



Bachelor Thesis

**Postnatal Development of the
prefrontal cortex – a behavioral
and an electrophysiological
approach**

Βασιλείου Ελισάβετ
Υπεύθυνη: Σιδηροπούλου Κυριακή

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
Νοέμβριος 2013

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ύστερα από το μακρό διάστημα εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας, το οποίο ήταν γεμάτο εμπειρίες, γνώσεις, μόχθο, αλλά και το αίσθημα ικανοποίησης που γεννά η ολοκλήρωση ενός μεγάλου κεφαλαίου, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά:

Πρώτα απ'όλους την υπεύθυνη καθηγήτριά μου, κ. Σιδηροπούλου, για την εμπιστοσύνη και την εκτίμηση που μου έδειξε, καθώς και την καθοδήγηση σε ακαδημαϊκό και προσωπικό επίπεδο.

Την Κλαίρη, τη Μαίρη, τη Στεργία, τη Νικόλα, το Βασίλη, την Τίνα, τη Δέσποινα και γενικά όλα τα μέλη του εργαστηρίου, χάρις στα οποία είχα την τύχη να δουλέψω σε ένα ευχάριστο και φιλικό περιβάλλον, για την αρμονική μας συνεργασία και την ψυχολογική συμπαράσταση.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Ξένια Κωνσταντουδάκη, η οποία με τις εμπειρίες, τις συμβουλές, την προθυμία και την υπομονή της αποτέλεσε για μένα, καθ'όλη τη διάρκεια αυτού του χρόνου, την πολυτιμότερη βοήθεια που θα μπορούσα να εύχομαι.

Βασιλείου Ελισάβετ
Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας
Νοέμβριος 2013

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή

- ❖ Προμετωπιαίος φλοιός
 - Ορισμός και ανατομικά χαρακτηριστικά3
 - Κυτταρική Σύνθεση.....3-10
 - Κυτταρική αρχιτεκτονική.....11
 - Υποδιαίρέσεις και συνδεσιμότητα.....11-13
 - Λειτουργίες Προμετωπιαίου Φλοιού.....13-23
 - Λειτουργική διαμερισματοποίηση.....24-25
- ❖ Μνήμη και μακρόχρονη ενδυνάμωση
 - Γενικές έννοιες.....26
 - Βασικοί μηχανισμοί επαγωγής LTP.....27-28
 - Ντοπαμίνη και πλαστικότητα στον προμετωπιαίο φλοιό.....28-31
- ❖ Μεταγεννητική ανάπτυξη προμετωπιαίου φλοιού
 - Γενικές αρχές.....32
 - Νεαρή παιδική ηλικία.....33-37
 - Εφηβεία.....37-44

2. Υλικά και μέθοδοι

- ❖ Tmaze (Delayed Alternation) – Συμπεριφορική δοκιμασία μνήμης εργασίας
 - Εισαγωγικά στοιχεία – Τύποι Tmaze πειραμάτων.....45-47
 - Διαγονιδιακό μοντέλο μειωμένης αναστολής (Rac1 conditional knockout).....47
 - Πειραματική διαδικασία.....48-49
- ❖ Ηλεκτροφυσιολογική μελέτη
 - Δυναμικά τοπικού πεδίου (Local Field Potentials – LFP).....50-51
 - Πειραματική διαδικασία.....51-54

3. Αποτελέσματα

- ❖ Tmaze.....55-57
- ❖ Ηλεκτροφυσιολογία.....58-64

4. Συζήτηση

- ❖ Tmaze.....65-68
- ❖ Ηλεκτροφυσιολογία.....69-74

5. Βιβλιογραφία.....75-81

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

❖ Προμετωπιαίος φλοιός (prefrontal cortex – PFC)

■ Ορισμός – Ανατομικά χαρακτηριστικά:

Η συνειρμική περιοχή του φλοιού στον πρόσθιο μετωπιαίο λοβό του εγκεφάλου των θηλαστικών συχνά προσδιορίζεται ως προμετωπιαίος φλοιός. Υπάρχουν πολλές απόπειρες οριοθέτησης της περιοχής αυτής με χρήση διαφορετικών κριτηρίων και μεθοδολογίας (Fuster, 2008). Παρ' ότι δεν υπάρχει μέχρι στιγμής ένας καθολικά αποδεκτός ανατομικός ορισμός του προμετωπιαίου φλοιού, μπορεί να θεωρηθεί με ακρίβεια για όλα τα θηλαστικά, ότι πρόκειται για αυτό το τμήμα του φλοιού, του οποίου οι κύριες αμφίδρομες συνδέσεις είναι με τον μεσοραχιαίο πυρήνα του θαλάμου. Η εν λόγω φλοιική περιοχή εντοπίζεται στο πρόσθιο άκρο των εγκεφαλικών ημισφαιρίων, μπροστά από τον πρωτοταγή κινητικό φλοιό στην πλάγια επιφάνεια και μπροστά από τον μεταιχμιακό συνειρμικό φλοιό (limbic cortex) στην κογχική και διάμεση επιφάνεια, ενώ περιλαμβάνει όχι ένα μοναδιαίο τμήμα, αλλά μια ομάδα συσχετιζόμενων περιοχών (Kolb et al. 2012). Στα πρωτεύοντα, ο προμετωπιαίος φλοιός αποτελεί την πλέον ανεπτυγμένη περιοχή του νεοφλοιού, καλύπτοντας περίπου το 30% αυτού (Miller & Cohen, 2001) και εμπερικλείει τις περιοχές 8-13, 24, 32, 46 και 47, σύμφωνα με τον κυτταροαρχιτεκτονικό χάρτη του Brodmann (1909) (Fuster, 2001). Σε ότι αφορά τα τρωκτικά, η παρουσία μιας δομής PFC αποτέλεσε αντικείμενο διχογνωμιών. Ωστόσο ανατομικές και λειτουργικές μελέτες παρείχαν αποδεικτικά στοιχεία για την ύπαρξη προμετωπιαίας φλοιικής περιοχής που υπεισέρχεται σε μαθησιακές και εκτελεστικές λειτουργίες, οι οποίες απαιτούνται για την εκδήλωση στοχευμένης συμπεριφοράς (Uylings et al., 2003).

■ Κυτταρική σύνθεση:

Ο προμετωπιαίος φλοιός αποτελείται από ένα πολυσύνθετο μικροκύκλωμα διαφόρων τύπων νευρώνων. Όπως και σε όλες τις περιοχές του νεοφλοιού, οι νευρώνες αυτοί κατανέμονται σε δύο μορφολογικά και φυσιολογικά διακριτές τάξεις νευρικών κυττάρων, τους ανασταλτικούς διάμεσους

νευρώνες και τους διεγερτικούς πυραμιδικούς νευρώνες (Wilson et al., 1994; Hussar C. & Pasternak T., 2009). Μελέτες έχουν δείξει ότι οι ανασταλτικοί διάμεσοι μπορούν να διαχωριστούν από τους πυραμιδικούς νευρώνες, καθώς χαρακτηρίζονται από βραχύτερη διάρκεια δυναμικού ενεργείας, μειωμένη προσαρμοστικότητα στην απόκριση και υψηλότερη συνόττητα πυροδότησης από αυτούς (Bartho et al., 2004). Η πλειοψηφία των νεοφλοιικών νευρώνων (70-80%) ανήκουν στους πυραμιδικούς (DeFelipe, J. & Fariñas, I., 1992), οι οποίοι έχουν σχετικά σταθερές ανατομικές, φυσιολογικές και μοριακές ιδιότητες, ενώ το υπόλοιπο 20 – 30% των νεοφλοιικών νευρώνων είναι διάμεσοι, κυρίως ανασταλτικοί, και εμφανίζουν ποικιλομορφία ως προς τα μορφολογικά, φυσιολογικά, μοριακά και συναπτικά χαρακτηριστικά τους (Markram et al., 2004).

- Πυραμιδικοί νευρώνες

Οι πυραμιδικοί νευρώνες είναι τα κύτταρα εξόδου του νεοφλοιού που ενσωματώνουν και μεταφέρουν πληροφορίες από εξω-φλοιικές εισόδους και τοπικά κυκλώματα σε άλλες περιοχές του φλοιού, αλλά και υποφλοιικές δομές. Πρόκειται για μεγάλα πολύπολα κύτταρα, με σώμα τριγωνικού σχήματος, μοναδιαίο νευράξονα, δενδρίτες που προεκβάλλουν από την βάση (βασικοί δενδρίτες) και από την κορυφή (κορυφαίοι δενδρίτες), ενώ διαθέτουν και έναν κορυφαίο θύσανο (Spruston, 2008). Οι δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων δέχονται σήματα από δεκάδες χιλιάδες διεγερτικές συνάψεις, μέσω υποδοχέων του γλουταμινικού, τύπου AMPA (2-amino-3-(3-hydroxy-5-methyl-isoxazol-4-yl)propanoic acid) και NMDA (N-methyl-D-aspartate), και από μερικές χιλιάδες ανασταλτικές συνάψεις, οι οποίες ενεργοποιούνται από την πρόσδεση GABA (gamma-aminobutyric acid) σε GABA_A ή GABA_B υποδοχείς. Όλα αυτά τα σήματα εισόδου που δέχεται ο πυραμιδικός νευρώνας ενσωματώνονται με συνεχή τρόπο και μέσω της διαδικασίας της συναπτικής ολοκλήρωσης καθορίζουν το σήμα εξόδου του κυττάρου, δηλαδή την πυροδότηση δυναμικού ενεργείας. Αυτή βέβαια, μπορεί να τροποποιηθεί και από έναν αριθμό άλλων προσαρμοστικών συναπτικών σημάτων εισόδου που χρησιμοποιούν διαφορετικούς νευροδιαβιβαστές, όπως η ακετυλοχολίνη, η ντοπαμίνη, η σεροτονίνη και η νορεπινεφρίνη (Spruston, 2008).

Παρ' ότι τα βασικά μορφολογικά χαρακτηριστικά αυτού του τύπου νευρώνων απαντώνται σε κάθε περίπτωση (Ramón y Cajal, 1893), παρατηρούνται διαφοροποιήσεις σε δευτερεύουσες ιδιότητες, μεταξύ ειδών, μεταξύ διαφορετικών φλοιικών περιοχών, αλλά και μεταξύ των στιβάδων της ίδιας περιοχής (Elston, 2003; Petrides, 2005). Για παράδειγμα, ο βαθμός διακλάδωσης των δενδριτών και ο αριθμός των ακανθών τους τείνει να αυξάνεται, όσο μεγαλύτερη είναι επέκταση του φλοιού κατά μήκος της

εξελικτικής πορείας των ειδών. Επίσης, τα ίδια χαρακτηριστικά των πυραμιδικών νευρώνων του PFC εμφανίζουν μεγαλύτερες τιμές εν συγκρίσει με άλλες περιοχές του εγκεφάλου, οι οποίες εδράζονται στον κροταφικό, το βρεγματικό ή τον ινιακό λοβό. Πιθανότατα μάλιστα, η αυξημένη δομική πολυπλοκότητα των πυραμιδικών του προμετωπιαίου σχετίζεται άμεσα με τις συνθετότερες λειτουργικές ικανότητες του κυκλώματος του PFC (Elston, 2003).

Εκτός όμως από τα μορφολογικά γνωρίσματα, διαφορές παρουσιάζουν και άλλες ιδιότητες των πυραμιδικών κυττάρων, όπως είναι η *ενδογενής διεγερσιμότητα* του νευρώνα, η οποία επηρεάζει τον τρόπο απόκρισής του σε κάποιο σήμα εισόδου. Ύστερα από μια σειρά ερευνών επί των ηλεκτροφυσιολογικών ιδιοτήτων των πυραμιδικών κυττάρων (McCormick et al., 1985; Connors & Gutnick, 1990; Mason & Larkman, 1990), έχει επικρατήσει η ταξινόμησή τους στις παρακάτω κατηγορίες, βάσει του *μοτίβου πυροδότησης ως απόκριση σε παλμούς εκπολωτικού ρεύματος*, αλλά και των χαρακτηριστικών των δυναμικών ενεργείας τους:

- ‘τακτικής πυροδότησης’ (regular spiking – RS) → η απόκριση των νευρώνων αυτών αποτελείται από μεμονωμένα δυναμικά ενεργείας, ανά *τακτά χρονικά διαστήματα*, καθένα απ’τα οποία συνήθως ακολουθείται από ένα σύνθετο σύνολο μεθυπερπολώσεων (AHPs) και μεθεκπολώσεων (ADPs). Σε περίπτωση παρατεταμένου ερεθισμού σταθερής έντασης, τα μεταδυναμικά αυτά αυξάνουν σε διάρκεια και οδηγούν σε προσαρμογή της συχνότητας πυροδότησης (Connors & Gutnick, 1990). Μετέπειτα μελέτες αποκάλυψαν ότι οι νευρώνες ταχείας απόκρισης διαχωρίζονται σε δύο επιμέρους ομάδες, τα ταχείας προσαρμογής RS και τα βραδείας προσαρμογής RS κύτταρα (Dégenétais et al., 2002).
- ‘εγγενούς ριπής’ (intrinsic [inactivating] bursting – IB) → οι νευρώνες αυτοί μπορούν να αποκρίνονται σε ερεθίσματα στο επίπεδο του ουδού με μια *ριπή ακαριαίων δυναμικών ενεργείας* (burst), στα πλαίσια της οποίας οι παλμοί συνήθως φθίνουν διαδοχικά σε μέγεθος. Το μοτίβο απόκρισης των IB νευρώνων περιλαμβάνει ‘ριπές’, αλλά και μεμονωμένα δυναμικά ενεργείας, είναι συχνά περιοδικό και εμφανίζει εκτεταμένη ποικιλομορφία (Connors & Gutnick, 1990).

Αυτή η ετερογένεια στις ηλεκτρικές ιδιότητες των νευρώνων είναι αποτέλεσμα της συντονισμένης δράσης διαφορετικών συνδυασμών ιοντικών διαύλων της μεμβράνης και των διαφορών στη μορφολογία των νευρώνων. Το συγκεκριμένο μοτίβο ηλεκτρικής συμπεριφοράς για κάθε τύπο νευρώνα αποτελεί στην ουσία το τελικό προϊόν μιας σειράς άλλων - μοναδικών γι’αυτόν τον τύπο - ιδιοτήτων, δηλαδή του συνδυασμού ιοντικών διαύλων που εκφράζει, της ποσότητας κάθε είδους διαύλου που παράγει, των μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων που υφίστανται τα μόρια αυτά, αλλά και του τρόπου διανομής τους στην επιφάνεια της μεμβράνης (Markram et al., 2004).

Οι ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες των νευρώνων του προμετωπιαίου φλοιού έχουν αναλυθεί σε έναν μικρό αριθμό *in vitro* και *in vivo* μελετών. Αυτές κατέδειξαν ότι ο βασικός τύπος πυραμιδικών νευρώνων του PFC είναι τα RS κύτταρα και ότι αντιπροσωπεύονται και οι δύο υποκατηγορίες (βραδείας και ταχείας προσαρμογής). Οι IB νευρώνες εντοπίστηκαν μόνο στη στιβάδα V και συνιστούν ένα μικρό ποσοστό του συνόλου των πυραμιδικών (~7%), αν και αυτή η τιμή διαφοροποιείται ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες. Επιπροσθέτως, ένας σημαντικός πληθυσμός πυραμιδικών κυττάρων (22%) ταυτοποιήθηκε ως NIB (non-inactivating bursting), αφού το μέγεθος των παλμών κατά τη διάρκεια μιας ριπής δυναμικών ενεργείας ήταν αμετάβλητο (Dégenétais et al., 2002).

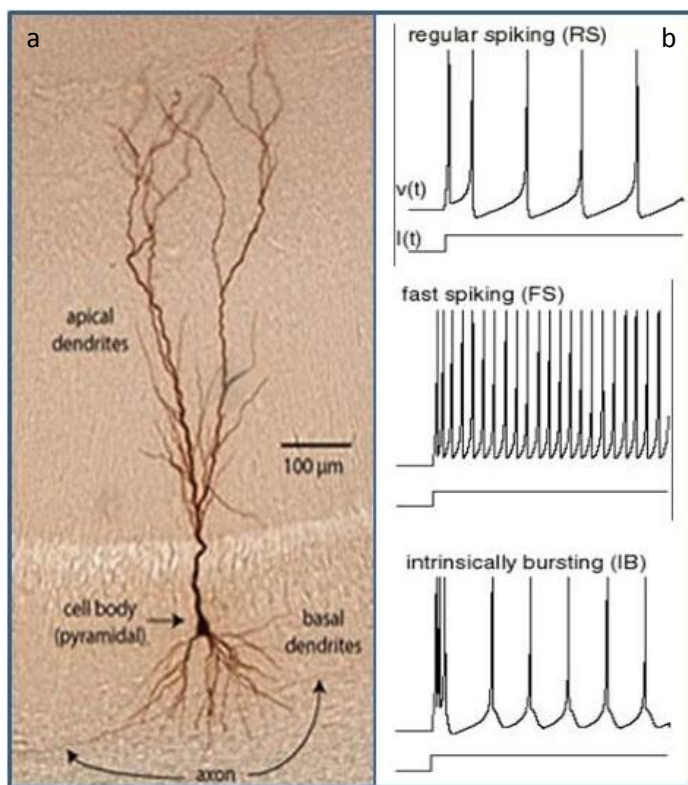


Figure 1] a. Τυπική μορφολογία πυραμιδικού νευρώνα. Απεικονίζεται το χαρακτηριστικό πυραμιδικό σχήματος νευρικό σώμα, ο κορυφαίος δενδριτικός θύσανος που εκτείνεται κάθετα προς το σώμα, οι βασικοί δενδρίτες που εκτείνονται πλευρικά από τη βάση του σώματος και ο μοναδικός νευράξονας του κυττάρου. b. Χαρακτηριστικά μοτίβα πυροδότησης των πυραμιδικών κυττάρων: 1) Τακτικής πυροδότησης (regular spiking - RS), που πυροδοτούν μοναδιαία δυναμικά ενεργείας ανά τακτά χρονικά διαστήματα. 2) Εγγενούς ριπής (intrinsically bursting - IB), τα οποία πυροδοτούν με ριπές ακαριαίων δυναμικών ενεργείας ως απόκριση σε ουδικά ερεθίσματα. Ο τύπος πυροδότησης του νευρώνα εξαρτάται κυρίως από τον αριθμό και το είδος τασεοελεγχόμενων διαύλων που φέρει, αλλά και από τη μορφολογία των δενδριτών του.

Το πιο σύνηθες μοτίβο πυροδότησης των διάμεσων νευρώνων (fast spiking - FS) παρατίθεται προς σύγκριση με τα άλλα μοτίβα.

- Διάμεσοι νευρώνες

Η άλλη μεγάλη ομάδα νευρώνων του προμετωπιαίου είναι οι διάμεσοι νευρώνες. Τα κύτταρα αυτά συγκροτούν σαφώς τον πιο πολυάριθμο πληθυσμό νευρώνων ολόκληρου του κεντρικού νευρικού συστήματος και ουσιαστικά πρόκειται για όλα τα κύτταρα που δεν είναι ειδικώς αισθητικά ή κινητικά. Οι διάμεσοι νευρώνες δημιουργούν *συνδέσεις μεταξύ άλλων νευρώνων*, οι οποίες μπορεί να εκτείνονται

μεταξύ διαφορετικών εγκεφαλικών περιοχών (διάμεσοι νευρώνες αναμετάδοσης ή προβολής) ή μέσα σε τοπικά δίκτυα εντός της ίδιας περιοχής (τοπικοί διάμεσοι νευρώνες) (Kandel et al., 2000) . Ο ρόλος αυτού του τύπου κυττάρων είναι θεμελιώδης στη διαμόρφωση των φλοιικών κυκλωμάτων και στον έλεγχο των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων, ο οποίος επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της αναστολής (Benarroch, 2013).

Οι ανασταλτικοί ενδονευρώνες συνθέτουν και εκλύουν ως νευροδιαβιβαστή το *γ-αμινοβουτυρικό οξύ* (GABA) που δρα ανασταλτικά στα ώριμα μετασυναπτικά κύτταρα, υπερπολώνοντας τη μετασυναπτική μεμβράνη, αφού προκαλεί κυρίως τη διάνοιξη διαύλων χλωρίου/διττανθρακικού ή καλίου. Δημιουργώντας συνάψεις τόσο με πυραμιδικούς νευρώνες, όσο και μεταξύ τους, οι διάμεσοι νευρώνες συνθέτουν πολύπλοκα λειτουργικά δίκτυα, τα οποία ρυθμίζουν το χρόνο πυροδότησης των πυραμιδικών, το συντονισμό/δημιουργία των φλοιικών ρυθμών ταλάντωσης, την διαμόρφωση των υποδεκτικών πεδίων του σωματοαισθητικού φλοιού και την νευρωνική πλαστικότητα (Benarroch, 2013). Το σύστημα GABAεργικής αναστολής αποτελεί βασικό μηχανισμό ρύθμισης της δραστηριότητας των πυραμιδικών κυττάρων και τροποποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της μεταγεννητικής ανάπτυξης ως και την ενηλικίωση. Στα τρωκτικά, το GABA καθώς και ο υποδοχέας GABA_A είναι παρόντα στο νεοφλοιό ήδη από τη 15^η εμβρυϊκή ημέρα. Τις πρώτες ημέρες μετά τη γέννηση ο GABA έχει *εκπολωτική δράση* στα μετασυναπτικά κύτταρα, αλλά μετά την έβδομη μέρα μετά τη γέννηση (PD7) αποκτά την *ανασταλτική του δράση*. Μεταξύ πρωτοταγών αισθητικών και συνειρμικών περιοχών, όπως ο προμετωπιαίος φλοιός, φαίνεται ότι υπάρχουν διαφοροποιήσεις στη ρύθμιση του συστήματος αυτού (Kilb et al., 2011).

Όσον αφορά τον προμετωπιαίο φλοιό, έχουν ταυτοποιηθεί τρεις βασικές υποδιαιρέσεις GABAεργικών διαμέσων νευρώνων: α) Αυτοί που παρέχουν ανασταλτικές συνάψεις στα κυτταρικά σώματα και στα αρχικά τμήματα του νευράξονα γειτονικών διεγερτικών πυραμιδικών νευρώνων και φαίνεται να ρυθμίζουν τον τρόπο πυροδότησής τους. Ο τύπος αυτός εκφράζει την ασβεστιο-προσδένουσα πρωτεΐνη παρβαλβουμίνη (PV). β) Αυτοί που δημιουργούν ανασταλτικές συνάψεις με τις περιφερικές μοίρες των δενδριτών πυραμιδικών νευρώνων, όπου τροποποιούν γειτονικά διεγερτικά σήματα εισόδου στα κύτταρα αυτά και εκφράζουν καλρετινίνη (CR). γ) Αυτοί που δημιουργούν ανασταλτικές συνάψεις με άλλους GABAεργικούς διάμεσους νευρώνες, καταλήγοντας σε μια κατιούσα άρση αναστολής πυραμιδικών κυττάρων. Και αυτή η ομάδα εκφράζει την πρωτεΐνη καλρετινίνη (Hashimoto et al., 2004). Οι νευρώνες που εκφράζουν καλβιδίνη (CB) μειώνονται σταδιακά στο διάστημα PD30-PD70 και συνιστούν ένα μικρό υποπληθυσμό των GABAεργικών διαμέσων νευρώνων κατά την ενήλικη ζωή (Brummelte et al., 2007).

Ένα σχετικά μικρό ποσοστό ενδονευρώνων έχει διεγερτική δράση. Τέτοια κύτταρα είναι τα ακανθώδη αστεροειδή κύτταρα, τα οποία συνθέτουν και εκλύουν ως νευροδιαβιβαστή το γλουταμικό και συναντώνται αποκλειστικά στη στιβάδα IV των πρωτοταγών αισθητικών περιοχών (Feldmeyer et al., 2002). Επίσης, υπάρχουν και διάμεσοι νευρώνες που συνθέτουν νευροπεπτίδια με διεγερτική δράση και αποτελούν υποκατηγορία των διπολικών κυττάρων.

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του σώματος, των δενδριτών και των αξόνων των διάμεσων νευρώνων χαρακτηρίζονται από *εξαιρετική ποικιλομορφία*. Η μορφολογία των δενδριτών είναι το πλέον μεταβλητό χαρακτηριστικό και έτσι δεν είναι εφικτό να καθορίσει με συνέπεια τον τύπο του κυττάρου. Η ανατομική ταυτότητα ενός διάμεσου νευρώνα μπορεί να προσδιοριστεί καλύτερα μέσω της μορφής που έχουν οι αξονικές διακλαδώσεις, αφού οι διάμεσοι νευρώνες φαίνεται να εξειδικεύονται ως προς τα διαφορετικά μέρη των νευρώνων (άξονας/σώμα/βασικοί ή ακραίοι δενδρίτες), τις επιμέρους φλοιικές στιβάδες μιας κολώνας, αλλά και τις διαφορετικές κολώνες που στοχεύουν. Τα σχετικά ποσοστά αντιπροσώπευσης των διαφόρων ειδών διάμεσων νευρώνων ποικίλλουν τόσο μεταξύ ειδών, όσο και μεταξύ εγκεφαλικών περιοχών αλλά και φλοιικών στιβάδων (DeFelipe et al., 2003). Βάσει της μορφολογίας τους λοιπόν οι διάμεσοι νευρώνες μπορούν να ταξινομηθούν σε πλήθος υποτύπων. Οι πολυπληθέστεροι στις περισσότερες στιβάδες του φλοιού είναι τα καλαθοκύτταρα, τα οποία αποτελούν το 50% των ανασταλτικών ενδονευρώνων, και τα κύτταρα Martinotti, τα οποία εντοπίζονται στις στιβάδες II-VI, αλλά οι άξονες τους προβάλλουν στην στιβάδα I, όπου και αναστέλλουν τους δενδρίτες πυραμιδικών νευρώνων. Άλλοι τύποι είναι τα κύτταρα Chandelier, τα δίπολα, τα ψευδομονόπολα, τα διθυσανωτά, τα double bouquet και τα νευρογλοιακά κύτταρα (Markram et al., 2004).

Ένα ακόμη μεταβλητό χαρακτηριστικό μεταξύ των διάμεσων νευρώνων, το οποίο προσφέρεται για την αναγνώριση του υποτύπου, στον οποίο ανήκει καθένας από αυτούς, είναι το *συγκεκριμένο πρότυπο έκφρασής τους*, ειδικά σε ότι αφορά *πρωτεΐνες που προσδέουν ασβέστιο* (calcium binding proteins – CaBPs), οι οποίες συμμετέχουν στην ενδοκυττάρια σηματοδότηση μέσω μεταβολής των κυτταροπλασματικών επιπέδων ασβεστίου. Αυτές είναι η *καλρετινίνη* (calretinin – CR), η *παρβαλβουμίνη* (parvalbumin – PV), και η *καλβιδίνη* (calbindin – CB) και καθεμία εκφράζεται σε διαφορετική υποομάδα διάμεσων νευρώνων, οι οποίες όμως αλληλεπικαλύπτονται μερικώς. Επίσης σημαντικός βιοχημικός δείκτης είναι η πρωτεΐνη *σωματοστατίνη* (somatostatin – Sst), μια ανασταλτική ορμόνη-πεπτίδιο που ρυθμίζει το ενδοκρινικό σύστημα και επηρεάζει τη νευρική μετάδοση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η σωματοστατίνη μαζί με άλλα τρία νευροπεπτίδια (αγγειοδραστικό εντερικό πεπτίδιο – VIP, χολοκυστοκίνηνη – CCK και νευροπεπτίδιο Y – NPY) μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν

για τον προσδιορισμό μερικώς αλληλεπικαλυπτόμενων κατηγοριών διάμεσων νευρώνων (Kubota et al., 1994; Cauli et al., 1997).

Όσον αφορά στις ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες των διάμεσων νευρώνων, όλοι οι ανασταλτικοί είχαν αρχικά περιγραφεί ως 'ταχείας πυροδότησης'. Πιο πρόσφατες μελέτες, ωστόσο, αποκάλυψαν ότι τα μη-πυραμδικά κύτταρα εμφανίζουν ευρεία ποικιλία στις εγγενείς ιδιότητες πυροδότησης, της οποίας η συχνότητα είναι δυνατό να υφίσταται προσαρμογή. Μεταξύ άλλων περιεγράφησαν τα εξής πρότυπα:

- Τα 'ταχείας πυροδότησης' (fast spiking – FS) → αυτός ο τύπος πυροδοτεί μεμονωμένα δυναμικά ενεργείας σε αμετάβλητο ρυθμό βραχείας διάρκειας (συνήθως <0.5 ms) που ακολουθούνται από μικρότερα διαστήματα μεθυπερπόλωσης. Μια ακόμη ιδιότητα που χαρακτηρίζει τα FS κύτταρα είναι ότι κατά τη διάρκεια εκτεταμένου ερεθισμού υφίστανται ασήμαντη ή μηδενική προσαρμογή της συχνότητας πυροδότησής τους, διατηρώντας σε σταθερά επίπεδα τη συχνότητα νευρικών παλμών για εκατοντάδες χιλιοστά του δευτερολέπτου (ms) (Connors & Gutnick, 1990), παρουσιάζουν σχετικά αρνητικό δυναμικό ηρεμίας και χαμηλή αντίσταση εισόδου σε σχέση με άλλους τύπους κυττάρων (Cauli et al., 1997; González-Burgos et al., 2005).
- Τα 'καθυστερημένης πυροδότησης' (late spiking – LS) κύτταρα, τα οποία δίνουν αργά αναπτυσσόμενες επικλινείς εκπολώσεις (ramp depolarizations) κοντά στον ουδό και πρόκειται για είδη νευρογλοίας.
- Τα 'χαμηλού ουδού πυροδότησης' (low threshold spiking – LTS) κύτταρα, γνωστά και ως 'πυροδότησης κατά ριπές μη πυραμδικά κύτταρα' (burst – spiking non pyramidal cells - BSNP), τα οποία εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στη στιβάδα V και αποκρίνονται στην έλευση μικρής έντασης υπερπολωτικών παλμών (κοντά στο επίπεδο του ουδού) με εκφορτίσεις που ομοιάζουν με ριπές (burst-like).
- Τα 'κανονικής πυροδότησης μη πυραμδικά κύτταρα' (regular spiking non-pyramidal cells - RSNP), τα οποία βρίσκονται στις στιβάδες II/III & V και χαρακτηρίζονται από παλμούς μεγάλης διάρκειας και έντονη πλαστικότητα της συχνότητας πυροδότησής τους.
- Τα 'ακανόνιστης πυροδότησης' (irregular spiking – IR) κύτταρα, τα οποία επίσης βρίσκονται στις στιβάδες II/III & V και αποκρίνονται αρχικά με μια ριπή παλμών, η οποία ακολουθείται από μια ακανόνιστη σειρά δυναμικών ενεργείας. (Kawaguchi, 1995; Markram et al., 2004)

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι έχει αναγνωρισθεί συσχέτιση μεταξύ των χημικών υποτύπων με μορφολογικές και ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες των διάμεσων νευρώνων. Η καλβιδίνη έχει βρεθεί στα διθυσανωτά και στα κύτταρα Martinotti και εντάσσονται στα RSNP κύτταρα, ενώ η καλρετίνη εντοπίζεται κυρίως στα δίπολα κύτταρα, των οποίων οι ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες τα κατατάσσουν στους IR νευρώνες. Η παρβαλβουμίνη εκφράζεται στα καλαθοκύτταρα και στους νευρώνες Chandelier, που ανταποκρίνονται στα χαρακτηριστικά των FS κυττάρων. Οι PV⁺ διάμεσοι νευρώνες σχηματίζουν

ανασταλτικές συνάψεις με πολυάριθμους πυραμιδικούς νευρώνες, κυρίως στο σώμα και τους εγγύς δενδρίτες, και ελέγχουν το ρυθμό πυροδότησής τους. Η ενεργοποίηση αυτής της κατηγορίας νευρώνων είναι κρίσιμη για τη δημιουργία των *υψηλής συχνότητας ταλαντώσεων του φάσματος γ (30 – 100 Hz)*, χάρις στην ικανότητά τους να εκπολώνονται και να επαναπολώνονται ταχύτατα (υψηλή συχνότητα πυροδότησης) και στους χασματοσυνδέσμους που σχηματίζουν με άλλους FS – νευρώνες, συγκροτώντας ένα συγχρονισμένης δραστηριότητας δίκτυο PV⁺ διάμεσων νευρώνων (Sohal et al., 2009; Nakazawa et al., 2011). Οι ταλαντώσεις γ συχνότητων είναι γνωστό ότι συντονίζουν νευρικά σύνολα και τα καθιστούν λειτουργικά δίκτυα, γι' αυτό έχουν σημαντική συμβολή στην εκτέλεση των ανώτερων γνωσιακών λειτουργιών, όπως η μνήμη και η προσοχή (Ulhaas et al., 2008).

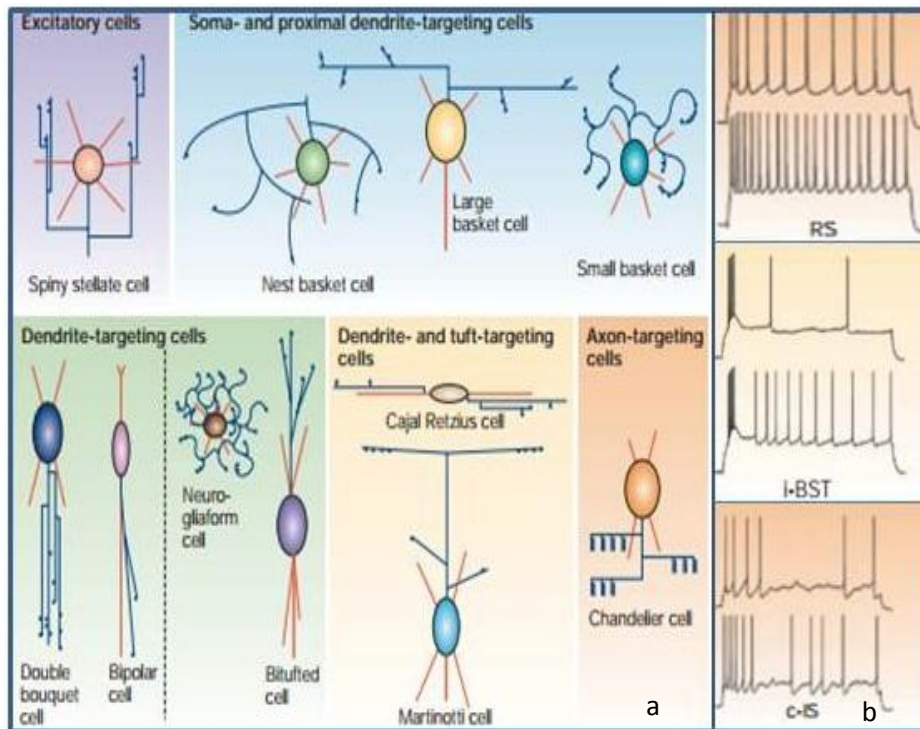


Figure 2] a. Ανατομική ποικιλομορφία διάμεσων νευρώνων του νεοφλοιού. Κάθε νευρώνας έχει διαφορετικού χρώματος σώμα; δενδρίτες: κόκκινο; άξονες: μπλε γραμμές; συναπτικά κομβία: μπλε κουκκίδες. Οι ανασταλτικοί διάμεσοι νευρώνες χαρακτηρίζονται κυρίως από τη δομή των αξονικών θυσάνων τους και συνήθως εννευρώνουν εκλεκτικά συγκεκριμένες περιοχές των κυττάρων στόχων τους (σωματική, περισωματική, δενδρική, αξονική) b. Ορισμένα από τα χαρακτηριστικά μοτίβα πυροδότησης των διάμεσων νευρώνων: 1) Κανονικής πυροδότησης μη πυραμιδικά κύτταρα (regular spiking non-pyramidal cells – RSNP) 2) Πυροδότησης κατά ριπές μη πυραμιδικά κύτταρα (burst – spiking non pyramidal cells - BSNP) 3) Ακανόνιστης πυροδότησης (irregular spiking – IR) κύτταρα, τα οποία αρχικά αποκρίνονται με μια ριπή παλμών και στη συνέχεια με δυναμικά ενεργείας ανά άτακτα χρονικά διαστήματα.

- Κυτταρική αρχιτεκτονική:

Οι νευρώνες του νεοφλοιού δεν βρίσκονται τυχαία διεσπαρμένοι στον φλοιό, αλλά οργανώνονται σε στιβάδες (στιβάδες I-IV), οι οποίες συνδέονται με ποικίλες φλοιικές και υποφλοιικές περιοχές (Markram et al., 2004), σύμφωνα με το δομικό μοτίβο που κυριαρχεί σε όλη την έκταση του νεοφλοιού. Στα πρωτεύοντα, η πλευρική προμετωπιαία επιφάνεια απαρτίζεται από έξι στιβάδες και χαρακτηρίζεται από μια σαφώς καθορισμένη εσωτερική κοκκοειδή στιβάδα (στιβάδα IV), γι' αυτό και φέρει την εναλλακτική ονομασία 'μετωπιαίος/πρόσθιος κοκκοειδής φλοιός' (frontal granular layer). Αντιθέτως, σε ορισμένες διάμεσες και κογχικές περιοχές του προμετωπιαίου η εσωτερική κοκκοειδής στιβάδα είναι αμελητέα ή ανύπαρκτη ('άκκοκος φλοιός'), ενώ οι βαθύτερες στιβάδες (στιβάδες V και VI) είναι πιο ανεπτυγμένες. Στην προμετωπιαία περιοχή των τρωκτικών και των σαρκοφάγων οι φλοιικές στιβάδες είναι γενικά λιγότερο καλά καθορισμένες σε σύγκριση με τα πρωτεύοντα και η βασική τους διαφορά έγκειται στην απουσία κοκκοειδούς και άκκοκου φλοιού από τον PFC των τρωκτικών (Fuster, 2008; Gao et al., 2012). Σύμφωνα με τον Swanson (1988) ο μέσος προμετωπιαίος φλοιός του αρουραίου αποτελείται από 5 στιβάδες. Η στιβάδα I είναι η πιο επιφανειακή και περιέχει τα σώματα των ανασταλτικών διάμεσων νευρώνων και δενδρίτες πυραμιδικών κυττάρων. Οι στιβάδες II-III είναι πλήρεις σωμάτων μικρών πυραμιδικών κυττάρων και διακριτών τύπων διάμεσων νευρώνων, ενώ στις στιβάδες V-VI συγκεντρώνονται πολυάριθμοι μεγάλοι πυραμιδικοί – νευρώνες εξόδου, των οποίων οι άξονες προεκβάλλουν σε υποφλοιικές περιοχές – και μια εξαιρετικά εκτεταμένη ποικιλομορφία διαφορετικών διάμεσων νευρώνων.

- Υποδιαιρέσεις και συνδεσιμότητα:

Στον προμετωπιαίο φλοιό των πρωτευόντων διακρίνονται ανατομικά τρεις περιοχές: η πλευρική (*lateral – lPFC*), η μέση (*medial – mPFC*) και η κοιλιακή (*ventral – vPFC*) ή κογχιαία (*orbital – oPFC*), οι οποίες εμφανίζουν ετερογένεια στην κυτταροαρχιτεκτονική τους οργάνωση και διαιρούνται σε πολυάριθμες επιμέρους υποπεριοχές. Η συνδεσιμότητα του PFC με άλλες φλοιικές και υποφλοιικές εγκεφαλικές δομές είναι εξαιρετική και οι υποπεριοχές του επικοινωνούν μέσω αμφίδρομων συνδέσεων τόσο μεταξύ τους όσο και με τους πυρήνες του πρόσθιου και ραχιαίου θαλάμου. Επιπροσθέτως, η μέση και κογχιαία περιοχή συνδέονται με τον υποθάλαμο και άλλες δομές του μεταχιακού συστήματος,

όπως η αμυγδαλή και ο υπόκαμπος, ενώ η πλευρική προεκβάλλει στα βασικά γάγγλια και συνδέεται εκτενώς με συνειρμικές περιοχές των άλλων λοβών του εγκεφάλου (Fuster, 2000).

