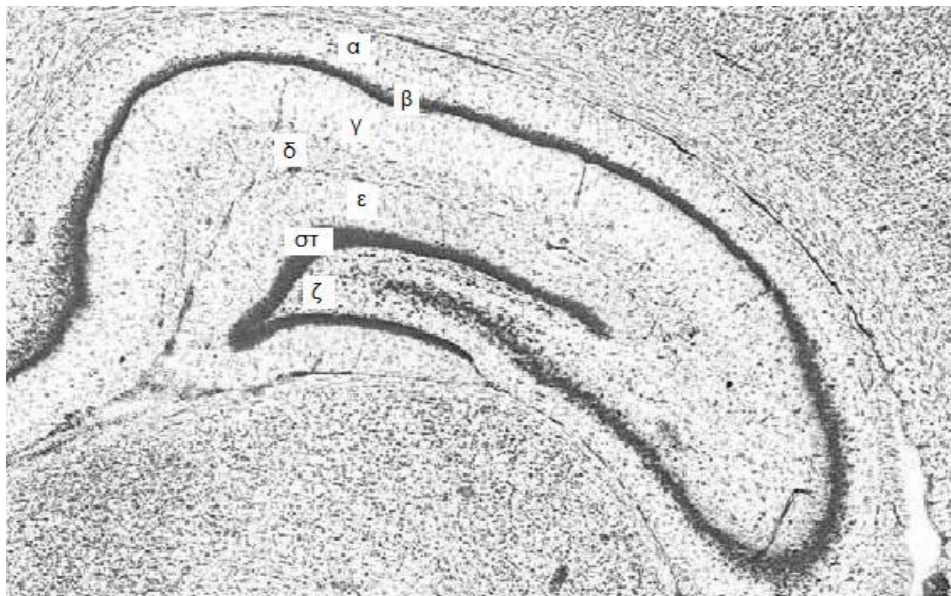


Εικόνα 3. Ο ιππόκαμπος του επίμυος. Ο ιππόκαμπος στον εγκέφαλο του επίμυος απεικονίζεται με έντονο χρώμα. Η κάθετη τομή κατά μήκος του άξονα του ραβδόμορφου σχηματισμού αποκαλύπτει την οδοντωτή έλικα (DG) το αμμώνειο κέρας (CA) και το υπόθεμα (S). Σημειώνονται οι θέσεις του ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου³.

Στον Κυρίως Ιππόκαμπο ή Αμμώνειο Κέρας (Cornu Ammonis) διακρίνονται οι περιοχές CA1, CA2 και CA3 (διαχωρίζεται περαιτέρω στις περιοχές CA3a ή fimbrial, κοντά στην παρυφή του ιπποκάμπου, CA3b ή ventricular, αντίστοιχα προς την τρίτη κοιλία και CA3c ή hilar, κοντά στην πολύμορφη στιβάδα της οδοντωτής έλικας). Στις περιοχές αυτές διακρίνονται οι εξής κυτταρικές στιβάδες (Εικ. 3, 4, 5):

1. Η σκάφη (alveus), μία μικρού εύρους στιβάδα που διατρέχεται κυρίως από εξερχόμενες αλλά και εισερχόμενες αξονικές ίνες.
2. Η στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων (stratum oriens) στην οποία βρίσκονται οι βασικοί δενδρίτες των πυραμειδικών κυττάρων του ιπποκάμπου και αρκετοί ενδονευρώνες ή διαμεσοι νευρωνες.
3. Η πυραμειδική στιβάδα (stratum pyramidale), που περιλαμβάνει τα κυτταρικά σώματα των πυραμειδικών νευρώνων, των κυρίως νευρώνων του Αμμωνείου Κέρατος.

4. Η διαυγής στιβάδα (stratum lucidum), παρούσα μόνο στην περιοχή CA3, μία ακυτταρική στιβάδα στην οποία απαντώνται οι βρυώδεις ίνες (mossy fibers).
5. Η ακτινωτή στιβάδα (stratum radiatum) όπου απαντώνται οι παράπλευρες ίνες του Schaffer.
6. Η βοθριώδης-μοριακή στιβάδα (stratum lacunosum-moleculare), η οποία περιλαμβάνει τμήματα κορυφαίων δενδριτών των πυραμιδικών κυττάρων (εγγύς και άπω κορυφαίοι δενδρίτες, αντίστοιχα). Εδώ καταλήγουν ίνες προερχόμενες από το ενδορρινικό φλοιό και άλλους πυρήνες του εγκεφάλου, όπως ο θάλαμος⁵.



Εικόνα 4. Παρασκεύασμα υποκάμπου επίμυος, όπου σημειώνονται οι κυτταρικές στιβάδες της περιοχής CA1 του ιδίως υποκάμπου (α έως δ) και της οδοντωτής έλικας (ε έως ζ): (α) στιβάδα πολύμορφων κυττάρων, (β) πυραμιδική στιβάδα, (γ) ακτινωτή στιβάδα, (δ) βοθριώδης μοριακή στιβάδα, (ε) μοριώδης στιβάδα της οδοντωτής έλικας, (στ) κοκκιώδης στιβάδα της οδοντωτής έλικας, (ζ) πολύμορφη στιβάδα της οδοντωτής έλικας⁸⁷.

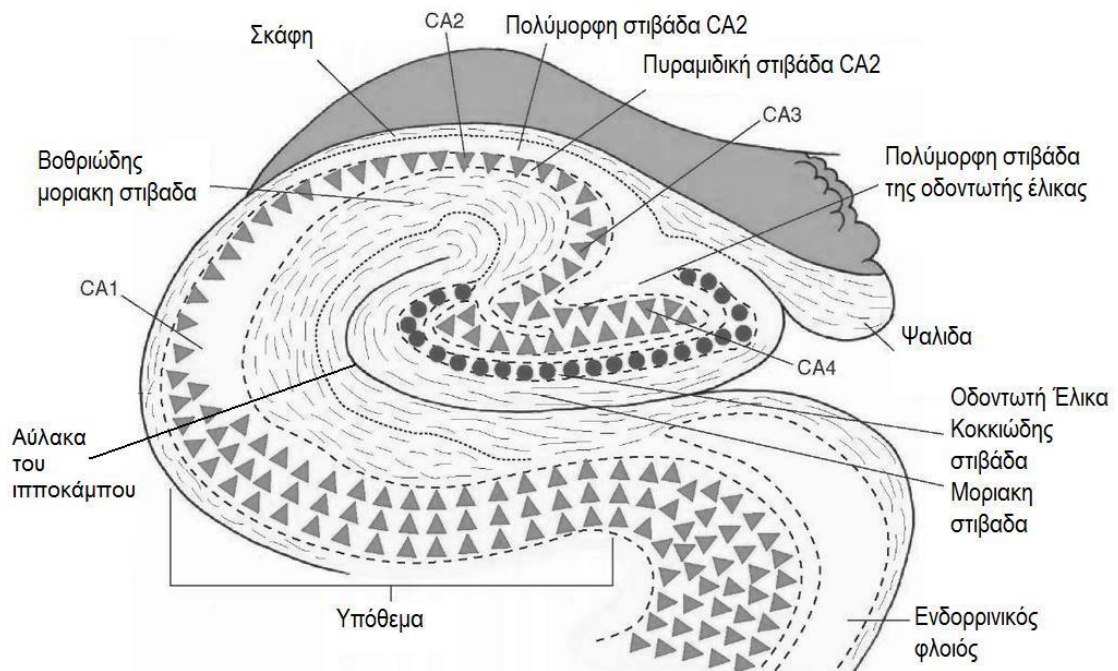
Στην οδοντωτή έλικα διακρίνουμε τρεις κυτταρικές στιβάδες (Εικ. 4 και 5):

1. Η μοριώδης στιβάδα (molecular layer), όπου εκτείνονται οι δενδρίτες των κοκκιωδών κυττάρων.

2. Η κοκκιώδης στιβάδα (granule cell layer), η οποία περιέχει τα κοκκώδη κύτταρα, τα κύρια κύτταρα της οδοντωτής έλικας.

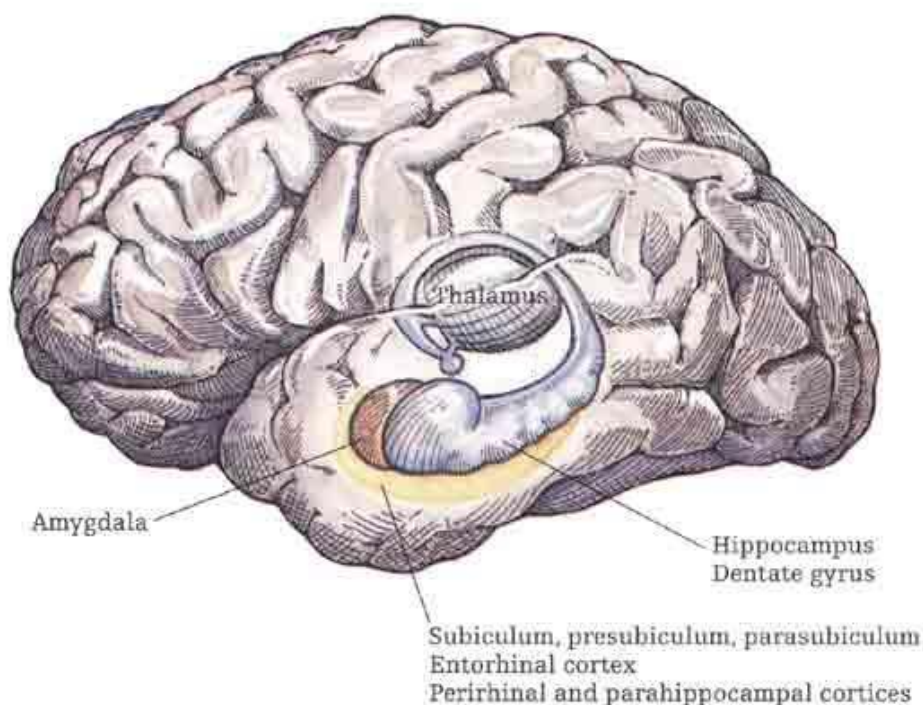
Η μοριώδης μαζί με την κοκκώδη στιβάδα συχνά αναφέρονται μαζί ως οδοντωτή ταινία (fascia dentata).

3. Η πολύμορφη στιβάδα (hilus), η οποία περιέχει κύτταρα ποικίλης μορφολογίας, με σημαντικότερο εκπρόσωπο τα βρυώδη κύτταρα (mossy cells), κύτταρα με διεγερτική δράση, τα οποία κατατάσσονται στην κατηγορία των ενδονευρώνων ή διάμεσων νευρώνων.



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση του ιπποκάμπου. Στην εικόνα φαίνεται σχηματικά, εκτός από τις κυτταρικές στιβάδες των υποπεριοχών του ιπποκάμπου, και η κατανομή των πυραμειδικών νευρώνων του ιδίως ιπποκάμπου και του υποθέματος, όπως και η κατανομή των κοκκιωδών κυττάρων της οδοντωτής έλικας. Σημειώνεται επίσης η θέση της αύλακας του ιπποκάμπου (hippocampal sulcus, hippocampal fissure), της αναδίπλωσης η οποία διαχωρίζει την οδοντωτή έλικα από την περιοχή CA1 και το υπόθεμα¹¹⁸

Στην πύλη της οδοντωτής έλικας, στην περιοχή που βρίσκεται μέσα στον ημικυκλικό σχηματισμό που δημιουργούν τα κύτταρα της κοκκώδους στιβάδας, ορισμένοι συγγραφείς αναφέρουν και την περιοχή CA4 (end folium). Στην περιοχή αυτή, η πυκνά δομημένη στιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων του Αμμωνίου κέρατος, των περιοχών CA1-3 αρχίζει να αποδομείται και τα πυραμιδικά κύτταρα εντοπίζονται εδώ αραιά διασπαρμένα (Εικ. 5).



Εικόνα 6. Άποψη της ανατομίας του υποκάμπου ανθρώπου. Διακρίνονται οι παραϊποκάμπειες δομές: το προϋπόθεμα (presubiculum), το παραϋπόθεμα (parasubiculum), ο ενδορρινικός φλοιός (entorhinal cortex), ο περιρρινικός φλοιός (perirhinal cortex) και η παραϊποκάμπεια έλικα (parahippocampal cortex). Διακρίνεται επίσης η θέση των δομών του ιδίως υποκάμπου (hippocampus), της οδοντωτής έλικας (dentate gyrus) και του υποθέματος (subiculum), όπως επίσης φαίνεται ο θάλαμος (thalamus) και η αμυγδαλή (amygdala), στο βάθος του κροτφικού λοβού¹¹¹

Το υπόθεμα αποτελεί μία από τις λιγότερα μελετημένες περιοχές του υποκάμπου. Οι κύριες κυτταρικές του στιβάδες είναι η πυραμιδική, ευρύτερη σε έκταση από την αντίστοιχη του κυρίως υποκάμπου, και η μοριακή, της οποίας το επιφανειακό τμήμα αποτελεί συνέχεια της βοθριώδους μοριακής στιβάδας του κυρίως υποκάμπου και το κατώτερο τμήμα αποτελεί συνέχεια της ακτινωτής του στιβάδας. Το υπόθεμα αποτελεί μία από τις σημαντικότερες

αφετηρίες απαγωγών ινών του υποκάμπου, με συνδέσεις προς ποικίλα κέντρα του κεντρικού νευρικού συστήματος: το προϋπόθεμα, το παραϋπόθεμα, τον ενδορρινικό φλοιό, την αμυγδαλή, το νεοφλοιό, τον ενωτικό και άλλους πυρήνες του θαλάμου, τα μαστία του υποθαλάμου και το εγκεφαλικό στέλεχος.

Σημείο αναφοράς στη μελέτη της δομής του υποκάμπου αποτελεί επίσης η αύλακα του υποκάμπου (hippocampal fissure), η οποία βρίσκεται ανάμεσα στην οδοντωτή έλικα και τις περιοχές CA1-3 και αποτυπώνει την πορεία της εμβρυολογικής εξέλιξης του υποκάμπου.

Στον υποκάμπειο σχηματισμό ανήκουν επίσης άμεσα γειτονικές δομές (παραϊποκάμπειες δομές) όπως ο ενδορρινικός φλοιός, ο περιρρινικός φλοιός, η παραϊποκάμπεια έλικα, το προϋπόθεμα και το παραϋπόθεμα (Εικ. 3 και 6).

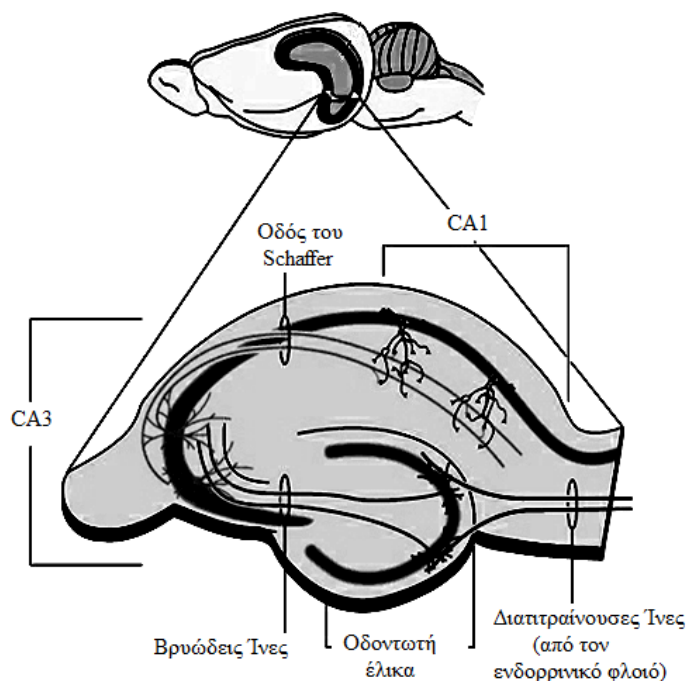
1.2. Συνδέσεις του υποκάμπου

Το τοπικό δίκτυο του υποκάμπου, το τρισυναπτικό κύκλωμα

Μία κοινή παραδοχή σχετικά με τις φλοιϊκές νευρωνικές συνδέσεις είναι ότι αυτές συνήθως είναι αμφίδρομες. Κάτι τέτοιο όμως δεν ισχύει και για τον υποκάμπο. Η συνδεσμολογία του τοπικού δικτύου του υποκάμπου αναφέρεται ως τρισυναπτικό κύκλωμα (trisynaptic pathway), και είναι γνωστή, σε γενικές γραμμές, από την εποχή του S. Ramon y Cajal (1911), του πρώτου ιστολόγου μελετητή της υποκάμπειας δομής.

Το τρισυναπτικό κύκλωμα ξεκινά από τον ενδορρινικό φλοιό. Νευρώνες των επιφανειακών στοιβάδων του ενδορρινικού φλοιού παρέχουν άξονες οι οποίοι διατρέχουν το υπόθεμα και συνάπτονται κυρίως με τα κοκκιώδη κύτταρα της οδοντωτής έλικας. Σχηματίζεται έτσι μέρος της κύριας οδού εισαγωγής των πληροφοριών του υποκάμπου, της **οδού των διατιτραινουσών ινών** (perforant path). Τα κοκκιώδη κύτταρα της οδοντωτής έλικας δεν «απαντούν» στον ενδορρινικό φλοιό (δεν ολοκληρώνουν αμφίδρομο δίκτυο επικοινωνίας),

αλλά χορηγούν άξονες προς τα πυραμιδικά κύτταρα της CA3 περιοχής σχηματίζοντας την **οδό των βρυωδών ινών** (mossy fibres). Τα πυραμιδικά κύτταρα της CA3 περιοχής δεν επικοινωνούν με την οδοντωτή έλικα, παρά μόνο παρέχουν τους άξονες της **οδού Schaffer** (Schaffer collaterals) που καταλήγουν στα πυραμιδικά κύτταρα της CA1 περιοχής. Τέλος, τα κύτταρα της CA1 περιοχής νευρώνουν κύτταρα του υποθέματος και των εν τω βάθει στοιβάδων του ενδορρινικού φλοιού. Το τρισυναπτικό κύκλωμα ολοκληρώνεται με τη σύνδεση των κυττάρων των εν τω βάθει στοιβάδων του ενδορρινικού φλοιού με τις επιφανειακές του στοιβάδες⁵ (Εικ.7).



Εικόνα 7. Το τρισυναπτικό κύκλωμα του υποκάμπου επίμυος. Έχει γίνει τομή κάθετη ως προς τον επιμήκη άξονα του υποκάμπειου σχηματισμού¹¹⁵

Εξωτερικές συνδέσεις του υποκάμπου

Οι κύριες δεσμίδες ινών οι οποίες ενώνουν τον υποκάμπο με τα υπόλοιπα κέντρα του εγκεφάλου είναι η ψαλίδα, οι δεσμίδες του μαστίου και το προσαγωγίο. Μέσω αυτών των οδών έρχονται στον υποκάμπο πληροφορίες, ή φεύγουν, με κατεύθυνση άλλα κέντρα (Εικ. 8).

Προσαγωγές ίνες του υποκάμπου: Οι προσαγωγές ίνες τις οποίες δέχεται ο υποκάμπος εκπορεύονται από διαφορετικά σημεία του εγκεφάλου.

Φλοιϊκές προσαγωγές ίνες:

Στον ιππόκαμπο καταλήγουν προσαγωγές ίνες από διαφορετικά σημεία του φλοιού. Οι περισσότερες ίνες συνάπτονται στον ενδορρινικό φλοιό, την αφετηρία του τρισυναπτικού κυκλώματος, άλλες καταλήγουν στον περιρρινικό και παραϊπποκάμπειο φλοιό, πριν από τη σύναψή τους στον ενδορρινικό φλοιό, και άλλες παρακάμπτουν τον ενδορρινικό φλοιό και απολήγουν απευθείας στο υπόθεμα του ιπποκάμπου. Μέσω αυτών των οδών φτάνουν στον ιππόκαμπο πληροφορίες από σύνθετες συνειρμικές οπτικές, ακουστικές και σωματοαισθητικές περιοχές⁸⁰.

Αμυγδαλή:

Ο ενδορρινικός φλοιός δέχεται σημαντικό αριθμό ινών κυρίως από τους έξω και τους βασικούς αμυγδαλικούς πυρήνες, ενώ οι βασικοί πυρήνες προβάλλουν επίσης και στο υπόθεμα⁸⁰.

Έσω πυρήνας του διαφράγματος και πυρήνας της διαγώνιας ταινίας:

Ο έσω πυρήνας του διαφράγματος και ο πυρήνας της διαγώνιας ταινίας περιέχουν μεγάλο αριθμό χολινεργικών νευρώνων. Έχει αποδειχθεί ότι οι πολυάριθμες χολινεργικές ίνες του ιπποκάμπειου σχηματισμού προέρχονται από τους πυρήνες αυτούς. Οι συνδέσεις όμως προς τον ιππόκαμπο και τις παραϊπποκάμπειες περιοχές δεν είναι όλες χολινεργικές. Εντοπίζονται και άλλοι νευροδιαβιβαστές, όπως το γ-αμινο βουτυρικό οξύ (GABA) και η ουσία P. Αξίζει επίσης να σημειώσουμε ότι οι διαφραγματο-ιπποκάμπειες συνδέσεις εμπλέκονται σε σημαντικό βαθμό στη δημιουργία του θήτα ρυθμού, της χαρακτηριστικής ρυθμικής ηλεκτρικής δραστηριότητας του ιπποκάμπου⁸⁰.

Θάλαμος:

Ο ιππόκαμπος δέχεται ίνες από τους πρόσθιους πυρήνες και το σύμπλεγμα των πυρήνων της μέσης γραμμής του ραχιαίου θαλάμου. Οι ίνες των πρόσθιων πυρήνων του θαλάμου απολήγουν στο υπόθεμα, αποτελώντας μέρος του κυκλώματος του Papez, η λειτουργία του οποίου αρχικά θεωρήθηκε ότι έχει να κάνει με το συναίσθημα, πλέον όμως θεωρείται ότι

αφορά στη μνήμη. Οι ίνες των θαλαμικών πυρήνων της μέσης γραμμής απολήγουν στον ενδορρινικό φλοιό, στο φλοιό του υποθέματος και στην CA1 περιοχή του υποκάμπου, και εμπλέκονται στη μεταφορά σπλαχνικοαισθητηριακών πληροφοριών προς το μεταιχμιακό σύστημα⁸⁰.

Υπερμαστική περιοχή:

Μέσω της ψαλίδας φτάνει στον υποκάμπο ένας σημαντικός αριθμός ινών προερχόμενες από κύτταρα της περιοχής ραχιαία των μαστίων. Οι περισσότερες από τις ίνες αυτές απολήγουν στην οδοντωτή έλικα και στη γειτονική CA3 περιοχή του Αμμωνείου κέρατος και εμπλέκονται στη διαμόρφωση του θήτα ρυθμού⁸⁰.

Προσαγωγές ίνες μονοαμινεργικών κυτταρικών ομάδων του στελέχους:

Ο υποκάμπος δέχεται νοραδρενεργικές ίνες από τον υπομέλανα τόπο, σεροτονινεργικές ίνες από τους μεσεγκεφαλικούς πυρήνες της ραφής και ντοπαμινεργικές ίνες από την κοιλιακή καλύπτρα⁸⁰.

Απαγωγές ίνες του υποκάμπου: Οι απαγωγές ίνες του υποκάμπου κατατάσσονται σύμφωνα με την οδό που ακολουθούν μετά την έξοδό τους από τον υποκάμπο.

Ίνες του Αμμωνείου Κέρατος:

Οι ίνες αυτές προβάλλουν στον έξω πυρήνα του διαφράγματος και είναι πιθανώς γλουταμινεργικές. Τα κύτταρα από τα οποία προέρχονται χορηγούν επίσης και ενδοϊποκάμπειες παράπλευρες ίνες. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ο έξω πυρήνας του διαφράγματος επικοινωνεί με τον έσω πυρήνα του διαφράγματος και τον πυρήνα της διαγώνιας ταινίας, οι οποίοι με τη σειρά τους έχουν ισχυρή σύνδεση με τον υποκάμπο⁸⁰.

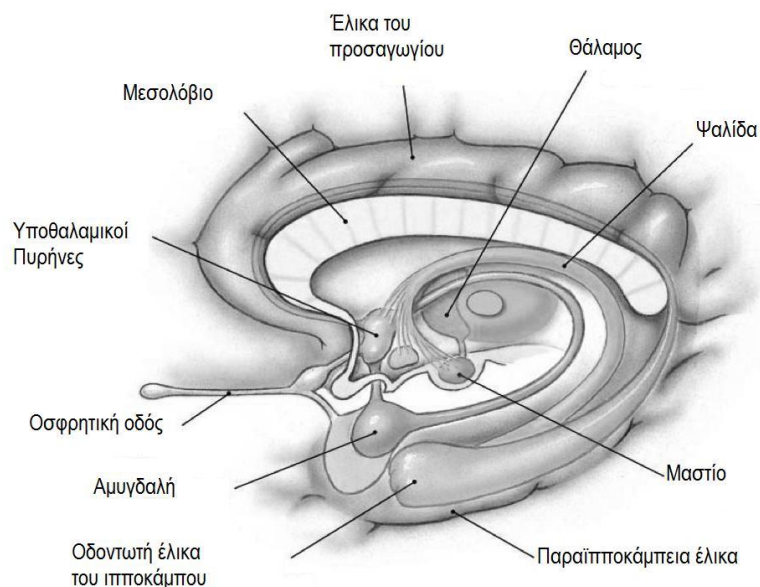
Ίνες του υποθέματος του υποκάμπου προς την προσυνδεσμική ψαλίδα:

Οι ίνες της προσυνδεσμικής ψαλίδας που εκφύονται από το υπόθεμα του υποκάμπου καταλήγουν στον έξω πυρήνα του διαφράγματος, στον επικλινή πυρήνα, στον κερκοφόρο

πυρήνα, στο κέλυφος, τον πρόσθιο οσφρητικό πυρήνα, στον προσυνδεσμικό ιππόκαμπο, στην έσω μοίρα του μετωπιαίου φλοιού και την ευθεία έλικα. Οι απαγωγές ίνες προς τον επικλινή πυρήνα αποτελούν τη σύνδεση του μεταιχμιακού συστήματος με σωματοκινητικούς μηχανισμούς⁸⁰.

Ίνες του υποθέματος του ιπποκάμπου προς τη μετασυνδεσμική ψαλίδα:

Οι περισσότερες ίνες της μετασυνδεσμικής ψαλίδας εκφύονται από το υπόθεμα του ιπποκάμπου, ενώ μικρό ποσοστό προέρχεται από την περιοχή του κέρατος του Άμμωνος. Κύριος προορισμός τους είναι τα μαστία, από όπου δημιουργούνται οδοί προς το θάλαμο και την καλύπτρα. Σχηματίζεται έτσι μέρος ενός κυκλώματος το οποίο αφορά στο μεταιχμιακό σύστημα και στο μέσο εγκέφαλο⁸⁰.



Εικόνα 8. Σχηματική απεικόνιση του ανθρώπινου ιπποκάμπου και των περιβαλλόντων δομών. Σημειώνονται κάποιες από τις δομές που συμμετέχουν στη σύνδεση του ιπποκάμπου με άλλα κέντρα του εγκεφάλου¹¹⁷

«Μη ψαλίδιες» ίνες:

Οι μη ψαλίδιες ίνες προβάλλουν κυρίως προς την αμυγδαλή και το νεοφλοιό. Η σύνδεση προς την αμυγδαλή είναι σαφώς ασθενέστερη από εκείνη η οποία αφορά πληροφορίες προερχόμενες από την αμυγδαλή. Οι ίνες οι οποίες προβάλλουν προς το νεοφλοιό προέρχονται από το υπόθεμα και τον ενδορρινικό και περιρρινικό φλοιό, και οι περισσότερες αποτελούν μέρος αμφίδρομων συστημάτων επικοινωνίας. Οι πληροφορίες από τον ιππόκαμπο διασπείρονται με αυτόν τον τρόπο προς ένα μεγάλο αριθμό σύνθετων συνειρμικών κέντρων και παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση της μακροχρόνιας μνήμης⁸⁰.

1.3. Διαφοροποίηση μεταξύ ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου

Στον άνθρωπο, ο ιππόκαμπος διακρίνεται με βάση τον προσανατολισμό του στο χώρο σε πρόσθιο ή κροταφικό (temporal) και οπίσθιο ή διαφραγματικό (septal) ιππόκαμπο. Ανάμεσα στις δύο αυτές περιοχές αναγνωρίζεται ο ενδιάμεσος (intermediate) ιππόκαμπος, ως μία μεταβατική δομή μεταξύ των δύο άκρων. Η αντίστοιχη διάκριση του ιπποκάμπου στον επίμου αφορά στον κοιλιακό (ventral), ενδιάμεσο (intermediate) και ραχιαίο (dorsal) ιππόκαμπο (Εικ. 2 και 3).

Λειτουργική διαφοροποίηση μεταξύ ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου

Η βιβλιογραφία παλαιότερα αντιμετώπιζε τον ιππόκαμπο είτε ως δομή με λειτουργίες καθαρά γνωστικές, σχετιζόμενες με τη μνήμη και τη μάθηση, είτε ως δομή ρυθμιστή του συναισθήματος, της οποίας η δυσλειτουργία οδηγεί σε ανάπτυξη ψυχοπαθολογίας. Συμπεριφορικές, ανατομικές και μελέτες γονιδιακής έκφρασης υποστηρίζουν πλέον ότι η διάκριση του ιπποκάμπου σε τρεις περιοχές, ραχιαίος, κοιλιακός και ενδιάμεσος, ανταποκρίνεται σε αντίστοιχη λειτουργική διάκριση: ο ραχιαίος ιππόκαμπος επιτελεί κυρίως γνωστικές λειτουργίες, ενώ ο κοιλιακός σχετίζεται με το stress και το συναίσθημα. Για παράδειγμα, η *χωρική μνήμη* στα πειραματόζωα ή η *ανάκληση χωρικών και προφορικών*

πληροφοριών στους ανθρώπους εξαρτάται από το ραχιαίο ιππόκαμπο, ενώ τομές στον κοιλιακό ιππόκαμπο μειώνουν την έκφραση άγχους και φόβου στα πειραματόζωα²⁹.

Οι διαφορές μεταξύ ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου εντοπίζονται:

- σε επίπεδο νευρωνικών κυκλωμάτων, καθώς ο ραχιαίος και ο κοιλιακός ιππόκαμπος διαφέρουν ως προς τις απαγωγές και προσαγωγές τους συνδέσεις
- σε ανατομικό επίπεδο, αφού για παράδειγμα ο αριθμός των GABAεργικών νευρώνων είναι μεγαλύτερος στην κοιλιακή μοίρα του ιπποκάμπου⁵³
- όσον αφορά στην ανθεκτικότητα στο stress και την ισχαιμία, καθώς αναφέρεται ότι το ραχιαίο τμήμα του ιπποκάμπου είναι πιο ευαίσθητο από το κοιλιακό^{1,75}

Πιθανολογείται ότι η ανθεκτικότητα του κοιλιακού ιπποκάμπου στο stress σχετίζεται με το χρόνο εμφάνισης της συμπτωματολογίας στη νόσο του Alzheimer, καθώς εκεί ο οπίσθιος ιππόκαμπος, εμπλεκόμενος με τις γνωστικές λειτουργίες, προσβάλλεται νωρίτερα από τον πρόσθιο ιππόκαμπο, το σχετιζόμενο με τις διαταραχές του συναισθήματος³⁸. Αξίζει να σημειώσουμε επίσης, ότι ο πρόσθιος ιππόκαμπος εμφανίζει μείωση του όγκου του σε ασθενείς με χρόνια καταθλιπτική συνδρομή¹⁰⁸.

Διαφοροποίηση διασυνδέσεων του ραχιαίου και του κοιλιακού ιπποκάμπου με άλλες εγκεφαλικές δομές

Οι προσαγωγές και απαγωγές ίνες προς και από το ραχιαίο και τον κοιλιακό ιππόκαμπο παρουσιάζουν επίσης σαφή διάκριση. Οι πιο σημαντικές προβολές της ραχιαίας περιοχής CA1 και του υποθέματος γίνονται προς την έλικα του προσαγωγίου, σε περιοχές οι οποίες διαχειρίζονται οπτικοχωρικές πληροφορίες και μνήμη. Το ραχιαίο υπόθεμα επίσης στέλνει αμφίδρομες ίνες προς τα μαστία και τον πρόσθιο θάλαμο, περιοχές επίσης εμπλεκόμενες με τη πλοήγηση στο χώρο. Επίσης, οι ραχιαίες περιοχές CA1 και CA3 προβάλλουν μέσω του έξω διαφραγματικού πυρήνα προς τον κεντρικό διαφραγματικό και τον υπερμαστικό πυρήνα, δομές οι οποίες ελέγχουν τον ιπποκάμπειο θήτα ρυθμό κατά την εθελούσια κίνηση του επίμου. Το ραχιαίο υπόθεμα προβάλλει μέσω του επικλινούς πυρήνα και του κελύφους προς την

κοιλιακή καλύπτρα, η οποία σχετίζεται με τη μετακίνηση και προς τη μέλαινα ουσία, η οποία συντονίζει τις κινήσεις των ματιών, του αυχένα και των άνω άκρων του επίμου²⁹.

Ο κοιλιακός υπόκαμπος, σε αντίθεση με το ραχιαίο, προβάλλει απευθείας προς τον οσφρητικό βολβό, βλάβη του οποίου οδηγεί στην εκδήλωση καταθλιπτικόμορφης συμπτωματολογίας. Η κοιλιακή περιοχή CA1 και το κοιλιακό υπόθεμα έχουν σημαντική αμφίδρομη επικοινωνία με πυρήνες της αμυγδαλής και προμετωπιαίες φλοιϊκές δομές, ένα κύκλωμα το οποίο στο σύνολό του συνδέεται με τη λειτουργία των περικοιλιακών και ενδιάμεσων περιοχών του υποθαλάμου. Οι περιοχές αυτές με τη σειρά τους αποτελούν σημείο ελέγχου συναισθηματικά εξαρτώμενων συμπεριφορών στον επίμου: της κατάποσης, της αναπαραγωγής και της άμυνας²⁹. Αξίζει να σημειώσουμε ότι η κοιλιακή περιοχή CA1 και το κοιλιακό υπόθεμα εμπλέκονται στον έλεγχο της νευροενδοκρινικής δραστηριότητας, μέσω των διαφραγματικών και προς την τελική ταινία συνδέσεών τους. Ο βασικός πυρήνας της τελικής ταινίας είναι η μόνη φλοιϊκή δομή η οποία προβάλλει προς τους νευροενδοκρινικούς νευρώνες του παρακοιλιακού πυρήνα του υποθαλάμου. Η επικοινωνία, επίσης, της κοιλιακής CA1 περιοχής και του κοιλιακού υποθέματος με τους κεντρικούς (μέσω του παραβραχιόνιου πυρήνα) και έξω αμυγδαλικούς πυρήνες συμβάλλει στη διαμόρφωση της μάθησης του φόβου και της αποστροφής, όπως και της εξαρτημένης μάθησης του Ρανιον στα πειραματόζωα. Οι ίδιες κοιλιακές περιοχές προβάλλουν και στον επικλινή πυρήνα, σε κέντρα τα οποία έχουν να κάνουν με την επιβράβευση και την αναζήτηση τροφής²⁹.

Ακόμα όμως και μέσα στο ενδοϊπποκάμπειο τρισυναπτικό κύκλωμα, βλέπουμε, σε γενικές γραμμές, προσανατολισμό στην πορεία των πληροφοριών, από την κοιλιακή οδοντωτή έλικα προς την κοιλιακή περιοχή CA3, από εκεί προς την κοιλιακή περιοχή CA1, στη συνέχεια στο κοιλιακό υπόθεμα, κ.ο.κ.²⁹.

Διαφοροποίηση ραχιαίου και κοιλιακού ιπποκάμπου όσον αφορά στα ηλεκτροφυσιολογικά τους χαρακτηριστικά

Ως προς τα ηλεκτροφυσιολογικά χαρακτηριστικά του, έχει βρεθεί ότι ο κοιλιακός υπόκαμπος στον αρουραίο είναι περισσότερο διεγέρσιμος, τόσο σε κυτταρικό επίπεδο όσο και σε επίπεδο

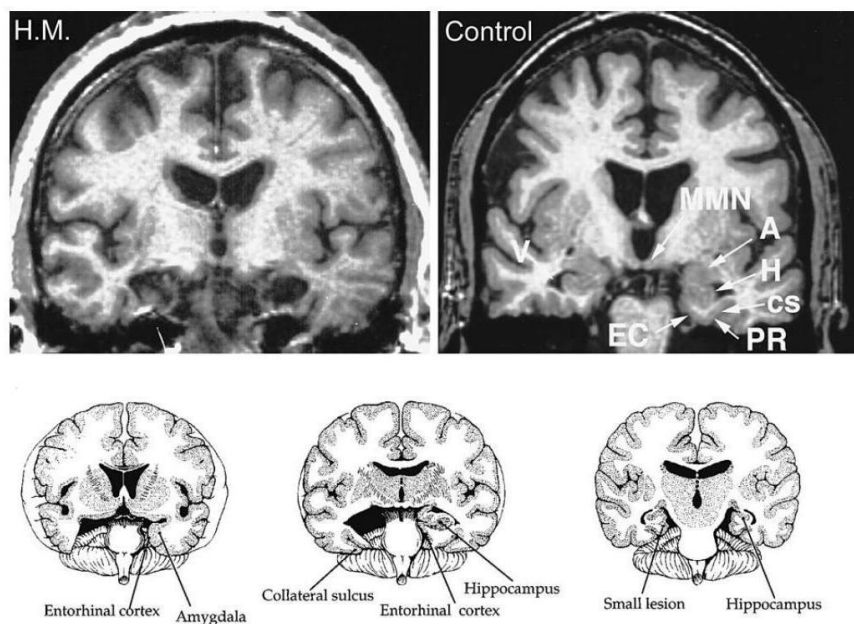
κυκλώματος. Σε σχέση επίσης με τον πρόσθιο υποκάμφο του ανθρώπου, ο κοιλιακός υποκάμφος του αρουραίου είναι περισσότερο επιρρεπής στην επιληπτογένεση in vivo, ενώ φέτες κοιλιακού υποκάμφου in vitro είναι περισσότερο επιρρεπείς σε επιληπτοειδείς εκφορτίσεις (μετά από αύξηση της εξωκυττάριας συγκέντρωσης καλίου, μετά από δυσαναστολή, δηλαδή άρση της δράσης των ανασταλτικών νευρώνων του ιστού, ή μετά από χορήγηση οπιοειδών).

1.4. Λειτουργικός ρόλος του υποκάμφου στον άνθρωπο

Υποκάμπος, μνήμη και μάθηση

Οι πρώτες δημοσιεύσεις σχετικά με τη συμμετοχή του υποκάμψου σχηματισμού (υποκάμπος και παραϊποκάμψεις περιοχές) στις λειτουργίες της μνήμης προέκυψαν με αφορμή το περιστατικό του ασθενούς H.M., στα μέσα του εικοστού αιώνα⁹⁶. Ο ασθενής H.M. υπέστη αμφοτερόπλευρη εκτομή τμημάτων του μέσου κροταφικού λοβού, στην προσπάθεια αντιμετώπισης ανθεκτικής επιληψίας. Η επέμβαση ήταν επιτυχής, όσον αφορά στην αντιμετώπιση της επιληψίας, ο ασθενής όμως εμφάνισε σημαντική διαταραχή της μνημονικής του λειτουργίας.

Συγκεκριμένα, είχε χάσει τη δυνατότητα να δημιουργεί νέες αναμνήσεις, ενώ οι αναμνήσεις πριν από την επέμβαση είχαν παραμείνει άθικτες (προχωρητική αμνησία). Εμφάνισε κάποια απώλεια μνήμης για γεγονότα λίγο προ της επέμβασής του (μερική αναδρομική αμνησία). Η νοημοσύνη και η αντίληψή του δεν είχαν επηρεαστεί. Η βραχύχρονη μνήμη του είχε διατηρηθεί, ήταν δηλαδή σε θέση να συγκρατήσει πληροφορίες, ή να επιτελέσει μία καινούρια δραστηριότητα για μικρό χρονικό διάστημα. Κάποια στοιχεία μακροχρόνιας μνήμης είχαν διατηρηθεί αφού, ενώ δεν ήταν σε θέση να δημιουργήσει νέες αναμνήσεις, μπορούσε, με τον καιρό, να καλλιεργήσει νέες δεξιότητες.



Εικόνα 9. Έκταση της εκτομής στον εγκέφαλο του ασθενούς H.M., συγκριτικά με τον εγκέφαλο υγιούς εθελοντή.

Επάνω: Απεικόνιση με χρήση μαγνητικής τομογραφίας. Ο υποκάμπος (H), η αμυγδαλή (A), η παράπλευρη αύλακα (CS), ο περιρρινικός φλοιός (PR), ο ενδορρινικός φλοιός (EC) και ο μέσος πυρήνας των μαστίων (MMN) έχουν υποστεί βλάβες. Κάτω: Περίληψη της έκτασης της βλάβης. Στον ασθενή και τα δύο ημισφαίρια έχουν τρωθεί. Εδώ το δεξιό φαίνεται φυσιολογικό, χάριν σύγκρισης (Endorhinal Cortex = Ενδορρινικός Φλοιός, Amygdala = Αμυγδαλή, Collateral Sulcus = Παράπλευρη Αύλακα, Hippocampus = Ιππόκαμπος, small lesion = μικρή τομή)²².

Η έρευνα σχετικά με την εμπλοκή του υποκάμπου στις διαδικασίες της μνήμης και της μάθησης συνεχίζεται μέχρι σήμερα, αν και είναι δύσκολο να απομονωθεί η συμμετοχή μίας μόνο περιοχής σε πολύπλοκες εγκεφαλικές λειτουργίες. Μαζί με τις γειτονικές φλοιϊκές δομές, ο υποκάμπος βρέθηκε ότι δραστηριοποιείται στην κωδικοποίηση και ανάκληση της μακροχρόνιας έκδηλης μνήμης (έκδηλη μνήμη ονομάζεται η μνήμη στην οποία έχουμε συνειδητή πρόσβαση, σε αντίθεση με την άδηλη μνήμη, η οποία αφορά, για παράδειγμα, το πώς οδηγούμε ένα ποδήλατο) σχετικά με δεδομένα και γεγονότα, η εμπλοκή του όμως σε αυτή έχει χρονικό περιορισμό. Πιθανολογείται ότι αποτελεί παροδικό χώρο αποθήκευσης των πληροφοριών, τις οποίες τελικά μεταβιβάζει σε άλλες περιοχές (πιθανώς στο φλοιό των ημισφαιρίων) για μόνιμη αποθήκευση. Δε συμμετέχει σε άλλους τύπους μακροχρόνιας μνήμης, σε μη μνημονικές γνωστικές παραμέτρους ή στη βραχυπρόθεσμη μνήμη. Στα πλαίσια της συμμετοχής του στις διαδικασίες της έκδηλης μνήμης, είναι σημαντικός ο ρόλος του στη

διαμόρφωση της χωρικής μνήμης, χωρίς όμως να συμμετέχει στη μη μνημονική επεξεργασία της χωρικής πληροφορίας^{5,55}.

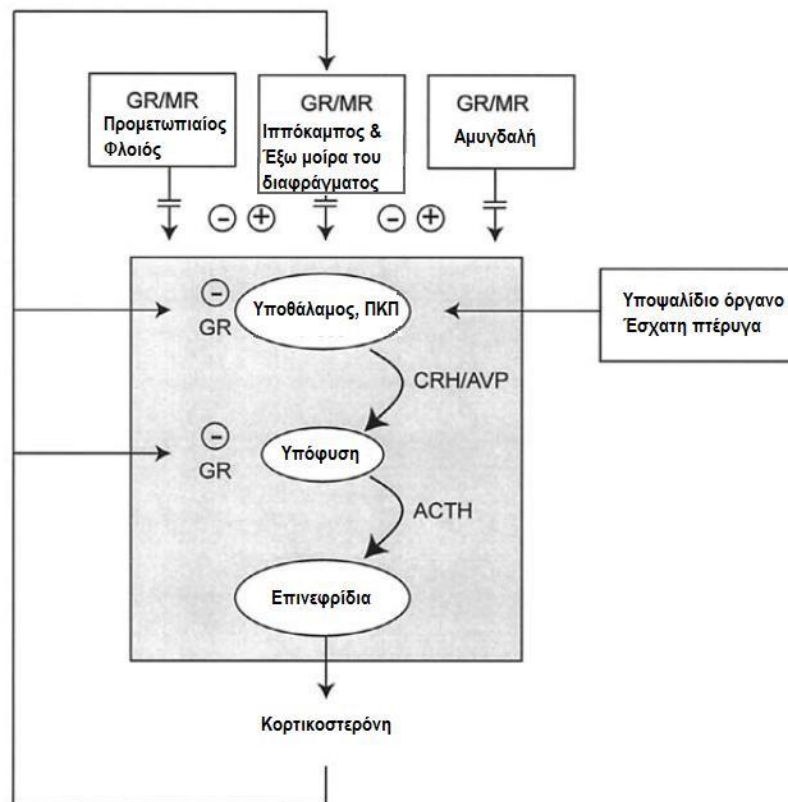
Ιππόκαμπος και stress

Αντιλαμβανόμενο ένα αγχογόνο ερέθισμα, το κεντρικό νευρικό σύστημα ενεργοποιεί νευροενδοκρινικούς και ανοσολογικούς μηχανισμούς, όπως και το αυτόνομο νευρικό σύστημα, με σκοπό την αντιμετώπιση του κινδύνου. Το κυρίαρχο όργανο ελέγχου της απάντησης αυτής είναι ο άξονας υποθαλάμου υπόφυσης επινεφριδίων (ΥΥΕ).

Ο άξονας ΥΥΕ (σκουρόχρωμο πλαίσιο στην εικόνα 10) ξεκινά από τον παρακωλιακό πυρήνα του υποθαλάμου. Ο πυρήνας αυτός ενεργοποιείται ή αναστέλλεται (αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση) σύμφωνα με πληροφορίες οι οποίες έρχονται από το προμετωπιαίο φλοιό, τον ιππόκαμπο, την έξω μοίρα του διαφράγματος και την αμυγδαλή. Η λειτουργία του επηρεάζεται επίσης από τον κερκάρδιο ρυθμό του οργανισμού και τη λειτουργία του υποψαλίδιου οργάνου και της έσχατης πτέρυγας.

Πιο συγκεκριμένα, ο άξονας ΥΥΕ έχει ως αφετηρία τον παρακωλιακό πυρήνα του υποθαλάμου, ο οποίος απελευθερώνει εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης και αντιδιουρητική ορμόνη. Οι ορμόνες αυτές, μέσω του πυλαίου αγγειακού συστήματος, ενεργοποιούν την πρόσθια υπόφυση για την παραγωγή κορτικοτροπίνης. Η κορτικοτροπίνη, με τη σειρά της, μέσω της συστηματικής κυκλοφορίας, φτάνει στα επινεφρίδια, τα οποία εκκρίνουν κορτικοστεροειδή. Το σύστημα υφίσταται αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση μέσω της ενεργοποίησης υποδοχέων κορτικοστεροειδών, οι οποίοι εδράζονται, μεταξύ των άλλων, και στον ιππόκαμπο (βλ. Εικ. 10).

Όσον αφορά στη μνήμη και στη μάθηση, από την καθημερινότητα γνωρίζουμε ότι χαμηλά επίπεδα stress ευοδώνουν τις μνημονικές λειτουργίες, ενώ υψηλότερα επίπεδα stress παρεμποδίζουν εν γένει τις γνωστικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένων της μνήμης και της μάθησης. Πληθώρα ερευνητικών δεδομένων έχει συνδέσει τα αυξανόμενα επίπεδα stress με αντιστοίχως αυξανόμενα επίπεδα κυκλοφορούντων κορτικοστεροειδών ορμονών, και ως επέκταση με την ενεργοποίηση του άξονα ΥΥΕ και τη δραστηριότητα του ιπποκάμπου.



