



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΙΤΛΟΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

**ΠΡΟΜΕΤΩΠΙΑΙΟΣ ΦΛΟΙΟΣ: ΝΕΥΡΩΝΕΣ ΚΑΙ Η ΑΥΘΟΡΜΗΤΗ
ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥΣ (UP&DOWN STATES)**

Γκιουλτέν ΙΧΤΙΑΡ ΣΑΛΗ

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

Κυριακή ΣΙΔΗΡΟΠΟΥΛΟΥ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2012

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	4
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	13
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	18
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ/ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	27
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	29

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο φλοιός του εγκεφάλου χαρακτηρίζεται από δισεκατομμύρια περίπλοκης μορφολογίας και λειτουργίας νευρώνες οι οποίοι ανάλογα την περιοχή στην οποία βρίσκονται αποκρίνονται με συγκεκριμένο τρόπο στα ερεθίσματα που δέχονται. Η οργάνωση τους στο φλοιό καθώς και η συνδεσμολογία τους με γειτονικούς αλλά και απομακρυσμένους νευρώνες δηλώνει την περίπλοκη λειτουργία τους. Ένα από τα αξιοθαύμαστα γεγονότα που λαμβάνουν χώρα στον εγκέφαλο, είναι και η αυθόρμητη δραστηριότητα των νευρώνων. Αν και παραμένουν αναπάντητα ερωτήματα γύρω από την ύπαρξη και δημιουργία αυτής της αυθόρμητης δραστηριότητας, ωστόσο προτείνονται διάφοροι μηχανισμοί για τη δημιουργία τους, καθώς και οι περιοχές εμφάνισης τους. Ο προμετωπιαίος φλοιός είναι μια από τις περιοχές όπου παρατηρείται αυτή η αυθόρμητη δραστηριότητα, κυρίως δε στα πλαίσια της μνήμης εργασίας η οποία χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη της παραμένουσας δραστηριότητας κατά τη διαδικασία της «απομνημόνευσης» για μικρό χρονικό διάστημα των λαμβανόμενων πληροφοριών. Η παρούσα εργασία εστιάστηκε κυρίως στη μελέτη των up and down states που αποτελούν ένα είδος αυθόρμητης δραστηριότητας των νευρώνων του προμετωπιαίου φλοιού, δίνοντας βάση κυρίως στη στοιβάδα II της υποπεριοχής prelimbic του εν λόγω φλοιού όπου παρατηρούνται ευκολότερα αυτές οι δύο φάσεις.

Λέξεις-Κλειδιά: προμετωπιαίος φλοιός, πυραμιδικοί νευρώνες, ενδονευρώνες, αυθόρμητη δραστηριότητα, up and down states, acsf.

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

2.1. ΝΕΥΡΩΝΕΣ ΤΟΥ ΦΛΟΙΟΥ

2.1.1. ΓΕΝΙΚΑ

Όλες οι κρίσιμες λειτουργίες του εγκεφάλου που έχουν σχέση με τη μετάδοση σημάτων -η επεξεργασία αισθητικών πληροφοριών, ο προγραμματισμός κινητικών και συναισθηματικών αποκρίσεων, η μνήμη και η μάθηση- πραγματοποιούνται από διασυνδεδεμένα και αλληλοεπηρεαζόμενα σύνολα νευρώνων. Υπάρχουν πολλών ειδών νευρώνες ανάλογα την περιοχή στην οποία βρίσκονται στον εγκεφαλικό φλοιό, διαφοροποιημένοι με τέτοιο τρόπο ώστε να αποκρίνονται στις ανάγκες του περιβάλλον χώρου. Ωστόσο, βάσει των ανακαλύψεων από νευροανατόμους, πιστεύεται ότι, το μοναδικό χαρακτηριστικό που διαφοροποιεί έναν νευρώνα από κάποιον άλλον είναι το σχήμα του και ειδικότερα, ο αριθμός και η μορφή των αποφυάδων του.