Ο προμετωπιαίος φλοιός στα τρωκτικά δεν είναι διαφοροποιημένος σε τόσο μεγάλο βαθμό, όσο στα πρωτεύοντα, αλλά και σε αυτή την περίπτωση αναγνωρίζονται οι προαναφερθείσες 3 βασικές υποδιαίρεσεις (Uylings et al., 2003; Heidbreder & Grönwegen, 2003). Ο mPFC στον αρουραίο συνίσταται από 4 υποδιαίρεσεις, οι οποίες ραχιαία προς κοιλιακά είναι ο μέσος άκκοκος φλοιός (AGm), ο φλοιός της πρόσθιας έλικας του προσαγωγίου (AC), ο προμεταιχμιακός (prelimbic – PC) και ο υπομεταιχμιακός φλοιός (infralimbic – IC) (Vertes, 2004). Οι πυραμιδικοί νευρώνες του φλοιού της πρόσθιας έλικας του προσαγωγίου στέλνουν κατιούσες προεκβολές στην καρδιά του επικλινούς πυρήνα - το κέντρο επεξεργασίας της ανταμοιβής- και δέχονται ανιούσες συνδέσεις από αυτή καθώς και από άλλες μεταιχμιακές περιοχές (Gao et al., 2012). Ο προμεταιχμιακός και ο υπομεταιχμιακός φλοιός επικοινωνούν μεταξύ τους, αλλά διασπείρουν τις συνδέσεις τους πολύ διαφορετικά στην έκταση του εγκεφάλου, με εξαίρεση τις κοινές προβολές τους σε τμήματα του μεσοκογχιαίου προμετωπιαίου φλοιού, του οσφρητικού προεγκεφάλου και του θαλάμου μέσης γραμμής. Ο PC προβάλλει κυρίως προς συνειρμικές και αισθητικοκινητικές περιοχές του νεοφλοιού, όπως το προτείχισμα, ο απιοειδής φλοιός και ο οσφρητικός βολβός, αλλά και προς μεταιχμιακές περιοχές που επηρεάζουν τη μάθηση, όπως για παράδειγμα ο κεντρικός και ο βασικός πυρήνας της αμυγδαλής. Ο IC, αντιθέτως, προβάλλει κυρίως προς περιοχές που ελέγχουν την αυτόνομη και σπλαγχοκινητική δραστηριότητα, όπως ο παραβραχιακός πυρήνας και ο πυρήνας μονήρους δεσμίδος του εγκεφαλικού στελέχους (Vertes, 2004).

Ένα ακόμη στοιχείο άξιο αναφοράς είναι το ότι ο προμετωπιαίος φλοιός δέχεται πλούσια χολινεργική (ACh) και μονοαμινεργική - ιδίως ντοπαμινεργική (DA) - εννεύρωση. Οι μονοαμίνες συνεισφέρουν στη σταθεροποίηση της διάθεσης και περίσσεια ή ανεπάρκεια κάποιων από αυτές οδηγούν σε διάφορες συναισθηματικές διαταραχές. Ο PFC στοχεύει στα κύρια μετωπιαία χολινεργικά και μονοαμινεργικά συστήματα, μεταξύ των οποίων στους νοραδρενεργικούς (NA) νευρώνες του υπομέλανος τόπου της γέφυρας (rostral locus coeruleus), τους ντοπαμινεργικούς (DA) νευρώνες της κοιλιακής καλυπτρικής περιοχής, τους σεροτονινεργικούς νευρώνες (5-HT) στους πυρήνες της ραφής. Επιπλέον έχει προβολές και στους χολινεργικούς (ACh) νευρώνες στο βασικό προσθεγκέφαλο (Dalley, 2004; Björklund & Dunnett, 2007). Τα συστήματα αυτά δρουν εναλλάξ τροποποιώντας τα νευρωνικά δίκτυα, μέσω επίδρασης στα διεγερτικά και ανασταλτικά συναπτικά σήματα, καθώς και σε άλλες πτυχές φλοιικής επεξεργασίας σε νευρώνες του PFC (Robbins, 2000). Επίσης, οι ανιούσες συνδέσεις από τα συστήματα νευροδιαβίβασης που αναφέρθηκαν συμμετέχουν στον έλεγχο διαφόρων πτυχών της συμπεριφοράς (Gao et al., 2012).

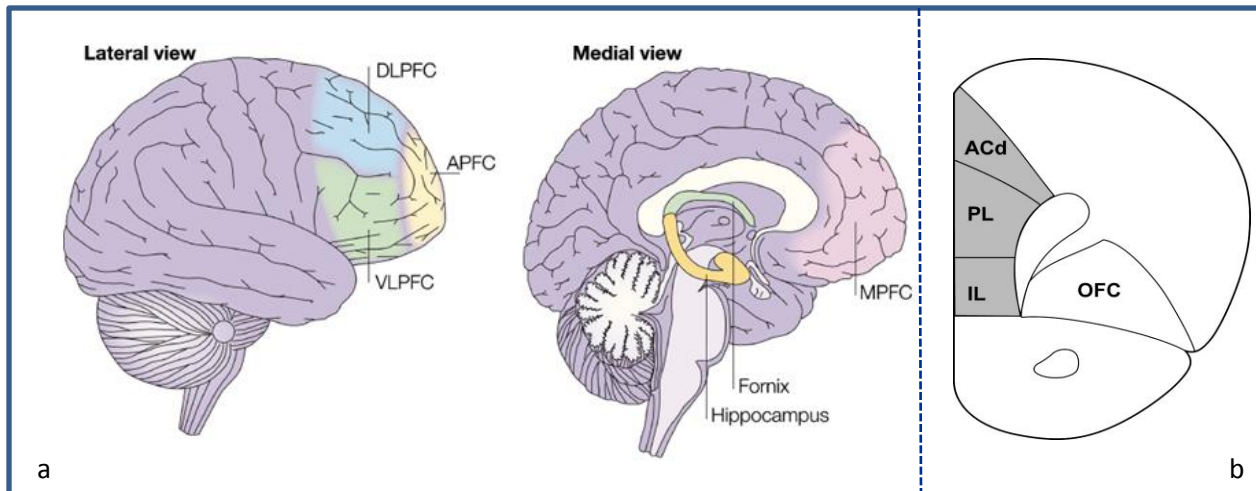


Figure 3] a. Κύριες υποδιαίρεσεις του προμετωπιαίου φλοιού (PFC). Διακρίνεται ο πλευρικός PFC (lateral – IPFC), που μαζί με τον κοιλιακή περιοχή (ventral – vPFC) σχετίζονται με την επεξεργασία σχέσεων ανταμοιβής μεταξύ των πιθανών επιλογών σε μία κατάσταση για την καθοδήγηση της συμπεριφοράς. Επίσης διακρίνεται και ο μέσος PFC (medial – mPFC), ο οποίος έχει συνδεθεί με τη ρύθμιση αυτόνομων σπλαχνοαισθητικών λειτουργιών και συμμετέχει σε πληθώρα γνωσιακών λειτουργιών, όπως η λήψη αποφάσεων, η στοχευμένη συμπεριφορά, οι διαδικασίες προσοχής και η μνήμη εργασίας. b. Επιμέρους υποπεριοχές του mPFC. Διακρίνεται ο φλοιός της πρόσθιας αύλακας του προσαγωγίου (ACd), ο υπομεταιχμιακός φλοιός (infralimbic – IL), που έχει συσχετιστεί με την απόσβεση μνήμης του φόβου και ο προμεταιχμιακός φλοιός (prelimbic – PL), που έχει ως γενικότερο ρόλο τη χρονική οργάνωση μιας διαδοχής συμπεριφορών, είναι υπεύθυνος για τη λειτουργία της μνήμης εργασίας και αποτελεί την υποδιαίρεση του PFC εκείνη, στην οποία πραγματοποιούνται τυπικά οι καταγραφές δυναμικών τοπικού πεδίου.

Λειτουργίες Προμετωπιαίου φλοιού

- Χρονική ολοκλήρωση

Ο προμετωπιαίος φλοιός λαμβάνει εισόδους από όλες τις υπόλοιπες περιοχές του νεοφλοιού και τις ολοκληρώνει για το σχεδιασμό και την καθοδήγηση σύνθετων κινητικών, μαθησιακών, συναισθηματικών και κοινωνικών πτυχών της συμπεριφοράς. Η θεμελιώδης και γενικότερη λειτουργία του, δηλαδή, είναι η χρονική οργάνωση διαφόρων δραστηριοτήτων προς την επίτευξη βιολογικών ή μαθησιακών στόχων. Η περιοχή αυτή - και κυρίως ο lateral PFC – ειδικεύεται στην *δόμηση της χρονικής διαδοχής* μιας νέας σειράς σύνθετων, στοχευμένων δράσεων, οι οποίες έχουν να κάνουν με τη συμπεριφορά, το λόγο ή τη λογική. Δεδομένης της συνθετότητας και της καινοτομίας της λειτουργίας αυτής ο προμετωπιαίος φλοιός έχει αποκαλεσθεί 'το όργανο της δημιουργικότητας'. Επιπλέον, λόγω της συμμετοχής του στην επιλογή μεταξύ εναλλακτικών, στη λήψη αποφάσεων και στην εκτέλεση χρονικά δομημένων ενεργειών,

θεωρείται επίσης το 'κέντρο εκτέλεσης' του εγκεφάλου (Fuster, 2002; Kolb et al., 2012). Η πολυπλοκότητα των λειτουργιών του PFC είναι μεγαλύτερη στον άνθρωπο και πολύ απλούστερη στα θηλαστικά, όπως για παράδειγμα στα τρωκτικά. Μολαταύτα, σε κάθε τάξη θηλαστικών υπάρχουν ορισμένες λειτουργίες που απαιτούν την παρουσία της δομής αυτής (Kolb et al., 2012).

Στη βάση της χρονικής οργάνωσης των ενεργειών βρίσκεται η νευρική διαδικασία της ενσωμάτωσης πληροφοριών από χρονικά διακριτά ερεθίσματα, δράσεις και σχέδια δράσεων που θα αξιοποιηθούν για την πραγματοποίηση μιας στοχευμένης αλληλουχίας συμπεριφορών. Για να διεκπεραιώσει το ρόλο αυτό, ο προμετωπιαίος φλοιός πρέπει να έχει πρόσβαση σε αισθητικά, κινητικά, μνημονικά και γενικότερα σε όλα τα στοιχεία που δομούν μια συμπεριφορά. Για να γίνει καλύτερα κατανοητός ο εν λόγω μηχανισμός, θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι οι πληθυσμοί νευρώνων του PFC αποτελούν τα κυτταρικά συστατικά ευρέως εκτεταμένων φλοιικών δικτύων, τα οποία αντικατοπτρίζουν τη χρονική δομή της συμπεριφοράς και τις συσχετίσεις μεταξύ των συστατικών της στοιχείων. Η διαδοχική χρονική ενεργοποίηση επιμέρους τμημάτων αυτών των δικτύων, με συγκεκριμένο λειτουργικό ρόλο, είναι αυτή που οδηγεί εν τέλει σε μια σειρά αλληπάληλων δράσεων – μια χρονικά δομημένη συμπεριφορά. Τα νευρωνικά αυτά δίκτυα σχηματίζονται και αναδιαμορφώνονται από τις εμπειρίες που αποκτώνται κατά την έκθεση στο περιβάλλον (Fuster, 2002).

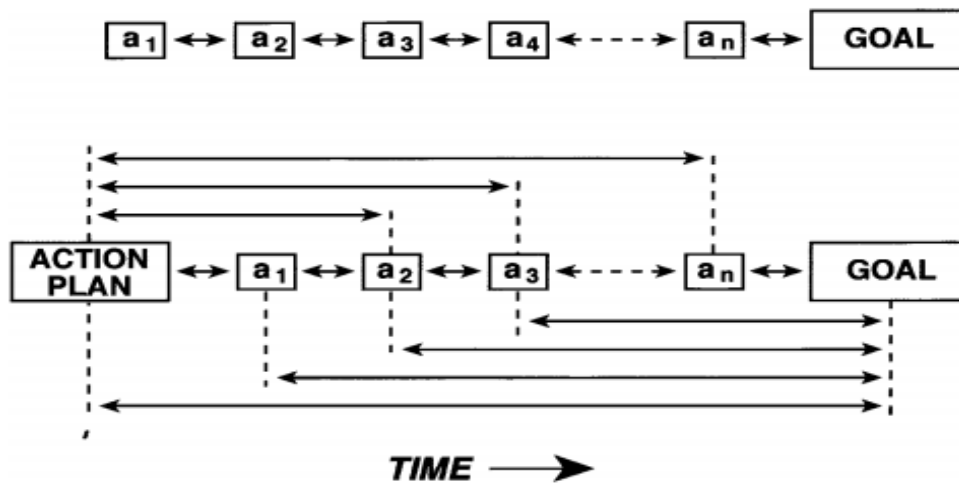


Figure 4] a. Πολλάκις επαναληφθείσα σειρά δράσεων, στα πλαίσια της οποίας η μια ενέργεια οδηγεί στην επόμενη σαν αλυσίδα με προσανατολισμό ένα συγκεκριμένο στόχο. Τέτοιου είδους αλληλουχία δράσεων μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς την επέμβαση του προμετωπιαίου φλοιού. b. Νέα και σύνθετη σειρά δράσεων με διασταυρούμενες χρονικές συνδέσεις (βέλη). Ο συλλογισμός των εναλλακτικών αλληλουχιών ενεργειών που μπορούν να διεκπεραιωθούν για την επίτευξη ενός δεδομένου στόχου απαιτεί τη λειτουργία χρονικής ολοκλήρωσης του PFC.

- Μνήμη εργασίας

Η μνήμη εργασίας (working memory) είναι ο όρος που χρησιμοποιείται για ένα τύπο μνήμης που είναι ενεργή για ένα πολύ περιορισμένο χρονικό διάστημα, συνήθως κλίμακας δευτερολέπτων. Πρόκειται δηλαδή για ένα σύστημα *βραχύχρονης αποθήκευσης και επεξεργασίας εξωτερικών και εσωτερικών αναπαραστάσεων* με σκοπό τη συσχέτιση πληροφοριών, απομακρυσμένων μεταξύ τους χωρικά και χρονικά. Η σημασία αυτής της διεργασίας έχει αποδοθεί ανάγλυφα από την κλασική πλέον παρομοίωση του Baddeley (1986) για τη μνήμη εργασίας, ως τον *‘μαυροπίνακα’* του εγκεφάλου, όπου η πληροφορία, όπως ένας στόχος ή ένας κανόνας, δεν εντυπώνεται μόνιμα στα νευρωνικά δίκτυα, αλλά αντικαθίσταται σύντομα, όταν πάψει να είναι χρήσιμη (Goldman-Rakic, 1995; Miller, 2000).

Έχουν αρχίσει προ πολλού να συσσωρεύονται αποδεικτικά στοιχεία, τα οποία προσδιορίζουν, ως νευρικό υπόστρωμα της μνήμης εργασίας, περιοχές του προμετωπιαίου φλοιού (Goldman-Rakic, 1987; Fuster, 2008). Η Patricia Goldman-Rakic και οι συνεργάτες της (1996), αποκάλυψαν ότι πολλοί νευρώνες του πλαγιοπίσθιου προμετωπιαίου φλοιού του πιθήκου πυροδοτούν με έναν χρονικά συντονισμένο, εμμένοντα τρόπο κατά τη διάρκεια της δοκιμής χωρικής μνήμης εργασίας. Υποστήριξαν επίσης, ότι αυτή η delay-related πυροδότηση προκύπτει από τη δραστηριότητα πυραμιδικών νευρώνων με παρόμοια χωρικά χαρακτηριστικά, οι οποίοι στέλνουν διεγερτικά σήματα μεταξύ τους, με στόχο την προσωρινή αποθήκευση της πληροφορίας στη μνήμη εργασίας. Έτσι φανερώθηκε μια πρωταρχικής σημασίας ιδιότητα των πυραμιδικών νευρώνων του προμετωπιαίου φλοιού για την σωστή λειτουργία αυτού του τύπου μνήμης. Πρόκειται για την ικανότητα της *‘on-line’* διατήρησης των πληροφοριών για βραχείες χρονικές περιόδους ως εσωτερικές ενεργές αναπαραστάσεις εξωτερικών ερεθισμάτων, ακόμη και όταν αυτά πάψουν να είναι παρόντα. Ο όρος που έχει επικρατήσει για την περιγραφή της ιδιότητας αυτής είναι η *«παραμένουσα δραστηριότητα»* (persistent activity).

Από τη στιγμή που πρωτοανακαλύφθηκε, η *«παραμένουσα δραστηριότητα»* έχει εντοπιστεί και σε πολλές άλλες φλοιικές και υποφλοιικές δομές (Hikosaka et al., 2000), γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι η δημιουργία και η διατήρησή της μπορεί να στηρίζεται σε κάποιο μηχανισμό που αξιοποιεί ένα ευρέως εκτεταμένο νευρωνικό κύκλωμα. Το πώς ακριβώς δημιουργείται και ρυθμίζεται η παραμένουσα δραστηριότητα των νευρώνων στον εγκέφαλο των θηλαστικών δεν έχει ακόμη πλήρως αποσαφηνιστεί. Ωστόσο, έχουν προταθεί διάφοροι πιθανοί, και όχι αναγκαστικά αλληλοαποκλειόμενοι, μηχανισμοί που εξηγούν αυτό το φαινόμενο. Μια υπόθεση είναι ότι η *«παραμένουσα δραστηριότητα»* προκύπτει από ισχυρές επαναλαμβανόμενες διεγέρσεις μεταξύ των πυραμιδικών νευρώνων, δηλαδή ότι αρχίζει και διατηρείται μέσω αμοιβαίας θετικής ανάδρασης στα πλαίσια ενός πληθυσμού νευρώνων. Δίκτυα

πυραμιδικών νευρώνων στον PFC διασυνδέονται με δενδριτικές άκανθες και ανταλλάσσουν *διεργεργετικά μετασυναπτικά σήματα*, μέσω υποδοχέων NMDA, οι οποίοι φαίνεται να διαδραματίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην delay-related πυροδότηση (Wang, 1999; Gao et al., 2012). Εναλλακτικά, η «παραμένουσα δραστηριότητα» πιθανώς εξαρτάται από την εγγενή ιοντική διαπερατότητα της μεμβράνης ή από ενδοκυττάρια σήματα. Πιο συγκεκριμένα, μοναδιαίοι νευρώνες του φλοιού μπορεί να εμφανίζουν παραμένουσα δραστηριότητα, λόγω ειδικών ρευμάτων που διαρρέουν τη μεμβράνη. Για παράδειγμα, νευρώνες του ενδορινικού φλοιού εμφανίζουν μια βαθμιδωτή εκπόλωση, ύστερα από σύντομο ερεθισμό. Τέτοια πυροδότηση μπορεί να οδηγήσει στην εισροή κατιόντων ασβεστίου μέσω τασεο-ελεγχόμενων διαύλων ασβεστίου στους δενδρίτες, προκαλώντας εκπόλωση εκ νέου και δημιουργώντας συνεπώς έναν κύκλο θετικής ανάδρασης που καταλήγει σε μια καθυστερημένη μεθεκπόλωση (dADP). Αυτός ο τύπος παραμένουσας δραστηριότητας δείχνει να εξαρτάται από ένα ρεύμα κατιόντων, ενεργοποιούμενο από ασβέστιο και μη εκλεκτικό ως προς το είδος του κατιόντος (calcium-activated non-selective cation current – CAN) (Wang, 1999; Egorov et al., 2002; Fransén et al., 2006; Sidiropoulou et al., 2009).

Η «παραμένουσα δραστηριότητα» είναι μια ιδιότητα εκλεκτική ως προς το ερέθισμα. Αυτό σημαίνει ότι σε μια δοκιμή χωρικής μνήμης εργασίας για παράδειγμα, ένας συγκεκριμένος πυραμιδικός νευρώνας θα εμφανίσει παραμένουσα δραστηριότητα, μόνο στην περίπτωση ερεθίσματος που θα παρουσιαστεί σε ένα ειδικό σημείο του οπτικού πεδίου, το οποίο αντιστοιχεί στο μνημονικό πεδίο του νευρώνα. Παρά το μεγάλο αριθμό ερευνών τα τελευταία χρόνια που έχουν εστιάσει σε αυτό το πεδίο, δεν έχουν ακόμη διασαφηνιστεί οι κυτταρικοί μηχανισμοί, στους οποίους στηρίζεται αυτή η εκλεκτικότητα (Sidiropoulou & Poirazi, 2012).

Η σημασία της μνήμης εργασίας στα πλαίσια ανώτερων γνωσιακών λειτουργιών δεν είναι αναγκαστικά αυτονόητη, ίσως εξαιτίας της παροδικής της φύσης. Ωστόσο, η ικανότητα του εγκεφάλου να ανακαλεί γεγονότα χωρίς να είναι παρόν το άμεσο ερέθισμα, είναι ίσως ο πιο ευέλικτος έμφυτος μηχανισμός του και το πλέον αξιόλογο εξελικτικό του επίτευγμα. Η πιο στοιχειώδης συνεισφορά της μνήμης εργασίας στην γνωσιακή λειτουργία είναι η ικανότητα αντίληψης της ύπαρξης ενός αντικειμένου, όταν αυτό ξεφύγει από το οπτικό ή γενικά απ'το αισθητικό πεδίο. Αυτή η διεργασία έχει αναφερθεί ως 'γνώση αναπαράστασης' και θεωρείται ένα θεμελιώδες συστατικό της αφηρημένης σκέψης (Goldman – Rakic, 1995; Gao et al., 2012). Η μνήμη εργασίας επιστρατεύεται επίσης σε όλες τις μορφές γνωστικής και γλωσσικής επεξεργασίας και είναι υψίστης σημασίας, τόσο για την κατανόηση όσο και για τη δόμηση προτάσεων. Εν τέλει, αυτός ο τύπος μνήμης διαδραματίζει γενικότερα σπουδαίο ρόλο στη διεκπεραίωση μεγάλου φάσματος πολυσύνθετων γνωστικών λειτουργιών, όπως η μάθηση, ο

συλλογισμός, η αντίληψη, ο προσανατολισμός της προσοχής, η λήψη αποφάσεων, η αναστολή συμπεριφορών, ο σχεδιασμός των δράσεων και η δημιουργικότητα (Goldman-Rakic, 1995).

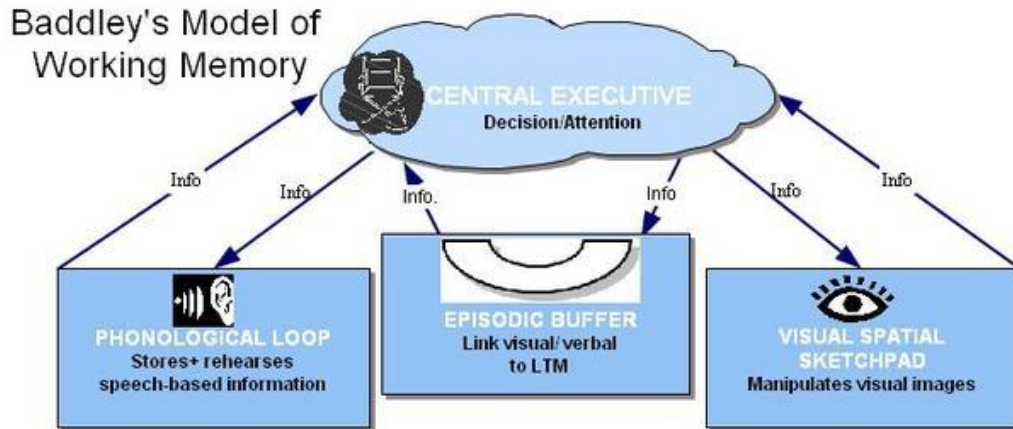


Figure 5] Το μοντέλο του Baddeley για τη μνήμη εργασίας (WM), σύμφωνα με το οποίο η WM αποτελείται από επιμέρους εξειδικευμένα συστήματα μνήμης και ένα κεντρικό σύστημα επίβλεψης. Τα εξειδικευμένα συστήματα είναι: 1) Η φωνολογική θηλιά (phonological loop) αποθηκεύει προσωρινά πληροφορίες που σχετίζονται με την ομιλία (inner ear), ενώ ρυθμίζει και την διαδικασία εκφοράς του λόγου (inner speech). 2) Το οπτικοχωρικό σημειωματάριο (visuospatial sketchpad) διατηρεί παροδικά πληροφορίες που σχετίζονται με οπτικά ερεθίσματα ή/ και με το χώρο. 3) Το episodic buffer λαμβάνει και συνδυάζει πληροφορίες από πολλαπλές πηγές (sensory modalities), ενώ ανακαλεί και τροφοδοτεί με πληροφορίες τη μακρόχρονη μνήμη (LTM). 4) Τέλος, ο κεντρικός εκτελεστής (central executive) συντονίζει τη δράση των υπολοίπων συστημάτων (slave systems) και είναι υπεύθυνος για τον προσανατολισμό της προσοχής.

- Προετοιμασία κινητικής προσοχής

Βάσει στοιχείων από διάφορες ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες σε πιθήκους, μια ακόμα λειτουργία του προμετωπιαίου φλοιού - και κυρίως του πλευρικού τμήματός του φαίνεται να αποτελεί το «σετ δραστηριοτήτων προετοιμασίας» της κινητικής προσοχής (preparatory set of motor attention) (Niki & Watanabe, 1979; Quintana & Fuster, 1999). Πρόκειται για μια ορθόδρομη χρονικά διαδικασία που προετοιμάζει τον οργανισμό για κάποια δραστηριότητα εξαρτώμενη από την πληροφορία που βρίσκεται στη μνήμη εργασίας του. Το σετ προετοιμασίας μπορεί να εκληφθεί και ως το «στοιχείο εγκλεισμού» της κινητικής προσοχής (ενώ αντίστοιχα το στοιχείο αποκλεισμού θεωρείται ο ανασταλτικός έλεγχος της προσοχής που θα αναλυθεί παρακάτω) (Fuster, 1997).

Μεταξύ ενός αισθητικού στοιχείου και της επακόλουθης κινητικής απόκρισης, καταγράφονται από την επιφάνεια του μετωπιαίου φλοιού αργά δυναμικά, των οποίων το μέγεθος συνδέεται με το χρόνο και

την ακρίβεια της απόκρισης (Brunia et al., 1985). Έχουν αναγνωρισθεί δύο ειδών δυναμικά, τα οποία ανήκουν στο ίδιο συνεχές. Το πρώτο είναι το επονομαζόμενο «κύμα προσμονής» (expectancy wave), ή αλλιώς η *εξαρτώμενη αρνητική μεταβολή* (contingent negative variation – CNV), η οποία εξαρτάται από την ανάγκη διαμεσολάβησης μεταξύ του αισθητικού ερεθίσματος και της χρονικά διακριτής απόκρισης. Το δεύτερο δυναμικό, το οποίο αποκαλείται «*δυναμικό ετοιμότητας*» (readiness potential – RP), εξαρτάται από την ανάγκη προετοιμασίας για μια κινητική δράση. Η πηγή του CNV βρίσκεται πιο πρόσθια, σε κάποια προμετωπιαία περιοχή, από αυτήν του RP, η οποία φαίνεται να δημιουργείται στην περιοχή του προκινητικού ή του κινητικού φλοιού. Και τα δύο δυναμικά αυξάνονται σε μέγεθος με το χρόνο, όσο πλησιάζει η στιγμή της απόκρισης και πιθανώς αναπαριστούν την αυξανόμενη δραστηριότητα των υπεύθυνων νευρώνων κατά την προετοιμασία για την εκδήλωση της απόκρισης.

Είναι σχεδόν βέβαιο, ότι η εμπλοκή του προμετωπιαίου φλοιού στην προπαρασκευή των εκτελεστικών δραστηριοτήτων είναι αλληλένδετη με το ρόλο του πλευρικού μετωπιαίου λοβού του ανθρώπου στον σχεδιασμό μελλοντικών δράσεων. Ένα από τα πιο σταθερά κλινικά συμπτώματα ασθενών με κακώσεις σε αυτή την περιοχή του εγκεφάλου είναι η ανικανότητα διαμόρφωσης και εκτέλεσης σχεδίων δράσης, η οποία φαίνεται να αντικατοπτρίζει, σε μεγαλύτερη χρονική κλίμακα, μια δυσλειτουργία στο βραχύχρονο σκετ προετοιμασίας δράσεων (Brunia et al., 1985; Fuster, 2002).

- **Ανασταλτικός έλεγχος**

Επιστημονικά δεδομένα από το χώρο της γνωστικής νευροεπιστήμης συγκλίνουν τα τελευταία χρόνια στο ότι διάφορες υποπεριοχές του προμετωπιαίου φλοιού συνεισφέρουν με ποικίλους τρόπους στον ανασταλτικό έλεγχο, ο οποίος αποτελεί απαραίτητη διαδικασία ενσωμάτωσης πληροφοριών για τη σωστή εκτέλεση μιας δραστηριότητας (Ridderinkhof et al. 2004; Aron, 2007). Ο προφανής φυσιολογικός σκοπός του ανασταλτικού ελέγχου είναι η *καταστολή όλων των πιθανών μη συσχετιζόμενων εσωτερικών ή εξωτερικών ερεθισμάτων* που μπορεί να αναμιχθούν και να παρεμποδίσουν οποιαδήποτε πτυχή της συμπεριφοράς, του λόγου ή της γνωστικής λειτουργίας προετοιμάζεται μια δεδομένη στιγμή να εκτελεστεί (Fuster, 2002). Η Harnishfeger (1995) ορίζει δύο πτυχές του ανασταλτικού ελέγχου: Η πρώτη είναι η *γνωστική αναστολή* (cognitive inhibition) που αφορά στην καταστολή γνωστικών στοιχείων ή διαδικασιών που έχουν ενεργοποιηθεί πρωτύτερα και στην αντίσταση ενάντια παρεμβολή αισθητικών ερεθισμάτων, συναισθημάτων, ανεπιθύμητων μνημών ή άλλων διαδικασιών στο πεδίο εστίασης της προσοχής. Η άλλη πτυχή είναι η *συμπεριφορική αναστολή* (behavioral inhibition) και έχει να κάνει με τον

έλεγχο της άσκοπης συμπεριφοράς, όπως η καθυστέρηση της ικανοποίησης και η κατανίκηση εσωτερικών τάσεων, παρορμήσεων ή ενστικτωδών συμπεριφορών.

Στην περίπτωση που οι παράγοντες παρεμβολής είναι τυχαία οπτικά, ακουστικά, απτικά ή άλλα ερεθίσματα που φθάνουν στον PFC από τα αισθητικά συστήματα, ενεργοποιείται το «στοιχείο αποκλεισμού» της προσοχής. Η δράση των αισθητικών περιοχών που επεξεργάζονται και στέλνουν τα ανεπιθύμητα σήματα στον προμετωπιαίο φλοιό πιθανότατα καταστέλλεται από ένα σύστημα ανασταλτικής ανατροφοδότησης του μεσοκογχιαίου PFC, το οποίο αποτελεί τμήμα του ευρύτερου δικτύου ελέγχου της προσοχής. Ο μεσοκογχιαίος φλοιός φαίνεται να έχει ρόλο και στην παρεμπόδιση των εσωτερικών παρωθήσεων από το να παρεμβληθούν στην εκτέλεση των στοχευμένων δράσεων. Οι βιολογικές παρορμήσεις πηγάζουν από το διεγκέφαλο και το εγκεφαλικό στέλεχος. Βρίσκονται όμως υπό τον έλεγχο του μεσοκογχιαίου PFC, μέσω ανατομικά ταυτοποιημένων απαγωγών συνδέσεων προς τις υποφλοιικές περιοχές αυτές και ειδικά προς τον υποθάλαμο. Τέλος, μια ακόμη πηγή παρεμβολής είναι οι αναπαραστάσεις κινητικών ενεργειών που είναι άσχετες ή ασυμβίβαστες με ενέργειες που βρίσκονται στη διαδικασία χρονικής οργάνωσης πριν την εκτέλεσή τους. Πρόκειται για κινητικές συνήθειες και τάσεις που έχουν εγκαθιδρυθεί στην μακρόχρονη μνήμη και κατ'επέκτασιν στο φλοιικό και υποφλοιικό δίκτυο των κινητικών συστημάτων. Η καταστολή τους αποτελεί τον πυρήνα του «στοιχείου αποκλεισμού» της κινητικής προσοχής (Fuster, 2002).

Παρά το γεγονός ότι ο κεντρικός ρόλος του προμετωπιαίου φλοιού στην καταστολή ανεπιθύμητων ερεθισμάτων θεωρείται πλέον επιβεβαιωμένος, ο μηχανισμός στον οποίο στηρίζεται η λειτουργία αυτή εξακολουθεί να παραμένει ασαφής (Barbas & Zikopoulos, 2007). Ένας μηχανισμός που προτάθηκε πρόσφατα από την Munakata και τους συνεργάτες της (2011) υποστηρίζει ότι υπάρχουν 2 τύποι ανασταλτικής επίδρασης του PFC σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου. Ο πρώτος έγκειται στην άμεση καθολική αναστολή της δράσης ολόκληρων περιοχών όπου προεκβάλλει και συντελεί στην ανοχή στρεσογόνων παραγόντων και στην καταστολή ανεπιθύμητων αποκρίσεων και ανάκλησης μνημών. Τέτοιο είδος αναστολής υφίστανται ορισμένες υποφλοιικές και αρχιφλοιικές περιοχές, όπου οι προβολές του PFC ενεργοποιούν GABAεργικούς διάμεσους νευρώνες και καταστέλλουν τη δράση ολόκληρης της περιοχής – στόχου. Η ενεργοποίηση των GABAεργικών διάμεσων νευρώνων μπορεί να γίνει είτε άμεσα μέσω συνάψεων με διεγερτικούς νευρώνες του PFC, όπως στην αντιμετώπιση των στρεσογόνων, είτε έμμεσα. Σε αυτή την περίπτωση οι διεγερτικοί νευρώνες του PFC συνάπτονται με διεγερτικά κύτταρα της περιοχής προβολής και αυτά με τη σειρά τους με τους ανασταλτικούς διάμεσους νευρώνες, κάτι που συμβαίνει στην καταστολή αποκρίσεων. Ο δεύτερος τύπος ανασταλτικής επίδρασης αφορά σε νεοφλοιικές και ορισμένες υποφλοιικές δομές και στηρίζεται σε ένα μηχανισμό έμμεσης, ανταγωνιστικής

ανασταλτικής δυναμικής. Στα πλαίσια αυτού του τύπου ανασταλτικού ελέγχου νευρώνες του προμετωπιαίου φλοιού διεγείρουν άμεσα περιοχές που σχετίζονται με την επεξεργασία της επιθυμητής στοχευμένης συμπεριφοράς. Με αυτόν τον τρόπο, τα επιθυμητά μονοπάτια επεξεργασίας καθίστανται «ανταγωνιστικότερα» από άλλα πιθανά μη συσχετιζόμενα μονοπάτια και παράλληλα ασκούν ανασταλτική επίδραση σε αυτά (Munakata et al., 2011). Τέτοιου είδους έμμεσοι ανταγωνιστικοί μηχανισμοί αναφέρονται συχνά σε θεωρίες που αφορούν στις διαδικασίες επιλογής και προσοχής (Desimone & Duncan, 1995).

Όποιος και αν είναι ο συγκεκριμένος μηχανισμός, απ'τον οποίο εξαρτάται ο ανασταλτικός έλεγχος, το βασικό στοιχείο που καθιστά τον προμετωπιαίο φλοιό ικανό να τον ασκεί είναι η εξαιρετική του συνδεσιμότητα με πολυάριθμες εγκεφαλικές περιοχές που επεξεργάζονται πληροφορίες προερχόμενες από όλα τα αισθητικά συστήματα ή άλλες που προέκυψαν μέσω της εμπειρίας και αποθηκεύτηκαν στη μνήμη. Επιπλέον, εξαιρετική σημασία έχει και η στενή επικοινωνία του προμετωπιαίου με δομές που σχετίζονται με την επεξεργασία του συναισθήματος, δεδομένου ότι η *στοχευμένη συμπεριφορά* είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τα κίνητρα και το συναισθηματικό τους πλαίσιο (Barbas & Zikopoulos, 2007).

- Επεξεργασία απώτερης μνήμης

Οι μνήμες από τα νέα ερεθίσματα που προσλαμβάνει διαρκώς ο εγκέφαλος εναπόκεινται αρχικά στο σύστημα του *μέσου κροταφικού λοβού*, συμπεριλαμβανομένου και του *ιπποκάμπου*, ο οποίος λειτουργεί ως προσωρινή αποθήκη νέων μνημών, μέσω της αρχικής εδραίωσής τους σε συναπτικό επίπεδο. Όσο όμως οι μνήμες αυτές ωριμάζουν, η εδραίωσή τους εξαρτάται ολοένα και περισσότερο από άλλες περιοχές του φλοιού. Φαρμακολογικές και ανατομικές προσεγγίσεις, σε συνδυασμό με τη χρήση διαγνονιδιακών μοντέλων και σύγχρονων μεθόδων απεικόνισης (imaging), αρχίζουν και καθιστούν σαφές τα τελευταία χρόνια, ότι ο προμετωπιαίος φλοιός πιθανότατα διαδραματίζει αξιοσημείωτο ρόλο στην *επεξεργασία απώτερων μνημών* (Maviel et al., 2004).

Όταν περιοχές του προμετωπιαίου φλοιού υφίστανται εκτομές ή φαρμακολογική απενεργοποίηση, παρατηρείται διαταραχή στην ανάκληση απώτερων, αλλά όχι πρόσφατων μνημών. Αντίστροφα, όταν αντίστοιχες παρεμβάσεις πραγματοποιούνται σε περιοχές του ιπποκάμπου διαταράσσεται η ανάκληση πρόσφατων, αλλά όχι απώτερων μνημονικών γεγονότων. Βάσει αυτών των δεδομένων, το προεινόμενο μοντέλο υποστηρίζει ότι ο προμετωπιαίος φλοιός συμβάλλει στην μακρόχρονη αποθήκευση μνημών με δυο τρόπους. Κατά πρώτον, αφού οι νέες μνήμες κωδικοποιηθούν στα δίκτυα μεταξύ φλοιού και ιπποκάμπου, *οι αμφίδρομες συνδέσεις* μεταξύ του PFC με διάφορες αισθητικές, κινητικές και

μεταιχμιακές δομικές ενότητες (modalities) του φλοιού αρχίζουν να ενισχύονται, επιτρέποντας στις μνήμες να λειτουργούν ανεξάρτητα από τον υποκάμπο. Στο σημείο αυτό ο PFC αναλαμβάνει τα ηνία για την ενσωμάτωση των πληροφοριών στην απώτερη μνήμη. Κατά δεύτερον, ο προμετωπιαίος φλοιός πιστεύεται ότι ρυθμίζει την δραστηριότητα του υποκάμπου, μέσω της ανάκλησης μνημών. Ο υποκάμπος δραστηριοποιείται φυσιολογικά κατά την επεξεργασία εξωτερικών ερεθισμάτων από το περιβάλλον. Όταν όμως η εισερχόμενη πληροφορία ταιριάζει με μια ήδη αποθηκευμένη, απώτερη, φλοιική μνήμη, ο προμετωπιαίος φλοιός αναστέλλει τη λειτουργία του υποκάμπου, με άμεσες ή έμμεσες προβολές, ώστε να προληφθεί η κωδικοποίηση περιττής πληροφορίας. Αν το ερέθισμα απαντάται για πρώτη φορά, ή έχει ξεχαστεί και άρα το εισερχόμενο μήνυμα δεν ταιριάζει με καμία αποθηκευμένη μνήμη, δεν πραγματοποιείται αναστολή από τον PFC και ο υποκάμπος επιστρατεύεται κανονικά (Frankland & Bontempi, 2005).

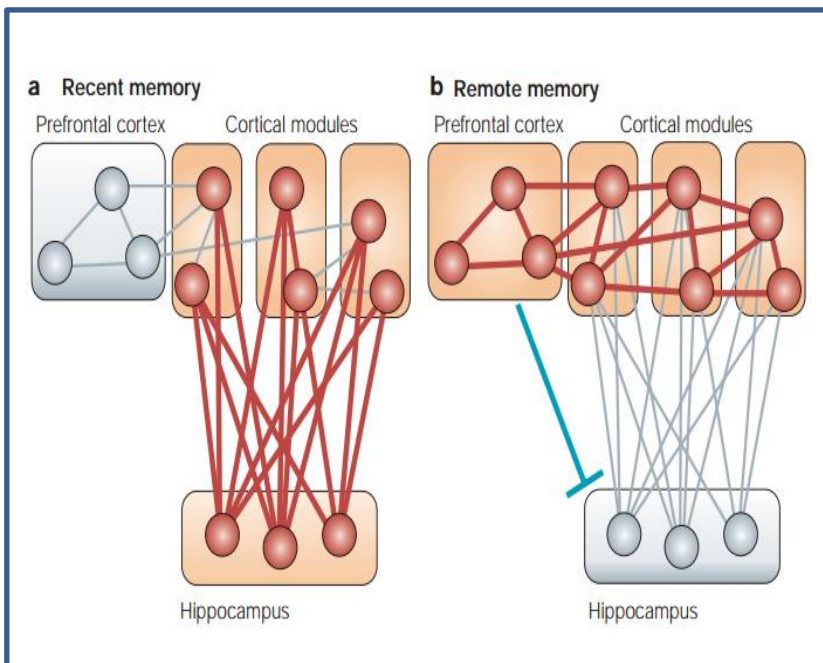


Figure 6] Προμετωπιαίος φλοιός και απώτερη μνήμη Αρχικά οι νεοεισερχόμενες μνήμες κωδικοούνται στα δίκτυα υποκάμπου – φλοιού. Σε αυτό το στάδιο ο ρόλος του υποκάμπου είναι καίριος στην ενσωμάτωση πληροφοριών από διάφορες διεσπαρμένες περιοχές του φλοιού, καθεμία από τις οποίες επεξεργάζεται συγκεκριμένα συστατικά στοιχεία μιας μνήμης .

a. Όταν οι μνήμες ωριμάζουν, οι διασυνδέσεις μεταξύ των φλοιικών αυτών κυκλωμάτων ενισχύονται και έτσι τα αποθηκευμένα μνημονικά γεγονότα εξαρτώνται ολοένα και λιγότερο από τον υποκάμπο. Σε αυτό το σημείο ο ρόλος ενσωμάτωσης αναλαμβάνεται από τον PFC.

b. Αμφίδρομες συνδέσεις επιτρέπουν την επικοινωνία του PFC με αισθητικές, κινητικές και μεταιχμιακέφλοιικές δομές. Ο PFC ρυθμίζει τη δραστηριότητα του υποκάμπου κατά τη διάρκεια ανάκλησης μνημών. Αυτό συμβαίνει

ως εξής: Ο υποκάμπος ενεργοποιείται φυσιολογικά κατά την επεξεργασία εξωτερικών ερεθισμάτων. Ωστόσο, αν οι εισερχόμενες πληροφορίες αντιστοιχούν σε κάποια ήδη αποθηκευμένη μνήμη στο φλοιό, ο προμετωπιαίος φλοιός αναστέλλει τη δραστηριότητα του υποκάμπου είτε με άμεσες είτε με έμμεσες συνδέσεις για την αποφυγή κωδικοποίησης περιττής πληροφορίας.