Εικόνα 10. Έλεγχος του άξονα υποθαλάμου - υπόφυσης - επινεφριδίων. GR/glucocorticoid receptors: υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών. MR/mineralcorticoid receptors: υποδοχείς αλατοκορτικοειδών. Πρόκειται για τα δύο είδη υποδοχέων των κορτικοειδικών ορμονών, οι οποίοι ευαισθητοποιούν τα όργανα ελέγχου του άξονα. CRH/corticotrophin releasing hormone: κορτικοτροπίνη, AVP/Vasopressin: αντιδιουρητική ορμόνη. ACTH/adrenocorticotrophic hormone: κορτικοτροπίνη. Η κορτικοστερόνη είναι η αντίστοιχη ορμόνη της ανθρώπινης κορτιζόνης στους επίμυες⁵.

Επιπλέον ερευνητικά δεδομένα, τα οποία συνηγορούν στη σύνδεση της λειτουργίας του υποκάμπτου με τα επίπεδα stress του οργανισμού, είναι η τροποποίηση της εγγενούς διεγερσιμότητάς του, όπως και της συναπτικής του πλαστικότητας (η ικανότητα των χημικών συνάψεων να τροποποιούν την ισχύ της σύνδεσής τους) υπό συνθήκες stress. Η ενίσχυση της ισχύος της σύναψης με την ενεργοποίηση των μηχανισμών της συναπτικής πλαστικότητας ονομάζεται μακροχρόνια ενίσχυση (long term potentiation, LTP), ενώ το αντίθετο φαινόμενο ονομάζεται μακροχρόνια ύφεση (long term depression, LTD). Η τροποποίηση της ισχύος των συνάψεων θεωρείται ένας από τους βασικούς μηχανισμούς διαμόρφωσης της μνήμης.

Μελέτες, τέλος, σε ανθρώπους, συγκεκριμένα σε ασθενείς πάσχοντες από σύνδρομο Cushing (προκαλείται εξαιτίας της υπερέκκρισης κορτικοστεροειδών ορμονών) αποδεικνύουν μείωση του όγκου του υποκάμπτου στους ασθενείς αυτούς.

1.5. Υπόκαμπος και νόσοι του ανθρώπου

Ο υποκάμπος εμπλέκεται στην γένεση πολλών και διαφορετικών παθολογιών. Όγκοι του κεντρικού νευρικού συστήματος, αγγειακές δυσπλασίες και φλοιϊκές δυσγενεσίες εμφανίζονται εξίσου εδώ, όπως και στα υπόλοιπα σημεία του εγκεφάλου, εκτός αυτών όμως είναι αξιοσημείωτη η ευαισθησία του στην ισχαιμία, το τραύμα και την υπογλυκαιμία (Andersen et al., 2007). Σπάνια αποτελεί εστία αποκλειστικής εμφάνισης κάποιας νόσου, με χαρακτηριστικά παραδείγματα την κροταφική επιληψία και τη νόσο του Alzheimer.

Εξαιτίας της συμμετοχής του στο μεταιχμιακό σύστημα, ο υποκάμπος εμπλέκεται, εκτός από τη μνήμη και τη μάθηση, τόσο στην έκφραση του συναισθήματος όσο και σε διαδικασίες επιβράβευσης. Η έρευνα επομένως της δομής αυτής αφορά και νόσους όπως η κατάθλιψη^{14,28} και η εξάρτηση από τη χρήση ψυχοτρόπων ουσιών^{21,35}. Πέραν αυτών όμως, η εμπλοκή του υποκάμπτου μελετάται και σε σχέση με παθολογίες όπως το σύνδρομο μετατραυματικού stress⁹⁴, η ψύχωση^{49,69,42,46,17,48}, ο πόνος⁹⁹ κ.α.

Θα εξετασθεί η εμπλοκή του υποκάμπτου ενδεικτικά σε τρεις νόσους: στην κροταφική επιληψία και τη νόσο του Alzheimer, στις οποίες οι παθολογικές ιστολογικές αλλοιώσεις αφορούν κυρίως στην υποκάμπεια περιοχή. Θα εξετασθεί επίσης και η ψύχωση, στην οποία, εκτός από την εμφάνιση χαρακτηριστικών αλλοιώσεων στη δομή, ο υποκάμπος παρεμβάλλεται στη λειτουργία των συστημάτων που ευθύνονται για την εμφάνιση της νόσου.

Κροταφική Επιληψία

Η κροταφική επιληψία αποτελεί το 60% των αιτιών μερικής επιληψίας (επιληψία η οποία οφείλεται σε εκπόλωση μίας μόνο περιοχής του εγκεφάλου, σε αντίθεση με τη γενικευμένη επιληψία, η οποία οφείλεται σε εκπόλωση ολόκληρου του φλοιού του εγκεφάλου). Η πιο κοινή

νευροπαθολογική βλάβη στον επιληπτικό ιστό είναι η σκλήρυνση του υποκάμπτου, ή σκλήρυνση του κέρατος του Άμμωνος, η οποία συναντάται σχεδόν στα μισά περιστατικά κροταφικής λοβεκτομής, στα πλαίσια αντιμετώπισης της νόσου⁵. Τα ιστολογικά ευρήματα της σκλήρυνσης του υποκάμπτου είναι εκφύλιση και επιλεκτική απώλεια πυραμιδικών νευρώνων, παθολογική εξάπλωση των ενδονευρωνικών δικτύων και εκτεταμένη γλοιακή αντίδραση. Στην κλασική μορφή της σκλήρυνσης, η απώλεια πυραμιδικών νευρώνων παρατηρείται στις περιοχές CA1 και CA3 όπως και στην περιοχή CA4 (end folium), ενώ τα κύτταρα της περιοχής CA2 συνήθως δεν εμφανίζουν παθολογία. Παρατηρείται επίσης διασπορά των κοκκωδών κυττάρων της οδοντωτής έλικας, όπως επίσης και διεύρυνση της στιβάδας αυτής⁹⁷. Άλλο σταθερό ιστολογικό εύρημα είναι η καταστροφή των βρυωδών κυττάρων (mossy cells) της πολύμορφης στιβάδας (hilus) της οδοντωτής έλικας. Πρόκειται για ενδονευρώνες, ρόλος των οποίων είναι να χορηγούν διεγερτικές ώσεις σε άλλους ενδονευρώνες. Σύμφωνα με την ευρύτερα αποδεκτή θεωρία των αδρανών καλαθοειδών κυττάρων (dormant basket cell theory¹⁰⁰), η υπερδιέγερση των πυραμιδικών νευρώνων του επιληπτικού ιστού οφείλεται στην αδράνεια των ρυθμιστικών τους ενδονευρώνων, των καλαθοειδών κυττάρων, τα οποία με τη σειρά τους έχουν χάσει τη διεγερτική τους σύνδεση με τα βρυώδη κύτταρα⁹⁷. Τυπικό ιστολογικό εύρημα κροταφικής σκλήρυνσης είναι επίσης η εμφάνιση εκβλαστήσεων των βρυωδών ινών προς γειτονικές τους ίνες (sprouting). Οι βρυώδεις ίνες είναι άξονες των κοκκωδών κυττάρων της οδοντωτής έλικας προς τα πυραμιδικά κύτταρα των περιοχών CA3 και CA4. Το φαινόμενο των εκβλαστήσεων θεωρείται ότι είναι αποτέλεσμα της καταστροφής των πυραμιδικών κυττάρων-στόχων των βρυωδών ινών⁹⁷.

Σημαντικός είναι ο ρόλος της τροποποιημένης συναπτικής πλαστικότητας του επιληπτικού ιστού. Πρόκειται για φαινόμενο χαρακτηριστικό σε περιπτώσεις μετατραυματικής επιληψίας, μεταξύ άλλων. Μετά από κρανιοεγκεφαλική κάκωση παρατηρείται μείωση της βιοηλεκτρικής δραστηριότητας, ως αποτέλεσμα της καταστροφής των νευρώνων. Στη διαδικασία της επούλωσης μπορεί να εμφανιστεί προσπάθεια υπεραναπλήρωσης, με αποτέλεσμα υπερδιέγερση του ιστού. Έχει δειχθεί επίσης ότι επαναλαμβανόμενες κρίσεις έχουν ως αποτέλεσμα την επίταση του φαινομένου της συναπτικής πλαστικότητας, με συνέπεια επιδείνωση των επιληπτικών κρίσεων. Μοριακές μελέτες επάνω σε σκληρυντικό ιστό έχουν

αποδείξει τη μειωμένη πυκνότητα των ανασταλτικών ιονοτροπικών GABAA υποδοχέων, απώλεια GABAεργικών νευρώνων και τροποποίηση της δομής των εναπομείναντων υποδοχέων GABA. Διαφοροποίηση στη δομή και λειτουργία του εμφανίζει επίσης και ο διεγερτικός μεταβοτροπικός υποδοχέας του γλουταμικού (mGluR)⁹⁷.

Χαρακτηριστικό εύρημα στον σκληρυντικό ιππόκαμπο είναι, τέλος, και η αστρογλοίωση, η οποία εμφανίζεται στο 90% των θεραπευτικών εκτομών του ιπποκάμπου. Εκτός της αύξησης του αριθμού, εμφανίζεται και τροποποίηση της λειτουργίας των κυττάρων αυτών, σε τουλάχιστο δύο παραμέτρους. Πρώτον, όσον αφορά στους νευροδιαβιβαστές, τους οποίους εκκρίνουν τα αστρογλοϊακά κύτταρα, επηρεάζοντας την προ και μετασυναπτική λειτουργία στις νευρωνικές συνάψεις. Δεύτερον, η λειτουργία των αστρογλοϊακών κυττάρων τροποποιείται και όσον αφορά στη λειτουργία των καναλιών ιόντων, η λειτουργία των οποίων (ιδίως των καναλιών καλίου) είναι σημαντική στη διατήρηση της ομοιοστασίας του νερού και των ιόντων στον εγκέφαλο⁹⁷.

Παρά την εκτενή μελέτη του φαινομένου της κροταφικής σκλήρυνσης, η παθοφυσιολογία της παραμένει αδιευκρίνιστη. Είναι αναπάντητο το ερώτημα εάν η σκλήρυνση του ιπποκάμπου αποτελεί την αιτία της επιληπτικής νόσου ή το αποτέλεσμα επαναλαμβανόμενων επιληπτικών κρίσεων στην περιοχή αυτή. Σύμφωνα με την ευρύτερα αποδεκτή θεωρία του διπλού πλήγματος για την κροταφική επιληψία (two hit hypothesis⁷⁰), αρχικό τραύμα έστω και μίας μικρής περιοχής του εγκεφάλου οδηγεί σε μία μακρόχρονη διαδικασία ιστολογικών και βιοχημικών αλλαγών, η οποία μπορεί να δημιουργήσει επιληπτική εστία στην περιοχή. Η έρευνα αποδεικνύει ότι κύριοι παράγοντες οι οποίοι προηγούνται της δημιουργίας κροταφικής σκλήρυνσης και της επιληπτογένεσης είναι σοβαρή κρανιοεγκεφαλική κάκωση, περιγενετική κάκωση, ιστορικό επιληπτικής κατάστασης (status epilepticus) στην παιδική ηλικία και παρατεταμένοι ή επαναλαμβανόμενοι πυρετικοί σπασμοί⁹⁷.

Νόσος του Alzheimer

Η νόσος του Alzheimer αποτελεί την πιο κοινή αιτία άνοιας. Η εμφάνιση της νόσου αφορά διαταραχή της μνήμης, ενώ στα τελευταία στάδιά της προκαλεί γενικευμένη γνωστική

δυσλειτουργία. Η νόσος έχει σποραδική εμφάνιση, και σε μικρό μόνο ποσοστό (5%) εμφανίζει οικογενή κατανομή. Σε αυτές τις περιπτώσεις η συμπτωματολογία ξεκινά νωρίτερα από την ηλικία των 65 ετών, ενώ οι ασθενείς φέρουν μεταλλάξεις σε γονίδια τα οποία κωδικοποιούν για την πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς (amyloid precursor protein), της πρεσενιλίνης (presenilin) 1 και 2 και της απολιποπρωτεΐνης (apolipoprotein).

Οι νευροπαθολογικές βλάβες εμφανίζονται αρχικά στον ενδορρινικό φλοιό, στη συνέχεια επεκτείνονται στον ιππόκαμπο και στα τελευταία στάδια επηρεάζουν και το νεοφλοιό. Σε ασθενείς οι οποίοι έχουν λάβει διάγνωση, νεκροτομικές μελέτες αποδεικνύουν ότι οι βλάβες έχουν ήδη εμφανιστεί στο φλοιό, γεγονός το οποίο οδήγησε τους ερευνητές στον προσδιορισμό της ήπιας γνωστικής δυσλειτουργίας, ένα πρόδρομο στάδιο της νόσου του Alzheimer, με ήπια κλινικά ευρήματα και νευροπαθολογικές αλλοιώσεις περιορισμένες στο μέσο κροταφικό λοβό⁵.

Απεικονιστικά, χαρακτηριστικό εύρημα είναι η ατροφία των εμπλεκόμενων δομών. Η απώλεια του όγκου του ενδορρινικού φλοιού, του ιπποκάμπου και του φλοιού των ημισφαιρίων ανταποκρίνεται στην προοδευτική επιδείνωση της νόσου σε τέτοιο βαθμό ώστε, ερευνητικά, είναι δυνατό να γίνει ο διαχωρισμός ανάμεσα στη φυσιολογική γήρανση του ιστού, την ήπια γνωστική δυσλειτουργία και τη νόσο του Alzheimer. Όσον αφορά στον ιππόκαμπο συγκεκριμένα, η απώλεια των πυραμιδικών νευρώνων φτάνει μέχρι και το 50%.

Τα παθολογοανατομικά ευρήματα της νόσου είχαν περιγραφεί ήδη από τις αρχές του εικοστού πρώτου αιώνα. Περιλαμβάνουν αλλοιώσεις όπως η εξωκυττάρια εναπόθεση πλακών ινιδίων αμυλοειδούς, οι νευροϊνιδιακοί θύσανοι, οι οποίοι σχηματίζονται με την εναπόθεση ινιδίων στο σώμα και το εγγύς τμήμα του κορυφαίου δενδρίτη των πυραμιδικών κυττάρων, η κοκκιοκενοτοπιώδης εκφύλισή τους και η εμφάνιση των σωματιδίων Hirano, η οποία αφορά επίσης στα πυραμιδικά κύτταρα και στη βοθριώδη στιβάδα του ιπποκάμπου. Πέραν των ιστολογικών ευρημάτων, χαρακτηριστική είναι και η διαταραχή της συναπτικής λειτουργίας τόσο στον πρόσθιο μετωπιαίο λοβό όσο και στον κροταφικό λοβό⁵.

Ψύχωση

Για δεκαετίες, η επικρατούσα υπόθεση για την εμφάνιση της ψύχωσης επικεντρώνονταν στην υπερδραστηριότητα του ντοπαμινεργικού συστήματος. Πρόσφατα δεδομένα αμφισβητούν αυτή τη θεώρηση, προτείνοντας ότι το ντοπαμινεργικό σύστημα είναι «φυσιολογικό» ενώ η παθολογία έχει να κάνει με τους ρυθμιστές του, μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνεται και ο ιππόκαμπος.

Το ενδιαφέρον των ερευνητών έχει προσελκύσει το γλουταμινεργικό σύστημα, καθώς ανταγωνιστές των υποδοχέων του γλουταμικού, έχουν ισχυρή ψυχομιμητική δράση^{51,88}. Έρευνες συνδέουν τη δράση των ουσιών αυτών με την ενεργοποίηση του θαλάμου, εν συνεχεία του ιπποκάμπου και, μέσω αυτού, της κοιλιακής καλύπτρας, της αφετηρίας του ντοπαμινεργικού κυκλώματος⁶⁹.

Στους σχιζοφρενείς ασθενείς παρατηρείται υπολειτουργία του GABAεργικού δικτύου, όπως αποδεικνύεται από μελέτες πτωματικού υλικού, όπου κοινό εύρημα είναι η μειωμένη συγκέντρωση της γλουταμικής αποκαρβοξυλάσης και της παρβαλβουμίνης. Η GABAεργική υπολειτουργία σχετίζεται με τη γνωστική έκπτωση που επιφέρει η νόσος⁴⁹. Μελέτες έχουν συνδέσει την υπολειτουργία αυτή με την προαναφερθείσα δράση των ανταγωνιστών του γλουταμικού⁶⁹.

Ο προμετωπιαίος φλοιός (περιοχές κατά Brodmann 9, 10, 11, 12, 46 και 47), επίσης, εμφανίζει μειωμένη απαντητικότητα σε σχιζοφρενείς ασθενείς. Η δυσλειτουργία αυτή ισχύει επίσης και για τα άτομα τα οποία βρίσκονται σε κίνδυνο να αναπτύξουν τη νόσο (π.χ. λόγω κληρονομικότητας), δεν έχουν νοσήσει όμως ακόμη. Δεδομένου του ρόλου του προμετωπιαίου φλοιού στη διαχείριση του stress, προτείνεται ότι η μειωμένη απαντητικότητά του καθιστά και τις υπόλοιπες δομές του εγκεφάλου (συμπεριλαμβανομένου και του ιπποκάμπου) ευαίσθητες σε παράγοντες stress, ευαίσθητες δηλαδή στην τοξική του δράση⁴².

Όσον αφορά στον ιππόκαμπο, αναφέρονται τυπικές απεικονιστικές αλλοιώσεις σε σχιζοφρενείς ασθενείς, με χαρακτηριστική τη μείωση του όγκου και τη διαφοροποίηση της

κυτταροαρχιτεκτονικής του, όπως επίσης και την υπερδραστηριότητά του, ιδιαίτερα στην περιοχή CA1^{46,17,48,69}. Η υπερδραστηριότητα του υποκάμπτου συνδέεται άμεσα με την υπερδραστηριότητα του ντοπαμινεργικού συστήματος. Μία από τις ισχυρότερες ανασταλτικές οδούς προς τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες αποτελείται από GABAεργικούς άξονες προερχόμενους από την ωχρά σφαίρα, η οποία με τη σειρά της δέχεται ανασταλτικό έλεγχο από τον επικλινή πυρήνα. Ο κοιλιακός υποκάμπος (υπόθεμα) συνδέεται άμεσα με τον επικλινή πυρήνα, έτσι ώστε η ενεργοποίηση του κοιλιακού υποκάμπτου να ενεργοποιεί τον επικλινή πυρήνα, ο οποίος δρα ανασταλτικά στην ωχρά σφαίρα και έτσι αίρεται η αναστολή του ντοπαμινεργικού συστήματος. Αποτέλεσμα επομένως της ενεργοποίησης του κοιλιακού υποθέματος είναι η ντοπαμινεργική ενεργοποίηση. Η ενεργοποίηση του υποκάμπτου συνδέεται αιτιολογικά με δυσλειτουργία του συστήματος των ενδονευρώνων του⁴².

Υπάρχουν δεδομένα από έρευνες σε ζώα αλλά και σε ανθρώπους τα οποία συνδέουν την έκθεση στο stress νωρίς στη ζωή του ατόμου με δομικές αλλοιώσεις του υποκάμπτου. Αντίστοιχα στη σχιζοφρένεια, συχνά βρίσκουμε παρόμοια σύνδεση με πρώιμους παράγοντες stress και την εκδήλωση της νόσου. Σε ασθενείς πρώτου ψυχωτικού επεισοδίου, παρατηρείται μειωμένος όγκος του υποκάμπτου, όπως επίσης και αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης στη συστηματική κυκλοφορία. Σε άτομα τα οποία βρίσκονται σε κίνδυνο να εμφανίσουν ψυχωτικό επεισόδιο παρατηρείται αυξημένη ενεργοποίηση του άξονα ΥΥΕ. Μπορεί να καταλήξει κανείς στο συμπέρασμα ότι η έκθεση σε stress μπορεί να είναι ένας καθοριστικός παράγοντας για την εμφάνιση ψυχωτικού επεισοδίου αργότερα στη ζωή, και ότι η διαδικασία αυτή μεσολαβείται και μέσω της δράσης του υποκάμπτου⁴².

1.6. Κυτταρικοί πληθυσμοί του ιπποκάμπου

Κυρίως ιππόκαμπος

Οι κύριοι νευρώνες (principal cells) των περιοχών CA1, CA2 και CA3, δηλαδή ο κυτταρικός πληθυσμός ο οποίος κατά βάση χορηγεί άξονες προς άλλες περιοχές του ιπποκάμπου, είναι τα γλουταμινεργικά πυραμιδικά κύτταρα. Τα πυραμιδικά κύτταρα, ονομαζόμενα έτσι εξαιτίας του χαρακτηριστικού σχήματος του σώματός τους, έχουν διάμετρο 20-30μm, και φέρουν βαικούς δενδρίτες οι οποίοι εκτείνονται στην πολύμορφη στιβάδα και έναν κορυφαίο δενδρίτη ο οποίος διακλαδώνεται, φτάνοντας μέχρι την αύλακα του ιπποκάμπου.

Οδοντωτή έλικα

Οι κύριοι νευρώνες (principal cells) της οδοντωτής έλικας, είναι τα κύτταρα της κοκκώδους στιβάδας, τα κοκκώδη κύτταρα. Το σώμα των κοκκωδών κυττάρων έχει ελλειπτοειδές σχήμα, με πλάτος περίπου 10μm και ύψος περίπου 18μm. Οι δενδρίτες τους έχουν κωνοειδή κατανομή και καταλήγουν στην ιπποκάμπεια αύλακα (το όριο μεταξύ της οδοντωτής έλικας και της περιοχής CA1 και του υποθέματος, βλ. Εικ.5) ή στην κοιλιακή περιοχή του ιπποκάμπου (αντίστοιχα προς την τρίτη κοιλία).

Οι ενδονευρώνες ή διάμεσοι νευρώνες του ιπποκάμπου

Σε όλες τις στιβάδες του ιπποκάμπου συναντούμε τους ενδονευρώνες ή διάμεσους νευρώνες (interneurons), ανασταλτικούς νευρώνες οι οποίοι ασκούν τη δράση τους μέσω συνάψεων γ-άμινο-βουτυρικού οξέος (GABA). Τα κύτταρα αυτά συνάπτονται τόσο με πυραμιδικά κύτταρα, δρώντας ανασταλτικά (inhibition), όσο και με άλλους ενδονευρώνες, ασκώντας έτσι έλεγχο της αναστολής των πυραμιδικών κυττάρων ή δυσαναστολή (disinhibition). Παρά το γεγονός ότι αποτελούν μικρό ποσοστό του κυτταρικού πληθυσμού (10-15%), ρόλος τους είναι ο συντονισμός της συνολικής νευρωνικής δραστηριότητας⁵⁸. Μία μικρή μειοψηφία των κυττάρων αυτών δίνουν διεγερτικές και όχι ανασταλτικές συνάψεις, όπως για παράδειγμα τα βρυώδη κύτταρα (mossy cells) της πολύμορφης στιβάδας της οδοντωτής έλικας, ή τα γιγάντια

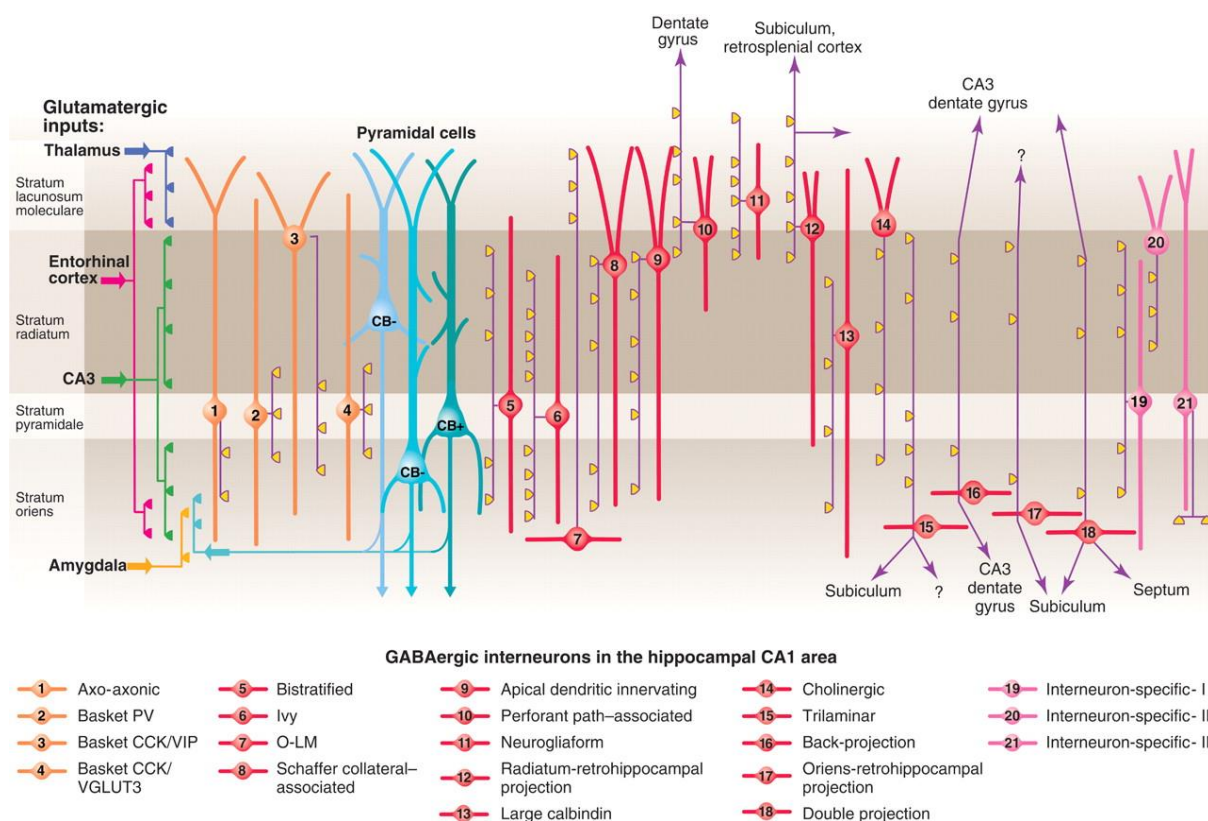
ακαθώδη κύτταρα της ακτινωτής στιβάδας του ιδίως υποκάμπου. Πρόκειται για κυτταρικούς πληθυσμούς πολύ λιγότερο μελετημένους από τους ανασταλτικούς ενδονευρώνες.

Οι ενδονευρώνες του υποκάμπου διακρίνονται σε υποομάδες, ανάλογα με την εντόπισή τους, τη μορφολογία τους, τη λειτουργικότητά τους και τα μόρια σήμανσης (markers) που εκφράζουν. Στην περιοχή CA1 του υποκάμπου έχουν αναγνωριστεί τουλάχιστον είκοσι μία διαφορετικές υποκατηγορίες ενδονευρώνων⁶⁰ (βλ. Εικ. 11).

Οι διαφορετικοί τύποι ενδονευρώνων σχηματίζουν συνάψεις σε διαφορετικά τμήματα της μεμβράνης του πυραμιδικού κυττάρου. Κάποιοι από αυτούς συνάπτονται με τα σώματα των πυραμιδικών νευρώνων (π.χ. καλαθοειδή κύτταρα, basket cells) ή με το αρχικό τμήμα του νευράξονα (π.χ. αξοαξονικά κύτταρα, axoaxonic cells), ενώ άλλοι συνάπτονται με τους εγγύς (π.χ. διστιβαδωτά κύτταρα, bistratified cells) ή τους άπω δενδρίτες (κύτταρα της πολύμορφης προς τη βοθριώδη μοριακή στιβάδα, OLM cells). Με τον τρόπο αυτό μπορούν να ασκήσουν έλεγχο σε διαφορετικά στάδια μετάδοσης της πληροφορίας. Δεν παρατηρούμε όμως διαφορές μόνο στη θέση στην οποία δημιουργούν σύναψη, αλλά και στο χρόνο στον οποίο παρεμβαίνουν στη μετάδοση του σήματος του πυραμιδικού κυττάρου. Η λειτουργία τους επίσης επηρεάζεται από την κατάσταση εγρήγορσης και τη δραστηριότητα του οργανισμού. Δεδομένης αυτής της πολυφωνίας στον τρόπο ελέγχου της πυραμιδικής διέγερσης, οι ενδονευρώνες αποκτούν τη δυνατότητα να οργανώσουν τα νευρωνικά δίκτυα και έτσι να επηρεάσουν τη μετάδοση πολύπλοκων πληροφοριών⁶¹.

Ένας ακόμα παράγοντας ο οποίος συντελεί στην πολυπλοκότητα της δράσης των ενδονευρώνων είναι η ποικιλία των πεπτιδίων τα οποία συνεκκρίνονται μαζί με το GABA, όπως για παράδειγμα: η παρβαλβουμίνη (parvalbumin) στα καλαθοειδή κύτταρα, η χολοκυστοκινίνη (cholecystokinin) επίσης στα καλαθοειδή κύτταρα αλλά και στα κύτταρα σχετιζόμενα με την οδό του Schaffer (Schaffer collateral associated cells) και τα κύτταρα τα σχετιζόμενα με την οδό των διατιτραίνουσών ινών (perforant path associated cells), το αγγειοδραστικό εντερικό πεπτίδιο (vasoactive intestinal peptide) στα καλαθοειδή κύτταρα και στα εξειδικευμένα για ενδονευρώνες κύτταρα (interneuron specific cells), η σωματοστατίνη (somatostatin) στα

κύτταρα της πολύμορφης - βοθριώδους μοριακής στιβάδα (OLM κύτταρα) αλλά και στα διστιβαδωτά κύτταρα (bistratified cells), η καλρετινίνη (calretinin) στα εξειδικευμένα για ενδονευρώνες κύτταρα (interneuron specific cells), το νευροπεπτίδιο Υ (neuropeptide Υ) στα διστιβαδωτά και στα νευρογλοιόμορφα κύτταρα (neurogliaform cells), η συνθετάση του νιτρικού οξειδίου (nitric oxide synthase) στα νευρογλοιόμορφα και τα κύτταρα Ivy, κ.α.^{58,101}.



Εικόνα 11. Κατηγορίες ενδονευρώνων του υποκάμπου. Περιγράφονται τουλάχιστον 21 κατηγορίες ενδονευρώνων στην περιοχή CA1. Πυραμιδικά κύτταρα: γαλάζιο χρώμα. Σώματα και δένδριτες των ενδονευρώνων οι οποίοι νευρώνουν κυρίως πυραμιδικά κύτταρα: πορτοκαλί χρώμα. Ενδονευρώνες οι οποίοι νευρώνουν μόνο ενδονευρώνες: ροζ χρώμα. Οι άξονες είναι μωβ, με κίτρινο χρώμα στις κύριες συναπτικές απολήξεις τους. Κάποια κύτταρα δίνουν τις τελικές τους απολήξεις έξω από την CA1 περιοχή. Η κατάληξη 4 κύριων γλουταμινεργικών οδών φαίνεται στα αριστερά της εικόνας (θάλαμος, ενδορρινικός φλοιός, περιοχή CA3 και αμυγδαλή). Φαίνεται επίσης η θέση των διαφορετικών κυττάρων μέσα στις κυτταρικές στιβάδες: βοθριώδης-μοριακή στιβάδα, ακτινωτή στιβάδα, πυραμιδική στιβάδα, στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων⁶⁰.

Ενδιαφέρον εμφανίζουν επίσης οι μηχανισμοί οι οποίοι έχουν αναπτυχθεί με σκοπό την άρση της αναστολής που ασκούν οι ενδονευρώνες (disinhibition). Η δράση των κυττάρων αυτών μπορεί να περιοριστεί με διαφορετικούς τρόπους:

1. Μέσω GABAεργικών συνάψεων μεταξύ ενδονευρώνων της ίδιας ή διαφορετικής κατηγορίας (π.χ. καλαθοειδή προς καλαθοειδή ή OLM κύτταρα προς καλαθοειδή κύτταρα). Στον ιππόκαμπο υπολογίζεται ότι το 10-15% των συνάψεων των ενδονευρώνων δε γίνονται προς πυραμιδικά κύτταρα, αλλά προς άλλους ενδονευρώνες.
2. Μέσω της δράσης των ενδονευρώνων των εξειδικευμένων για ενδονευρώνες (interneuron specific interneurons).
3. Μέσω της δράσης GABAεργικών αξόνων προερχόμενων από άλλες περιοχές, όπως για παράδειγμα ο ενδορρινικός φλοιός.
4. Μέσω αυτοσυνάψεων, οι οποίες έχουν περιγραφεί στα καλαθοειδή, τα διστιβαδωτά και τα νευρογλοιόμορφα κύτταρα.
5. Μέσω ηλεκτρικών συνάψεων, οι οποίες έχουν περιγραφεί χαρακτηριστικά στους εξειδικευμένους για ενδονευρώνες ενδονευρώνες, οι οποίες όμως εξυπηρετούν περισσότερο στο συντονισμό νευρωνικών δικτύων, παρά συγκεκριμένα στην αναστολή κάποιων νευρώνων²⁰.

Κάποιες από τις καλύτερα μελετημένες κατηγορίες ενδονευρώνων είναι (Εικ. 12):

1. Τα καλαθοειδή κύτταρα (basket cells), το σώμα των οποίων εντοπίζεται κυρίως στην πυραμιδική στιβάδα και ο άξονάς τους αγκαλιάζει σαν καλάθι το σώμα και τους εγγύς δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων. Σε πολύ μικρότερο βαθμό τα κύτταρα αυτά συνάπτονται και με ενδονευρώνες της πυραμιδικής στιβάδας. Οι δενδρίτες των καλαθοειδών κυττάρων εκτείνονται στην πολύμορφη, την ακτινωτή και τη βοθριώδη-μοριακή στιβάδα και δέχονται πληροφορίες από πυραμιδικά κύτταρα και ενδονευρώνες. Τα καλαθοειδή κύτταρα διαχωρίζονται περαιτέρω σε τρεις κατηγορίες, ανάλογα με το είδος των πεπτιδίων που

εκφράζουν επιπλέον του GABA: (α) παρβαλβουμίνη, (β) χολοκυστοκινίνη και μεταφορέα του γλουταμικού 3 (glutamate transporter 3). Το σώμα των κυττάρων αυτών εντοπίζεται στην ακτινωτή στιβάδα, στο όριό της με τη βοθριώδη μοριακή, (γ) χολοκυστοκινίνη και αγγειοκινητικό εντερικό πεπτίδιο^{5,20,60}.

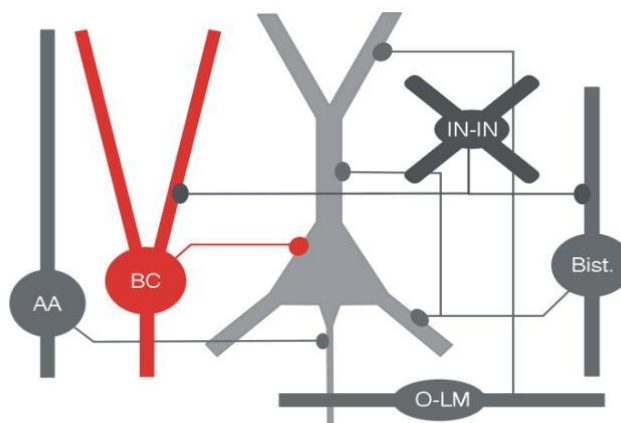
2. Τα αξο-αξονικά κύτταρα ή κύτταρα πολυέλαιοι (axo-axonic or chandelier cells), το σώμα των οποίων βρίσκεται κυρίως στην πυραμιδική στιβάδα και ο άξονάς τους συνάπτεται με το αρχικό τμήμα (initial segment) του νευράξονα των πυραμιδικών κυττάρων. Οι δενδρίτες τους διατρέχουν όλες τις στιβάδες του ιπποκάμπου. Τα κύτταρα αυτά νευρώνουν επίσης κατά κύριο λόγο τα πυραμιδικά κύτταρα και δευτερευόντως ενδονευρώνες, και εκφράζουν, μαζί με το GABA, παρβαλβουμίνη^{5,60}.

3. Τα κύτταρα της πολύμορφης προς τη βοθριώδη - μοριακή στιβάδα ή OLM κύτταρα (oriens lacunosum-moleculare associated cells) των οποίων το σώμα και οι δενδρίτες εντοπίζονται μέσα στην πολύμορφη στιβάδα όσον αφορά στην περιοχή CA1 (στην περιοχή CA3, το σώμα και οι δενδρίτες των κυττάρων αυτών εντοπίζονται σε όλες τις υπόλοιπες στιβάδες εκτός της βοθριώδους-μοριακής). Οι άξονες των κυττάρων αυτών, σε όλες τις περιοχές του ιπποκάμπου, καταλήγουν σε ένα πυκνό πλέγμα μέσα στη βοθριώδη-μοριακή στιβάδα. Τα κύτταρα αυτά εκφράζουν κυρίως σωματοστατίνη επιπλέον του GABA^{5,64}.

4. Τα διστιβαδωτά κύτταρα (bistratified cells), των οποίων το σώμα βρίσκεται κυρίως μέσα στην πυραμιδική στιβάδα και οι άξονές τους νευρώνουν κορυφαίους και βασικούς δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων στην ακτινωτή, πυραμιδική και πολύμορφη στιβάδα. Οι δενδρίτες τους εκτείνονται σε όλες τις στιβάδες του ιπποκάμπου και ειδικά στην ακτινωτή στιβάδα της CA1 περιοχής έρχονται σε επαφή με τις παράπλευρες ίνες του Schaffer. Τα κύτταρα αυτά εκφράζουν παρβαλβουμίνη, σωματοστατίνη και το νευροπεπτίδιο Y⁵.

5. Τα εξειδικευμένα για ενδονευρώνες κύτταρα (interneuron specific interneurons), τα οποία συνάπτονται αποκλειστικά με ενδονευρώνες και έχουν ως αποστολή το συντονισμό των ενδονευρωνικών δικτύων. Τα κύτταρα αυτά έχουν εντοπιστεί μόνο στον ιππόκαμπο και στις επιφανειακές φλοιϊκές στιβάδες. Χωρίζονται σε τρεις υποκατηγορίες:

- i. τα εξειδικευμένα για ενδονευρώνες κύτταρα τύπου I, των οποίων το σώμα εντοπίζεται στη σκάφη και την πολύμορφη στιβάδα. Σχηματίζουν αξονικές και δενδριτικές συνάψεις σε όλες τις στιβάδες εκτός της βοθριώδους - μοριακής. Οι δενδρίτες τους εμφανίζουν επίσης πολύπλοκο δίκτυο ηλεκτρικών συνάψεων με κύτταρα της ίδιας κατηγορίας, εξασφαλίζοντας έτσι ισχυρό νευρωνικό συντονισμό. Τα εξειδικευμένα για ενδονευρώνες κύτταρα τύπου I εκφράζουν εκτός από το GABA και καλρετινίνη (calretinin).
- ii. τα εξειδικευμένα για ενδονευρώνες κύτταρα τύπου II, το σώμα των οποίων εντοπίζεται στο όριο μεταξύ ακτινωτής και βοθριώδους μοριακής στιβάδας. Οι άξονές τους εκτείνονται στην ακτινωτή στιβάδα και οι δενδρίτες τους στη βοθριώδη - μοριακή. Τα κύτταρα αυτά εκτός από το GABA εκφράζουν το αγγειοδραστικό εντερικό πεπτίδιο.
- iii. τα εξειδικευμένα για ενδονευρώνες κύτταρα τύπου III, των οποίων το σώμα βρίσκεται στο όριο πυραμιδικής και ακτινωτής στιβάδας, οι άξονές τους εκτείνονται στην ακτινωτή και οι δενδρίτες στη βοθριώδη - μοριακή στιβάδα. Τα κύτταρα αυτά, πέραν του GABA, εκφράζουν καλρετινίνη και αγγειοδραστικό εντερικό πεπτίδιο²⁰.



Εικόνα 12. Απεικόνιση της θέσης σύναψης των κυριότερων τύπων ενδονευρώνων με το πυραμιδικό κύτταρο, ή άλλους ενδονευρώνες (περίπτωση των εξειδικευμένων για ενδονευρώνες κυττάρων). Βλ. κείμενο για συντομογραφίες νευρώνων¹¹⁴

1.7. Νευροδιαβιβαστές στον ιππόκαμπο

Στον ιππόκαμπο εντοπίζεται μεγάλος αριθμός νευροδιαβιβαστών. Ως διεγερτικό νευροδιαβιβαστή, τα πυραμιδικά κύτταρα χρησιμοποιούν κυρίως το γλουταμικό, ενώ ο κύριος ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής, *αποκλειστικά στους ιπποκάμπειους ενδονευρώνες*, είναι το γ αμινο βουτυρικό οξύ (GABA). Τροποποιητικό ρόλο επίσης παίζουν χολινεργικές ίνες, ενώ στη δομή αναγνωρίζονται, σε μικρότερες συγκεντρώσεις, νευροδιαβιβαστές και νευροτροποποιητές όπως τα νευροπεπτίδια σωματοστατίνη και νευροπεπτίδιο Υ, η σεροτονίνη, στεροειδή και ενδοκανναβινοειδή. Σημαντικό ρόλο στην τροποποίηση της νευροδιαβίβασης παίζει επίσης και η λειτουργία των ηλεκτρικών συνάψεων (gap junctions). Θα εξετασθεί αναλυτικότερα τη λειτουργία των ανασταλτικών GABAεργικών υποδοχέων.

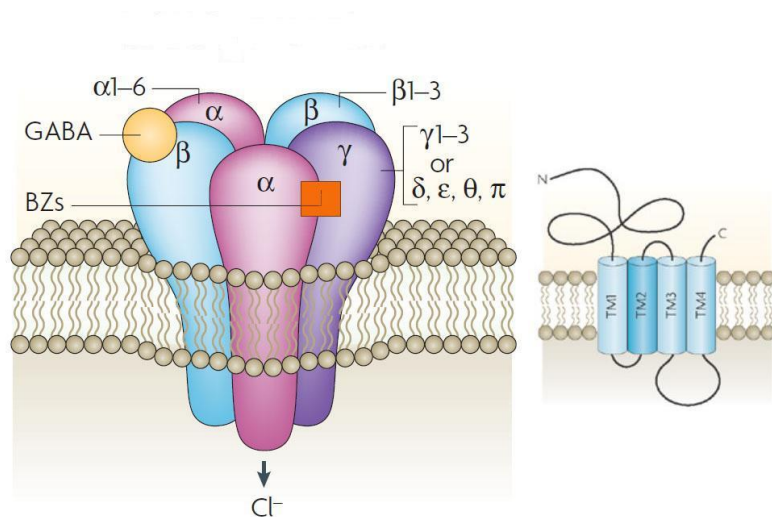
Υποδοχείς GABA

Απαντώνται δύο κύρια είδη υποδοχέων του GABA στο κεντρικό νευρικό σύστημα, οι GABAA ιονοτροπικοί υποδοχείς (Εικ. 13) οι οποίοι δρουν μέσω ενεργοποίησης διαύλων ιόντων Cl⁻, και οι GABAB μεταβοτροπικοί υποδοχείς (Εικ. 14) οι οποίοι δρουν μέσω ενεργοποίησης G πρωτεϊνών (G-protein coupled receptors).

Η ενεργοποίηση των ιονοτροπικών, GABAA υποδοχέων, οδηγεί στη νευρωνική αναστολή μέσω τουλάχιστον δύο κύριων μηχανισμών: της υπερπόλωσης (hyperpolarization inhibition) και της αναστολής μέσω διαφυγής του εκπολωτικού ρεύματος (shunting inhibition).

Η αναστολή μέσω υπερπόλωσης προκύπτει όταν το δυναμικό ηρεμίας της κυτταρικής μεμβράνης είναι ηλεκτροθετικότερο από το δυναμικό ισορροπίας του χλωρίου. Η συγκέντρωση του χλωρίου στο εσωτερικό του ώριμου νευρώνα διατηρείται ενεργητικά σε επίπεδα χαμηλότερα από το δυναμικό ισορροπίας του ιόντος, δημιουργώντας έτσι μία κλίση συγκέντρωσης (gradient) προς το εσωτερικό του κυττάρου. Οι GABAA υποδοχείς είναι διάυλοι ανιόντων ενεργοποιούμενοι από προσδέτες (ligand-gated anion channels). Η πρόσδεση του GABA προκαλεί διάνοιξη αυτών των διαύλων με αποτέλεσμα ιόντα χλωρίου να μεταφέρονται

στο εσωτερικό του κυττάρου υπερπολώνοντας τη μεμβράνη. Η υπερπόλωση αυτή αυξάνει τον ουδό έκλυσης δυναμικού ενεργείας (spike threshold) με αποτέλεσμα τη μείωση της αποτελεσματικότητας των διεγερτικών σημάτων³⁴.

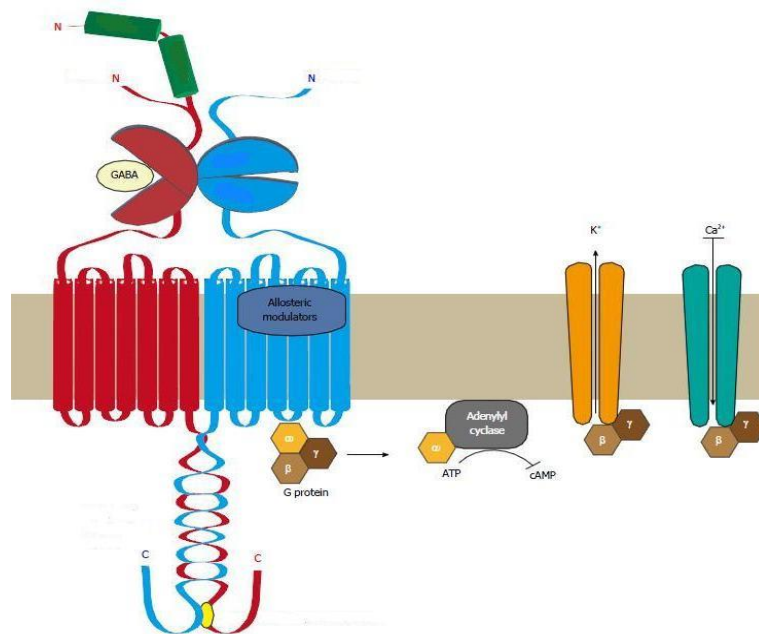


Εικόνα 13: Ο GABAA υποδοχέας. Αριστερά: Ο υποδοχέας GABAA συνίσταται από πέντε υπομονάδες, οι οποίες μπορεί να ανήκουν σε επτά διαφορετικές οικογένειες (α, β, γ, δ, ε, θ, π). Σχηματίζεται έτσι ένας ετεροπενταμερικός διάυλος χλωρίου. Η πλειοψηφία των GABA_A υποδοχέων στο ΚΝΣ απαρτίζονται από δύο α, δύο β και μία γ υπομονάδα, η οποία όμως μπορεί να αντικαθίσταται από μόρια των οικογενειών δ, ε ή π. Τα σημεία πρόσδεσης για το GABA, όπως και για ψυχοδραστικές ουσίες, όπως οι βενζοδιαζεπίνες (BZs), βρίσκονται στα σημεία σύνδεσης των υπομονάδων, κοντά στο αμινοτελικό άκρο των αλυσίδων τους. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων οδηγεί στη διάνοιξη του διαύλου και την είσοδο ιόντων στο εσωτερικό του κυττάρου. Δεξιά: Το μόριο των υπομονάδων αποτελείται από τέσσερις διαμεμβρανικές αλυσίδες (στο σχήμα φαίνονται το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο). Στο βρόγχο (loop) ο οποίος σχηματίζεται ανάμεσα στις διαμεμβρανικές έλικες TM3 και TM4 δημιουργούνται θέσεις πρόσδεσης ενδοκυττάρων προσδετών οι οποίοι διαφοροποιούν τη λειτουργία του υποδοχέα⁵⁰.