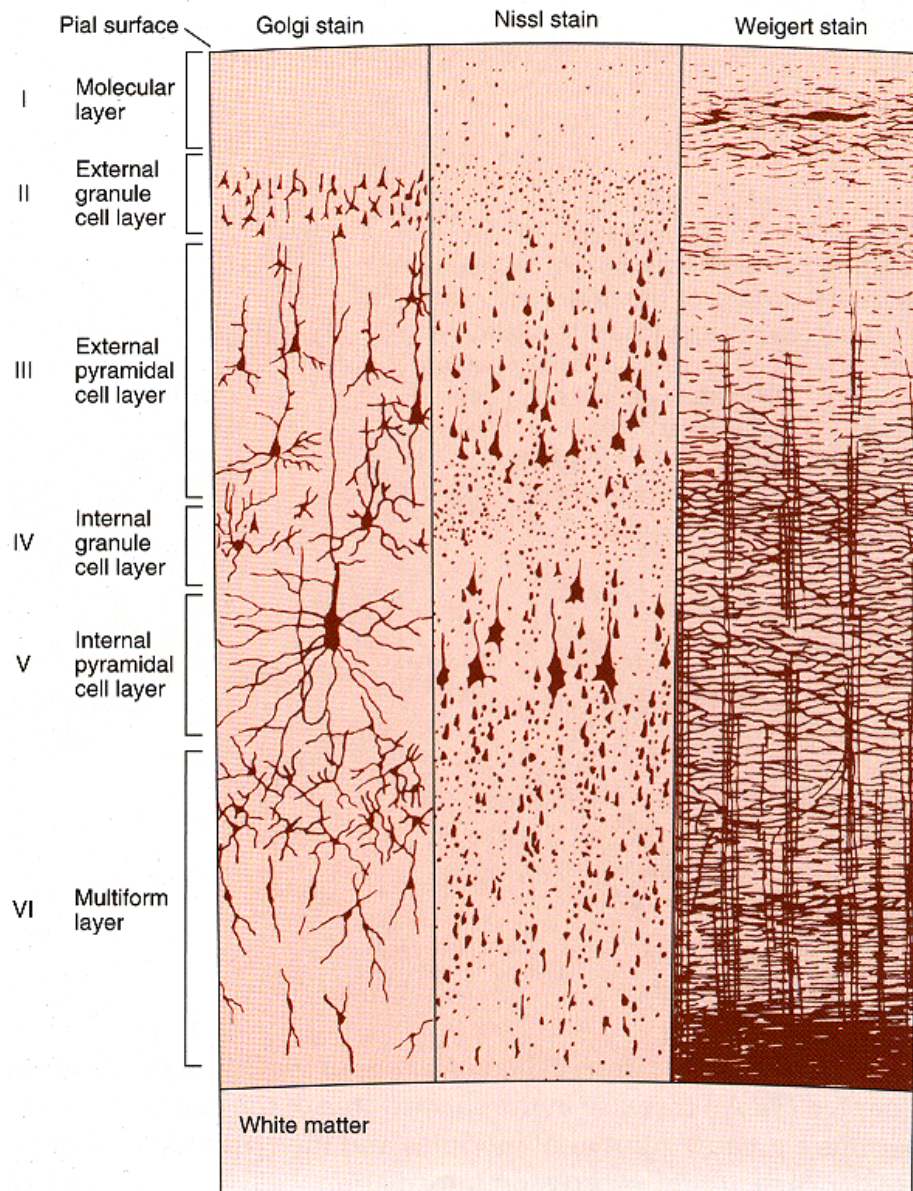
Είναι εντυπωσιακό το γεγονός ότι, οι νευρώνες δεν κατανέμονται στον νεοφλοιό με τυχαίο τρόπο, αλλά βρίσκονται οργανωμένοι σε στοιβάδες (στοιβάδες I-VI) (Εικ.1) οι οποίες συνδέονται με διαφορετικές φλοιικές και υποφλοιικές περιοχές (DeFelipe and Farinas, 1992). Στα τρωκτικά, μια νεοφλοιική κολώνα διαμέτρου 0,3 mm περιέχει περίπου 7300 νευρώνες (100 νευρώνες στην στοιβάδα I, 2150 στην στοιβάδα II/III, 1500 στην στοιβάδα IV, 1250 στην στοιβάδα V και 2500 στην στοιβάδα VI) (Beaulieu, 1993; Ren et al., 1992).

Οι περισσότεροι νεοφλοιικοί νευρώνες (70-80%) είναι διεγερτικοί πυραμιδικοί νευρώνες (DeFelipe and Farinas, 1992; Peters and Jones, 1984; Peters and Sethares, 1991), οι οποίοι έχουν στερεότυπες ανατομικές, φυσιολογικές και μοριακές ιδιότητες (DeFelipe and Farinas, 1992). Το υπόλοιπο 20-30% των νεοφλοιικών νευρώνων είναι ενδονευρώνες, κυρίως ανασταλτικοί, οι οποίοι εμφανίζουν ποικιλομορφία ως προς τα μορφολογικά, φυσιολογικά, μοριακά και συναπτικά χαρακτηριστικά τους (Peters and Jones, 1984; DeFelipe, 1993; DeFelipe, 2002; Gupta et al., 2000; Thomson and Deuchars, 1994).

2.1.2. ΠΥΡΑΜΙΔΙΚΟΙ ΝΕΥΡΩΝΕΣ

Τα πυραμιδοειδή κύτταρα, που βρίσκονται στον ιππόκαμπο και σε όλη την έκταση του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων, έχουν περίπου τριγωνικό κυτταρικό σώμα και οι δενδρίτες τους προεκβάλλουν από την κορυφή (κορυφαίοι δενδρίτες) και από την βάση (βασικοί δενδρίτες).

Οι πυραμιδικοί νευρώνες είναι τα κύτταρα-προβολής του νεοφλοιού, δηλαδή είναι νευρώνες «εξόδου» αφού είναι τα μόνα κύτταρα που μεταδίδουν τα λαμβανόμενα σήματα έξω από τη τοπική περίγυρο σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου (Wells, 2005). Με εξαίρεση τις προεκτάσεις που κάνουν διαμέσου της λευκής ουσίας, η ακτίνα προβολής των νευρώνων αυτών είναι αρκετά περιορισμένη σε έκταση. Στο νεοφλοιό μυών, το 90% των συνολικών πυραμιδικών κυττάρων δεν κάνουν συνάψεις με νευρώνες πέραν της απόστασης των 0,2-0,3 mm, και μόνο το 9% αυτών κάνουν απλές (single) συναπτικές συνδέσεις σε αυτό το εύρος (Schüz, 2003), το οποίο θέτει ένα κατά προσέγγιση πλευρικό εύρος του μεγέθους της λειτουργικής κολώνας.