- Απόσβεση μνήμης του φόβου

Ο όρος απόσβεση αναφέρεται κατά κανόνα στην αποδυνάμωση μιας απόκρισης ως προς ένα ερέθισμα, το οποίο είχε αρχικά αποκτήσει ιδιότητες αποστροφής μέσω της εξαρτημένης μάθησης (*conditioned stimulus - CS*), όταν αυτό σταματήσει να συνοδεύεται από τις επώδυνες συνέπειες ενός μη εξαρτημένου ερεθίσματος (*unconditioned stimulus - US*). Η απόσβεση του φόβου ως προς ένα τέτοιο ερέθισμα αποτελεί κατά βάση μια αναπροσαρμογή της συμπεριφορικής «στρατηγικής» που ακολουθείται, όταν αυτό επανεμφανιστεί. Η εναλλαγή μεταξύ διαφορετικών στρατηγικών απόκρισης είναι μια από τις λειτουργίες του προμετωπιαίου φλοιού, όπως επιβεβαιώνουν και πολυάριθμα κλινικά και πειραματικά δεδομένα, σύμφωνα με τα οποία άνθρωποι και ζώα με κακώσεις σε περιοχές του mPFC αδυνατούν να μεταβάλλουν τις συμπεριφορικές τους επιλογές, όταν οι συνθήκες αλλάζουν (διατήρηση – *preservation*) (Sotres-Bayon et al., 2006). Το 1994 ο Morgan και οι συνεργάτες τους διαπίστωσαν ότι αρουραίοι με βλάβες σε περιοχές του μέσου προμετωπιαίου φλοιού απαιτούσαν πολύ μεγαλύτερο αριθμό παρουσιάσεων του CS, μη συνοδευόμενου από επώδυνο US, μέχρι να σταματήσουν να εκδηλώνουν αποκρίσεις φόβου ως προς το CS. Εμφάνιζαν δηλαδή αντίσταση ενάντια στην απόσβεση του φόβου, την οποία και όρισαν ως «*συναισθηματική διατήρηση*».

Τα αποτελέσματα πιο σύγχρονων ερευνών που αφορούν στο πεδίο αυτό συγκλίνουν στο ότι η απόσβεση του φόβου στηρίζεται σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ φλοιικών και υποφλοιικών περιοχών του εγκεφάλου και ειδικά μεταξύ του προμετωπιαίου φλοιού και της αμυγδαλής (Quirk et al., 2003; Rosenkranz et al., 2003). Κυκλώματα νευρώνων της αμυγδαλής ευθύνονται για την εκμάθηση του φόβου. Ειδικά η πλευρική της περιοχή είναι το κεντρικό σημείο συσχέτισης ενός εξαρτημένου ερεθίσματος (*conditioned stimulus - CS*) με ένα μη εξαρτημένο, επώδυνο ερέθισμα (*unconditioned stimulus - US*). Η σύνδεση αυτή απαιτείται για την εκδήλωση μιας εξαρτημένης απόκρισης που φανερώνει φόβο, όπως είναι η πλήρης ακινησία (*freezing*). Η πλευρική αμυγδαλή (LA) στη συνέχεια στέλνει σήματα στον κεντρικό πυρήνα της αμυγδαλής (CE), ο οποίος ασκεί έλεγχο στην έκφραση του φόβου, μέσω άμεσων ή έμμεσων προβολών του σε ειδικά κυκλώματα που μεσολαβούν σε διαφορετικές πτυχές αντίδρασης, όπως το *freezing*, οι αποκρίσεις του αυτόνομου νευρικού συστήματος και οι ενδοκρινικές αποκρίσεις. Η συμμετοχή του προμετωπιαίου φλοιού - και ειδικότερα του υπομεταιχμιακού φλοιού (IL) του μέσου κοιλιακού PFC - στη διαδικασία απόσβεσης του φόβου, έγκειται στη ρύθμιση της επικοινωνίας μεταξύ της LA και του CE και κατ'επέκταση στην ικανότητα του εξαρτημένου ερεθίσματος να προκαλεί εξαρτημένη απόκριση φόβου (Sotres-Bayon et al., 2006). Η ρυθμιστική αυτή δράση θεωρείται ότι επιτυγχάνεται μέσω διεγερτικών σημάτων του vmPFC, είτε σε ανασταλτικούς διάμεσους

νευρώνες της πλευρικής αμυγδαλής (Rosenkranz et al., 2003), είτε σε ανασταλτικές προβολές και ενδιάμεσες κυτταρικές μάζες που συνδέουν την πλευρική αμυγδαλή με τον κεντρικό πυρήνα (Quirk et al., 2003). Οι λεπτομέρειες ωστόσο του μηχανισμού αυτού εξακολουθούν να είναι εν πολλοίς άγνωστες.

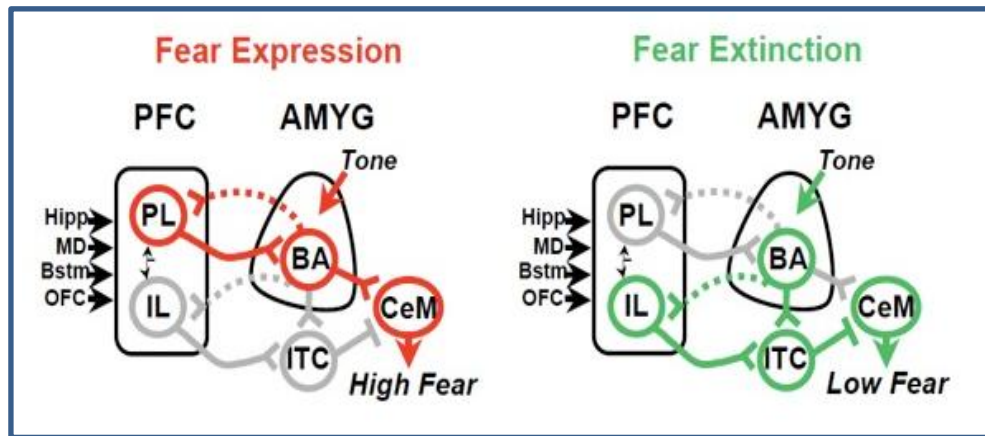


Figure 7] Ρύθμιση της έκφρασης και της απόσβεσης της μνήμης του φόβου: Ο προμετωπιαίος φλοιός μπορεί να ελέγξει τις αποκρίσεις ως προς ένα εξαρτημένο ερέθισμα (conditioned stimulus – CS), το οποίο έχει συσχετιστεί με κάποιο επώδυνο μη εξαρτημένο ερέθισμα (unconditioned stimulus – US) και να οδηγήσει είτε στην έκφραση είτε στην απόσβεση της μνήμης του φόβου. Ο PFC δέχεται πληροφορίες από την αμυγδαλή, όπου το εξαρτημένο ακουστικό ερέθισμα έχει υποστεί επεξεργασία, καθώς και από άλλες περιοχές, όπως ο ιππόκαμπος, μονοαμινεργικοί νευρώνες του εγκεφαλικού στελέχους, ο μεσοραχιαίος πυρήνας του θαλάμου κ.ά. Το αν θα εκδηλωθούν αποκρίσεις φόβου ή όχι εξαρτάται από την υποπεριοχή του PFC που θα μεσολαβήσει στη μεταγωγή του σήματος. Αν διεγερθεί ο προμεταιχμιακός φλοιός (prelimbic cortex – PL) από τις προσαγωγούς ίνες του βασικού πυρήνα της αμυγδαλής (basal amygdala – BA) οι απαγωγί νευρώνες της περιοχής αυτής θα στείλουν διεγερτικό σήμα πίσω στην BA και από εκεί το σήμα θα μεταφερθεί στον κεντρικό πυρήνα της αμυγδαλής (CeM). Η διέγερση του CeM οδηγεί σε ενεργοποίηση απόκρισης του φόβου (fear expression). Αν αντίθετα διεγερθεί ο υπομεταιχμιακός φλοιός (infralimbic cortex –IL), η πληροφορία θα μεταφερθεί στις ενδιάμεσες κυτταρικές μάζες (intercalated cell masses –ITC), οι οποίες αποτελούνται από GABAεργικούς ανασταλτικούς νευρώνες. Οι ίνες των ITC στέλνουν ανασταλτικά σήματα στον CeM με συνέπεια την αναστολή της έκφρασης του φόβου (fear extinction).

- Λειτουργική διαμερισματοποίηση:

Έχοντας κατά νου τη δομική διαμερισματοποίηση του προμετωπιαίου φλοιού στα τρωκτικά, οι λειτουργίες που έχουν αποδοθεί στις διαφορετικές του υποπεριοχές είναι οι εξής:

Ο κοιλιακός και πλευρικός κογχιαίος φλοιός (vPFC, IPFC) σχετίζονται με την *επεξεργασία σχέσεων ανταμοιβής* μεταξύ των πιθανών επιλογών σε μία κατάσταση για την καθοδήγηση της συμπεριφοράς. Ο φλοιός της νήσου είναι πρωταρχικά μια *σπλαχνοαισθητική περιοχή* που εμπλέκεται απευθείας στην επεξεργασία προσαγωγών καρδιαγγειακών, καρδιοπνευμονικών, γαστρεντερικών, γευστικών και σχετικών αισθητικών πληροφοριών (Gabbott et al, 2005).

Αντίθετα, ο μέσος προμετωπιαίος φλοιός (mPFC) έχει συσχετιστεί με *αυτόνομες σπλαχνοαισθητικές λειτουργίες*, καθώς και με *ποικιλία διανοητικών λειτουργιών*, όπως η λήψη αποφάσεων, η στοχευμένη συμπεριφορά, οι διαδικασίες προσοχής και η *μνήμη εργασίας*. Για παράδειγμα, ένα πείραμα, κατά το οποίο εφαρμόστηκε η δοκιμασία της εναλλαγής με καθυστέρηση (delayed alternation task) στο λαβύρινθο οκτώ βραχιόνων (eight arm - maze) κατέληξε στο εξής αποτέλεσμα: Η παροδική απενεργοποίηση του mPFC με τοπική χορήγηση μουςκιμόλης (αγωνιστής του GABA_A υποδοχέα) οδήγησε σε μειωμένο ποσοστό σωστών επιλογών (μειωμένη ακρίβεια), χωρίς να επηρεάσει την ικανότητα εκμάθησης του κανόνα για το διαχωρισμό μεταξύ σωστών και λανθασμένων επιλογών. Υπήρξαν δηλαδή επιπλοκές στη μνήμη εργασίας, όχι όμως και στη μνήμη αναφοράς (Yoon et al, 2008).

Οι διάφορες υποδιαιρέσεις του mPFC φαίνεται να διαμεσολαβούν σε διακριτές λειτουργίες. Έτσι, ο ραχιαίος μέσος προμετωπιαίος φλοιός (AGm, AC, PL dorsal) έχει ως γενικότερο ρόλο τη χρονική οργάνωση μιας διαδοχής συμπεριφορών, ενώ εμπλέκεται και στη λήψη αποφάσεων, σε διάφορες κινητικές συμπεριφορές και στην ανάμνηση αυτών, στην επιλογή και ολοκλήρωση μιας απόκρισης, στη μάθηση πλοήγησης στο χώρο και στη *μνήμη εργασίας*. Χρησιμοποιώντας τη δοκιμή Morris water maze σε τρωκτικά, η Teixeira και οι συνεργάτες της (2006) έδειξαν ότι ο φλοιός της πρόσθιας αύλακας του προσαγωγίου (AC) διαδραματίζει βασικό ρόλο στην ανάκληση απόμακρων χωρικών μνημών, που είναι απαραίτητη για την απρόσκοπτη πλοήγηση στο χώρο. Συγκεκριμένα, εξέτασαν την έκφραση του immediate early γονιδίου c-Fos στον AC. Η έκφραση του γονιδίου αυτού παρουσίασε αυξημένα επίπεδα κατά την ανάκληση ενός απόμακρου (1 μηνός) χωρικού μνημονικού γεγονότος, αλλά όχι ενός πρόσφατου (1 ημέρας). Επιπροσθέτως, η στοχευμένη φαρμακολογική απενεργοποίηση του AC παρεμπόδισε την ανάκληση απόμακρης μνήμης, αλλά δεν επέδρασε στη βραχύχρονη μνήμη.

Από την άλλη πλευρά, ο κοιλιακός μέσος προμετωπιαίος φλοιός (PL ventral, IL) έχει συσχετιστεί ανατομικά και λειτουργικά με το μεταιχμιακό σύστημα και μάλιστα είναι γνωστός και με την ονομασία

«συναισθηματικό κινητικό σύστημα». Το σύστημα αυτό είναι υπεύθυνο για την τροποποίηση και το συγχρονισμό των εσωτερικών μεταβολών στη φυσιολογία του οργανισμού, δηλαδή στην αυτόνομη και σπλαχνική δραστηριότητα. Για παράδειγμα, διεγερσιτοξικές (excitotoxic) βλάβες στον υπομεταιχμιακό φλοιό (IL), βρέθηκε ότι παρεμποδίζουν τη γενική αύξηση της θερμοκρασίας του σώματος κατά την προσδοκία τροφής και κατά τη μεταγευματική κατάσταση, η οποία παρατηρείται φυσιολογικά σε ζώα που ταΐζονται σε συγκεκριμένες ώρες της ημέρας, καταδεικνύοντας το ρόλο του IL στις αυτόνομες αποκρίσεις που σχετίζονται με την όρεξη (Recabarren et al, 2005). Άλλες πτυχές της λειτουργίας του κοιλιακού mPFC θεωρείται ότι αποτελούν οι διαδικασίες σχηματισμού κανόνων που προβλέπουν τη σχέση ενέργειας-αποτελέσματος, η προετοιμασία και η επιλογή μιας δράσης, η «επίβλεψη» του επιλεγμένου σχεδίου δράσης και η αναπροσαρμογή της συμπεριφοράς σύμφωνα με νέες στρατηγικές. Ένα πείραμα που πραγματοποιήθηκε για τη διερεύνηση λειτουργικών διαφοροποιήσεων μεταξύ του ραχιαίου και του κοιλιακού προμετωπιαίου φλοιού έδωσε τα εξής αποτελέσματα: Εφαρμόστηκε η δοκιμασία πέντε επιλογών, όπου αρουραίοι έπρεπε να ανταποκριθούν σε σύντομης διάρκειας φωτεινά σήματα. Τα ζώα που είχαν υποστεί διεγερσιτοξικές βλάβες στον ραχιαίο mPFC εμφάνισαν ελαττωμένη ακρίβεια, χωρίς να επαναλαμβάνουν επίμονα λανθασμένες επιλογές. Οι πτυχές της γνωσιακής λειτουργίας που υπέστησαν πλήγμα δηλαδή, ήταν η μνήμη εργασίας ή/και η ικανότητα διαλογής και χρονικής οργάνωσης των συμπεριφορικών αποκρίσεων κατά τη διάρκεια της δοκιμής. Αντίθετα, τα ζώα που υπέστησαν βλάβες στον κοιλιακό mPFC εμφάνισαν παροδική μόνο αύξηση στο ποσοστό των λανθασμένων επιλογών, αλλά αυξήθηκε ο βαθμός επανάληψης της ίδιας επιλογής (preservative responding). Το γεγονός αυτό υπογραμμίζει τη σημασία της συγκεκριμένης υποπεριοχής σε ότι αφορά τον ανασταλτικό έλεγχο ακατάλληλων αποκρίσεων και την αναπροσαρμογή της συμπεριφορικής στρατηγικής ανάλογα με τις συνθήκες (Passeti et al, 2002). Ακόμη ο υπομεταιχμιακός φλοιός (IL) φαίνεται να διαμεσολαβεί στη φάση απόσβεσης της εξαρτημένης μάθησης (π.χ στη διαδικασία απόσβεσης του φόβου) μέσω της καταστολής της αμυγδαλής (Heidbreder & Grönewegen, 2003; Vertes 2004; Gabbott et al., 2005).

Μνήμη και μακρόχρονη ενδυνάμωση (LTP)

- Γενικές έννοιες

Η μάθηση θα μπορούσε να περιγραφεί ως η διαδικασία με την οποία αποκτώνται νέες πληροφορίες για το περιβάλλον και η μνήμη ως η διεργασία με την οποία οι πληροφορίες αυτές διατηρούνται. Η μνήμη δεν είναι ενιαία, αλλά μπορεί να διαχωριστεί σε άδηλη, κατά την οποία η ανάκληση αποθηκευμένων πληροφοριών δεν περιλαμβάνει συνειδητή συμμετοχή του νου, και στην έκδηλη, η οποία αφορά στην απόκτηση γνώσεων για τον κόσμο, οι οποίες είναι προσιτές στη συνείδηση.

Είναι ευρέως αποδεκτό, ότι ικανή και αναγκαία συνθήκη για τον σχηματισμό μνημών αποτελούν οι *εξαρτώμενες από τη δραστηριότητα μεταβολές της συναπτικής πλαστικότητας*, οι οποίες επιτρέπουν την ενδυνάμωση της σύνδεσης μεταξύ νευρώνων. Έχουν γίνει εκτεταμένες προσπάθειες για την κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους επιτυγχάνονται οι μεταβολές αυτές και το κυρίαρχο μοντέλο, σε ότι αφορά την έκδηλη μάθηση, είναι αυτό της *μακρόχρονης ενδυνάμωσης* (long term potentiation – LTP). Η μακρόχρονη ενδυνάμωση θα μπορούσε να οριστεί ως η *παρατεταμένη αύξηση των μετασυναπτικών διεγερτικών δυναμικών*, ύστερα από μια σειρά επαναλαμβανόμενων, υψηλής συχνότητας διεγερτικών σημάτων εισόδου (όπως ο τετανικός ερεθισμός) και έχει μελετηθεί διεξοδικότερα στα νευρικά κυκλώματα του ιπποκάμπου. Η αντίθετη επίδραση τέτοιου είδους ερεθισμάτων στη συναπτική διαβίβαση, δηλαδή η μείωση της συχνότητας μετασυναπτικών δυναμικών για μακρό χρονικό διάστημα, είναι γνωστή ως *μακρόχρονη αποδυνάμωση* (long term depression – LTD) (Lynch, 2004).

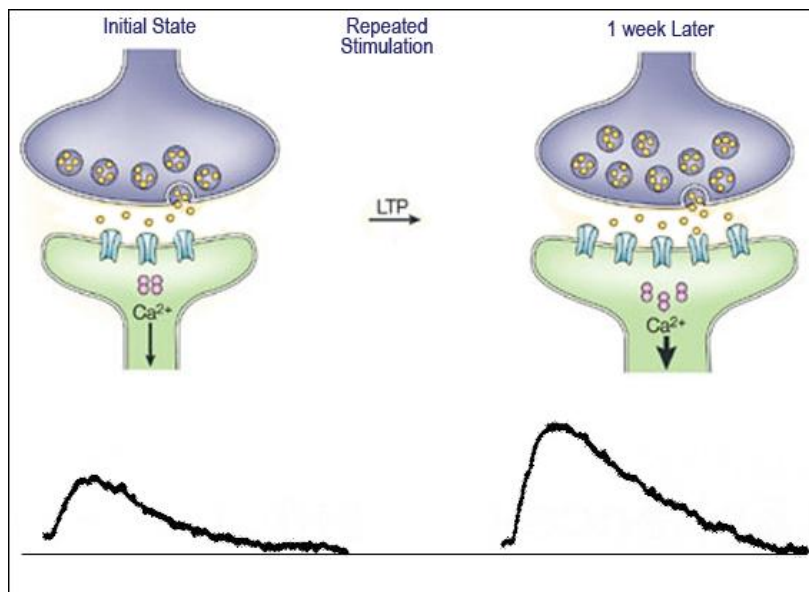


Figure 8] Σχεδιαγραμματική απεικόνιση μακρόχρονης ενδυνάμωσης (LTP)

Ο επαναλαμβανόμενος, υψηλής συχνότητας, ερεθισμός (όπως είναι ο τετανικός) μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση του μεγέθους της μετασυναπτικής απόκρισης σε ίσης έντασης ερεθίσματα για παρατεταμένο χρονικό διάστημα. Η επίδραση αυτή επί της συναπτικής ισχύος ονομάζεται μακρόχρονη ενδυνάμωση (LTP). Για την έκφρασή της απαιτείται επαγωγή έκφρασης ειδικών γονιδίων και de novo πρωτεϊνική σύνθεση. Η λειτουργία των πρωτεϊνικών αυτών προϊόντων μεταβάλλει τις ιδιότητες της σύναψης ή οδηγούν στο σχηματισμό νέων συνάψεων.

- Βασικοί μηχανισμοί επαγωγής LTP

Στο κυτταρικό επίπεδο η αποθήκευση μακρόχρονης μνήμης συνδέεται με την επαγόμενη έκφραση γονιδίων κατά τη διάρκεια ή σε σύντομο διάστημα μετά από μια εμπειρία, την *de novo* σύνθεση πρωτεϊνών και τη δημιουργία νέων συναπτικών συνδέσεων. Υπάρχουν ποικίλα σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγοντας τις παραπάνω επιδράσεις και προκαλώντας τόσο προσυναπτικές, όσο και μετασυναπτικές μεταβολές, επιτρέπουν την έκφραση και διατήρηση της μακρόχρονης ενδυνάμωσης.

Ένα από τα σημαντικότερα μονοπάτια είναι το εξής: Κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής συναπτικής διαβίβασης χαμηλής συχνότητας απελευθερώνεται γλουταμινικό από τις προσυναπτικές απολήξεις, το οποίο προσδένεται τόσο στους NMDA όσο και στους μη NMDA (κισκαλικού/ καϊνικού - Q/K) υποδοχείς που βρίσκονται στις δενδριτικές άκανθες. Ιόντα Na^+ και K^+ διαρρέουν μέσω των μη NMDA, όχι όμως και μέσω των NMDA διαύλων-υποδοχέων, διότι ιόντα Mg^{2+} αποφράσσουν τους διαύλους αυτούς, όταν το δυναμικό της μεμβράνης βρίσκεται σε κατάσταση ηρεμίας. Η ροή κατιόντων μέσω των μη NMDA διαύλων κατά τη διάρκεια ενός υψηλής συχνότητας τετανικού ερεθισμού, εκπολώνει τη μετασυναπτική μεμβράνη και έτσι αναστέλλεται ο αποκλεισμός των NMDA διαύλων. Το γεγονός αυτό επιτρέπει την εισροή Ca^{2+} στο κύτταρο και την αύξηση της συγκέντρωσής τους στο κυτταρόπλασμα, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των ασβεστιοεξαρτώμενων κινασών (PKC και CaMKII, η οποία ρυθμίζεται από το σύμπλοκο Ca^{2+} /καλμοδουλίνης), οι οποίες διαδραματίζουν μείζονα ρόλο στη μεταβολή της συναπτικής πλαστικότητας. Όταν επιτευχθεί η μακρόχρονη ενδυνάμωση το μετασυναπτικό κύτταρο απελευθερώνει έναν *παλίνδρομο αγγελιαφόρο*, ο οποίος θεωρείται ότι δρα στις κινάσες της προσυναπτικής απόληξης, για να προκαλέσει τη συνεχή ενίσχυση της απελευθέρωσης του γλουταμινικού, στην οποία οφείλεται η διατήρηση της μακρόχρονης ενδυνάμωσης (Kandel et al., 2000).

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η διατήρηση του LTP μπορεί επίσης να επιτευχθεί από ένα σηματοδοτικό μονοπάτι που εξαρτάται από την ενδοκυττάρια αύξηση της συγκέντρωσης του cAMP, η οποία οδηγεί σε ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA) προ- και μετασυναπτικά και εν τέλει στην ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, όπως η CREB που επάγει την εκ νέου σύνθεση πρωτεϊνών. Η σημασία της cAMP/PKA σηματοδοτικής οδού φαίνεται να είναι μεγαλύτερη στην ύστερη φάση του LTP (L-LTP), η οποία διαρκεί για αρκετές ώρες *in vitro* και εβδομάδες *in vivo*, ενώ κατέχει και σπουδαία θέση στην εδραίωση της χωρικής μνήμης (Abel et al., 1997).

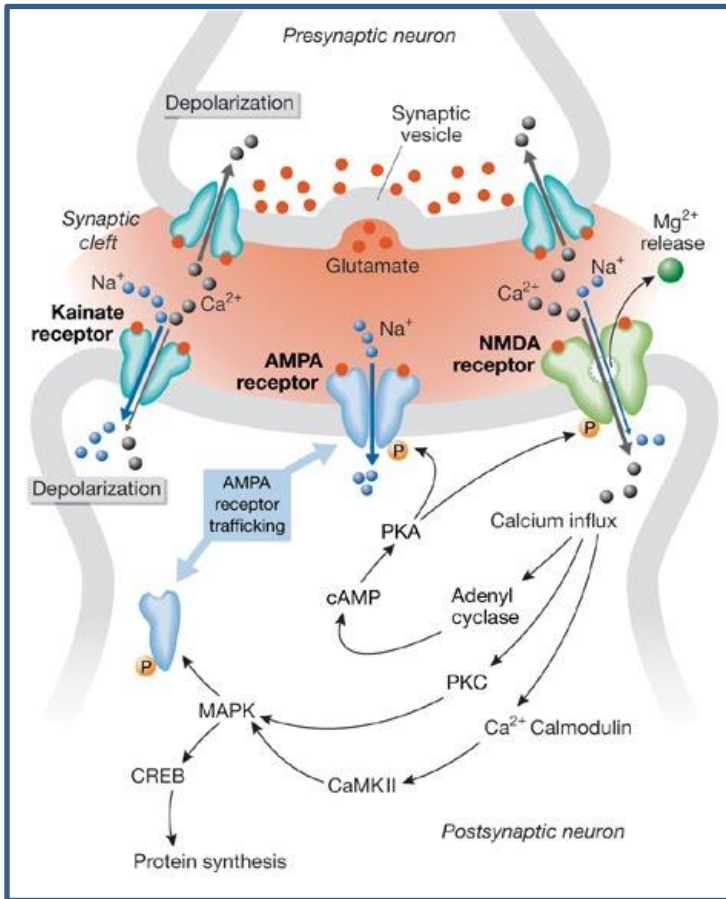


Figure 9] Βασικό σηματοδοτικό μονοπάτι επαγωγής LTP

Κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής συναπτικής διαβίβασης χαμηλής συχνότητας γλουταμινικό (Glu) απελευθερώνεται από τις προσυναπτικές απολήξεις και δρα τόσο στους μη NMDA (κισκαλικού/ καϊνικού - Q/K) υποδοχείς, οι οποίοι επιτρέπουν την εισροή Na⁺ και K⁺, όσο και στους NMDARs, οι οποίοι αποφράσσονται από Mg²⁺ και δεν επιτρέπουν την διέλευση ιόντων. Μετά την αρχική εκπόλωση, τα Mg²⁺ απομακρύνονται από τους NMDARs, επιτρέποντας την εισροή ιόντων Ca²⁺ και την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών που εξαρτώνται από την πρωτεϊνοκινάση PKC είτε το σύμπλοκο Ca²⁺/calmodulin, τα οποία καταλήγουν στην ενεργοποίηση της CREB και την ενσωμάτωση AMPARs στην μετασυναπτική μεμβράνη. Η φωσφορυλίωση των AMPARs από ένα cAMP/ PKA εξαρτώμενο μονοπάτι, τους ενεργοποιεί και έτσι συμβάλλει στην αύξηση της μετασυναπτικής αποκριτικότητας ως προς το Glu. Επιπλέον, η CREB προάγει την μεταγραφή πολλών διαφορετικών πρωτεϊνών, μεταξύ των οποίων και κάποιου παλίνδρομου αγγελιαφόρου, ο οποίος θεωρείται ότι δρα στις κινάσες της προσυναπτικής απόληξης. Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται μια «θηλιά» θετικής ανατροφοδότησης που προσδίδει στην ενδυνάμωση της συναπτικής ισχύος τον παρατεταμένο της χαρακτήρα.

- **Ντοπαμίνη και συναπτική πλαστικότητα στον PFC**

Πέρα από τα νευρικά κυκλώματα της περιοχής του *ιπποκάμπου*, η ικανότητα επαγωγής μακρόχρονης συναπτικής ενδυνάμωσης και αποδυνάμωσης έχουν αναφερθεί και σε διάφορες άλλες περιοχές του εγκεφάλου. Μια από τις πρώτες αναφορές έκφρασης LTP εκτός του ιπποκάμπου αφορούσε σε προβολές νευρώνων του ιπποκάμπου στον προμεταιχμιακό φλοιό (prelimbic cortex) in vivo (Doyere et al., 1993). Έκτοτε LTP και LTD βρέθηκε ότι μπορούν επίσης να δημιουργηθούν στα δίκτυα νευρώνων εντός του προμετωπιαίου φλοιού, καθώς και στις προσαγωγούς οδούς που προβάλλουν στον PFC από τον ιππόκαμπο, την αμυγδαλή, τον θάλαμο και τους αισθητικούς φλοιούς (Goto et al., 2010).

Η επαγωγή LTP στον προμετωπιαίο φλοιό, όπως και στον ιππόκαμπο, απαιτεί ενεργοποίηση των NMDA υποδοχέων (Jay et al., 1996), ενώ πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν και το ότι η ενεργοποίηση της πρωτεϊνοκινάσης A (PKA) στις συνάψεις αυτές καταλήγει σε ενεργοποίηση της CREB (Laroche et al., 2000). Επίσης, είναι πλέον κοινώς αποδεκτό, ότι στα πλαίσια ορισμένων εγκεφαλικών περιοχών, όπως ο

PFC, ο υποκάμπος και το νεοραβδωτό σώμα, η ισχύς της συναπτικής διαβίβασης υφίσταται τροποποιήσεις μέσω της δράσης *ενδογενών τροποποιητών* (neuromodulators), όπως οι μοναμίνες ντοπαμίνη (DA), νοραδρεναλίνη (NA), σεροτονίνη (5-HT) και ακετυλοχολίνη (ACh) (Goto et al., 2010).

Η καλύτερα μελετημένη ρυθμιστική οδός τροποποίησης, σε *in vivo* και σε *in vitro* κατάσταση, είναι αυτή που μεσολαβείται από την ντοπαμίνη. Οι μελέτες που πραγματοποιήθηκαν *in vivo* αποκάλυψαν ότι η εν λόγω οδός εμπλέκει *D1/NMDA* συνεργιστικές δράσεις που έχουν σαν αποτέλεσμα την επαγωγή του LTP, αλλά και τη διέγερση των *D2* υποδοχέων διάμεσων νευρώνων του PFC, η οποία μειορρυθμίζει την έκφραση LTP στην *μεταιχμιακή – PFC* οδό. Όταν διεγερθεί ο *D1* υποδοχέας, ο οποίος είναι συζευγμένος με την ετεροτριμερή G_s πρωτεΐνη, ενεργοποιείται η αδενυλική κυκλάση (AC) και έτσι τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του cAMP αυξάνονται. Επακολουθεί ενεργοποίηση της PKA κινάσης, η οποία φωσφορυλιώνει ειδικά υποστρώματα του κυτταροπλάσματος, της μεμβράνης και του πυρήνα, μεταξύ των οποίων η CREB, οι NMDARs, οι AMPARs και η πρωτεΐνη *DARPP-32*. Η φωσφορυλίωση της NR1 υπομονάδας των NMDA υποδοχέων αποτελεί προϋπόθεση για τη λειτουργικότητα αυτών και άρα την ενεργοποίηση των Ca^{2+} -εξαρτώμενων μηχανισμών (Snyder et al., 1998). Στην περίπτωση των AMPARs, η φωσφορυλίωση επιτρέπει την τοποθέτησή τους στην μεμβρανική επιφάνεια και ενισχύει κατ' επέκταση τις διεγερτικές γλουταματεργικές συναπτικές αποκρίσεις (Sun et al., 2005), ενώ η *DARPP-32* μετατρέπεται σε ισχυρό αναστολέα της φωσφατάσης PP-1 και έτσι προωθείται η φωσφορυλίωση της CaMKII που αποτελεί ένα από τα «ένζυμα – κλειδιά» για την επαγωγή LTP. Από την άλλη πλευρά, η αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων Ca^{2+} , εκτός από την CaMKII ενεργοποιεί και την φωσφατάση PP2B ή καλσινευρίνη, η οποία αποφωσφορυλιώνει την *DARPP-32* με αποτέλεσμα την παύση της αναστολής της PP-1 και την αναστολή της CaMKII αλλά και της CREB (Blitzer et al., 1998). Η ρύθμιση της PP-1 από την *DARPP-32*, επομένως, αποτελεί ένα μοριακό διακόπτη ιδιαίτερης σημασίας για τη ρύθμιση της μεταγωγής σήματος μέσω της ντοπαμίνης, ελέγχοντας έτσι τη δυναμική ισορροπία μεταξύ της δραστηριότητας κινάσων και φωσφατασών που καθορίζει τη συναπτική ισχύ (Jay, 2003).

Η διέγερση των *D2* υποδοχέων αντίθετα, έχει βρεθεί ότι εξασθενεί την έκφραση LTP (χωρίς να οδηγεί σε LTD) στη νευρική οδό υποκάμπου – προμετωπιαίου φλοιού, πιθανότατα μέσω αναστολής του AC/cAMP/PKA σηματοδοτικού μονοπατιού. Η επίδραση αυτή θεωρείται ότι έχει ως βάση την προώθηση της δράσης ανασταλτικών διάμεσων νευρώνων - σε ζώα που έχουν φτάσει στη φάση της ενηλικίωσης, όχι όμως κατά την προεφηβεία (Tseng & O' Donnell, 2007). Ο μηχανισμός που επάγει LTD στην *in vivo* κατάσταση παραμένει ακόμη άγνωστος.

Τα πειραματικά δεδομένα των *in vitro* ερευνών σε εγκεφαλικές τομές, από την άλλη πλευρά, φανερώνουν ότι οι μηχανισμοί μεταβολής της συναπτικής ισχύος εμφανίζουν μια αξιοσημείωτη

διαφορά στα πλαίσια των τοπικών νευρικών δικτύων του PFC. Συγκεκριμένα, η επαγωγή LTP σε αυτή την περίπτωση απαιτεί ταυτόχρονη διέγερση των υποδοχέων D1 και D2 (Matsuda et al., 2006), ενώ αν διεγερθεί μόνο ένας τύπος υποδοχέα (είτε D1 είτε D2), προκαλείται LTD (Otani et al., 1998). Η συνενεργοποίηση των D1 και D2 υποδοχέων ξεκινά έναν άλλο σηματοδοτικό καταρράκτη, στον οποίο συμμετέχει η φωσφολιπάση C (PLC), ο δεύτερος αγγελιαφόρος διακυλογλυκερόλη (DAG) που ενεργοποιεί την πρωτεϊνοκινάση C (PKC) και η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει τις κινάσες MAP, όπως η MEK1/2 και η ERK 1/2. Το μονοπάτι αυτό καταλήγει στην ενεργοποίηση της CREB και επάγει LTP ύστερα από υψηλής συχνότητας τετανικό ερεθισμό, υπό την προϋπόθεση ότι υπάρχει μια σταθερή εξωκυττάρια συγκέντρωση ντοπαμίνης, ανάλογη των επιπέδων που διατηρούνται τονικά in vivo, μέσω της αυθόρμητης πυροδότησης των ντοπαμινεργικών νευρώνων (Matsuda et al., 2006).

Η ευθύνη για την παρατηρούμενη αυτή διαφορά μεταξύ in vivo και in vitro μελετών αποδίδεται εν μέρει στη διέγερση διαφορετικών συναπτικών συνόλων. Οι μεταχιακοί νευρώνες, στον άθικτο εγκέφαλο, προβάλλουν κυρίως στις βαθύτερες στιβάδες του PFC (layers V-VI), στις οποίες εντοπίζεται μεγαλύτερος αριθμός D1 υποδοχέων. Στα τοπικά δίκτυα του PFC, εντούτοις, οι στιβάδες που δέχονται τετανικό ερεθισμό είναι κυρίως οι επιφανειακές (layers I-II), οι οποίες αποτελούνται από διασυνδεδεσες φλοιο-φλοιικές ίνες. Με τον τρόπο αυτό, διατηρείται πιθανώς μια ισορροπία σε ότι αφορά την επεξεργασία πληροφοριών, μεταξύ των τοπικών δικτύων του προμετωπιαίου φλοιού και των οδών που συνδέουν τον PFC με δομές του μεταχιακού συστήματος. Η ισορροπία αυτή μετατοπίζεται προς μια από τις δύο αυτές κατευθύνσεις, ανάλογα με το DA-εξαρτώμενο μονοπάτι που ενεργοποιείται (Goto et al., 2010).

Πειραματικά δεδομένα αναδεικνύουν τον σημαίνοντα ρόλο της τροποποίησης της συναπτικής ισχύος μέσω ντοπαμίνης σε διάφορες πτυχές της λειτουργίας του προμετωπιαίου φλοιού. Για παράδειγμα, η διέγερση των D1 υποδοχέων σε φυσιολογικά επίπεδα είναι κρίσιμη για την ανεμπόδιση απόδοση των ζώων στη δοκιμασία της χωρικής εναλλαγής με καθυστέρηση (Seamans et al., 1998). Τόσο η ανεπαρκής DA ή η υποδιέγερση των D1 υποδοχέων - μέσω νευροτοξικής βλάβης της περιοχής VTA ή της χρήσης φαρμακολογικών ανταγωνιστών του D1- όσο και η υπερδιέγερση των D1 υποδοχέων προκαλούν σημαντικές επιπτώσεις στη μνήμη εργασίας (Goldman – Rakić, 1995). Τα ντοπαμινεργικά συστήματα έχει βρεθεί ότι συμμετέχουν επίσης στην επεξεργασία πληροφοριών και σε τύπους μάθησης που σχετίζονται με την ανταμοιβή, στη χωρική μνήμη καθώς και στην μακροπρόθεσμη μνήμη του φόβου (Jay, 2003).