Σε πολλές περιπτώσεις, στις οποίες το δυναμικό ηρεμίας της κυτταρικής μεμβράνης διατηρείται σε επίπεδα παρόμοια με το δυναμικό ισορροπίας του χλωρίου, οι ιοντοτροπικοί υποδοχείς μπορούν να προκαλέσουν αναστολή μέσω μείωσης της αλλαγής του δυναμικού της κυτταρικής μεμβράνης (ενός μηχανισμού γνωστού ως shunting inhibition). Στις περιπτώσεις αυτές, η αύξηση της αγωγιμότητας των ιόντων δεν προκαλεί σημαντικές αλλαγές στο δυναμικό της μεμβράνης. Η αύξηση της αγωγιμότητας της μεμβράνης όμως μειώνει την αντίσταση της μεμβράνης, με αποτέλεσμα την άμβλυνση της επίδρασης που έχει το ρεύμα ενός διεγερτικού ερεθίσματος στο δυναμικό της μεμβράνης, σύμφωνα με το νόμο του Ohm ($I=V/R$, όπου I το ρεύμα, V η διαφορά δυναμικού και R η αντίσταση ενός κυκλώματος). Εάν το δυναμικό ισορροπίας του χλωρίου είναι ηλεκτροθετικότερο από το δυναμικό ηρεμίας του κυττάρου, η ενεργοποίηση των διαύλων χλωρίου οδηγεί σε εκπόλωση της μεμβράνης. Υπό ορισμένες συνθήκες (αναπτυσσόμενοι νευρώνες, παθολογικές συνθήκες και σε κάποια τμήματα της μεμβράνης του νευρώνα, όπως το αρχικό τμήμα του άξονα), η κλίση συγκέντρωσης του χλωρίου είναι τέτοια ώστε η διάνοξη των διαύλων να προκαλεί εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης με αποτέλεσμα το GABA να γίνεται διεγερτικός διαβιβαστής³⁴.

Οι μεταβοτροπικοί υποδοχείς του GABA ονομάζονται GABA_B υποδοχείς και είναι συνδεδεμένοι με G πρωτεΐνες (G-protein coupled receptors, Εικ. 14). Η ενεργοποίησή τους οδηγεί σε διάνοξη διαύλων K^+ ή και σε αναστολή των τασεοεξαρτώμενων διαύλων Ca^{2+} (voltage gated calcium channels) μέσω μείωσης του ενδοκυττάρου cAMP. Η ενεργοποίηση των διαύλων K^+ οδηγεί σε υπερπόλωση η οποία μπορεί να γίνει εξίσου αποτελεσματική με αυτή που προκαλούν οι ιοντοτροπικοί υποδοχείς και είναι μεγαλύτερης διάρκειας.

Ανασταλτικοί νευροδιαβιβαστές οι οποίοι δρουν μέσω της ενεργοποίησης μεταβοτροπικών υποδοχέων, είναι, εκτός του GABA, η ακετυλοχολίνη (ACh), η σεροτονίνη (5HT), η ντοπαμίνη ή ακόμα και το γλουταμικό³⁴.



Εικόνα 14: Οι GABA_B υποδοχείς. Οι GABA_B υποδοχείς είναι ετεροδιμερή, αποτελούμενοι από δύο υπομονάδες. Και οι δύο υπομονάδες είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες με επτά έλικες. Φαίνονται τα αμινοτελικά (N) και τα καρβοξυτελικά (C) άκρα των πρωτεϊνικών αλυσίδων. Στην πρώτη υπομονάδα βρίσκεται το σημείο πρόσδεσης του GABA, ενώ στη δεύτερη εντοπίζεται υποδοχέας για αλλοστερικούς προσδέτες, οι οποίοι επηρεάζουν τη συγγένεια του σημείου πρόσδεσης για το GABA (ή άλλους προσδέτες). Η πρόσδεση του GABA στην πρώτη υπομονάδα οδηγεί στην ενεργοποίηση της G πρωτεΐνης (σύμπλοκο αβγ) μέσω της δεύτερης υπομονάδας. Η υπομονάδα α του συμπλόκου αναστέλλει την αδενυλική κυκλάση, με αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων cAMP στο εσωτερικό του κυττάρου. Το σύμπλοκο των υπομονάδων β και γ οδηγεί στην ενεργοποίηση διαύλων K⁺ και την αναστολή διαύλων Ca⁺⁺. Σε κάθε περίπτωση, το αποτέλεσμα της πρόσδεσης του GABA είναι η νευρωνική αναστολή¹¹.

1.8. Οπιοειδή πεπτίδια και οπιοειδικοί υποδοχείς

Από την αρχαιότητα το όπιο, προϊόν επεξεργασίας της παπαρούνας *Papaver somniferum*, ήταν γνωστό για την αναλγητική του δράση, την ευφορία που προσέφερε και για την εξάρτηση την οποία προκαλούσε η χρόνια χρήση του. Η μορφίνη, ονομαζόμενη έτσι από το όνομα του θεού των ονείρων Μορφέα, είναι το κατεξοχήν δραστικό αλκαλοειδές του οπίου και το ευρύτερα χρησιμοποιούμενο αναλγητικό από την αρχαιότητα μέχρι τις μέρες μας. Άλλα φυσικά παράγωγα επεξεργασίας του οπίου είναι η κωδεΐνη και η θηβαΐνη. Στα τέλη του 19ου αιώνα

συντέθηκε η ηρωίνη από διακετυλίωση της μορφίνης και τη σύνθεσή της ακολούθησε πλήθος φαρμακευτικών ουσιών όπως η πεθιδίνη, η μεθαδόνη, η βουπρενορφίνη και η φεντανύλη⁶⁵.

Πίνακας 1. Κατάταξη ενδογενών οπιοειδών πεπτιδίων με βάση το πρόδρομο μόριο από το οποίο προέρχονται. Οι αριθμοί στις παρενθέσεις δείχνουν τον αριθμό των αμινοξέων των πεπτιδίων⁹¹.

ΕΝΔΟΓΕΝΗ ΟΠΙΟΕΙΔΗ ΠΕΠΤΙΔΙΑ		
<u>Πρόδρομο μόριο:</u>		
<i>προεγκεφαλίνη</i>	<i>προδυνορφίνη</i>	<i>προοπιομελανο-κορτίνη</i>
<u>Μεταγραφικό προϊόν</u>		
Μεθ-εγκεφαλίνη	Λευ-μορφίνη	α Ενδορφίνη
Λευ-εγκεφαλίνη	Δυνορφίνη Α (έξι τύποι)	γ Ενδορφίνη
Μεθ-εγκεφαλίνη-αργ-φαι	β Νεοενδορφίνη	β Ενδορφίνη (1-26)
Μεθ-εγκεφαλίνη-αργ-γλυ-λευ	α Νεοενδορφίνη	β Ενδορφίνη (1-27)
Μεθορφαμίδη	Δυνορφίνη Β	β Ενδορφίνη (1-31)
BAM 12, BAM 18, BAM 22	Δυνορφίνη 32 (AB)	
Πεπτίδιο Ε, Πεπτίδιο F		
Αμιδορφίνη		
<u>Θέση σύνδεσης στο ΚΝΣ</u>		
Ευρεία κατανομή στο ΚΝΣ	Ευρεία κατανομή στο ΚΝΣ	Τοξοειδής πυρήνας, μονήρης δεσμίδα
<u>Από την προορφανίνη: Νοσισεπτίνη ή ορφανίνη FQ</u>		
<u>Χωρίς αναγνωρισμένο πρόδρομο μόριο: Ενδομορφίνη 1, Ενδομορφίνη 2</u>		

Η μελέτη της δράσης των αλκαλοειδών του οπίου οδήγησε στην περιγραφή των οπιοειδικών υποδοχέων οι οποίοι, εκτός από τους εξωγενείς αγωνιστές τους, ενεργοποιούνται και από ενδογενή οπιοειδικά πεπτίδια, ρυθμίζοντας έτσι μια πλειάδα φυσιολογικών λειτουργιών. Κύριοι εκπρόσωποι των ενδογενών αυτών πεπτιδίων είναι οι Met- και Leu-εγκεφαλίνες, οι δυνορφίνες και η β-ενδορφίνη, οι οποίες προκύπτουν από μεγαλύτερες πρόδρομες πρωτεϊνικές δομές: προεγκεφαλίνη, προδυνορφίνη και προοπιομελανοκορτίνη αντίστοιχα⁶⁵ (Πίνακας 1). Άξιος λόγου είναι οι ενδομορφίνες, πεπτίδια τα οποία συνδέονται με εξαιρετική συγγένεια στο μ οπιοειδικό υποδοχέα³³.

Στις δράσεων των οπιοειδικών υποδοχέων περιλαμβάνονται αναλγησία, πρόκληση εθισμού, εξάρτησης και ανοχής, εμπλοκή σε παθολογικές ψυχιατρικές διεργασίες όπως το stress, το άγχος και η κατάθλιψη, αλλά και στο μηχανισμό επιβράβευσης, στη σεξουαλική συμπεριφορά, στην πρόσληψη τροφής, στη μνήμη και τη μάθηση, ακόμα και στη φυσιολογική λειτουργία του καρδιαγγειακού, αναπνευστικού και γαστρεντερικού συστήματος³³.

Έξι κύριες κατηγορίες οπιοειδικών υποδοχέων και οι υπότυποί τους έχουν αναγνωριστεί: μ , κ , δ , nociceptin/orphanin FQ (ORL), σ και ϵ (οι κυριότεροι φαίνονται στον Πίνακα 2). Οι αγωνιστές τους εκλύουν φυσιολογικές, φαρμακολογικές ή ανεπιθύμητες ενέργειες ενεργοποιώντας έναν ή περισσότερους υποτύπους των υποδοχέων αυτών, ανάλογα με τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της σύνδεσής τους⁴. Έτσι, για παράδειγμα οι συνθετικές ουσίες μορφίνη, φεντανύλη, μεθαδόνη, υδροκωδόνη, λεβορφανόλη και σουλφεντανύλη ασκούν την αναλγητική τους δράση κυρίως μέσω ισχυρής σύνδεσης με τους μ οπιοειδικούς υποδοχείς (η μεθαδόνη συνδέεται ισχυρά και με δ υποδοχείς). Οι ουσίες πενταζοκίνη, διμεθυλτρυπταμίνη και φενυκυκλιδίνη ασκούν τη δράση τους στους σ υποδοχείς και αποτελούν ουσίες κατάχρησης εξαιτίας ψυχομμητικής δράσης. Η βουπρενορφίνη είναι ισχυρός αγωνιστής των υποδοχέων ORL και μερικός των μ , δ και κ , και χρησιμοποιείται στα προγράμματα υποκατάστασης εξαρτημένων ασθενών.

Στον άνθρωπο, οι οπιοειδικοί υποδοχείς εντοπίζονται κυρίως στο κεντρικό νευρικό σύστημα και στο νωτιαίο μυελό, όπως επίσης και στα περιφερικά νεύρα και στον γαστρεντερικό σωλήνα. Στον ιππόκαμπο βρέθηκε ότι οι μ και οι δ οπιοειδικοί υποδοχείς εκφράζονται κυρίως στους GABAεργικούς ενδονευρώνες, και επηρεάζουν έτσι έμμεσα τη λειτουργία των πυραμιδικών νευρώνων, προκαλώντας άρση της ασκούμενης από τους ενδονευρώνες αναστολής⁹².

Στην παρούσα εργασία μας απασχολεί η φεντανύλη, αγωνιστής των μ οπιοειδικών υποδοχέων, ουσία με δράση 100 φορές ισχυρότερη αυτής μορφίνης και 50 φορές ισχυρότερη από τη δράση της καθαρής ηρωίνης. Η αναλγητική δράση της μορφίνης στον άνθρωπο δεν ξεπερνά τις δύο ώρες, μετά από ενδοφλέβια ή ενδομυϊκή χορήγηση, ενώ η μέγιστη συγκέντρωσή της στον

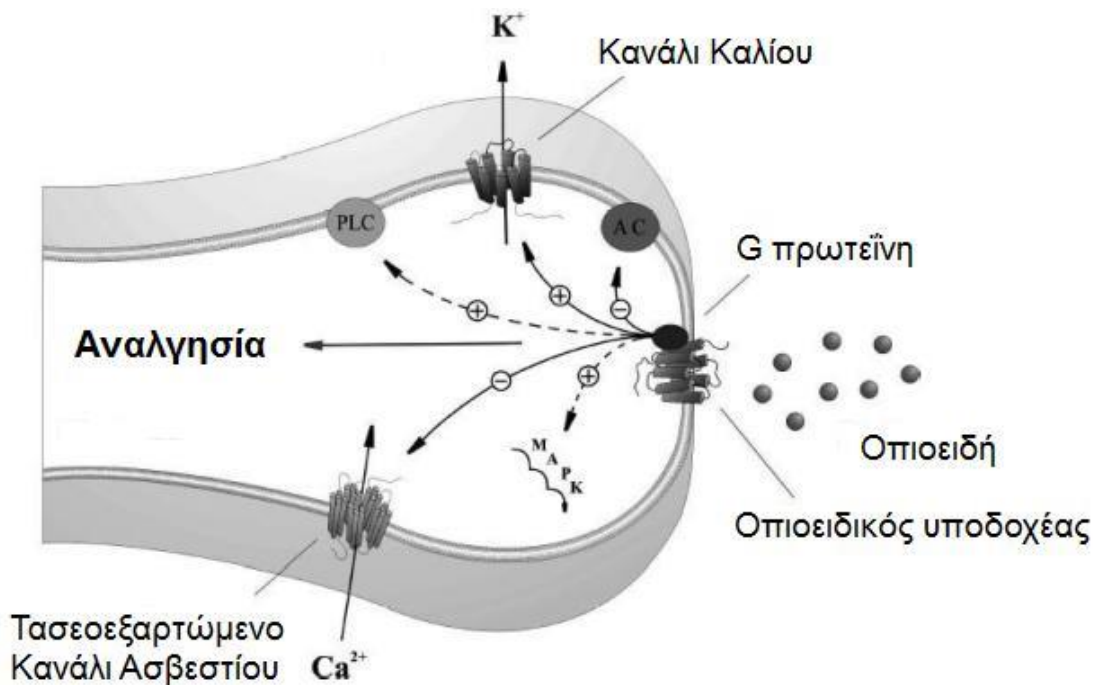
ορό επιτυγχάνεται το αργότερο μισή ώρα μετά τη χορήγησή της. Η φεντανύλη, όπως όλα τα οπιοειδή, προκαλεί υπεραλγησία, με κορύφωση της εμφάνισής της 24 ώρες μετά τη χορήγησή της ουσίας.

Πίνακας 2. Κύριοι οπιοειδικοί υποδοχείς και συνδέτες τους (*GIRK*= *G protein inwardly rectifying K⁺ channels*).

Υποδοχέας	δ	κ	μ	ORL1
Άλλες ονομασίες	DOR	KOR	MOR	NOR
Υπότυπος	δ ₁ , δ ₂	κ ₁ , κ ₂	μ ₁ , μ ₂	?
Κυτταρική δράση				
↑ της δραστηριότητας των <i>GIRK</i>	+	+	+	+
Κλείσιμο διαύλων Ca ²⁺	+	+	+	+
↓ έκλυσης νευροδιαβιβαστή	+	+	+	+
↓ cAMP	+	+	+	+
Σχετική ισχύς ενδογενούς συνδέτη	Leu-enk= Met-enk= β-endorphin> dynorphin A	dynorphin A>> β-endorphin> Leu-enk> Met-enk	β-endorphin> dynorphin A> Met-enk= Leu-enk	nociceptin>> dynorphin A
Αγωνιστής	DPDPE	U-69593	Φεντανύλη, DAMGO	nociceptin
Ανταγωνιστής	ναλοξόνη	ναλοξόνη	ναλοξόνη, CTOP	

Ενεργοποίηση του οπιοειδικού υποδοχέα

Η πρόσδεση των αγωνιστών στους οπιοειδικούς υποδοχείς οδηγεί σε στερεοτακτικές μεταβολές της πρωτεΐνης του υποδοχέα, οι οποίες σηματοδοτούν την αφετηρία της μετάδοσης του μηνύματος, με την ενεργοποίηση Gi πρωτεϊνών. Μειώνεται έτσι η δραστηριότητα της αδενυλικής κυκλάσης, μειώνοντας την ενδοκυττάρια κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cAMP), ενώ η διάνοιξη διαύλων K⁺ προκαλεί υπερπόλωση της νευρωνικής μεμβράνης (Εικ. 15). Η μετάδοση του σήματος από τους ενεργοποιημένους οπιοειδικούς υποδοχείς προκαλεί μείωση της νευρωνικής διεγερσιμότητας και της ποσότητας του εκλυόμενου νευροδιαβιβαστή, γεγονός τα οποία οδηγούν στην οπιοειδική αναλγησία⁴.



Εικόνα 15. Διαγραμματική αναπαράσταση των μηχανισμών ενεργοποίησης του καταρράκτη της οπιοειδικής αναλγησίας. Η ενεργοποίηση των υπομονάδων του οπιοειδικού υποδοχέα (G πρωτεΐνες) έχει ως άμεση δράση την απενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης (AC), με αποτέλεσμα τη διάνοιξη των διαύλων K^+ και την αναστολή τασεοεξαρτώμενων καναλιών ασβεστίου, ενώ με έμμεσους μηχανισμούς ενεργοποιείται καταράκτη των MAP κινασών και την φωσφολιπάση C (PLC)⁵⁶.

Οπιοειδική υπεραλγησία

Η προκαλούμενη από οπιοειδή αναλγητικά υπεραλγησία είναι φαινόμενο το οποίο έχει περιγραφεί στον ιατρικό τύπο από το 19ο αιώνα². Πρόκειται για παράδοξο φαινόμενο, κατά το οποίο η χορήγηση της φαρμακευτικής ουσίας (μετά από χρόνια χρήση ή ακόμα και μετά από μία εφάπαξ δόση) προκαλεί επίταση του υποκείμενου αλγεινού αισθήματος ή, άλλες φορές, μπορεί να προκαλέσει υπερβολική υποκειμενική αντίδραση σε αλγεινό ερέθισμα διαφορετικής εστίας⁶⁶.

Έχουν προταθεί διάφοροι πιθανοί μηχανισμοί για την εξήγηση του φαινομένου της υπεραλγησίας. Ο επικρατέστερος μηχανισμός αφορά την ενεργοποίηση των υποδοχέων NMDA.

Πράγματι, οι ανταγωνιστές των υποδοχέων γλουταμικού, όπως η κεταμίνη, εμπειρικά χορηγούνται προστατευτικά, κατά της ανάπτυξης της μετεγχειρητικής υπεραλγησίας. Προτεινόμενο μοριακό μονοπάτι για την εξήγηση αυτού του φαινομένου είναι η προκαλούμενη από οπιοειδή αύξηση της δραστηριότητας των NMDA διαύλων μέσω ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) από τον οπιοειδικό υποδοχέα^{66,67} (Εικ. 16).

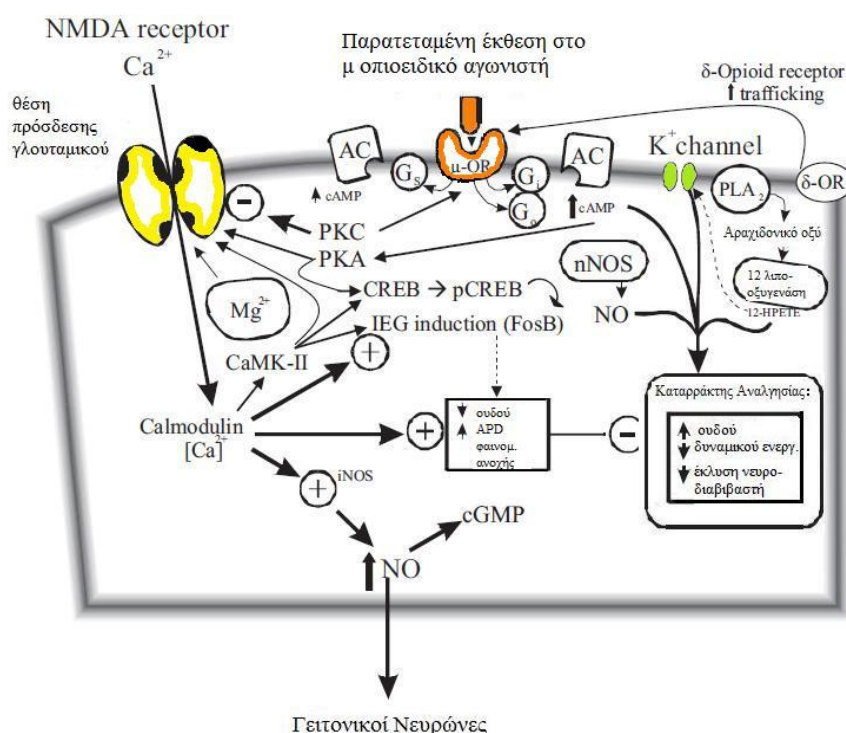
Αναφέρεται επίσης ότι ορισμένοι οπιοειδικοί αγωνιστές έχουν διεγερτική δράση μετά από τη σύνδεσή τους με τον οπιοειδικό υποδοχέα, δράση η οποία είναι δοσοεξαρτώμενη και αναστρέψιμη από τη ναλοξόνη. Το γεγονός αυτό οφείλεται στη σύνδεσή τους με G_s πρωτεΐνες, οι οποίες αυξάνουν τη δραστηριότητα της αδενυλικής κυκλάσης, και επομένως το κυκλικό AMP, και τελικά οδηγούν σε νευρωνική ενεργοποίηση⁴.

Οπιοειδική ανοχή

Η οπιοειδική ανοχή οφείλεται κυρίως στη σταδιακή απευαισθητοποίηση των οπιοειδικών υποδοχέων και στη ρύθμιση προς τα πάνω (upregulation) του μονοπατιού του cAMP. Άλλοι μηχανισμοί που συντελούν στην ανάπτυξη οπιοειδικής ανοχής είναι η ενεργοποίηση νευροανοσολογικών μονοπατιών, η παραγωγή αντι-οπιοειδικών πεπτιδίων και η ενεργοποίηση του συστήματος των δυνορφινών του νωτιαίου μυελού. Η απευαισθητοποίηση των οπιοειδικών υποδοχέων προκύπτει από τη ρύθμιση προς τα κάτω (downregulation) των οπιοειδικών υποδοχέων, τη μεταφορά υποδοχέων στο εσωτερικό του κυττάρου (μέσω ενεργοποίησης της β αρρεστίνης), την αποσύνδεση των υποδοχέων από τις G πρωτεΐνες τους, την αυξημένη παραγωγή νιτρικού οξειδίου και την επιπλέον μετάδοση μηνυμάτων μέσω πρωτεϊνών μετάδοσης σήματος όπως οι G_z πρωτεΐνες⁴.

Η ρύθμιση προς τα πάνω (upregulation) του μονοπατιού του cAMP προκύπτει από την υπερευαισθητοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης, τη σύνδεση των οπιοειδικών υποδοχέων με

G₅ πρωτεΐνες (οι πρωτεΐνες αυτές, σε αντίθεση με τις G_i πρωτεΐνες ενεργοποιούν την αδενυλική κυκλάση) και τη ρύθμιση προς τα πάνω των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών του νωτιαίου μυελού μέσω της cAMP response element-binding (CREB) πρωτεΐνης η οποία ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση Cγ (PKCγ) και τους υποδοχείς NMDA (Εικόνα 16)⁴.



Εικόνα 16. Προτεινόμενοι μηχανισμοί οπιοειδικής ανοχής. Οι μηχανισμοί οι οποίοι οδηγούν στη οπιοειδική ανοχή περιλαμβάνουν μείωση του δυναμικού ηρεμίας της νευρωνικής μεμβράνης, αύξηση της διάρκειας του δυναμικού ενεργείας (APD), και αύξηση της έκλυσης του νευροδιαβιβαστή. μ-OR, μ οπιοειδικός υποδοχέας, IEG, immediate early genes (c-fos, FosB), PKA, πρωτεϊνική κινάση A, CREB, cAMP response element-binding protein, pCREB, φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη CREB, Gi/Go, ανασταλτικές της πρωτεϊνικής κινάσης πρωτεΐνες G, Gs, διεγερτικές της πρωτεϊνικής κινάσης πρωτεΐνες G, CaMK-II, εξαρτημένη από το ασβέστιο και την καλμοδουλίνη πρωτεϊνική κινάση II; PLA2, φωσφολιπάση A2; δ-OR, δ opioid receptor; NO, μονοξείδιο του αζώτου; nNOS, νευρωνική συνθετάση του οξειδίου του αζώτου; HPETE, υδροπεροξυεικοσατετρανοϊκό οξύ⁴.

1.9. Οπιοειδή και ιππόκαμπος

Δράση των οπιοειδών στον ιππόκαμπο

Ο ιππόκαμπος ως μέρος του μεταιχμιακού συστήματος θεωρείται ως κομβικό σημείο της ευφορικής και εθιστικής δράσης των οπιοειδών. Λόγω της μεγάλης κλινικής τους σημασίας, η δράση των οπιοειδών στον ιππόκαμπο έχει μελετηθεί διεξοδικά με στόχο την κατανόηση των μηχανισμών του εθισμού. Επιπλέον, η ανάπτυξη ανοχής και εθισμού στα οπιοειδή, η σφοδρή επιθυμία (craving), αλλά και η υποτροπή μετά από απεξάρτηση ακόμα και χρόνια μετά την τελευταία έκθεση στην ουσία θεωρείται ότι σχετίζεται με την πλαστικότητα των συνάψεων του ιπποκάμπου και του ρόλου του στη λειτουργία της μνήμης^{78,79}. Πράγματι, ο σχηματισμός μνημονικών εγγραμμάτων από ερεθίσματα που προκαλούν ευφορία φαίνεται να ενισχύεται από τη δράση οπιοειδών στον ιππόκαμπο^{78,79}.

Όσον αφορά στη λειτουργία του ιπποκάμπου, έχει βρεθεί ότι η ενεργοποίηση των μ οπιοειδικών υποδοχέων στον ιππόκαμπο οδηγεί στην τροποποίηση της ολοκλήρωσης της συναπτικής δραστηριότητας στο χρόνο (temporal integration⁷⁹) και αποδιοργάνωση των γ ^{109,30} και β ³¹ ρυθμών. Επιπλέον, οπιοειδικοί αγωνιστές όπως η μορφίνη και η φεντανύλη βρέθηκε ότι επηρεάζουν, με διαφορετικό τρόπο ο καθένας, τα υψίσυχνα κύματα του ιπποκάμπου⁴⁰ (sharp wave ripples) τα οποία θεωρείται ότι σχετίζονται άμεσα με την παγίωση και αποθήκευση πληροφοριών⁸⁴.

Η διερεύνηση των κυτταρικών μηχανισμών δράσης των οπιοειδών έχει μελετηθεί σε πλήθος εργασιών. Σε μια πρώιμη μελέτη τους σε φέτες ιπποκάμπου *in vitro* οι Madison & Nicoll⁷⁴ (1988) έδειξαν ότι τα οπιοειδή προκαλούν αναστολή των GABAεργικών ενδονευρώνων μέσω υπερπόλωσης της κυτταρικής τους μεμβράνης. Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώθηκαν από τους Svoboda and Lupica¹⁰⁷ (1998), ενώ οι Carogna et al.¹⁶ (1993) έδειξαν ότι τα οπιοειδή μειώνουν την απελευθέρωση του GABA από τις νευρωνικές τους απολήξεις. Στη CA1 περιοχή του ιπποκάμπου τα οπιοειδή αναστέλλουν, μέσω υπερπόλωσης, τους ενδονευρώνες οι οποίοι προβάλλουν ειδικά στο σώμα των πυραμιδικών νευρώνων^{74,78}. Έτσι εξηγείται το γεγονός ότι

ενώ στις περισσότερες δομές του εγκεφάλου στις οποίες έχει μελετηθεί η δράση τους τα οπιοειδή δρουν ανασταλτικά, στον ιππόκαμπο παρατηρείται διέγερση των νευρώνων η οποία μπορεί να οδηγήσει σε επιληπτική κρίση⁶⁷. Η δράση αυτή των οπιοειδών μπορεί να αποδοθεί στην προαναφερθείσα ανασταλτική τους επίδραση σε GABAεργικούς ανασταλτικούς νευρώνες η οποία οδηγεί στην άρση της αναστολής στον ιππόκαμπο, γνωστής και ως δυσαναστολή (disinhibition).

Οι προαναφερθείσες δράσεις των οπιοειδών έχουν παρατηρηθεί μετά από την *οξεία* χορήγησή τους σε *in vitro* παρασκεύασμα του ιπποκάμπου. Η *χρόνια* έκθεση του ιπποκάμπου σε οπιοειδή δεν φαίνεται να επηρεάζει τις βασικές μεμβρανικές ιδιότητες των νευρώνων του⁷⁴. Ωστόσο, προκαλεί μείωση της συναπτικής πλαστικότητας στον ιππόκαμπο^{74,93} και της ικανότητας χωρικής μάθησης⁹⁰. Επιπλέον, προηγούμενη ηλεκτροφυσιολογική μελέτη έδειξε ότι 24 ώρες μετά την *in vivo* οξεία χορήγηση φεντανύλης παρατηρείται, στη CA1 περιοχής ραχιαίας μοίρας του ιπποκάμπου, ελάττωση της GABAεργικής αναστολής⁶² υποδηλώνοντας ότι ακόμα και μονήρης έκθεση του οργανισμού σε οπιοειδές μπορεί να επιφέρει τροποποίηση της λειτουργίας του ιπποκάμπου. Στόχος της τρέχουσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της φεντανύλης στους GABAεργικούς νευρώνες της κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου επίμυος.

Προέλευση οπιοειδών που επιδρούν στον ιππόκαμπο

Η διερεύνηση της προέλευσης των ενδογενών οπιοειδών που δρουν στον ιππόκαμπο πραγματοποιήθηκε κυρίως με τη χρήση ανοσοϊστοχημικών μεθόδων και απεκάλυψε την ύπαρξη αφενός προσαγωγών εγκεφαλινεργικών ινών που καταλήγουν σε δομές του ιπποκάμπου και αφετέρου νευρώνων του ιπποκάμπου που περιέχουν εγκεφαλίνη^{12,36}.

Σε ό,τι αφορά στον ιδίως ιππόκαμπο, οι **εξωγενείς προσαγωγές ίνες που περιέχουν εγκεφαλίνη** προέρχονται από από την *οδοντωτή έλικα* (βρυώδεις ίνες, οι οποίες προβάλλουν στη CA3) και τον *συνειρμικό σφρητικό φλοιό* (έξω οδός της διάτρητης ουσίας)³⁶ καθώς και από τον *ενωτικό πυρήνα του θαλάμου* (κροταφοαμμωνική οδός, με την οποία συνενώνεται η έξω διατιτραίνουσα οδός και μαζί αποτελούν τη βασικότερη διεγερτική προσαγωγό οδό στην περιοχή CA1)⁷⁹.

Σχετικά με τους **νευρώνες του ιδίως υποκάμπτου που περιέχουν εγκεφαλίνη**, μελέτες δείχνουν ότι πρόκειται αποκλειστικά για ενδονευρώνες⁷⁹. Στην περιοχή CA1 εντοπίστηκαν ανοσοθετικοί για εγκεφαλίνη ενδονευρώνες σε όλες τις στιβάδες, με εντοπισμό των αξόνων τους επίσης σε όλες τις στιβάδες και κυρίως στη στιβάδα των πολυμόρφων κυττάρων (*stratum oriens*) προς το όριο με την παρυφή (*alveus*). Οι ανοσοθετικοί στην εγκεφαλίνη νευρώνες δίνουν πολυάριθμες συμμετρικές (δηλ. ανασταλτικές) συνάψεις με σώματα και δενδριτικές ακάνθους άλλων GABAεργικών νευρώνων οι οποίοι μπορεί να είναι ανοσοθετικοί ή ανοσοαρνητικοί στην εγκεφαλίνη, σε κάθε περίπτωση, όμως, είναι ανοσοθετικοί στην καλβιδίνη (*calbindin*), στην σωματοστατίνη, και στο αγγειοδραστικό εντερικό πεπτίδιο (*vasoactive intestinal polypeptide, VIP*)⁷⁹. Επιπλέον, οι ανοσοθετικοί στην εγκεφαλίνη νευρώνες παρουσιάζουν συνεντοπισμό με το GABA, το VIP και με την καλρετινίνη υποδηλώνοντας ότι οι εγκεφαλινεργικοί νευρώνες του υποκάμπτου ανήκουν στην κατηγορία νευρώνων που συνάπτονται με άλλους ενδονευρώνες και συνιστούν υπο-ομάδα των GABAεργικών εκείνων ενδονευρώνων που παρουσιάζουν ανοσοθετικότητα στο VIP και την καλρετινίνη⁷⁹. Σύμφωνα με τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι οι ανοσοθετικοί για εγκεφαλίνη ενδονευρώνες του υποκάμπτου συνάπτοντα με ανοσοθετικούς και ανοσοαρνητικούς για εγκεφαλίνη ενδονευρώνες. Οι ανοσοαρνητικοί για εγκεφαλίνη ενδονευρώνες δίνουν με τη σειρά τους συνάψεις στους δενδρίτες πυραμιδικών νευρώνων⁷⁹.

Υποδοχείς οπιοειδών στον υποκάμφο

Οι μελέτες για τον εντοπισμό των οπιοειδικών υποδοχέων είναι περιορισμένες και επικεντρώνονται σχεδόν αποκλειστικά στη ραχιαία μοίρα^{6,25,26,27,105}. Όλες οι μελέτες συμφωνούν στο ότι οι οπιοειδικοί υποδοχείς εντοπίζονται σε ενδονευρώνες του υποκάμπτου με εξαίρεση περιορισμένο αριθμό κοκκωδών κυττάρων στην οδοντωτή έλικα οι οποίοι βρέθηκαν ανοσοθετικοί για υποδοχείς τύπου μ και δ ⁶. Επειδή η παρούσα μελέτη αφορά στην επίδραση της φεντανύλης, ενός μ -οπιοειδικού αγωνιστή, θα αναφερθεί ο εντοπισμός μόνον αυτού του υποτύπου υποδοχέα στον υποκάμφο με έμφαση στην CA1 περιοχή όπου διεξήχθησαν τα πειράματα ηλεκτροφυσιολογίας.

Χρησιμοποιώντας μεθόδους ανοσοϊστοχημείας και έκφρασης mRNA, βρέθηκε ότι οι μ-οπιοειδικοί υποδοχείς εντοπίζονται σε ένα χαρακτηριστικό, από λειτουργική και νευροχημική άποψη, υποπληθυσμό ενδονευρώνων της CA1 περιοχής. Συγκεκριμένα, οι μ-οπιοειδικοί υποδοχείς εντοπίζονται σε καλαθοειδείς ενδονευρώνες της πυραμιδικής στιβάδας οι οποίοι συνάπτονται με σώματα πυραμιδικών νευρώνων και είναι σχεδόν όλοι (96%) ανοσοθετικοί για παρβαλβουμίνη. Εντοπίζονται, επίσης, και σε O-LM ενδονευρώνες της στιβάδας των πολύμορφων κυττάρων οι οποίοι συνάπτονται με άπω κορυφαίους δενδρίτες της βοθριώδους-μοριακής στιβάδας και είναι ανοσοθετικοί στη σωματοστατίνη και στο νευροπεπτίδιο Υ²⁷. Τέλος, εντοπίζονται σε ενδονευρώνες που είναι ανοσοθετικοί στην χολεκυστοκινίνη και ενίοτε στον αγγειοδραστικό σπλαχνικό παράγοντα και συνάπτονται κυρίως με άλλους ενδονευρώνες. Σε υποκυτταρικό επίπεδο, οι μ-υποδοχείς εντοπίζονται στους άξονες, τις τελικές απολήξεις, στο σώμα και τους δενδρίτες των ενδονευρώνων. Με βάση τα παραπάνω, οι ενδονευρώνες που φέρουν μ-οπιοειδικούς υποδοχείς ρυθμίζουν τη διεγερσιμότητα των πυραμιδικών νευρώνων με διακριτό για τον καθένα τρόπο: η αναστολή των καλαθοειδών ενδονευρώνων, η οποία επέρχεται από την ενεργοποίηση των μ-υποδοχέων, επιφέρει άμεση αύξηση της δυνατότητας πρόκλησης δυναμικών ενεργείας μέσω άρσης της GABAεργικής αναστολής στο σώμα των πυραμιδικών νευρώνων. Αντίθετα, η ενεργοποίηση των μ-υποδοχέων στους O-LM νευρώνες επιφέρει άρση της αναστολής τους σε άπω κορυφαίους πυραμιδικούς δενδρίτες της βοθριώδους-μοριακής στιβάδας με αποτέλεσμα την ευχερέστερη διέγερση των εν λόγω δενδριτών από άξονες της διατιτραίνουσας οδού και των θαλαμικών νευρώνων που εισέρχονται στην στιβάδα αυτή.

Αναφορικά με την διαφοροποίηση των οπιοειδών υποδοχέων κατά μήκος του επιμήκους άξονα του ιπποκάμπου, υπάρχει μόνο μια μελέτη σύμφωνα με την οποία ο κοιλιακός ιππόκαμπος παρουσιάζει, σε σχέση με τον ραχιαίο, αυξημένο αριθμό ανοσοθετικών στους μ-οπιοειδικοί υποδοχείς νευρώνων²⁵.

1.10. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός GABAεργικών νευρώνων στον ιππόκαμπο

Κατά την ανοσοϊστοχημική μελέτη ενός ιστού, απαραίτητη προϋπόθεση για τον εντοπισμό ενός επιτόπου αποτελούν η ελαχιστοποίηση της διαστρέβλωσής του όπως και η κατά το δυνατόν διατήρηση της μικροαρχιτεκτονικής του ιστού. Με την απομάκρυνση ενός ιστού από τον ζωντανό οργανισμό ξεκινά η αυτόλυσή του δηλαδή η ενζυματική πέψη του κυττάρου από τα ένζυμα του ιδίου κυττάρου. Η μονιμοποίηση του ιστού αποτελεί μια χημική διαδικασία η οποία στοχεύει στην διατήρηση της δομής του. Πράγματι, το μέσον μονιμοποίησης σταθεροποιεί τη μικροαρχιτεκτονική τόσο των ίδιων των κυττάρων όσο και αυτή μεταξύ των κυττάρων, προλαμβάνοντας την αυτόλυσή τους και δίνοντας τη δυνατότητα στον ιστό να υποβληθεί σε περαιτέρω διαδικασίες χωρίς αλλαγές στη δομή του.

Οι πλέον συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι μονιμοποίησης ιστών είναι αυτή μέσω κυκλοφορίας του αίματος με ενδοκαρδιακή έγχυση του μονιμοποιητικού διαλύματος (perfusion fixation) και αυτή της εμβάπτισης (immersion fixation). Το μεγάλο πλεονέκτημα της μονιμοποίησης με ενδοκαρδιακή έγχυση είναι ότι η μονιμοποίηση πραγματοποιείται μέσω του ανέπαφου αγγειακού συστήματος καθώς το μονιμοποιητικό διάλυμα διαχέεται μέσω της αριστερής κοιλίας στη συστηματική κυκλοφορία και μεταφέρεται σταδιακά από τα αιμοφόρα αγγεία στο γύρω παρέγχυμα¹⁵. Παρόλο που η διάχυση του μονιμοποιητικού εξαρτάται από το βαθμό αγγείωσης της υπό μελέτη περιοχής όπως επίσης και από το τοίχωμα και το ενδοθήλιο του αγγείου, αυτή η μέθοδος μονιμοποίησης ελαχιστοποιεί την περίοδο ανοξίας και διατηρεί τη μορφολογία του εγκεφαλικού ιστού⁶³. Ως εκ τούτου, η μονιμοποίηση με ενδοκαρδιακή έγχυση έχει αποτελέσει την μέθοδο εκλογής για το νευρικό σύστημα.

Κατά τη μονιμοποίηση με εμβάπτιση ο ιστός αποκόπτεται από το αγγειακό του δίκτυο και βυθίζεται άμεσα στο μονιμοποιητικό διάλυμα, ενώ η μονιμοποίηση επιτυγχάνεται με διάχυση του μονιμοποιητικού διαλύματος από την εξωτερική επιφάνεια του ιστού προς το εσωτερικό του. Παράγοντες που εξασφαλίζουν την διείσδυση του μονιμοποιητικού σε ολόκληρο το δείγμα ιστού είναι η θερμοκρασία, το pH και ο όγκος του μονιμοποιητικού, ο χρόνος έκθεσης, η πίεση και το μέγεθος της επιφάνειάς του⁹.

Η μονιμοποίηση με εμφύτευση βρίσκει εφαρμογή σε τομές εγκεφάλου στις οποίες έχει προηγηθεί λειτουργικός έλεγχος. Πράγματι, το παρασκεύασμα τομών εγκεφάλου έχει αποτελέσει σημαντικό σταθμό στη μελέτη του εγκεφάλου θηλαστικών και συγκεκριμένα στην διερεύνηση νευροφυσιολογικών μηχανισμών *in vitro*. Το παρασκεύασμα αυτό επιτρέπει τη λειτουργική μελέτη των μεμβρανικών ιδιοτήτων των νευρώνων και ταυτόχρονα των συναπτικών διασυνδέσεων μεταξύ τους, καθώς στο πάχος της φέτας διατηρείται, στοιχειωδώς, ένα συναπτικό νευρωνικό κύκλωμα. Η συσχέτιση των λειτουργικών χαρακτηριστικών των νευρώνων με βιοχημικούς νευρωνικούς δείκτες και μορφολογικά στοιχεία του ιστού εξακολουθεί να αποτελεί πρόκληση στο πεδίο των νευροεπιστημών. Πράγματι, η απόδοση λειτουργικών χαρακτηριστικών των νευρώνων σε ενδοκυττάριους δείκτες μπορεί να διαφωτίσει και να εξηγήσει αδιευκρίνιστες πτυχές της μεταβλητότητας και της πολυπλοκότητας των νευρωνικών μικροκυκλωμάτων. Μοναδικός τρόπος πραγματοποίησης τέτοιου είδους πειραμάτων αποτελεί η χρώση μονιμοποιημένης φέτας εγκεφάλου στην οποία έχει προηγηθεί ηλεκτροφυσιολογικός έλεγχος. Στόχος της τρέχουσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της φεντανύλης στην GABAεργική αναστολή, τόσο από άποψη λειτουργίας όσο και ανοσοθετικότητας, στην κοιλιακή μοίρα του υποκάμπτου επίμυος.

1.11. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της εργασίας ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της *in vivo* χορήγησης φεντανύλης στην GABAεργική αναστολή όπως αυτή καταγράφεται *in vitro* στην CA1 περιοχή της κοιλιακής μοίρας του υποκάμπτου. Παράλληλα, διερευνήθηκε η επίδραση της φεντανύλης στον πληθυσμό των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων σε όλες τις περιοχές της ραχιαίας και της κοιλιακής μοίρας του υποκάμπτου.

Επιμέρους σκοπός ήταν η διερεύνηση της επίδρασης διαφορετικών μεθόδων μονιμοποίησης (ενδοκαρδιακή έγχυση έναντι εμφύτευσης) αλλά και διαφορετικού χρόνου επώασης τομών υποκάμπτου σε οξυγονούμενο τεχνητό εγκεφαλωνιτιαίο υγρό στο πλήθος των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων στον υποκάμφο.

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η συλλογή των πειραματικών δεδομένων συνίσταται στην προετοιμασία εγκάρσιων τομών υποκάμπτου πάχους 500μm, με σκοπό την ενδοκυττάρια *in vitro* ηλεκτροφυσιολογική καταγραφή, και στη συνέχεια στη μονιμοποίησή τους, ώστε να προκύψουν τομές μικρότερου πλέον πάχους, για χρώση εωσίνης-αιματοξυλίνης όπως και για ανοσοϊστοχημική χρώση, με σκοπό τον εντοπισμό της παρουσίας και ενεργότητας των GABAεργικών κυττάρων.

2.1.1. Πειραματόζωα

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί, νεαροί, λευκοί επίμυες Wistar βάρους 200-350g. Τα πειραματόζωα είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό και στεγάστηκαν ανά τρία μέσα σε κλωβούς σε χώρο με σταθερή θερμοκρασία $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ και εναλλαγή φωτός-σκότους κάθε 12 ώρες. Οι χειρισμοί για τους σκοπούς του πειράματος πραγματοποιήθηκαν μία εβδομάδα μετά τη μεταφορά των πειραματοζώων στο εργαστήριο, κατά τη διάρκεια της οποίας λάμβανε χώρα καθημερινή εξοικείωσή τους με τον ερευνητή για την ελαχιστοποίηση του άγχους τους. Οι συνθήκες διαβίωσης και χειρισμού των αρουραίων ήταν σύμφωνες με τον Ελληνικό Νόμο (Π.Δ. 160/91).

2.1.2. Χορήγηση φεντανύλης – Πειραματικές ομάδες

Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν τυχαία σε δύο ομάδες:

Η πρώτη ομάδα αποτελούνταν από πειραματόζωα στα οποία πραγματοποιήθηκε, με υποδόρια έγχυση στην αυχενική χώρα, χορήγηση φεντανύλης σε τέσσερις δόσεις, μία κάθε δεκαπέντε λεπτά. Το διάλυμα της φεντανύλης το οποίο χρησιμοποιήθηκε είχε περιεκτικότητα 0,05mg/ml

και η κάθε δόση του φαρμάκου αναλογούσε σε 80μg ανά κιλό βάρους σώματος των πειραματοζώων. Ο τελικός όγκος του διαλύματος έγχυσης ήταν 1,6ml/kg. Για την αποφυγή τυχόν μοιραίας αναπνευστικής καταστολής από τη χορήγηση του οπιοειδούς, υπήρξε συνεχής παρακολούθηση του πειραματοζώου (και ενδεχόμενη αφύπνιση με ηχητικά και απτικά ερθίσματα) για χρονικό διάστημα έως και δύο ωρών μετά την τελευταία έγχυση.

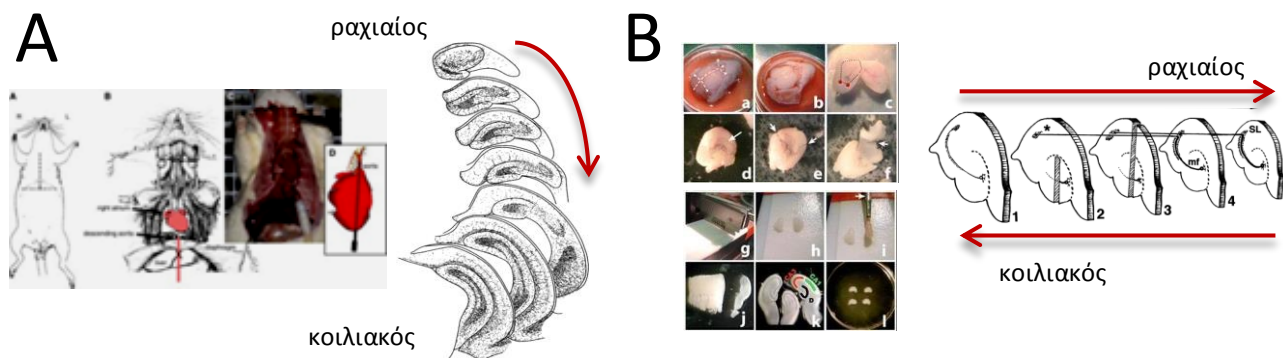
Η δεύτερη ομάδα πειραματοζώων, η ομάδα ελέγχου, αποτελούνταν από πειραματόζωα στα οποία έγινε μία εφάπαξ υποδόρια έγχυση φυσιολογικού ορού (1,6ml/kg) στην αυχενική χώρα (Εικ. 19).