Πηγή: Richard B. Wells. Cortical Neurons and Circuits. April, 2005.

Εικόνα 1. Στοιβάδες του νεοφλοιού όπως φαίνονται μετά από διαφορετικές τεχνικές χρώσεις. [Golgi stain (αριστερά) αποκαλύπτει τα νευρωνικά σώματα και τους δενδρίτες, Nissl stain (κέντρο) κυρίως τα κυτταρικά σώματα, και Weigert stain (δεξιά) αποκαλύπτει το πρότυπο αξονικής κατανομής]. Η μοριακή στοιβάδα (στοιβάδα I) περιλαμβάνει λίγους νευρώνες, οι οποίοι είναι ανασταλτικοί ενδονευρώνες, ενώ παρατηρούνται δενδρίτες και νευράξονες πυραμιδικών νευρώνων βαθύτερων στρωμάτων. Η εξωτερική κοκκώδη στοιβάδα (στοιβάδα II) περιλαμβάνει μικρούς πυραμιδικούς νευρώνες και μερικούς ενδονευρώνες, και τους κορυφαίους δενδρίτες νευρώνων, των οποίων τα σώματα βρίσκονται στις στοιβάδες V και VI. Στη στοιβάδα III βρίσκονται ποικιλία νευρώνων, η πλειοψηφία των οποίων είναι μικροί πυραμιδικοί νευρώνες. Η στοιβάδα IV είναι η αποκλειστική τοποθεσία των ακανθωδών αστεροειδών κυττάρων (μικρά διεγερτικά κύτταρα) ενώ περιλαμβάνει και ποικιλία ενδονευρώνων. Επίσης, η στοιβάδα αυτή είναι ο κυριότερος προορισμός των επερχόμενων από τον θάλαμο στον φλοιό σημάτων. Η στοιβάδα V αποτελείται κυρίως από μεγάλα πυραμιδικά κύτταρα των οποίων οι αξονικές προεκτάσεις φτάνουν στα βασικά γάγγλια, εγκεφαλικό στέλεχος και νωτιαίο μυελό, και έναν μικρό πληθυσμό ενδονευρώνων. Chandelier νευρώνες και πιθανόν οι άξονες και οι βασικοί δενδρίτες μη ακανθωδών διπολικών κυττάρων βρίσκονται επίσης στη στοιβάδα αυτή. Η ετερογενής στοιβάδα VI φιλοξενεί κυρίως μεγάλα πυραμιδικά κύτταρα, των οποίων οι άξονες καταφτάνουν πίσω στο θάλαμο, και ένα είδος ενδονευρώνων (Martinotti cells). Μετά την στοιβάδα IV, αυτή είναι ο επόμενος κύριος στόχος σημάτων από τον θάλαμο.

Κάθε πυραμιδικός νευρώνας λαμβάνει περίπου 10.000 συνάψεις, από τις οποίες περίπου τα 2/3 με 3/4 είναι διεγερτικές (White, 1989; Abeles, 1991; Braitenburg and Shuz, 1998). Το γεγονός ότι οι συνδέσεις μεταξύ δύο οποιοδήποτε πυραμιδικών νευρώνων περιλαμβάνουν μικρό αριθμό συνάψεων (<5), υποδεικνύει ότι, ο κάθε νευρώνας λαμβάνει σήματα (εισόδου) από πάνω από χίλιους άλλους διεγερτικούς νευρώνες (McCormick et al., 2003).

Η ηλεκτροφυσιολογική ποικιλότητα των νευρώνων οφείλεται στην συνδυασμένη δραστηριότητα διαφορετικών συνδυασμών ιοντικών καναλιών που υπάρχουν στην μεμβράνη τους (Llinas, 1988), και στην μορφολογία τους (Mainen and Sejnowski, 1996). Κάθε τύπος νευρώνα εκφράζει ένα συγκεκριμένο συνδυασμό ιοντικών καναλιών, παράγει συγκεκριμένες ποσότητες κάθε καναλιού, τροποποιεί μοναδικά κάθε κανάλι και τα διανέμει με ένα χαρακτηριστικό πρότυπο στην επιφάνεια της μεμβράνης για να εκφράσει συγκεκριμένο τύπο ηλεκτρικής συμπεριφοράς.

Όσον αφορά τις ηλεκτρικές ιδιότητες των πυραμιδικών κυττάρων, αρκετοί πυραμιδικοί νευρώνες όχι όμως όλοι, ανήκουν στη κατηγορία «κανονικής πυροδότησης» (regular-spiking – RS), άλλοι, κυρίως της στοιβάδας V, παρουσιάζουν Τάξης-1 IB-τύπου σηματοδότηση (IB: intrinsic bursting, όπου οι νευρώνες σε εργαστηριακές συνθήκες κάνουν πυροδότηση σε ριπές (bursts), ακολουθούμενο από περίοδο αποσιώπησης και επανάληψη με εξασθενημένη απόκριση), ενώ υπάρχουν και εκείνοι που ανήκουν στην Τάξης-2 IB-τύπου πυροδότηση (πυροδότηση ριπών, παύση και επανάληψη του κύκλου μέχρι την απομάκρυνση του ερεθίσματος) (Connors and Gutnick, 1990).