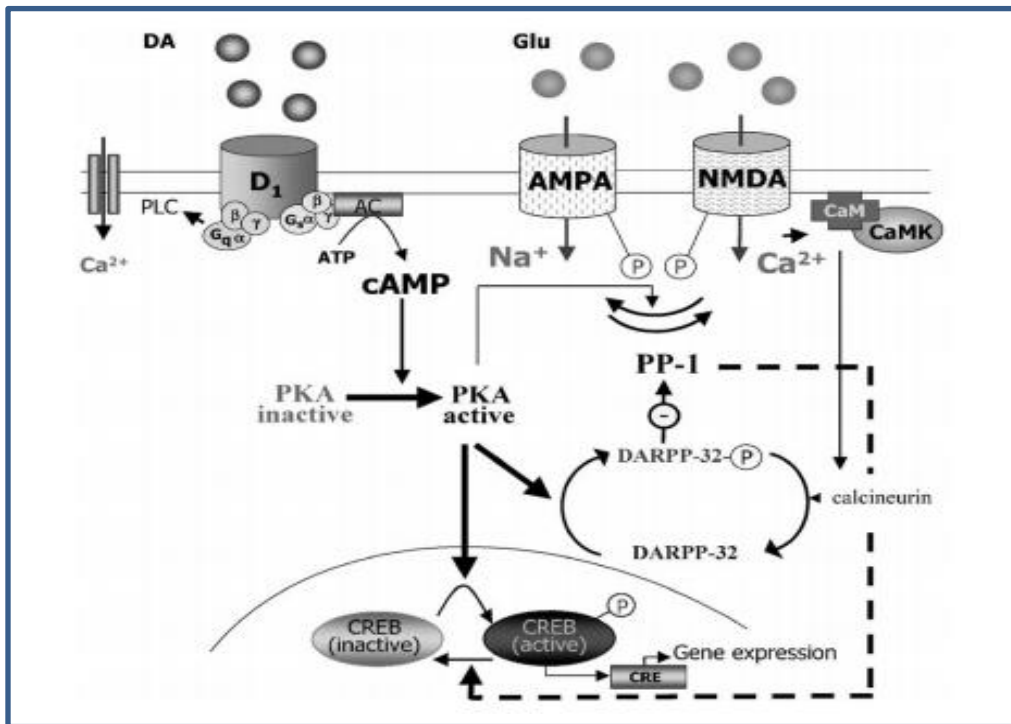


Figure 10] Σχηματική αναπαράσταση της σημαντικής συνεισφοράς του D1/cAMP/PKA/PP1 σηματοδοτικού μονοπατιού στην DA-εξαρτώμενη ρύθμιση έκφρασης LTP. Ο έλεγχος της πρωτεϊνικής φωσφατάσης PP1 από την DARPP-32, έναν κεντρικό ρυθιστή της DA-εξαρτώμενης ρύθμισης και της δραστηριότητας των NMDA υποδοχέων, θεωρείται καθοριστικής σημασίας για την ρύθμιση της έκφρασης μακρόχρονης ενδυνάμωσης μέσω ντοπαμίνης. Για λεπτομέρειες επί του μηχανισμού βλέπε κείμενο (σελ. 26-27)

Μεταγεννητική ανάπτυξη προμετωπιαίου φλοιού

Όλες οι περιοχές του φλοιού διέρχονται από διάφορα στάδια ανάπτυξης. Η ανάπτυξη του νευρικού συστήματος αποτελεί μια σειρά πολύπλοκων δυναμικών και προσαρμοστικών διαδικασιών, όπως είναι για παράδειγμα οι μεταβολές στη λευκή ουσία και η εγκαθίδρυση νευρικών συνδέσεων στον εγκέφαλο, οι οποίες προκαθορίζονται από γενετικούς, καθοηγούνται από επιγενετικούς και επηρεάζονται από περιβαλλοντικούς παράγοντες (Bossong & Niesink, 2010). Οι αναπτυξιακές διεργασίες αρχίζουν με το σχηματισμό των προγονικών κυττάρων του νευρικού συστήματος - 3 εβδομάδες περίπου μετά τη σύλληψη στους ανθρώπους -, συνεχίζουν να λαμβάνουν χώρα για ένα ιδιαίτερα μεγάλο χρονικό διάστημα μετά τη γέννηση και δεν ολοκληρώνονται παρά μόνο όταν το άτομο φτάσει την τέταρτη δεκαετία της ζωής του (Kolb et al., 2012). Εν ολίγοις, κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης τα πρώιμα νευρικά κύτταρα δημιουργούνται και μεταναστεύουν στην κατάλληλη περιοχή του φλοιού. Στη συνέχεια, μετά τη γέννηση, ωριμάζουν, σχηματίζουν συνάψεις δημιουργώντας νευρικά κυκλώματα και αναπτύσσουν νευρογλοία, η οποία θα παράγει μυελίνη και άλλα είδη υποστηρικτικών κυττάρων. Στην αρχική αναπτυξιακή φάση πραγματοποιείται υπερπαραγωγή νευρώνων και σχηματισμός τρισεκατομμυρίων νευρωνικών συνδέσεων. Στη συνέχεια όμως τα δίκτυα αυτά 'λαξεύονται' ανάλογα με τη νευρική δραστηριότητα: Επαναλαμβανόμενες εμπειρίες και ερεθίσματα που οδηγούν σε νευρική πυροδότηση συγκεκριμένων δικτύων έχουν ως αποτέλεσμα την παγίωση των κυκλωμάτων αυτών, ενώ άλλα κυκλώματα που δεν χρησιμοποιούνται εξαλείφονται μέσω της διαδικασίας της «συναπτικής αποκλάδωσης» (synaptic pruning). Οι χρονικές περίοδοι, στις οποίες συμβαίνει αυτή η εκκαθάριση νευρώνων και συνδέσεων, διαφέρουν σε αξιοσημείωτο βαθμό μεταξύ των διαφορετικών φλοιικών περιοχών. Μια από τις περιοχές που ολοκληρώνουν τελευταίες τη διαδικασία ωρίμανσης είναι ο προμετωπιαίος φλοιός (Gao et al., 2012; Kolb et al., 2012).

Η ανάπτυξη του προμετωπιαίου φλοιού στον άνθρωπο ξεκινά από το νευρικό σωλήνα - μια εμβρυϊκή δομή από την οποία εν τέλει προκύπτει ο εγκέφαλος και ο νωτιαίος μυελός - και υφίσταται μια από τις εκτενέστερες περιόδους ανάπτυξης σε σχέση με τις υπόλοιπες εγκεφαλικές περιοχές (Gonzalez-Burgos et al., 2008). Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης διάφορες χαρακτηριστικές λειτουργίες του PFC, όπως ο σχεδιασμός, η ικανότητα συλλογισμού και η γλωσσική αντίληψη, μεταβάλλονται δραματικά σε συνάρτηση με την ηλικία και νέες λειτουργικές ικανότητες προστίθενται μέχρι και την εφηβεία. Οι διαδικασίες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη των λειτουργιών αυτών συνιστούν ζήτημα εντατικής διερεύνησης εδώ και πολλές δεκαετίες, τόσο στο φυσιολογικό όσο και στο συμπεριφορικό επίπεδο (Casey et al., 2000). Όπως φαίνεται, οι δραστικότερες δομικές αλλαγές στον υγιή εγκέφαλο λαμβάνουν

χώρα κατά την περιγεννητική περίοδο και συνεχίζονται στη νεαρή παιδική ηλικία, όπου σημαντικότερο ρόλο παίζουν οι εμπειρίες και τα εξωτερικά ερεθίσματα. Ωστόσο, η πιο καλά μελετημένη και ιδιαίτερα κρίσιμη περίοδος νευρικής αναδιοργάνωσης του προμετωπιαίου φλοιού είναι η εφηβική ηλικία (Sisk & Foster, 2004). Τα κυριότερα ευρήματα των ερευνών αυτών συνοψίζονται αμέσως παρακάτω.

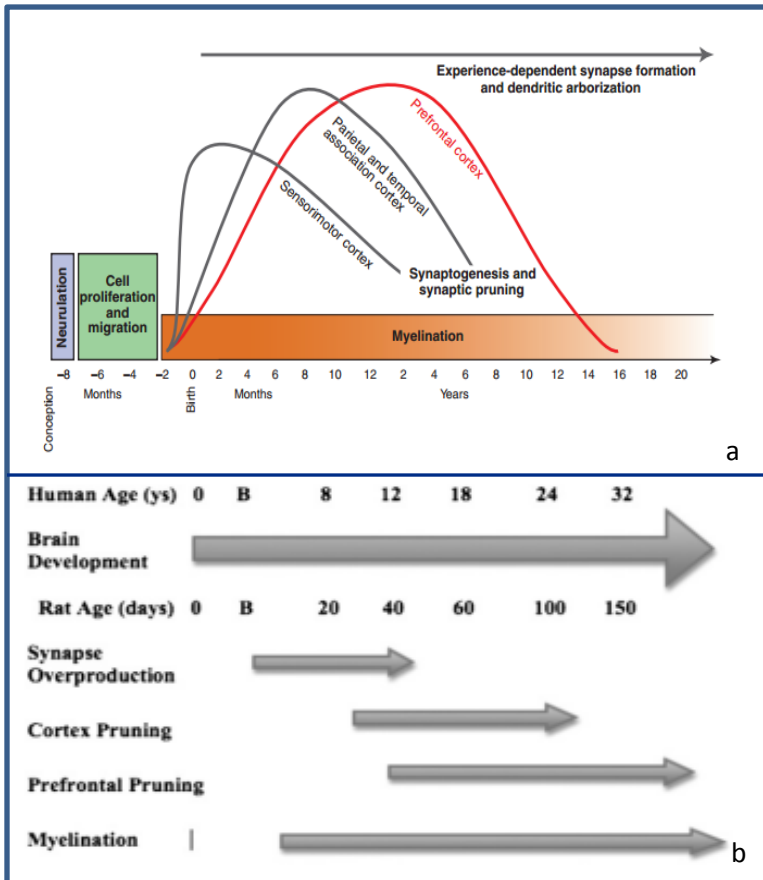


Figure 11] a. Χρονική πορεία της ανάπτυξης του εγκεφάλου στον άνθρωπο. Η ανάπτυξη του νευρικού συστήματος πραγματοποιείται μέσω της αλληλεπίδρασης διαφόρων διεργασιών. Πολλές από αυτές, όπως η δημιουργία και μετανάστευση των πρώιμων νευρικών κυττάρων και ο σχηματισμός του νευρικού σωλήνα (νευριδίωση), πραγματοποιούνται κατά την κύηση. Άλλες συνεχίζονται και μετά τη γέννηση, ορισμένες εκ των οποίων συνεχίζονται ως και την ενηλικίωση. Οι μεταγεννητικές αναπτυξιακές διαδικασίες συμπεριλαμβάνουν τοπικές μεταβολές στη συναπτική πυκνότητα και την παρατεταμένη διαδικασία της μυελίνωσης. Ο προμετωπιαίος φλοιός είναι η περιοχή του φλοιού που καθυστερεί περισσότερο από κάθε άλλη να ολοκληρώσει τις διαδικασίες ωρίμανσής του. b. Χρονοδιάγραμμα της ανάπτυξης του εγκεφάλου σε ανθρώπους και τρωκτικά. B: birth.

■ Νεαρή παιδική ηλικία

Βάσει των επιστημονικών παρατηρήσεων, η περίοδος μεταξύ της βρεφικής και της προσχολικής ηλικίας θεωρείται ότι αποτελεί το κρίσιμο διάστημα, στο οποίο *θεμελιώνονται τα βασικά νευρικά κυκλώματα* του PFC, τα οποία θα υποστηρίξουν αργότερα την εκτέλεση ανώτερων γνωστικών λειτουργιών, αφ' ότου τροποποιηθούν κατά τη διάρκεια της εφηβείας. Όπως αποκάλυψαν μεταθανάτιες ανατομικές μελέτες και in vivo προσεγγίσεις απεικόνισης, η νεαρή παιδική ηλικία χαρακτηρίζεται από σημαντικές *μεταβολές της νευρωνικής και συναπτικής πυκνότητας* (Tsujiimoto, 2008). Συγκεκριμένα, οι νευρώνες της στιβάδας III του PFC ελλαττώνονται σε αριθμό από 55% στο 10% πάνω από το μέσο αριθμό των ενηλίκων στις

ηλικίες μεταξύ 2 ως 7 ετών (Huttenlocher, 1979). Η συναπτική πυκνότητα φθάνει στο μέγιστο επίπεδο στην ηλικία των 3.5 ετών με την τιμή της να ανέρχεται στο 50% περίπου πάνω από το μέσο όρο των ενηλίκων. Από αυτή την ηλικία όμως και ως την εφηβεία ο αριθμός των συνάψεων ελαττώνεται σταδιακά (Huttenlocher & Dabholkar, 1997). Αναπτυξιακές μεταβολές έχουν επίσης παρατηρηθεί και στην κυτταρική μορφολογία του PFC, συμπεριλαμβανομένης της εξάπλωσης των δενδριτών των πυραμιδικών νευρώνων και τη σημαντική αύξηση του όγκου της λευκής και της φαιάς ουσίας (Tsujimoto, 2008). Η επέκταση της φαιάς ουσίας στη νεαρή παιδική ηλικία ίσως αποτελεί μια από τις ορατές εκδηλώσεις του σχηματισμού νέων νευρωνικών δικτύων στον προμετωπιαίο φλοιό. Από την άλλη, η επέκταση της λευκής ουσίας, η οποία συνίσταται κυρίως από εμμέλους νευράξονες, παρέχει ενδεχομένως τη δομική βάση που απαιτείται για τις σύνθετες γνωστικές λειτουργίες που εναπόκεινται σε εκτεταμένα δίκτυα. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι η μυελίνωση αυξάνει την ταχύτητα μετάδοσης νευρικών σημάτων, διευκολύνοντας έτσι τη συγχρονισμένη πυροδότηση κυττάρων που ανήκουν στο ίδιο δίκτυο αλλά χωρίζονται από μεγάλη απόσταση (Salami et al, 2003). Σε ότι αφορά τη νευρική δραστηριότητα του PFC, έρευνες σε φυσιολογικά αναπτυσσόμενα παιδιά έδειξαν ότι όσο μεγαλώνουν σε ηλικία, οι συγκεκριμένοι νευρώνες που επιστρατεύονται στα πλαίσια μιας δοκιμής αυξάνουν το ρυθμό πυροδότησής τους, ενώ άλλα δίκτυα που δεν είναι υπεύθυνα για την εκτελούμενη δραστηριότητα πυροδοτούν λιγότερο. Παρατηρείται δηλαδή μια στροφή από τη διάχυτη στην εστιασμένη νευρική ενεργοποίηση· ένας πιο εκλεπτυσμένος συντονισμός δραστηριότητας μεταξύ των νευρικών κυκλωμάτων, ώστε όταν παρουσιάζεται κάποια λειτουργική ανάγκη να εξυπηρετείται με εξειδικευμένο τρόπο (Tsujimoto, 2008).

Μια άλλη πτυχή της αναπτυξιακής διαδικασίας του προμετωπιαίου φλοιού, η οποία έχει ως υπόβαθρο τις νευροανατομικές αλλαγές που συντελούνται κατά την παιδική ηλικία, είναι η δραστική βελτίωση πολλών σύνθετων λειτουργιών του, όπως για παράδειγμα η μνήμη εργασίας και ο ανασταλτικός έλεγχος. Σύμφωνα με τον Miyake και τους συνεργάτες του (2000) αυτές οι λειτουργίες του PFC συνιστούν διακριτές λειτουργικές ενότητες και εναπόκεινται σε ανεξάρτητα μεταξύ τους νευρικά υποστρώματα. Η ίδια αρχή της λειτουργικής τμηματοποίησης θεωρείται ότι ισχύει γενικά για όλα τα συστήματα του εγκεφάλου που είναι υπεύθυνα για ανώτερες πνευματικές λειτουργίες (Baddeley, 1998). Ειδικά για τον προμετωπιαίο φλοιό, η περίοδος που λαμβάνει χώρα αυτή η διαδικασία ξεκινά ήδη από την νεαρή παιδική ηλικία και προοδεύει βαθμιαία μέχρι και την εφηβεία ή τη νεαρή ενήλικη ζωή. Στον ανώριμο προμετωπιαίο φλοιό διακριτές γνωστικές λειτουργίες υφίστανται επεξεργασία από κοινού σε ένα διάχυτο νευρικό κύκλωμα. Κατά την ωρίμανση, ωστόσο, ο PFC αρχίζει και οργανώνεται λειτουργικά σε ανεξάρτητα μεταξύ τους δίκτυα, που εξειδικεύονται στην εκτέλεση μιας συγκεκριμένης λειτουργίας.

Βέβαια, δεν είναι απαραίτητο τα κυκλώματα αυτά να διαχωρίζονται μεταξύ τους τοπολογικά, αλλά οι νευρώνες τους μπορεί να διαπλέκονται στην ίδια εγκεφαλική περιοχή (Tsujimoto, 2008). Συμπερασματικά, η πολυπλοκότερη μορφολογία και η πιο εστιασμένη νευρική δραστηριότητα που αναπτύσσουν τα κύτταρα του PFC κατά τη νεαρή παιδική ηλικία επιτρέπουν τη διαμόρφωση κατάλληλων νευρικών δικτύων, ικανών να υποστηρίξουν εξειδικευμένη λειτουργική τμηματοποίηση. Αυτή με τη σειρά της θέτει τις βάσεις για την βελτιωμένη εκτέλεση των σύνθετων γνωστικών λειτουργιών που ελέγχονται από τον προμετωπιαίο φλοιό.

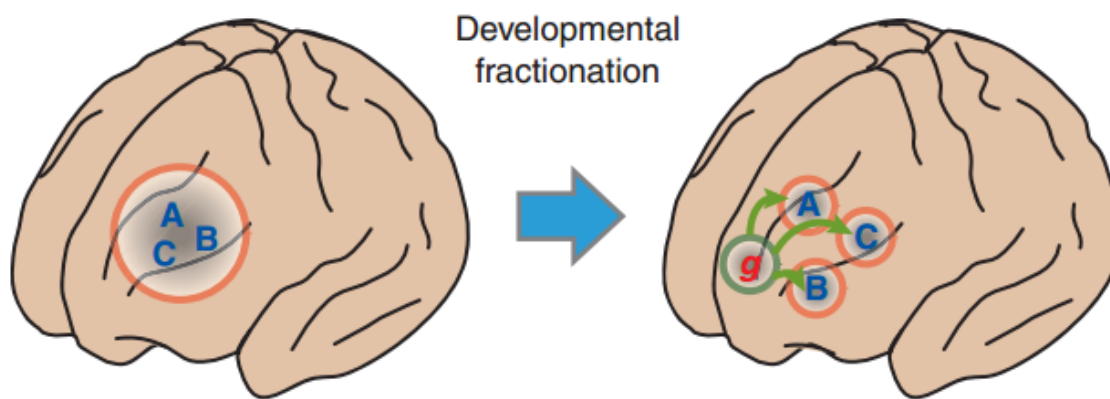


Figure 12] Υποθετικό διάγραμμα της λειτουργικής ανάπτυξης του προμετωπιαίου φλοιού. Στον ανώριμο εγκέφαλο (αριστερά) διακριτές γνωστικές λειτουργίες (A,B, C) υφίστανται επεξεργασία σε κοινά νευρικά κυκλώματα, ενώ στον ώριμο εγκέφαλο (δεξιά) έχουν διαμορφωθεί χωριστά νευρικά υποστρώματα, καθένα από τα οποία εξειδικεύεται σε συγκεκριμένη λειτουργία και αυτά τα τμηματοποιημένα συστήματα συντονίζονται από τη γενική ευφυΐα (g). Παρατηρείται δηλαδή μια μεταστροφή από τη διάχυτη λειτουργία σε πιο «εστιασμένη» κατανομή της ευθύνης για τις διάφορες πνευματικές λειτουργίες, μέσω της διαδικασίας της λειτουργικής τμηματοποίησης. Σημειώνεται ότι τα ανεξάρτητα νευρικά κυκλώματα δεν διαχωρίζονται αναγκαστικά τοπογραφικά, αλλά μπορεί να αλληλεμπλέκονται στην ίδια περιοχή.

Σε ότι αφορά τα συστήματα νευροδιαβίβασης, μια από τις πιο σημαντικές αναπτυξιακές μεταβολές μετά τη γέννηση που αξίζει να αναφερθεί είναι η μεταστροφή του $GABA_A$ υποδοχέα, από εκπολωτικής δράσης σε υπερπολωτικής δράσης. Ο υποδοχέας αυτός είναι μια πρωτεΐνη 5 υπομονάδων, που σχηματίζει δίαυλο, διαπερατό από ανιόντα χλωρίου (Cl^-) και μεσολαβεί στις ταχείες $GABA_A$ εργικές αποκρίσεις. Η φορά κατά την οποία θα κινηθούν τα ιόντα χλωρίου, όταν ο ιοντικός δίαυλος μεταπίπτει σε ανοιχτή κατάσταση καθορίζεται από το ηλεκτροχημικό δυναμικό του. Το ρεύμα ιόντων που διέρχεται μέσα από τον $GABA_A$ έχει αντίθετη διεύθυνση (E_{GABA}) σε πρώιμο μεταγεννητικό αναπτυξιακό στάδιο από αυτή που παρατηρείται στην ώριμη φάση (Le Magueresse & Monyer, 2013). Αυτό συμβαίνει γαι τον εξής λόγο: στους ανώριμους νευρώνες η ενδοκυττάρια συγκέντρωση ιόντων χλωρίου είναι μεγαλύτερη από ότι σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια, διότι ο συµμεταφορέας χλωρίου KCC2 που εξάγει Cl^- από το

κυτταρόπλασμα εκφράζεται σε αμελητέα επίπεδα και έτσι δεν μπορεί να αντισταθμίσει τη δράση NKCC1 – συμμεταφορέα χλωρίου που εισάγει Cl⁻ στο κύτταρο. Συνεπώς το E_{GABA} είναι μεγαλύτερο από το δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης και ο GABA_A εμφανίζει εκπολωτική (διεγερτική) δράση. Στο τέλος της πρώτης εβδομάδας μετά τη γέννηση (PD7), ωστόσο, ο KCC2 αρχίζει να εκφράζεται και η ενδοκυττάρια συγκέντρωση χλωρίου μειώνεται. Ως επακόλουθο, ο GABA_A υποδοχέας αποκτά υπερπολωτική (ανασταλτική) δράση, την οποία και διατηρεί σε όλα τα μετέπειτα στάδια (Rivera et al., 1999; Ben – Ari et al., 2012).

Η εκπολωτική δράση του GABA_A φαίνεται να έχει σημαντικό και πολυδιάστατο ρόλο στα αρχικά στάδια ωρίμανσης του φλοιού. Κατ' αρχάς ο GABA, όσο είναι εκπολωτικός, προωθεί τη *μετανάστευση γλουταμιναργικών και GABAεργικών διαμέσων νευρώνων* στις σωστές θέσεις επί της έκτασης του φλοιού. Παράλληλα, η έναρξη της έκφρασης του KCC2, που ευθύνεται για τη μεταστροφή του GABA, λειτουργεί ως σήμα τερματισμού της μεταναστευτικής διαδικασίας, καθορίζοντας έτσι την τελική θέση των διαμέσων νευρώνων (Bortone & Polleux, 2009). Κατά δεύτερον, ο διεγερτικός GABA συντονίζει το *σηματισμό γλουταμιναργικών συνάψεων* στους νευρώνες που δραστηριοποιούνται εντονότερα, συνεισφέροντας με αυτόν τον τρόπο στην εξισορρόπηση μεταξύ ανασταλτικής και διεγερτικής δραστηριότητας στον αναπτυσσόμενο φλοιό (Wang & Kriegstein, 2011; Le Magueresse & Monyer, 2013). Επιπλέον, οι διεγερτικοί GABAεργικοί νευρώνες φαίνεται να συμμετέχουν και στη *διασύνδεση (wiring) ανώριμων φλοιικών κυκλωμάτων* μεταξύ τους, επάγοντας τη δημιουργία γιγαντιαίων εκπολωτικών δυναμικών (giant depolarizing potentials – GDPs) σε ορισμένες περιοχές του φλοιού (Allene et al., 2008). Τα GDPs του ιπποκάμπου έχει δειχθεί ότι ενισχύουν τις ανώριμες γλουταμιναργικές συνάψεις και θεωρούνται ζωτικής σημασίας για την ομαλή μετάβαση σε επόμενα αναπτυξιακά στάδια (Mohajerani et al., 2007).

Από την άλλη, όταν ολοκληρωθεί η συμβολή της GABAεργικής διέγερσης στην αναπτυξιακή διαδικασία του φλοιού, η μεταστροφή του GABA, επιτρέπει στους GABAεργικούς νευρώνες να επιτελέσουν τις εξίσου σημαντικές λειτουργίες τους ως ανασταλτικοί διάμεσοι νευρώνες. Μεταξύ των λειτουργιών αυτών συγκαταλέγονται η διαμόρφωση των *νευρικών υποδεκτικών πεδίων*, η *ρύθμιση βασικών ιδιοτήτων των νευρώνων*, όπως ο ρυθμός αύξησης της συχνότητας πυροδότησης ως απόκριση σε αυξανόμενη διέγερση (gain) και η *δημιουργία ρυθμικών και συντονισμένων ταλαντώσεων* του μεμβρανικού δυναμικού νευρωνικών πληθυσμών - ειδικά αυτών που ανήκουν στο φάσμα συχνότητας β (14 - 30 Hz) και γ (30 - 80 Hz), οι οποίες αποτελούν το ανάλογο ενός βηματοδότη για τα νευρικά δίκτυα (Carvalho & Buonomano, 2009; Atallah & Scanziani, 2009; Isaacson & Scanziani, 2011).

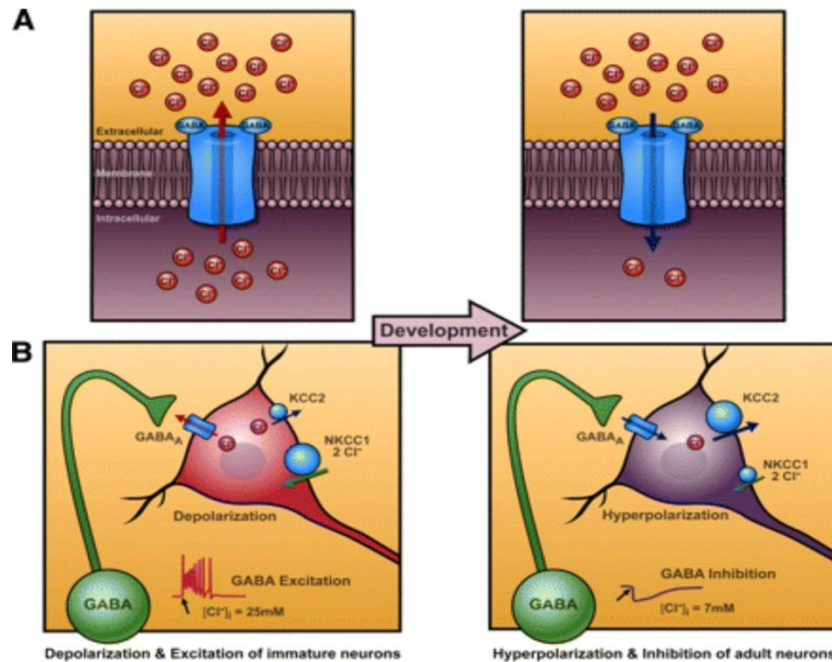


Figure 13] Η μεταστροφή του GABA_A υποδοχέα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης: Κατά την αναπτυξιακή διαδικασία ο GABA_A υποδοχέας αρχικά εμφανίζει εκπολωτική (διεγερτική) δράση, ενώ αργότερα αναλαμβάνει τον τυπικό υπερπολωτικό (ανασταλτικό) του ρόλο. Αυτό οφείλεται στο εξής: Σε πρώιμο στάδιο τα επίπεδα έκφρασης του συμμεταφορέα KCC2 που εξάγει Cl⁻ από το κύτταρο είναι αμελητέα, ενώ ο NKCC1, ο οποίος εισάγει Cl⁻, εκφράζεται κανονικά. Έτσι η συγκέντρωση Cl⁻ στους νεαρούς νευρώνες είναι πολύ υψηλότερη απ' ότι σε ύστερα στάδια και όταν ο διάυλος του GABA_A υποδοχέα ανοίξει, τα ιόντα χλωρίου διαρρέουν έξω από το κύτταρο, εκπολώνοντας την κυτταρική μεμβράνη (excitatory postsynaptic potential - EPSP). Μια εβδομάδα μετά τη γέννηση ωστόσο, στα τρωκτικά, ο KCC2 συμμεταφορέας αρχίζει να παράγεται σε υψηλότερες και ο NKCC1 σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις και έτσι ο ρυθμός εκροής Cl⁻ είναι σημαντικά μεγαλύτερος από τον ρυθμό εισροής. Στους ώριμους νευρώνες δηλαδή, διαμορφώνεται τέτοια βαθμίδωση ανιόντων χλωρίου εκατέρωθεν της μεμβράνης, ώστε όταν ανοίξει ο διάυλος GABA_A τα Cl⁻ κινούνται με φορά προς το εσωτερικό του κυττάρου, γεγονός που προκαλεί υπερπόλωση του κυττάρου (inhibitory postsynaptic potential – IPSP).

▪ Εφηβική ηλικία

Η εφηβεία είναι μια χρονική περίοδος μείζονων φυσικών, πνευματικών και συναισθηματικών αλλαγών, οι οποίες σηματοδοτούν τη μετάβαση από την παιδική ηλικία στην ενηλικίωση. Ο εφηβικός εγκέφαλος έχει χαρακτηριστεί ως ένα «φυσικό σπирτόκουτο» (Dahl, 2004), καθ' ότι ενώ η ενισχυμένη δραστηριότητα υποφλοιικών δομών, όπως η αμυγδαλή και ο επικλινής πυρήνας, και οι ορμόνες των γονάδων που αρχίζουν να παράγονται, διεγείρουν τις εσωτερικές τάσεις και τις βιολογικές παρορμήσεις, τα συστήματα καθοδήγησης της συμπεριφοράς και μετριασμού των παρωθήσεων δεν είναι ακόμη πλήρως λειτουργικά. Για το λόγο αυτό στο διάστημα που μεσολαβεί μέχρι την ολοκλήρωση της ωρίμανσης του προμετωπιαίου φλοιού, παρατηρούνται τυπικές εφηβικές συμπεριφορές, όπως τα

υψηλά επίπεδα ανάληψης ρίσκων, ο αυξημένος παρορμητισμός, η έντονη διερευνητική συμπεριφορά και η υψηλή ανάγκη για κοινωνική αλληλεπίδραση (Selemon, 2013). Πρόκειται επίσης για μια ευάλωτη περίοδο, καθώς συμπίπτει με το διάστημα εμφάνισης διαφόρων σημαντικών ψυχολογικών διαταραχών, όπως είναι η σχιζοφρένεια, η κατάθλιψη, οι διατροφικές και συναισθηματικές διαταραχές (Sturman & Moghaddam, 2011).

- **Νευροανατομικές αλλαγές**

Ο έφηβος εγκέφαλος υφίσταται σημαντικές αλλαγές σε ότι αφορά τη νευροανατομία και τη νευροδιαβίβαση, οι οποίες παρέχουν τη βιολογική βάση για την ωρίμανση των ανώτερων γνωστικών ικανοτήτων και της συμπεριφοράς. Το πλέον χαρακτηριστικό αναπτυξιακό γεγονός κατά την εφηβεία αποτελεί η μείωση της συναπτικής πυκνότητας (*συναπτική εκκαθάριση – synaptic pruning*), η οποία όμως - αντίθετα από ότι συμβαίνει στα αρχικά αναπτυξιακά στάδια - δε συνοδεύεται από μείωση του αριθμού των νευρικών κυττάρων. Ποσοτικές αναλύσεις των συνάψεων στον ανθρώπινο φλοιό φανέρωσαν ότι η πυκνότητα των συνάψεων φτάνει στη μέγιστη τιμή της στη νεαρή παιδική ηλικία, παραμένει σταθερή για ένα διάστημα σε συγκεκριμένες εγκεφαλικές περιοχές, αλλά μετέπειτα υφίσταται μείωση, στην αρχή με αργό ρυθμό και ύστερα – κατά την εφηβεία – ραγδαία (Huttenlocher & Dabholkar, 1997). Την αξιοπιστία αυτής της παρατήρησης ενισχύει και το παρόμοιο μοτίβο μεταβολής συγκεντρώσεων, συναρτήσει της ηλικίας, των πρωτεϊνών συναπτοφυσίνη και PSD-95 (post-synaptic density protein – 95), οι οποίες αποτελούν συναπτικούς μοριακούς δείκτες (Glantz et al., 2007). Ειδικά για τον προμετωπιαίο φλοιό των τρωκτικών, πρόσφατα δεδομένα έδειξαν ότι η συναπτική πυκνότητα ανέρχεται στη μέγιστη τιμή της περίπου στην PD31 και από τότε ελαττώνεται ως και την PD57-PD60 (Gourley et al., 2012).

Αυτή η εκκαθάριση των συνάψεων γενικά πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνη για την παρατηρούμενη μείωση του όγκου της φαιάς ουσίας των εφήβων. Μελέτες απεικόνισης διά μαγνητικού συντονισμού (MRI) στον άνθρωπο εξακριβώνουν μια μεταβολή του όγκου της φαιάς ουσίας σχήματος ανεστραμμένου U, με μια αύξηση κατά την προεφηβική περίοδο ακολουθούμενη από μια μείωση που ολοκληρώνεται στο τέλος της εφηβείας (Giedd et al., 1999). Αντίθετα, ο όγκος της λευκής ουσίας αυξάνεται γραμμικά καθ'όλη τη διάρκεια της εφηβείας ως και την ηλικία των 22 ετών και δεν παρουσιάζει μείωση μέχρι το άτομο να φτάσει την ηλικία των 40 ετών περίπου (Ge et al., 2002). Οι συγκεκριμένες μεταβολές, αφορούν το φλοιό στο σύνολό του, αλλά στις συνειρμικές περιοχές ανώτερων γνωσιακών λειτουργιών, όπως ο PFC, πραγματοποιούνται αργότερα από όλες τις υπόλοιπες.

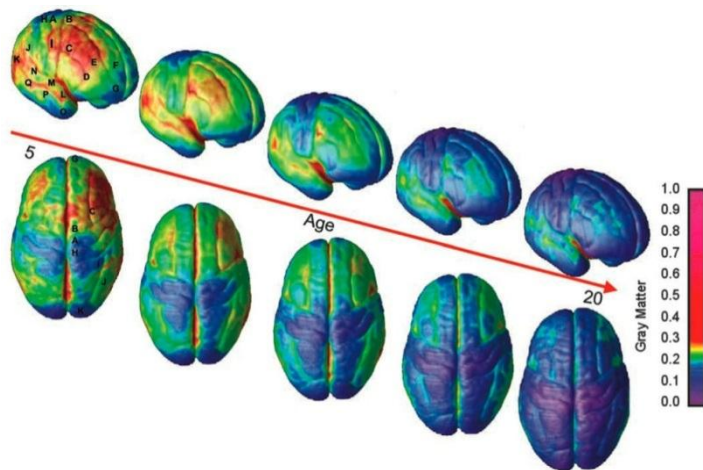


Figure 14] Απεικόνιση της σταδιακής μείωσης του όγκου της φαιάς ουσίας συναρτήσει της ηλικίας, η οποία θεωρείται ότι είναι κυρίως το αποτέλεσμα της εκλεκτικής συναπτικής εκκαθάρισης (synaptic pruning) που πραγματοποιείται με εξαρτώμενο από τη δραστηριότητα τρόπο.

Η πιο πιθανή εξήγηση για τη λειτουργική σημαντικότητα της συναπτικής μείωσης κατά την εφηβεία είναι η σχετική εξισορρόπηση μεταξύ διεγερτικών και ανασταλτικών εισόδων, τόσο σε επίπεδο κυττάρου όσο και σε επίπεδο νευρικού δικτύου (Selemon, 2013). Το βασικό επιχείρημα που υποστηρίζει την άποψη αυτή είναι η εξειδίκευση της συναπτικής εκκαθάρισης: κατά προτίμηση εκφυλίζονται διεγερτικές και διατηρούνται ανασταλτικές συνάψεις, με αποτέλεσμα να αυξάνεται ελαφρώς η αναλογία των ανασταλτικών προς τις διεγερτικές συνάψεις (Bourgeois & Rakic, 1993). Επιπλέον, οι αγωνιστές των D2 υποδοχέων της ντοπαμίνης αρχίζουν να έχουν ισχυρή διεγερτική επίδραση στους ανασταλτικούς διάμεσους νευρώνες μόνο από την εφηβεία και μετά. Συνολικά δηλαδή, κατά την ωρίμανση του εγκεφάλου ενισχύεται ο ρόλος της αναστολής στη ρύθμιση της δραστηριότητας των πυραμιδικών νευρώνων. Αυτό το γεγονός είναι θεμελιώδους σημασίας για την αρμονική λειτουργία των νευρώνων του φλοιού, ενώ αποκλίσεις από αυτή την σχετική ισορροπία και το σωστό χρονικό συντονισμό μεταξύ ανασταλτικής και διεγερτικής δραστηριότητας έχουν συσχετιστεί με πολλές ψυχολογικές διαταραχές (O'Donnell, 2011).

- Μεταβολές στη νευροδιαβίβαση

Η δραστηριότητα των πυραμιδικών νευρώνων του προμετωπιαίου φλοιού τροποποιείται από πολυάριθμα συστήματα νευροδιαβίβασης, συμπεριλαμβανομένων των GABAεργικών διάμεσων νευρώνων καθώς και των ντοπαμινεργικών, γλουταμινεργικών, σεροτονινεργικών, νοραδρενεργικών και χολινεργικών προσαγωγών νευρώνων. Οι αναπτυξιακές αλλαγές που χαρακτηρίζουν τα συστήματα αυτά κατά την εφηβεία οδηγούν σε ποικίλες μεταβολές των συμπεριφορικών και συναισθηματικών

αποκρίσεων, ενώ είναι ίσως υπεύθυνες και για ορισμένες ιδιαιτερότητες της εγκεφαλικής λειτουργίας των εφήβων, όπως για παράδειγμα η αυξημένη ευαισθησία σε ψυχοτρόπους ουσίες (Steketee, 2003). Οι πλέον αξιοσημείωτες είναι οι μεταβολές στα ντοπαμινεργικά, τα GABAεργικά και τα γλουταμινεργικά συστήματα.

Η ντοπαμίνη (DA) είναι μια κατεχολαμινεργική ορμόνη/νευροδιαβιβαστής που κατέχει εξέχουσα θέση στη ρύθμιση των διαδικασιών της μάθησης, του κινητικού ελέγχου, της ανταμοιβής, των κινήτρων και άλλων εγκεφαλικών λειτουργιών. Οι βασικές συγκεντρώσεις του νευροδιαβιβαστή και η πυκνότητα των προσαγωγών ντοπαμινεργικών νευρώνων στην περιοχή του PFC κορυφώνονται νωρίς κατά την εφηβεία και ελαττώνονται στη συνέχεια. Από την άλλη πλευρά, ο ρυθμός σύνθεσης και ανακύκλωσης της ντοπαμίνης στις υποφλοιικές περιοχές, όπου προεκβάλλει ο PFC, κυμαίνονται σε χαμηλότερα επίπεδα στην αρχή της εφηβείας σε σύγκριση με αυτά των ενηλίκων. Η μεταβολή της ισορροπίας της ντοπαμίνης μεταξύ των εν λόγω περιοχών συνοδεύεται και πιθανώς προκύπτει από την εκτεταμένη εκκαθάριση των αξόνων που προβάλλουν στο νεοφλοιό (Bossong & Niesink, 2010). Το ίδιο μοτίβο αυξομείωσης στην αρχή και στο τέλος της εφηβείας εμφανίζουν και τα επίπεδα του υποδοχέα D1 της ντοπαμίνης, ο οποίος αποτελεί έναν από τους κυριότερους παράγοντες τροποποίησης της συναπτικής πλαστικότητας στον προμετωπιαίο φλοιό. Όταν διεγερθεί ο D1, ενεργοποιείται ένα cAMP/PKA - εξαρτώμενο σηματοδοτικό μονοπάτι που καταληγεί στην έκφραση μεταγραφικών παραγόντων και μεταφραστικών ρυθμιστών, απαραίτητων για μακροπρόθεσμες μεταβολές της συναπτικής πλαστικότητας. Ο D1 εμπλέκεται τόσο στη διατήρηση (όχι όμως επαγωγή) του LTP, όσο και στη διατήρηση του LTD, η οποία ωστόσο προϋποθέτει και την παράλληλη ενεργοποίηση του υποδοχέα D2 (Huang et al., 2004).

Δεδομένα από μεγάλο αριθμό ερευνών συγκλίνουν στο ότι η ρυθμιστική επίδραση της ντοπαμίνης στη συναπτική πλαστικότητα χάνεται, και στην περίπτωση ανεπαρκούς ντοπαμίνης ή υποδιέγερσης του D1 υποδοχέα, και στην περίπτωση υπερβολικής ποσότητας DA ή υπερδιέγερσης του D1. Με άλλα λόγια, ο PFC απαιτεί μια μέση συγκέντρωση DA και D1 υποδοχέων για την άρτια εκτέλεση των γνωσιακών λειτουργιών του, όπως η μνήμη εργασίας (Goldman – Rakić, 1995). Λαμβάνοντας υπ' όψιν την παρατήρηση αυτή, η εντονότερη παρουσία του ντοπαμινεργικού συστήματος νευροδιαβίβασης και η υψηλότερη έκφραση του D1 υποδοχέα στον PFC κατά την εφηβική περίοδο, φέρουν ενδεχομένως μερίδιο ευθύνης για την καθυστερημένη ωρίμανση της μνήμης εργασίας, η οποία δεν ολοκληρώνεται παρά μόνο στο τέλος της εφηβείας (Jay, 2003).

Επιπρόσθετα, τα νευρικά μονοπάτια που μεσολαβούν και τροποποιούν τις επιδράσεις στρεσογόνων ερεθισμάτων στις λειτουργίες του PFC εμπλέκουν και οδούς μονοαμινεργικής σηματοδότησης - ιδίως ντοπαμινεργικής. Η ενισχυμένη ευαισθησία στο άγχος που χαρακτηρίζει την εφηβική ηλικία λοιπόν,

μπορεί να οφείλεται εν μέρει στην πυκνότερη ντοπαμινεργική εννεύρωση του προμετωπιαίου φλοιού, συγκριτικά με τα επίπεδα του ώριμου εγκεφάλου (Selemon, 2013).