2.1.3. Παρασκευή ιστού με τη μέθοδο της διήθησης με μονιμοποιητικό ολόκληρου του σώματος του ζώου (whole animal perfusion)

Εικοσιτέσσερις ώρες μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας τα πειραματόζωα αναισθητοποιήθηκαν με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση ένυδρου χλωράλης και χρησιμοποιήθηκε εξωσωματικό δίκτυο κυκλοφορίας (περιλαμβάνεται αντλία σταθερής πίεσης) προκειμένου να διηθηθεί το σώμα του πειραματοζώου με διάλυμα παραφορμαλδεΐδης: 4% PFA σε 0,1M PB (0,1M NaH_2PO_4 και 0,1M Na_2HPO_4) με pH 7,4, στους 4°C.

Το αναισθητοποιημένο πειραματόζωο τοποθετήθηκε σε ύπτια θέση, σταθεροποιήθηκαν τα άκρα του, και πραγματοποιήθηκε θωρακοτομή και ευρεία τομή του κοιλιακού τοιχώματος κατά μήκος της μέσης γραμμής μέχρι το υπογάστριο. Μετά από μικρή τομή εισήχθη στη κορυφή του μυοκαρδίου ατραυματική βελόνη, η οποία ήταν συνδεδεμένη με το εξωσωματικό δίκτυο κυκλοφορίας. Στερεώθηκε στη θέση της με χειρουργική λαβίδα και κατόπιν πραγματοποιήθηκε τομή στο ους του δεξιού κόλπου, με σκοπό από την τομή αυτή να εκρέουν τα χορηγούμενα υγρά. Αρχικά εγχύθηκαν 100 ml φυσιολογικού ορού, με σκοπό την απομάκρυνση του αίματος από την κυκλοφορία, και την αποφυγή δημιουργίας θρόμβων. Εν συνεχεία χορηγήθηκαν 200 ml διαλύματος παραφορμαλδεΐδης. Με την ολοκλήρωση της

έγχυσης, ο εγκέφαλος αφαιρέθηκε από το κρανίο και διατηρήθηκε σε όμοιο διάλυμα παραφορμαλδεΰδης στους 4°C για 16-18 ώρες (Εικ. 17Α).



Εικόνα 17. Τεχνικές προετοιμασίας μονιμοποιημένων τομών του υποκάμπτου. Α. Μονιμοποίηση ολόκληρου του εγκεφάλου με ενδοκαρδιακή έγχυση μονιμοποιητικού πραγματοποιήθηκε μέσω μη τραυματικής βελόνας στην αριστερή κοιλία που έφθανε μέχρι την ανιούσα αορτή, ενώ έγινε τομή και στο δεξιό κόλπο. **Β.** Κατά τη μονιμοποίηση με εμβάπτιση πραγματοποιήθηκε αρχικά εκτομή του υποκάμπτου σε οξυγονωμένο TENY, στη συνέχεια κόπηκαν τομές εγκάρσια στον επιμήκη άξονα της δομής οι οποίες κατόπιν εμβαπτίσθηκαν σε μονιμοποιητικό διάλυμα.

Με την πάροδο 16-18 ωρών πραγματοποιήθηκε έκπλυση του μονιμοποιητικού υλικού, υπό συνεχή παροχή τρεχούμενου νερού για τρεις ώρες, και εν συνεχεία οι ιστοί τοποθετήθηκαν σε διαλύματα αλκοόλης διαδοχικά αυξημένης πυκνότητας (50°, 70°, 96°, 100°), για μία ώρα σε έκαστο διάλυμα, με σκοπό την πλήρη αφυδάτωση του ιστού.

Αφού διατηρήθηκαν για 16-18 ώρες σε καθαρό διάλυμα αλκοόλης (100°), ακολουθήθηκε παρόμοια με της προηγούμενης ημέρας διαδικασία, με παραμονή των ιστών σε δύο διαδοχικά καθαρά διαλύματα ξυλόλης, για μία ώρα σε έκαστο. Με τον τρόπο αυτό το μέσο αφυδάτωσης αντικαθίσταται από την ξυλόλη, η οποία αποτελεί διαλύτη συμβατό με το μέσο έγκλεισης (παραφίνη). Ακολούθησε παραμονή σε καθαρή παραφίνη, μέσα σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 60-62°C, για δύο ώρες, σε δύο διαδοχικά δοχεία. Τέλος οι ιστοί εγκλείστηκαν σε παραφίνη και αφέθηκαν να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου. Από τα εγκλεισμένα σε παραφίνη παρασκευάσματα έγινε λήψη μετωπιαίων τομών πάχους 8 μm, με χρήση

μικροτόμου κοπής. Οι τομές οι οποίες προέκυψαν αποθηκεύθηκαν σε θερμοκρασία συντήρησης (4°C) μέχρι την τελική τους χρήση.

Πραγματοποιήθηκε χρώση Nissl σε επιλεγμένες τομές (1/20 από το σύνολο των τομών κάθε ιστού), προκειμένου να εξασφαλιστεί μια αδρή χαρτογράφηση του κάθε παρασκευάσματος. Με οδηγό αυτές τις εικόνες, και σύμφωνα με τη χαρτογράφηση του εγκεφάλου του αρουραίου από τους Paxinos και Watson, πραγματοποιήθηκε χρώση ανοσοφθορισμού σε συγκεκριμένες τομές. Στόχος ήταν η λήψη τομών στις οποίες απεικονίζεται με ευκρίνεια ο ραχιαίος (Bregma 0,24mm έως 0,12mm) και ο κοιλιακός ιππόκαμπος (Bregma -0,84mm έως -0,96mm).

2.1.4. Παρασκευή ιστού με τη μέθοδο της μονιμοποίησης με εμβάπτιση λεπτής τομής ιστού (immersion fixation)

Εικοσιτέσσερις ώρες μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας χορήγησης φεντανύλης ή φυσιολογικού ορού, τα ζώα αναισθητοποιήθηκαν με αιθέρα και καρατομήθηκαν. Αφαιρέθηκε ο εγκέφαλος από το κρανίο, διαχωρίστηκαν τα δύο ημισφαίρια, αποκαλύφθηκε ο ιππόκαμπος σε κάθε ημισφαίριο, και αποκολλήθηκε από τις παρακείμενες δομές (φλοιός, θάλαμος). Εν συνεχεία, ολόκληρη η δομή του ιπποκάμπου τοποθετήθηκε σε έδρα μικροτόμου (McIlwain tissue chopper) και έγινε λήψη εγκάρσιων ως προς τον επιμήκη άξονα τομών πάχους 500μm, από την κοιλιακή και από τη ραχιαία μοίρα (Εικ. 17 Β; Εικ. 19, B₁, B₂ αντίστοιχα). Σε κάθε πειραματόζωο, ο ιππόκαμπος του αριστερού ημισφαιρίου παρασκευάστηκε κατά προτεραιότητα, με αποτέλεσμα οι χειρισμοί στον δεξιό ιππόκαμπο να απέχουν τρία με πέντε λεπτά της ώρας από αυτούς του αριστερού ημισφαιρίου. Σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας οι ιστοί διαποτίζονταν με οξυγονούμενο (95% O₂-5% CO₂), παγωμένο (T=0-4°C), τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό (TENY) σε mM: 124 NaCl, 4 KCl, 2 MgSO₄, 2 CaCl₂, 1,25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 10 γλυκόζη, σε pH 7,4.

Οι εγκάρσιες τομές (φέτες) του ιπποκάμπου από την κοιλιακή ή ραχιαία μοίρα διαχωρίστηκαν στη συνέχεια σε τρεις ομάδες. Οι φέτες της πρώτης ομάδας εμβαπτίστηκαν απευθείας σε

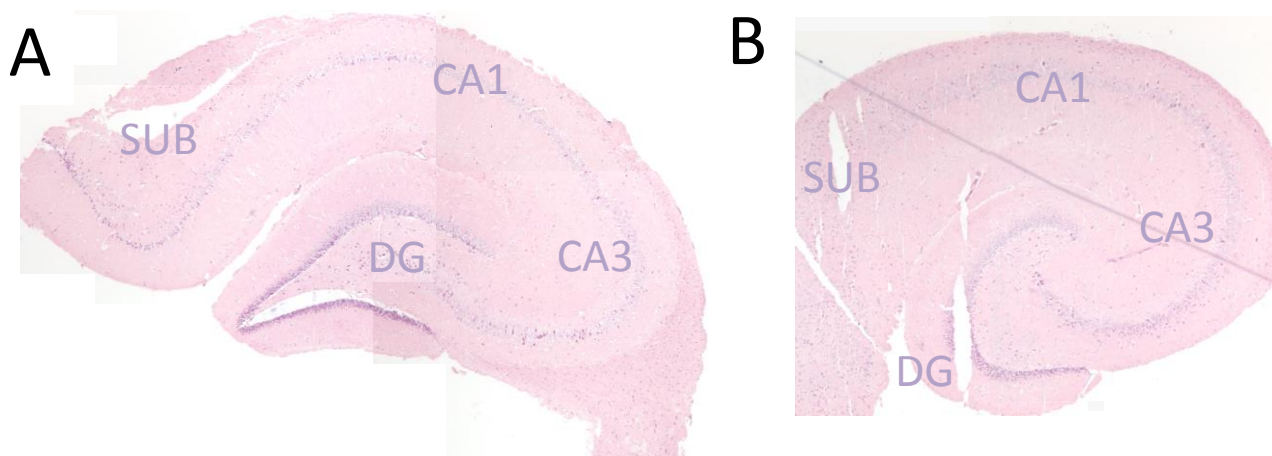
μονιμοποιητικό διάλυμα παραφορμαλδεΐδης [4% PFA σε 0,1M PB (0,1M NaH_2PO_4 και 0,1M Na_2HPO_4) με pH 7,4, στους 4°C]. Η ομάδα αυτή ονομάστηκε (0h). Η δεύτερη ομάδα τομών (1h) τοποθετήθηκε για μία ώρα σε λουτρό τεχνητού οξυγονούμενου εγκεφαλονωτιαίου υγρού της προαναφερθείσας σύστασης, σε θερμοκρασία 32-33°C. Μετά το πέρας της ώρας αυτής, οι τομές εμβαπτίστηκαν στο μονιμοποιητικό διάλυμα παραφορμαλδεΐδης. Η τρίτη ομάδα τομών (xh) παρέμεινε στο λουτρό ηλεκτροφυσιολογικής καταγραφής για 5-9 ώρες, ενόσω πραγματοποιούνταν ενδοκυττάρειες καταγραφές από πυραμιδικούς νευρώνες της CA1 περιοχής (Εικ. 19, 3). Μετά την ολοκλήρωση των χειρισμών, κάθε μία ομάδα τομών διατηρήθηκε στην ψύξη, μέσα στο μονιμοποιητικό διάλυμα, για 12-18 ώρες (overnight).

Στο επόμενο βήμα, οι τομές τοποθετήθηκαν κάτω από τρεχούμενο νερό βρύσης για 15 λεπτά, με σκοπό την απομάκρυνση του μονιμοποιητικού διαλύματος. Ακολούθησε σταδιακή αφυδάτωση των ιστών, με τοποθέτηση σε διαλύματα αλκοόλης διαδοχικά αυξανόμενης πυκνότητας (50°, 80°, 96°, 100°, για μία ώρα σε έκαστο διάλυμα), και στη συνέχεια ο ιστός παρέμεινε σε καθαρό διάλυμα ξυλόλης για μία ακόμη ώρα. Ακολούθησε παραμονή σε καθαρή παραφίνη, μέσα σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 60-62°C, για δύο ώρες, σε δύο διαδοχικά ποτήρια ζέσεως. Τέλος, οι ιστοί εγκλείστηκαν σε παραφίνη και αφέθηκαν να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου (Εικ. 19, 4).

Από τα εγκλεισμένα σε παραφίνη παρασκευάσματα έγινε λήψη τομών πάχους 4μm, με χρήση μικροτόμου κοπής, σε βάθος 100-200μm περίπου από την επιφάνεια του ιστού. Λαμβάνονταν τρεις διαδοχικές τομές: η πρώτη και η τρίτη τομή τοποθετούνταν σε αντικειμενοφόρους πλάκες, κατάλληλες για σήμανση με ανοσοφθορισμό, ενώ η δεύτερη σε απλές αντικειμενοφόρους πλάκες με σκοπό την πραγματοποίηση χρώσης με Εωσίνη-Αιματοξυλίνη. Η χρώση με Εωσίνη-Αιματοξυλίνη δίνει τη δυνατότητα αξιολόγησης της ποιότητας του ιστού κατά την ώρα της μονιμοποίησης, ενώ επίσης παρέχει σημείο αναφοράς συγκριτικά με τις εκατέρωθεν της τομές που είχαν χρωσθεί ανοσοϊστοχημικά (Εικ. 19, 5).

2.1.5. Χρώση με εωσίνη-αιματοξυλίνη

Για να εξετασθούν τα γενικά ιστολογικά χαρακτηριστικά και η θέση των τομών κατά μήκος του ραχιαίο-κοιλιακού άξονα του υποκάμπου, χρώσθηκαν με εωσίνη-αιματοξυλίνη τομές γειτονικές προς αυτές που προορίζονταν για ανοσοϊστοχημική χρώση. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετήθηκαν σε κλίβανο με σταθερή θερμοκρασία 60°C, ώστε να απομακρυνθεί η παραφίνη.



Εικόνα 18. Ανακατασκευασμένες εικόνες λεπτών τομών του υποκάμπου χρωσμένων με εωσίνη-αιματοξυλίνη. Απεικονίζονται οι περιοχές του ραχιαίου (A) και του κοιλιακού (B) υποκάμπου.

Στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα ξυλόλης, με σκοπό να απομακρυνθούν τα υπολείμματα της παραφίνης, και ακολούθησε η ενυδάτωσή τους με εμβάπτιση σε μειούμενης πυκνότητας διαλύματα αλκοόλης.

Τοποθετήθηκαν σε διάλυμα αιματοξυλίνης (δίνει στη χρωματίνη των πυρήνων χρώμα μωβ) και εωσίνης (δίνει στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων του ιστού χρώμα ροζ) και ξεπλύθηκαν με νερό βρύσης (Εικ. 18; Εικ. 19, 6).

2.1.6. Μελέτη ανοσοφθορισμού

Για τον εντοπισμό με χρώση ανοσοφθορισμού της παρουσίας και ενεργότητας GABAεργικών κυττάρων στον ιππόκαμπο, χρησιμοποιήθηκε ως πρώτο αντίσωμα πολυκλωνικό αντίσωμα κατά του GABA, ανεπτυγμένο σε κουνέλι, και ως δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε συνδεδεμένο με φλουοροσκεΐνη φθορίζον αντίσωμα ανεπτυγμένο σε αίγα κατά των IgG (H+L) ανοσοσφαιρινών του κουνελιού.

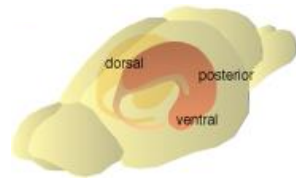
Πραγματοποιήθηκε αρχικά αποπαραφίνωση των τομών παραφίνης με παραμονή για 6 λεπτά σε θερμό (40°C) διάλυμα καθαρής ξυλόλης, και για ακόμα 6 λεπτά σε διάλυμα καθαρής ξυλόλης σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, ακολούθησε ενυδάτωση των τομών σε διαλύματα αλκοόλης σταδιακά μειούμενης πυκνότητας (100°, 96°, 80°, 70°, 50°, με παραμονή για πέντε λεπτά σε κάθε διάλυμα). Μετά από έκπλυση με διάλυμα PBS (0,1M NaH₂PO₄, 0,1M Na₂HPO₄ και 0,9% NaCl, pH 7,4) οι ιστοί μεταφέρθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος 0,01M σε pH 6,0, και θερμάνθηκαν σε φούρνο μικροκυμάτων προκειμένου να αποκαλυφθούν οι αντιγονικές θέσεις οι οποίες τυχόν καλύφθηκαν κατά την αφυδάτωση (για τρία λεπτά σε μέγιστη ισχύ και για επτά λεπτά στη συνέχεια σε μέτρια ισχύ). Οι ιστοί αφέθηκαν να επιστρέψουν σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθως, μετά από ακόμα μία έκπλυση με διάλυμα PBS, επώασθηκαν για τριάντα λεπτά σε διάλυμα ορού αίγας (10% Normal Goat Serum σε PBS: 0,1M NaH₂PO₄, 0,1M Na₂HPO₄ και 0.9% NaCl, pH 7,4), για την αποφυγή της μη ειδικής δέσμευσης του δεύτερου αντισώματος. Εν συνεχεία, ο ορός αφαιρέθηκε και οι τομές επώασθηκαν με το πρώτο αντίσωμα, πολυκλωνικό αντίσωμα κατά του GABA, ανεπτυγμένο σε κουνέλι (Ab rabbit anti-GABA, σε συγκέντρωση 1:500, σε διάλυμα 0,5% Triton X σε PBS) για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και για 16-18 ώρες σε θερμοκρασία συντήρησης (4°C).

Μετά την παραμονή τους για 16-18 ώρες σε θερμοκρασία συντήρησης (4°C), οι ιστοί αφέθηκαν για μία ώρα να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε έκπλυση με διάλυμα PBS και επώαση με το δεύτερο αντίσωμα (Ab anti-rabbit Alexa 555 σε συγκέντρωση 1:400 σε PBS) για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από εκ νέου έκπλυση με διάλυμα PBS, έγινε έγκλειση σε antifade-mounting medium και ο ιστός καλύφθηκε με τοποθέτηση καλυπτρίδων.

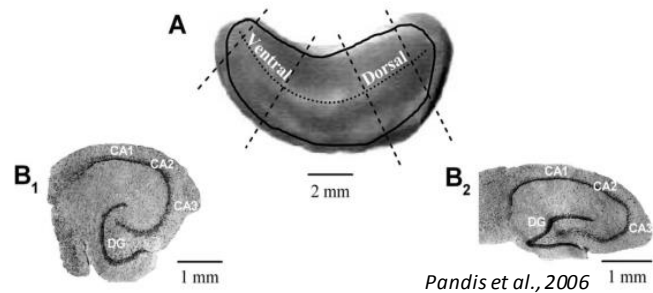
1 Χορήγηση φεντανύλης ή φυσιολογικού ορού *in vivo*



2 Προετοιμασία εγκεφαλικών τομών πάχους 500 μm

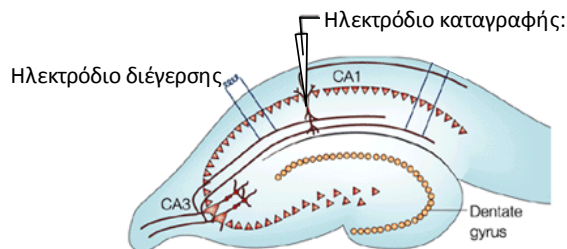


<http://csonline.dayoo.com>



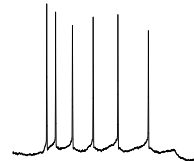
Pandis et al., 2006

3 Ηλεκτροφυσιολογία *in vitro*

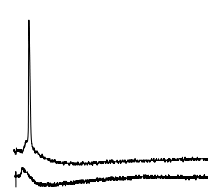


Martin & Kosik, 2002

Σωματική διέγερση

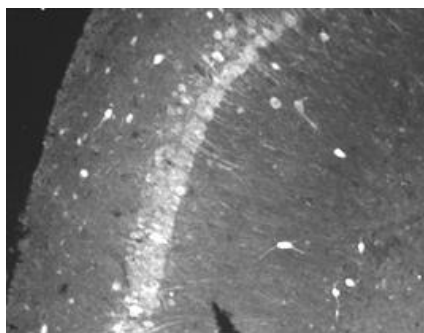


Συναπτική διέγερση



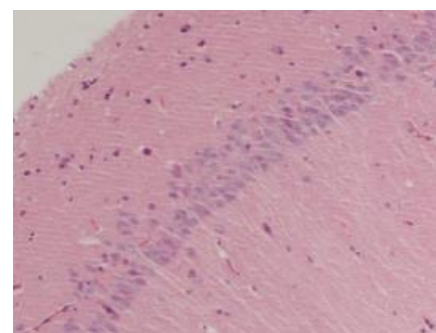
4 Μονιμοποίηση τομών 500 μm με εμβάπτιση
Έγκλειση σε παραφίνη
Κοπή τομών 5 μm

5 Ανοσοϊστοχημεία



Pippidou et al., 2013

6 Ιστολογία



Pippidou et al., 2013

Εικόνα 19. Απεικόνιση πειραματικών σταδίων που ακολουθήθηκαν για την ηλεκτροφυσιολογική, ανοσοϊστοχημική και ιστολογική μελέτη τομών του υποκάμπτου.

2.1.7. Μικροσκοπία

Οι τομές παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss Axioskop με φακό Plan-Neofluar x20,x40/0.75. Φωτογραφίες όλων των περιοχών του υποκάμπου ελήφθησαν με την χρήση ασπρόμαυρης κάμερας AxioCam CCD (Carl Zeiss, Jena, Germany) σε ψηφιακή μορφή και αποθηκεύθηκαν με τη χρήση λογισμικού Cytovision (Leica Biosystems). Για την λεπτομερή απεικόνιση του ιστού ήταν απαραίτητη η λήψη μεγάλου αριθμού διαδοχικών φωτογραφιών ώστε να μπορέσει να γίνει ανακατασκευή της συνολικής εικόνας της τομής. Η καταμέτρηση των νευρώνων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό ανάλυσης εικόνας ImageJ και περιγράφεται λεπτομερώς στα αποτελέσματα.

2.1.8. Ηλεκτροφυσιολογική καταγραφή

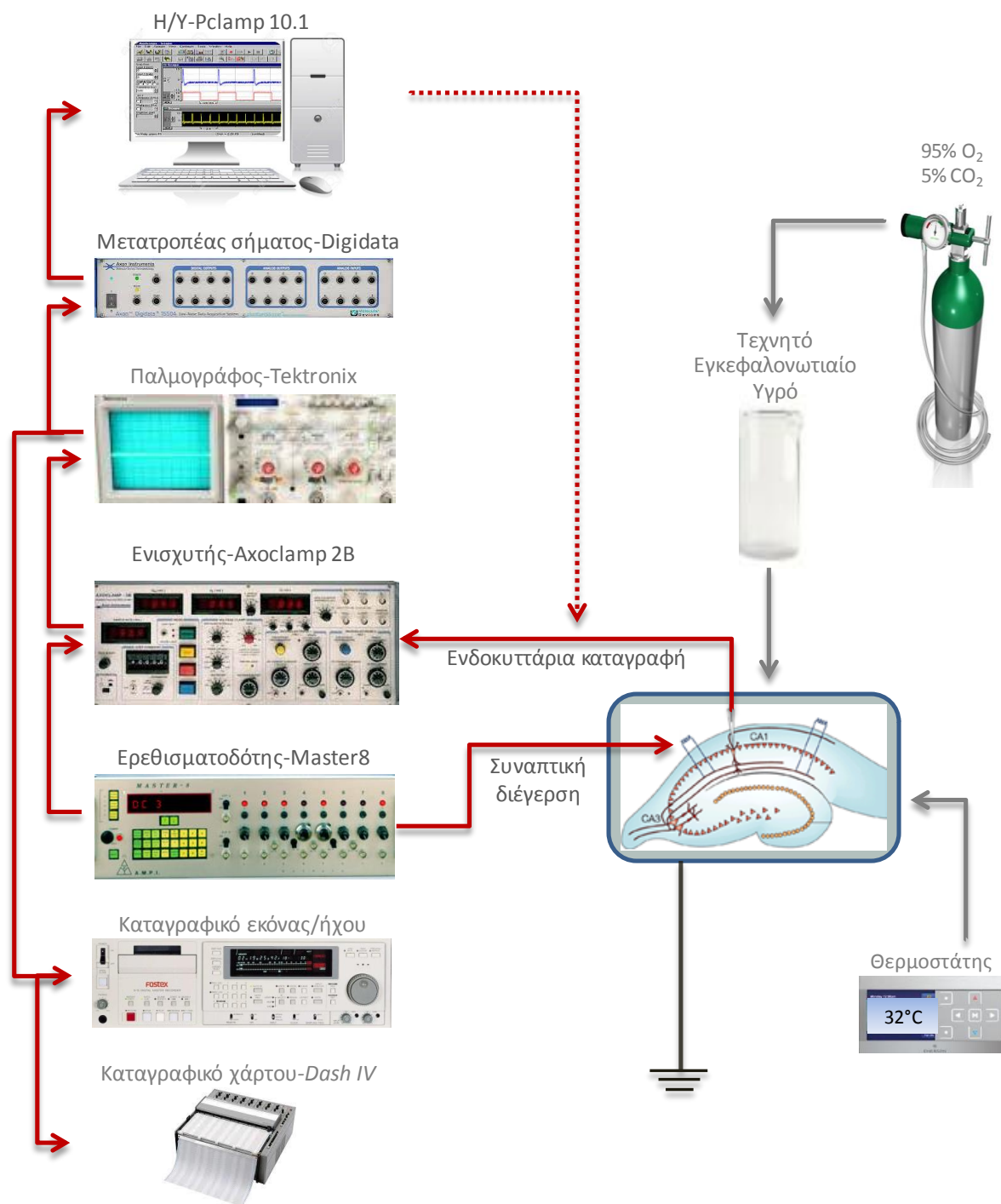
Οι τομές του ιστού τοποθετήθηκαν στο θάλαμο ηλεκτροφυσιολογικής καταγραφής, σταθεροποιημένες με διηθητικό χαρτί στην κατάλληλη έδρα, ενώ διαποτίζονταν με οξυγονούμενο TENEY θερμοκρασίας 32-33°C. Το οξυγονούμενο TENEY ήταν τοποθετημένο σε φιάλη χωρητικότητας 500ml, και διοχετεύονταν προς την έδρα καταγραφής μέσω ελαστικού σωλήνα. Προκειμένου το TENEY να αποκτήσει την κατάλληλη θερμοκρασία, ο ελαστικός σωλήνας περιελίσσονταν πρώτα μέσα στον εσωτερικό θάλαμο του συστήματος καταγραφής, ο οποίος περιείχε νερό θερμοκρασίας 33°C. Το σύστημα καταγραφής έφερε επιπλέον μικροχειριστές για την τοποθέτηση των ηλεκτροδίων στη CA1 περιοχή του υποκάμπου και πηγή ψυχρού φωτισμού (για την προστασία των τομών από υπερθέρμανση) για την οπτικοποίηση του ιστού. Το όλο σύστημα ήταν τοποθετημένο πάνω σε αντικραδαστική τράπεζα και περιβάλλονταν από κλωβό Faraday με σκοπό να εξουδετερώνεται ο εξωτερικός ηλεκτρικός θόρυβος.

Τα ηλεκτρόδια καταγραφής κατασκευάσθηκαν από γυάλινους μικροσωλήνες διαμέτρου 1,2mm με τη βοήθεια εξολκέα τύπου Brown-Flaming (μοντέλο P-97 Sutter Instruments

California) και είχαν αντίσταση $\approx 65\text{-}85\text{ M}\Omega$. Τα ηλεκτρόδια οδηγήθηκαν στο ανατομικό σημείο καταγραφής του ιστού (πυραμιδική στιβάδα της περιοχής CA1) με τη βοήθεια μικροσκοπίου Nikon. Οι ηλεκτρικοί παλμοί παράγονταν με ερεθισματοδότη (Master-8 A.M.P.I) και ενισχύθηκαν με ενισχυτή τύπου Axoclamp 2B (Axon Instruments Inc.). Η προβολή του ενισχυμένου σήματος έγινε σε αναλογικό παλμογράφο (HAMEG HM-305) με σκοπό τη συνεχή παρακολούθηση των αποκρίσεων του δυναμικού της μεμβράνης. Το σήμα μετατράπηκε σε αναλογικό με μετατροπέα σήματος (αναλογικού-ψηφιακού και αντίστροφα, Digidata 1200, Axon Instruments). Για την πρόσληψη και ανάλυση δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα pCLAMP 5.03 και pCLAMP 10.1 (Axon Instruments), αντίστοιχα. Τα πειραματικά αποτελέσματα αποτυπώνονταν σε καταγραφικό χαρτί (Astromed, DASH IV, Model XL). Αποθήκευση του αναλογικού σήματος πραγματοποιήθηκε με καταγραφέα εικόνας-ήχου (DAT recorder). Όλα τα δεδομένα λήφθηκαν, καταγράφηκαν, αποθηκεύτηκαν και αναλύθηκαν με τη βοήθεια προσωπικού Η/Υ. Μετασυναπτικά δυναμικά προκλήθηκαν μετά από διέγερση των παράπλευρων ινών του Schaffer με ηλεκτρόδιο ερεθισμού τοποθετημένου σε απόσταση $500\mu\text{m}$ από το ηλεκτρόδιο καταγραφής (Εικ. 20).

2.1.9. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα της μελέτης εκφράσθηκαν ως ο μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα μέσου όρου (Standard Error of the Mean, SEM). Για τη σύγκριση μεταξύ των μέσων όρων των τιμών χρησιμοποιήθηκε το student's t-test. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίσθηκε ως $p < 0,05$. Σε όλες τις περιπτώσεις ως n καθορίσθηκε ο αριθμός των παρατηρήσεων.



Εικόνα 20. Απεικόνιση πειραματικής διάταξης και συνδεσμολογίας του κυκλώματος που χρησιμοποιήθηκε για τις ενδοκυττάριας καταγραφές σε συνθήκες καθήλωσης ρεύματος. Ο θάλαμος καταγραφής αντιπροσωπεύεται σχηματικά από το ζωντανό ιστό. Στη CA1 στιβάδα βρίσκεται τοποθετημένο το ηλεκτρόδιο καταγραφής, η θερμοκρασία του ιστού διατηρείται σταθερή με θερμοστάτη. Το αέριο μίγμα O₂/CO₂ οξυγονώνει το τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό (τεχνητό ENY). Το σήμα που καταγράφεται ενισχύεται από τον ενισχυτή Axoclamp 2B με ενσωματωμένο headstage. Ως ερεθισματοδότης χρησιμοποιείται ο Master 8. Το σήμα παρακολουθείται σε παλμογράφο και μεταφέρεται μετά την ψηφιακή μετατροπή του σε Η/Υ.

2.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 48 πειραματόζωα. Το πλήθος των ζώων που χρησιμοποιήθηκαν σε διαφορετικά πρωτόκολλα παρουσιάζεται στον πίνακα 3.

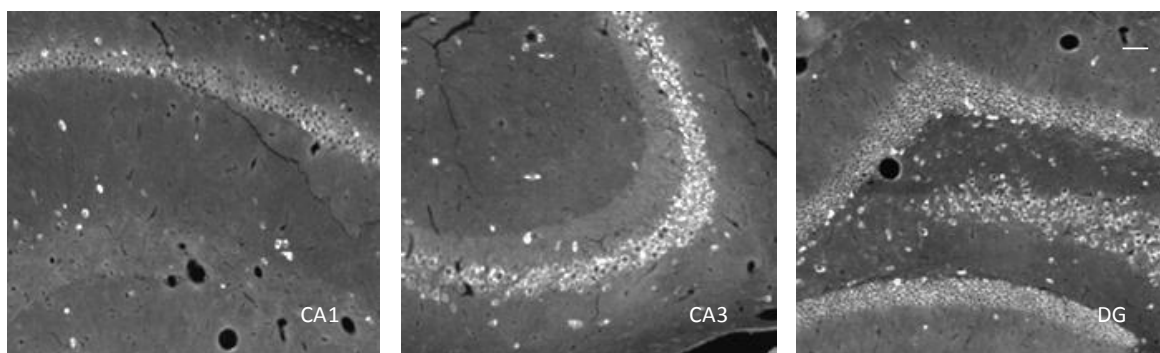
Πίνακας 3. Πλήθος πειραματόζώων χρησιμοποιηθέντων σε πρωτόκολλα της μελέτης.

ν	IHC με διήθηση	IHC με εμβάπτιση	H/Φ	H/Φ & IHC
Φυσιολογικός ορός	10	8	9	4
Φεντανύλη	5	4	4	4
Σύνολο	15	12	13	8

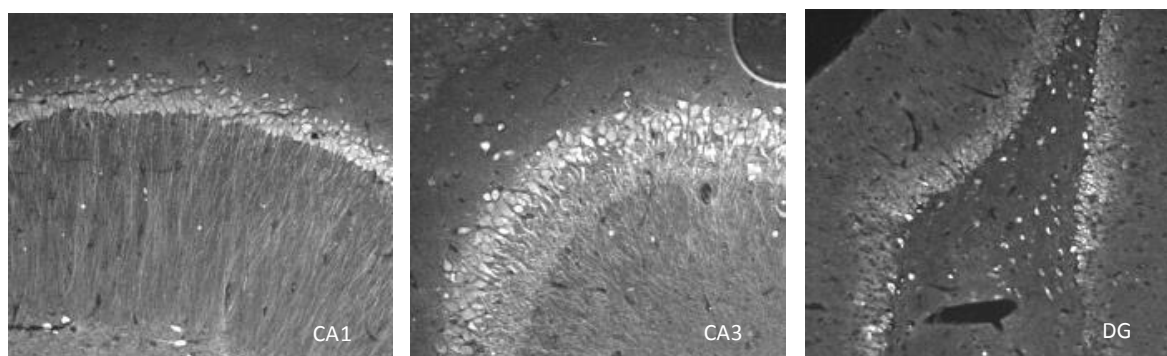
2.2.1 Επίδραση της φεντανύλης στον εντοπισμό των των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων.

Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση της φεντανύλης στο πλήθος των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοϊστοχημείας σε τομές υποκάμπου ακολουθώντας δύο μεθόδους μονιμοποίησης. Ο στόχος της χρησιμοποίησης των δύο μεθόδων ήταν να συγκριθεί η μονιμοποίηση με εμβάπτιση με την μέθοδο αναφοράς μονιμοποίησης με ενδοκαρδιακή έγχυση. Έτσι, σε μία αρχική σειρά πειραμάτων, η μονιμοποίηση του ιστού έγινε με διαπότισή του κατόπιν ενδοκαρδιακής έγχυσης παραφορμαλδεΰδης (Εικ. 21Α). Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο αυτή, παρατηρήθηκε χρώση νευρώνων σε όλες τις στιβάδες όλων των περιοχών του υποκάμπου. Η εικόνα του ιστού ήταν καθαρή, το σήμα ήταν οξύ και τα περιγράμματα των κυττάρων ήταν σαφή. Επίσης, τα περιγράμματα των αγγείων του ιστού φαίνονταν ξεκάθαρα στην εικόνα, καθώς αυτά αποτελούσαν τον πρώτο αγωγό από τον οποίο διήλθε το μέσον μονιμοποίησης πριν διηθήσει τον υπόλοιπο ιστό. Στις τομές υποκάμπου που μονιμοποιήθηκαν με εμβάπτιση, τα περιγράμματα των κυττάρων διακρίνονταν επίσης με σαφήνεια. Το σήμα εντός του κυττάρου ήταν σαφές και οξύ υποδηλώνοντας άρτια μονιμοποίηση του ιστού. Ωστόσο, η εικόνα του παρεγχύματος δεν ήταν απόλυτα σαφής, ενώ, σε αντίθεση με τη μονιμοποίηση με ενδοκαρδιακή έγχυση, τα περιγράμματα των αγγείων δεν διατηρούνταν (Εικ. 21Β).

A ΕΝΔΟΚΑΡΔΙΑΚΗ ΕΓΧΥΣΗ



B ΕΜΒΑΠΤΙΣΗ



Εικόνα 21. Ανοσοϊστοχημική έκφραση του GABA σε τομές του ραχιαίου υποκάμπου με διαφορετικές μεθόδους μονιμοποίησης. **A.** Μονιμοποίηση με ενδοκαρδιακή έγχυση μονιμοποιητικού. **B.** Μονιμοποίηση με εμβάπτιση φέτας υποκάμπου πάχους 500 μm σε μονιμοποιητικό διάλυμα. (Pirpidou et al., 2013, τροποποιημένη).

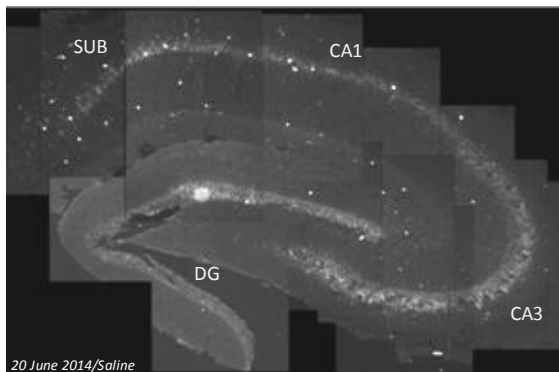
Με βάση τα παραπάνω, επιβεβαιώνεται ότι στη μονιμοποίηση με εμβάπτιση διατηρείται άρτια η κυτοαρχιτεκτονική του ιστού και η ποιότητα των σημασμένων κυττάρων με αποτέλεσμα η εντόπιση των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων με αυτή τη μέθοδο μονιμοποίησης να είναι συγκρίσιμη με τη μέθοδο αναφοράς δηλαδή τη μονιμοποίηση με ενδοκαρδιακή έγχυση.

Στην Εικ. 22 παρουσιάζονται ανακατασκευασμένες τομές του ραχιαίου και του κοιλιακού υποκάμπου ακολουθώντας τις δύο μεθόδους μονιμοποίησης. Ο ιστός που μονιμοποιείται με εμβάπτιση προέρχεται από φέτες πάχους 500 μm οι οποίες κόπηκαν κάθετα στον επιμήκη άξονα του υποκάμπου μετά την εκτομή του από τον εγκέφαλο. Έτσι, η διάταξη των περιοχών και των στιβάδων διατηρήθηκε παρόμοια μεταξύ της ραχιαίας και της κοιλιακής μοίρας καθιστώντας ευχερή τη μεταξύ τους σύγκριση. Αντίθετα, στην μονιμοποίηση με ενδοκαρδιακή

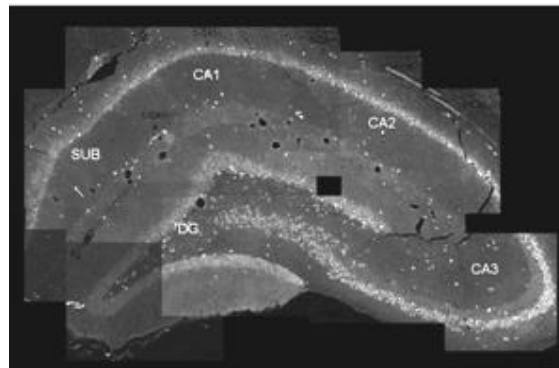
A

ΡΑΧΙΑΙΟΣ

ΕΜΒΑΠΤΙΣΗ



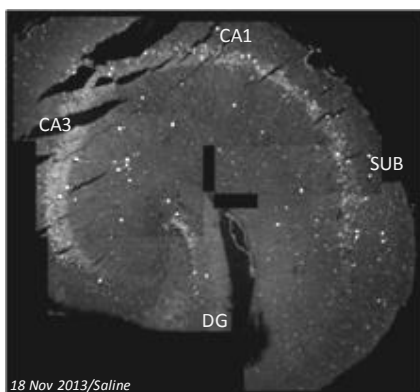
ΕΝΔΟΚΑΡΔΙΑΚΗ ΕΓΧΥΣΗ



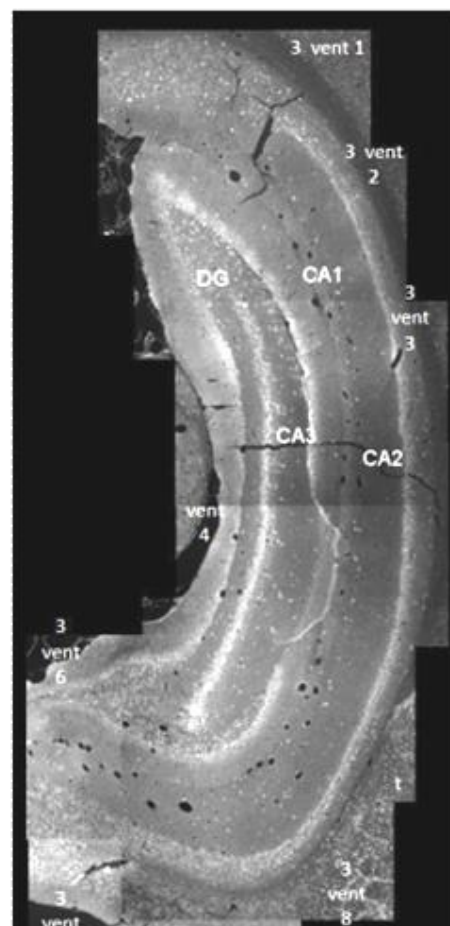
B

ΚΟΙΛΙΑΚΟΣ

ΕΜΒΑΠΤΙΣΗ

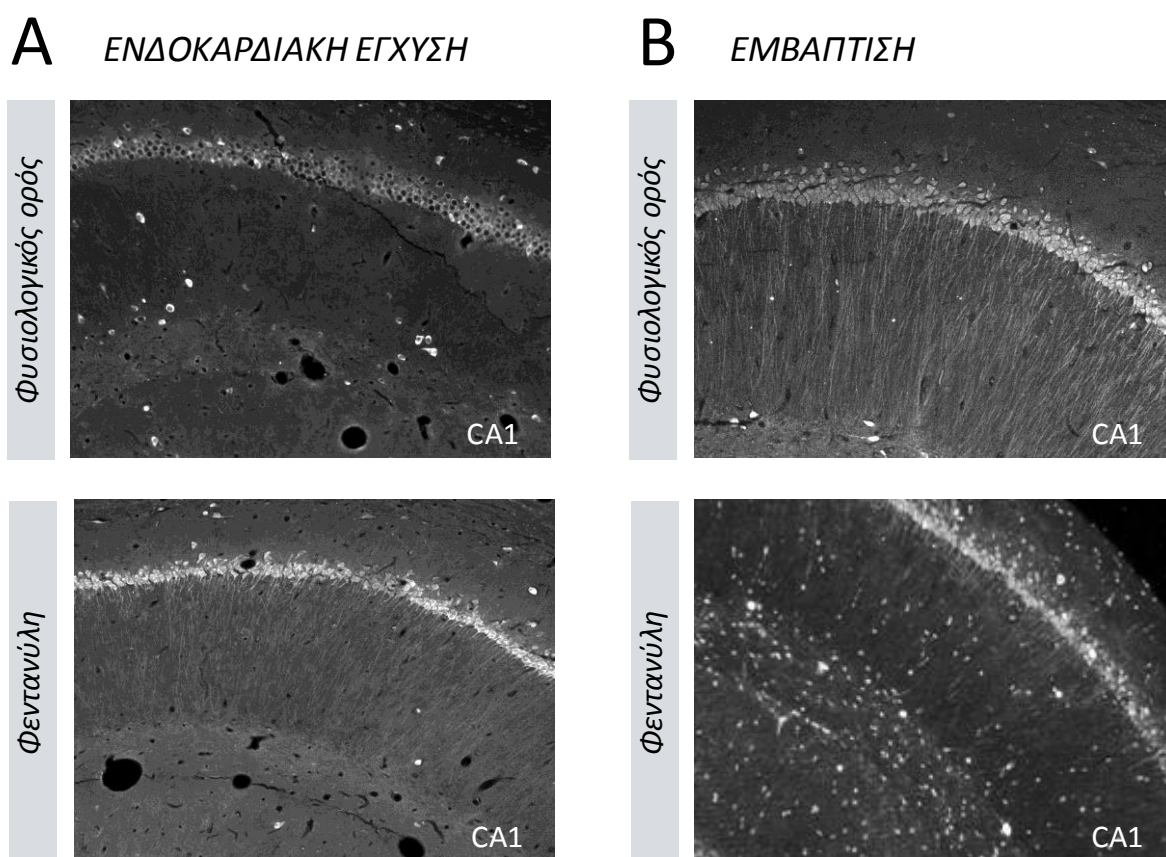


ΕΝΔΟΚΑΡΔΙΑΚΗ ΕΓΧΥΣΗ



Εικόνα 22. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός του GABA σε ανακατασκευασμένες τομές του ραχιαίου (A) και του κοιλιακού (B) ιπποκάμπου με διαφορετικές μεθόδους μονιμοποίησης.

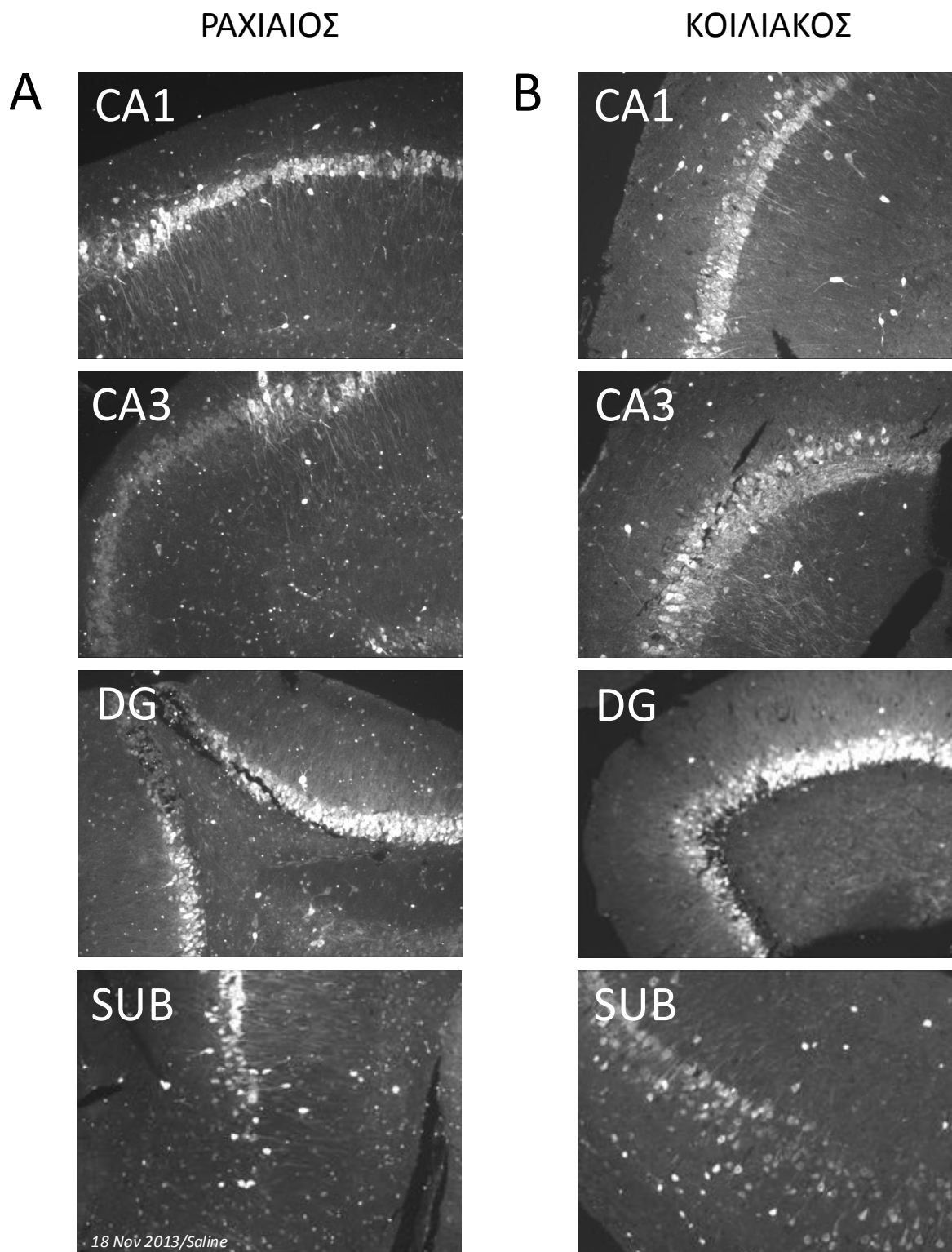
έγχυση, κόπηκαν μετωπιαίες τομές του εγκεφάλου με αποτέλεσμα να υπάρχει διαφοροποίηση, μεταξύ της ραχιαίας και της κοιλιακής μοίρας, στη διάταξη των περιοχών και των στιβάδων του υποκάμπου λόγω της καμπυλωτής δομής του στον εγκέφαλο καθιστώντας δυσχερή τη σύγκριση μεταξύ των δύο μοιρών. Έτσι, αρχικά πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοϊστοχημικού εντοπισμού του GABA, μετά την *in vivo* χορήγηση φυσιολογικού ορού ή φεντανύλης, με τις δύο μεθόδους μονιμοποίησης (Εικόνα 23). Στη συνέχεια, αφού διαπιστώθηκε ότι οι δύο μέθοδοι δίνουν συγκρίσιμα αποτελέσματα, και με δεδομένη την ανάγκη λειτουργικού ελέγχου της GABAεργικής αναστολής σε φέτες, τα υπόλοιπα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε τομές υποκάμπου μονιμοποιημένες με εμβάπτιση.