2.1.3. ΕΝΔΟΝΕΥΡΩΝΕΣ

Οι ανασταλτικοί ενδονευρώνες, οι οποίοι συνθέτουν και εκλύουν το νευροδιαβιβαστή GABA (γάμμα-αμινοβουτυρικό οξύ, gamma-aminobutyric acid), ποικίλουν πολύ όσον αφορά την μορφολογία των σωμάτων, των δενδριτών και των αξόνων τους. Η δενδριτική μορφολογία είναι το πιο μεταβλητό χαρακτηριστικό και δεν μπορεί να ορίσει με συνέπεια τον τύπο του ενδονευρώνα. Αντίθετα, οι διακλαδώσεις των αξόνων μπορούν να αποκαλύψουν την ανατομική ταυτότητα ενός ενδονευρώνα, καθώς οι ενδονευρώνες φαίνεται να είναι εξειδικευμένοι ως προς τα διαφορετικά μέρη των νευρώνων, τις διαφορετικές στοιβάδες μίας κολώνας, αλλά και τις διαφορετικές κολώνες που στοχεύουν. Επίσης, τα σχετικά ποσοστά του κάθε τύπου ενδονευρώνα ποικίλλουν σε διαφορετικά είδη, εγκεφαλικές περιοχές και στοιβάδες (DeFelipe, 2002; Feldman and Peters, 1978; Jones, 1975; Martin and Whitteridge, 1984; Peters and Fairen, 1978; Valverde, 1986).

Στην ηλεκτροφυσιολογική ποικιλότητα των ανασταλτικών νευρώνων, εκτός από τον συνδυασμό και τους τύπους των ιοντικών καναλιών που εμπεριέχονται στη μεμβράνη, σε κάποιους υποπληθυσμούς νευρώνων συμβάλλει και η έκφραση συγκεκριμένων νευροπεπτιδίων [σωματοστατίνη (SOM), αγγειοδραστικό εντερικό πεπτίδιο (VIP), χολοκυστοκίνη (CCK) και νευροπεπτίδιο Y (NPY)] (Hendry et al., 1984a; Hendry et al., 1984b; Jones and Hendry, 1986; Somogyi et al., 1986) και πρωτεϊνών που συνδέουν ασβέστιο [calcium binding proteins (CaBPs)] [calbindin (CB), parvalbumin (PV) & calretinin (CR)] (Demeulemeester et al., 1989; Rogers and Resibois, 1992), τα οποία βοηθούν στον περαιτέρω χαρακτηρισμό συγκεκριμένων κυτταρικών υποτύπων.

Οι ανασταλτικοί ενδονευρώνες βάσει των ηλεκτρικών τους ιδιοτήτων, χαρακτηρίζονται ως «ταχείας πυροδότησης» (fast spiking - FS) (Connors and Gutnick, 1990; McCormick et al., 1985), ενώ έχουν αποκαλυφτεί και

άλλα πρότυπα πυροδότησης (Kawaguchi and Kubota, 1997; Kawaguchi, 1993) όπως «χαμηλής ουδού πυροδότησης» (low threshold spiking – LTS), τα οποία βρίσκονται κυρίως στην στιβάδα V. Τα «κανονικής πυροδότησης μη πυραμιδικά κύτταρα» (regular spiking non pyramidal cells – RSNP), όπως επίσης, οι «καθυστερημένης πυροδότησης» (late spiking – LS) ενδονευρώνες και οι «ακανόνιστης πυροδότησης» (irregular spiking – IS) ενδονευρώνες (Cauli et al., 1997; Porter et al., 1998) βρίσκονται στις στιβάδες II/III και V (Kawaguchi and Kubota, 1997; Cauli et al., 1997; Porter et al., 1998; Kawaguchi and Kubota, 1993; Kawaguchi and Kubota, 1996).

2.2. ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΣΗΜΑΤΩΝ ΣΤΟΝ ΦΛΟΙΟ

Προκειμένου να παραχθεί μια ολοκληρωμένη απόκριση σε κάποιο ερέθισμα, ο κάθε νευρώνας μεταδίδει το σήμα στο γειτονικό κύτταρο με το οποίο συνάπτεται. Όλα τα σημαντικά σήματα στον εγκέφαλο ωστόσο, δεν είναι διεγερτικά. Στην πραγματικότητα, οι μισοί τουλάχιστον από όλους τους νευρώνες έχουν ως αποστολή να αναστέλλουν τη γένεση ορισμένων σημάτων.

Ένα άλυτο θέμα γύρω από τη λειτουργική φλοιική αρχιτεκτονική είναι το κατά πόσο η φλοιική αναστολή έχει κοντινό ή μακρινό βεληνεκές από την ενδοφλοιική διέγερση. Η χωρική προέκταση ειδικών διασυνδέσεων (όπως ενδονευρώνες με πυραμιδικά κύτταρα) βασίζεται στην περιέλιξη των αξονικών προεκτάσεων των προσυναπτικών κυττάρων και τη προέκταση των δενδριτών των μετασυναπτικών κυττάρων. Κρίνοντας τις ανατομικές εκτιμήσεις της αξονικής και δενδριτικής διασποράς των φλοιικών ενδονευρώνων και πυραμιδικών νευρώνων (Lund and Wu, 1997) μπορεί να ειπωθεί ότι η αναστολή από τους περισσότερους ενδονευρώνες δρα περισσότερο τοπικά απ' όση η διέγερση, αν και υπάρχουν και κάποιοι ενδονευρώνες με μεγάλο βεληνεκούς αναστολή.