Κατά την εφηβική περίοδο, σημαντικές επίσης αναπτυξιακές μεταβολές συμβαίνουν στα πλαίσια των GABAεργικών διάμεσων νευρώνων, οι οποίοι συνιστούν το μείζων ανασταλτικό σύστημα νευροδιαβίβασης του εγκεφάλου και διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στην ωρίμανση των φλοιικών δικτύων. Οι μεταβολές αυτές αφορούν σε ποικίλες πτυχές του συστήματος, όπως η ωρίμανση των μοτίβων πυροδότησης των GABAεργικών νευρώνων, η έκλυση, η αποδόμηση και η επαναπρόσληψη του GABA (Le Magueresse & Monyer, 2013). Μάλιστα, οι διαφορετικοί τύποι διάμεσων νευρώνων υφίστανται διαφορετικές αλλαγές και ακολουθούν διακριτές πορείες ωρίμανσης. Η πιο αξιοσημείωτη φαίνεται να είναι η τροποποίηση των ιδιοτήτων πυροδότησης και εγγενούς διεγερσιμότητας των PV^+ -διάμεσων νευρώνων (FS κύτταρα), η οποία επάγεται από έναν πολύπλοκο συνδυασμό πρωτεϊνικών παραγόντων, μεταξύ των οποίων ο BDNF (brain-derived neurotrophic factor). Χαρακτηριστικά της ωρίμανσης των FS κυττάρων είναι η μείωση της αντίστασης της κυτταρικής μεμβράνης και η υπερπόλωση του μεμβρανικού δυναμικού ηρεμίας που αυξάνουν την εγγενή διεγερσιμότητα του κυττάρου. Έτσι τα ώριμα FS κύτταρα είναι σε θέση να πυροδοτούν με μεγαλύτερο ρυθμό και ακρίβεια από τα ανώριμα. (Nakazawa et al., 2011). Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με πολλές άλλες διαδικασίες ωρίμανσης του GABAεργικού συστήματος, όπως οι ταχύτερες κινητικές ιδιότητες του $GABA_A$ υποδοχέα λόγω αύξησης της έκφρασης των α_1 υπομονάδων, πιστεύεται ότι επιτρέπει τον καλύτερο συγχρονισμό της νευρικής δραστηριότητας και την επέκταση του φάσματος συχνοτήτων των ταλαντώσεων του μεμβρανικού δυναμικού προς τις υψηλές συχνότητες γ (Doischer et al., 2008; Le Magueresse & Monyer, 2013). Πράγματι, στα τρωκτικά, χαμηλής συχνότητας γ -φάσματος ταλαντώσεις (30 – 40 Hz) αρχίζουν να ανιχνεύονται ήδη μεταξύ των PD (postnatal day) 6 και PD10, αλλά τόσο ο συγχρονισμός όσο και η συχνότητα των ταλαντώσεων αυξάνονται μέχρι και την 4^η εβδομάδα μετά τη γέννηση, ώσπου φτάνουν τα επίπεδα των ενηλίκων (30 – 100/200 Hz) (Leinenkugel et al., 2002). Η μεταβολή αυτή φαίνεται να συμβάλλει ιδιαίτερα στην ωρίμανση εγκεφαλικών λειτουργιών που απαιτούν το συντονισμό της δράσης διασκορπισμένων φλοιικών δικτύων, όπως ο συντονισμός των κινήσεων, η εστίαση της προσοχής και η μνήμη εργασίας (Uhlhaas et al., 2008).

Στα πλαίσια του γλουταμινεργικού συστήματος νευροδιαβίβασης, η αναπτυξιακή πορεία του PFC παρουσιάζει μια ιδιαιτερότητα. Σε πολλές περιοχές του φλοιού, όπως ο υπόκαμπος και ο πρωτοταγής οπτικός φλοιός, οι υποδοχείς NMDA του γλουταμινικού (NMDARs) σε πρώιμο αναπτυξιακό στάδιο αποτελούνται στην πλειοψηφία τους από NR1/NR2B υπομονάδες, αλλά στη συνέχεια αρχίζει να εκφράζεται η υπομονάδα NR2A και ακολουθεί μια μεταστροφή προς NR1/NR2A υποδοχείς. Η

υπομονάδα NR2A εμφανίζει μικρότερη συγγένεια από την NR2B για την πρωτεϊνική κινάση CaMK II (calcium/calmodulin-dependent protein kinase II), η οποία είναι σημαντική για την επαγωγή LTP. Αυτό σημαίνει, ότι η υψηλότερη αναλογία NR2A/ NR2B στους ώριμους νευρώνες των περιοχών αυτών οδηγεί σε αύξηση του ουδού για την επαγωγή του LTP, δημιουργώντας παράλληλα ευνοϊκότερες συνθήκες για την επαγωγή LTD. Η μετάβαση στην LTD-επιδεκτική κατάσταση αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα της φλοιικής ωρίμανσης κατά την εφηβεία (Wang & Gao, 2009; Le Magueresse & Monyer, 2013). Οι FS διάμεσοι νευρώνες του PFC, ωστόσο, φαίνεται να μην υφίστανται την εν λόγω αντικατάσταση υπομονάδων, αφού διατηρούν *υψηλά επίπεδα της NR2B* και κατά τη διάρκεια της εφηβείας. Μελέτες υποστηρίζουν, ότι η ιδιαιτερότητα αυτή επιτρέπει στα νευρικά δίκτυα του PFC τη δημιουργία της *παραμένουσας δραστηριότητας*, λόγω του ότι οι βραδύτερες κινητικές ιδιότητες της υπομονάδας καθιστούν εφικτή την επαρκώς ισχυρή επαναλαμβανόμενη αλληλοδιέγερση μεταξύ των νευρώνων. Με άλλα λόγια, η διατήρηση της NR2B στους PV⁺-διάμεσους νευρώνες του PFC αποτελεί σημαντική ιδιότητα για τη σωστή λειτουργία της μνήμης εργασίας. Από την άλλη πλευρά, το ίδιο γνώρισμα καθιστά ενδεχομένως τους νευρώνες αυτούς πιο ευάλωτους απέναντι στην έκκριση μεγάλων ποσοτήτων γλουταμινικού (Wang et al., 2008). Αυτό, γιατί οι NR2B υπομονάδες απενεργοποιούνται 3 με 4 φορές βραδύτερα από τους NR2A, επιτρέποντας σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις Ca²⁺ να εισρεύσουν στο κύτταρο (Ewald et al., 2008). Η είσοδος όμως υπερβολικών ποσοτήτων Ca²⁺ στο κυτταρόπλασμα μπορεί να αποδειχθεί επιβλαβής και να καταλήξει σε απόπτωση ή νέκρωση του νευρώνα (*διεγερσιοτοξικότητα – excitotoxicity*) (Hardingham & Bading, 2003; Bossong & Niesink, 2010). Μάλιστα, σε ασθενείς με σχιζοφρένεια παρατηρούνται επιλεκτικές βλάβες στον υποπληθυσμό των FS διάμεσων νευρώνων του προμετωπιαίου φλοιού. Εν ολίγοις, το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό χαρακτηριστικό της ωρίμανσης των κυττάρων αυτών αποτελεί ίσως έναν από τους λόγους, εξ' αιτίας των οποίων η εφηβεία είναι η κρισιμότερη περίοδος για την εμφάνιση της σχιζοφρένειας (Lewis et al., 2005).

Τέλος, μια ακόμα αναπτυξιακή μεταβολή που συσχετίζεται με το γλουταμινεργικό σύστημα νευροδιαβίβασης είναι η *ενσωμάτωση AMPA υποδοχέων (AMPA receptors)* στη μετασυναπτική μεμβράνη με εξαρτώμενο από τη νευρική δραστηριότητα τρόπο (activity-dependent). Στην αρχή της κρίσιμης περιόδου οι πρώιμες συνάψεις βρίσκονται σε ανενεργό μορφή, η οποία χαρακτηρίζεται από απουσία AMPARs και παρουσία NMDARs που δεν αποκρίνονται στο γλουταμινικό οξύ, εξ' αιτίας φραγής του διαμεμβρανικού τους πόρου από ιόντα Mg²⁺. Για να εκποτιστούν τα κατιόντα μαγνησίου και να απελευθερωθεί ο πόρος απαιτείται επαρκής εκπόλωση της μεμβράνης (Isaac, 2003). Ο ακριβής μηχανισμός που προκαλεί αυτή την αρχική εκπόλωση δεν έχει ακόμη εξακριβωθεί, αλλά πιστεύεται ότι πρόκειται για έναν συνδυασμό της GABAεργικής νευροδιαβίβασης που ωριμάζει αυτή την περίοδο,

καθώς και της εμφάνισης υποδοχέων AMPA στη μετασυναπτική μεμβράνη. Με αυτόν τον τρόπο σιωπηλές συνάψεις μετατρέπονται σταδιακά σε λειτουργικές (Bossong & Niesink, 2010).

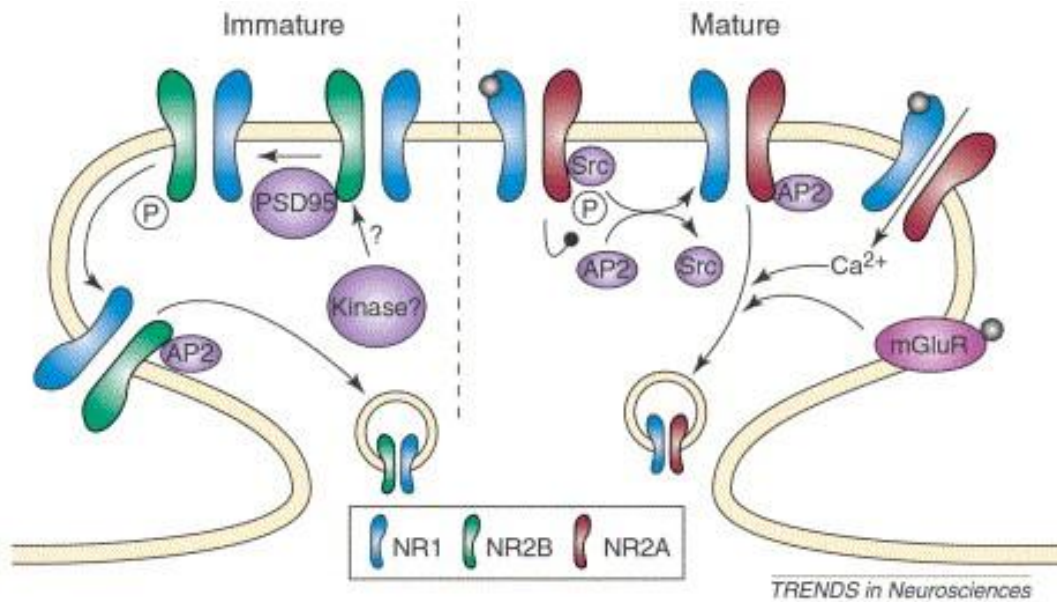


Figure 15] Μεταβολή της αναλογίας των NR1-NR2A αποτελούμενων NMDA υποδοχέων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Οι NMDA υποδοχείς που αποτελούνται από τις NR1-NR2B υπομονάδες κυριαρχούν στις ανώριμες συνάψεις. Ωστόσο, η αντιπροσώπευσή τους μειώνεται καθώς αυξάνεται η ηλικία και οι ώριμες πλέον συνάψεις περιέχουν ως επί τω πλείστον NR1-NR2A υποδοχείς. Αυτό είναι ένα φαινόμενο που παρατηρείται σε όλη την έκταση του φλοιού, με εξαίρεση τον προμετωπιαίο φλοιό, όπου τα επίπεδα των NR1-NR2B υποδοχέων παραμένουν υψηλά. Το γεγονός αυτό, λόγω των βραδύτερων κινητικών ιδιοτήτων της NR2B υπομονάδας, θεωρείται σημαντικό για την εμφάνιση της «παραμένουσας δραστηριότητας» από τους νευρώνες του PFC, η οποία αποτελεί το νευρικό υπόστρωμα της μνήμης εργασίας.

Συνοψίζοντας, η εφηβεία είναι η περίοδος κατά την οποία ο εγκέφαλος ολοκληρώνει τη διαδικασία ωρίμανσής του και χαρακτηρίζεται από δραματικές αλλαγές, ειδικά στις μετωπιαίες περιοχές του φλοιού που ελέγχουν τις συνθετότερες γνωσιακές λειτουργίες. Από την παιδική ηλικία στην εφηβεία, η αναπτυξιακή διαδικασία παρουσιάζει μια μεταστροφή από την αύξηση του όγκου του εγκεφάλου και τη δημιουργία μεγάλου αριθμού νευρώνων, στην διαμόρφωση πιο αποτελεσματικών νευρικών μονοπατιών. Οι κυριότερες μεταβολές που οδηγούν σε αυτή την κατεύθυνση είναι το ραφινάρισμα του συστήματος αναστολής, η βελτίωση του συντονισμού μεταξύ νευρικών δικτύων και η αύξηση της συχνότητας των συγχρονισμένων ταλαντώσεων μεμβρανικού δυναμικού, η ωρίμανση των συστημάτων νευροδιαβίβασης και η συναπτική εκκαθάριση, δηλαδή είτε ο εκφυλισμός είτε η ενεργοποίηση συνάψεων, ανάλογα με τη σχετική τους δραστηριοποίηση. Το συνολικό αποτέλεσμα όλων αυτών των

μεταβολών, σε ότι αφορά τον προμετωπιαίο φλοιό, είναι η πιο στοχευμένη λειτουργία του και κατ' επέκταση η βελτίωση της απόδοσης των γνωσιακών ικανοτήτων που σχετίζονται με τον PFC, καθώς και ο αποτελεσματικότερος έλεγχος της συμπεριφοράς. Η μεγάλη έκταση των αλλαγών αυτών, ωστόσο, καθιστά τους εφήβους ευπαθείς σε αναπτυξιακές διαταραχές που μπορεί να προκληθούν από εξωγενείς παράγοντες, όπως το άγχος, το αλκοόλ ή οι ψυχοτρόποι ουσίες. Αυτή μάλιστα θεωρείται ότι είναι και η πιθανότερη αιτία, για τη οποία η εφηβική ηλικία συμπίπτει με την περίοδο εκδήλωσης πολλών ψυχιατρικών διαταραχών, όπως η σχιζοφρένεια.

Με τον όρο κρίσιμη περίοδος οι επιστήμονες περιγράφουν συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα, εντός των οποίων οι αναπτυξιακές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα καθοδηγούνται από αλληλεπιδρώντες γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες και οδηγούν στην εγκαθίδρυση λειτουργικών χαρακτηριστικών (Crews et al., 2007). Βάσει όλων των παραπάνω στοιχείων λοιπόν, η εφηβεία μπορεί δικαιολογημένα να χαρακτηριστεί ως μια *κρίσιμη περίοδος* για την ωρίμανση του εγκεφάλου.

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

❖ Tmaze (Delayed Alternation) – Συμπεριφορική δοκιμασία μνήμης εργασίας

▪ Εισαγωγικά στοιχεία- τύποι Tmaze πειραμάτων:

Από τις αρχές του 20^{ου} αιώνα τα τρωκτικά έχουν χρησιμοποιηθεί σε χιλιάδες μελέτες, στις οποίες εξετάζεται το πως αυτά συμπεριφέρονται σε διάφορους τύπους λαβυρίθων (mazes), όπως το T-maze, τα radial arm maze ή τα water mazes. Οι μελέτες αυτές χρησιμεύουν στη διερεύνηση της χωρικής μάθησης και διαφορετικών τύπων μνήμης των τρωκτικών και έχουν συνεισφέρει στην αποκάλυψη γενικών αρχών σχετικά με τη μάθηση για πολλά είδη, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Σήμερα, οι έρευνες που χρησιμοποιούν λαβυρίθους στοχεύουν στη διαπίστωση του κατά πόσο διαφορετικοί χειρισμοί ή διαφορετικές συνθήκες επηρεάζουν τη μνήμη και τη μάθηση στα τρωκτικά (Dudchenko, 2004).

Το Tmaze είναι μια κατασκευή σχήματος T, κλειστή ή με ανυψωμένα τείχη, στην οποία το πειραματόζωο τοποθετείται στον εναρκτήριο βραχίονα (start arm) και στη συνέχεια του επιτρέπεται να επιλέξει έναν από τους 2 βραχίονες της 'κεφαλής' του T (goal arms). Η κατασκευή που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα που περιγράφονται εδώ είχε τις εξής διαστάσεις: μήκος εναρκτήριου βραχίονα: 23 cm, μήκος βραχιόνων κεφαλής: 35 cm έκαστος, πλάτος βραχιόνων: 10 cm, μήκος σταθερού διαχωρισμού βραχιόνων: 17 cm.

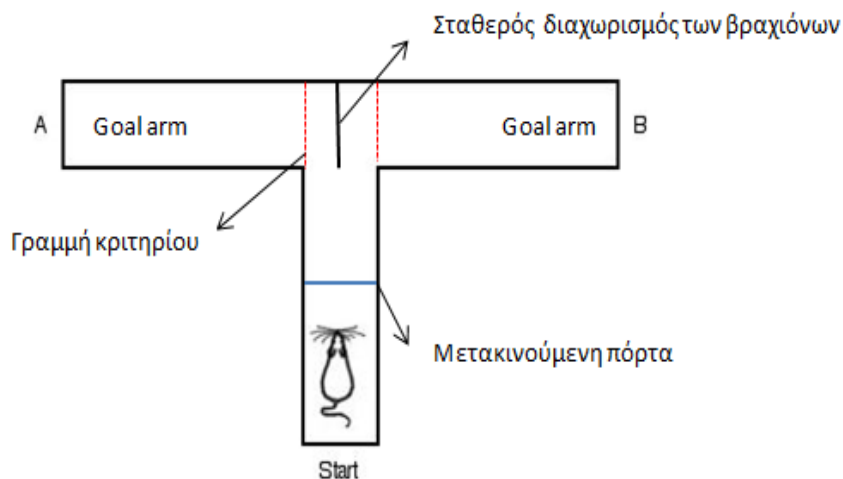


Figure 1. Πειραματική διάταξη λαβυρίθου σχήματος T (Tmaze)

Υπάρχουν διάφορες παραλλαγές πειραμάτων στο Tmaze, οι οποίες χρησιμοποιούνται για διαφορετικές πτυχές της διαδικασίας της μάθησης και της μνήμης. Για παράδειγμα, η δοκιμασία διαχωρισμού (discrimination task) χρησιμοποιείται ευρέως για την εκτίμηση της μνήμης αναφοράς (reference memory) στα τρωκτικά (Shoji et al., 2012). Σε αυτή την εκδοχή, σκοπός είναι το ποντίκι να μάθει ότι η ανταμοιβή (τροφή) συνδέεται πάντα με το ίδιο στοιχείο. Το στοιχείο αυτό μπορεί να είναι απλά το αριστερά ή δεξιά (left-right discrimination task), δηλαδή η τροφή τοποθετείται πάντα στον ίδιο (είτε αριστερό είτε δεξί) βραχίονα (και μάλιστα στον αντίθετο από αυτόν, για τον οποίο το ποντίκι εμφανίζει φυσική προτίμηση). Επίσης, το στοιχείο, το οποίο σηματοδοτεί ανταμοιβή, μπορεί να είναι κάποιο διακριτικό ερέθισμα (cue), δηλαδή ένα αντικείμενο ή κάποιο χαρακτηριστικό στο χώρο. Επί παραδείγματι, μια ομάδα ποντικών θα μπορούσε να εκπαιδευτεί να επιλέγει τον άσπρο βραχίονα του λαβυρίνθου, ανεξάρτητα από το αν βρίσκεται αριστερά ή δεξιά, και να αποφεύγει τον μαύρο, τον οποίο τα ποντίκια θα επέλεγαν ενστικτωδώς, καθώς προτιμούν τα σκοτεινότερα μέρη. Το ζώο εν ολίγοις πρέπει να μάθει να διαχωρίζει το στοιχείο ανταμοιβή από το στοιχείο - απουσία ανταμοιβής (το οποίο μάλιστα ενδείκνυται να αντιπροσωπεύει και τη φυσική του προτίμηση), επομένως καλείται να χρησιμοποιεί τη μνήμη αναφοράς του (Dudchenko, 2004; Deacon & Rawlins, 2006).

Μια άλλη εκδοχή του Tmaze task, είναι αυτή η οποία βασίζεται στην εναλλαγή του βραχίονα, όπου βρίσκεται η τροφή (alternation tasks) και η οποία χρησιμοποιείται για τη μελέτη της μνήμης εργασίας (Shoji et al., 2012). Εδώ δεν απαιτείται η μνημόνευση ενός σταθερού μοτίβου από το ποντίκι, αλλά η μνήμη της αμέσως προηγούμενης επιλογής του (βραχύχρονη μνήμη). Την πιο απλή μορφή αυτής της δοκιμής αποτελεί η δοκιμή αυθόρμητης εναλλαγής (spontaneous alternation task), η οποία στηρίζεται εξ' ολοκλήρου στην φυσική τάση των τρωκτικών να εναλλάσσουν το βραχίονα επιλογής τους. Η ενστικτώδης αυτή συμπεριφορά εναλλαγής αντικατοπτρίζει τη διάθεση του ζώου να εξερευνά το περιβάλλον του για την εύρεση νέων πηγών τροφής, νερού, συντρόφου ή θέσεων καταφυγίου (Dember & Richman, 1989). Σε τέτοιου είδους πειράματα παραλείπεται κάθε είδους ανταμοιβή (σε κανένα βραχίονα δεν τοποθετείται τροφή ή νερό) και απλά παρατηρείται κατά πόσο το ποντίκι επιλέγει εναλλάξ το που θα πάει. Αυτός ο τύπος πειράματος χρησιμοποιούνταν για δεκαετίες, αλλά θεωρείται ότι δίνει ασυνεπή και ποικίλα αποτελέσματα, ανάλογα με τις συνθήκες που διεξήχθησαν τα πειράματα κάθε φορά (μη συγκρίσιμα). Πιο αξιόπιστα αποτελέσματα δίνουν τα πειράματα εναλλαγής, στα οποία τοποθετείται ανταμοιβή στους βραχίονες εναλλάξ (forced choice alternation task). Εάν το ποντίκι αναγκάζεται (π.χ με τη βοήθεια μιας μετακινούμενης πόρτας) να παραμείνει για ένα μικρό χρονικό διάστημα στον αρχικό βραχίονα, και άρα να καθυστερήσει την επιλογή του, τότε αναφερόμαστε στη

δοκιμασία εναλλαγής με καθυστέρηση (delayed alternation task) (Deacon & Rawlins, 2006), η οποία αποτελεί την πειραματική διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε εν προκειμένω, για τη μελέτη της λειτουργίας της μνήμης εργασίας δυο διαφορετικών ηλικιακών ομάδων ποντικών.

■ Διαγονιδιακό μοντέλο μειωμένης αναστολής (Rac1 conditional knockout):

Οι μικρές σηματοδοτικές G πρωτεΐνες Rac συνιστούν μια υποομάδα της οικογένειας των Rho-GTPases και λαμβάνουν μέρος σε πλήθος κυτταρικών λειτουργιών, όπως ο κυτταρικός κύκλος, η ρύθμιση της ακτίνης και η κινητικότητα των κυστιδίων, η πολικότητα του κυττάρου και η αξονογένεση (Parri & Chiarugi, 2010). Τα μέλη της ομάδας αυτής είναι η πρωτεΐνη Rac2, η οποία εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στο αιμοποιητικό σύστημα, η Rac3 που βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στο νευρικό σύστημα, η RhoG και η Rac1 (Bustelo et al., 2007). Η πρωτεΐνη αυτή φαίνεται ότι συμμετέχει στην πυρηνική μετανάστευση φλοιικών προγονικών κυττάρων και η αδρανοποίησή της στην κοιλιακή ζώνη του τελεγκεφάλου καταλήγει σε βλάβες στην αξονογένεση και την ακτινική μετανάστευση φλοιικών νευρώνων, σε αυξημένο θάνατο των εκκολαπτόμενων νευρώνων, καθώς και σε διαταραχές στη μετανάστευση των φλοιικών ενδονευρώνων που προέρχονται από τη μέση γαγγλιακή προεξοχή (MGE) (Chen et al., 2009). Είναι πιθανό η Rac1 να είναι απαραίτητη για τη σωστή ανάπτυξη των GABAεργικών διάμεσων νευρώνων στο πρώιμο στάδιο, επηρεάζοντας την έξοδό τους από τον κυτταρικό κύκλο (Vidaki et al., 2012).

Αξιοποιώντας τα δεδομένα αυτά, έχει δημιουργηθεί μια διαγονιδιακή σειρά ζώων (Rac1^{fl/fl};R26^{FlStoPFIYFP}; Nkx2.1 Cre) που χρησιμοποιείται ως μοντέλο μειωμένης αναστολής στο φλοιό. Με χρήση της τεχνολογίας Cre-loxP έχει επιτευχθεί στα ζώα αυτά απαλοιφή της πρωτεΐνης Rac1, ειδικά από τους GABAεργικούς διάμεσους νευρώνες του φλοιού. Στα knock-out ζώα (με γονότυπο Rac1^{fl/fl}; Nkx2.1 Cre) η σημαντική μείωση των ανασταλτικών διάμεσων νευρώνων είναι πολύ πιθανό να προξενεί διατάραξη στη λεπτή ισορροπία μεταξύ διεγερτικών και ανασταλτικών δικτύων και κατ'επέκταση στη συνολική λειτουργία των νευρωνικών δικτύων (Fogarty et al., 2007). Συγκεκριμένα, η ανεπαρκής GABAεργική αναστολή θα μπορούσε να έχει ως κατάληξη τη γενικευμένη υπερδιέγερση των νευρωνικών δικτύων του φλοιού (επιληπτικού τύπου πυροδοτήσεις), κατά τις οποίες μεγάλος αριθμός διάμεσων και πυραμιδικών νευρώνων πυροδοτούν συγχρόνως, αντίθετα από το φυσιολογικό (Velazquez & Carlen, 1999; Bernard et al., 2000).

Στα συμπεριφορικά πειράματα μνήμης/μάθησης που διεξήχθησαν αποκλείστηκαν ποντίκια με γονότυπο Rac1^{fl/fl}; Nkx2.1 Cre.

- Πειραματική διαδικασία:

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν αρσενικά ποντίκια (*Mus musculus*) της σειράς C57BL/6 και της σειράς Nkx2.1-Cre-Directed Conditional Rac1-Deficient, αγρίου τύπου (Rac1^{+/+};Nkx2.1 Tg(Cre) ;R26R-YFP^{+/-}) (Vidaki et al., 2011), τα οποία χωρίστηκαν σε 2 ομάδες διαφορετικής ηλικίας: νεαρά έφηβα (early adolescents) (40-60 ημερών) και ενήλικα (adults) (>120 ημερών). Συνολικά, στα πειράματα έλαβαν μέρος 15 έφηβα και 10 ενήλικα ποντίκια. Η πειραματική διαδικασία που εφαρμόστηκε περιγράφεται παρακάτω:

- **Προ-πειραματική διαδικασία:**

Περίπου μια εβδομάδα πριν την έναρξη του κυρίως πειράματος πραγματοποιείται χειρισμός (handling) των ποντικών σε καθημερινή βάση, μέχρις ώτου αυτά να εξοικειωθούν με τον ερευνητή και να αποκτήσουν εξερευνητική διάθεση. Στη συνέχεια, υποβάλλονται σε στέρηση τροφής (standard pellet chow) με σκοπό τη μείωση του βάρους στο 85-90% του αρχικού, αλλά και σε εξοικείωση με την τροφή αμοιβής (τεμάχια σοκολατένιων δημητριακών), προς αποφυγή της υπονεοφαγίας. Δεδομένου ότι το Tmaze είναι ένα πείραμα μνήμης/μάθησης έπρεπε να διασφαλιστεί η μέγιστη δυνατή μείωση του άγχους των ποντικών, ώστε αυτά να μπορέσουν να αποδώσουν το μέγιστο δυνατό των μαθησιακών τους ικανοτήτων. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η εφαρμογή της διαδικασίας εξοικείωσης (habituation) με το νέο περιβάλλον (Tmaze), συνολικής διάρκειας 2 ημερών. Την πρώτη μέρα, όλα τα ποντίκια ενός κλουβιού εισέρχονται στο λαβύρινθο, όπου βρίσκεται διασκορπισμένη η τροφή ανταμοιβής, για 10 λεπτά επί 3 φορές. Μεταξύ των sessions παρεμβάλλεται δεκάλεπτο διάλειμμα και καθαρισμός του λαβυρίνθου με αραιωμένη αιθανόλη. Την δεύτερη ημέρα ακολουθεί η ίδια διαδικασία, αλλά για κάθε ποντίκι ξεχωριστά.

- **Κύρια πειραματική διαδικασία (testing):**

Πριν ξεκινήσει η διαδικασία, πρέπει να έχει καθοριστεί ένα κριτήριο για το πότε θεωρούμε ότι το ζώο έχει κάνει ολοκληρωμένη επιλογή βραχίονα. Σύμφωνα με το κριτήριο που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα, το ζώο πρέπει να έχει περάσει τη γραμμή κριτηρίου που φαίνεται στο αρχικό σχήμα, με όλο του το σώμα, συμπεριλαμβανομένης και της ουράς του. Αυτό το κριτήριο συμβάλλει στην αποφυγή λαθών, καθώς τα ποντίκια ορισμένες φορές είναι διστακτικά και αλλάζουν την κατεύθυνση της κίνησής τους.

Κάθε μέρα, καθ' ένα από τα ποντίκια που συμμετέχουν στο πείραμα, υποβάλλεται σε 3 sessions των 10 trials (+ 1, to trial 0). Ως trial θεωρούμε μια διαδρομή που κάνει το ποντίκι από τον αρχικό βραχίονα

μέχρι την άκρη του βραχίονα-στόχου της επιλογής του. Στο trial 0 τοποθετούμε τροφή και στους 2 βραχίονες και αφήνουμε το ποντίκι να επιλέξει ελεύθερα που θα πάει και να καταναλώσει την τροφή. Στα υπόλοιπα trials, τροφή πρέπει να βρίσκεται πάντα στον αντίθετο βραχίονα από αυτόν που επέλεξε προηγουμένως το ποντίκι. Έτσι όταν το ζώο εισέρχεται στο βραχίονα που περιέχει τροφή, η επιλογή του σημειώνεται ως σωστή, ενώ αν μπει σε αυτόν που δεν περιέχει τροφή (που συμβαίνει όταν το ποντίκι επιλέγει επαναλαμβανόμενα τον ίδιο βραχίονα), σημειώνεται ως λάθος. Αν το ποντίκι δεν κάνει επιλογή μέσα σε 30'' σημειώνουμε 'omission error'. Το πρώτο session τελειώνει αφότου όλα τα ποντίκια στο κλουβί περάσουν δέκα trials. Πριν την είσοδο του επόμενου ζώου στο λαβύρινθο καθαρίζουμε με αιθανόλη (70%), για απολύμανση και την απομάκρυνση οποιονδήποτε οσφρητικών υπολειμμάτων, τα οποία ενδεχομένως να επηρεάσουν τις επιλογές του ποντικού. Στη συνέχεια ακολουθεί το 2ο και μετά το 3ο session. Μεταξύ των sessions μεσολαβεί διάλειμμα 15 λεπτών, στο οποίο και πάλι καθαρίζουμε το Tmaze με αιθανόλη.

- **Εισαγωγή καθυστερήσεων:**

Όταν ένα ποντίκι συμπληρώσει κριτήριο (δηλαδή τουλάχιστον στα 2 από τα 3 sessions της ίδιας μέρας, ή στο session 3 της μιας ημέρας και στο session 1 της επόμενης να επιτευχθούν 70% και άνω σωστές επιλογές) εισάγουμε μια καθυστέρηση διάρκειας 5''. Αυτή επιτυγχάνεται με τη βοήθεια μιας μετακινούμενης πόρτας που εμποδίζει το ποντίκι να μετακινηθεί από την αρχή του start arm. Κάθε φορά που ένα ποντίκι συμπληρώνει κριτήριο με δεδομένη καθυστέρηση, προχωράμε σε καθυστέρηση μεγαλύτερης διάρκειας (10'', 15'', 20'' και 25''). Το πείραμα ολοκληρώνεται όταν όλα τα ποντίκια συμπληρώσουν κριτήριο με delay 25'' και αυτό απαιτεί κατά κανόνα 7-8 μέρες.

❖ Ηλεκτροφυσιολογική μελέτη

▪ Δυναμικά τοπικού πεδίου (Local Field Potentials – LFPs):

Τα δυναμικά τοπικού πεδίου είναι μια ειδική κατηγορία ηλεκτρικών σημάτων που συνίστανται από χαμηλής συχνότητας εξωκυττάρειες διακυμάνσεις δυναμικού (Liu J. & Newsome W.T., 2006) και καταγράφονται με την τοποθέτηση μικροηλεκτροδίου εντός του εγκεφάλου ή κατ'ευθείαν στην επιφάνειά του. Τα σήματα αυτού του είδους χρησιμοποιούνται σε πλήθος ηλεκτροφυσιολογικών μελετών, για τη διερεύνηση μηχανισμών της φλοιικής επεξεργασίας και του σχεδιασμού της κίνησης, καθώς και για τη μελέτη ανώτερων πνευματικών λειτουργιών όπως η μνήμη, η λήψη αποφάσεων και η εστίαση της προσοχής (Katzner et al 2009). Τα LFPs συσχετίζονται με το ηλεκτροεγκεφαλογράφημα (EEG), το οποίο επίσης περιλαμβάνει εξωκυττάρειες καταγραφές, οι οποίες όμως πραγματοποιούνται με τη χρήση μακροηλεκτροδίων τοποθετημένων στην επιφάνεια του κρανίου. Παρά το γεγονός, ότι οι νευροφυσιολόγοι χρησιμοποιούν τις καταγραφές πεδίου με ολοένα αυξανόμενη συχνότητα τα τελευταία χρόνια, η γνώση για τη φύση των LFPs είναι ακόμη συγκεχυμένη σε πολλά σημεία – κυρίως σε ότι αφορά τη χωρική διακριτική ικανότητα της μεθόδου και την ακριβή προέλευση των δυναμικών πεδίου (Liu J. & Newsome W.T., 2006).

Σύμφωνα με παλαιότερες έρευνες, η συνεισφορά των δυναμικών ενεργείας στη δημιουργία των LFPs και των σημάτων που καταγράφονται με το EEG είναι ασήμαντη. Μια πιθανή εξήγηση για αυτό είναι το ότι ο φλοιικός ιστός διαθέτει ισχυρή ικανότητα φιλτραρίσματος των συχνοτήτων. Οι υψηλές συχνότητες που δημιουργούνται από τα δυναμικά ενεργείας υπόκεινται σε έντονη άμβλυση του μεγέθους τους, ενώ αντίθετα οι χαμηλές συχνότητες, όπως αυτές των συναπτικών δυναμικών, αμβλύνονται λιγότερο απότομα σε συνάρτηση με την απόσταση. Κατά συνέπεια, στις εξωκυττάρειες καταγραφές τα δυναμικά ενεργείας μπορούν να ανιχνευθούν μόνο αν το ηλεκτρόδιο βρίσκεται ακριβώς δίπλα στο κύτταρο που πυροδοτεί, ενώ τα συναπτικά δυναμικά μπορούν να διαδοθούν σε μεγάλες αποστάσεις διατηρώντας ανιχνεύσιμο μέγεθος (Bédard et al., 2004).

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω, η σύγχρονη θεώρηση για την προέλευση των δυναμικών τοπικού πεδίου υποστηρίζει ότι τα LFPs προκύπτουν από συγχρονισμένα συναπτικά ρεύματα νευρικών συνόλων του φλοιού, πιθανώς μέσω σχηματισμού διπόλων (Niedermeyer & Lopes da Silva, 1998). Εκτός όμως από τα συγχρονισμένα συναπτικά δυναμικά, τα LFPs πιστεύεται ότι αντικατοπτρίζουν πλήθος άλλων νευρικών διαδικασιών, όπως υποουδικές ταλαντώσεις του μεμβρανικού δυναμικού (Kamondi et al.,

1998), ανασταλτικά μετασυναπτικά δυναμικά, καθώς και μεταδυναμικά σωματοδενδρικών δυναμικών ενεργείας που προέρχονται από την εγγύτερη περιοχή της κορυφής του ηλεκτροδίου (Buzsaki, 2002; Logothetis and Wandell, 2004).

Οι καταγραφές πεδίου θεωρείται ότι προσφέρουν μια ιδιαίτερα χρήσιμη προσέγγιση για τη μελέτη της συνδυασμένης νευρωνικής δραστηριότητας εντός μιας περιοχής νευρικού ιστού, αφού αντίθετα από τα δυναμικά ενεργείας, που δημιουργούνται από μεμονωμένους νευρώνες, τα LFPs είναι μέτρο των συναπτικών δυναμικών ολόκληρου του πληθυσμού νευρώνων που συγκεντρώνονται στην εγγύτερη περιοχή του ηλεκτροδίου. Επίσης, τα σήματα αυτά τυπικά περιέχουν ένα ευρύ φάσμα ταλαντώσεων ή διακυμάνσεων της νευρικής δραστηριότητας, το οποίο εκτείνεται από συχνότητες μικρότερες του 1 Hz ως και συχνότητες μερικών εκατοντάδων Hz (Lakatos et al., 2005; Senkowski et al., 2007). Αυτό το φάσμα δραστηριοτήτων πιθανώς αντιπροσωπεύει τη συμβολή διαφόρων μονοπατιών νευρικής επεξεργασίας. Αξιόλογος αριθμός ερευνών έχει δείξει ότι οι επιμέρους συνεισφορές μπορούν να διαχωριστούν ως ένα βαθμό και να ταυτοποιηθούν με τη χρήση σχετικά απλών μεθόδων, όπως η αποσυναρμολόγηση συχνοτήτων (Mazzoni et al., 2008; Ray & Maunsell, 2010). Συνεπώς, οι καταγραφές δυναμικών πεδίου μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ένα χρήσιμο εργαλείο για τη διερεύνηση και το διαχωρισμό διαφορετικών και εν δυνάμει ανεξάρτητων στη διαμόρφωσή τους μονοπατιών που συμμετέχουν στην νευρική επεξεργασία πληροφοριών.

■ Πειραματική διαδικασία:

1. Παρασκευή τεχνητού εγκεφαλονωτιαίου υγρού (artificial cerebrospinal fluid – aCSF)

Από τη στιγμή της εξαγωγής του εγκεφάλου από την κρανιακή κοιλότητα του ζώου, κατά τη λήψη λεπτών εγκεφαλικών τομών και καθ'όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας καταγραφών πεδίου, ο εγκεφαλικός ιστός πρέπει να βρίσκεται υπό συνεχή ροή τεχνητού εγκεφαλονωτιαίου υγρού (aCSF), προκειμένου να παραμείνουν μεταβολικά ενεργά τα εγκεφαλικά κύτταρα. Εν προκειμένω, χρησιμοποιήθηκαν 2 τύποι aCSF:

- Normal aCSF με την εξής χημική σύσταση: 125 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 26 mM NaHCO₃, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 10 mM glucose, pH=7.4 και ωσμωγραμμομοριακότητα κατ'όγκο 310 mOsm/L, το οποίο χρησιμοποιείται στην επώαση των τομών σε υδατόλουτρο (tissue well) για 30-45' πριν την έναρξη του πειράματος καθώς και καθ'όλη τη διάρκεια των καταγραφών.

- 0Ca-aCSF με την εξής χημική σύσταση : 125 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 26 mM NaHCO₃, 3 mM MgCl₂, 1.26 mM NaH₂PO₄, 10 mM glucose, pH=7.4 και ωσμωγραμμομοριακότητα κατ'όγκο 310 mOsm/L , το οποίο χρησιμοποιείται κατά την προπαρασκευή του εγκεφαλικού ιστού (λήψη λεπτών τομών).

Μετά την προσθήκη των προαναφερθέντων αλάτων στην κατάλληλη ποσότητα απιονισμένου νερού (3L για το normal aCSF, 1L για το 0Ca-aCSF), το διάλυμα είναι κατά κανόνα πιο βασικό απ'ότι το εγκεφαλονωτιαίο υγρό σε πραγματικές συνθήκες, το οποίο έχει pH = 7.31 (Seifter, 2005). Για τη διόρθωση του pH προστίθεται στο aCSF μικρός όγκος διαλύματος HCl (αραίωση 1:10), μέχρι η τιμή του να φτάσει το 7.4 (τιμή μεγαλύτερη από το φυσιολογικό pH, καθώς λαμβάνουμε υπ' όψιν τη χαμηλή θερμοκρασία του διαλύματος κατά την παρασκευή του).

2. Αφαίρεση εγκεφάλου και λήψη λεπτών τομών

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια (*Mus musculus*) της σειράς C57BL/6, αρσενικού γένους, δύο ηλικιακών ομάδων: ανήλικα - juveniles (30-35 ημερών) και νεαρά ενήλικα – young adults (> 60 ημερών). Το ζώο αρχικά αναισθητοποιείται με halothane (2-bromo-2-chloro-1,1,1-trifluoroethane) και στη συνέχεια αφαιρείται ταχέως ο εγκέφαλος ως εξής: το ποντίκι καρατομείται και αφαιρείται η εξωτερική επιδερμίδα της κεφαλής. Αφ' ότου αποκαλυφθεί το κρανίο, δημιουργούνται σε αυτό τρεις σχισμές σχήματος T: μια κατά μήκος του εμπρόσθιο-οπίσθιου άξονα και άλλες δύο μικρότερες, σε διεύθυνση κάθετη προς την πρώτη και στο επίπεδο του κρανίου που καλύπτει την παρεγκεφαλίδα. Έτσι διευκολύνεται η απομάκρυνση του κρανιακού οστού, με τη βοήθεια κυρτής λαβίδας, και η αφαίρεση της σκληράς μήνιγγος που περιβάλλει τον εγκέφαλο. Τέλος, με τη χρήση λεπτής σπάτουλας, αποκόπτεται το οπτικό χίασμα και οι υπόλοιποι σύνδεσμοι μεταξύ κρανίου και εγκεφάλου και ο ιστός τοποθετείται σε παγωμένο 0Ca – aCSF, το οποίο τροφοδοτείται συνεχώς με μίγμα αερίων (95% O₂/ 5% CO₂).