Εικόνα 23. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός του GABA στη CA1 περιοχή του ραχιαίου υποκάμπου με διαφορετικές μεθόδους μονιμοποίησης. **Α.** Μονιμοποίηση με ενδοκαρδιακή έγχυση: τα χρωσμένα κύτταρα εμφανίζουν άρτια μικροσκοπική δομή/μορφολογία, έντονο σήμα χρώσης, τα δε περιγράμματα των αγγείων του ιστού διαγράφονται σαφώς. **Β.** Μονιμοποίηση με εμβάπτιση: η μορφολογία των κυττάρων διακρίνεται σαφώς, το σήμα χρώσης είναι έντονο, και ο ιστός εμφανίζει άρτια κυτταρο-αρχιτεκτονική δομή⁸⁹.

Παραδείγματα ανοσοϊστοχημικού εντοπισμού του GABA σε διαφορετικές περιοχές της ραχιαίας και της κοιλιακής μοίρας του υποκάμπου παρουσιάζονται στην Εικ. 24. Ανοσοθετικοί στο GABA νευρώνες εντοπίστηκαν σε όλες τις στιβάδες του αμμωνείου κέρατος και της οδοντωτής έλικας. Στην CA1 περιοχή ανοσοθετικοί στο GABA νευρώνες εντοπίστηκαν στην πυραμιδική στιβάδα, λιγότεροι στη στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων, στη βοθριώδη μοριακή και στην ακτινωτή στιβάδα, ενώ χαρακτηριστικός ήταν ο εντοπισμός νευρώνων στο όριο μεταξύ ακτινωτής και βοθριώδους-μοριακής στιβάδας. Στην CA3 περιοχή ο εντοπισμός των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων ακολουθούσε το ίδιο μοτίβο με τη CA1 περιοχή. Μεγάλος αριθμός ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων εντοπίστηκε επίσης στη μοριακή και ακτινωτή στιβάδα του υποθέματος με χαρακτηριστική διασπορά των νευρώνων στις στιβάδες αυτές. Στην οδοντωτή έλικα μικρός αριθμός νευρώνων εντοπίστηκε πολύμορφη στιβάδα, ενώ μεγαλύτερος αριθμός ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων εντοπίστηκε στην κοκκώδη και μοριακή στιβάδα. Σε ορισμένες τομές της οδοντωτής έλικας χαρακτηριστικός ήταν ο εντοπισμός νευρώνων στην εσωτερική πλευρά της στιβάδας των κοκκωδών κυττάρων.

Η πυραμιδική στιβάδα του αμμωνείου κέρατος και η στιβάδα των κοκκωδών κυττάρων της οδοντωτής έλικας ενίοτε παρουσίαζαν μεγάλη ανοσοθετικότητα εν είδη σημείων (puncta) σε δομές πλέον των ανοσοθετικών στο GABA κυτταρικών σωμάτων. Αυτά τα σημεία ανοσοθετικότητας θα μπορούσουν να αποδοθούν σε αποφύσεις ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων που περιστοιχίζουν τα ανοσοαρνητικά στο GABA περικάρυα πυραμιδικών νευρώνων. Επιπλέον, σε ορισμένες τομές ανοσοθετικότητα παρουσίαζαν και αποφύσεις οι οποίες διέσχιζαν το μήκος της ακτινωτής στιβάδας, από την πυραμιδική μέχρι την βοθριώδη-μοριακή στιβάδα. Η ταυτότητα αυτών των αποφύσεων δεν είναι γνωστή καθώς το οπτικό μικροσκόπιο δεν δίνει τη δυνατότητα διαχωρισμού μεταξύ αξόνων και δενδριτών που φέρουν σήμα ανοσοθετικότητας στο GABA. Κατά αναλογία με τις κύριες στιβάδες, είναι πιθανόν τα σημεία αυτά ανοσοθετικότητας να ανήκουν σε αποφύσεις GABAεργικών νευρώνων γύρω από κορυφαίους δενδρίτες πυραμιδικών νευρώνων ή δενδρίτες άλλων GABAεργικών νευρώνων. Δεν μπορεί να αποκλεισθεί η περίπτωση κάποια από τα σημεία ανοσοθετικότητας να οφείλονται σε μη ειδική σύνδεση του αντισώματος στον ιστό.

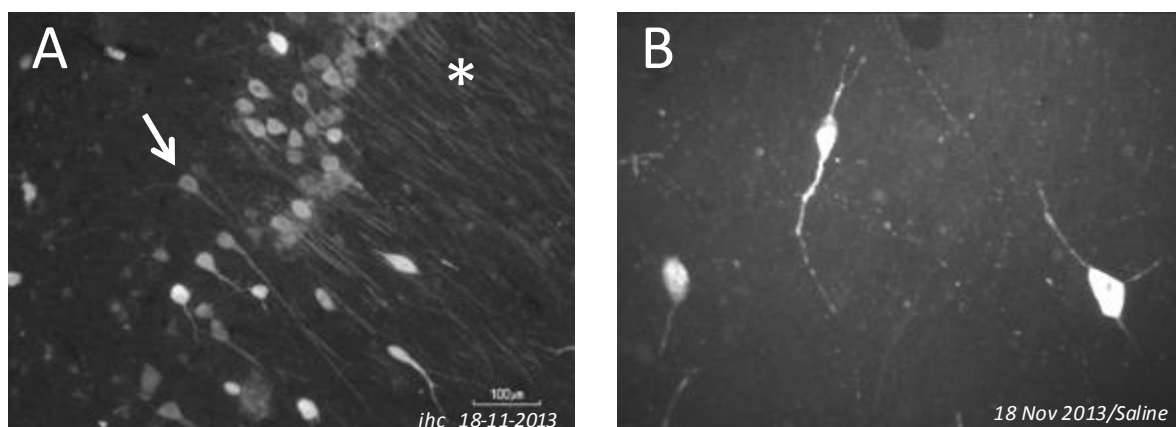


Εικόνα 24. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός του GABA σε διαφορετικές περιοχές του υποκάμπου. Α. Ραχιαίος υποκάμπος. **Β.** Κοιλιακός υποκάμπος. Παρατηρείται έντονος ανοσοφθορισμός σε όλες τις περιοχές που απαρτίζουν τη δομή του υποκάμπου (Μεγέθυνση x20).

Σύνηθες χαρακτηριστικό των τομών τόσο της ραχιαίας όσο και της κοιλιακής μοίρας του υποκάμπου ήταν ένα πυκνό δίκτυο ινών αποτελούμενο από σημεία ανοσοθετικότητας στο GABA. Το δίκτυο αυτό εντοπιζόταν εσωτερικά της πυραμιδικής στιβάδας της περιοχής CA3 και όριζε τη διάφανη στιβάδα (stratum lucidum; Εικ. 24).

Στην Εικ. 25Α παρουσιάζεται η περιοχή του υποθέματος, στο όριο με την CA1 περιοχή, ως παράδειγμα σημείων ανοσοθετικότητας. Διακρίνονται ανοσοθετικοί στο GABA νευρώνες, περικάρυα ανοσοαρνητικά στο GABA (λευκό βέλος) και χαρακτηριστικές λεπτές αποφύσεις που πορεύονται προς την ακτινωτή στιβάδα (αστερίσκος).

Αν και δεν έγινε προσπάθεια μέτρησης του μεγέθους του κυτταρικού σώματος, οι ανοσοθετικοί στο GABA νευρώνες παρουσίαζαν περικάρυο ποικίλου μεγέθους και πολύ συχνά έφεραν κυτταρικές αποφύσεις στο οπτικό πεδίο της τομής (Εικ. 25B). Η παρατήρηση αυτή βρίσκεται σε συμφωνία με την αξιοσημείωτη πολυμορφία των GABAεργικών νευρώνων ανάλογα με τη θέση τους, τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των δενδριτών και των αξόνων τους καθώς και την ανοσοθετικότητά τους σε ασβεστιο-δεσμετικές πρωτεΐνες και πεπτιδία^{60,20}.

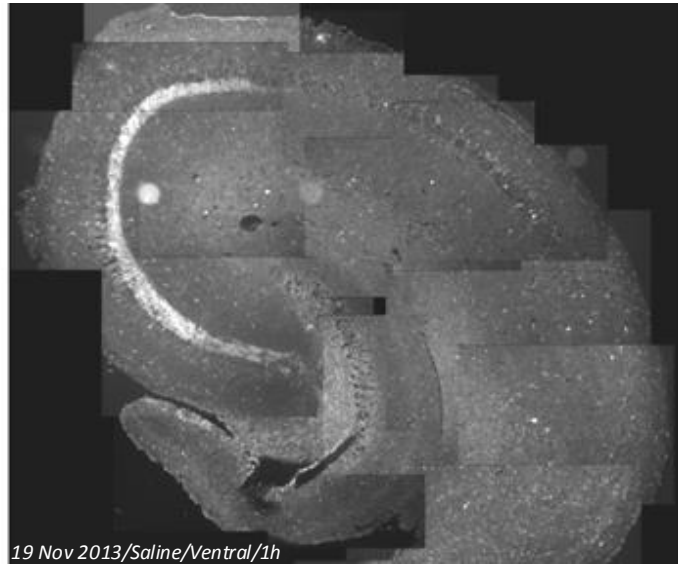


Εικόνα 25. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός σε κυτταρικά σώματα και παρέγχυμα του υποκάμπου. Παρουσιάζεται περιοχή του υποθέματος στο όριο με την περιοχή CA1. **A.** Εντοπισμός ανοσοθετικών αλλά και ανοσοαρνητικών (βέλος) στο GABA νευρώνων καθώς και αποφύσεις με σημεία ανοσοθετικότητας (αστερίσκος, μεγέθυνση x20) **B.** Ανοσοθετικοί στο GABA νευρώνες διαφορετικού μεγέθους με έντονη χρώση και αποφύσεις εκπορευόμενες από το κυτταρικό σώμα. Χαρακτηριστική είναι η διαφορετική ένταση σήματος (μεγέθυνση x40).

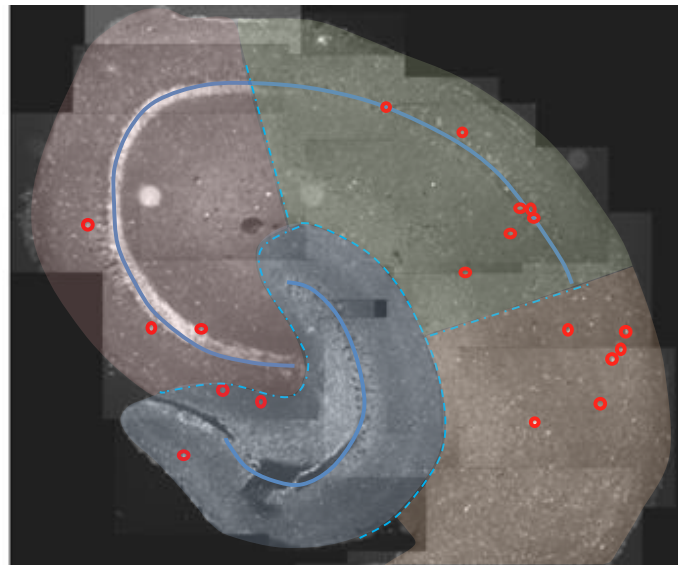
Προκειμένου να εκτιμηθεί η τοπογραφική και ποσοτική κατανομή των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων σε τομές του ραχιαίου και του κοιλιακού υποκάμπου, καθώς και η επίδραση της φεντανύλης σε αυτές, πραγματοποιήθηκε καταμέτρησή τους ακολουθώντας την διαδικασία που εμφανίζεται στις Εικ. 26 και 27. Αρχικά έγινε φωτογράφιση της τομής με αντικειμενικό φακό μεγέθυνσης x20, ώστε να εξασφαλισθεί ικανοποιητική ανάλυση των εικόνων, και ακολούθησε η ανακατασκευή της τομής από τις επιμέρους εικόνες (Εικ. 26Α). Στη συνέχεια, επισημάνθηκαν, με τη βοήθεια μικροσκοπίου φθορισμού, οι ανοσοθετικοί στο GABA νευρώνες οι οποίοι και σημειώθηκαν στην ψηφιακή μορφή της ανακατασκευασμένης τομής (κόκκινοι κύκλοι, Εικ. 26Β). Στην ίδια ψηφιακή ανακατασκευασμένη τομή σχεδιάσθηκε, επίσης, το περίγραμμα της πυραμιδικής στιβάδας CA1-CA3 και της στιβάδας των κοκκωδών κυττάρων της DG (συμπαγής γραμμή Εικ. 26Β), καθώς και το περίγραμμα της σχισμής του υποκάμπου (στικτή γραμμή Εικ. 26Β). Η κάθε τομή χωρίσθηκε σε τέσσερις περιοχές: CA1, CA3, SUB, DG. Η περιοχή CA1 οριοθετήθηκε από τις γειτονικές της περιοχές CA3 και SUB με δύο ακτινωτές γραμμές, ενώ το όριο της προς την οδοντωτή έλικα αποτέλεσε η σχισμή του υποκάμπου. Η γραμμή οριοθέτησης μεταξύ CA1 και SUB διερχόταν από το σημείο διακοπής των πυκνά παρατεταγμένων νευρώνων της πυραμιδικής στιβάδας, ενώ αυτή μεταξύ CA1 και CA3 από το σημείο έναρξης της διαυγούς στιβάδας. Το όριο μεταξύ των περιοχών CA3 και DG ορίσθηκε από γραμμή που σχεδιάσθηκε κατά μήκος του χείλους του εσωτερικού και του εξωτερικού πτερυγίου της οδοντωτής έλικας και του άκρου της πυραμιδικής στιβάδας της περιοχής CA3 (Εικ. 26Β, 26Γ, διάστικτη γραμμή).

Εικόνα 26. Καταμέτρηση GABAεργικών νευρώνων σε τομές υποκάμπου. Α. Ανακατασκευασμένη εικόνα του κοιλιακού υποκάμπου από φωτογραφίες που ελήφθησαν σε μικροσκόπιο φθορισμού (μεγέθυνση x20). **Β.** Σήμανση των νευρώνων (κόκκινοι κύκλοι) πραγματοποιηθείσα, με τη βοήθεια μικροσκοπίου φθορισμού, σε εκτυπωμένη ανακατασκευασμένη εικόνα. Συμπαγής γραμμή χρησιμοποιήθηκε για την επισήμανση του περιγράμματος της πυραμιδικής στιβάδας στις περιοχές CA1, CA3 και SUB και της στιβάδας κοκκιωδών κυττάρων στην DG. Στικτή γραμμή χρησιμοποιήθηκε για την επισήμανση του περιγράμματος της σχισμής του υποκάμπου και των ορίων των διαφόρων περιοχών του. Με έγχρωμη σκίαση σημαίνονται οι περιοχές που οριοθετούνται από τις συμπαγείς και στικτές γραμμές. **Γ.** Σχηματική αναπαράσταση της θέσης των νευρώνων στις διάφορες περιοχές του υποκάμπου που προκύπτει μετά από απομάκρυνση της ανακατασκευασμένης εικόνας. Στις γωνίες του περιγεγραμμένου τετραγώνου αναγράφεται ο αριθμός των καταμετρηθέντων νευρώνων σε κάθε περιοχή και στιβάδα.

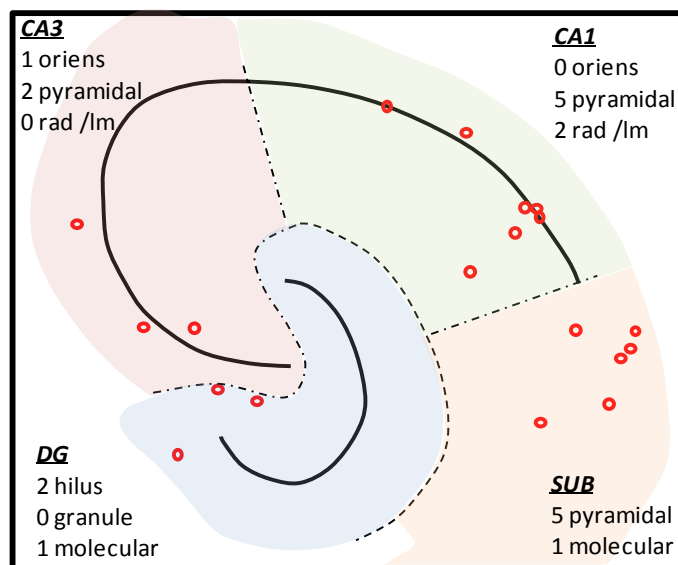
A



B



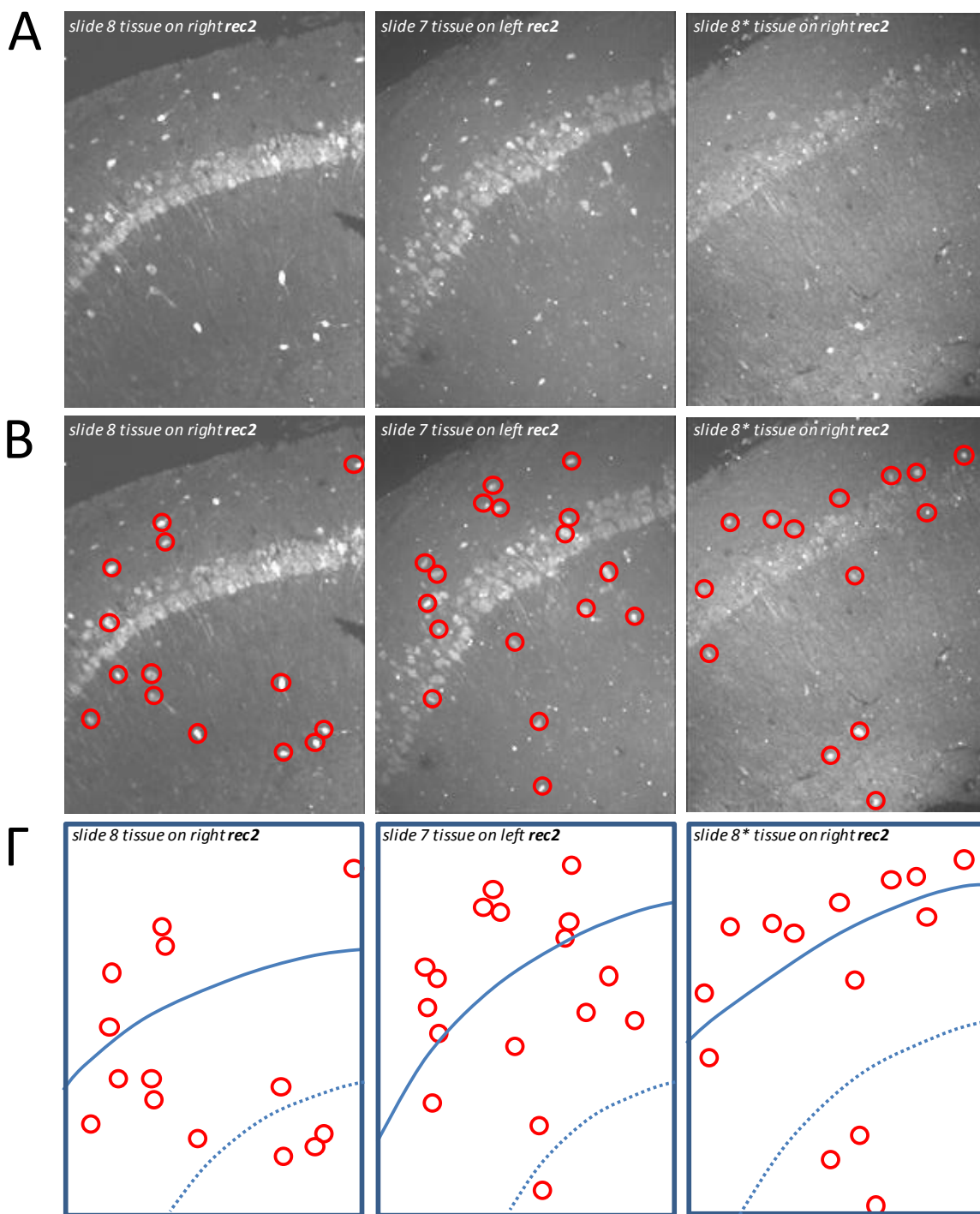
Γ



Δεν έγινε προσπάθεια διαχωρισμού της περιοχής CA2 λόγω των δυσδιάκριτων ορίων της, αλλά και από το γεγονός ότι ο μικρός αριθμός νευρώνων δεν επαρκούσε για στατιστική ανάλυση. Μετά την περιγραφείσα οριοθέτηση, προέκυψαν οι τέσσερις περιοχές της τομής οι οποίες εμφανίζονται έγχρωμες στην Εικ. 26Γ. Ακολούθησε καταμέτρηση των νευρώνων ανά περιοχή και στιβάδα. Στην καταμέτρηση των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων συμπεριελήφθησαν νευρώνες πλήρως χρωσμένοι και νευρώνες με μαύρο-άβαφο διακριτό πυρήνα στο κέντρο και χρωσμένο περικάρυο.

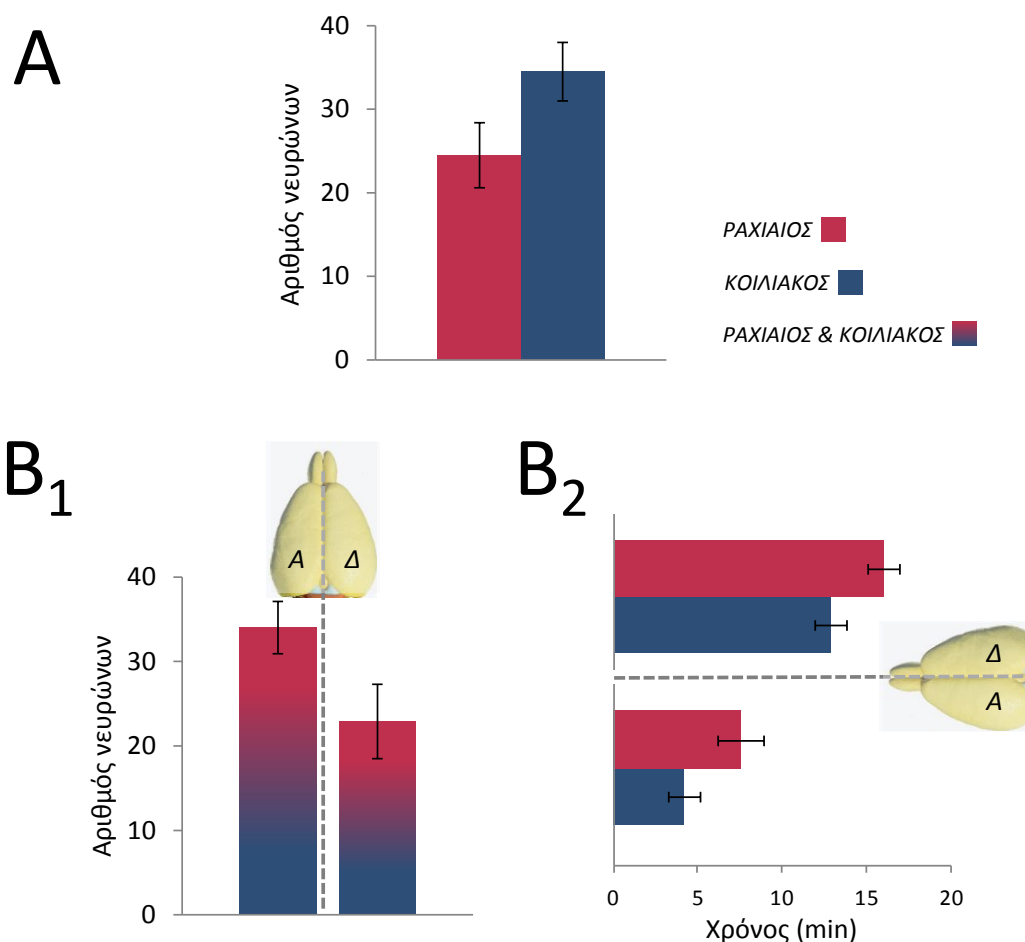
Στην Εικ. 27 παρουσιάζεται παράδειγμα καταμέτρησης νευρώνων στην CA1 περιοχή του ιπποκάμπου. Πρόκειται για τομή που προέρχεται από φέτα 500μm της κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου πειραματοζώου στο οποίο χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός. Η φέτα επώασθηκε σε TENY για 6,5 ώρες προκειμένου να πραγματοποιηθεί λειτουργικός έλεγχος της GABAεργικής αναστολής και κατόπιν μονιμοποιήθηκε και κόπηκε σε λεπτές τομές οι οποίες χρώσθηκαν ανοσοϊστοχημικά για GABA. Ακολούθησε καταμέτρηση των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων από την οποία προέκυψε παρόμοιος αριθμός μεταξύ των τομών υποδηλώνοντας αξιοπιστία της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Αρχικά έγινε σύγκριση του αριθμού των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων μεταξύ του ραχιαίου και του κοιλιακού ιπποκάμπου. Για το σκοπό αυτό καταμετρήθηκε ο συνολικός αριθμός νευρώνων κάθε μοίρας, δηλαδή συμπεριελήφθησαν όλες οι περιοχές (CA1, CA3, SUB, DG) των δύο εγκεφαλικών ημισφαιρίων όλων των ομάδων (0, 1, xh). Από την καταμέτρηση προέκυψε ότι ο αριθμός των νευρώνων του ραχιαίου ιπποκάμπου ($24,5 \pm 3,9$, $n=23$) είναι μικρότερος από αυτόν του κοιλιακού ($34,5 \pm 3,5$, $n=31$) χωρίς, όμως, η διαφορά να φθάνει σε στατιστική σημαντικότητα ($p=0,06$; Εικ. 28Α). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες σύμφωνα με τις οποίες το πλήθος των νευρώνων που εκφράζουν GAD mRNA⁵³ ή παρουσιάζουν ανοσοθετικότητα σε ασβεστιο-συνδεδεμένες πρωτεΐνες (παρβαλβουμίνη, καλβιδίνη) και πεπτίδια (σωματοστατίνη, συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου και αγγειοδραστικό εντερικό παράγοντα)^{82,83} είναι, γενικά, μεγαλύτερο στην κοιλιακή μοίρα του ιπποκάμπου, με ελάχιστες εξαιρέσεις σε ορισμένες στιβάδες.



Εικόνα 27. Καταμέτρηση ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων στη CA1 περιοχή του υποκάμπου. Α. Ανοσοθετικοί στο GABA νευρώνες σε γειτονικές τομές του υποκάμπου οι οποίες προέκυψαν από την ίδια φέτα πάχους 500μm. **Β.** Σήμανση των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων υπό μικροσκόπιο φθορισμού. **Γ.** Καταμέτρηση των χρωσμένων νευρώνων σε διαφορετικές στιβάδες της CA1 περιοχής. Με συνεχόμενη και σικτή γραμμή ορίζονται η πυραμιδική στιβάδα και το όριο μεταξύ ακτινωτής και βοθριώδους-μοριακής στιβάδας του υποκάμπου, αντίστοιχα.

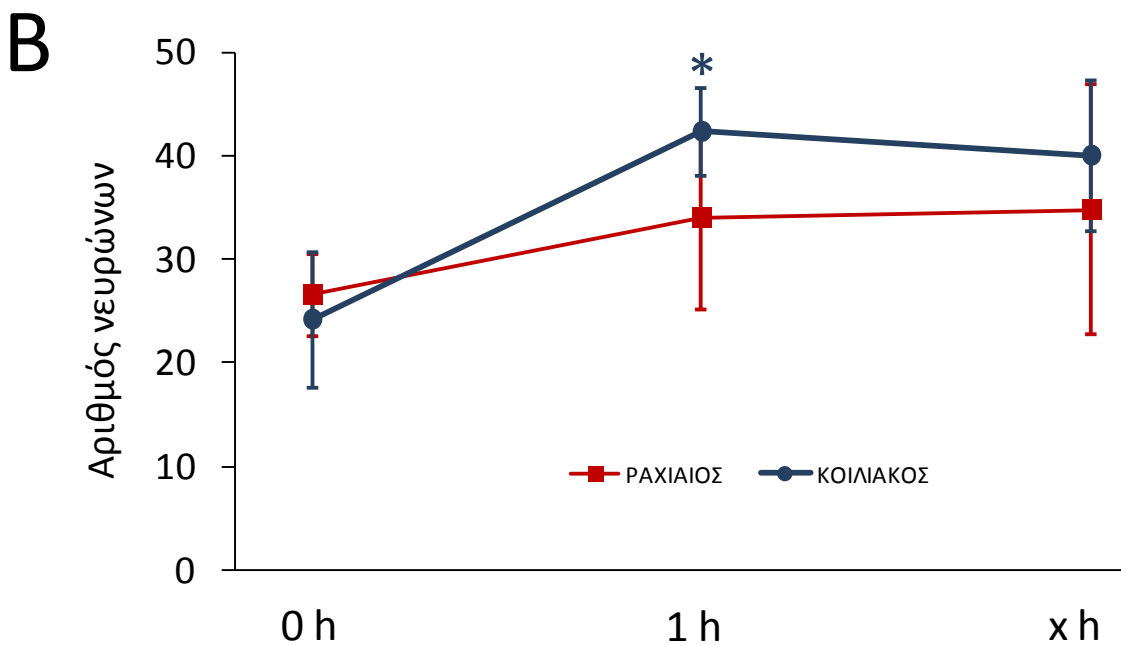
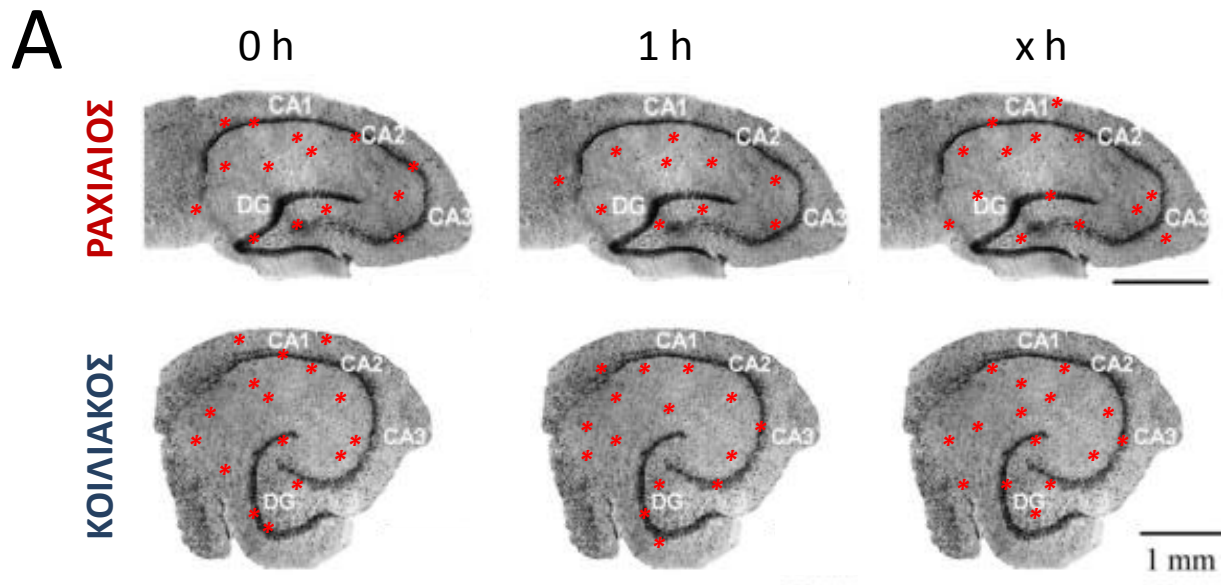
Ένα σημαντικό ερώτημα που προκύπτει κατά την προετοιμασία του ιστού για ηλεκτροφυσιολογική και ανοσοϊστοχημική μελέτη αφορά στη βιωσιμότητα των τομών από τη στιγμή του θυσιασμού του πειραματοζώου μέχρι την εμφάνισή τους στο μονιμοποιητικό διάλυμα. Προκειμένου να γίνει έλεγχος του ερωτήματος αυτού, διατηρήθηκε αυστηρή σειρά προετοιμασίας των τομών και χρονομετρήθηκαν τα στάδια προετοιμασίας τους. Έτσι, αρχικά



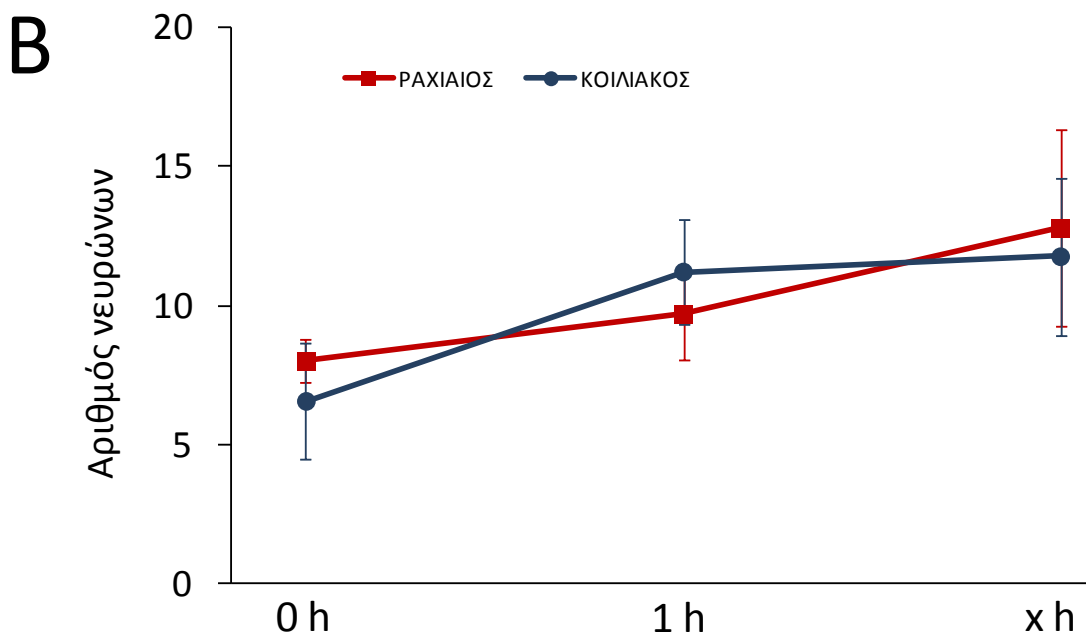
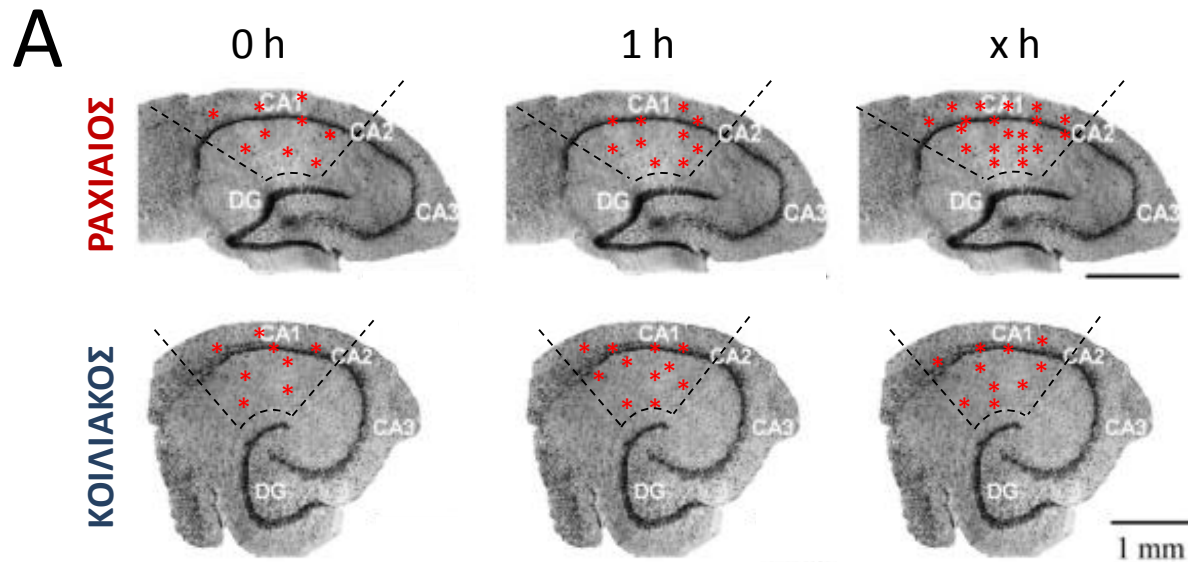
Εικόνα 28. Καταμέτρηση ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων σε ραχιαίο και κοιλιακό υπόκαμπο. Α. Ο κοιλιακός υπόκαμπος παρουσιάζει μεγαλύτερο, αλλά όχι στατιστικά σημαντικό, αριθμό νευρώνων έναντι του ραχιαίου. Στην καταμέτρηση νευρώνων της κάθε μοίρας (ραχιαία-κοιλιακή) συμπεριελήφθησαν όλες οι περιοχές (CA1, CA3, SUB, DG) των δύο εγκεφαλικών ημισφαιρίων όλων των ομάδων (0, 1, xh) ($p=0,06$). **B₁.** Μικρότερος αριθμός νευρώνων παρατηρείται σε τομές του δεξιού ημισφαιρίου, σε σχέση με το αριστερό, με διαφορά οριακής στατιστικής σημαντικότητας ($p=0,051$). **B₂.** Χρόνος που παρήλθε από τον θυσιασμό μέχρι την εμφάνιση των παρασκευασθέντων τομών σε μονιμοποιητικό διάλυμα.

παρασκευαζόταν ο ιππόκαμπος του αριστερού ημισφαίριου, ενώ το δεξί ημισφαίριο εμβάπτιζόταν σε οξυγωνούμενο TENY. Από το αριστερό ημισφαίριο, προετοιμαζόταν κατά προτεραιότητα τομές του κοιλιακού ($4,4 \pm 1,2 \text{ min}$) και κατόπιν του ραχιαίου ($7,5 \pm 1,3 \text{ min}$) ιπποκάμπου. Ακολουθούσε εκτομή του ιπποκάμπου από το δεξί ημισφαίριο και, κατά αναλογία με το αριστερό ημισφαίριο, προετοιμαζόταν τομές του κοιλιακού ($12,1 \pm 0,9 \text{ min}$) και μετά του ραχιαίου ($15,1 \pm 0,9 \text{ min}$) ιπποκάμπου (Εικ. 28B2). Επομένως, οι τομές του δεξιού ημισφαίριου κόπηκαν με καθυστέρηση 5-7 min σε σχέση με τις τομές του αριστερού ημισφαίριου. Είναι πιθανό η καθυστέρηση αυτή να επηρεάζει τη βιωσιμότητα του ιστού καθώς από τη σύγκριση του αριθμού των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων μεταξύ του αριστερού ($34,0 \pm 3,1$; $n=35$) και του δεξιού ($23,2 \pm 4,5$; $n=19$) ημισφαίριου προέκυψε στατιστική διαφορά οριακής σημαντικότητας (Εικ. 28B1; $p=0,051$). Σημειώνεται ότι στην καταμέτρηση του συνολικού αριθμού των νευρώνων των τομών του αριστερού και δεξιού ημισφαίριου της Εικ. 28B1 συμπεριελήφθησαν όλες οι περιοχές (CA1, CA3, SUB, DG) όλων των ομάδων (0, 1, xh).

Το προφίλ των καταμετρηθέντων νευρώνων που παρουσίαζαν ανοσοθετικότητα στο GABA στις τρεις ομάδες 0, 1 και xh παρουσιάζεται στις Εικ. 29 και 30, για το σύνολο των περιοχών (CA1, CA3, SUB, DG) και για την περιοχή CA1, αντίστοιχα. Με κόκκινους αστερίσκους σημειώνονται ενδεικτικές θέσεις εντοπισμού των νευρώνων σε όλες τις περιοχές (Εικ. 29A), ενώ ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στην περιοχή CA1 (οριζόμενη από στικτές γραμμές, Εικ. 30A) λόγω της λειτουργικής αναστολής που εξετάσθηκε στην περιοχή αυτή. Στο σύνολο των περιοχών, ο αριθμός των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων βρέθηκε να κατανέμεται στη ραχιαία (P) και στην κοιλιακή (K) μοίρα του ιπποκάμπου ως εξής: 0h: (P) $26,6 \pm 6,5$, $n=7$, (K) $24,2 \pm 6,5$, $n=6$; 1h: (P) $34,0 \pm 8,9$, $n=5$, (K) $42,3 \pm 4,7$, $n=9$; xh: (P) $34,8 \pm 12,1$, $n=5$, (K) $40,0 \pm 7,3$, $n=11$. Στην περιοχή CA1, ο αριθμός των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων βρέθηκε να κατανέμεται στη ραχιαία (P) και στην κοιλιακή (K) μοίρα του ιπποκάμπου ως εξής: 0h: (P) $8,0 \pm 0,8$, $n=6$, (K) $6,6 \pm 2,1$, $n=8$; 1h: (P) $9,7 \pm 1,6$, $n=10$, (K) $12,2 \pm 1,9$, $n=10$; xh: (P) $12,8 \pm 3,5$, $n=6$, (K) $11,8 \pm 2,8$, $n=14$. Αν και στατιστικά σημαντική διαφορά υπήρξε μόνο στον κοιλιακό ιππόκαμπο μεταξύ των ομάδων 0h και 1h ($p<0,05$), παρατηρήθηκε, γενικά, μεγαλύτερος αριθμός νευρώνων στις 1 και xh έναντι της 0h.



Εικόνα 29. Σχηματική απεικόνιση του συνόλου των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων σε τομές της ραχιαίας και κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου. Α. Ενδεικτικές θέσεις εντοπισμού ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων (κόκκινοι αστερίσκοι) στη ραχιαία και κοιλιακή μοίρα σε τρεις ομάδες τομών ανάλογα με τον χρόνο παραμονής τους σε TENY (0h, 1h, xh). **Β.** Γραφική παράσταση των μέσων όρων του αριθμού των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων της ραχιαίας και κοιλιακής μοίρας των τριών ομάδων που εμφανίζονται στο Α. Στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρείται μόνο στον κοιλιακό ιππόκαμπο μεταξύ των ομάδων 0h και 1h ($p < 0,05$).



Εικόνα 30. Σχηματική απεικόνιση του συνόλου των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων της CA1 περιοχής της ραχιαίας και κοιλιακής μοίρας του υποκάμπου. Α. Ενδεικτικές θέσεις εντοπισμού ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων (κόκκινοι αστερίσκοι) στη ραχιαία και κοιλιακή μοίρα σε τρεις ομάδες τομών ανάλογα με τον χρόνο παραμονής τους σε TENY (0h, 1h, xh). Οι στικτές γραμμές οριοθετούν την CA1 περιοχή. **Β.** Γραφική παράσταση των μέσων όρων του αριθμού των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων της ραχιαίας και κοιλιακής μοίρας των τριών ομάδων που εμφανίζονται στο Α. Δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων.

Η επίδραση της φεντανύλης στο πλήθος των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων ελέγχθηκε αρχικά στο σύνολο των τομών, δηλαδή συγκρίθηκαν τομές του υποκάμπου (συμπεριλαμβανομένων όλων των περιοχών, CA1, CA3, SUB, DG της ραχιαίας και της κοιλιακής μοίρας, του αριστερού και δεξιού ημισφαιρίου των τριών ομάδων 0, 1 και xh) που προήλθαν από πειραματόζωα στα οποία είχε προηγηθεί *in vivo* χορήγηση φυσιολογικού ορού έναντι φεντανύλης (Πίνακας 4; Εικ. 31A, γκρι στήλες).

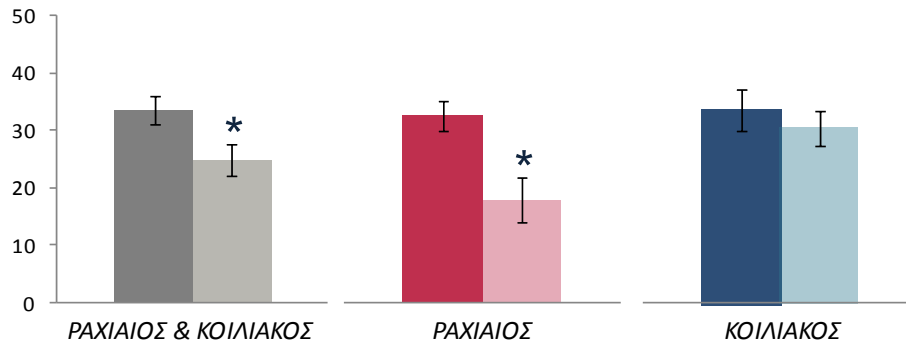
Πίνακας 4. Επίδραση της φεντανύλης στον αριθμό των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων στον υποκάμπο. Η *in vivo* χορήγηση φεντανύλης μείωσε τον αριθμό των νευρώνων και στις δύο μοίρες του υποκάμπου. Στατιστικώς σημαντική ήταν η μείωση στη ραχιαία αλλά όχι στην κοιλιακή μοίρα.

	Φυσιολογικός ορός	Φεντανύλη	<i>p</i>
Σύνολο (<i>n</i> =11)	33,5 ± 2,4	24,8 ± 2,8	0,03
Ραχιαίος (<i>n</i> =4)	32,7 ± 2,6	18,0 ± 3,9	0,02
Κοιλιακός (<i>n</i> =7)	33,9 ± 3,7	30,7 ± 3,1	0,51

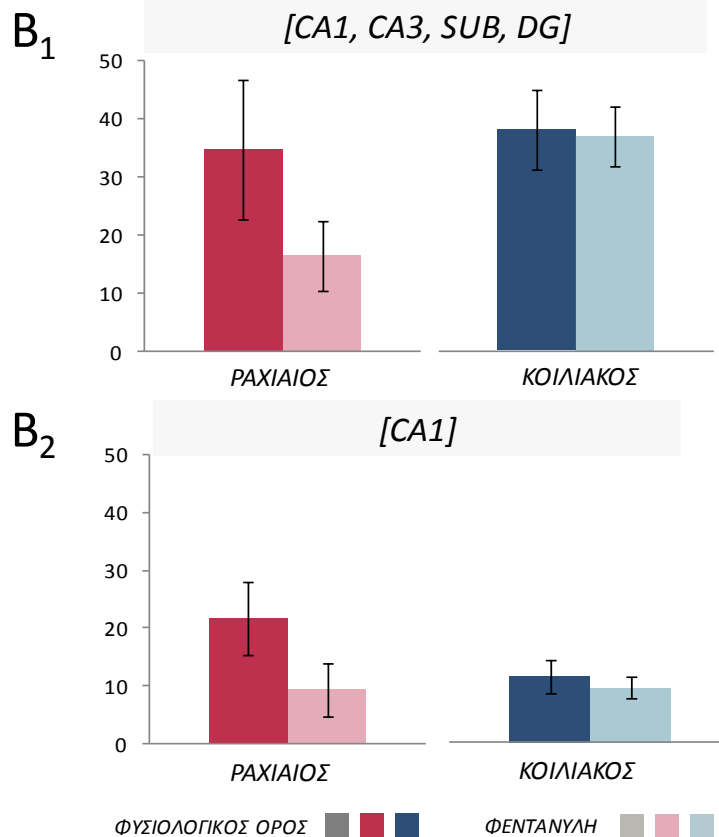
Η χορήγηση φεντανύλης επέφερε μείωση του αριθμού των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων (*p*=0,03). Η μείωση αυτή φαίνεται να οφείλεται σε στατιστικά σημαντική μείωση στη ραχιαία (*p*=0,02) παρά στην κοιλιακή μοίρα (*p*=0,51) μοίρα (Πίνακας 4; Εικ. 31A, κόκκινες και μπλε στήλες).