Γενικά, η αναστολή είναι ευρέως διαδεδομένη στο φλοιό. Οποιοδήποτε ισχυρό ερέθισμα που εφαρμόζεται στον φλοιό οδηγεί στην εμφάνιση ενός καθαρού ανασταλτικού μετασυναπτικού δυναμικού (inhibitory postsynaptic potential, IPSP) ως μέρος της ανταπόκρισης στο ερέθισμα. Κάθε αναδραστική (feedback, μείωση της δραστηριότητας στη διεγερμένη οδό και παρεμπόδιση άρσης ενός κρίσιμου ορίου δημιουργίας δυναμικού ενεργείας) και ορθόδρομη αναστολή (feedforward, ενίσχυση του αποτελέσματος της ενεργής οδού μέσω καταστολής άλλων ανταγωνιστικών οδών) στον φλοιό ρυθμίζεται από μεγάλη ποικιλία GABAεργικών ενδονευρώνων και όποια διέγερση πυραμιδικών κυττάρων αμετάβλητα οδηγεί στην εμφάνιση διαβαθμισμένης αναστολής με σκοπό την εξισορρόπηση όποιας αμοιβαίας διέγερσης μεταξύ των πυραμιδικών κυττάρων (Haidner et al., 2006; Rigas and Castro-Alamancos, 2007; Destexhe et al., 2003; Rudolph et al., 2007). Αυτό προτείνει έναν απλό μηχανισμό που μπορεί να οδηγήσει σε up και down state (βλ. παρακάτω) στα πυραμιδικά κύτταρα χωρίς να απαιτούνται άλλοι ειδικοί κυτταρικοί μηχανισμοί όπως συμβαίνει σε άλλα κύτταρα (Bazhenov et al., 2002; Compte et al., 2003; Holcman and Tsodyks, 2006; Yuste et al., 2005).

2.3. ΠΡΟΜΕΤΩΠΙΑΙΟΣ ΦΛΟΙΟΣ

2.3.1. ΓΕΝΙΚΑ

Ο προμετωπιαίος φλοιός είναι μία συνειρμική περιοχή στον μετωπιαίο λοβό, που είναι απαραίτητη για υψηλής τάξης γνωστικές διεργασίες, όπως είναι η λογική, η λήψη αποφάσεων, η αναστολή συμπεριφοράς, και οι στοχευμένες ή προσαρμοστικές συμπεριφορές (Roberts et al., 1998). Αν και δεν έχει επιτευχθεί η χαρτογράφηση συγκεκριμένων γνωστικών λειτουργιών επάνω σε ανατομικές ή κυτταροαρχιτεκτονικές υποδιαίρεσεις του προμετωπιαίου φλοιού, ωστόσο ένας γενικός χαρακτηρισμός έχει πραγματοποιηθεί (Courtney et al., 1998; Ramnani and Owen, 2004). Έτσι, η ραχαιοπλευρική περιοχή [Brodmann area, (BA) 9/46] (στα πρωτεύοντα) έχει εμπλακεί σε πολλές γνωστικές λειτουργίες συμπεριλαμβανομένου της ενεργής διατήρησης χωρικών πληροφοριών στον τρέχοντα χρόνο, του ελέγχου και χειρισμού στα πλαίσια της μνήμης εργασίας, της επιλογής απόκρισης, της εφαρμογής στρατηγικών στη διευκόλυνση της μνήμης, της οργάνωσης των υλικών πριν την κωδικοποίησή τους, και της επαλήθευσης και αξιολόγησης των αναπαράστασεων που έχουν ανακτηθεί από την μακροχρόνια μνήμη. Η μεσο- κοιλιακοπλευρική περιοχή (BA 47) έχει εξίσου εμπλακεί σε ευρύ φάσμα γνωστικών λειτουργιών συμπεριλαμβανομένης της επιλογής, σύγκρισης και ανάκλησης των ερεθισμάτων που πάθησαν από βραχυχρόνια και μακροχρόνια μνήμη, της «on line» διατήρησης μη-χωρικών πληροφοριών, της εναλλαγής εργασίας, της αντίστροφης μάθησης, της επιλογής ερεθισμάτων και επεξεργασμένης κωδικοποίησης πληροφοριών σε επεισοδιακή μνήμη. Τέλος, ο κογχομετωπιαίος φλοιός έχει συσχετιστεί με διαδικασίες που περιλαμβάνουν πληροφορίες κινητικής ή συναισθηματικής φύσεως, συμπεριλαμβανομένης της αναπαράστασης των πρωτογενών ενισχυτών όπως η γεύση, η όσφρηση και η αφή, της αναπαράστασης της έκδηλης μάθησης μεταξύ αυθαίρετων ουδέτερων ερεθισμάτων και της ανταμοιβής ή ποινής, και της ολοκλήρωσης αυτών των πληροφοριών που θα οδηγήσει στην επιλογή απόκρισης, απραξίας (καταστολής) και λήψη απόφασης. Επιπλέον, έχει αναφερθεί άλλη μια περιοχή του μετωπιαίου λοβού, η περιοχή BA 10, της οποίας ο ακριβής ρόλος δεν έχει καθοριστεί, αλλά πιστεύεται πως εμπλέκεται στη σαφή επεξεργασία των εσωτερικών νοητικών καταστάσεων ή γεγονότων, ή στην αξιολόγηση των προσωπικών σκέψεων και συναισθημάτων του ατόμου.