Στη συνέχεια, ο εγκέφαλος τέμνεται υπό γωνία ~60° ως προς τον πρόσθιο-οπίσθιο άξονα και ~60° ως προς τον εσωπλευρικό άξονα. Το πρόσθιο τμήμα του εγκεφάλου, όπου εντοπίζεται η περιοχή ενδιαφέροντος (προμετωπιαίος φλοιός), τοποθετείται σε μικροτόμο παλλόμενης λεπίδας (Leica VT1000S) και παραλαμβάνονται από αυτό τομές πάχους 400 μm. Στη συνέχεια οι τομές μεταφέρονται σε tissue well, βυθισμένο σε normal aCSF, σε θερμοκρασία δωματίου και υπό συνεχή οξυγόνωση για 30-45' πριν τη μεταφορά τους στο χώρο διεξαγωγής του πειράματος.

3. Πειραματική διάταξη καταγραφών τοπικού πεδίου

Έπειτα ακολουθεί η διαδικασία εξωκυττάριας καταγραφής δυναμικών τοπικού πεδίου (Local Field Potentials – LFPs), για την οποία χρησιμοποιείται ένα μεταλλικό συγκεντρωτικό ηλεκτρόδιο ερεθισμού και ένα ηλεκτρόδιο καταγραφής που απαρτίζεται από λεπτό σύρμα χλωριούχου αργύρου και μονωτική γυάλινη πιπέτα (διαμέτρου $\sim 10 \mu\text{m}$), πλήρη ηλεκτρολύτη (2 M NaCl). Οι καταγραφές πραγματοποιήθηκαν στο σύνολό τους στη έξω κοκκιώδη στιβάδα (layer II) στην περιοχή του prelimbic prefrontal cortex, η οποία εντοπίζεται με τη βοήθεια μικροσκοπίου φωτισμού πρόσπτωσης (Zeiss, USA) και ενσωματωμένης κάμερας (Hamamatsu, Japan). Τα ασθενή ηλεκτρικά σήματα που δέχεται το μικροηλεκτρόδιο φιλτράρονται με χαμηλοπερατό φίλτρο στα 0-1 kHz και ενισχύονται μέσω ενισχυτή (DAGAN BVC-700), ψηφιοποιούνται με το ITC-18 (A-D board), και καταγράφονται σε υπολογιστή όπου λαμβάνονται με τη βοήθεια του προγράμματος IgorPro (Wavemetrics, USA). Η συχνότητα λήψης ανέρχεται στα 100 kHz.

4. Πρωτόκολλο ερεθισμού

Το πρωτόκολλο ερεθισμού για τον προμετωπιαίο φλοιό πραγματοποιείται με τα δύο ηλεκτρόδια (ερεθισμού και καταγραφής) τοποθετημένα στην ίδια στιβάδα του προμετωπιαίου (στιβάδα II) και αποτελείται από τις εξής φάσεις:

- **Input – Output:** Αρχικά, αφού εντοπιστεί η κατάλληλη διάταξη των ηλεκτροδίων για την διεξαγωγή ολοκληρωμένου πρωτοκόλλου, πραγματοποιούνται διαδοχικά δύο ερεθισμοί διάρκειας 0.01 ms, έντασης 0.05 mA και με μεταξύ τους ISI (Interstimulus Interval) διάρκειας 60". Στη συνέχεια, απουσία ερεθισμού, καταγράφεται η αυθόρμητη δραστηριότητα των νευρώνων της περιοχής για 50". Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται με μόνη διαφορά την ένταση του σήματος ερεθισμού, η οποία αυξάνεται κατά 0.05 mA τη φορά, μέχρι και τα 0.3 mA. Σκοπός της φάσης αυτής είναι η μελέτη των ιδιοτήτων της βασικής συναπτικής διαβίβασης της ομάδας νευρώνων που βρίσκεται κοντά στο ηλεκτρόδιο καταγραφής, σε σχέση με την αυξανόμενη ένταση του ρεύματος ερεθισμού.

Σε όλες τις φάσεις που ακολουθούν η ένταση του ρεύματος ερεθισμού θα παραμείνει σταθερή σε εκείνο το επίπεδο, στο οποίο η απόκριση που λαμβάνεται είναι της τάξης του 1 mV.

- **Paired-Pulses:** Κατά τη δεύτερη φάση του πειράματος εφαρμόζονται συζευγμένοι παλμοί με μεταξύ τους διάστημα 100, 50 και 20 ms ή αλλιώς με συχνότητα 10, 20 και 50 Hz, με τη σειρά που

αναγράφονται και από 2 επαναλήψεις για την κάθε συχνότητα, μεταξύ των οποίων παρεμβάλλεται ISI διάρκειας 60''.

Αυτός ο τύπος ερεθισμού αποσκοπεί στη μελέτη της βραχύχρονης συναπτικής πλαστικότητας της ομάδας νευρώνων, από την οποία λαμβάνονται οι καταγραφές. Η ενδυνάμωση μέσω συζυγμένων παλμών (paired pulse facilitation_PPF) είναι μια μορφή πλαστικότητας που μεσολαβείται από προσυναπτικούς μηχανισμούς.

- **Baseline - activity:** Το πρωτόκολλο ερεθισμού συνεχίζεται με την εφαρμογή 20 μονών ερεθισμών διάρκειας 0.01 ms και μεταξύ τους ISI 60'', για την εκτίμηση του μέσου μεγέθους της απόκρισης πριν την εφαρμογή του τετανικού ερεθισμού.
- **Tetanus - Test:** Ο τετανικός ερεθισμός αποτελείται από 3 επαναλήψεις διεγερτικών σημάτων υψηλής συχνότητας, μεταξύ των οποίων παρεμβάλλεται ISI διάρκειας 20''. Ο συγκεκριμένος τύπος ερεθισμού εφαρμόζεται, επειδή έχει εξακριβωθεί ως ένας από τους βασικούς μηχανισμούς επαγωγής μακρόχρονης ενδυνάμωσης (long term potentiation – LTP).
- **LTP – induction :** Αφού περάσουν 5 περίπου λεπτά μετά τη λήξη του τετάνου, εφαρμόζουμε και πάλι μια σειρά 50 μονών ερεθισμών, με μεταξύ τους ISI 60'', για τη μελέτη της επίδρασης ενός ισχυρού ερεθισμού στη μακρόχρονη συναπτική πλαστικότητα των νευρώνων υπό εξέταση. Εάν το μέσο μέγεθος της απόκρισης αυξηθεί σε σύγκριση με την baseline activity, παρ' ότι η ένταση του ερεθισμού είναι σταθερή, πρόκειται για μακρόχρονη ενδυνάμωση της συναπτικής ισχύος (long-term potentiation – LTP). Εάν μειωθεί, αντίθετα, πρόκειται για μακρόχρονη καταστολή (long-term depression – LTD), ενώ αν δε μεταβληθεί σημαντικά οι συνάψεις δεν εμφανίζουν πλαστικότητα.
- **Paired – Pulses:** Τέλος, ακολουθεί μια δεύτερη εφαρμογή συζευγμένων παλμών με τον ίδιο ακριβώς τρόπο, όπως περιεγράφη παραπάνω. Στόχος της τελευταίας αυτής φάσης είναι η διαπίστωση αν το LTP που ενδεχομένως παρατηρήθηκε οφείλεται σε προσυναπτικό ή μετασυναπτικό μηχανισμό. Μεταβολές στο PPF υποδεικνύουν την εμπλοκή προσυναπτικού μηχανισμού στην επαγωγή της μακρόχρονης ενδυνάμωσης.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

❖ T-maze

Έχει προταθεί ότι η ωρίμανση του προμετωπιαίου φλοιού δεν ολοκληρώνεται παρά μόνο μετά το τέλος της εφηβείας (Casey et al, 2000). Συνεπώς και οι γνωσιακές λειτουργίες, οι οποίες εξαρτώνται από αυτή την περιοχή, φτάνουν στο βέλτιστο επίπεδο, όταν ο οργανισμός έχει πλέον ενηλικιωθεί. Για τη μελέτη της λειτουργικότητας του PFC χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία της εναλλαγής με καθυστέρηση σε λαβύρινθο σχήματος T (T-maze). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων που διεξήχθησαν σε 15 νεαρά έφηβα (40-60 ημερών) και 10 ενήλικα ποντίκια (>120 ημερών) έδειξαν τα εξής:

- Η επίδοση των ενηλίκων κυμαίνεται σε ελαφρώς καλύτερα επίπεδα από αυτά των εφήβων ποντικών. Συγκεκριμένα, η ομάδα των ενηλίκων χρειάστηκε συνολικά λιγότερα sessions κατά μέσο όρο από τα έφηβα για να ολοκληρώσουν τη δοκιμασία, δηλαδή για να συμπληρώσουν κριτήριο ($\geq 70\%$ σωστές επιλογές, είτε σε 2 sessions την ίδια μέρα, είτε διαδοχικά στο 3^ο session μιας μέρας και το 1^ο session της επόμενης) για μια σειρά αυξανόμενων καθυστερήσεων μέχρι και τα 25 δευτερόλεπτα (**figure 1, c**).

Επίσης, το μέσο ποσοστό σωστών επιλογών των ενηλίκων ήταν ελαφρώς αυξημένο σε σχέση με αυτό των εφήβων για κάθε καθυστέρηση (**figure 1, b**). Οι μεγαλύτερες διαφορές στην επίδοση παρατηρήθηκαν στα αρχικά, χωρίς καθυστέρηση, sessions και στις μικρότερες καθυστερήσεις (5''-15''), ενώ στη συνέχεια οι διαφορές εξομαλύνθηκαν (**figure 1, b,c,d**).

Μάλιστα, στις μεγάλες καθυστερήσεις, τόσο ο αριθμός των sessions για τη συμπλήρωση κριτηρίου όσο και το ποσοστό των σωστών επιλογών, βελτιώθηκαν σε μεγάλο βαθμό από τα επίπεδα που παρατηρήθηκαν στην αρχή της δοκιμασίας. Ο κύριος περιοριστικός παράγων της επίδοσης δηλαδή στα πλαίσια της δοκιμασίας αυτής φαίνεται πως ήταν η εκμάθηση του μοτίβου εναλλαγής του βραχίονα με αμοιβή.

- Οι δύο συγκρινόμενες ομάδες δεν παρουσίασαν αξιοσημείωτες διαφορές στο χρόνο επιλογής βραχίονα (choice latency), με εξαίρεση το 1^ο session με καθυστέρηση 5'', κατά το οποίο τα ενήλικα ζώα έκαναν την επιλογή τους σε σημαντικά μικρότερο χρόνο. Επιπλέον, στο 1^ο session με καθυστέρηση 25'' η ομάδα που κινήθηκε ελαφρώς γρηγορότερα προς τον βραχίονα επιλογής ήταν αυτή των εφήβων ποντικών, σημειώνοντας ωστόσο χαμηλότερο ποσοστό σωστών επιλογών. Αντίθετα, ιδιαίτερα εμφανής ήταν η τάση μείωσης του χρόνου επιλογής και για τις δύο ομάδες, σε πολύ μεγάλο βαθμό, καθώς

προχωρούσαν οι μέρες διεξαγωγής της δοκιμασίας, παρά την αύξηση της διάρκειας της καθυστέρησης (figure 2, b).

▪ Σε ότι αφορά τη διαδοχική επανάληψη μιας λανθασμένης επιλογής, η οποία αποτελεί ένδειξη «εμμονής» (preservation), δηλαδή ανικανότητας αναπροσαρμογής της συμπεριφορικής στρατηγικής, παρατηρήθηκε ότι οι έφηβοι ποντικοί πραγματοποίησαν συνολικά μεγαλύτερες σειρές διαδοχικών λαθών και με αυξημένη συχνότητα σε σχέση με τα ενήλικα. Μάλιστα περισσότερα από 5 διαδοχικά λάθη (6-10) πραγματοποιήθηκαν αποκλειστικά από την ομάδα των εφήβων (figure 2, c).

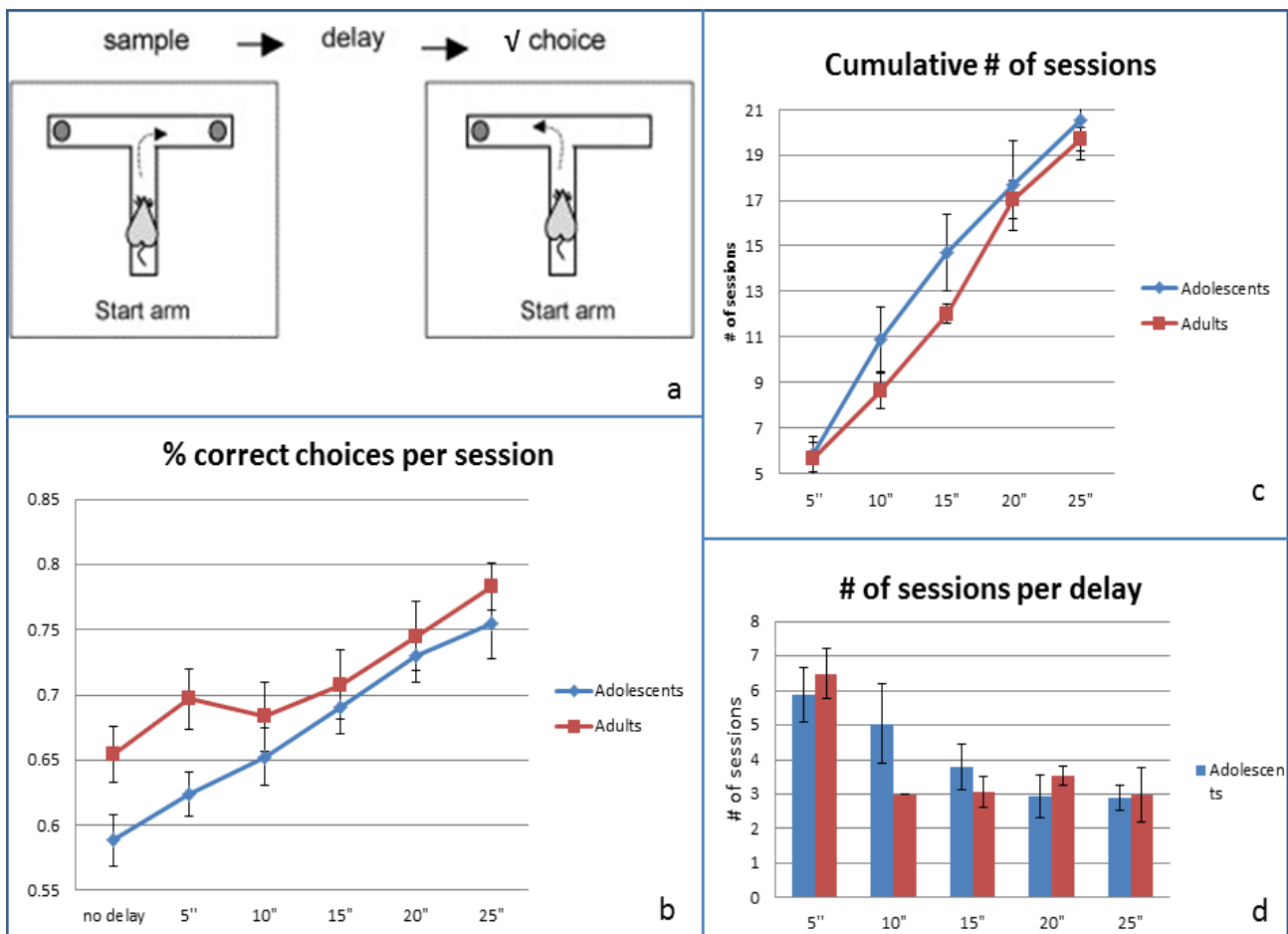


Figure 2] Αποτελέσματα δοκιμασίας εναλλαγής με καθυστέρηση. α. Πρωτόκολλο δοκιμασίας και αναπαράσταση trial 0 και σωστής επιλογής – αντίθετη πλευρά από την αμέσως προηγούμενη επιλογή. β. Μέσο ποσοστό σωστών επιλογών ενηλίκων και εφήβων ποντικών για το σύνολο των sessions ανά καθυστέρηση. γ. Μέσος αθροιστικός αριθμός sessions ανά ηλικιακή ομάδα για την συμπλήρωση κριτηρίου με αυξανόμενες καθυστερήσεις και μέσος συνολικός αριθμός sessions για την ολοκλήρωση της δοκιμασίας. δ. Απόλυτος μέσος αριθμός sessions για την συμπλήρωση κριτηρίου και την προαγωγή σε μεγαλύτερη καθυστέρηση για κάθε ηλικιακή ομάδα, ανά καθυστέρηση.

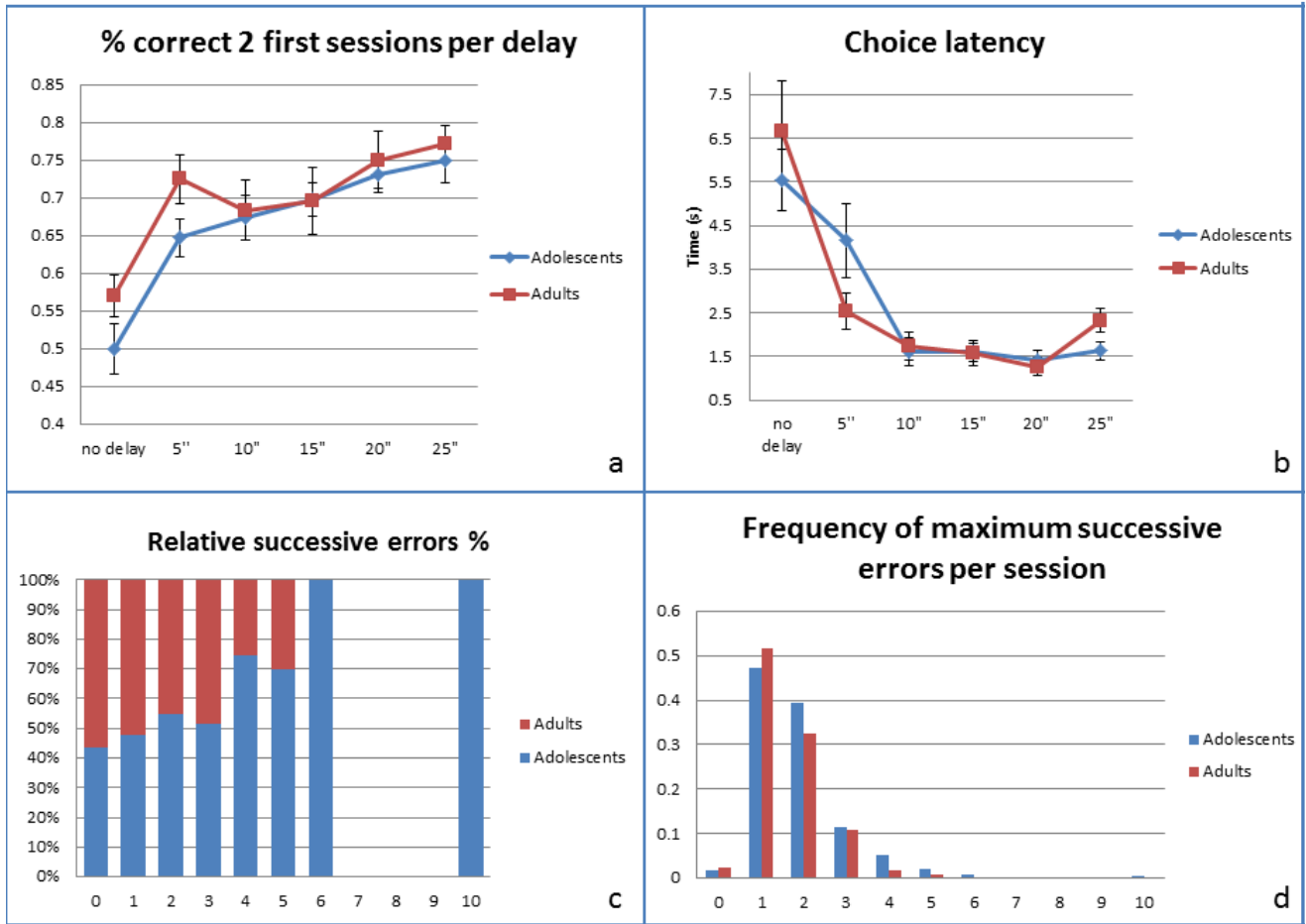


Figure 3] a. Μέσο ποσοστό σωστών επιλογών ενηλίκων και εφήβων ποντικών για τα πρώτα 2 sessions ανά καθυστέρηση. b. Μέσος χρόνος για την επιλογή βραχίονα (κίνηση από το start arm στο βραχίονα επιλογής μέχρι να περάσει η ουρά τη γραμμή κριτηρίου – βλέπε figure 1, υλικά και μέθοδοι) για το 1^ο session σε καθυστέρηση. c. Αναλογία παρατηρούμενων μέγιστων διαδοχικών λαθών μεταξύ ενηλίκων και εφήβων στο σύνολο των sessions, ανά αριθμό διαδοχικών λανθασμένων επιλογών. d. Συχνότητα εμφάνισης συγκεκριμένου αριθμού διαδοχικών λαθών ως μέγιστο ανά session για κάθε ηλικιακή ομάδα.

❖ Ηλεκτροφυσιολογία

Οι καταγραφές δυναμικών τοπικού πεδίου (LFPs) πραγματοποιήθηκαν στην δεύτερη στιβάδα (layer II) του προμεταιχμιακού φλοιού του PFC σε 8 εγκεφαλικές τομές νεαρών ενηλίκων ποντικών (>60 ημερών) και 10 εγκεφαλικές τομές ανηλίκων ποντικών (30-35 ημερών), για την εκτίμηση των ηλεκτροφυσιολογικών ιδιοτήτων και της συναπτικής πλαστικότητας της περιοχής αυτής.

Για την επαγωγή νευρικής απόκρισης μεταλλικό ηλεκτρόδιο ερεθισμού τοποθετήθηκε, έτσι ώστε να εφάπτεται στην εγκεφαλική τομή στο επίπεδο της στιβάδας II. Το ηλεκτρόδιο καταγραφής τοποθετήθηκε επίσης στο επίπεδο της στιβάδας II του προμεταιχμιακού φλοιού του PFC (**figure 3,a**). Τα καταγραφόμενα δυναμικά τοπικού πεδίου έπρεπε να φέρουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, τα οποία απεικονίζονται στην εικόνα **figure 3,b**, ώστε να γίνουν αποδεκτά και να εφαρμοστεί το πρωτόκολλο rfc 2_2 (βλέπε σελ. 51-52). Εν συντομία τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά μιας καταγραφής είναι τα εξής:

Vpeak: κορυφή του χειμάρρου πυροδότησης (fiber volley) που αντικατοπτρίζει τη συνολική απόκριση των προσυναπτικών νευρώνων και εξαρτάται από το πλήθος των προσυναπτικών ιών που πυροδοτούν δυναμικά ενεργείας.

Fpeak: αντιπροσωπεύει τη μέγιστη τιμή εκπόλωσης διεγερτικού μετασυναπτικού δυναμικού του συνόλου των νευρώνων που καταγράφονται σε σύγκριση με το επίπεδο δραστηριότητας των νευρώνων πριν την εφαρμογή του σήματος ερεθισμού (baseline activity).

Fppeak: αποτελεί τη διαφορά της μέγιστης τιμής εκπόλωσης της (fpeak) από το μέγιστο θετικό σημείο της καμπύλης μετά το vpeak.

Actslope: Η κλίση της καμπύλης που σηματοδοτεί την ταχύτητα ενεργοποίησης.

Inactslope: Η χρονική σταθερά απόσβεσης της εκπόλωσης.

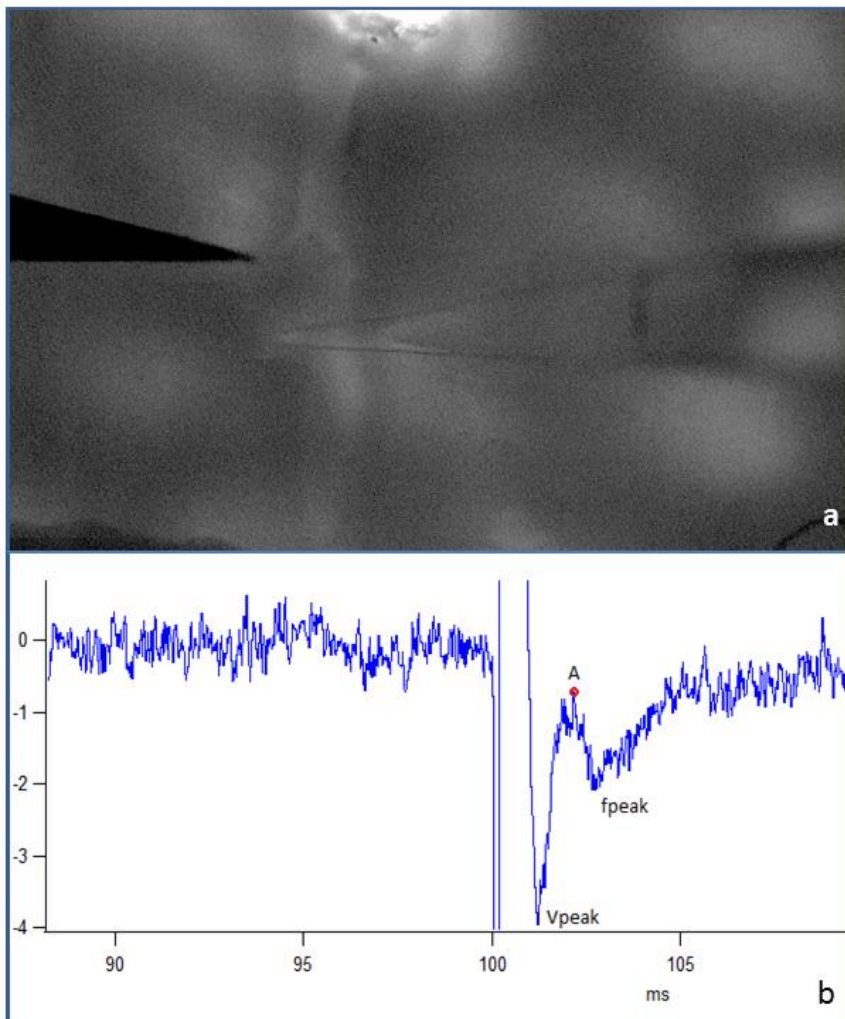


Figure 4] a. Χαρακτηριστική εικόνα από τον ιστό και την περιοχή λήψης των καταγραφών (prelimbic cortex, PFC, layer II). Τόσο το ηλεκτρόδιο καταγραφής (διαφανές) όσο και το ηλεκτρόδιο ερεθισμού (μαύρο) τοποθετούνται κατά μήκος της μέσης γραμμής που χωρίζει τα εγκεφαλικά ημισφαίρια (midline) στο επίπεδο τις επιφάνειας της στιβάδας II και σε μικρή μεταξύ τους απόσταση. b. Τυπική εικόνα της απόκρισης μιας ομάδας νευρώνων, ύστερα από μοναδιαίο ερεθισμό. Απεικονίζονται οι κορυφές vpeak (fiber volley), fpeak (μέγιστη εκπόλωση – μετασυναπτική απόκριση). Η διαφορά δυναμικού μεταξύ του σημείου A και του fpeak αποτελεί το fpeak.

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφυσιολογικής μελέτης ήταν τα εξής:

- Σε ότι αφορά τις βασικές ιδιότητες συναπτικής διαβίβασης των νευρώνων του προμετωπιαίου φλοιού με μεταβλητή ένταση σήματος ερεθισμού, παρατηρήθηκε ότι και στις δύο ηλικιακές ομάδες, όσο μεγαλύτερη ήταν η ένταση του διεγερτικού σήματος, τόσο αυξανόταν η καταγραφόμενη απόκριση (στην ουσία δηλαδή η συχνότητα πυροδότησης δυναμικών ενεργείας της καταγραφόμενης ομάδας νευρώνων). Σε ότι αφορά το μέγεθος της απόκρισης για κάθε συγκεκριμένη τιμή διεγερτικού ρεύματος, οι νευρώνες των ανηλικών ποντικών εμφάνισαν μεγαλύτερες αποκρίσεις από τις αντίστοιχες των ενηλικών (figure 4,b).

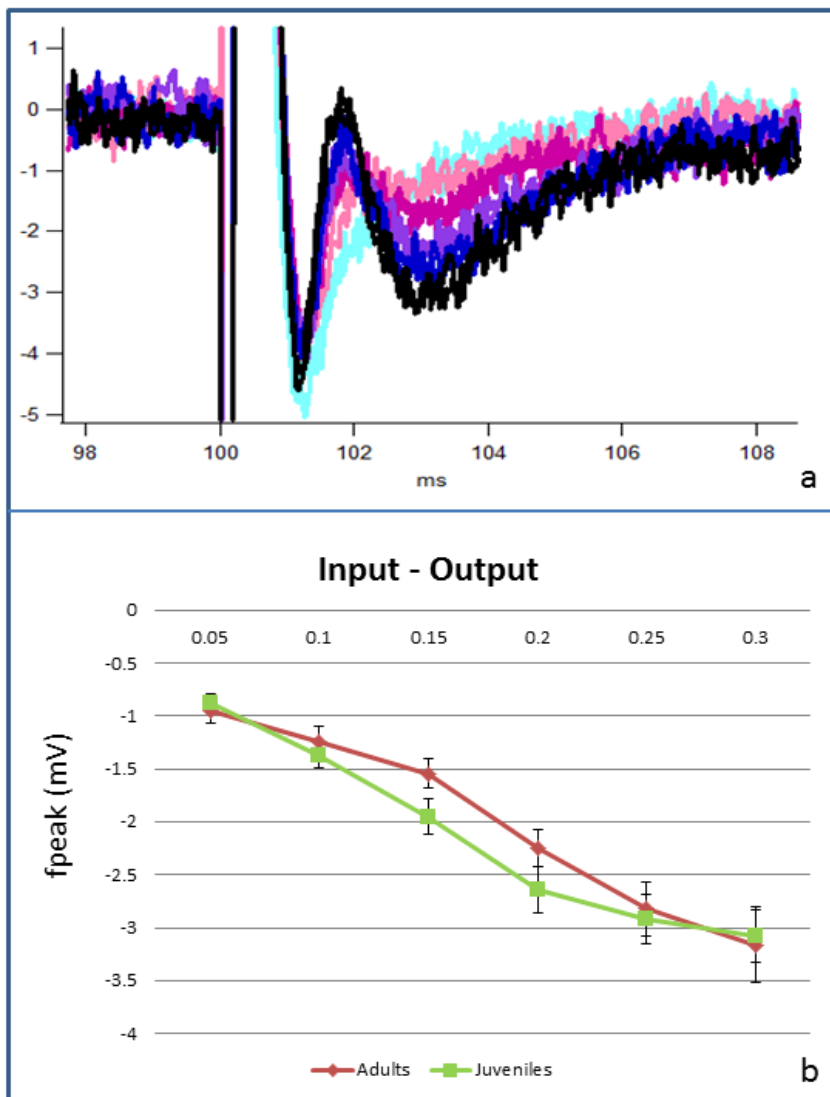


Figure 5] a. Καταγραφές δυναμικών τοπικού πεδίου σε διεγερτικά σήματα αυξανόμενης έντασης (όσο πιο σκούρο είναι το χρώμα της καταγραφής, τόσο μεγαλύτερης έντασης ήταν το ερέθισμα). Πρόκειται για αποκρίσεις τις ίδιας ομάδας νευρώνων από μια εγκεφαλική τομή. b. Μέσες τιμές μέγιστης εκπόλωσης (fpeak), για διεγερτικά ρεύματα αυξανόμενης ισχύος, και για τις δύο ηλικιακές ομάδες.

▪ Για τη μελέτη της βραχύχρονης πλαστικότητας των νευρώνων του PFC εφαρμόστηκαν συζευγμένοι παλμοί με μεταξύ τους διάστημα 100, 50 και 20 ms , δηλαδή συχνότητας 10Hz, 20Hz και 50Hz. Το μέτρο που βοηθά στην εκτίμηση της βραχύχρονης συναπτικής πλαστικότητας είναι ο λόγος f_{peak2}/f_{peak1} , δηλαδή η τιμή f_{peak} της απόκρισης στον 2^ο κατά σειρά ερεθισμό δια την τιμή f_{peak} της απόκρισης στον 1^ο ερεθισμό.

Οι συζευγμένοι παλμοί εφαρμόζονται δύο φορές κατά τη διάρκεια του πρωτοκόλλου. Η πρώτη λαμβάνει χώρα πριν την εφαρμογή οποιουδήποτε ερεθισμού και πριν την καταμέτρηση της baseline activity, για να διαπιστωθεί αν οι νευρώνες εμφανίζουν διευκόλυνση συζευγμένων παλμών (paired pulse facilitation_PPF), αναστολή (paired pulse depression_PPD) ή δεν παρουσιάζουν βραχύχρονη πλαστικότητα (**figure 5**). Η δεύτερη εφαρμογή τους λαμβάνει χώρα αφ'ότου εφαρμοστεί τετανικός ερεθισμός και καταγραφεί η απόκριση για 50' μετά από αυτόν. Σκοπός της εφαρμογής αυτής είναι η

διαπίστωση μεταβολών στο PPF, οι οποίες αποτελούν ένδειξη εμπλοκής προσυναπτικού μηχανισμού στην επαγωγή μακρόχρονης ενδυνάμωσης.

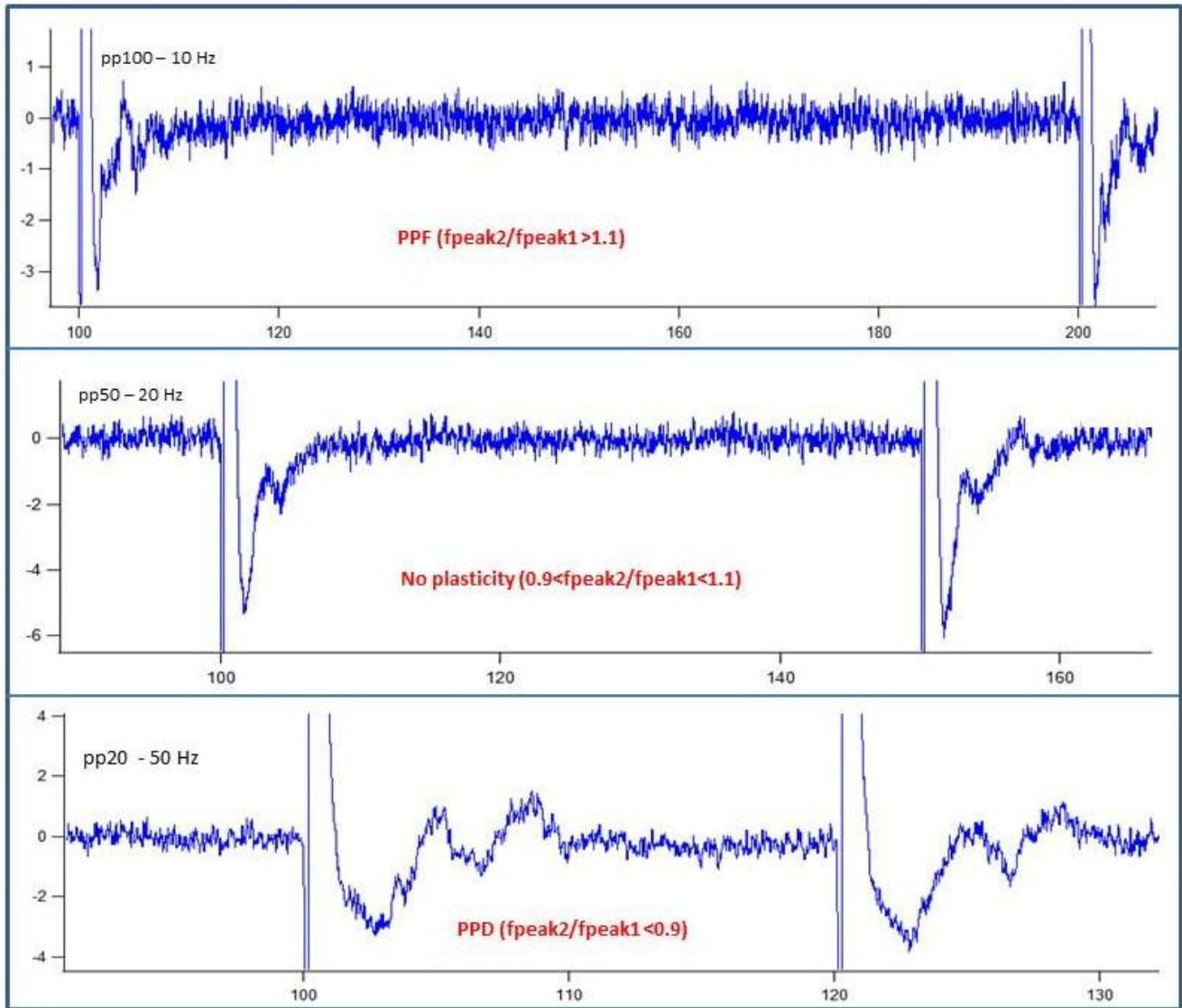


Figure 6] Μεταβολές στο μέγεθος απόκρισης κατά τους συζευγμένους παλμούς. Εμφανίζεται μια περίπτωση paired pulse facilitation (PPF), με διάστημα 100 ms μεταξύ των συζευγμένων παλμών, μια περίπτωση απουσίας πλαστικότητας, όπου το αντίστοιχο διάστημα είναι 50 ms και μια περίπτωση paired pulse depression (PPD), με διάστημα 20 ms μεταξύ των παλμών. Ως διάστημα μη σημαντικής μεταβολής της απόκρισης (απουσίας πλαστικότητας) θεωρήσαμε τις τιμές f_{peak2}/f_{peak1} που ανήκουν στο διάστημα (0.9,1.1).

Η μελέτη της απόκρισης ύστερα από εφαρμογή συζευγμένων παλμών κατέδειξε τα εξής:

- Πριν από τον τετανικό ερεθισμό, οι νευρώνες στον προμεταιχμιακό φλοιό των ενηλίκων εμφανίζουν συναπτική διευκόλυνση κατά τους συζευγμένους παλμούς, η ένταση της οποίας ωστόσο υφίσταται

μικρή μείωση, όσο αυξάνεται η συχνότητα διέγερσης. Στην ομάδα των ανηλίκων διευκόλυνση έχουμε μόνο στην περίπτωση των 10 Hz, ενώ στα 20 Hz και 50 Hz το μέγεθος της απόκρισης παραμένει κατά βάση σταθερό. Σε όλες τις συχνότητες συζευγμένων παλμών ο λόγος f_{peak2}/f_{peak1} των ανηλίκων είναι ελαφρώς μικρότερος από αυτόν των ενηλίκων (**figure 6,a**).

- Μετά τον τετανικό ερεθισμό η διαφορά στην τιμή του λόγου f_{peak2}/f_{peak1} μεταξύ ανηλίκων και ενηλίκων ποντικών αυξάνεται για όλες τις συχνότητες συζευγμένων παλμών. Παρατηρείται ωστόσο η ίδια πτωτική τάση μεταβολή της απόκρισης, όσο αυξάνεται η συχνότητα των παλμών (**figure 6,b**).
- Υπολογίζοντας τον λόγο $[(f_{peak2}/f_{peak1})_{post\ tetanus}]/[(f_{peak2}/f_{peak1})_{pre\ tetanus}]$ ποσοτικοποιήσαμε τη μεταβολή στη συναπτική πλαστικότητα, ύστερα από την εφαρμογή του τετάνου. Και στις 2 ηλικιακές ομάδες, όσο αυξάνεται η συχνότητα των παλμών, τόσο μειώνεται η τιμή του λόγου f_{peak2}/f_{peak1} , με τις τιμές των ενηλίκων ποντικών να είναι μεγαλύτερες σε κάθε περίπτωση. Ενίσχυση της διευκόλυνσης παρατηρείται μόνο στα ενήλικα στην περίπτωση των 100 Hz, ενώ μετατροπή της πλαστικότητας από απουσία σε αναστολή (μετά τον τέτανο) εμφανίζεται μόνο στην ομάδα των ανηλίκων, στα 50 Hz (**figure 6, c**).