Στη συνέχεια, η ανάλυση επικεντρώθηκε στην ομάδα της xh καθώς στην ομάδα αυτή πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα λειτουργικής αναστολής. Κατ' αναλογία με τα προαναφερθέντα, βρέθηκε ότι η φεντανύλη επιφέρει μείωση του αριθμού των νευρώνων στον ραχιαίο παρά στον κοιλιακό υποκάμπο, αν και η διαφορά δεν ήταν πλέον στατιστικά σημαντική, τόσο στο σύνολο των περιοχών, όσο και στην περιοχή CA1 (Εικ. 31B1, B2).

A [0, 1, xh] [CA1, CA3, SUB, DG] [Αριστερό & Δεξί ημισφ.]

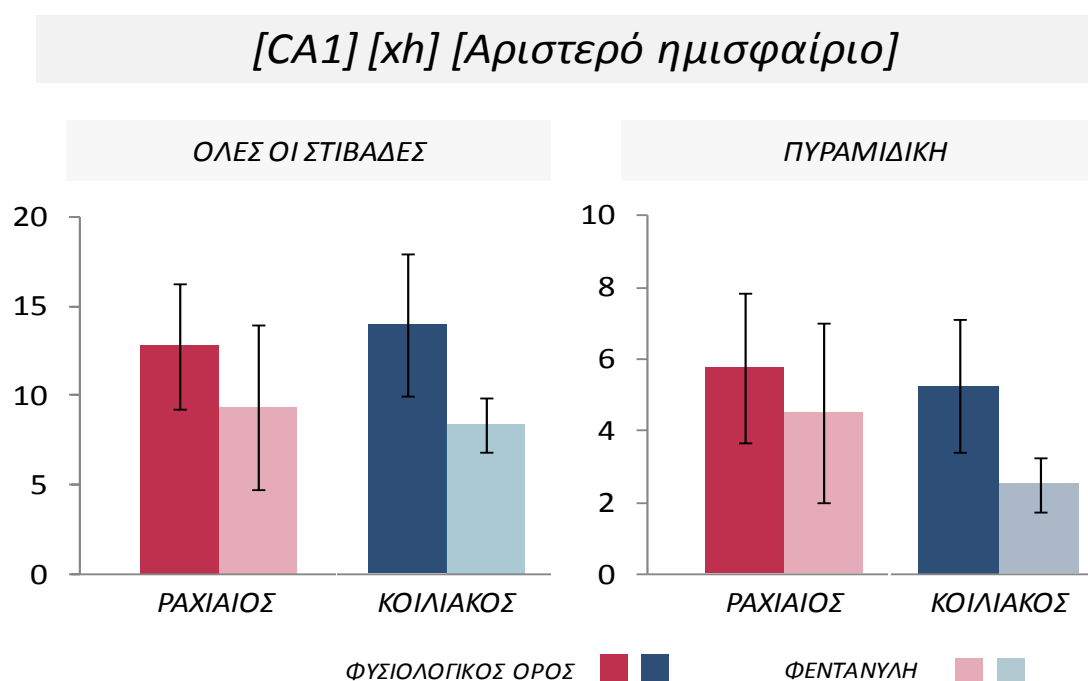


B [xh] [Αριστερό & Δεξί ημισφαίριο]



Εικόνα 31. Επίδραση της φεντανύλης στο πλήθος των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων στον ιππόκαμπο. Α. Χορήγηση φεντανύλης επιφέρει μείωση του συνολικού αριθμού των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων η οποία αποδίδεται, κυρίως, στην επίδραση του φαρμάκου στη ραχιαία μοίρα. Στην καταμέτρηση των νευρώνων συνυπολογίζονται όλες οι περιοχές (CA1, CA3, SUB, DG) όλων των ομάδων (0h, 1h, xh) και των δύο ημισφαιρίων. **Β.** Μείωση των νευρώνων παρατηρήθηκε στην ομάδα [xh], στην οποία ελέγχθηκε η λειτουργική αναστολή, τόσο στο σύνολο των περιοχών (B₁) όσο και στην περιοχή CA1 (B₂).

Όπως προαναφέρθηκε, οι τομές του αριστερού ημισφαιρίου, το οποίο χρησιμοποιήθηκε κατά προτεραιότητα έναντι του δεξιού, εμφάνισε μεγαλύτερο αριθμό νευρώνων πιθανόν λόγω καλύτερης βιωσιμότητας του ιστού. Επιπλέον, όπως προαναφέρθηκε, απώτερος στόχος των πειραμάτων ήταν να συσχετισθεί η λειτουργική αναστολή στην CA1 περιοχή (η οποία ελέγχθηκε στην ομάδα χη) με την ανοσοθετικότητα στο GABA. Με βάση αυτά τα δύο στοιχεία η καταμέτρηση των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων επικεντρώθηκε στη CA1 περιοχή της ομάδας χη του αριστερού ημισφαιρίου. Ιδιαίτερη αναφορά γίνεται στην πυραμιδική στιβάδα καθώς εκεί εντοπίζεται ο μεγαλύτερος αριθμός GABAεργικών νευρώνων που φέρουν οπιοειδικοί υποδοχείς¹⁰⁵. Τα αποτελέσματα έδειξαν μεγαλύτερη επίδραση της φεντανύλης στην κοιλιακή σε σχέση με τη ραχιαία μοίρα, αν και η διαφορά τιμών δεν έφθασε σε στατιστική σημαντικότητα πιθανώς λόγω του μικρού αριθμού παρατηρήσεων και της μεγάλης τυπικής απόκλισης.



Εικόνα 32. Επίδραση της φεντανύλης στο πλήθος των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων στην περιοχή CA1 του κοιλιακού υποκάμπου. Χορήγηση φεντανύλης επιφέρει μείωση του αριθμού των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων που καταμετρήθηκαν τόσο σε όλες τις στιβάδες (*oriens, pyramidale, radiatum, lacunosum-moleculare*) της περιοχής CA1 (αριστερά της εικόνας) όσο και στη πυραμιδική στιβάδα (δεξιά της εικόνας) χωρίς όμως η μείωση να φθάσει σε στατιστική σημαντικότητα.

2.2.2. Επίδραση της φεντανύλης στη λειτουργία του ιπποκάμπου.

Σε προηγούμενη μελέτη βρέθηκε ότι η *in vivo* χορήγηση φεντανύλης επιφέρει μείωση της GABAεργικής αναστολής στην CA1 περιοχή του ραχιαίου ιπποκάμπου⁶². Τα πειράματα που περιγράφονται παρακάτω σχεδιάστηκαν με σκοπό να διερευνηθεί η επίδραση της φεντανύλης στην CA1 περιοχή της κοιλιακής μοίρας του ιπποκάμπου.

2.2.2.1. Παθητικές και ενεργητικές ιδιότητες της κυτταρικής μεμβράνης των πυραμιδικών νευρώνων της CA1 περιοχής του κοιλιακού ιπποκάμπου – Επίδραση της φεντανύλης.

Η φεντανύλη επιδρώντας σε μ-οπιοειδικοί υποδοχείς οι οποίοι εντοπίζονται σε GABAεργικούς, αλλά όχι σε πυραμιδικούς, νευρώνες αναμένεται να επηρεάσει τη μετασυναπτική GABAεργική αναστολή που δέχονται οι πυραμιδικοί νευρώνες. Δεν αναμένεται, τουλάχιστον άμεσα, επίδραση της *in vivo* χορήγησης φεντανύλης στις ιδιότητες της κυτταρικής μεμβράνης των πυραμιδικών νευρώνων. Παρόλα αυτά, προκειμένου να εξετασθεί η ενδεχόμενη επίδραση της χορήγησης φεντανύλης στην μετασυναπτική GABAεργική αναστολή που δέχονται οι πυραμιδικοί νευρώνες, θα πρέπει πρώτα να ελεγχθεί (ή/και να αποκλεισθεί) η επίδραση στις παθητικές και ενεργητικές ιδιότητες της κυτταρικής μεμβράνης των νευρώνων.

2.2.2.2. Παθητικές ιδιότητες

Οι παθητικές ιδιότητες ενός νευρώνα αναφέρονται στα χαρακτηριστικά της χωρητικότητας και αντίστασης τα οποία ενυπάρχουν στην κυτταρική μεμβράνη και τα οποία είναι συνυφασμένα με την αντίσταση του κυτταροπλάσματος και του εξωκυττάριου μικροπεριβάλλοντος. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι ιδιότητες αυτές της κυτταρικής μεμβράνης των δενδριτών και των αξόνων προσομοιάζουν με τις ηλεκτρικές ιδιότητες ηλεκτρικού κυκλώματος.

Προκειμένου να προσδιορισθούν οι παθητικές ιδιότητες της κυτταρικής μεμβράνης, πραγματοποιήθηκαν *in vitro* ενδοκυττάριας ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές από πυραμιδικούς νευρώνες της CA1 περιοχής σε φέτες του κοιλιακού ιπποκάμπου που προέρχονταν από πειραματόζωα στα οποία είχε προηγηθεί χορήγηση φυσιολογικού ορού ή φεντανύλης. Η διείδυση του μικροηλεκτροδίου στους νευρώνες έγινε υπό οπτικό έλεγχο μέσω οπτικού μικροσκοπίου και οι ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές είχαν τυπικά χαρακτηριστικά καταγραφών από κυτταρικά σώματα και όχι από δενδρίτες. Η αντίσταση των μικροηλεκτροδίων καταγραφής δεν διέφερε μεταξύ των δύο πληθυσμών νευρώνων (φυσιολογικός ορός: $78,0 \pm 6,8 \text{ M}\Omega$, $n=9$; φεντανύλη: $89,0 \pm 7,7 \text{ M}\Omega$, $n=8$; $p>0,05$) υποδηλώνοντας ότι οι καταγραφές πραγματοποιήθηκαν από παρόμοιους σε μέγεθος νευρώνες. Ο προσδιορισμός των παθητικών ιδιοτήτων της κυτταρικής μεμβράνης των νευρώνων έγινε με την εφαρμογή τετράγωνων υπερπολωτικών παλμών ηλεκτρικού ρεύματος διάρκειας 375 ms αυξανόμενης έντασης (από 0,05 έως 0,8 nA, αύξηση πλάτους παλμού 0,05 nA) σε συνθήκες καθήλωσης ρεύματος. Η αλληλουχία των συνολικά 16 παλμών εφαρμόσθηκε πέντε φορές κατ' επανάληψη και κατόπιν εξήχθη μέσω ηλεκτρονικής επεξεργασίας με το λογισμικό Clampfit 10.1 η συνισταμένη των υπερπολωτικών αποκρίσεων της κυτταρικής μεμβράνης σε κάθε ηλεκτρικό παλμό με στόχο τη μετρίαση του ηλεκτρικού θορύβου στις κυματομορφές. Εξετάσθηκαν τρεις παθητικές ιδιότητες της κυτταρικής μεμβράνης:

- Το δυναμικό ηρεμίας (resting membrane potential, RMP):

προσδιορίζεται από την τιμή του δυναμικού που καταγράφεται μετά την είσοδο της μικροπιπέτας στο εσωτερικό του νευρώνα σε συνθήκες καθήλωσης ρεύματος απουσία εφαρμογής συνεχούς ρεύματος (Direct current, DC). Το δυναμικό ηρεμίας δεν διέφερε μεταξύ των δύο πληθυσμών των νευρώνων (φυσιολογικός ορός: $61,9 \pm 0,9 \text{ mV}$, $n=14$; φεντανύλη: $62,6 \pm 1,5 \text{ mV}$, $n=8$; $p>0,05$; Εικ. 33Γ).

- Η αντίσταση εισόδου του νευρώνα (input resistance, R_i):

προσδιορίζεται σύμφωνα με τον νόμο του Ohm από το πηλίκο

$$R_i = \Delta V / I$$

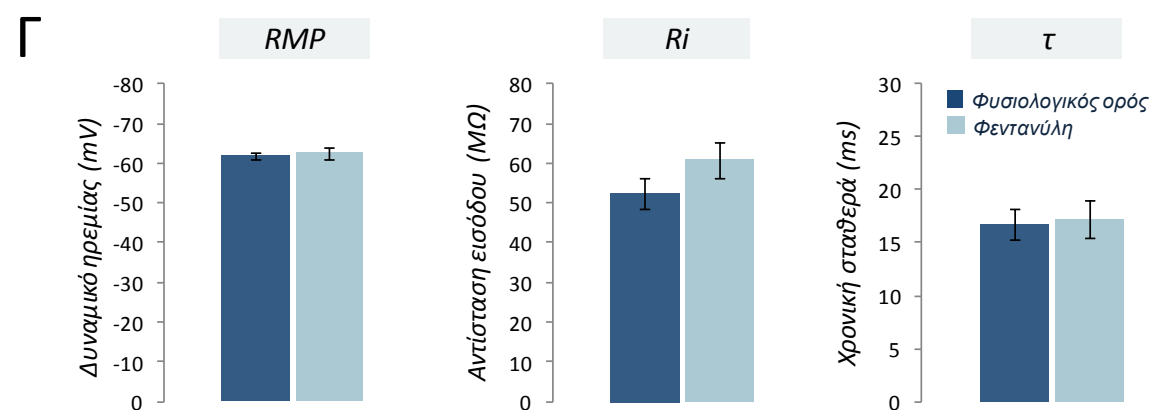
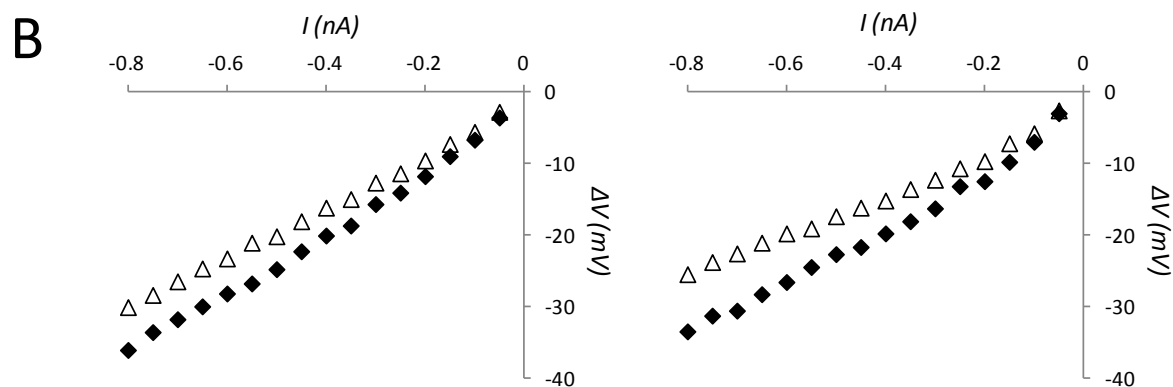
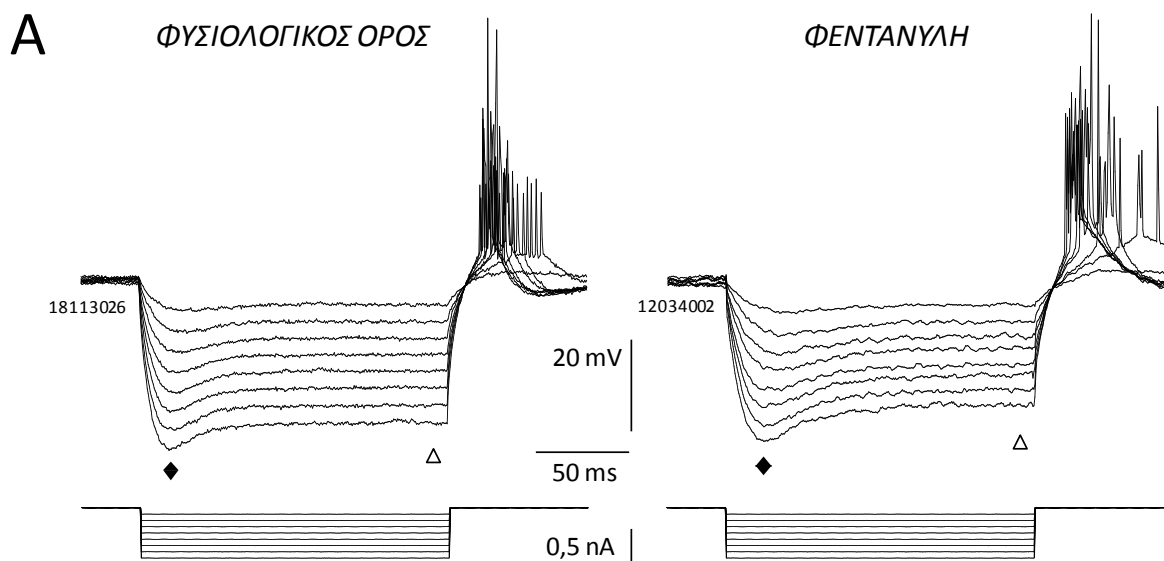
όπου ΔV είναι η διαφορά του δυναμικού της μεμβράνης V από το δυναμικό ηρεμίας V_0 μετά την εφαρμογή ρεύματος I . Η απόκριση της κυτταρικής μεμβράνης νευρώνα σε τετράγωνο

υπερπολωτικό παλμό ηλεκτρικού ρεύματος σε συνθήκες καθήλωσης ρεύματος συνίσταται σε υπερπολωτική απόκλιση του δυναμικού της μεμβράνης V από το δυναμικό ηρεμίας της V_o , που τερματίζεται μετά το τέλος του ηλεκτρικού παλμού (Εικ. 33Α). Η απόκλιση του δυναμικού μεμβράνης V από το δυναμικό ηρεμίας V_o κατά την εφαρμογή ηλεκτρικού παλμού πλάτους I οφείλεται στη συμπεριφορά της κυτταρικής μεμβράνης του νευρώνα ως ωμικής αντίστασης R και το εύρος της απόκλισης $V-V_o$ (ΔV) καθορίζεται από την αντίσταση εισόδου R_i . Η αντίσταση εισόδου μετράται σε $M\Omega$ καθώς η ένταση του εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού ρεύματος αναφέρεται σε nA και η απόκλιση του δυναμικού μεμβράνης μετράται σε mV .

Με την εφαρμογή τετράγωνου υπερπολωτικού παλμού ηλεκτρικού ρεύματος πλάτους μεγαλύτερου του $0,1nA$ παρατηρείται μείωση του εύρους της αρχικής υπερπόλωσης της κυτταρικής μεμβράνης παρά το γεγονός ότι το πλάτος του εφαρμοζόμενου ρεύματος παραμένει σταθερό, η δε μείωση του εύρους της υπερπόλωσης δημιουργεί την εντύπωση "κουλάδας" ("sag") στην αρχή της κυματομορφής. Η μέγιστη διαφορά δυναμικού της κυτταρικής μεμβράνης σε σχέση με το δυναμικό ηρεμίας, που προκύπτει ως αποτέλεσμα του υπερπολωτικού παλμού ρεύματος, βρίσκεται ως εκ τούτου στην κορυφή του "sag" και είθισται να αποκαλείται ΔV_{peak} (Εικ. 33Α, \blacklozenge). Η μερική εκπόλωση που οδηγεί στο παραπάνω φαινόμενο οφείλεται στην ενεργοποίηση του I_h , ενός μεικτού ρεύματος Na^+/K^+ , το οποίο λειτουργεί ως ανώμαλος ή ανάστροφος ανορθωτής⁷¹. Οι δίαυλοι I_h δεν αδρανοποιούνται όσο διαρκεί ο παλμός με αποτέλεσμα η κυτταρική μεμβράνη να διατηρείται σε σταθερή κατάσταση (steady state, ss) μερικής εκπόλωσης μέχρι το τέλος του εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού παλμού. Η διαφορά δυναμικού της κυτταρικής μεμβράνης στο τέλος του παλμού σε σχέση με το δυναμικό ηρεμίας αποκαλείται ΔV_{ss} (Εικ. 33Α, \blacktriangle). Αμέσως μετά το πέρας του ηλεκτρικού παλμού η κυτταρική μεμβράνη επιστρέφοντας στο δυναμικό ηρεμίας εμφανίζει χαρακτηριστική "εκπόλωση αναπήδησης" ("rebound depolarization"). Ο υποκείμενος μηχανισμός της εκπόλωσης αναπήδησης, ο οποίος έχει μελετηθεί σε συνθήκες καθήλωσης τάσης και ρεύματος στους πυραμιδικούς νευρώνες της CA1 περιοχής του υποκάμπου¹⁰⁶, αποδίδεται αφενός στην άρση της αδρανοποίησης του ρεύματος ασβεστίου I_T κατά τη διάρκεια της παρατεταμένης υπερπόλωσης της μεμβράνης και αφετέρου στο ουραίο ρεύμα (tail current) που εμφανίζεται με τη λήξη της υπερπόλωσης και την απενεργοποίηση του I_h .

Για να υπολογισθεί η αντίσταση εισόδου της κυτταρικής μεμβράνης, έγινε γραφική παράσταση των τιμών ΔV_{peak} και ΔV_{ss} έναντι του πλάτους του εφαρμοζόμενου ρεύματος (καμπύλη I-V; Εικ. 33Α) κατά την οποία παρατηρήθηκε απόκλιση από τη γραμμικότητα στη μεταβολή του δυναμικού. Η αναμενόμενη αυτή απόκλιση οφείλεται στην προαναφερθείσα ενεργοποίηση του ρεύματος I_h . Προκειμένου να αποφευχθεί η συμμετοχή ενεργών αγωγιμοτήτων στον υπολογισμό της αντίστασης εισόδου του νευρώνα, χρησιμοποιήθηκε το ευθύγραμμο μόνο τμήμα της καμπύλης I-V το οποίο αντιστοιχούσε στις δύο πρώτες τιμές εφαρμοζόμενου υπερπολωτικού ρεύματος. Με αυτό τον τρόπο υπολογισμού βρέθηκε ότι η αντίσταση εισόδου δεν διαφέρει μεταξύ των δύο πληθυσμών των νευρώνων (φυσιολογικός ορός: $52,4 \pm 4,0 \text{ M}\Omega$, $n=14$; φεντανύλη: $60,9 \pm 4,5 \text{ M}\Omega$, $n=8$; $p>0,05$; Εικ 33Γ).

Εικόνα 33. Προσδιορισμός των παθητικών ιδιοτήτων της κυτταρικής μεμβράνης. **Α.** Μεταβολή του δυναμικού της μεμβράνης των νευρώνων των δύο πληθυσμών μετά την εφαρμογή διαδοχικών τετράγωνων υπερπολωτικών παλμών αυξανόμενου πλάτους. **Β.** Γραφική παράσταση του δυναμικού της μεμβράνης στο ΔV_{peak} \blacklozenge και στο ΔV_{ss} \blacktriangle έναντι του ρεύματος στους δύο πληθυσμούς νευρώνων. Η απόκλιση από τη γραμμικότητα στη μεταβολή του δυναμικού οφείλεται στην ενεργοποίηση του ρεύματος I_h . Η αντίσταση εισόδου των νευρώνων υπολογίζεται από το ευθύγραμμο τμήμα της καμπύλης. **Γ.** Ραβδογράμματα των συγκεντρωτικών αποτελεσμάτων των παθητικών ιδιοτήτων της κυτταρικής μεμβράνης. Δεν βρέθηκε διαφορά μεταξύ των δύο πληθυσμών.

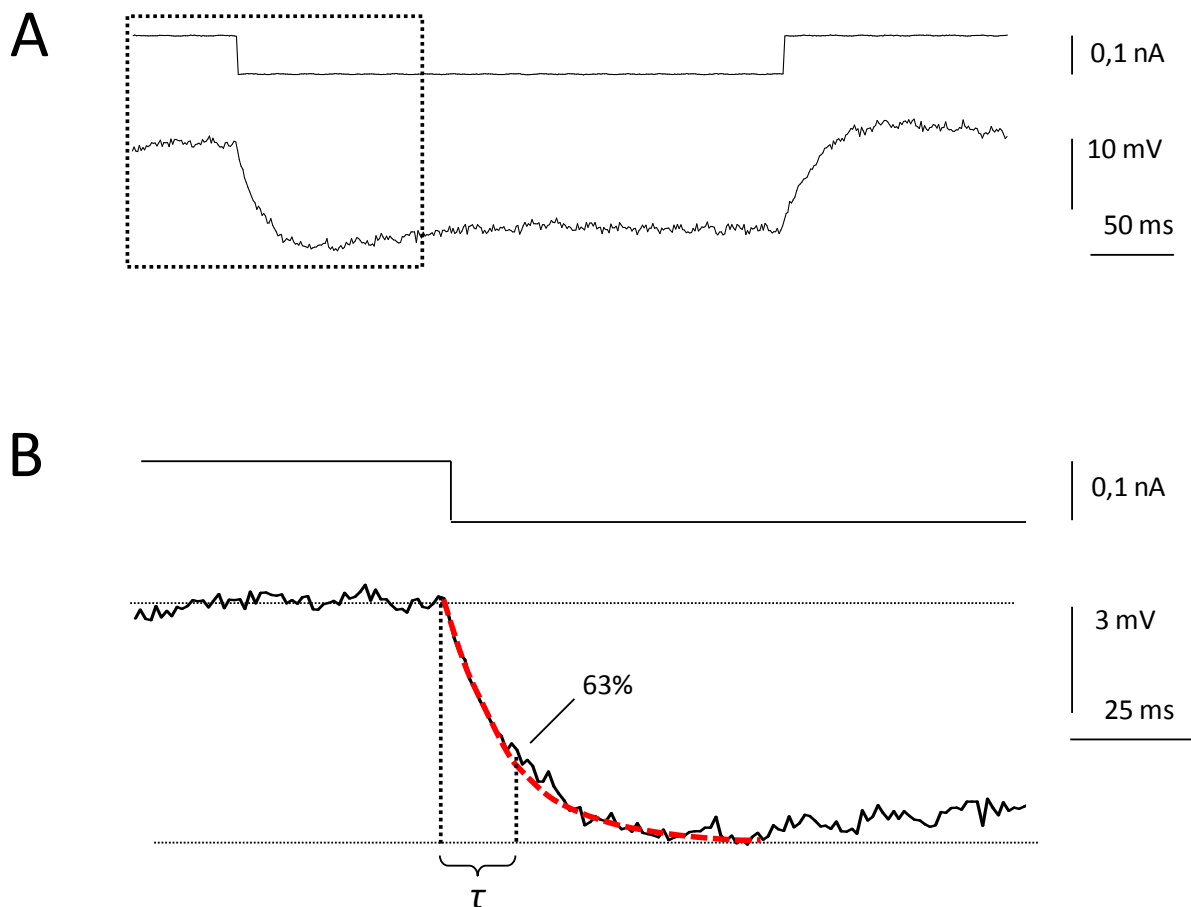


- Η χρονική σταθερά μεμβράνης (tau, τ):

Με την εφαρμογή του υπερπολωτικού ηλεκτρικού παλμού η τελική απόκλιση του δυναμικού μεμβράνης από το δυναμικό ηρεμίας δεν επιτυγχάνεται ακαριαία, αλλά μετά από συγκεκριμένο χρόνο, λόγω της συμπεριφοράς της κυτταρικής μεμβράνης ως πυκνωτή. Συνολικά, η κυτταρική μεμβράνη συνδυάζει χαρακτηριστικά πυκνωτή C και ωμικής αντίστασης R και από αυτή την άποψη μπορεί να χαρακτηριστεί στα πλαίσια μελέτης των χαρακτηριστικών αυτών ως κύκλωμα RC. Ο χρόνος που απαιτείται για να επιτευχθεί η τελική απόκλιση του δυναμικού $\Delta V = |V - V_o|$, όπως αυτή περιγράφηκε παραπάνω, εξαρτάται, ως εκ τούτου, από τη χωρητικότητα του πυκνωτή C. Η δε αύξηση του εύρους της απόκλισης του δυναμικού μεμβράνης μέχρι να επιτευχθεί η τελική τιμή της απόκλισης $|V - V_o|$ παριστάνει καμπύλη γραμμή, που προσεγγίζεται στις πειραματικές συνθήκες από καμπύλη εκθετικής συνάρτησης πρώτου βαθμού, από την οποία εξάγεται η χρονική σταθερά της μεμβράνης tau (τ , Εικ. 34B, κόκκινη γραμμή)

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

Η εύρεση της εκθετικής συνάρτησης πρώτου βαθμού που προσεγγίζει ικανοποιητικά (fit) την καμπύλη του δυναμικού που καταγράφεται πειραματικά γίνεται με τη χρήση του λογισμικού Clampfit 10.1. Η χρονική σταθερά της μεμβράνης tau (τ) είναι ο χρόνος στον οποίο επιτυγχάνεται το 63% της τελικής απόκλισης $|V - V_o|$ και προσδιορίζεται σε ms. Ακολουθώντας αυτή τη διαδικασία προσδιορισμού της χρονικής σταθεράς τ , βρέθηκε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά του τ μεταξύ των δύο πληθυσμών των νευρώνων (φυσιολογικός ορός: $16,8 \pm 1,4$ ms, $n=10$; φεντανύλη: $17,3 \pm 1,8$ ms, $n=7$; $p > 0,05$; Εικ. 33Γ).



Εικόνα 34. Υπολογισμός της χρονικής σταθεράς τ . Ενδοκυττάρια καταγραφή από πυραμιδικό νευρώνα της περιοχής CA1 του κοιλιακού υποκάμπου όπου απεικονίζεται η απόκριση της κυτταρικής μεμβράνης σε υπερπολωτικό ηλεκτρικό παλμό. **A.** Απεικονίζεται ολόκληρη η καταγραφή. **B.** Μεγεθύνονται η αρχή του ηλεκτρικού παλμού και της απόκρισης της μεμβράνης για μεγαλύτερη ευκρίνεια: η εφαρμογή τετράγωνου υπερπολωτικού ηλεκτρικού παλμού εκλύει απόκλιση του δυναμικού μεμβράνης από το δυναμικό ηρεμίας προς πιο υπερπολωτικές τιμές. Το εύρος της υπερπόλωσης για συγκεκριμένης έντασης ηλεκτρικό παλμό (εδώ 0,1 nA) καθορίζεται από την αντίσταση εισόδου R_i . Η διακεκομμένη κόκκινη γραμμή παριστάνει εκθετική συνάρτηση πρώτου βαθμού που προσεγγίζει ικανοποιητικά (fit) την εξέλιξη του δυναμικού μεμβράνης από την αρχή εφαρμογής του ηλεκτρικού παλμού μέχρι την επίτευξη του τελικού δυναμικού V . Η εκθετική συνάρτηση βρέθηκε με τη χρήση ηλεκτρονικού λογισμικού και όλη η διαδικασία προσδιορισμού της χρονικής σταθεράς τ ήταν αυτοματοποιημένη. Η απεικόνιση των τιμών τ , και 63% εξυπηρετεί την κατανόηση του συνημμένου κειμένου.

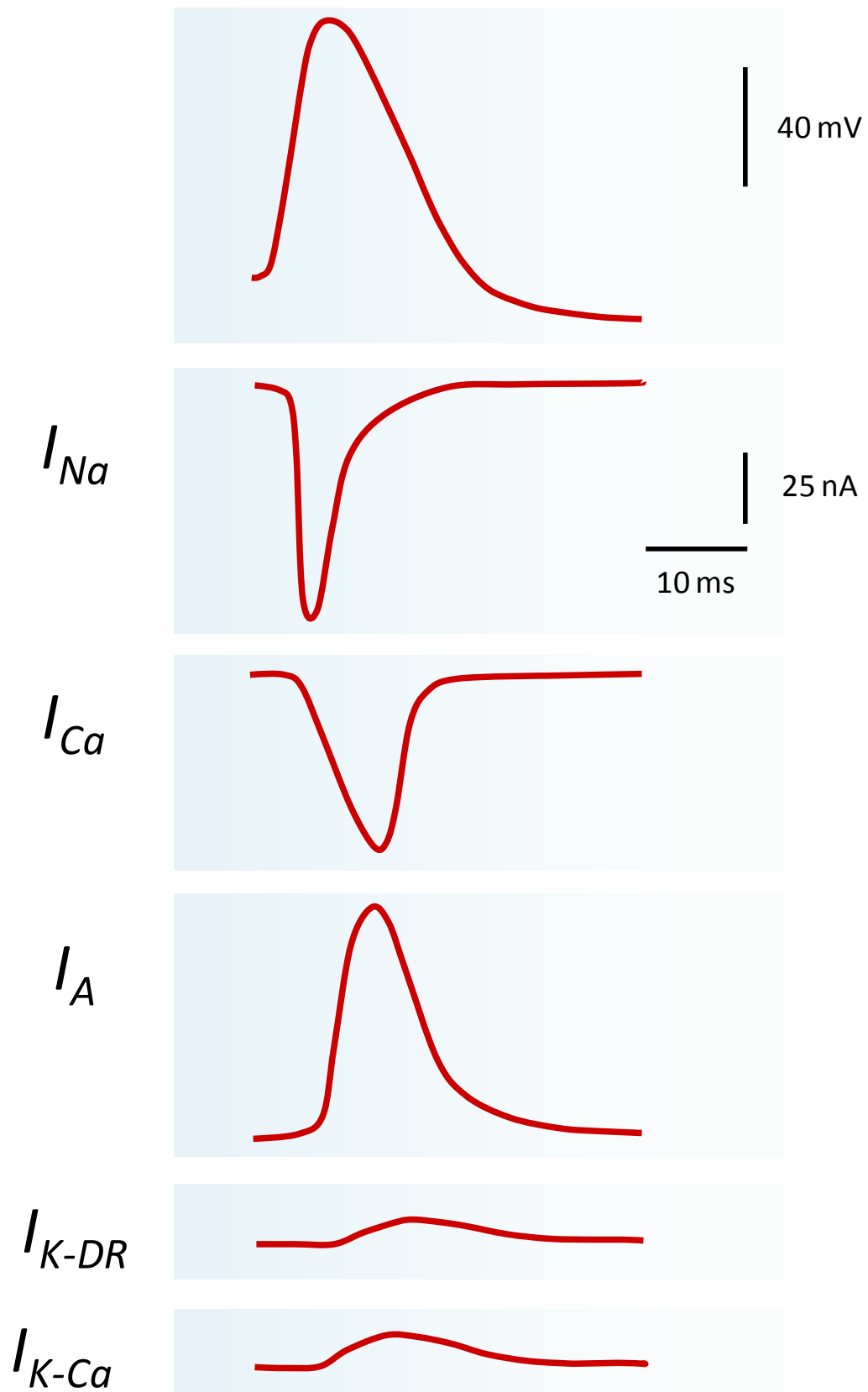
2.2.2.3. Ενεργητικές ιδιότητες

Ο όρος ενεργητικές ιδιότητες αναφέρεται στις ηλεκτρικές αγωγιμότητες της κυτταρικής μεμβράνης οι οποίες ενεργοποιούμενες από την τάση, διάφορους συνδέτες ή δεύτερους αγγελιοφόρους επηρεάζουν και επιφέρουν σημαντικές αλλαγές στο δυναμικό κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης. Παράδειγμα αποτελεί το δυναμικό ενεργείας το οποίο παράγεται από την ενεργοποίηση πολλαπλών τασεο-εξαρτώμενων ηλεκτρικών αγωγιμοτήτων στις οποίες συμπεριλαμβάνονται αγωγιμότητες Na^+ , Ca^{2+} και K^+ (Εικ. 35).

Τα δυναμικά ενεργείας επιτελούν εντελώς διαφορετική λειτουργία στο σώμα του νευρώνα, όπου κωδικοποιούν πληροφορίες συχνότητας και προτύπων εκφόρτισης (firing patterns), σε σχέση με τους νευράξονες οι οποίοι εξυπηρετούν κυρίως την πιστή και άμεση μετάδοσή τους σε μεγάλες αποστάσεις. Επομένως, η πυροδότηση δυναμικών ενεργείας στο σώμα του νευρώνα χαρακτηρίζεται από μεγάλο εύρος συχνοτήτων και προτύπων εκφόρτισης, έτσι ώστε μικρές μόνο αλλαγές εισερχομένων σημάτων να επιφέρουν σημαντικές αλλαγές στη συχνότητα εκφόρτισής τους. Το μεγάλο εύρος συχνοτήτων και προτύπων εκφόρτισης αντανακλά το εξαιρετικά μεγάλο ρεπερτόριο ιοντικών αγωγιμοτήτων που χαρακτηρίζει την κυτταρική μεμβράνη των νευρώνων.

Εξωγενώς χορηγούμενοι φαρμακολογικοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση των ενεργητικών ιδιοτήτων των νευρώνων. Ως εκ τούτου, έγινε σύγκριση των ενεργητικών ιδιοτήτων (δυναμικό ενεργείας, μεθυπερπολωτικά δυναμικά, επαναλαμβανόμενες εκφορτίσεις) των πυραμιδικών νευρώνων της περιοχής CA1 του υποκάμπου σε τομές που προέρχονται από πειραματόζωα στα οποία έχει χορηγηθεί φυσιολογικός ορός ή φεντανύλη.

Εικόνα 35. Ενεργοποίηση ιοντικών αγωγιμοτήτων κατά το δυναμικό ενέργειας. Πέντε, τουλάχιστον, ιοντικές αγωγιμότητες συνεισφέρουν στο δυναμικό ενέργειας και μπορούν να μελετηθούν με την τεχνική καθήλωσης δυναμικού ενεργείας και απομόνωσή τους με κατάλληλους φαρμακολογικούς αποκλειστές. Χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικά 60 μM TTX, 3mM TEA, 40mM TEA, 1mM 4-AP, 2mM CdCl_2 για τον φαρμακολογικό αποκλεισμό των αγωγιμοτήτων I_{Na} , $I_{\text{K-Ca}}$, $I_{\text{K-DR}}$, I_{A} , I_{Ca} αντίστοιχα. TTX: tetrodotoxin; TEA: tetraethyl ammonium; 4-AP: 4-aminopyridine. (Τροποποιημένη από Bean, 2007¹⁰).

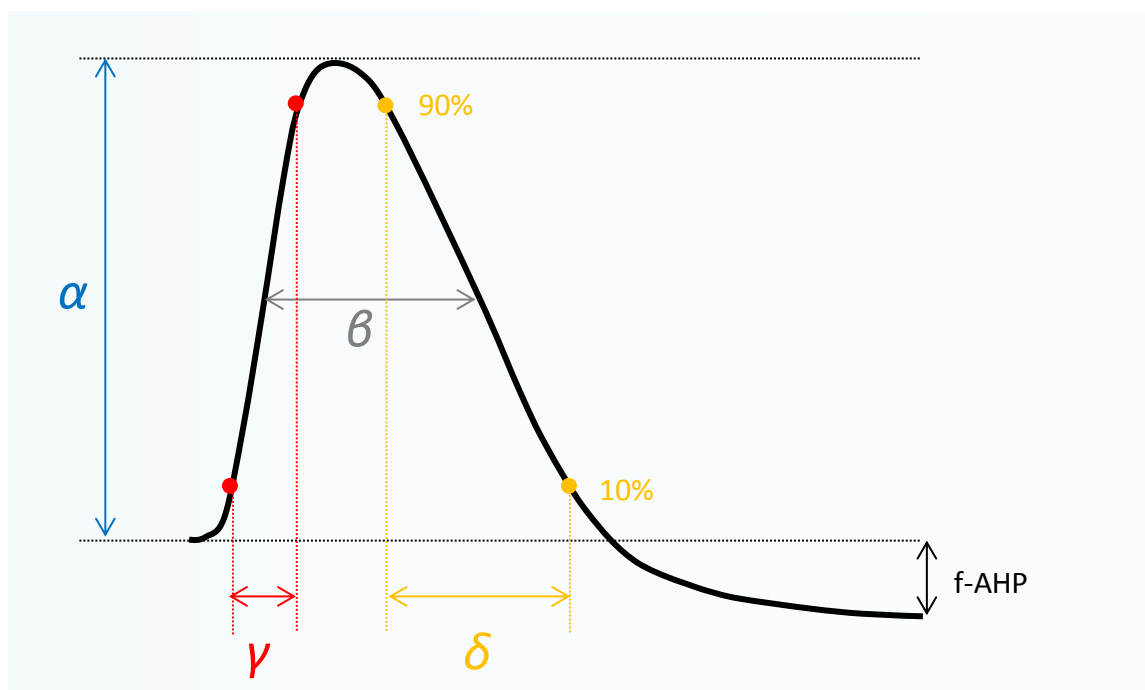


2.2.2.4. Δυναμικά ενεργείας

Η μελέτη των χαρακτηριστικών των δυναμικών ενεργείας των νευρώνων έγινε μέσω χορήγησης μικρής διάρκειας (3-5 ms) εκπολωτικού παλμού ηλεκτρικού ρεύματος αυξανόμενου πλάτους με σκοπό την πυροδότηση μονήρους δυναμικού ενεργείας δια ουδικού ερεθισμού της μεμβράνης. Με τη χρήση του λογισμικού ανάλυσης Clampfit 10.1 προσδιορίστηκαν διάφορες παράμετροι του δυναμικού ενεργείας όπως το μέγιστο πλάτος των δυναμικών ενεργείας σε mV, η ημίσεια διάρκεια σε ms (half width: το εύρος του δυναμικού ενεργείας στο επίπεδο του 50% του μέγιστου πλάτους του), ο χρόνος ανόδου σε ms (rise time: ο χρόνος στον οποίο το δυναμικό ενεργείας εξελίσσεται από το 10% στο 90% του ύψους του), ο χρόνος φθίσης σε ms (decay time: ο χρόνος στον οποίο το δυναμικό ενεργείας φθίνει από το 90% στο 10% του ύψους του) (Εικ. 36). Υπολογίσθηκε επίσης το γρήγορο μεθυπερπολωτικό δυναμικό ή f-AHP (fast afterhyperpolarizing potential) σε mV και το μεταεκπολωτικό δυναμικό ή ADP (afterdepolarization potential) σε mV (Εικ. 37A). Τα παραπάνω χαρακτηριστικά μετρήθηκαν σε πυραμιδικούς νευρώνες πειραματοζώων στα οποία είχε προηγηθεί χορήγηση φυσιολογικού ορού ή φεντανύλης. Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων βρέθηκε ότι οι δύο πληθυσμοί δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Πίνακας 5) υποδηλώνοντας ότι η *in vivo* χορήγηση φεντανύλης δεν επηρεάζει τη μορφή του δυναμικού ενεργείας των πυραμιδικών νευρώνων της CA1 περιοχής του κοιλιακού ιπποκάμπου.

Πίνακας 5. Σύγκριση των παραμέτρων του δυναμικού ενεργείας σε νευρώνες του ιπποκάμπου.

		Φυσιολογικός ορός <i>n</i> =5	Φεντανύλη <i>n</i> =5
α	Πλάτος (mV)	86,0 \pm 2,5	87,1 \pm 1,6
β	Ημίσεια διάρκεια (ms)	0,9 \pm 1,1	1,4 \pm 0,1
γ	Χρόνος ανόδου 10-90% (ms)	0,27 \pm 0,02	0,34 \pm 0,02
δ	Χρόνος φθίσης 90-10% (ms)	1,14 \pm 0,11	1,57 \pm 0,25



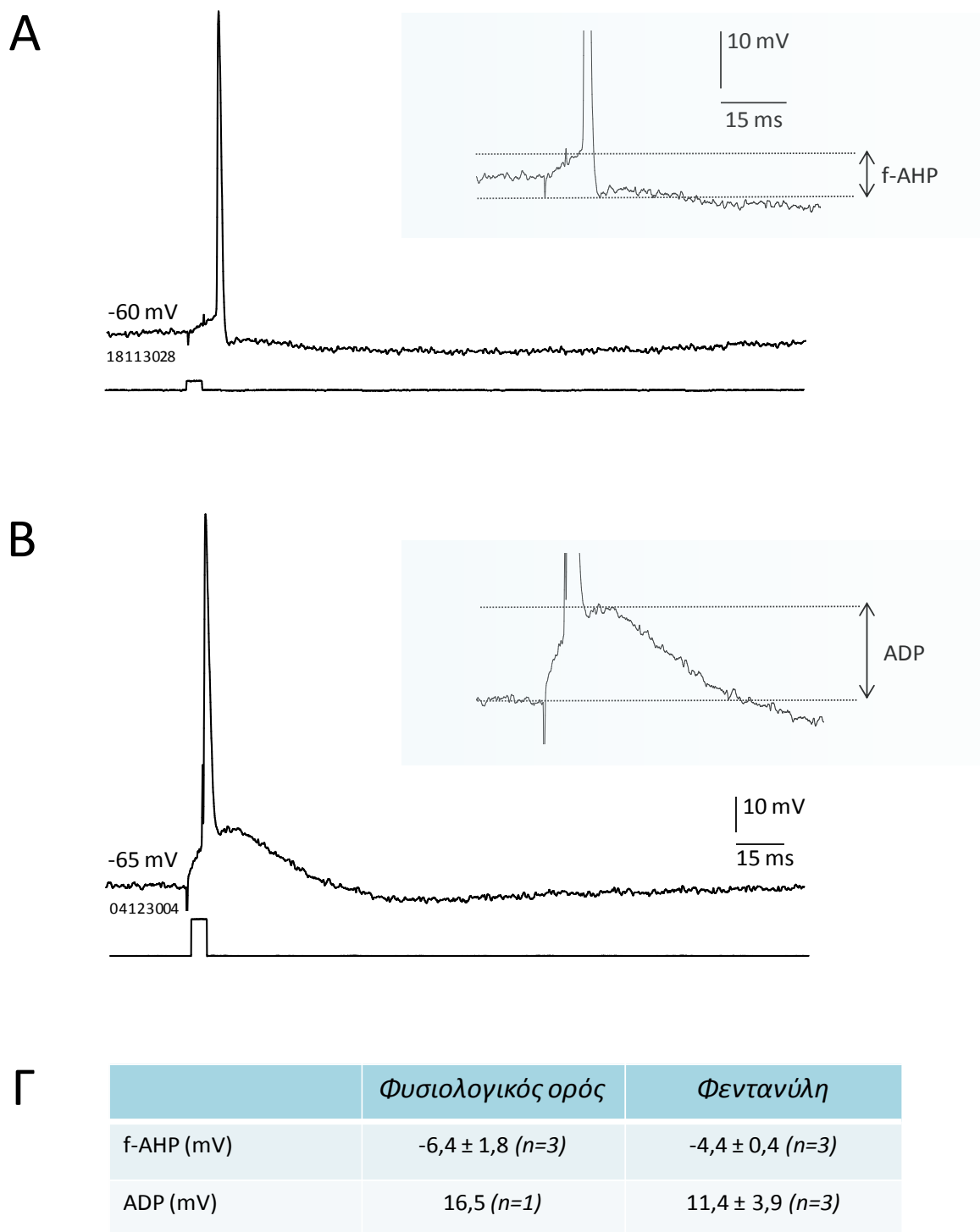
Εικόνα 36. Σχηματική απεικόνιση των παραμέτρων του δυναμικού ενεργείας που προσδιορίστηκαν σε νευρώνες του κοιλιακού υποκάμπου. α: μέγιστο πλάτος (mV), β: ημίσεια διάρκεια (half width, ms), το εύρος του δυναμικού ενεργείας στο επίπεδο του 50% του μέγιστου πλάτους του, γ: χρόνος ανόδου (rise time, ms), ο χρόνος στον οποίο το δυναμικό ενεργείας εξελίσσεται από το 10% στο 90% του μέγιστου πλάτους του, δ: χρόνος φθίσης (decay time, ms), ο χρόνος στον οποίο το δυναμικό ενεργείας φθίνει από το 10% στο 90% του μέγιστου πλάτους του, f-AHP: ταχεία υπερπόλωση που έπεται του δυναμικού ενεργείας (mV).