Όσον αφορά την αρχιτεκτονική του προμετωπιαίου φλοιού, είναι ελάχιστα γνωστά, ωστόσο έχει προταθεί ότι τουλάχιστον στα πρωτεύοντα, ο PFC ακολουθεί την οργάνωση σε κολώνες (Bugbee and Goldman-Rakic, 1983; Goldman and Nauta, 1977; Hirata and Sawaguchi, 2008) και ενδεχομένως αυτή η οργάνωση να έχει και λειτουργικές συνέπειες (Sawaguchi et al., 1988).

2.3.2. ΠΡΟΜΕΤΩΠΙΑΙΟΣ ΦΛΟΙΟΣ ΚΑΙ ΜΝΗΜΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η μνήμη εργασίας είναι μια διαδικασία διατήρησης μιας ποσότητας πληροφοριών από εξωτερικά ερεθίσματα σε μορφή ενεργής εσωτερικής αναπαράστασης για περιορισμένο χρονικό διάστημα, μετά την απομάκρυνση των ερεθισμάτων. Έτσι, ακόμα και μετά την απομάκρυνση των εξωτερικών ερεθισμάτων τα οποία ενεργοποίησαν τους νευρώνες, οι πληροφορίες παραμένουν ενεργές για κάποιο δεδομένο χρονικό διάστημα (Courtney et al., 1998). Το μοντέλο αυτό για τη μνήμη εργασίας περιγράφει καλύτερα από πολλά άλλα προτεινόμενα μοντέλα την λειτουργία του προμετωπιαίου φλοιού. Επομένως, αν και διαφορετικές κυτταροαρχιτεκτονικά περιοχές του PFC κωδικοποιούν

συγκεκριμένο περιεχόμενο (χωρικό ή χαρακτηριστικών), όλες οι περιοχές του PFC έχουν κοινή την λειτουργία της «on line» επεξεργασίας πληροφοριών ή της μνήμης εργασίας (Goldman-Rakic, 1995).

Συγκεκριμένες περιοχές παραμένουν δραστήριες κατά τη μνήμη εργασίας στον ανθρώπινο προμετωπιαίο φλοιό. Έχει διαπιστωθεί γενικά, ότι η αποκωδικοποίηση μακροχρόνιων αναμνήσεων συντελείται κατά προτίμηση στον αριστερό προμετωπιαίο φλοιό, ενώ η ανάκτηση αυτών ενεργοποιεί νευρώνες του δεξιού προμετωπιαίου φλοιού. Όπως και στον αντίστοιχο φλοιό στους πιθήκους, συνεχή δραστηριότητα σε περισσότερο κοιλιακές (μετωπιαίες) περιοχές (συγκεκριμένα στην inferior convexity, BA12) συσχετίζονται με μνήμη εργασίας για αντικείμενα, ενώ δραστηριοποίηση περιοχών περισσότερο ραχιαία ευρισκόμενων (ανώτερη μετωπική αύλακα - superior frontal sulcus, BA 46) συσχετίζονται με μνήμη εργασίας που αφορούν χωρικές τοποθετήσεις (Courtney et al., 1998). Ωστόσο, οι λειτουργίες της αντίληψης και της μνήμης εργασίας είναι πιο στενά συνδεδεμένες για χωρικές πληροφορίες απ' ότι για πληροφορίες σχετικά με αντικείμενα. Επιπλέον, τα ντοπαμινεργικά κύτταρα από την κοιλιακή καλυπτρική περιοχή (ventral tegmental area) προβάλλουν στις στοιβάδες του PFC, επιτρέποντας την επεξεργασία της ανταμοιβής μαζί με τις υπόλοιπες πληροφορίες που δέχεται ένας πυραμιδικός νευρώνας του PFC (Goldman-Rakic, 1995).

Ωστόσο, παραμένουν αναπάντητες ερωτήσεις και κάποιες διαμάχες σχετικά με τη λειτουργική οργάνωση του ανθρώπινου προμετωπιαίου φλοιού και του ακριβή του ρόλου στη μνήμη εργασίας.

2.3.3. ΠΡΟΜΕΤΩΠΙΑΙΟΣ ΦΛΟΙΟΣ ΚΑΙ ΠΑΡΑΜΕΝΟΥΣΑ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

Τοπικά νευρωνικά δίκτυα στον προμετωπιαίο φλοιό καθώς και στον οπτικό φλοιό είναι ικανά να παράγουν αυθόρμητη συνεχή δραστηριότητα μετά την απομάκρυνση του εξωτερικού ερεθίσματος -την επονομαζόμενη παραμένουσα δραστηριότητα (persistent activity)- για περιόδους δευτερολέπτων ή μεγαλύτερων (McCormick et al., 2003). Αυτή η συνεχής δραστηριότητα οφείλεται στην επαναλαμβανόμενη διέγερση μεταξύ των πυραμιδικών κυττάρων, η οποία ελέγχεται από την αναδραστική αναστολή (feedback inhibition) και μπορεί να παράγει ταχείες εναλλαγές καταστάσεων ενεργοποίησης (onset) και απενεργοποίησης (offset) νευρώνων.