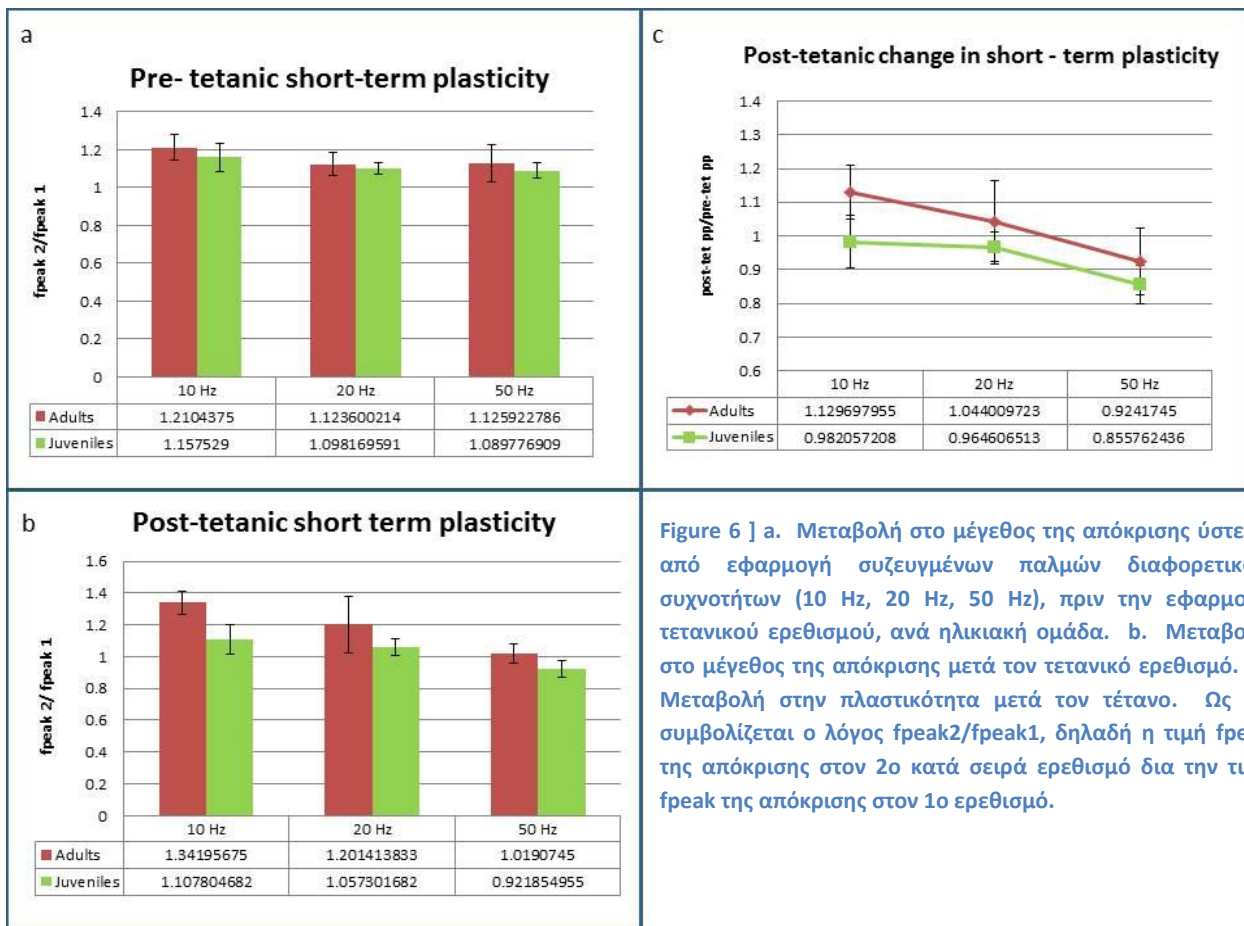


Figure 6] a. Μεταβολή στο μέγεθος της απόκρισης ύστερα από εφαρμογή συζευγμένων παλμών διαφορετικών συχνοτήτων (10 Hz, 20 Hz, 50 Hz), πριν την εφαρμογή τετανικού ερεθισμού, ανά ηλικιακή ομάδα. b. Μεταβολή στο μέγεθος της απόκρισης μετά τον τετανικό ερεθισμό. c. Μεταβολή στην πλαστικότητα μετά τον τέτανο. Ως pp συμβολίζεται ο λόγος f_{peak2}/f_{peak1} , δηλαδή η τιμή f_{peak} της απόκρισης στον 2ο κατά σειρά ερεθισμό δια την τιμή f_{peak} της απόκρισης στον 1ο ερεθισμό.

Σε ότι αφορά το ποσοστό εμφάνισης των διαφόρων τύπων πλαστικότητας (PPF, no plasticity, PPD) στον πληθυσμό εγκεφαλικών τομών που εξετάστηκαν, το μεγαλύτερο ποσοστό διευκόλυνσης καταγράφηκε κατά τους συζευγμένους παλμούς συχνότητας 10 Hz στην ομάδα των ενηλίκων ποντικών. Το ποσοστό αυτό μάλιστα ανήλθε στο 75% μετά τον τετανικό ερεθισμό. Αντίθετα, τα μεγαλύτερα ποσοστά αναστολής εμφανίστηκαν κατά τους συζευγμένους παλμούς συχνότητας 50 Hz. Μετά τον τετανικό ερεθισμό, το ποσοστό αναστολής αυξήθηκε και στις 2 ηλικιακές ομάδες, αλλά σε ότι αφορά τα ανήλικα ποντίκια η αύξηση αυτή ήταν θεαματική (PPD εμφάνισε το 50% των τομών). Στην περίπτωση των 20 Hz δεν υπήρξε ξεκάθαρη τάση μεταβολής της πλαστικότητας, καθώς αυξήθηκε τόσο το ποσοστό εμφάνισης διευκόλυνσης, όσο και το ποσοστό εμφάνισης αναστολής και στις 2 ομάδες. Μάλιστα, σε αυτή τη συχνότητα, η ομάδα με το μεγαλύτερο ποσοστό εμφάνισης PPF ήταν αυτή των ανήλικων ποντικών, αντίθετα με τις υπόλοιπες συχνότητες (figure 7, a,b).

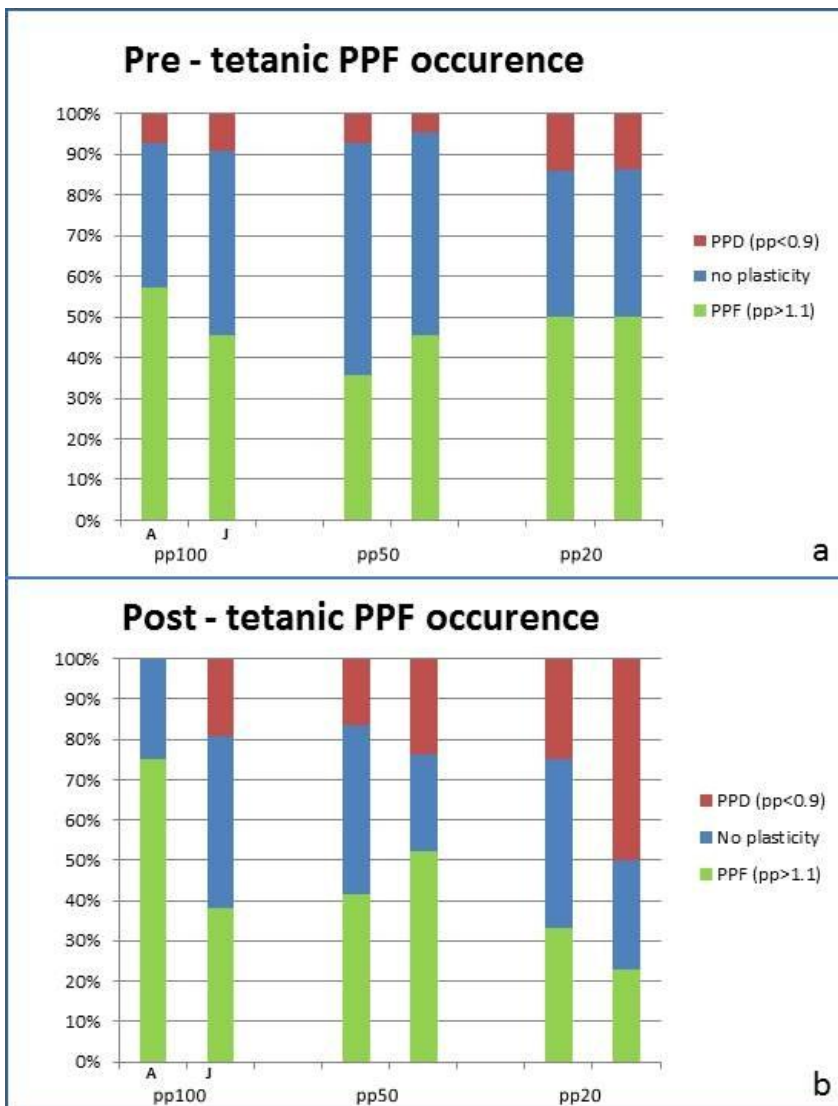
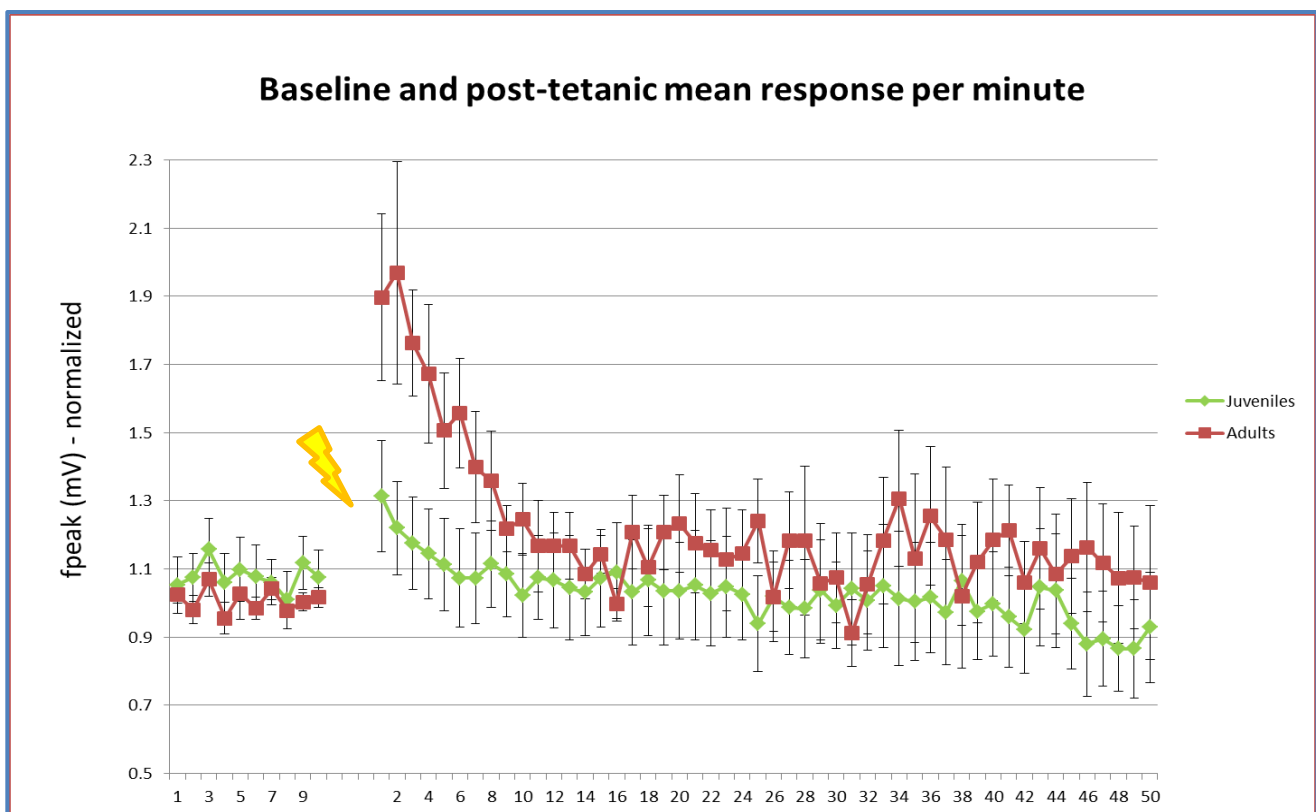


Figure 7] Συχνότητα εμφάνισης κάθε τύπου πλαστικότητας (PPF, no plasticity, PPD) στον αριθμό εγκεφαλικών τομών που χρησιμοποιήθηκαν στις καταγραφές δυναμικών τοπικού πεδίου, ανά συχνότητα παλμών και ανά ηλικιακή ομάδα. a. Προ-τετάνου. b. Μετά-τετάνου.

▪ Για τη μελέτη της μακρόχρονης συναπτικής πλαστικότητας καταμετράται αρχικά το μέσο μέγεθος απόκρισης των νευρώνων πριν την εφαρμογή του τετανικού ερεθισμού (baseline activity). Στη συνέχεια, ακολουθεί υψηλής συχνότητας τετανικός ερεθισμός και έπειτα καταγραφή του μέσου μεγέθους απόκρισης για 50' λεπτά μετά τον ερεθισμό. Εάν το μέσο μέγεθος απόκρισης αυξάνεται σε σχέση με την baseline activity, πρόκειται για μακρόχρονη ενδυνάμωση της συναπτικής ισχύος (long-term potentiation – LTP), εάν μειώνεται έχουμε μακρόχρονη αποδυνάμωση (long-term depression – LTD) και αν παραμένει σχετικά αμετάβλητη έχουμε απουσία μακρόχρονης συναπτικής πλαστικότητας.

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από την παρούσα μελέτη ήταν τα εξής:

- Η baseline activity κυμαίνεται σε λίγο χαμηλότερα επίπεδα σε ότι αφορά την ομάδα των ενηλίκων σε σύγκριση με την ομάδα των ανηλίκων.
- Τα πρώτα λεπτά (~1-10) μετά την εφαρμογή του ερεθισμού διαπιστώθηκε πολύ μεγαλύτερη αύξηση της απόκρισης των νευρώνων των ενηλίκων ποντικών σε σύγκριση με τα ανήλικα ζώα.
- Στη συνέχεια, το επίπεδο της απόκρισης μειώνεται σταδιακά και σταθεροποιείται σχετικά και για τις δύο ομάδες. Ωστόσο, στην περίπτωση των ενηλίκων ο λόγος: f_{peak} μετατετανικής απόκρισης / μέσο επίπεδο προ-τετανικής απόκρισης κυμαίνεται σε τιμές >1 (~1.1-1.3), άρα διαπιστώνουμε ότι έχει επαχθεί LTP, ενώ οι αντίστοιχες τιμές για τα ανήλικα ποντίκια κυμαίνονται σε επίπεδα ≤ 1 (~0.9-1), άρα διαπιστώνεται μια τάση προς LTD (**figure 8**).



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

❖ T-maze

Η δοκιμασία εναλλαγής με καθυστέρηση σε λαβύρινθο T ανήκει στην ευρύτερη ομάδα δοκιμών απόκρισης με καθυστέρηση (delayed response tasks - DR), στα πλαίσια των οποίων ένα στοιχείο-πληροφορία παρουσιάζεται αρχικά στο πειραματόζωο / άτομο, στη συνέχεια απομακρύνεται από το αντιληπτικό του πεδίου για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (καθυστέρηση) και τέλος το ίδιο στοιχείο παρουσιάζεται ξανά σε συνδυασμό με ένα νέο στοιχείο. Το πειραματόζωο καλείται να θυμηθεί ποιο ήταν το στοιχείο που συνάντησε πριν από την καθυστέρηση. Αυτού του είδους οι δοκιμασίες χρησιμοποιούνται κατά κόρον για τη μελέτη της μνήμης εργασίας (Pontecorvo et al., 1996; Rodriguez & Paule, 2009) και η σημασία του προμετωπιαίου φλοιού για την απόδοση στις DR δοκιμές έχει αποκαλυφθεί με τη χρήση τεχνικών ηλεκτροφυσιολογίας και νευροαπεικόνισης, καθώς και με στοχευμένες βλάβες εντός του PFC σε πρωτεύοντα (Goldman-Rakic, 1990). Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο που ακολουθήσαμε στο εργαστήριο κατά την διάρκεια του πειράματος απαιτούσε συγκεκριμένα τη λειτουργία της χωρικής μνήμης εργασίας, ενώ δίνει πληροφορίες και για άλλες πτυχές της λειτουργίας του προμετωπιαίου φλοιού, όπως η αναπροσαρμογή συμπεριφορικής στρατηγικής ανάλογα με τις εκάστοτε συνθήκες. Επίσης, προτιμήθηκε η χρήση αμοιβής, έναντι της απλούστερης δοκιμής αυθόρμητης εναλλαγής (spontaneous alternation task), η οποία στηρίζεται εξ' ολοκλήρου στην φυσική τάση των τρωκτικών να εναλλάσσουν το βραχίονα επιλογής τους, διότι η τελευταία θεωρείται ότι δίνει ασυνεπή και ποικίλα αποτελέσματα (Deacon & Rawlins, 2006). Μάλιστα, κατά τη διάρκεια των πρώτων ημερών του πειράματος, ήταν εμφανής η τάση των ποντικών να επιλέγουν συνεχόμενα τον ίδιο βραχίονα, ίσως επειδή δεν ήταν πλήρως απαλλαγμένα του άγχους και προτιμούσαν την πιο οικεία πλευρά που είχαν επισκεφθεί προηγουμένως. Για τους λόγους αυτούς η πειραματική διαδικασία αμοιβόμενης εναλλαγής με καθυστέρηση, αποτέλεσε το καταλληλότερο εργαλείο για τη μελέτη του επιπέδου ανάπτυξης, στο οποίο έχει φτάσει ο προμετωπιαίος φλοιός σε λειτουργικό επίπεδο κατά την εφηβεία, σε σύγκριση με τον ενήλικο εγκέφαλο.

Όπως είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία, οι αναπτυξιακές μεταβολές που υφίσταται ο προμετωπιαίος φλοιός δεν έχουν ακόμη ολοκληρωθεί πριν το τέλος της εφηβείας και διάφορες χαρακτηριστικές λειτουργίες της περιοχής αυτής, όπως η μνήμη εργασίας, μεταβάλλονται δραματικά σε συνάρτηση με την ηλικία και μέχρι την πλήρη ωρίμανση (Kolb et al., 2012). Η υπόθεση εργασίας στα πλαίσια της δοκιμής T-maze, συνεπώς, ήταν ότι η επίδοση της ομάδας των εφήβων ποντικών θα υστερούσε σε

σύγκριση με αυτή των ενηλίκων. Πράγματι, οι έφηβοι ποντικοί χρειάστηκαν συνολικά περισσότερα sessions για να ολοκληρώσουν τη δοκιμασία με μέσο ποσοστό σωστών επιλογών χαμηλότερο από αυτό των ενηλίκων. Υπάρχουν πολύ λίγες μελέτες που έχουν διερευνήσει τη λειτουργία του PFC, και πιο συγκεκριμένα του mPFC, σε συμπεριφορικό επίπεδο κατά την εφηβεία, και ειδικότερα σε ότι αφορά τα τρωκτικά. Η μοναδική δημοσιευμένη μελέτη που συγκρίνει άμεσα την επίδοση εφήβων και ενηλίκων τρωκτικών και των δύο φύλων στη δοκιμασία εναλλαγής με καθυστέρηση συμφωνεί με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, καθώς η ομάδα των εφήβων σημείωσε προοδευτικά χαμηλότερα ποσοστά σωστών επιλογών καθώς αυξανόταν η διάρκεια της καθυστέρησης (Koss, 2013). Από την άλλη πλευρά, η γενικότερη υστέρηση γνωσιακών λειτουργιών, όπως η λήψη αποφάσεων, η εστίαση της προσοχής και ο ανασταλτικός έλεγχος κατά την απόκριση, στην εφηβεία σε σχέση με το βέλτιστο επίπεδο κατά την ενηλικίωση έχει διαπιστωθεί από πολλές μελέτες σε ανθρώπους, πρωτεύοντα και θηλαστικά (Schenk, 1985; Anderson et al, 2001; van Duijvenvoorde et al., 2010; Burnett et al, 2010; Koss, 2013). Για παράδειγμα, τρωκτικά που βρίσκονται στη φάση της εφηβείας υστερούν σε επίδοση στη δημοφιλή δοκιμή της μνήμης εργασίας Morris water maze έναντι των ενηλίκων (Schenk, 1985). Επιπλέον, στους ανθρώπους η επίδοση σε δοκιμές που εξετάζουν τη μνήμη εργασίας και τον έλεγχο της προσοχής, όπως είναι η ανάμνηση ενός εύρους ψηφίων (digit span) και το CNT (contingency naming task), διαπιστώθηκε ότι βελτιώνεται καθ' όλη τη διάρκεια της εφηβείας (Anderson et al, 2001).

Μια άλλη γνωσιακή ικανότητα που μπορεί να διερευνηθεί με τη δοκιμασία Tmaze είναι η ευκολία στην εναλλαγή μεταξύ συμπεριφορικών στρατηγικών που αποτελεί στην ουσία την αντίθετη κατάσταση της «εμμονής» (preservation). Η διερεύνηση αυτή πραγματοποιείται ποσοτικοποιώντας τη συχνότητα εκτέλεσης αλληπάληλων λανθασμένων επιλογών από τους ποντικούς των δύο ηλικιακών ομάδων. Δεδομένα από νευροχημικές μελέτες αποκαλύπτουν ότι το γλουταματεργικό (διεγερτικό) σύστημα νευροδιαβίβασης έχει ήδη διαμορφωθεί ολοκληρωτικά κατά την προγεννητική και πρώιμη μεταγεννητική περίοδο. Αντίθετα, το GABAεργικό (ανασταλτικό) σύστημα νευροδιαβίβασης, ειδικά στον προμετωπιαίο φλοιό, αναπτύσσεται για πολύ μεγάλο διάστημα, το οποίο περιλαμβάνει και την εφηβική ηλικία, οπότε και υφίσταται σημαντική αναδιαμόρφωση (Li & Xu, 2008). Κλινικές μελέτες σε ανθρώπους που έχουν υποστεί κακώσεις στον πρόσθιο κογχιαίο φλοιό - στον οποίο έχει αποδοθεί σημαίνων ρόλος στον ανασταλτικό έλεγχο - καθώς και ανάλογα πειράματα σε πιθήκους κατέδειξαν ότι αυτού του είδους η βλάβες προκαλούν συμπτώματα αυξημένου παρορμητισμού και ανελαστικότητας στη συμπεριφορά (Rolls et al., 1994; Hornak et al. 1996). Η συμπεριφορική αναστολή λοιπόν, έχει συσχετιστεί με τον έλεγχο της άσκοπης συμπεριφοράς, όπως η κατανίκιση εσωτερικών τάσεων, παρορμήσεων, ενστικτωδών συμπεριφορών και της συναισθηματικής διατήρησης. Βάσει των παραπάνω δεδομένων, η

ομάδα των εφήβων αναμενόταν να εμφανίζει εντονότερη επιμονή σε λάθος επιλογές από αυτή των ενηλίκων. Τα ευρήματα των πειραμάτων που διεξήγαμε επιβεβαίωσαν το αναμενόμενο αποτέλεσμα, εφ' όσον οι έφηβοι ποντικοί εμφάνισαν μια ξεκάθαρα μεγαλύτερη τάση πραγματοποίησης αλληπάλληλων λαθών σε σύγκριση με τα ενήλικα. Τα ευρήματα αντίστοιχης μελέτης εναλλαγής με καθυστέρηση ήταν ανάλογα, αφού και σε αυτή την περίπτωση έφηβοι αρουραίοι πραγματοποίησαν σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό αλληπάλληλων λαθών από τους ενηλίκους (Koss, 2013). Το γεγονός αυτό αντικατοπτρίζει κατά πάσα πιθανότητα την ανωριμότητα του mPFC ή άλλων, συσχετιζόμενων με αυτόν περιοχών, όπως ο βασεοπλευρικός πυρήνας της αμυγδαλής (basolateral nucleus of amygdala – BLN), μια βασική περιοχή επεξεργασίας του φόβου. Ο πυρήνας αυτός υφίσταται, όπως και ο PFC, παρατεταμένη μεταγεννητική ανάπτυξη και μάλιστα μείωση του αριθμού νευρώνων κατά την εφηβεία (Rubinow & Juraska, 2009), ενώ σχηματίζει κύκλωμα πυκνής εννεύρωσης με τον mPFC, το οποίο εμπλέκεται σε διαδικασίες μάθησης (Uylings et al., 2003). Επίσης, γενικότερα η αλληλεπίδραση του προμετωπιαίου φλοιού με την αμυγδαλή παίζουν ρόλο στη ρύθμιση των συναισθημάτων και των αποκρίσεων του φόβου (Ernst & Fudge, 2010). Συνεπώς, ένας παράγων που συνετέλεσε ενδεχομένως στον αυξημένο αριθμό επαναλαμβανόμενων λαθών που πραγματοποίησαν τα έφηβα ποντίκια είναι η έλλειψη μετριασμού των αποκρίσεων φόβου από την ανώριμη αμυγδαλή, που τα ώθησε να επισκέπτονται συνεχόμενα την πιο οικεία πλευρά.

Προτάσεις και μελλοντικοί στόχοι

Παρακάτω θα περιγραφούν ορισμένα σημεία που απαιτούν προσοχή και μπορούν να συμβάλλουν στη βελτίωση της πειραματικής διαδικασίας της εναλλαγής με καθυστέρηση, για την αύξηση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων. Κατά πρώτον, το γεγονός ότι ο αριθμός των sessions που χρειάστηκαν τα ζώα για τη συμπλήρωση κριτηρίου μειωνόταν και το ποσοστό σωστών επιλογών αυξανόταν σταθερά, όσο αυξανόταν η διάρκεια των καθυστερήσεων, υποδεικνύει ότι: Από τη μια πλευρά ο κύριος περιοριστικός παράγων στην επίδοση των ποντικών ήταν η εκμάθηση του μοτίβου εναλλαγής, η οποία έγκειται στη μνήμη αναφοράς, και από την άλλη τα όρια της μνήμης εργασίας στους ποντικούς εκτείνονται πέρα από τη μέγιστη καθυστέρηση των 25 δευτερολέπτων. Παρ'ότι και με το παρών πρωτόκολλο κατέστη εμφανής η υστέρηση της λειτουργίας της μνήμης εργασίας κατά την εφηβεία, η εφαρμογή καθυστερήσεων μεγαλύτερης διάρκειας θα επιτρέψει την αποκάλυψη της πραγματικής έκτασης αυτής της υστέρησης. Ως μέγιστη καθυστέρηση σε πείραμα εναλλαγής με καθυστέρηση σε ποντίκια έχει αναφερθεί το διάστημα των 60 δευτερολέπτων (Shoji et al., 2012), ενώ σε αντίστοιχη μελέτη με αρουραίους αυτό των 90 δευτερολέπτων (Koss, 2013). Ωστόσο, γενικότερα τα διαθέσιμα δεδομένα από

τη βιβλιογραφία, σε ότι αφορά τη διάρκεια των καθυστερήσεων, είναι ποικίλα και αρκετά μεταβλητά, ανάλογα με τις ιδιαίτερες συνθήκες και τους σκοπούς της κάθε μελέτης. Κρίνεται σκόπιμο επομένως να πραγματοποιηθεί μια δοκιμαστική μελέτη, στα πλαίσια της οποίας θα εφαρμοστεί μεγάλο εύρος καθυστερήσεων, ούτως ώστε να βρεθεί το διάστημα εκείνο, κατά το οποίο η επίδοση των ποντικών θα εμφανίσει plateau και σε καθυστερήσεις μεγαλύτερες από το οποίο η επίδοση θα αρχίσει να μειώνεται (ουδός μνήμης εργασίας).

Σχετικά με την εμπλοκή της μνήμης αναφοράς στη διεκπεραίωση της εν λόγω δοκιμασίας, ο [Dudchenko \(2004\)](#) αναφέρει ότι αυτός ο τύπος μνήμης απαιτείται για την αποθήκευση των κανόνων μιας πειραματικής δοκιμής και διαφέρει από τη μνήμη εργασίας στο ότι δεν είναι τόσο ευέλικτη στη σύνδεση ερεθίσματος – απόκρισης και δεν αναπαριστά τη χρονική σειρά των ερεθισμάτων. Ωστόσο, σημειώνει και ότι δεν είναι πάντα εφικτός ο πλήρης διαχωρισμός μεταξύ της χρήσης της μνήμης αναφοράς ή της μνήμης εργασίας, καθώς λειτουργούν και οι δύο τύποι για την ολοκλήρωση μιας δοκιμής. Μια πιθανή λύση στο πρόβλημα αυτό αποτελεί ίσως η προετοιμασία, χωρίς καθυστερήσεις, των πειραματοζώων στο μοτίβο εναλλαγής του βραχίονα που περιέχει αμοιβή (zero delay pre-training), με σκοπό την απομνημόνευση του βασικού κανόνα της εναλλαγής από τα ποντίκια, πριν την εξέταση της επίδοσής τους. Τέτοιου είδους προετοιμασία έχει εφαρμοστεί και σε αντίστοιχη μελέτη, στα πλαίσια της οποίας έλαβαν χώρα 6 sessions των 10 trials χωρίς καθυστερήσεις σε διάστημα 3 ημερών ακολουθώντας το πρωτόκολλο forced alternation ([Koss, 2013](#)). Με αυτόν τον τρόπο η κύρια φάση εκτίμησης της επίδοσης των ποντικών (testing) θα μελετά πιο στοχευμένα τη λειτουργία της μνήμης εργασίας. Επιπλέον, ένας ακόμα περιοριστικός παράγων που παρεμποδίζει την εκμετάλλευση των γνωσιακών ικανοτήτων στο μέγιστο βαθμό και οδηγεί σε φαινομενικά μειωμένη επίδοση είναι το άγχος. Παρ' όλο που τα ποντίκια εξοικειώνονται με το περιβάλλον του λαβυρίνθου T κατά τη φάση του habituation, η κύρια πειραματική διαδικασία δημιουργεί και πάλι νέες συνθήκες, οι οποίες πιθανότατα προξενούν άγχος σε αυτά. Μια ένδειξη που υποστηρίζει την υπόθεση αυτή είναι η θεαματική μείωση του χρόνου επιλογής βραχίονα (choice latency) –που εναλλακτικά θα μπορούσε να θεωρηθεί ως μείωση του χρόνου διστακτικότητας - και για τις δύο ηλικιακές ομάδες, καθώς προχωρούσαν οι μέρες διεξαγωγής της δοκιμασίας, παρά την αύξηση της διάρκειας της καθυστέρησης. Η εισαγωγή της φάσης προετοιμασίας, όπως αυτή αναλύθηκε παραπάνω, θα βοηθούσε ταυτόχρονα και στην καταπολέμηση του άγχους.

Παρά την σαφώς διαπιστωμένη καθυστέρηση της ανάπτυξης του προμετωπιαίου φλοιού και τις εμφανείς ιδιαιτερότητες της συμπεριφοράς κατά την εφηβεία (αυξημένη κοινωνική συναναστροφή, παρορμητικότητα και ριψοκίνδινη συμπεριφορά), οι περιορισμοί της γνωσιακής ικανότητας σε αυτή την

κρίσιμη αναπτυξιακή περίοδο, παραμένουν ένα πεδίο σχετικά ανεξερεύνητο. Για το λόγο αυτό θεωρείται επιτακτική η ανάγκη διαξεγωγής περαιτέρω επιστημονικών μελετών επί του θέματος αυτού.

❖ Ηλεκτροφυσιολογία

Για την περαιτέρω μελέτη της μεταγεννητικής ανάπτυξης του προμετωπιαίου φλοιού, σε επίπεδο ηλεκτροφυσιολογικών ιδιοτήτων και συναπτικής πλαστικότητας των νευρικών του κυττάρων, ακολούθησαν καταγραφές δυναμικών τοπικού πεδίου (LFPs) σε εγκεφαλικές τομές ανηλίκων και ενηλίκων ποντικών. Υπενθυμίζεται ότι οι καταγραφές αυτές πραγματοποιήθηκαν σε τοπικά κυκλώματα της στιβάδας II του προμεταιχμιακού φλοιού (PLC).

Οι καταγραφές δυναμικών τοπικού πεδίου είναι μια σχετικά εύχρηστη μέθοδος, στα πλαίσια της οποίας εξωκυττάρια τοποθετημένα ηλεκτρόδια καταγράφουν τα ηλεκτρικά πεδία που δημιουργούνται από τη διαφορά δυναμικού (V_e) μεταξύ δύο σημείων σε δεδομένο όγκο εγκεφαλικού ιστού, με χρονική ανάλυση κλίμακας υποδιαίρεσεων του χιλιοστού του δευτερολέπτου. Βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής, σε σύγκριση με άλλες τεχνικές διερεύνησης της δραστηριότητας νευρικών κυκλωμάτων, αποτελεί ότι οι αρχές της βιοφυσικής που σχετίζονται με τις μετρήσεις αυτές είναι σε πολύ μεγάλο βαθμό κατανοητές. Αυτό επέτρεψε την ανάπτυξη αξιόπιστων μαθηματικών μοντέλων ποσοτικοποίησης, για την αποσαφήνιση του τρόπου με τον οποίο τα διαμεμβρανικά ρεύματα συνεισφέρουν συλλογικά στα καταγραφόμενα δυναμικά τοπικού πεδίου. Επιπλέον, παρέχει ενδείξεις σε ότι αφορά των τύπο των νευρικών κυκλωμάτων υπό μελέτη (π.χ ανοιχτού ή κλειστού βρόχου) (Freeman, 1972) και τη μελέτη της υποουδικής τους δραστηριότητας, η οποία απαιτείται για τη διερεύνηση μεταβολών της συναπτικής ισχύος (Buzsáki et al, 2012), οποία αποτελεί και το στόχο της παρούσας μελέτης.

Ωστόσο, κατά τις καταγραφές των δυναμικών τοπικού πεδίου ανακύπτει το επονομαζόμενο «αντίστροφο πρόβλημα», το οποίο χαρακτηρίζει μεθόδους που βασίζονται σε μακροσκοπικές μεταβλητές για να εξάγουν συμπεράσματα για τις μικροσκοπικές μεταβλητές. Εν προκειμένω, από πληροφορίες που αφορούν στη σταθμισμένη μέση δραστηριότητα πολυπληθών ομάδων νευρώνων ο ερευνητής καλείται να βγάλει συμπεράσματα για τη δραστηριότητα μεμονωμένων συνάψεων. Το πρόβλημα έγκειται στο ότι το ίδιο μακροσκοπικό σήμα μπορεί να προκύψει από πολλούς διαφορετικούς συνδυασμούς νευρωνικής δραστηριότητας και κατά συνέπεια η διάκριση της συνεισφοράς των διακριτών κυτταρικών διεργασιών καθίσταται δύσκολη (Nunez & Srinivasan, 2006; Buzsáki et al, 2012).

Αρχική φάση του πρωτοκόλλου αποτελούν οι καταγραφές input – output για τη μελέτη των ιδιοτήτων της βασικής συναπτικής απόκρισης σε διεγερτικά σήματα αυξανόμενης έντασης. Διαπιστώθηκε

γραμμική αύξηση των μετασυναπτικών δυναμικών σε συνάρτηση με την ένταση του ερεθισμού και για τις δύο ηλικιακές ομάδες. Οι νευρώνες, ώστόσο, των ανηλικών ποντικών εμφάνισαν μεγαλύτερες συναπτικές αποκρίσεις σε σήματα μέσης έντασης. Το εύρημα αυτό συμφωνεί με το αναμενόμενο αποτέλεσμα, δεδομένης της καθυστερημένης ωρίμανσης του συστήματος GABAεργικής αναστολής, η οποία ολοκληρώνεται προς το τέλος της εφηβείας. Αντίστοιχες ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες σε τρωκτικά διαφορετικών ηλικιακών σταδίων αποκάλυψαν μεταβολές στην ευαισθησία των πυραμιδικών νευρώνων της στιβάδας V του μέσου προμετωπιαίου φλοιού στη διέγερση των υποδοχέων ντοπαμίνης (Tseng & O'Donnell, 2006), αλλά και μια μείωση της προκαλούμενης μετασυναπτικής απόκρισης σε πυραμιδικούς νευρώνες του mPFC κατά τη διάρκεια της εφηβείας (Heng et al., 2011). Η μείωση αυτή συσχετίστηκε, στα πλαίσια της τελευταίας μελέτης, με τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα ενδοκανναβινοειδών CB1, του οποίου η εκπολωτική δράση μεσολαβεί στον μετριασμό της GABAεργικής αναστολής. Σε όλη την έκταση του φλοιού, αλλά κυρίως σε δομές του μεταιχμιακού συστήματος και στον mPFC, τα επίπεδα έκφρασης του CB1 κορυφώνονται κατά τη νεαρή παιδική ηλικία και στη συνέχεια αρχίζουν να ελαττώνονται κατά την εφηβεία. Έτσι η CB1 – μεσολαβούμενη «αναίρεση» της αναστολής είναι πιο εκτεταμένη στα αρχικά μεταγεννητικά αναπτυξιακά στάδια, συντελώντας στη δημιουργία μεγαλύτερης έντασης μετασυναπτικών δυναμικών (EPSPs).

Τα αποτελέσματα που αφορούσαν στην επαγωγή ή μη LTP ύστερα από τετανικό ερεθισμό κατέδειξαν ότι οι νευρώνες στον ενήλικο εγκέφαλο τείνουν προς την έκφραση μακρόχρονης ενδυνάμωσης, ενώ στον ανήλικο τείνουν προς μακρόχρονη αποδυνάμωση της συναπτικής ισχύος. Το θεωρητικό υπόβαθρο που περιγράφει τις αναπτυξιακές μεταβολές που πραγματοποιούνται στον εγκέφαλο συναρτήσει της ηλικίας παρέχει πληθώρα στοιχείων που δικαιολογούν το εύρημα αυτό.

Κατ'αρχάς είναι πλέον γνωστό, ότι ο βαθμός συγχρονισμού της δραστηριότητας στα πλαίσια των νευρικών κυκλωμάτων συνδέεται στενά με τη συναπτική πλαστικότητα, η οποία έχει δύο κατευθύνσεις: η καλά συγχρονισμένη έλευση προσαγωγών εισόδων μπορεί να ωθήσει την έκφραση LTP και να οδηγήσει σε ωρίμανση και σταθεροποίηση των συνάψεων, ενώ η μη συγχρονισμένη δραστηριότητα ενδέχεται να μειώσει τη συναπτική ισχύ μέσω LTD και να αυξήσει τις πιθανότητες για εξάλειψη των συνάψεων (Selemon, 2013). Σε ότι αφορά τον εμπλεκόμενο μηχανισμό φαίνεται ότι ένας ενεργός (έντονα εκπολωμένος) νευρώνας μπορεί να αναγνωρίσει περιπτώσεις συμπίπτουσας προ- και μετασυναπτικής δραστηριότητας, μέσω τοπικής ροής Ca^{2+} από τους NMDA διαύλους της μετασυναπτικής μεμβράνης, καταλήγοντας στην ενδυνάμωση της συναπτικής διαβίβασης (Hebbian LTP) (Bear, 2003). Δεδομένου ότι οι GABAεργικοί διάμεσοι νευρώνες, μεταξύ των οποίων και τα σημαντικά για τη δημιουργία υψηλής συχνότητας γ-ταλαντώσεων εκφράζοντα παρβαλβουμίνη (PV^+ ή FS) κύτταρα,

καθυστερούν να ολοκληρώσουν την ωρίμανσή τους, το αναμενόμενο αποτέλεσμα ήταν η παρατήρηση μεγαλύτερης συναπτικής ενδυνάμωσης στην ομάδα των ενηλίκων συγκριτικά με αυτή των ανηλίκων, το οποίο και επιβεβαιώθηκε πειραματικά.

Ένα ακόμη στοιχείο που ενισχύει την αξιοπιστία της διαπιστωθείσας διαφοράς στη μακρόχρονη συναπτική πλαστικότητα μεταξύ των διαφορετικών ηλικιών αποτελεί το γεγονός ότι οι υποδοχείς AMPA αρχίζουν να ενσωματώνονται με μεγαλύτερο ρυθμό στη μετασυναπτική μεμβράνη κατά την εφηβεία, άρα σε πρωιμότερα στάδια η συγκεντρωσή τους είναι μικρότερη απ' ό,τι κατά την ενηλικίωση (Bossong & Niesink, 2010). Η αυξημένη παρουσία των AMPARs ενισχύει την έκφραση LTP, καθώς ενισχύεται η αποκριτικότητα του μετασυναπτικού κυττάρου στο γλουταμικό οξύ, ενώ αντίθετα η απουσία τους έχει συνδεθεί με την εμφάνιση LTD (Dineley et al., 2001). Μάλιστα, κατά τη διάρκεια του LTP η CaMKII κινάση φωσφορυλιώνει κυτταροπλασματικά αποθέματα υποδοχέων AMPA με αποτέλεσμα την ενσωμάτωσή τους στην κυτταρική μεμβράνη, γεγονός που αναδεικνύει τη σημασία της εξαρτώμενης από AMPA ιοντικής ροής για την επίτευξη μακρόχρονης ενδυνάμωσης. Εν ολίγοις, η εντονότερη παρουσία υποδοχέων AMPA στη μετασυναπτική μεμβράνη στο στάδιο της ενηλικίωσης θέτει το κύτταρο σε μια «LTP – δεκτική» κατάσταση. Τέλος, όπως έχει προαναφερθεί οι βασικές συγκεντρώσεις ντοπαμίνης (DA) και η πυκνότητα των προσαγωγών ντοπαμινεργικών νευρώνων στην περιοχή του PFC κορυφώνονται νωρίς κατά την εφηβεία, σε προεφηβικό δηλαδή στάδιο (που αντιστοιχεί στην περίοδο PD30 –PD35), και ελαττώνονται στη συνέχεια (Bossong & Niesink, 2010). Από τη βιβλιογραφία είναι επίσης γνωστό ότι η διέγερση του D1 υποδοχέα *in vivo* ενεργοποιεί ένα μονοπάτι που προωθεί τη μακρόχρονη ενδυνάμωση. Ωστόσο η υπερδιέγερση του υποδοχέα αυτού έχει ανασταλτική επίδραση στην έκφραση LTP (Otani et al., 1998). Επίσης σε *in vitro* μελέτες οι ντοπαμινεργικές εισοδοί στην περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού έχουν υποστεί τομή και η τοπική συγκέντρωση DA είναι χαμηλότερη από τα σταθερά τονικά επίπεδα που διατηρούνται στον άθικτο εγκέφαλο. Ο υψηλής συχνότητας τετανικός ερεθισμός, ωστόσο, διεγείρει φασική απελευθέρωση της ντοπαμίνης που περιέχεται στις εναπομείνουσες απολήξεις DA νευρώνων, η οποία προωθεί την έκφραση LTD (Kolomiets et al., 2009). Έτσι, αυτό το «σήμα» προώθησης συναπτικής αποδυνάμωσης αναμένεται να είναι εντονότερο στις εγκεφαλικές τομές νεαρών ζώων, δεδομένου ότι οι νευρώνες τους εκφράζουν μεγαλύτερες ποσότητες ντοπαμίνης και D1 υποδοχέων.