2.2.2.5. Μεθυπερπολωτικά δυναμικά

Την επαναπόλωση της μεμβράνης μετά την εκφόρτιση δυναμικών ενέργειας διαδέχονται τρία μεθυπερπολωτικά δυναμικά τα οποία βάσει του χρόνου εμφάνισης του μέγιστου πλάτους τους περιγράφονται ως ταχύ-, μεσαίο- και αργό- μεθυπερπολωτικό δυναμικό (fast-, f-AHP, medium-, m-AHP, και slow-, s-AHP afterhyperpolarization, αντίστοιχα). Το f-AHP διαδέχεται την επαναπόλωση της μεμβράνης του κυττάρου μετά από εκφόρτιση μονήρους δυναμικού ενεργείας, ενώ η ενεργοποίηση των m-AHP και s-AHP λειτουργεί αθροιστικά, μετά από κάθε δυναμικό ενεργείας, και καθίσταται σημαντική, όσον αφορά στη λειτουργία του κυττάρου, μόνο μετά από αλληπάλληλες εκφορτίσεις⁷².

Το f-AHP οφείλεται στους διαύλους K^+ BK οι οποίοι χαρακτηρίζονται από υψηλή αγωγιμότητα και η ενεργοποίησή τους εξαρτάται από το δυναμικό της μεμβράνης και την ενδοκυττάρια συγκέντρωση Ca^{2+} ¹⁰³. Το ρεύμα που χαρακτηρίζει το f-AHP αναφέρεται ως I_C και συμμετέχει τόσο στην επαναπόλωση του δυναμικού του νευρώνα μετά από μονήρες δυναμικό ενεργείας όσο και στην ταχεία φάση του μεθυπερπολωτικού δυναμικού (f-AHP) (Εικ. 37A). Σε ορισμένους νευρώνες, και σε τιμές δυναμικού μεμβράνης αρνητικότερου του -65 mV, μετά από μονήρες δυναμικό ενεργείας ακολουθεί ένα εκπολωτικό δυναμικό (afterdepolarizing potential, ADP) στο οποίο φαίνεται να συνεισφέρουν πολλαπλές αγωγιμότητες στις οποίες συμμετέχουν ιόντα Na^+ και Ca^{2+} ⁴¹. Το ADP εμφανίζεται είτε ως αργή φάση παθητικής επαναπόλωσης μετά το πέρας του δυναμικού ενεργείας, είτε ως διακριτή εκπόλωση όπως αυτή της Εικ. 37B. Εάν το πλάτος του ADP είναι αρκετά μεγάλο ώστε να φθάσει τον ουδό, τότε αντί του μονήρους δυναμικού ενεργείας παρατηρείται έκλυση ριπής καθιστώντας το ADP αιτιολογικό παράγοντα αυξημένης διεγερσιμότητας του νευρώνα.

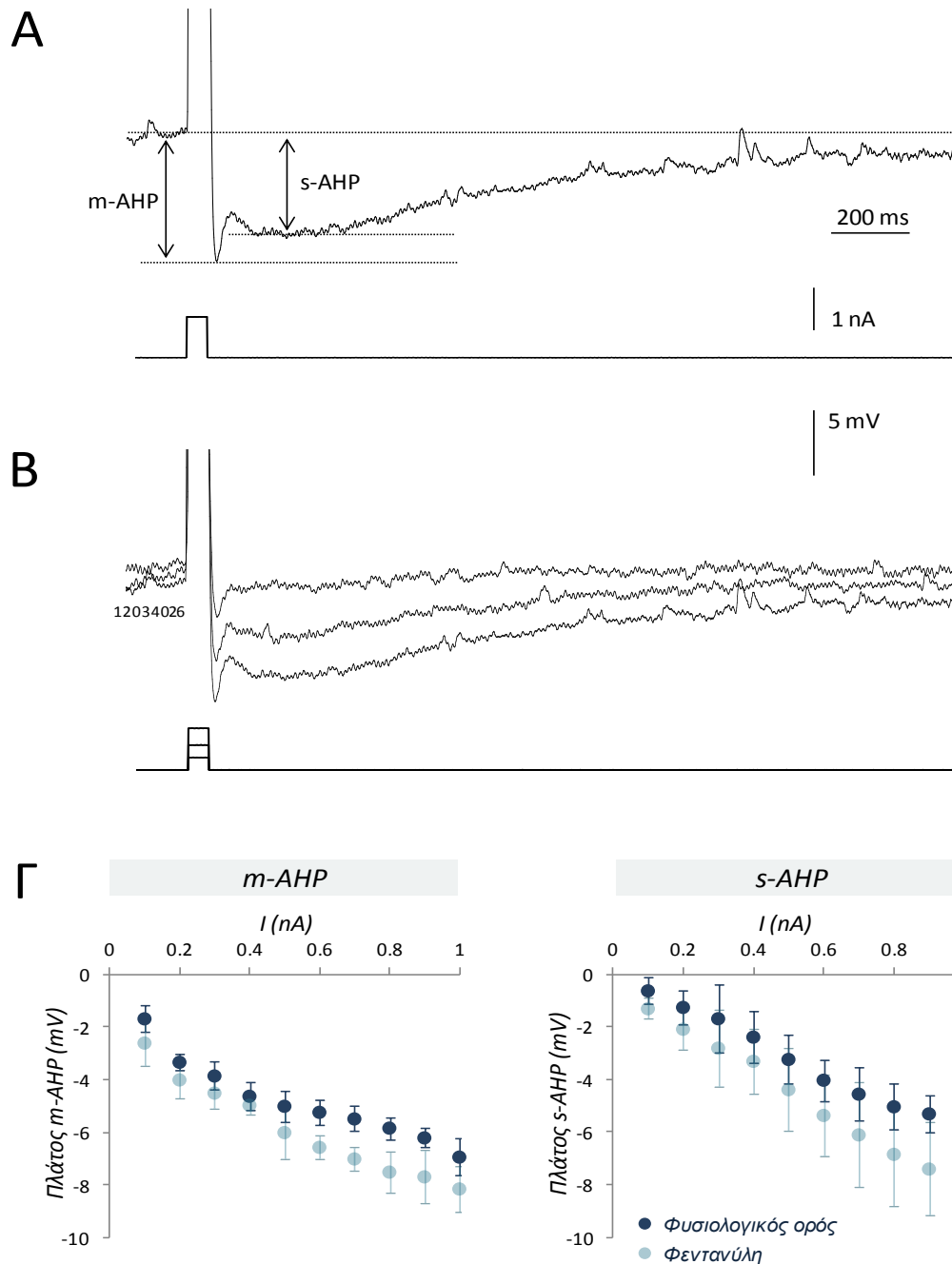
Για την μελέτη του f-AHP χρησιμοποιήθηκε πρωτόκολλο πρόκλησης μονήρους δυναμικού ενεργείας με την εφαρμογή εκπολωτικού παλμού διάρκειας 3-5 msec και μεταβλητού πλάτους ανάλογα με το δυναμικό ηρεμίας και την αντίσταση εισόδου του νευρώνα. Το πλάτος του f-AHP υπολογίστηκε ως η διαφορά μεταξύ της ελάχιστης τιμής δυναμικού που καταγράφεται αμέσως μετά το πέρας του δυναμικού ενεργείας και της τιμής δυναμικού του ουδού του νευρώνα (Εικ. 37A). Το πλάτος του ADP προσδιορίστηκε ως η διαφορά εκπολωτικής απόκλισης του δυναμικού της μεμβράνης μετά το πέρας του δυναμικού ενεργείας σε σχέση με το δυναμικό ηρεμίας πριν την εφαρμογή του εκπολωτικού παλμού (Εικ. 37B). Από τη σύγκριση των προσδιορισθέντων τιμών του f-AHP στους δύο πληθυσμούς νευρώνων (φυσιολογικός ορός: $-6,4 \pm 1,8$ mV, $n=3$; φεντανύλη: $-4,4 \pm 0,4$ mV $n=3$; $p>0,05$) προέκυψε ότι η χορήγηση φεντανύλης δεν επηρεάζει την ηλεκτροφυσιολογική αυτή παράμετρο. Λόγω του μικρού αριθμού των παρατηρήσεων δεν έγινε προσπάθεια σύγκρισης του ADP στους δύο πληθυσμούς νευρώνων (Εικ. 37Γ).



Εικόνα 37. Βραχύς παλμός ηλεκτρικού ρεύματος (5 ms) πυροδοτεί μονήρες δυναμικό ενεργείας σε πυραμιδικούς νευρώνες της CA1 περιοχής του κοιλιακού υποκάμπτου. **A.** Για τον προσδιορισμό του f-AHP μετράται το πλάτος της υπερπόλωσης μετά το πέρας του δυναμικού ενεργείας σε σχέση με τον ουδό έκλυσης του δυναμικού ενεργείας. **B.** Για τον προσδιορισμό του ADP μετράται το πλάτος της εκπολωτικής απόκλισης του δυναμικού μεμβράνης μετά το πέρας του δυναμικού ενεργείας σε σχέση με το δυναμικό ηρεμίας -πριν την εφαρμογή του παλμού. **Γ.** Σύγκριση υπολογισθέντων παραμέτρων μεταξύ των δύο πληθυσμών νευρώνων.

Στην εμφάνιση του mAHP συμβάλλει η αγωγιμότητα καλίου I_M η οποία ενεργοποιείται μετά από εκπόλωση της μεμβράνης πάνω από την τιμή των -60 mV και αναστέλλεται από την ακετυλοχολίνη¹³. Παρότι το ρεύμα I_M ενεργοποιείται ακόμα και μετά από μονήρη δυναμικά ενέργειας, λόγω της αργής κινητικής του διαύλου δεν συμβάλλει ουσιαστικά στην επαναπόλωση του κυττάρου¹⁰³. 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 ερεθισμάτων¹⁰⁴. Το s-AHP αποδίδεται στο ρεύμα $K^+ I_{AHP}$, είναι ευαίσθητο στην ενδοκυττάρια $[Ca^{2+}]$ και σε διάφορους νευροδιαβιβαστές όπως η νοραδρεναλίνη, και συμβάλει στην εξοικείωση ή προσαρμογή των εκφορτίσεων μετά από παρατεταμένη εκπόλωση¹⁰⁴.

Ο προσδιορισμός του μεσαίου (m-AHP) και αργού (s-AHP) μεθυπερπολωτικού δυναμικού στους πυραμιδικούς νευρώνες έγινε μέσω πρόκλησης ριπών δυναμικών ενεργείας δια εκπολωτικών παλμών ηλεκτρικού ρεύματος διάρκειας 100 ms και αυξανόμενου πλάτους (0,1-1,0 nA). Αξίζει να σημειωθεί ότι παρατηρήθηκαν τρεις συνδυασμοί mAHP και sAHP: κάποιοι νευρώνες είχαν σημαντικό mAHP και sAHP, σε κάποιους υπερίσχυε το sAHP, ενώ σε άλλους το mAHP. Στην Εικ. 38 απεικονίζεται περίπτωση νευρώνα που παρουσιάζει κυματομορφή με διακριτά mAHP και sAHP. Το mAHP μετρήθηκε αμέσως μετά το τέλος της απόκρισης του δυναμικού μεμβράνης στον παλμό, ενώ το sAHP μετρήθηκε στα 380-400 ms μετά το τέλος του παλμού (Εικ. 38Α). Η αύξηση του πλάτους των εκπολωτικών παλμών προκάλεσε αύξηση του αριθμού των δυναμικών ενεργείας κατά τη διάρκεια του παλμού και επακόλουθη αύξηση του πλάτους των mAHP και sAHP (Εικ. 38Β). Οι τιμές των δύο μεθυπερπολωτικών δυναμικών κυμαίνονταν από μη μετρήσιμες έως τιμές που προσέγγιζαν ή ξεπερνούσαν τα 10 mV, με τη διακύμανση του sAHP να είναι μεγαλύτερη από ό,τι του mAHP. Οι τιμές που προέκυψαν από την μέτρηση των mAHP και sAHP σε όλα τα πλάτη ρεύματος που εφαρμόστηκαν (0,1-1,0 nA) απεικονίζονται στην Εικ. 38Γ. Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο πληθυσμών νευρώνων που εξετάστηκαν (φυσιολογικός ορός, $n=5$; φεντανύλη, $n=5$).



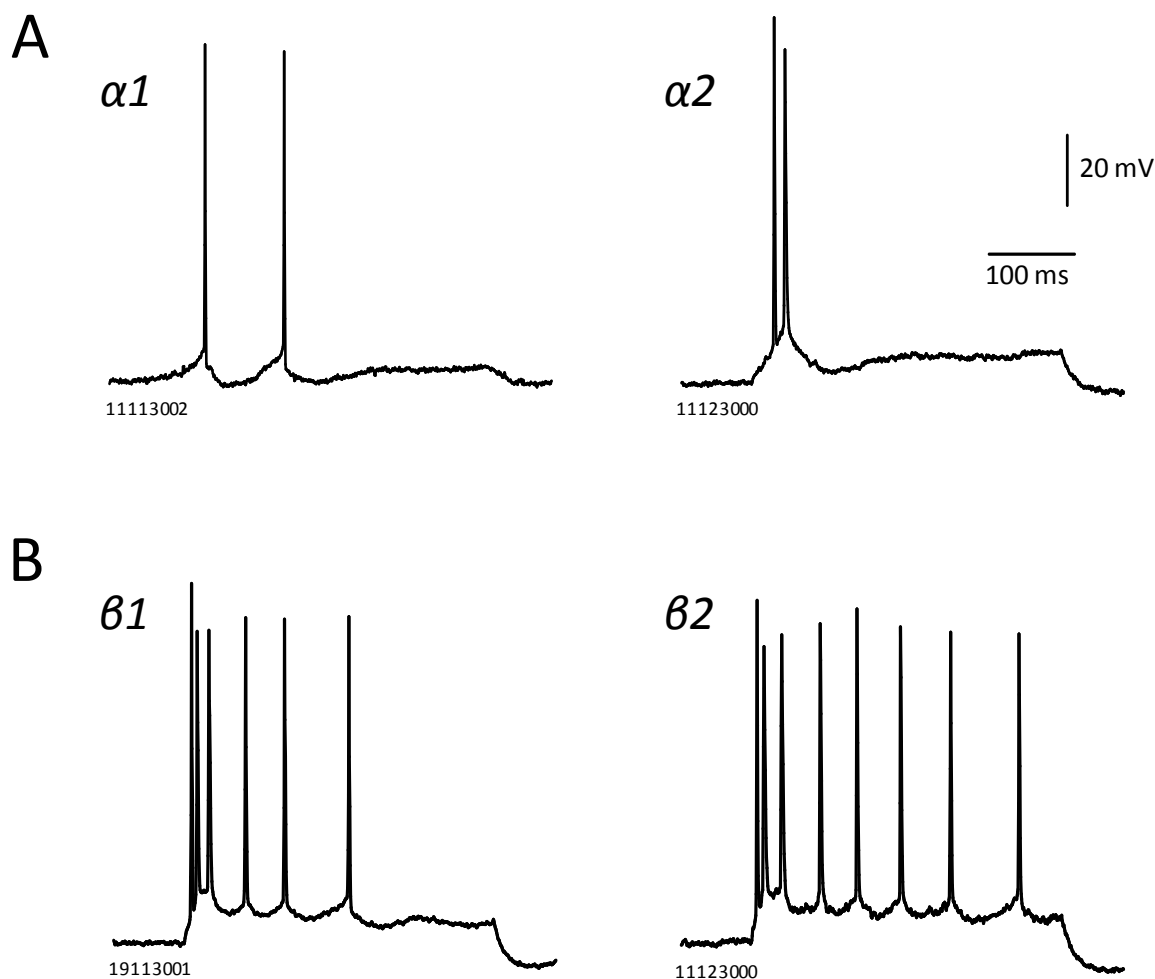
Εικόνα 38. Μέτρηση των mAHP και sAHP σε πυραμιδικούς νευρώνες της περιοχής CA1 του κοιλιακού υποκάμπου. Η έκλυση ριπής δυναμικών ενεργείας επιτυγχάνεται με την εφαρμογή τετράγωνου παλμού ηλεκτρικού ρεύματος (100 ms). **A.** Το mAHP μετράται αμέσως μετά το πέρας του παλμού, ενώ το sAHP 380-400 ms μετά το πέρας του παλμού. Απεικονίζεται νευρώνας με διακριτά mAHP και sAHP, από τον οποίο προκύπτει ξεκάθαρα σε ποια χρονική στιγμή απαντάται η μέγιστη τιμή των εν λόγω μεθυπερπολωτικών δυναμικών. **B.** Απεικόνιση της αύξησης του πλάτους των μεθυπερπολωτικών δυναμικών με εφαρμογή παλμών αυξανόμενου πλάτους. **Γ.** Σύγκριση υπολογισθέντων παραμέτρων μεταξύ των δύο πληθυσμών νευρώνων (βλ. συνημμένο κείμενο).

2.2.2.6. Επαναλαμβανόμενες εκφορτίσεις

Το είδος της απόκρισης των νευρώνων σε εκπολωτικό παλμό μακράς διάρκειας αποτελεί δείκτη της διεγερσιμότητάς τους. Με την εφαρμογή παρατεταμένων εκπολωτικών παλμών αυξανόμενου πλάτους, το δυναμικό της μεμβράνης των νευρώνων φτάνει τον ουδό και πυροδοτείται συστοιχία δυναμικών ενεργειών. Οι πυραμιδικοί νευρώνες με βάση την απόκρισή τους σε εφαρμοζόμενους παλμούς χαμηλού πλάτους (0,1-0,3 nA) διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: νευρώνες που αποκρίνονται με συνεχόμενα μονήρη δυναμικά ενέργειας (Εικ. 39Α, α1) και νευρώνες που αποκρίνονται με ριπές δυναμικών ενέργειας (Εικ. 39Α, α2). Ως ριπή δυναμικών ενέργειας ορίζεται ομάδα 2-3 δυναμικών ενέργειας που πυροδοτούνται με υψηλή συχνότητα (περί το 1kHz) κατά την αρχική φάση μιας μακράς εκπόλωσης. Στον κοιλιακό ιππόκαμπο, αντίθετα με τον ραχιαίο, μεγάλο ποσοστό των πυραμιδικών νευρώνων ανταποκρίνεται με ριπές σε μικρά πλάτη εφαρμοζόμενου εκπολωτικού ρεύματος (Kouvaras et al., *in preparation*). Αξίζει να σημειωθεί ότι ένας νευρώνας ο οποίος ανταποκρίνεται με μονήρη δυναμικά ενεργειών σε χαμηλά πλάτη ρεύματος μπορεί να εμφανίσει υψηλής συχνότητας πρότυπο πυροδότησης (ριπή) μετά από εφαρμογή εκπολωτικού ρεύματος μεγάλου πλάτους.

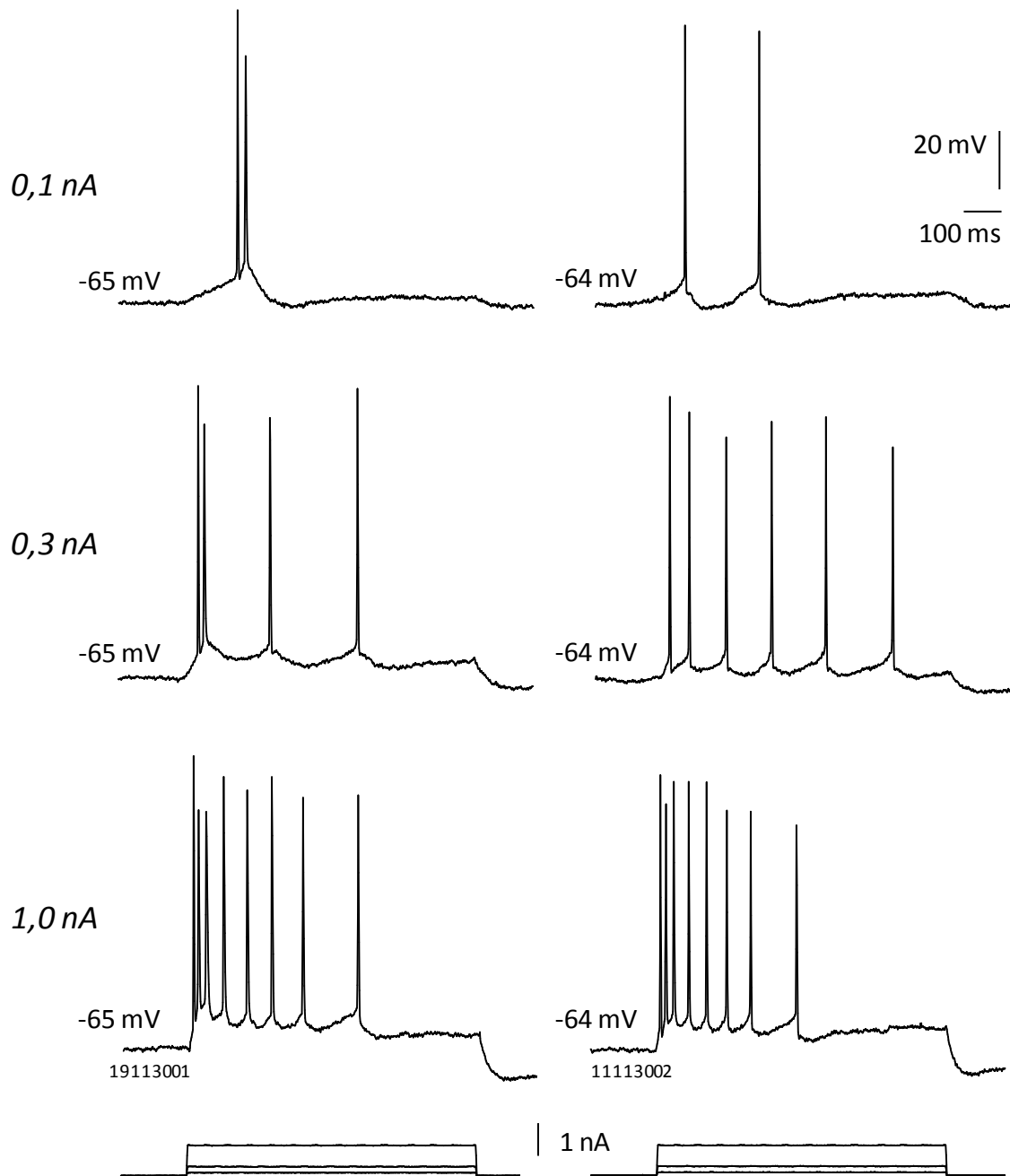
Στην πλειονότητα των πυραμιδικών νευρώνων της CA1 περιοχής του υποκάμπου παρατηρείται το φαινόμενο της εξοικείωσης (accommodation) κατά το οποίο η συχνότητα της συστοιχίας των δυναμικών ενεργειών κατά τη διάρκεια του εκπολωτικού παλμού προοδευτικά μειώνεται, μέχρι την παύση των δυναμικών ενεργειών πριν τη λήξη του παλμού (Εικ. 39Β, β1). Βεβαίως, υπάρχουν νευρώνες οι οποίοι δεν παρουσιάζουν το φαινόμενο της εξοικείωσης (non-accommodating neurons, Εικ. 39Β, β2). Ανεξαρτήτως της παρουσίας ή όχι του φαινομένου της εξοικείωσης, η εκφόρτιση των πυραμιδικών νευρώνων χαρακτηρίζεται από το φαινόμενο της προσαρμογής (spike frequency adaptation) κατά το οποίο παρατηρείται προοδευτική μείωση της συχνότητας εκφόρτισης δυναμικών ενεργειών κατά τη διάρκεια του εκπολωτικού παλμού.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, ένας πυραμιδικός νευρώνας μπορεί να χαρακτηρίζεται από οποιοδήποτε πρότυπο εκφόρτισης, μονήρη δυναμικά ενεργειών έναντι ριπών ή εξοικείωση έναντι μη εξοικείωσης. Παραδείγματα παρουσιάζονται στις Εικ. 39 και 40.



Εικόνα 39. Πρότυπα εκφόρτισης πυραμιδικών νευρώνων του κοιλιακού υποκάμπτου. Α. Μετά από ουδική διέγερση με χαμηλού πλάτους τετράγωνου παλμού (0,1 nA) οι πυραμιδικοί νευρώνες ανταποκρίνονται με δύο πρότυπα εκφόρτισης: μονήρη δυναμικά ενεργείας ($\alpha 1$) ή ριπές ($\alpha 2$) που αφορούν στην πρώιμη φάση εκπόλωσης. **Β.** Με εφαρμογή τετράγωνου παλμού μεγαλύτερου πλάτους (0,6 nA) παρατηρείται μεγαλύτερη εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης και παρατεταμένη εκφόρτιση των νευρώνων με ($\beta 1$) ή χωρίς εξοικείωση ($\beta 2$). Οι κυματομορφές των τετράγωνων εκπολωτικών παλμών έχουν παραληφθεί προς απλούστευση της εικόνας.

Προκειμένου να διερευνηθεί η διεγερσιμότητα των πυραμιδικών νευρώνων της CA1 περιοχής του κοιλιακού υποκάμπτου και να ελεγχθεί η επίδραση της φεντανύλης, αξιολογήθηκε η απόκρισή τους σε σειρά εκπολωτικών παλμών μακράς διάρκειας (500 ms) και αυξανόμενου πλάτους (0,1-1,0 nA). Ως εκ τούτου, έγινε καταμέτρηση των δυναμικών ενεργείας που πυροδοτούνται κατά τη διάρκεια των εκπολωτικών παλμών και ακολούθησε σύγκριση των καταμετρηθέντων δυναμικών μεταξύ των δύο πληθυσμών (Εικ. 41).



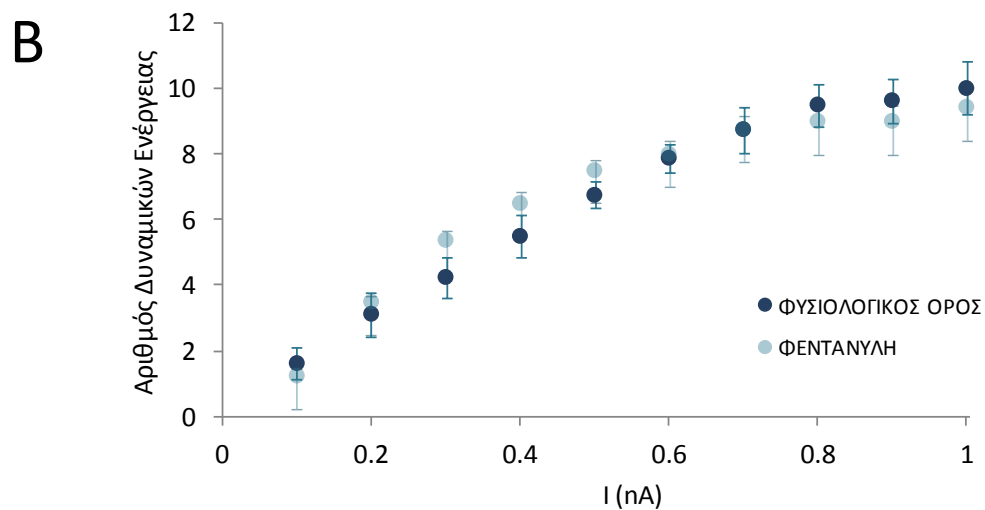
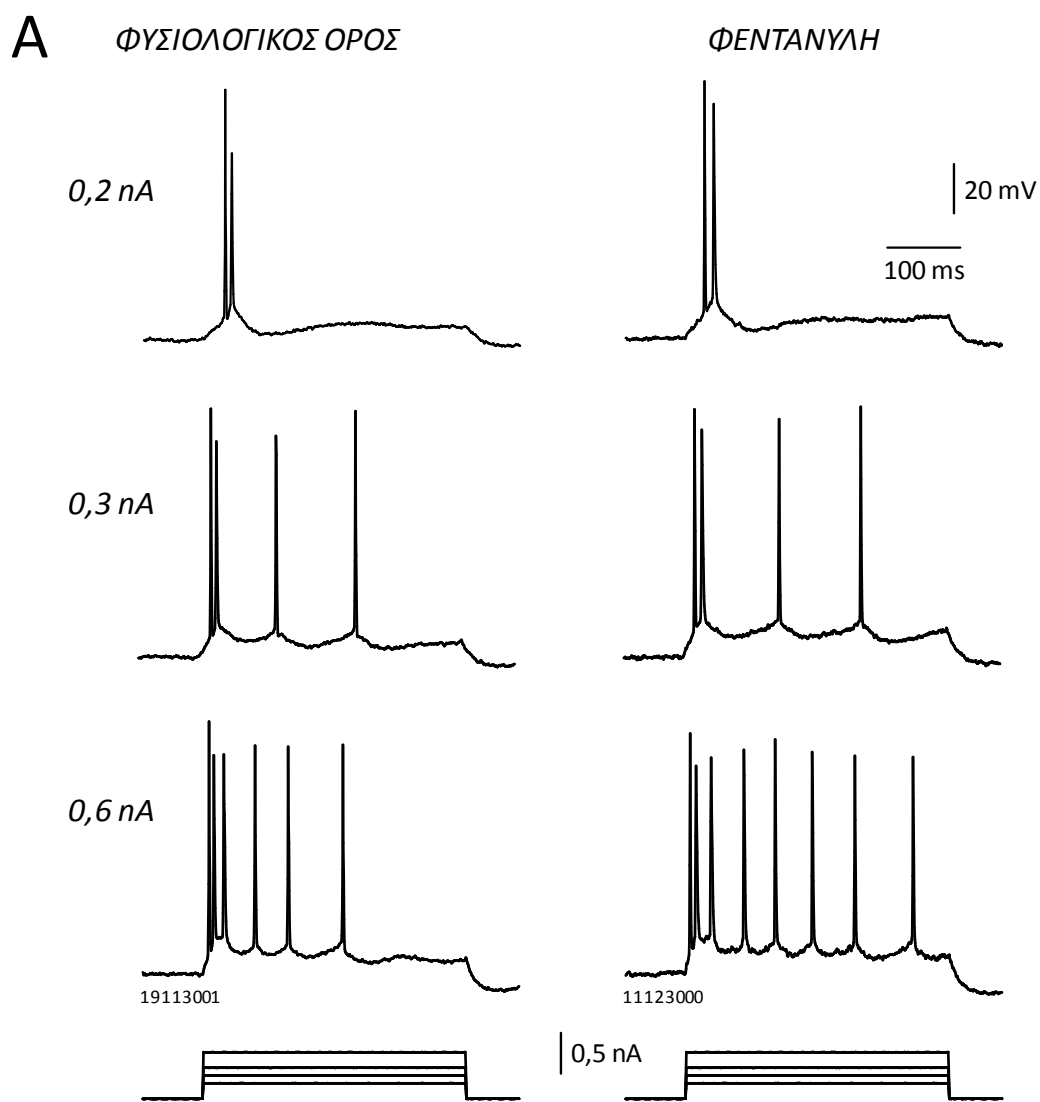
Εικόνα 40. Παραδείγματα προτύπων εκφόρτισης νευρώνων του κοιλιακού υποκάμπτου. Στην αριστερή στήλη εμφανίζεται νευρώνας που ανταποκρίνεται με ριπές στην αρχή της εκπόλωσης, ενώ στην δεξιά στήλη εμφανίζεται νευρώνας που ανταποκρίνεται με μονήρη δυναμικά ενεργείας. Αμφότεροι νευρώνες παρουσιάζουν το φαινόμενο της εξοικείωσης (παύση των δυναμικών ενεργείας πριν τη λήξη του παλμού) και το φαινόμενο της προσαρμογής (μείωση της συχνότητας εκφόρτισης). Στο κάτω μέρος της εικόνας οι κυματομορφές, η μία επί της άλλης, των εκπολωτικών τετράγωνων παλμών (0,1, 0,3, 1,0 nA).

Αναλυτικά, εφαρμόσθηκαν δέκα εκπολωτικοί τετράγωνοι παλμοί διάρκειας 500 ms και αυξανόμενου πλάτους από 0,1 έως 1,0 nA. Προσδιορίσθηκε ο μέσος όρος του αριθμού των δυναμικών ενεργείας και το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου για κάθε πλάτος εκπολωτικού παλμού και έγινε σύγκριση των μέσων όρων για κάθε πληθυσμό νευρώνων (φυσιολογικός ορός, $n=5$ έναντι φεντανύλης $n=5$). Στην ανάλυση δεν λήφθηκε υπόψη το πρότυπο εκφόρτισης των νευρώνων. Ο αριθμός των προκληθέντων δυναμικών ενεργείας δεν βρέθηκε να διαφέρει στατιστικά μεταξύ των δύο πληθυσμών νευρώνων (Εικ. 41B). Κατά συνέπεια, από τις παραπάνω μετρήσεις δεν φαίνεται να προκύπτει ότι η *in vivo* χορήγηση φεντανύλης επηρεάζει την σωματική διεγερσιμότητα των νευρώνων του κοιλιακού ιπποκάμπου.

2.2.2.7. Συναπτική διέγερση των πυραμιδικών νευρώνων της CA1 περιοχής του κοιλιακού ιπποκάμπου – Επίδραση της φεντανύλης.

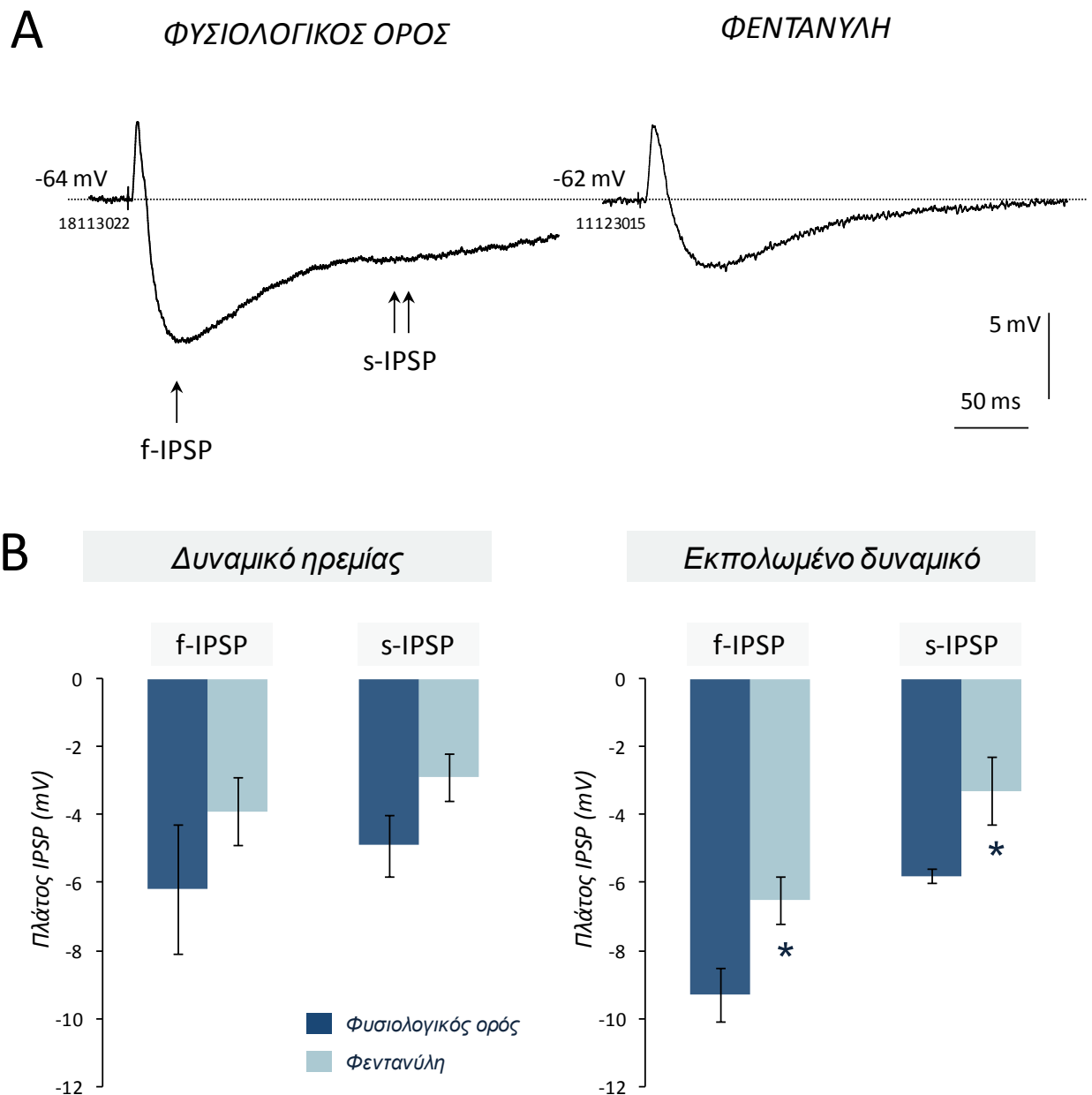
Η λειτουργική μελέτη της συναπτικής νευροδιαβίβασης στον ιππόκαμπο πραγματοποιήθηκε με ενδοκυττάρειες καταγραφές από πυραμιδικούς νευρώνες μετά από διέγερση των παράπλευρων ινών του Schaffer. Μια τυπική καταγραφή μετασυναπτικών δυναμικών συνίσταται από διεγερτικό μετασυναπτικό δυναμικό (excitatory postsynaptic potential, EPSP) ακολουθούμενο από ταχύ- (fast-, απλό βέλος) και αργό- (slow-, διπλό βέλος) υπερπολωτικό δυναμικό (inhibitory postsynaptic potential, IPSP; Εικ. 42A και 43A).

Εικόνα 41. Επίδραση της *in vivo* χορήγησης φεντανύλης σε παρατεταμένη νευρωνική εκφόρτιση. Α. Τυχαία παραδείγματα ηλεκτροφυσιολογικής καταγραφής νευρωνικών εκφορτίσεων σε νευρώνες πειραματόζων στα οποία χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός έναντι φεντανύλης. **Β.** Γραφική παράσταση του αριθμού των δυναμικών ενεργείας ως συνάρτηση του πλάτους του τετράγωνου εκπολωτικού παλμού σε νευρώνες πειραματόζων στα οποία χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός ($n=5$) έναντι φεντανύλης ($n=5$). Παρατηρείται πλατό της ανταπόκρισης των νευρώνων σε εκπολωτικούς παλμούς πλάτους μεγαλύτερου των 0,8 nA και στους δύο πληθυσμούς νευρώνων. Οι δύο πληθυσμοί δεν διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους.

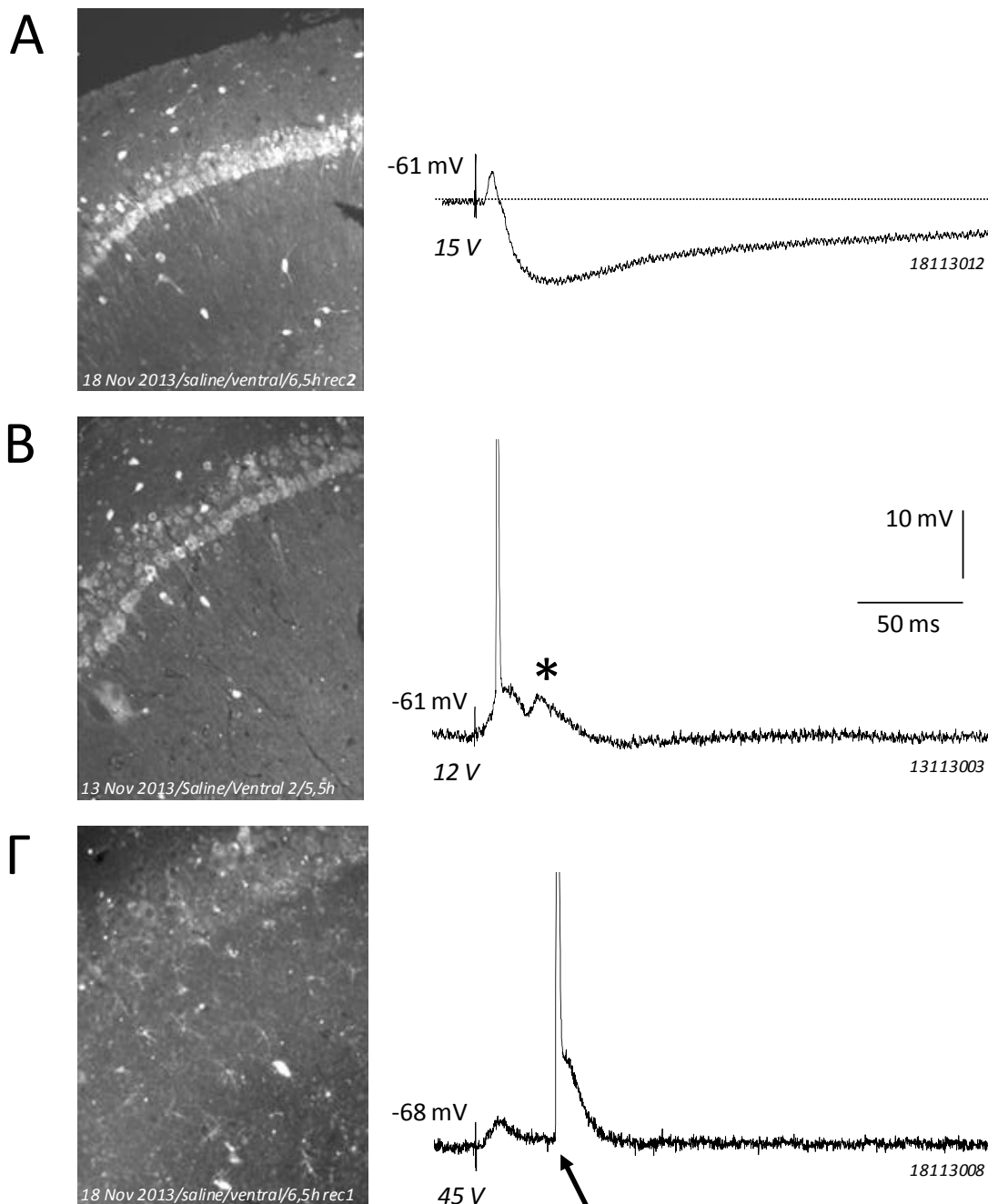


Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση της φεντανύλης στην ανασταλτική νευροδιαβίβαση στη CA1 περιοχή του υποκάμπου, προκλήθηκαν μετασυναπτικά δυναμικά με διέγερση των παράπλευρων ινών του Schaffer και μελετήθηκαν διάφοροι παράμετροι της ανασταλτικής διαβίβασης. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν το f-IPSP το οποίο χαρακτηρίζεται από χρόνο επίτευξης μέγιστου πλάτους $\approx 50\text{ms}$ και διαμεσολαβείται από υποδοχείς τύπου GABA_A , καθώς και το s-IPSP το οποίο χαρακτηρίζεται από χρόνο επίτευξης μέγιστου πλάτους $\approx 150\text{ms}$ και διαμεσολαβείται από υποδοχείς τύπου GABA_B (Εικ. 42Α, απλό και διπλό βέλος, αντίστοιχα). Το πλάτος των ανασταλτικών μετασυναπτικών δυναμικών υπολογίστηκε σε δύο διαφορετικά δυναμικά της κυτταρικής μεμβράνης, δηλαδή στο δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης $\approx -65\text{mV}$ και σε εκπολωμένο μεμβρανικό δυναμικό $\approx -59\text{mV}$. Στόχος της διατήρησης της κυτταρικής μεμβράνης σε εκπολωμένο δυναμικό, η οποία επετεύχθη με ενδοκυττάρια εφαρμογή συνεχούς ρεύματος (DC current injection), ήταν η αύξηση του πλάτους του IPSP και, επομένως, η ευχερέστερη μελέτη του, καθώς, όπως είναι γνωστό, η απομάκρυνση του δυναμικού της μεμβράνης από το δυναμικό αντιστροφής του IPSP έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του πλάτους του. Υπό αυτές τις συνθήκες καταγραφής, βρέθηκε ότι στο δυναμικό ηρεμίας τόσο το πλάτος του f-IPSP (φυσιολογικός ορός: $-6,2 \pm 1,9\text{ mV}$, $n=5$; φεντανύλη $-3,9 \pm 1,0\text{ mV}$, $n=7$; $p>0,05$) όσο και του s-IPSP (φυσιολογικός ορός: $-4,9 \pm 0,9\text{ mV}$, ($n=5$); φεντανύλη $-2,9 \pm 0,7\text{ mV}$, $n=4$; $p>0,05$) δεν διαφέρει μεταξύ των δύο πληθυσμών. Αντίθετα, σε μεμβρανικό δυναμικό εκπολωμένο με τη βοήθεια εφαρμογής συνεχούς ρεύματος DC, τόσο το πλάτος του f-IPSP (φυσιολογικός ορός: $-9,3 \pm 0,8\text{ mV}$, $n=6$; φεντανύλη $-6,5 \pm 0,7\text{ mV}$, $n=6$ $p<0,05$) όσο και του s-IPSP (φυσιολογικός ορός: $-5,8 \pm 0,2\text{ mV}$, $n=4$; φεντανύλη $-3,3 \pm 1,0\text{ mV}$, $n=4$ $p=0,05$) βρέθηκαν να διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους. Συνολικά, τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η φεντανύλη μειώνει την ανασταλτική διαβίβαση στην CA1 περιοχή του κοιλιακού υποκάμπου 24h μετά την *in vivo* χορήγησή της.

Εκτός από τις συνήθεις κυματομορφές που καταγράφονται μετά από διέγερση των παράπλευρων ινών του Schaffer (Εικ. 43Α), παρατηρήθηκαν, και άλλες μορφές συναπτικών απαντήσεων όπως πολυσυναπτική διέγερση (Εικ. 43Β) και αντίδρομα δυναμικά ενεργείας (Εικ. 43Γ).



Εικόνα 42. Η συναπτική αναστολή σε πυραμιδικούς νευρώνες της CA1 περιοχής του κοιλιακού υποκάμπου μειώνεται 24h μετά την *in vivo* χορήγηση φεντανύλης. **A.** Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα τυπικών κυματομορφών που καταγράφονται μετά από συναπτική διέγερση των παράπλευρων ινών του Schaffer σε νευρώνες πειραματοζώων στα οποία έχει χορηγηθεί φυσιολογικός ορός έναντι φεντανύλης. **B.** Γραφική απεικόνιση των συνοπτικών αποτελεσμάτων των f- και s-IPSP στο δυναμικό ηρεμίας και σε δυναμικό εκπολωμένο με την εφαρμογή συνεχούς ρεύματος (DC) στους δύο πληθυσμούς νευρώνων. Αν και παρατηρείται μείωση της αναστολής και στις δύο συνθήκες, σε στατιστική σημαντικότητα έφθασε η αναστολή μόνο στην περίπτωση του εκπολωμένου δυναμικού (βλ. συνημμένο κείμενο για λεπτομέρειες).



Εικόνα 43. Απαντήσεις συναπτικής διέγερσης στη CA1 περιοχή του κοιλιακού υποκάμπου. Απεικονίζεται ανοσοϊστοχημική έκφραση του GABA (αριστερά) σε τομές στις οποίες έχει προηγηθεί ηλεκτροφυσιολογική καταγραφή από πυραμιδικούς νευρώνες της CA1 περιοχής μετά από συναπτική διέγερση των παράπλευρων ινών του Schaffer (δεξιά). **A.** Τυπική κυματομορφή απαρτιζόμενη από διεγερτικό και ανασταλτικό μετασυναπτικό δυναμικό. **B.** Παράδειγμα πολυσυναπτικής διέγερσης (αστερίσκος). **Γ.** Παράδειγμα αντίδρομης διέγερσης (βέλος). Οι καταγραφές A-Γ πραγματοποιήθηκαν από την κοιλιακή μοίρα του υποκάμπου.