Η εμφάνιση της παραμένουσας δραστηριότητας κατά τη διάρκεια της μνήμης εργασίας δεν είναι μοναδικό γνώρισμα του προμετωπιαίου φλοιού αλλά πράγματι εμφανίζεται και σε άλλες πολύπλοκες συνειρμικές φλοιικές περιοχές ακόμη και υποφλοιικές περιοχές (Fuster and Jervey, 1981; Hikosaka et al., 1989; Fuster, 1995; Pesaran et al., 2002). Υπολογιστικά μοντέλα της παραμένουσας δραστηριότητας βασίζονται κυρίως στη λειτουργία των ανατροφοδοτούμενων δικτύων τα οποία ελέγχονται από ανασταλτικούς ενδονευρώνες (Amit and Brunel, 1997; Lisman et al., 1998; Wang, 1999, 2001; Compte et al., 2000, 2003; Durstewitz et al., 2000), αν και επίσης πιθανή στην εμφάνιση αυτής της δραστηριότητας, είναι η συμβολή των εγγενών μεμβρανικών ιδιοτήτων των νευρώνων αυτών (Marder et al., 1996; Camperi and Wang, 1998; Haj-Dahmane and Andrade, 1998). Έτσι, τόσο οι συναπτικές ιδιότητες μεταξύ μικροκυκλωμάτων του προμετωπιαίου φλοιού (Wang et al., 2008) όσο και οι εγγενείς ιδιότητες (Sidiropoulou et al., 2009) αυτών των νευρώνων συμμετέχουν στην επαγωγή της παραμένουσας δραστηριότητας.

2.4. UP AND DOWN STATES

2.4.1. ΓΕΝΙΚΑ

Οι McCormick et al. (2003) έχουν αναφέρει ότι τομές από προμετωπιαίο και οπτικό φλοιό από κουνάβι παράγουν επαναλαμβανόμενες περιόδους παραμένουσας δραστηριότητας όταν αυτές διατηρούνται *in vitro* σε ιοντικό διάλυμα (artificial cerebral spinal fluid, ACSF), μίμο του φυσιολογικού εγκεφαλονωτιαίου υγρού (Sanchez-Vives and McCormick, 2000; Shu et al., 2003). Αυτή η συνεχής δραστηριότητα αποτελείται από τις λεγόμενες up και down states οι οποίες θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως συγχρονισμένες εκπολώσεις και υπερπολώσεις των γειτονικών νευρώνων, και φαίνονται σχεδόν ταυτόσημες με εκείνες που εμφανίζονται στις χαμηλής συχνότητας φλοιικές ταλαντώσεις *in vivo* κατά τη διάρκεια αναισθησίας ή ύπνου (Steriade et al., 1993, 2001; Contreras and Steriade, 1995; Contreras et al., 1996).

Η κυκλική παραγωγή των up και down states, που έχουν βρεθεί σε όλες τις μέχρι τώρα καταγεγραμμένες περιοχές του φλοιού, εμφανίζονται και υπό φυσιολογικές συνθήκες στον φλοιό, ως αποτέλεσμα της συνδεσμολογίας των νευρώνων του φλοιού καθώς και των μεμβρανικών και συναπτικών ιδιοτήτων του κάθε νευρώνα (Metherate and Ashe, 1993; Steriade et al., 1993; Cowan and Wilson, 1994; Contreras et al., 1996; Stern et al., 1997; Sanchez-Vives and McCormick, 2000; Shu et al., 2003).

Παρόμοιες με αυτήν την αυθόρμητη δραστηριότητα βρέθηκαν να υπάρχουν και σε άλλες περιοχές του εγκεφαλικού φλοιού εκτός από τον προμετωπιαίο φλοιό. Στην παρεγκεφαλίδα, οι κυριότεροι ανασταλτικοί ενδονευρώνες της κοκκώδους στοιβάδας, τα κύτταρα Golgi, βρέθηκε να εμφανίζουν αυθόρμητη ρυθμική υπερπόλωση σε πειραματόζωα σε εγρήγορση (γάτα: 2 με ~50 Hz, Edgley & Lidieth, 1987; πίθηκος: 10–80 Hz, Miles et al. 1980) και σε αναισθητοποιημένα (αρουραίος: 2 με ~30 Hz, Schulman & Bloom, 1981; Vos et al., 1999). Συγκεκριμένα, οι Forti et al., (2006) παρατήρησαν αυθόρμητη χαμηλής συχνότητας ρυθμική πυροδότηση σε απουσία φασικού σήματος (phasic input) στα κύτταρα Golgi της παρεγκεφαλίδας αρουραίου.

Γενικά σημειώνεται (review Ramirez et al. 2004; Surmeier et al. 2005) ότι, κάποιοι νευρώνες *in vivo* μπορούν να εναλλάσσονται μεταξύ ρυθμικών καταστάσεων (non-pacemaker and pacemaker properties) ως απόκριση σε συμπεριφορικές απαιτήσεις, όπως οι νευρώνες του οσφρητικού δικτύου θηλαστικών, υποθαλάμου και βασικών γαγγλίων, και οι νευρώνες καρκινωειδών.