Εν τέλει τα αποτελέσματα από τις καταγραφές συζευγμένων παλμών κατέδειξαν ότι η τάση προς βραχύχρονη συναπτική αναστολή (PPD) αυξάνεται όσο αυξάνεται και η συχνότητα των παλμών και στις δύο ηλικιακές ομάδες, αλλά σχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα με την ηλικία. Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγουν και πολυάριθμες ανάλογες μελέτες (Betz, 1970; Metherate & Ashe, 1994; Zucker & Regehr 2002) και ήδη εδώ και χρόνια υπάρχουν μοντέλα που επεξηγούν το μηχανισμό του φαινομένου της

βραχύχρονης αναστολής. Ένα από τα κυρίαρχα μοντέλα είναι αυτό της «εξάντλησης» (depletion model of depression), σύμφωνα με το οποίο ο πρώτος κατά σειρά παλμός προκαλεί απελευθέρωση μεγάλου μέρους (έστω F) συναπτικών κυστιδίων της άμεσα διαθέσιμης δεξαμενής (readily releasable pool – RRP), δηλαδή του συνόλου συναπτικών κυστιδίων που είναι διαθέσιμα αμέσως μετά την έλευση του σήματος στην προσυναπτική απόληξη, οδηγώντας σε μείωση των διαθέσιμων αποθεμάτων του νευροδιαβιβαστή. Η αναστολή που παρατηρείται στην απόκριση ως προς τον δεύτερο παλμό οφείλεται σε αυτή τη μείωση, εφόσον έκκριση μικρότερης ποσότητας νευροδιαβιβαστή συνεπάγεται διέγερση λιγότερων υποδοχέων επί της μετασυναπτικής μεμβράνης. Η έκταση της αναστολής εξαρτάται κατά πρώτον από το διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ των δύο παλμών: όσο βραχύτερο είναι αυτό, τόσο μικρότερο ποσοστό της απελευθερωθείσας ποσότητας F προλαβαίνει να αποκατασταθεί στα αποθέματα της RRP μέχρι την έλευση του δεύτερου παλμού. Κατά δεύτερον εξαρτάται και από την τιμή της ποσότητας F, δηλαδή όσο μεγαλύτερο απόθεμα νευροδιαβιβαστή καταναλώνεται κατά τη διάρκεια της πρώτης απόκρισης, τόσο λιγότερη ποσότητα παραμένει στην RRP προς χρήση κατά τη διάρκεια της δεύτερης απόκρισης και κατ' επέκταση τόσο εντονότερη είναι η παρατηρούμενη αναστολή (Regehr, 2012). Από την ανάλυση καταγραφών εισόδου - εξόδου διαπιστώθηκε ότι οι νευρώνες στον ανήλικό εγκέφαλο αποκρίνονται εντονότερα στο ίδιο ερεθισμό σε σύγκριση με τους ενήλικους νευρώνες, γεγονός το οποίο θα μπορούσε να αποτελέσει ένδειξη ότι η τιμή της ποσότητας F είναι μεγαλύτερη στην περίπτωση των ανώριμων νευρώνων. Βάσει του μοντέλου της «εξάντλησης» επομένως μπορεί να δικαιολογηθεί και η παρατήρηση ότι οι εγκεφαλικές τομές των ανηλικών ζώων εμφανίζουν εντονότερη τάση προς βραχύχρονη συναπτική αναστολή.

Σε ότι αφορά την αλλαγή της βραχύχρονης πλαστικότητας, δηλαδή τη διαφορά στη μεταβολή της συναπτικής ισχύος πριν και μετά τον τετανικό ερεθισμό, διαπιστώθηκε ότι από τη μια πλευρά η βραχύχρονη συναπτική ενδυνάμωση (PPF) ενισχύθηκε ελαφρώς στον ώριμο PFC και από την άλλη πλευρά ότι οι νευρώνες του ανήλικου εγκέφαλου έδειξαν μικρού βαθμού ενίσχυση της συναπτικής αποδυνάμωσης (PPD) μετά τον τετανικό ερεθισμό.

Η ευθύνη για την έκφραση της μακρόχρονης ενδυνάμωσης έχει αποδοθεί σε πολλούς διαφορετικούς μηχανισμούς, τόσο σε μετα- όσο και σε προσυναπτικό επίπεδο. Η μετασυναπτική πλαστικότητα, πολύ περιληπτικά, αφορά σε αλλαγές του αριθμού ή των ιδιοτήτων των υποδοχέων της μετασυναπτικής μεμβράνης, ενώ η προσυναπτική πλαστικότητα σχετίζεται κυρίως με αυξομειώσεις στην ποσότητα ή την πιθανότητα απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστή (Yang & Calakos, 2013). Θεωρείται πιθανό ότι αν στην έκφραση LTP εμπλέκεται κυρίως προσυναπτικός μηχανισμός, θα υφίσταται τροποποιήσεις και μια άλλη μορφή πλαστικότητας που εξαρτάται από προσυναπτικές μεταβολές, όπως είναι η βραχύχρονη

συναπτική ενδυνάμωση (PPF) (Schulz et al., 1994). Έτσι, οι παρατηρήσεις που προέκυψαν από τις καταγραφές συζευγμένων παλμών πριν και μετά την εφαρμογή του τετανικού ερεθισμού, μπορούν να μας οδηγήσουν σε ορισμένα συμπεράσματα για τη φύση του μηχανισμού που μεσολάβησε στην έκφραση LTP/LTD στους νευρώνες του προμετωπιαίου φλοιού. Συγκεκριμένα η πληροφορία που μπορεί να μας δώσει η συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, είναι το κατά πόσο η μακρόχρονη ενδυνάμωση οφείλεται ή όχι σε μεταβολή της ποσότητας F ή της πιθανότητας έκκρισης νευροδιαβιβαστή.

Έστω λοιπόν πως η αρχική μας υπόθεση είναι ότι το LTP στους νευρώνες του προμετωπιαίου φλοιού είναι αποτέλεσμα της αλλαγής στην πιθανότητα έκκρισης (release probability) p . Το παρατηρούμενο PPF στην περίπτωση των ενηλίκων υποδηλώνει ότι η p μειώνεται μετά τον τέτανο, δεδομένου ότι το PPR (paired pulse ratio) σχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα με την p (Zucker & Regehr, 2002). Το παρατηρούμενο LTP αντίθετα αποτελεί ένδειξη αύξησης της p μετά τον τέτανο, όπως έχει δείχθει από μελέτες κβαντικής ανάλυσης (Bekkers & Stevens, 1990). Στην περίπτωση των ανηλίκων έχουμε τις αντίστροφες, επίσης όμως αντικρουόμενες, ενδείξεις: η ενίσχυση της συναπτικής αναστολής (PPD) υποδεικνύει αύξηση της p , ενώ το LTD που παρουσιάστηκε είναι ένδειξη μείωσης της p . Η αρχική μας υπόθεση, επομένως, απορρίπτεται και συμπεραίνουμε ότι η μακρόχρονη ενδυνάμωση σε αυτή την περίπτωση επάγεται κυρίως από άλλους μηχανισμούς, χωρίς ωστόσο να αποκλείεται μια μικρή συμμετοχή και της εν λόγω προσυναπτικής επίδρασης. Αν η εν λόγω προσυναπτική τροποποίηση εμπλέκεται ως δευτερεύων μηχανισμός στην επαγωγή LTP, θα μπορούσε να δικαιολογηθεί το σχετικά μικρό ποσοστό ενδυνάμωσης που παρατηρήθηκε στους νευρώνες του mPFC των ενηλίκων. Το ίδιο ακριβώς σκεπτικό ισχύει και για το μηχανισμό μεταβολής της ποσότητας F που εκκρίνεται ύστερα από τον πρώτο ερεθισμό.

Προτάσεις και μελλοντικοί στόχοι

Ένα σημείο το οποίο θα πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν σε μελλοντικές μελέτες είναι η σημασία της τονικής συγκέντρωσης ντοπαμίνης στο περιβάλλον επώασης των εγκεφαλικών τομών (aCSF). Απουσία τονικής συγκέντρωσης DA κατά την προπαρασκευή των τομών, ο υψηλής συχνότητας τετανικός ερεθισμός - ο οποίος επάγει LTP στον PFC *in vivo* - οδηγεί σε φασική απελευθέρωση της ενδογενούς DA και προωθεί την έκφραση LTD *in vitro*. Έτσι, η προσθήκη background επιπέδων DA (3 $\mu\text{mol/L}$ για 40min) (Goto et al, 2010) στο διάλυμα επώασης μεταστρέφει το LTD σε NMDA - εξαρτώμενο LTP, μέσω διέγερσης του D1 & D2 εξαρτώμενου σηματοδοτικού μονοπατιού και οδηγεί σε μια πιστότερη προσομοίωση των φυσιολογικών ιδιοτήτων πλαστικότητας.

Ακόμη, ενδιαφέρουσες προοπτικές θα είχε ο συνδυασμός των δύο πειραματικών διαδικασιών που αναλύθηκαν, δηλαδή οι καταγραφές των ηλεκτοφυσιολογικών ιδιοτήτων των νευρώνων του PFC σε εγκεφάλους ενηλίκων ζώων που έχουν εκπαιδευτεί στη δοκιμασία Tmaze, σε διαφορετικά ηλικιακά στάδια. Η σύγκριση των ομάδων αυτών μεταξύ τους και με μια ομάδα ελέγχου (naive), θα μπορούσε να οδηγήσει σε χρήσιμα συμπεράσματα για την επίδραση του εμπλουτισμού των αισθητικών εμπειριών και των αυξημένων γνωσιακών απαιτήσεων κατά τη διάρκεια διαφορετικών μεταγεννητικών αναπτυξιακών σταδίων στη λειτουργία του PFC, σε επίπεδο ιδιοτήτων συναπτικής πλαστικότητας. Η προσέγγιση αυτή θα καταστήσει ενδεχομένως εφικτό τον προσδιορισμό των «κρίσιμων περιόδων» κατά τη διάρκεια της παρατεταμένης ωρίμανσης του PFC και θα βοηθούσε στην κάλυψη μικρού μέρους ενός ως τώρα μεγάλου ερευνητικού κενού – τη δύναμη της εμπειρίας πάνω στη διαμόρφωση του αναπτυσσόμενου προμετωπιαίου φλοιού.

Βιβλιογραφία

1. Abel T., Nguyen P., Barad M., Deuel T., Kandel E.R., Bourtchouladze R., Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell*, 1997; 88: 615–626.
2. Allene C., Cattani A., Ackman J.B., Bonifazi P., et al., Sequential generation of two distinct synapse-driven network patterns in developing neocortex. *J. Neurosci*, 2008; 28:12851–12863.
3. Anderson V.A., Anderson P., Northam E., Jacobs R., Catroppa C., Development of executive functions through late childhood and adolescence in an Australian sample. *DevNeuropsychol*, 2001; 20:385-406.
4. Aron A., The Neural Basis of Inhibition in Cognitive Control. *Neuroscientist*, 2007; 13: 214–228.
5. Atallah B.V. & Scanziani M., Instantaneous modulation of gamma oscillation frequency by balancing excitation with inhibition. *Neuron*, 2009; 62:566–577.
6. Baddeley A., Logie R., Bressi S., Della Sala S., Spinnler H., Dementia and working memory. *QJEP*, 1986; 38(4):603-618.
7. Barbas H. & Zikopoulos B., The Prefrontal Cortex and Flexible Behavior. *Neuroscientist*, 2007; 13(5):532–545.
8. Bartho P., Hirase H., Monconduit L., Zugaro M., Harris K.D., Buzsaki G., Characterization of Neocortical Principal Cells and Interneurons by Network Interactions and Extracellular Features. *J Neurophysiol*, 2004; 92:600–608.
9. Bear M.F., Bidirectional synaptic plasticity: from theory to reality. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 2003; 358:648-655.
10. Bédard C., Kröger H. & Destexhe A., Modeling extracellular field potentials and the frequency-filtering properties of extracellular space. *Biophys. J*, 2004; 86: 1829-1842.
11. Bekkers J.M. & Stevens C.F., Presynaptic mechanism for long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 1990; 346:724-728.
12. Ben-Ari Y., Khalilov I., Kahle K.T., Cherubini E., The GABA excitatory/inhibitory shift in brain maturation and neurological disorders. *Neuroscientist*, 2012; 18:467–486.
13. Benarroch E., Neocortical interneurons: Functional diversity and clinical correlations. *Neurology*, 2013; 81(3):273-80.
14. Bernard C., Cossart R., Hirsch J. C., Esclapez M., Ben-Ari Y., What is GABAergic Inhibition? How Is it Modified in Epilepsy? *Epilepsia*, 2000; 41(Suppl. 6): 90-95.
15. Betz W.J., Depression of transmitter release at the neuromuscular junction of the frog. *J Physiol*, 1970; 206:629–644.
16. Björklund, A. & Dunnett S.B., Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends in Neurosciences*, 2007; 30(5):194-202.
17. Blitzer R.D., Connor J.H., Brown G.P., Wong T., Shenolikar S., Iyengar R., Landau E.M., Gating of CaMKII by cAMP-regulated protein phosphatase activity during LTP. *Science*, 1998; 280:1940–1942.
18. Bortone D. & Polleux F., KCC2 expression promotes the termination of cortical interneuron migration in a voltage-sensitive calcium-dependent manner. *Neuron*, 2009; 62:53–71.
19. Bossong M.G. & Niesink R.J.M., Adolescent brain maturation, the endogenous cannabinoid system and the neurobiology of cannabis-induced schizophrenia. *Progress in Neurobiology*, 2010; 92:370–385.
20. Bourgeois J-P. & Rakic P., Changes of synaptic density in the primary visual cortex of the macaque monkey from fetal to adult stage. *J Neurosci*, 1993; 13: 2801–2820.
21. Brummelte S., Witte V. & Teuchert-Noodt G., Postnatal development of GABA and calbindin cells and fibers in the prefrontal cortex and basolateral amygdala of gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Int J Dev Neurosci*, 2007; 25(3):191-200.
22. Bustelo X.R., Sauzeau V. & Berenjeno I.M., GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays*, 2007; 29(4): 356–370.
23. Brunia C. H. M., Haagh S. A. V. M. & Scheirs J. G. M.(1985). Waiting to respond: Electrophysiological measurements in man during preparation for a voluntary movement. In *Motor Behavior* (edited by Heuer H., Kleinbeck U. & Schmidt K.H.) pp. 35–78, New York: Springer.

24. Buzsáki G., Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron*, 2002; 33:325–340.
25. Buzsáki G., Anastassiou C.A. & Koch C., The origin of extracellular fields and currents — EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nature Reviews*, 2012; 13:407-420.
26. Carvalho T.P. & Buonomano D.V., Differential effects of excitatory and inhibitory plasticity on synaptically driven neuronal input-output functions. *Neuron*, 2009; 61:774–785.
27. Casey B.J., Giedd J.N. & Thomas K.M., Structural and functional brain development and its relation to cognitive development. *Biological Psychology*, 2000; 54(1-3):241-257.
28. Cauli B., Audinat E., Lambolez B., et al., Molecular and Physiological Diversity of Cortical Nonpyramidal Cells. *The Journal of Neuroscience*, 1997; 17(10):3894–3906.
29. Chen L., Melendez J., Cambell K., Kuan C.Y., Zheng Y., Rac1 deficiency in the forebrain results in neural progenitor reduction and microcephaly. *Developmental Biology*, 2009; 325:162–170.
30. Connors B.W. & Gutnick M.J., Intrinsic firing pattern of diverse neocortical neurons. *Trends Neurosci*, 1990; 13: 99-104.
31. Crews F., He J., Hodge C., Adolescent cortical development: A critical period of vulnerability for addiction. *Pharmacol Biochem Behav*, 2007; 86: 189–199.
32. Dahl R.E., Adolescent brain development: A period of vulnerabilities and opportunities. *Ann NY Acad Sci*, 2004; 1021:1–22.
33. Dalley, J.W., Cardinal R.N., and Robbins T.W., Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neurosci Biobehav Rev*, 2004; 28(7):771-784.
34. Deacon R.M.J. & Rawlins N.P., T-maze alternation in the rodent. *Nature Protocols*, 2006; 1(1):7-12.
35. DeFelipe J. & Fariñas I., The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog. Neurobiol*, 1992; 39: 563–607.
36. DeFelipe J., Alonso-Nanclares L., Arellano J.I., Microstructure of the neocortex: comparative aspects. *Journal of Neurocytology*, 2003; 31(3-5):299-316.
37. Dégenétais E., Thierry A.M., Glowinski J., Gioanni Y., Electrophysiological properties of pyramidal neurons in the rat prefrontal cortex: an in vivo intracellular recording study. *Cerebral Cortex*, 2002; 1:1-16.
38. Dember W.N. & Richman C.L. (1989), Spontaneous Alternation Behavior. New York: Springer.
39. Desimone R. & Duncan J., Neural mechanisms of selective visual attention. *Annu. Rev. Neurosci*, 1995; 18: 193–222.
40. Doyere V., Burette F., Negro C.R. & Laroche S., Long-term potentiation of hippocampal afferents and efferents to prefrontal cortex: implications for associative learning. *Neuropsychologia*, 1993; 31: 1031–1053.
41. Dudchenko P.A., An overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neurosci and Biobehav Rev*, 2004; 28:699-709.
42. Egorov A.V., Hamam B.N., Fransén E., Hasselmo M.E., Alonso A.A., Graded persistent activity in entorhinal cortex neurons. *Nature*, 2002; 420:173–178.
43. Elston J.N., Cortex, Cognition and the Cell: New Insights into the Pyramidal Neuron and Prefrontal Function. *Cerebral Cortex*, 2003; 13:1124–1138.
44. Ernst M. & Fudge J.L., Adolescence: On the neural path to adulthood (2010). *Young Adult Mental Health J.E*, Grant, M.N. Potenza, eds. Oxford University Press, New York, pp:19-39.
45. Ewald R.C., VanKeuren-Jensen K.R., Aizenman C.D. & Cline H.T., Roles of NR2A and NR2B in the Development of Dendritic ArborMorphology *In Vivo*. *The Journal of Neuroscience*, 2008; 28(4):850–861.
46. Feldmeyer D., Lübke J., Silver R., Sakmann B., Synaptic connections between layer 4 spiny neurons-layer 2/3 pyramidal cell pairs in juvenile rat barrel cortex: physiology and anatomy of interlaminar signaling within a cortical column. *Journal of Physiology*, 2002; 538: 803–822
47. Fogarty M., Grist M., Gelman D., Marín O., Pachnis V., Kessar N., Spatial Genetic Patterning of the Embryonic Neuroepithelium Generates GABAergic Interneuron Diversity in the Adult Cortex. *The Journal of Neuroscience*, 2007; 27(41):10935–10946.

48. Frankland P.W. & Bontempi B., The organization of recent and remote memories. *Nature Rev Neuroscience*, 2005; 6:119-130.
49. Fransén, E. et al., Mechanism of graded persistent cellular activity of entorhinal cortex layer V neurons. *Neuron*, 2006; 49:735–746.
50. Freeman W.J., Linear Analysis of the dynamics of neural masses. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 1972; 1:225-256.
51. Fuster J. M. (1997). *The Prefrontal Cortex—Anatomy, Physiology, and Neuropsychology of the Frontal Lobe*. Philadelphia: Lippincott-Raven
52. Fuster J.M., The Prefrontal Cortex – An Update: Time is of the Essence. *Neuron*, 2001; 30: 319-333.
53. Fuster J.M., Frontal lobe and cognitive development. *Journal of Neurocytology*, 2002; 31: 373-385
54. Fuster J. (2008). *The Prefrontal Cortex* (4th ed.). Oxford, UK: Academic Press – Elsevier
55. Gabbott P.L., Warner T.A., Jays P.R., Salway P., Busby S.J., Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *J Comp Neurol*, 2005; 492:145–177.
56. Gao W., Wang H., Snyder M.A, Li Y., The Unique Properties of the Prefrontal Cortex and Mental Illness. Open Access, 2012; DOI: 10.5772/35868
57. Ge Y., Grossman R.I, Babb J.S., et al., Age-Related Total Gray Matter and White Matter Changes in Normal Adult Brain. Part I: Volumetric MR Imaging Analysis. *Am J Neuroradiol*, 2002; 23:1327–1333.
58. Giedd J.N., Blumenthal J., Jeffries N.E., Castellanos F.X. et al., Brain development during childhood and adolescence: A longitudinal MRI study. *Nature Neurosci*, 1999; 2:861–863.
59. Glantz L.A., Gilmore J.H., Hamer R.M., Lieberman J.A., Jarskog L.F., Synaptophysin and postsynaptic density protein 95 in the human prefrontal cortex from mid-gestation into early adulthood. *Neuroscience*, 2007; 149:582–591.
60. Goldman-Rakic P.S., Cellular Basis of Working Memory. *Neuron*, 1995; 14:477-485.
61. Goldman-Rakic P.S., Cellular and circuit basis of working memory in prefrontal cortex of nonhuman primates. *Prog Brain Res*, 1990; 85:325–336.
62. Goldman-Rakic, P. S., (1987). Circuitry of the prefrontal cortex and the regulation of behavior by representational knowledge. In *Handbook of Physiology* Bethesda, Maryland: American Physiological Society, F. Plum and V. Mountcastle, eds. pp 373-417.
63. González-Burgos G., Krimer L.S., Povysheva N.V., Barrionuevo G., Lewis D.A., Functional Properties of Fast Spiking Interneurons and Their Synaptic Connections With Pyramidal Cells in Primate Dorsolateral Prefrontal Cortex. *J Neurophysiol*, 2005; 93: 942–953.
64. González-Burgos G., Kröner S., Zaitsev A.V., Povysheva N.V., Krimer L.S., Barrionuevo G., Lewis D.A., Functional maturation of excitatory synapses in layer 3 pyramidal neurons during postnatal development of the primate prefrontal cortex. *Cereb Cortex*, 2008; 18: 626-637.
65. Goto Y., Yang C.R. & Otani S., Functional and Dysfunctional Synaptic Plasticity in Prefrontal Cortex: Roles in Psychiatric disorders. *Biol Psychiatry*, 2010; 67:199-207.
66. Gourley S.L., Olevska A., Sloan Warren M., Taylor J.R., Koleske A.J., Arg kinase regulates prefrontal dendritic spine refinement and cocaine-induced plasticity. *J Neurosci*, 2012;32: 2314–2323.
67. Gupta, A., Wang, Y. & Markram, H., Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons and synapses in the neocortex. *Science*, 2000; 287:273–278.
68. Hardingham G.E. & Bading H., The Yin and Yang of NMDA receptor signaling. *TRENDS in Neurosciences*, 2003; 26(2):81-89.
69. Harnishfeger K. (1995). Development of cognitive inhibition. In: Dempster F., Brainerd C., editors. *Interference and inhibition in cognition*. San Diego: Academic. P. 175–204.
70. Hashimoto T., Volk D.W. & Lewis D., GABA Neurons in the Human Prefrontal Cortex. *Am J Psychiatry*, 2004; 161:10?
71. Heidebreder C.A & Grönwegen H.J., The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2003; 27:555–579.

72. Heng L., Beverley J.A., Steiner H., Tseng K.Y., Differential developmental trajectories for CB1 cannabinoid receptor expression in limbic/associative and sensorimotor cortical areas. *Synapse*, 2011; 65:278–286.
73. Hikosaka, O et al., Role of the basal ganglia in the control of purposive saccadic eye movements. *Physiol. Rev*, 2000; 80:953–978.
74. Hornak J., Rolls E.T. & Wade D., Face and voice expression identification in patients with emotional and behavioural changes following ventral frontal lobe damage. *Neuropsychologia*, 1996; 34: 247-261.
75. Huang Y-Y., Simpson E., Kellendonk C., Kandel E.R., Genetic evidence for the bidirectional modulation of synaptic plasticity in the prefrontal cortex by D1 receptors. *PNAS*, 2004; 101(9):3236 –3241.
76. Hussar C. & Pasternak T., Flexibility of sensory representations in prefrontal cortex depends on cell type. *Neuron*, 2009; 64(5):730–743.
77. Huttenlocher P.R., Synaptic density in human frontal cortex—developmental changes and effects of aging. *Brain Res*, 1979; 163:195–205.
78. Huttenlocher P.R. & Dabholkar A.S., Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex. *J Comp Neurol*, 1997; 387:167–178.
79. Isaac J.T., Postsynaptic silent synapses: evidence and mechanisms. *Neuropharmacology*, 2003; 45:450–460.
80. Isaacson J.S. & Scanziani M., How Inhibition Shapes Cortical Activity. *Neuron*, 2011; 72:231-243.
81. Jay T.M., Burette F., & Laroche S., Plasticity of the hippocampal-prefrontal cortex synapses. *J Physiol*, 1996; 90: 361–366.
82. Jay T.M., Dopamine: a potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanisms. *Progress in Neurobiology*, 2003; 69:375–390.
83. Kamondi A., Acsady L., Wang X. J., Buzsaki G., Theta oscillations in somata and dendrites of hippocampal pyramidal cells in vivo: activity-dependent phase-precession of action potentials. *Hippocampus*, 1998; 8:244–261.
84. Kandel E.R., Schwartz J.H. & Jessel T.M. (2000). Principles of Neural Science (4th ed.). Columbia (USA): McGraw – Hill.
85. Katzner S., Nauhaus I., Benucci A., Bonin V., Ringach D.L., Carandini M., Local origin of field potentials in visual cortex. *Neuron*, 2009; 61(1): 35–41.
86. Kawaguchi Y., Physiological Subgroups of Non-pyramidal Cells with Specific Morphological Characteristics in Layer II/III of Rat Frontal Cortex. *The Journal of Neuroscience*, 1995; 15(4): 2638-2655.
87. Kilb W., Kirischuk S. & Luhmann H. J., Electrical activity patterns and the functional maturation of the neocortex. *European Journal of Neuroscience*, 2011; 34:1677–1686.
88. Kolb B., Mychasiuk R., et al., Experience and the developing prefrontal cortex. *PNAS Early Edition*, 2012;
89. Kolomiets B., Marzo A., Caboche J., Vanhoutte P., Otani S., Background dopamine concentration dependently facilitates long-term potentiation in rat prefrontal cortex through postsynaptic activation of extracellular signal-regulated kinases. *Cereb Cortex*, 2009; doi:10.1093/cercor/bhp047
90. Koss W.A., Development of the adolescent prefrontal cortex and basolateral amygdala and the effects of puberty and alcohol exposure. 2013, Graduate College of the University of Illinois at Urbana-Champaign
91. Kubota Y., Hattori R. & Yui Y., Three distinct subpopulations of GABAergic neurons in rat frontal agranular cortex. *Brain Res*, 1994; 649:159 –173.
92. Lakatos P., Shah A.S., Knuth K.H., Ulbert I., Karmos G., Schröder C.E., (2005) An oscillatory hierarchy controlling neuronal excitability and stimulus processing in the auditory cortex. *J Neurophysiol*, 2005; 94:1904-1911.
93. Laroche S., Davis S. & Jay T.M., Plasticity at hippocampal to prefrontal cortex synapses: dual roles in working memory and consolidation. *Hippocampus*, 2000; 10: 438–446.
94. Le Magueresse C. & Monyer H., GABAergic Interneurons Shape the Functional Maturation of the Cortex. *Neuron*, 2013; 77:388-405.
95. Leinekugel X., Khazipov R., Cannon R., Hirase H., Ben-Ari Y., Buzsáki G., Correlated bursts of activity in the neonatal hippocampus in vivo. *Science*, 2002; 296:2049–2052.

96. Lewis D.A., Hashimoto T. & Volk D.W., Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci.*, 2005; 6:312–324.
97. Logothetis N. K. & Wandell B. A., Interpreting the BOLD signal. *Annu. Rev. Physiol*, 2004; 66: 735–769.
98. Lynch M.A., Long-Term Potentiation and Memory. *Physiol Rev*, 2004; 84: 87–136.
99. Markram H., Toledo-Rodriguez M., Wang Y., Gupta A., Silberberg G., Wu C., Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nature Reviews Neuroscience*, 2004; 5: 793-807.
100. Mason A. & Larkman A., Correlation between morphology and electrophysiology of pyramidal neurons in slices of rat visual cortex. II. Electrophysiology. *J Neurosci*, 1990; 10:1415-1428.
101. Matsuda Y., Marzo A. & Otani S., The presence of background dopamine signal converts long-term synaptic depression to potentiation in rat prefrontal cortex. *J Neurosci.*, 2006; 26:4803–4810.
102. Maviel T., Durkin T. P., Menzaghi F., Bontempi B., Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. *Science*, 2004; 305:96–99.
103. Mazzone A., Panzeri S., Logothetis N.K., Brunel N., Encoding of naturalistic stimuli by local field potential spectra in networks of excitatory and inhibitory neurons. *PLoS Comput Biol*, 2008; 4:e1000239
104. McCormick D.A., Connors B.W., Lighthall J.W., Prince D.A., Comparative electrophysiology of pyramidal and sparsely spiny stellate neurons of the neocortex. *J. Neurophysiol*, 1985; 54:782-806.
105. Metherate R. & Ashe J.H., GABAergic suppression prevents the appearance and subsequent fatigue of an NMDA receptor-mediated potential in neocortex. *Brain Res*, 1995; 699(2):221-230.
106. Miller E., The prefrontal cortex and cognitive control. *Nature Reviews Neuroscience*, 2000; 1:59-65.
107. Miller E. & Cohen J., An integrative theory of the prefrontal cortex function. *Annu. Rev. Neurosci.*, 2001; 24:167–202.
108. Mohajerani M.H., Sivakumaran S., Zacchi P., Aguilera P., Cherubini E., Correlated network activity enhances synaptic efficacy via BDNF and the ERK pathway at immature CA3 CA1 connections in the hippocampus. *PNAS*, 2007; 104: 13176–13181.
109. Morgan M.A., Schulkin J. & LeDoux J.E., Ventral medial prefrontal cortex and emotional perseveration: The memory for prior extinction training. *Behav Brain Res*, 2003; 146:121–130.
110. Munakata Y., Herd S.A., Chatham C.H., Depue B.E., Banich M.T., O'Reilly R.C., A unified framework for inhibitory control. *Trends in Cognitive Sciences*, 2011; 15(10):453-459.
111. Nakazawa K., Zsiros V., Jiang Z., Nakao K., et al., GABAergic interneuron origin of schizophrenia pathophysiology. *Neuropharmacology*, 2011; doi:10.1016/j.neuropharm.2011.01.022
112. Niedermeyer E. & Lopes da Silva F. -editors (1998), *Electroencephalography* (4th ed.). Baltimore, MD : Williams and Wilkins
113. Niki H. & Watanabe M., Prefrontal and cingulate unit activity during timing behavior in the monkey. *Brain Research*, 1979; 171: 213–224.
114. Nunez P. & Srinivasan R. (2006), *Electric Fields Of The Brain*(2nd ed.). Oxford Univ. Press
115. O'Donnell P., Adolescent onset of cortical disinhibition in schizophrenia: Insights from animal models. *Schizophr bull*, 2011; 37:484–492.
116. Otani S., Blond O., Desce J.M., Crepel F., Dopamine facilitates long-term depression of glutamatergic transmission in rat prefrontal cortex. *Neuroscience*, 1998; 85:669–676.
117. Parri M. & Chiarugi P., Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. *Cell Communication and Signaling*, 2010; 8:23
118. Passetti F., Chudasama Y. & Robbins T.W., The frontal Cortex of the rat and visual attentional performance: Dissociable functions of distinct medial prefrontal subregions. *Cerebral Cortex*, 2002; 12:1254-1268.
119. Petrides M., Lateral prefrontal cortex: architectonic and functional organization. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 2005; 360:781–795.
120. Quintan J. & Fuster J. M., From perception to action: Temporal integrative functions of prefrontal and parietal neurons. *Cerebral Cortex*, 1999; 9: 213–221.

121. Quirk G.J., Likhtik E., Pelletier J.G., Paré D., Stimulation of medial prefrontal cortex decreases the responsiveness of central amygdala output neurons. *J Neurosci*, 2003; 23:8800–8807.
122. Ramón y Cajal S., Nuevo concepto de la histología de los centros nerviosos. *Rev Cienc Méd Barcelona*, 1893; 18:21–40.
123. Ray S. & Maunsell J.H., Differences in gamma frequencies across visual cortex restrict their possible use in computation. *Neuron*, 2010; 67:885-896.
124. Recabarren M.P., Valdés J.L., Farías P., Serón-Ferré M., Torrealba F., Differential effects of infralimbic cortical lesions on temperature and locomotor activity responses to feeding in rats. *Neuroscience*, 2005; 134(4):1413-1422.
125. Regehr W.G., Short-Term Presynaptic Plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012; 4:a005702.
126. Ridderinkhof R.K., van den Wildenberg W.P.M., Segalowitz S.J., Carter C.S., Neurocognitive mechanisms of cognitive control: The role of prefrontal cortex in action selection, response inhibition, performance monitoring, and reward-based learning. *Brain and Cognition*, 2004; 56:129–56140.
127. Rivera C., Voipio J., Payne J.A., Ruusuvuori E., et al., The K^+/Cl^- co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature*, 1999; 397:251–255.
128. Robbins, T.W., Chemical neuromodulation of frontal-executive functions in humans and other animals. *Exp Brain Res*, 2000; 133(1):130-138.
129. Rodriguez J.S & Paule M.G., (2009). *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. (2nd ed.) Boca Raton (FL): CRC Press; Buccafusco JJ, editor
130. Rolls E.T., Hornak J., Wade D., McGrath J., Emotional – related learning in patients with social and emotional changes associated with frontal lobe damage. *J Neurol Neurosurg Psychiat*, 1994; 57:1518-1524.
131. Rosenkranz J.A., Moore H., Grace A.A., The prefrontal cortex regulates lateral amygdala neuronal plasticity and responses to previously conditioned stimuli. *J Neurosci*, 2003; 23:11054–11064.
132. Rubinow M.J. & Juraska J.M., Neuron and glia numbers in the basolateral nucleus of the amygdala from preweaning through old age in male and female rats: A stereological study. *J Comp Neurol*, 2009; 512:717-725.
133. Salami M., Itami C., Tsumoto T., Kimura F., Change of conduction velocity by regional myelination yields constant latency irrespective of distance between thalamus and cortex. *PNAS*, 2003; 100:6174–6179.
134. Schenk, F., Development of place navigation in rats from weaning to puberty. *Behav Neural Biol*, 1985; 43:69-85.
135. Schulz P.E, Cook E.P. & Johnston D., Changes in Paired-Pulse Facilitation Suggest Presynaptic Involvement in Long-Term Potentiation. *The Journal of Neuroscience*, 1994; 14:5325-5337.
136. Seamans J.K., Floresco S.B. & Phillips A.G., D1 receptor modulation of hippocampal-prefrontal cortical circuits integrating spatial memory with executive functions in the rat. *J. Neurosci.*, 1998; 18:1613–1621.
137. Seifter J.L., Acid-Base Disturbances and the Central Nervous System. *Nephrology rounds*, 2005; Vol. 3 Issue 1
138. Selemon L.D., A role for synaptic plasticity in the adolescent development of executive function. *Transl Psychiatry*, 2013; 3:e238.
139. Senkowski D., Gomez-Ramirez M., Lakatos P., Wylie G.R., Molholm S., Schröder C.E., Foxe J.J., Multisensory processing and oscillatory activity: analyzing non-linear electrophysiological measures in humans and simians. *Exp Brain Res*, 2007; 177:184-195.
140. Shoji H., Hagihara H., Takao K., Hattori S., Miyakawa T., T-maze forced alternation and Left-Right Discrimination Tasks for Assessing Working and Reference Memory in Mice. *Jove*, 2012; 60:e3300.
141. Sidiropoulou K. & Poirazi P., Predictive Features of Persistent Activity Emergence in Regular Spiking and Intrinsic Bursting Model Neurons. *PLoS Computational Biology*, 2012; 8(4):1-15.
142. Sisk C.L. & Foster D.L., The neural basis of puberty and adolescence. *Nat Neurosci*, 2004; 7(10): 1040-1047.
143. Snyder G.L., Fienberg A.A., Haganir R.L., Greengard P., A dopamine/D1 receptor/protein kinase A/dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein (Mr 32 kDa)/protein phosphatase-1 pathway regulates dephosphorylation of the NMDA receptor. *J. Neurosci.*, 1998; 18: 10297–10303.

144. Sohal V.S., Zhang F., Yizhar O., Deisseroth K., Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature*, 2009; 459:698-702.
145. Sotres-Bayon F., Cain C. K. & LeDoux D.E., Brain Mechanisms of Fear Extinction: Historical Perspectives on the Contribution of Prefrontal Cortex. *Biological Psychiatry*, 2006; 60:329–336.
146. Spruston N., Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nature Reviews Neuroscience*, 2008; 206-221.
147. Steketee J.D., Neurotransmitter systems of the medial prefrontal cortex: potential role in sensitization to psychostimulants. *Brain Res Brain Res Rev*, 2003; 41(2-3):203-228.
148. Sturman D. & Moghaddam B., Reduced neuronal inhibition and coordination of adolescent prefrontal cortex during motivated behavior. *J Neurosci*, 2011; 31(4): 1471–1478.
149. Sun X., Zhao Y. & Wolf M.E., Dopamine receptor stimulation modulates AMPA receptor synaptic insertion in prefrontal cortex neurons. *J Neurosci*, 2005; 25:7342–7351.
150. Swanson, L.W. (1998). *Brain Maps: Structure of the Rat Brain* (2nd ed.). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier
151. Teixeira C., Pomedli S.R., Maei H.R., Kee N., Frankland P., Involvement of the Anterior Cingulate Cortex in the Expression of Remote Spatial Memory. *The Journal of Neuroscience*, 2006; 26(29):7555–7564.
152. Tseng K.Y. & O'Donnell P. Dopamine modulation of prefrontal cortical interneurons changes during adolescence. *Cereb Cortex*, 2006; 17:1235–1240.
153. Tseng K.Y. & O'Donnell P., D2 dopamine receptors recruit a GABA component for their attenuation of excitatory synaptic transmission in the adult rat prefrontal cortex. *Synapse*, 2007; 61:843–850.
154. Tsujimoto S., The Prefrontal Cortex: Functional Neural Development During Early Childhood. *The Neuroscientist*, 2008; 14(4):345–358.
155. Uhlhaas P.J., Häscher C., Nikolić D. & Singer W., The Role of Oscillations and Synchrony in Cortical Networks and Their Putative Relevance for the Pathophysiology of Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 2008; 34(5):927–943.
156. Uylings H., Grönweg H.J., Kolb B., Do rats have a prefrontal cortex? *Behavioural Brain Research*, 2003; 146:3–17.
157. Velazquez J.L. & Carlen P.L., Synchronization of GABAergic inter-neuronal networks during seizure-like activity in the rat horizontal hippocampal slice. *Eur J Neurosci*, 1999; 11:4110-4118.
158. Vertes R., Differential Projections of the Infralimbic and Prelimbic Cortex in the Rat. *Synapse*, 2004; 51:32–58.
159. Vidaki M., Tivodar S., Doulgieraki K., Tybulewicz V., Kessaris N., Pachnis V., Karagogeos D., Rac1-dependent cell cycle exit of MGE precursors and GABAergic interneuron migration to the cortex. *Cereb Cortex*, 2011; 22(3):680-692.
160. Wang X-J., Synaptic basis of cortical persistent activity: the importance of NMDA receptors to working memory. *J Neurosci*, 1999; 19(21): 9587-9603.
161. Wang H., Stradtman G.G., Wang X-J. & Gao W-J., A specialized NMDA receptor function in layer 5 recurrent microcircuitry of the adult rat prefrontal cortex. *PNAS*, 2008; 105(43):16791–16796.
162. Wang H-X. & Gao W-J., Cell-type Specific Development of NMDA Receptors in the Interneurons of Rat Prefrontal Cortex. *Neuropsychopharmacology*, 2009; 34(8):2028–2040.
163. Wang D.D. & Kriegstein A.R., Blocking early GABA depolarization with bumetanide results in permanent alterations in cortical circuits and sensorimotor gating deficits. *Cereb. Cortex*, 2011; 21:574–587.
164. Wilson F.A., O'Scalaidhe S.P., Goldman-Rakic P.S. Functional synergism between putative gamma-aminobutyrate-containing neurons and pyramidal neurons in prefrontal cortex. *PNAS*, 1994; 91:4009–4013.
165. Yang Y. & Calakos N., Presynaptic long-term plasticity. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 2013; 5(8):1-22.
166. Yoon T., Okada J., Jung M.W. & Kim J.J., Prefrontal cortex and hippocampus subserve different components of working memory in rats. *Learning & Memory*, 2008; 15(3): 97–105.
167. Zucker R.S. & Regehr W.G., Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol*, 2002; 64:355 – 405.