2.3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

2.3.1. Συνοπτική παρουσίαση των ευρημάτων

Ο στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της φεντανύλης στο πλήθος και τη λειτουργία των GABAεργικών νευρώνων στην κοιλιακή μοίρα του υποκάμπου. Ένα από τα βασικά στοιχεία που μελετήθηκαν ήταν η δυνατότητα διενέργειας ηλεκτροφυσιολογικών και ανοσοϊστοχημικών πειραμάτων στο ίδιο ιστοτεμάχιο με σκοπό τη συσχέτιση μεταξύ της GABAεργικής αναστολής με το πλήθος των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων αλλά και την επίδραση της φεντανύλης σε αυτούς τους δείκτες.

Προς την κατεύθυνση αυτή, παρασκευάσθηκαν φέτες υποκάμπου και στη συνέχεια επώασθηκαν σε TENY όπου και παρέμειναν για 5-9 ώρες, έως ότου ολοκληρώθηκε ο ηλεκτροφυσιολογικός έλεγχος των μεμβρανικών ιδιοτήτων των πυραμιδικών νευρώνων και της συναπτικής ανασταλτικής διαβίβασης. Κατόπιν, οι φέτες κόπηκαν σε λεπτές τομές στις οποίες πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική χρώση για GABA και κατόπιν εντοπίστηκαν και καταμετρήθηκαν οι ενδονευρώνες οι οποίοι συνεισέφεραν στα ανασταλτικά συναπτικά δυναμικά που είχαν ήδη καταγραφεί ηλεκτροφυσιολογικά⁸⁹. Επίσης, σε γειτονικές τομές πραγματοποιήθηκε χρώση εωσίνης-αιματοξυλίνης για τον έλεγχο των γενικών ιστολογικών χαρακτηριστικών στην εκάστοτε τομή. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε πειραματόζωα στα οποία είχε χορηγηθεί *in vivo* φυσιολογικός ορός ή φεντανύλη. Συνοπτικά, τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι:

- η κοιλιακή μοίρα του υποκάμπου χαρακτηρίζεται, γενικά, από μεγαλύτερο αριθμό ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων σε σχέση με τη ραχιαία μοίρα, αν και η διαφορά δεν έφθασε σε στατιστική σημαντικότητα
- ο αριθμός των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων είναι αυξημένος μετά από επώαση σε TENY (1, xh) σε σχέση με τον αριθμό των νευρώνων που παρατηρείται μετά από άμεση μονιμοποίηση του ιστού (0h)
- η χορήγηση φεντανύλης μειώνει την GABAεργική ανασταλτική διαβίβαση και του αριθμού των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων στον κοιλιακό υπόκαμπο

Ο μεγαλύτερος αριθμός ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων που παρατηρήθηκε στην κοιλιακή, σε σχέση με τη ραχιαία, μοίρα βρίσκεται στην ίδια κατεύθυνση με προηγούμενες μελέτες της βιβλιογραφίας. Σύμφωνα με αυτές, το πλήθος των νευρώνων που εκφράζουν GAD mRNA⁵³ ή παρουσιάζουν ανοσοθετικότητα σε ασβεστιο-συνδεόμενες πρωτεΐνες (παρβαλβουμίνη, καλβιδίνη) και πεπτίδια (σωματοστατίνη, συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου και αγγειοδραστικό εντερικό παράγοντα)^{82,83} είναι, γενικά, μεγαλύτερο στην κοιλιακή μοίρα του ιπποκάμπου. Εξαιρέση αποτελεί η CA1 περιοχή στην οποία έχει αναφερθεί μεγαλύτερος αριθμός ανοσοθετικών στην παρβαλβουμίνη νευρώνων στη ραχιαία σε σχέση με την κοιλιακή μοίρα^{53,82}. Το εύρημα αυτό επαληθεύθηκε στην παρούσα μελέτη καθώς ο αριθμός των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων της CA1 περιοχής της ραχιαίας μοίρας βρέθηκε μεγαλύτερος από αυτόν της κοιλιακής.

Η διερεύνηση της κατανομής των GABAεργικών νευρώνων στις διάφορες περιοχές και σε όλες τις ομάδες (0, 1, xh) του ραχιαίου και του κοιλιακού ιπποκάμπου, αλλά και της επίδρασης της φεντανύλης στον πληθυσμό των GABAεργικών σε αυτές, βασίσθηκε στη δυνατότητα της μεθόδου να σημάνει αποκλειστικά τους GABAεργικούς νευρώνες. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε επέτρεψε την αξιόπιστη χρώση των GABAεργικών νευρώνων σε όλες τις περιοχές, στιβάδες και μοίρες του ιπποκάμπου, καθώς δεν χρώσθηκαν ούτε οι πυραμιδικοί νευρώνες του Αμμωνείου κέρατος ούτε και τα κοκκώδη κύτταρα της οδοντωτής έλικας, υποδηλώνοντας την ειδικότητα της μεθόδου. Βέβαια, χαρακτηριστική υπήρξε η ανοσοθετικότητα που ενίοτε περιέγραφε τόσο το περικάρυο των πυραμιδικών νευρώνων και των κοκκωδών κυττάρων όσο και αποφύσεις που παρατηρήθηκαν κυρίως στην ακτινωτή στιβάδα ευρήματα τα οποία συμφωνούν με τη βιβλιογραφία³⁹.

2.3.2. Επίδραση της φεντανύλης στην ανοσοθετικότητα του GABA

Τα αίτια της μείωσης του αριθμού των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων μετά από την *in vivo* χορήγηση φεντανύλης, δεν είναι γνωστά. Γενικά, η προσπάθεια ποσοτικοποίησης αποτελεσμάτων σε πειράματα ανοσοϊστοχημείας είναι παρακινδυνευμένη λόγω των πολλών παραγόντων που μπορούν να επηρεάσουν το τελικό αποτέλεσμα⁶⁸. Στην παρούσα μελέτη η μείωση του αριθμού των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων μπορεί να οφείλεται σε μείωση

των αντιγονικών θέσεων (εν προκειμένω του ενδοκυττάριου GABA) με επακόλουθη μείωση του ουδού ανίχνευσης (ευαισθησία της μεθόδου) και επομένως των καταμετρηθέντων νευρώνων. Εναλλακτικά, η χορήγηση φεντανύλης μπορεί να επιφέρει απώλεια νευρώνων όπως αυτή παρατηρείται κατά την επιληψία, την ισχαιμία και το τραύμα του εγκεφάλου⁸⁵.

Μέχρι στιγμής η τεχνική που χρησιμοποιείται από την πλειοψηφία των εργαστηρίων για τη μονιμοποίηση ιστών είναι αυτή της ενδοκαρδιακής έγχυσης⁴³. Μια τέτοια μέθοδος θα απέκλειε, όμως, τη δυνατότητα ηλεκτροφυσιολογικής καταγραφής και κατόπιν χρώσης της ίδιας τομής από την οποία έγινε η καταγραφή⁶². Η παρούσα μελέτη έδειξε, πως παρά την πολύωρη επώαση του ιστού σε TENY κατά τη διάρκεια των ηλεκτροφυσιολογικών πειραμάτων, η μορφολογία των νευρώνων του ιστού μετά την μονιμοποίησή του ήταν άρτια. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με τη διεθνή βιβλιογραφία όπου αναφέρεται ότι μονιμοποίηση με εμβάπτιση (immersion fixation) μπορεί να έχει ομοιογενές και υψηλής ποιότητας αποτέλεσμα, αντίστοιχο της ενδοκαρδιακής έγχυσης, σε τομές πάχους 1-2 mm^{32,59}. Δεδομένου ότι το πάχος των τομών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη δεν ξεπερνούσε τα 500 μm, η ικανοποιητική ποιότητα του αποτελέσματος της διαδικασίας που ακολουθήθηκε ήταν αναμενόμενη σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. Στην παρούσα εργασία ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στην ανάλυση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του GABA στην CA1 περιοχή καθώς εκεί υπήρχε η δυνατότητα συσχέτισης λειτουργικών και ανοσοϊστοχημικών δεδομένων.

Ένα άλλο σημαντικό εύρημα της παρούσας μελέτης ήταν ο μεγαλύτερος αριθμός ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων που ανιχνεύθηκε στην κοιλιακή μοίρα του υποκάμπου στο σύνολο του ιστού και σε όλες τις ομάδες επώασης σε TENY (0h, 1h, xh), αν και οι διαφορές μεταξύ του ραχιαίου και του κοιλιακού υποκάμπου δεν έφθασαν σε στατιστική σημαντικότητα. Στην παρούσα μελέτη δεν διερευνήθηκαν οι λόγοι για τους οποίους ο κοιλιακός υποκάμπος εμφάνισε μεγαλύτερο αριθμό ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων, ωστόσο στοιχεία από τη διεθνή βιβλιογραφία υποστηρίζουν αυτό το εύρημα. Καταρχάς, είναι γνωστό ότι η κοιλιακή μοίρα του υποκάμπου παρουσιάζει μεγαλύτερο αριθμό GABA νευρώνων σε σχέση με τη ραχιαία^{53,82,83}. Παρομοίως, σε πρόσφατη μελέτη του εργαστηρίου βρέθηκε μεγαλύτερος αριθμός ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων στην κοιλιακή μοίρα του

ιποκάμπου, σε σχέση με τη ραχιαία, σε δύο ομάδες που μελετήθηκαν (0h και 1h)^{120,121}. Είναι λοιπόν πιθανό, ο μεγαλύτερος αριθμός ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων που παρατηρήθηκε χη μετά την επώαση σε TENY στην κοιλιακή μοίρα του ιποκάμπου να οφείλεται στο γεγονός ότι αυτή η μοίρα του ιποκάμπου διαθέτει, εξ αρχής, μεγαλύτερο αριθμό νευρώνων. Ένα δεύτερο σημαντικό στοιχείο το οποίο στηρίζει την αριθμητική υπεροχή της κοιλιακής μοίρας σε ανοσοθετικούς στο GABA νευρώνες χη μετά την επώασή της σε TENY, αποτελεί η γνωστή από τη βιβλιογραφία μεγαλύτερη ανθεκτικότητα της μοίρας αυτής, σε σχέση με τη ραχιαία, στην ισχαιμία. Συγκεκριμένα, η αγγείωση που παρατηρείται στην κοιλιακή μοίρα του ιποκάμπου, μετά από perfusion με Indian ink σε επίμυς, είναι σημαντικά υψηλότερη σε σύγκριση με τη ραχιαία⁴⁴. Είναι λοιπόν πιθανόν, ως εκ της μεγαλύτερης αγγειακής άρδευσής της, η κοιλιακή μοίρα του ιποκάμπου να παρουσιάζει μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην ισχαιμία που επέρχεται κατά την εκτομή του ιποκάμπου και την παρασκευή των τομών. Τα αποτελέσματα αυτά στηρίζονται και από παλαιότερη μελέτη η οποία έδειξε ότι πρόκληση ισχαιμίας σε επίμυς μετά από παροδικό αποκλεισμό των καρωτιδικών αρτηριών επέφερε νέκρωση του 90% των νευρώνων της ραχιαίας έναντι 10% της κοιλιακής μοίρας του ιποκάμπου με ανάλογη επίπτωση στην λειτουργική συναπτική διαβίβαση της CA1 περιοχής⁷. Παρομοίως, πρόκληση ισχαιμίας σε επίμυς, μετά από 20λεπτο αποκλεισμό της εγκεφαλικής αιμάτωσης, επέφερε, 48 ώρες αργότερα, εξαφάνιση της προκλητής συναπτικής δραστηριότητας στη CA1 περιοχή της ραχιαίας μοίρας, αλλά καμία αντίστοιχη λειτουργική αλλαγή στην ίδια περιοχή της κοιλιακής μοίρας του ιποκάμπου⁵². Τα δεδομένα αυτά στηρίζουν τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα της κοιλιακής μοίρας που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη.

Τέλος, από τα αποτελέσματά μας προέκυψε πως, τόσο στη ραχιαία όσο και στην κοιλιακή μοίρα του ιποκάμπου, ο μέσος όρος του αριθμού των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων παρουσιάζει ένα κοινό, για τις δύο μοίρες, χαρακτηριστικό μοτίβο κατά το οποίο παρατηρείται σταδιακή αύξηση από τη 0h στη 1h και έπειτα στις χη. Τα αίτια αυτού του φαινομένου δεν είναι επακριβώς γνωστά καθώς είναι η πρώτη φορά που μελετάται η βιωσιμότητα των τομών παράλληλα με τη λειτουργικότητά τους για τόσο μεγάλο χρονικό διάστημα μετά την παρασκευή τους. Ενδείξεις ανάκαμψης του ιποκάμπου, όπως αναδιάταξη της δομής του κυτταροσκελετού (μικροσωλινίσκοι), εμφάνιση νέων συναπτικών στοιχείων (άκανθες, spines)

και αποκατάσταση της συναπτικής δραστηριότητας, έχουν παρατηρηθεί κατά την πρώτη ώρα μετά την εκτομή του υποκάμπου και την παρασκευή των τομών^{59,32}. Επιπλέον, θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι ο μειωμένος, αρχικά, αριθμός των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων, ο οποίος παρατηρείται κατά την 0h μετά την εκτομή του υποκάμπου, αντικατοπτρίζει μεταβολές παρόμοιες με αυτές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία κατά την πρόκληση ισχαιμίας. Συγκεκριμένα, μετά από 30λεπτη ισχαιμία έχει παρατηρηθεί παροδική και βραχύχρονη αύξηση της απελευθέρωσης του GABA στο φλοιό του εγκεφάλου⁷⁷. Στην παρούσα μελέτη, ανάλογη αύξηση της απελευθέρωσης του GABA κατά τη διάρκεια της εκτομής του ιστού, και της συνεπαγόμενης πιθανής παροδικής ισχαιμίας, θα μπορούσε να οδηγήσει σε μείωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του νευροδιαβιβαστή και, ως εκ τούτου, τη μείωση των αντιγονικών, προς ανοσοϊστοχημική χρώση, θέσεων με αποτέλεσμα την μείωση του αριθμού των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων που θα ήταν καταμετρήσιμοι στον ιστό. Τα στοιχεία από τη βιβλιογραφία είναι, ωστόσο, αντικρουόμενα καθώς υπάρχουν μελέτες οι οποίες υποστηρίζουν ότι οι GABA νευρώνες επιβιώνουν μετά από ισχαιμία⁵⁴.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δείχνουν ότι φέτες μονιμοποιημένες με εμβάπτιση μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ιστολογική και ανοσοϊστοχημική εξέταση μετά από την ηλεκτροφυσιολογική καταγραφή τους *in vitro*. Τα οφέλη αυτής της μεθοδολογικής προσέγγισης είναι ιδιαίτερα σημαντικά καθώς η νευρωνική λειτουργικότητα μπορεί να σχετιστεί άμεσα με διάφορους κυτταρικούς δείκτες και μηχανισμούς που σχετίζονται με τους δείκτες αυτούς.

2.3.3. Επίδραση της φεντανύλης στη λειτουργία των νευρώνων της CA1 περιοχής

Η χορήγηση φεντανύλης δεν επηρέασε τις μεμβρανικές ιδιότητες των πυραμιδικών νευρώνων της CA1 περιοχής του κοιλιακού υποκάμπου. Τόσο οι παθητικές (δυναμικό ηρεμίας, αντίσταση εισόδου, χρονική σταθερά) όσο και οι ενεργητικές (δυναμικό ενεργείας, μεθυπερπολωτικά δυναμικά, επαναλαμβανόμενες εκφορτίσεις) ιδιότητες έμειναν αμετάβλητες από την *in vivo* χορήγηση φεντανύλης. Τα αποτελέσματα αυτά ήταν αναμενόμενα καθώς οι πυραμιδικοί νευρώνες της CA1 περιοχής στερούνται οπιοειδών υποδοχέων¹⁰⁵.

Η χορήγηση φεντανύλης μείωσε τη μετασυναπτική αναστολή στη CA1 περιοχή του κοιλιακού ιπποκάμπου. Τόσο τα γρήγορα όσο και τα αργά μετασυναπτικά δυναμικά, τα οποία διαμεσολαβούνται από GABA_A και GABA_B υποδοχείς, αντίστοιχα⁸⁶, μειώθηκαν μετά την *in vivo* χορήγηση φεντανύλης.

Η μετασυναπτική αναστολή βρέθηκε μειωμένη τόσο στο δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης όσο και σε εκπολωμένο δυναμικό, έφθασε, όμως, σε στατιστική σημαντικότητα στη δεύτερη περίπτωση. Ένας λόγος για τη διαφοροποίηση αυτή είναι η μεγαλύτερη διακύμανση τιμών των ανασταλτικών δυναμικών στο δυναμικό ηρεμίας. Πράγματι, το πλάτος του συναπτικού δυναμικού επηρεάζεται από το δυναμικό της μεμβράνης με τρόπο ώστε να μειώνεται σε υπερπολωμένο μεμβρανικό δυναμικό, κοντά στο δυναμικό αντιστροφής του, και να αυξάνεται σε εκπολωμένο μεμβρανικό δυναμικό στο οποίο απομακρύνεται από το δυναμικό αντιστροφής του. Αυτό ισχύει τόσο για την GABA_A (δυναμικό αντιστροφής [Cl⁻] \approx -67mV) όσο και την GABA_B (δυναμικό αντιστροφής [K⁺] \approx -90mV) αναστολή. Επομένως, η διακύμανση των τιμών του πλάτους των ανασταλτικών δυναμικών πιθανόν να αντανακλά σε μεγάλο βαθμό την διακύμανση των τιμών του δυναμικού ηρεμίας του κάθε νευρώνα. Αντίθετα, όταν τα ανασταλτικά δυναμικά εξετάζονται σε νευρώνες με παρόμοιο δυναμικό, τότε η διακύμανση του πλάτους τους αντανακλά κυρίως τη λειτουργική αναστολή του νευρωνικού κυκλώματος που διεγείρεται στη φέτα. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης βρίσκονται προς την ίδια κατεύθυνση με τα δεδομένα που αφορούν την επίδραση της φεντανύλης στον ραχιαίο ιππόκαμπο⁶².

Αξίζει να σημειωθεί ότι γενικά το εύρος τιμών του πλάτους των ανασταλτικών μετασυναπτικών δυναμικών και το πλήθος των ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων ήταν προς την ίδια κατεύθυνση. Παρόλαυτα, υπήρξαν περιπτώσεις κατά τις οποίες τα ηλεκτροφυσιολογικά δεδομένα δε συμφωνούσαν με τα ανοσοϊστοχημικά, υπό την έννοια ότι παρόλο που καταγράφηκαν μεγάλοι πλάτους συναπτικές ανασταλτικές απαντήσεις δεν παρατηρήθηκε αντίστοιχα μεγάλος αριθμός ανοσοθετικών στο GABA νευρώνων στις αντίστοιχες τομές. Αυτό ίσως δικαιολογείται από το γεγονός ότι οι ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές πραγματοποιήθηκαν σε φέτες πάχους 500μm, ενώ η καταμέτρηση των ανοσοθετικών στο

GABA νευρώνων έγινε σε τομές πάχους 4μm. Επομένως, είναι πιθανό ότι ο αριθμός των νευρώνων που καταμετρήθηκαν είναι μόνον ενδεικτικός του συνολικού πληθυσμού των GABAεργικών νευρώνων της φέτας. Προκειμένου να υπάρχει πληρέστερη εικόνα των αποτελεσμάτων και να διαλευκανθούν τα αίτια της απόκλισης μεταξύ των λειτουργικών και των ανοσοϊστοχημικών δεδομένων, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί ανοσοϊστοχημική χρώση σε τομές που προέρχονται από όλο το πάχος της φέτας των 500μm, πράγμα το οποίο αποτελεί στόχο των μελλοντικών πειραμάτων του εργαστηρίου.

2.3.5. Λειτουργική σημασία των αποτελεσμάτων

Η αναλγητική αξία των οπιοειδών φαρμάκων στην κλινική πράξη είναι αδιαμφισβήτητη. Παρόλαυτα, η κλινική τους χρήση περιορίζεται λόγω της ανάπτυξης ανοχής και εξάρτησης. Επομένως, η μελέτη των προσαρμοστικών και πλαστικών αλλαγών που αναπτύσσονται στα νευρωνικά δίκτυα κατά τη χρόνια χρήση με οπιοειδή⁹⁸, αλλά και κατά την οξεία έκθεση σε αυτά¹¹⁹, αποτελεί αντικείμενο μεγάλης σημασίας. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το φαινόμενο της εξάρτησης μπορεί να εμφανισθεί στον άνθρωπο⁸ ή σε πειραματόζωα⁹⁵ ακόμα και μετά από μια και μόνον έκθεση σε οπιοειδές, ή μετά από βραχύχρονη έγχυση του φαρμάκου. Η διερεύνηση των επιδράσεων των οπιοειδών στον οργανισμό μετά από σύντομη έκθεσή του σε αυτά, που αποτέλεσε και το αντικείμενο της παρούσας μελέτης, μπορεί να βοηθήσει στην κατανόηση όχι μόνο των μηχανισμών που οδηγούν στην ανάπτυξη οξείας ανοχής, αλλά και εκείνων που διέπουν την μετάβαση από την οξεία στην χρόνια ανοχή⁴⁷. Επιπλέον, η έκθεση σε οπιοειδή μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια μνήμης σε χρήστες οπιοειδών⁴⁵ και σε αλλαγές των μνημονικών διεργασιών σε πειραματόζωα⁹⁰. Ο ιππόκαμπος, μια δομή άρρηκτα συνδεδεμένη με τη συναπτική πλαστικότητα και την διαμόρφωση μνημονικών εγγραμμάτων, έχει αποτελέσει επί μακρόν αντικείμενο μελέτης της έκθεσης σε οπιοειδή. Η παρούσα μελέτη δίνει στοιχεία μείωσης της GABAεργικής αναστολής 24 ώρες μετά από την οξεία έκθεση σε ένα ισχυρό οπιοειδές, ένα χρονικό σημείο κατά το οποίο η φεντανύλη εμφανίζει το μέγιστο της υπεραλγησίας¹⁸. Περαιτέρω πειράματα σχεδιασμένα για την αποσαφήνιση των μεταβολών που επέρχονται σε μοριακούς και κυτταρικούς μηχανισμούς αλλά και σε νευρωνικά δίκτυα, μπορούν να

βοηθήσουν στην κατανόηση των πρώιμων σταδίων ανάπτυξης ανοχής στην αναλγητική δράση των οπιοειδών.

Η κατανόηση, βέβαια, αυτών των μηχανισμών στον ιππόκαμπο είναι ιδιαίτερα δυσχερής καθώς η οργάνωση του GABAεργικού συστήματος στη δομή αυτή παρουσιάζει εξαιρετική πολυπλοκότητα η οποία οφείλεται στην μεγάλη ετερογένεια των GABAεργικών νευρώνων όσον αφορά στη μορφολογία, τη θέση τους, ή την συνύπαρξη του GABA με άλλους ενδοκυττάριους δείκτες⁶⁰. Αν και οι GABAεργικοί νευρώνες συνιστούν μόνο το 10% περίπου του συνολικού πληθυσμού των νευρώνων στον ιππόκαμπο^{60,110} είναι οι κύριοι ρυθμιστές των ταλαντώσεων του ιπποκάμπου καθώς στρατολογούν και συγχρονίζουν πυραμιδικούς νευρώνες. Επομένως, η πολυμορφία τους και κυρίως η πολυπλοκότητα των διασυνδέσεών τους καθιστά δυσχερή κάθε προσπάθεια επεξήγησης των παραγόντων εκείνων που μπορούν να επηρεάσουν τη λειτουργία τους. Η επίδραση εξωγενών παραγόντων, εν προκειμένω της φεντανύλης, προσθέτει ακόμα ένα βαθμό πολυπλοκότητας στο σύστημα, η κατανόηση του οποίου είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με:

- τον εντοπισμό των οπιοειδικών υποδοχέων σε συγκεκριμένες κατηγορίες ενδονευρώνων
- τις ενδογενείς ιδιότητες αυτών των ενδονευρώνων και την πιθανή μεταβολή τους μετά την έκθεσή τους στο οπιοειδές, αλλά και
- τη λειτουργική επικοινωνία τους με άλλους νευρώνες του ιπποκάμπου (ενδονευρώνες και πυραμιδικούς) η οποία υπόκειται σε δυναμική αλλαγή μετά την έκθεσή τους στο οπιοειδές

Η κατανομή των οπιοειδικών υποδοχέων κατά μήκος του επιμήκους άξονα του ιπποκάμπου παραμένει, εν πολλοίς, ανεξερεύνητη όπως ανεξερεύνητη παραμένει και η επίδραση των οπιοειδών κατά μήκος της δομής του ιπποκάμπου. Η παρούσα εργασία παρέχοντας στοιχεία της επίδρασης εξωγενώς χορηγούμενης φεντανύλης στον κοιλιακό ιππόκαμπο, παρουσιάζει ακόμα μια πτυχή της διαφοροποίησης των δύο μοιρών του ιπποκάμπου και ένα ακόμα πλαίσιο ερμηνείας για να κατανοηθεί η δράση των οπιοειδών σε κοιλιακό και ραχιαίο ιπποκάμπο.

2.4 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Akai F, Yanagihara T. Identity of the dorsal hippocampal region most vulnerable to cerebral ischemia. *Brain Res.* 1993 Feb 12;603(1):87-95.
2. Albutt C. On the abuse of hypodermic injections of morphia. *Practitioner.* 1870;5:327–331.
3. Amaral D.G. and Witter M.P. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. 1989: 31(3): 571-591.
4. Anand K.J., Willson D.F., Berger J., Harrison R., Meert K.L., Zimmerman J., Carcillo J., Newth C.J., Prodhan P., Dean J.M. and Nicholson C. Tolerance and withdrawal from prolonged opioid use in critically ill children. *Pediatrics.* 2010: 125(5):e1208-25.
5. Andersen et al., 2007. *The Hippocampus book* Edited by Per Andersen, Richard Morris, David Amaral, Tim Bliss, and John O'Keefe, Oxford Neuroscience series.
6. Arvidsson U. et al. Distribution and Targeting of a μ -opioid receptor (MOR1) in brain and spinal cord. *J. Neurosci.* 1995: 15: 3328-3341.
7. Ashton D., Van Reempts J., Haseldonckx M. et al. Dorsal-ventral gradient in vulnerability of CA1 hippocampus to ischemia: a combined histological and electrophysiological study. *Brain Res* 1989: 487(2): 368–372.
8. Azaralosa, J.L., Stitzer, M.L., Greenwald, M.K. Opioid physical dependence development: effects of single versus repeated morphine pretreatments and of subjects' opioid exposure history. *Psychopharmacology (Berl.)* 1994: 114, 71–80.
9. Bancroft J.D., Stevens A. (1996) *Theory and Practice of Histological Techniques.* Edinburgh, Churchill Livingstone, pp 766.
10. Bean B. The action potential in mammalian central neurons. *Nature Reviews Neuroscience*, 2007: 8: 451-465.
11. Benke D., Zemoura K. and Maier P.J. Modulation of cell surface GABA(B) receptors by desensitization, trafficking and regulated degradation. *World J Biol Chem.* 2012: 26;3(4):61-72.

12. Blasco-Ibáñez, Martínez-Guijarro F. J., Freund T. F. Enkephalin-containing interneurons are specialized to innervate other interneurons in the hippocampal CA1 region of the rat and guinea-pig. *European Journal of Neuroscience*, 1998; 10: 1784-1795.
13. Brown D.A. and Adams P.R. Muscarinic suppression of a novel sensitive K⁺ current in a vertebrate neuron. *Nature (Lond)*, 1980; 283: 673-676.
14. Busatto G.F. Structural and functional neuroimaging studies in major depressive disorder with psychotic features: a critical review. *Schizophr Bull.* 2013;39(4):776-86.
15. Cage TA, Louie JD, Liu SR, Alvarez-Buylla A, Gupta N, Hyer J.; Distinct patterns of human medulloblastoma dissemination in the developing chick embryo nervous system. *Clin Exp Metastasis*. 2012 Apr;29(4):371-80. doi: 10.1007/s10585-012-9456-6. Epub 2012 Feb 10.
16. Capogna M., Gähwiler B. H., Thompson S. M. Mechanism of μ -opioid receptor-mediated presynaptic inhibition in the rat hippocampus. *Journal of Physiology*, 1993; 470: 539-558.
17. Casanova M.F. and Rothberg B. Shape distortion of the hippocampus: a possible explanation of the pyramidal cell disarray reported in schizophrenia. *Schizophr Res.* 2002; 1;55(1-2):19-24.
18. Celerier, E., Rivat, C., Jun, Y., Laulin, J.P., Larcher, A., Reynier, P., Simonnet, G. Long-lasting hyperalgesia induced by fentanyl in rats: preventive effect of ketamine. *Anesthesiology* 2000; 92, 465–472.
19. Chalifoux J.R. Carter A.G. GABAB receptor modulation of synaptic function. *Curr Opin Neurobiol.* 2011; 21(2):339-44.
20. Chamberland S. and Topolnik L. Inhibitory control of hippocampal inhibitory neurons. *Front Neurosci.* 2012 Nov 14;6:165.
21. Chambers R.A. Adult hippocampal neurogenesis in the pathogenesis of addiction and dual diagnosis disorders. *Drug Alcohol Depend.* 2013;1;130(1-3):1-12.
22. Corkin S., Amaral D.G., González R.G., Johnson K.A. and Hyman B.T. H. M.'s medial temporal lobe lesion: findings from magnetic resonance imaging. *J Neurosci.* 1997; 15; 17:3964-79.

23. Craig K.D. "Emotions and psychobiology," in Wall and Mellzack's Textbook of Pain, S. B. McMahon and M. Koltzenburg, Eds., pp. 231–240, Elsevier, London, UK, 5th edition, 2006.
24. de Kloet ER, Oitzl MS, Joëls M. Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci.* 1999; 22:422-6.
25. Delfs J.M. et al. Expression of mu opioid receptor mRNA in rat brain: an in situ hybridization study at the single cell level. *J. Comp. Neurol.* 1994; 345: 46-68.
26. Drake C.T. and Milner T. A. Mu opioid receptors are in discrete hippocampal interneuron subpopulations. *Hippocampus* 2002; 12: 119-136.
27. Drake C.T. and Milner T. A. Mu opioid receptors are in somatodendritic and axonal compartments of GABAergic neurons in rat hippocampal formation. *Brain Res.* 1999;849: 203-215.
28. Eisch A.J. and Petrik D. Depression and hippocampal neurogenesis: a road to remission? *Science.* 2012; 5:338(6103):72-5.
29. Fanselow M.S. and Dong H.W. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron.* 2010; 14:65(1):7-19.
30. Faulkner HJ, Traub RD, Whittington MA. Anaesthetic/amnesic agents disrupt beta frequency oscillations associated with potentiation of excitatory synaptic potentials in the rat hippocampal slice. *Br.J.Pharmacol* 1999; 128:1813–1825.
31. Faulkner HJ, Traub RD, Whittington MA. Disruption of synchronous gamma oscillations in the rat hippocampal slice: a common mechanism of anaesthetic drug action. *Br.J.Pharmacol* 1998; 125:483–492.
32. Fiala J., Kirov S., Feinberg M. et al. Timing of Neuronal and Glial Ultrastructure Disruption during brain Slice Preparation and Recovery In Vitro'. *The Journal of Comparative Neurology*, 2003; 465:90–103.
33. Fichna J., Janecka A., Costentin J. and Do Rego J.C. The endomorphin system and its evolving neurophysiological role. *Pharmacol Rev.* 2007; 59(1):88-123.
34. Fishell G. and Rudy B. Mechanisms of inhibition within the telencephalon: "where the wild things are" *Annu Rev Neurosci.* 2011; 34:535-67.

35. Flagel S.B., Waselus M., Clinton .SM., Watson S.J. and Akil H. Antecedents and consequences of drug abuse in rats selectively bred for high and low response to novelty. *Neuropharmacology*. 2014;76 Pt B:425-36.
36. Füzezi M., Rácz B., Eliás B., Halasy K. Enkephalinergic nerve terminals target inhibitory interneurons in the rat hippocampus. *NeuroReport*, 1997; 8: 2471-2475.
37. Fujisawa S., Amarasingham A., Harrison M.T. and Buzsaki G. Behavior-dependent short-term assembly dynamics in the medialprefrontalcortex. *Nature Neuroscience*; 2008: 11, 823–833.
38. Fuster-Matanzo A, Llorens-Martín M, de Barreda EG, Ávila J, Hernández F.; Different susceptibility to neurodegeneration of dorsal and ventral hippocampal dentate gyrus: a study with transgenic mice overexpressing GSK3 β *PLoS One*. 2011;6(11):e27262. doi: 10.1371/journal.pone.0027262. Epub 2011 Nov 3.
39. Gamrani H., Onteniente B., Seguela P., Geffard M. and Calas A. Gamma-aminobutyric acid-immunoreactivity in the rat hippocampus. A light and electron microscopic study with anti-GABA antibodies. *Brain Res*. 1986; 29; 364(1):30-8.
40. Giannopoulos P. and Papatheodoropoulos C. Effects of m-opioid receptor modulation on the hippocampal network activity of sharp wave and ripples. *British Journal of Pharmacology* 2013; 168: 1146–1164.
41. Golomb, D., Yue, C. & Yaari, Y. Contribution of persistent Na⁺ current and M-type K⁺ current to somatic bursting in CA1 pyramidal cells: combined experimental and modeling study. *J. Neurophysiol*. 2006; 96: 1912–1926.
42. Grace A.A. Dopamine system dysregulation by the hippocampus: implications for the pathophysiology and treatment of schizophrenia, *Neuropharmacology*. 2012: 62(3):1342-8.
43. Gregory J.G., Daryl R.K., William S. Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents. *J. Vis. Exp*, 2012: 65, e3564.
44. Grivas I., Michaloudi H., Batzios Ch. et al. V ascular network of the rat hippocampus is not homogeneous along the septotemporal axis. *Brain Research*, 2003: 971 245–249.

45. Guera D., Sole A., Cami J., Tobena, A. Neuropsychological performance in opiate addicts after rapid detoxification. *Drug Alcohol Depend.* 1987; 20, 261–270.
46. Gur R.E., Keshavan M.S. and Lawrie S.M. Deconstructing psychosis with human brain imaging. *Schizophr Bull.* 2007; 33(4):921-31.
47. Harris, A.C., Gewritz, J.C. Acute opioid dependence: characterizing the early adaptations underlying drug withdrawal. *Psychopharmacology* 2005; 178, 353–366.
48. Heckers S. and Konradi C. GABAergic mechanisms of hippocampal hyperactivity in schizophrenia. *Schizophr Res.* 2015; 167(1-3):4-11.
49. Inan M., Petros T.J. and Anderson S.A. Losing your inhibition: linking cortical GABAergic interneurons to schizophrenia. *Neurobiol Dis.* 2013; 53:36-48.
50. Jacob T.C., Moss S.J. and Jurd R. GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition *Nat Rev Neurosci.* 2008; 9(5):331-43.
51. Javitt D.C. and Zukin S.R. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 1991; 148(10):1301-8.
52. Jensen M. S., Lambert J.D.C, Johansen F. F. Electrophysiological recordings from rat hippocampus slices following in vivo brain ischemia. *Brain* 1991; 554(1-2): 166-175.
53. Jinno S., Aika Y., Fukuda T., Kosaka T. Quantitative analysis of GABAergic neurons in the mouse hippocampus, with optical dissector using confocal laser scanning microscope. *Brain Res.* 1998; 814(1-2): 55-70.
54. Johansen FF. Interneurons in rat hippocampus after cerebral ischemia. Morphometric, functional, and therapeutic investigations. *Acta Neurol Scand Suppl.* 1993; 150: 1-32.
55. Kandel E.R., Schwartz J.H. and Jessel T.M. Νευροεπιστήμη και Συμπεριφορά. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 1999.
56. Kapitzke D, Vetter I, Cabot PJ.; Endogenous opioid analgesia in peripheral tissues and the clinical implications for pain control. *Ther Clin Risk Manag.* 2005 Dec;1(4):279-97.
57. Keay K. and Bandler R. “Emotional and behavioral significance of the pain signal and the role of the midbrain periaqueductal gray (PAG),” in *Science of Pain*, A. I. Basbaum and M. C. Bushnell, Eds., pp. 627–634, Elsevier, San Diego, Calif, USA, 2009.

58. Kepecs A. and Fishell G. Interneuron cell types are fit to function, *Nature*. 2014;505:318-26.
59. Kirov S., Sorra K. and Harris K. Slices Have More Synapses than Perfusion-Fixed Hippocampus from both Young and Mature Rats. *The Journal of Neuroscience* 1999: 19(8):2876–2886.
60. Klausberger T. and Somogyi P. Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* 2008;4:321(5885):53-7.
61. Klausberger T. Magill P.J., Márton L.F., Roberts J.D., Cobden P.M., Buzsáki G. and Somogyi P. Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo. *Nature* 2006: 15:441(7095):902.
62. Kouvaras E., Asprodini E.K. et al., Fentanyl treatment reduces GABAergic inhibition in the CA1 area of the hippocampus 24 h after acute exposure to the drug. *Neuropharmacol.* 2008: 55: 1172-1182.
63. Lavenex P, Lavenex PB, Bennett JL, Amaral DG; Postmortem changes in the neuroanatomical characteristics of the primate brain: hippocampal formation. *J Comp Neurol*. 2009 Jan 1;512(1):27-51. doi: 10.1002/cne.21906.
64. Lawrence J.J. Cholinergic control of GABA release: emerging parallels between neocortex and hippocampus. *Trends Neurosci.* 2008: 31(7):317-27.
65. Le Merrer J., Becker J.A., Befort K., Kieffer B.L. Reward processing by the opioid system in the brain. *Physiol Rev.* 2009: 89(4):1379-412.
66. Lee M., Silverman S.M., Hansen H., Patel V.B. and Manchikanti L. A comprehensive review of opioid-induced hyperalgesia. *Pain Physician.* 2011: 14(2):145-61.
67. Lee P. H. K., Obie J., Hong J.-S. Opioids induce convulsions and wet dog shakes in rats: Mediation by hippocampal mu, but not delta or kappa opioid receptors. *The Journal of Neuroscience*, 1989; 9 (2): 692-697.
68. Leong A.S. and Leong T.Y. Standardization in immunohistology. *Methods Mol Biol* 2011;724:37-68.

69. Lisman J.E., Pi H.J., Zhang Y. and Otmakhova N.A. A thalamo-hippocampal-ventral tegmental area loop may produce the positive feedback that underlies the psychotic break in schizophrenia, *Biol Psychiatry*. 2010; 68(1):17-24.
70. Love R. Two hit hypothesis for temporal lobe epilepsy. *Lancet Neurol*. 2005; 4(8):458.
71. Maccaferri G. Properties of the hyperpolarization-activated current in rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *J. Neurophysiol*. 1993; 69:(6) 2129-2136.
72. Madison D.V. and Nicoll R.A. Control of the repetitive discharge of rat CA1 pyramidal neurons in vitro. *J. Physiol*, 1984;354: 319-331.
73. Madison D.V., Nicoll R.A. Enkephalin hyperpolarizes interneurons in the rat hippocampus, *Journal of Physiology*, 1988; 398: 123-130.
74. Mansouri F.A., Motamedi F. and Fathollahi Y. Chronic in vivo morphine administration facilitates prime bursts-induced long term potentiation of Schaffer collateral A1 synapses in hippocampal slices in vitro *Brain Res* 1999; 815: 419-423.
75. Maras PM, Molet J, Chen Y, Rice C, Ji SG, Solodkin A, Baram TZ. Preferential loss of dorsal-hippocampus synapses underlies memory impairments provoked by short, multi-modal stress. *Mol Psychiatry*. 2014 Jul;19(7):745. doi: 10.1038/mp.2014.64.
76. Martin K.C. and Kosik K.S. Synaptic tagging — who's it? *Nature Reviews Neuroscience* 2002; 3: 813-820.
77. Matsumoto K, Lo Eng H., Allen R. P. et al. Secondary Elevation of Extracellular Neurotransmitter Amino Acids in the Reperfusion Phase Following Focal Cerebral Ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; 16(1): 114-124.
78. McQuiston A. R. Layer selective presynaptic modulation of excitatory inputs to hippocampal cornu Ammon 1 by mu-opioid receptor activation. *Neuroscience* 2008; 151: 209-221.
79. McQuiston A. R. Mu Opioid receptor activation normalizes temporo-ammonic pathway driven inhibition in hippocampal CA1. *Neuropharmacology*, 2011; 60 (2-3): 472-479.
80. Nieuwenhuys R., Voogd J. and Huijzen C. *The Human Central Nervous System A Synopsis and Atlas*, Springer, 2007.

81. Nieuwenhuys R., Voogd J., Van Huijen C. Το κεντρικό νευρικό σύστημα του ανθρώπου. Σύνοψη και άτλαντας. Εκδόσεις Κυριακίδη, 1997.
82. Nomura T., Fukuda T., Aika Y., et al. Laminar distribution of non-principal neurons in the rat hippocampus, with special reference to their compositional difference among layers. *Brain Research*, 1997; 764: 197-204.
83. Nomura T., Fukuda T., Aika Y., Heiymann C. W., Emson P. C., Kobayashi T., Kosaka T. Distribution of nonprincipal neurons in the rat hippocampus, with special reference to their dorsoventral difference. *Brain Research*, 1997; 751 (1): 64-80.
84. O'Neill J., Pleydell-Bouverie B., Dupret D., Csicsvari J. Play it again: reactivation of waking experience and memory. *Trends Neurosci* 2010; 33: 220–229.
85. Obenaus A., Esclapez M. and Houser C. R. Loss of Glutamate Decarboxylase mRNA-containing Neurons in the Rat Dentate Gyrus following Pilocarpine-induced Seizures. *J. Neuroscience* 1993; 10: 4470-4485.
86. Papatheodoropoulos C, Asprodini E, Nikita I et al. Weaker synaptic inhibition in CA1 region of ventral compared to dorsal rat hippocampal slices. *Brain Res*, 2002; 948: 117-121.
87. Paxinos G. and Watson C. In: *The rat brain in stereotaxic co-ordinates*. New York: Academic, 1986.
88. Pilowsky L.S., Bressan R.A., Stone J.M., Erlandsson K., Mulligan R.S., Krystal J.H. and Ell P.J. First in vivo evidence of an NMDA receptor deficit in medication-free schizophrenic patients. *Mol Psychiatry* 2006; 11(2):118-9.
89. Pippidou N., Kouvaras E., Sinani O. et al. "GABA immunohistochemistry in the rat hippocampus- comparison between perfusion and immersion fixation". Abstracts of the 26th Annual Meeting of the Hellenic Society for Neuroscience, 2013: p.88.
90. Pu L., Bao G.B., Xu N.J., Pei G. Hippocampal long-term potentiation is reduced by chronic opiate treatment and can be restored by re-exposure to opiates. *J. Neurosci.* 2002;22:1914-1921.
91. Qureshi B., Scarff J.R. and Lippmann S. Alcohol Use Disorder And Genetic Variability In The Opioidergic System. *The Internet Journal of Psychiatry*. 2015; 4(1): 1-3.

92. Rezai X., Kieffer B.L., Roux M.J. and Massotte D. Delta Opioid Receptors Regulate Temporoammonic-Activated Feedforward Inhibition to the Mouse CA1 Hippocampus. *PLoS ONE* 2013; 8(11): e79081.
93. Salmanzadeh F., Fathollahi Y., Semnanian S. and Shafizadeh M. Dependence on morphine impairs the induction of long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Brain Res.* 2003; 965: 108-113.
94. Schmidt U., Kaltwasser S.F. and Wotjak C.T. Biomarkers in posttraumatic stress disorder: overview and implications for future research. *Disease Markers* 2013; 35: 43-54.
95. Schulteis, G., Morse, A.C., Liu, J. Conditioning process contribute to severity of naloxone precipitated withdrawal from acute opioid dependence. *Psychopharmacology* 2004: 175, 463–472.
96. Scoville W.B. and Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1957: 20(1):11-21.
97. Sendrowski K. and Sobaniec W. Hippocampus, hippocampal sclerosis and epilepsy. *Pharmacol Rep.* 2013; 65(3):555-65.
98. Shaw-Lutcham, T.Z., Barrit, M., Wallace, T., Gilden, L., Zachariou, V., Impy, S., Duman, R.S., Storm, D., Nestler, E.L. Regional and cellular mapping of Camp response element-mediated transcription during naltrexone precipitated morphine withdrawal. *J. Neurosci.* 2002; 22, 3663–3672.
99. Simons L.E., Elman I. and Borsook D. Psychological processing in chronic pain: a neural systems approach. *Neurosci Biobehav Rev.* 2014; 39:61-78.
100. Sloviter R.S. Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy. *Science.* 1987; 2; 235(4784):73-6.
101. Somogyi P. and Klausberger T. Defined types of cortical interneuron structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol.* 2005; 562:9-26.
102. Sotiriou E., Papatheodoropoulos C., and Angelatou F. “Differential Expression of γ -Aminobutyric acid-A receptor Subunits in Rat dorsal and Ventral Hippocampus”. *Journal of Neuroscience Research*, 2005; 82:690-700.

103. Storm J.F. An after-hyperpolarization of medium duration in rat hippocampal pyramidal cells. *Biophys. J.* 1989; 51: 65a.
104. Storm J.F. Potassium currents in hippocampal pyramidal neurons. *Progress in Brain Res*, 1990; 83 (12): 161-187.
105. Stum R.K., Zhou C., Schulz S. and Holtt V. Neuronal types expressing μ - and δ -opioid receptor mRNA in the rat hippocampal formation. *J. Comp. Neurol.* 2004; 469: 107-118.
106. Surges .R, Sarvari M., Steffens M., Els T. Characterization of rebound depolarization in hippocampal neurons. *Biochem & Biophys Res Commun*, 2006; 348: 1343–1349.
107. Svoboda K. R. and Lupica C. R. Opioid inhibition of hippocampal interneurons via modulation of potassium and hyperpolarization-activated cation (I_h) currents. *The Journal of Neuroscience*, 1998; 18 (18): 7084-7098.
108. Videbech P, Ravnkilde B.; Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies. *Am J Psychiatry*. 2004 Nov;161(11):1957-66.
109. Whittington M.A., Traub R.D., Faulkner H.J., Jefferys J.G. and Chettiar K. Morphine disrupts long-range synchrony of gamma oscillations in hippocampal slices. *Proc Natl Acad. Sci USA* 1998;95:5807-5811.
110. Woodson W., Nitecka L., Ben-Ari Y. Organization of the GABAergic system in the rat hippocampal formation: a quantitative immunocytochemical study. *Journal of Comparative Neurology*, 1989; 280: 254-271.
111. www.cognitiveneurosciencearena.com/brain-scans/dehaan05.asp
112. www.csonline.dayoo.com (figure methods)
113. www.histgueb.net/atienza/stmaria/1a.htm
114. www.ineuron.org/dokuwiki/doku.php?id=research:home
115. www.nature.com/nrn/journal/v3/n10/fig_tab/nrn942_F2.html (figure methods)
116. www.pubs.niaaa.nih.gov/publications/arh27-2/IMAGES/Page11.gif
117. www.studyblue.com/notes/note/n/hippocampal-circuit/deck/1644648
118. www.what-when-how.com/neuroscience/the-limbic-system-integrative-systems-part-1

119. Zieglengansberger, W., French, E.D., Siggins, G.R., Bloom, F.E. Opioid peptides may excite hippocampal pyramidal neurons by inhibiting adjacent inhibitory interneurons. *Science* 1979: 205, 415–417.
120. Παπαγεωργίου Δ.Ι. Η ανοσοδραστικότητα του GABA σε τομές υποκάμπου in vitro. Διπλωματική εργασία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 2013.
121. Σινάνη Ο. Κατανομή GABA νευρώνων στη ραχιαία και κοιλιακή μοίρα του υποκάμπου. Διπλωματική εργασία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 2013.