2.4.2. UP AND DOWN STATES ΚΑΙ ΠΡΟΜΕΤΩΠΙΑΙΟΣ ΦΛΟΙΟΣ

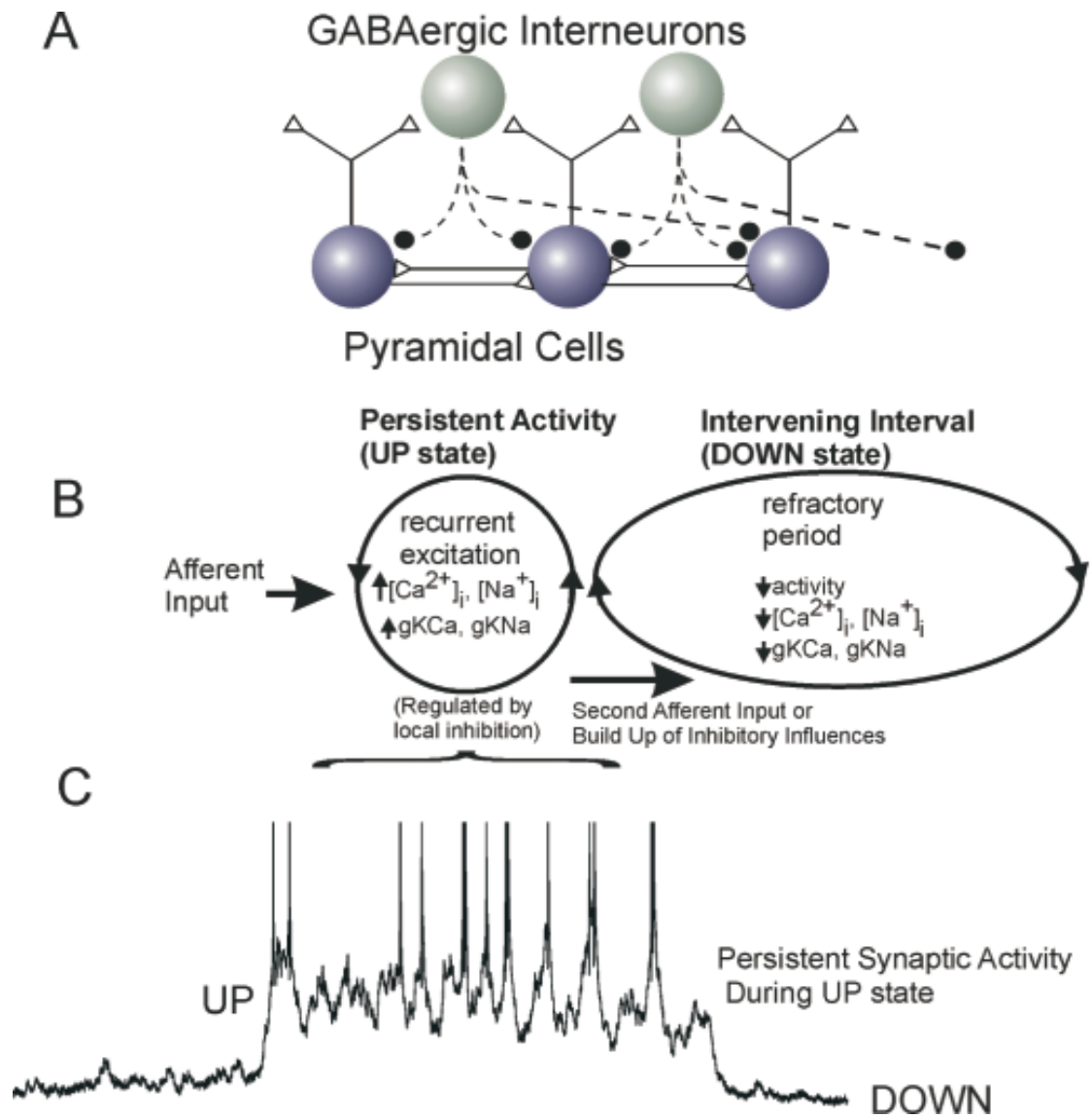
Νευρώνες, ιδιαίτερα τα φλοιικά κύτταρα βρίσκονται κάτω από σταθερό βομβαρδισμό με συναπτικά δυναμικά, τα οποία μπορούν να επηρεάσουν τις ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες των νευρώνων (Holmes and Woody, 1989; Destexhe and Pare, 1999; Destexhe et al., 2001; Steriade et al., 2001; Chance et al., 2002; Fellous et al., 2003). Σε αναισθητοποιημένα ζώα, αυτή η αυξανόμενη συναπτική δραστηριότητα εκπολώνει τα κύτταρα κατά 5-15 mV και αυξάνει τη μεμβρανική αγωγιμότητα κατά $\geq 100\%$ (Destexhe and Pare, 1999).

Αλλαγές στον υπόβαθρο (background) της συναπτικής δραστηριότητας μπορεί όχι μόνο να υποβοηθούν τη παραγωγή αυθόρμητης νευρωνικής δραστηριότητας, αλλά να έχουν σημαντικές επιπτώσεις στη νευρωνική διεγερσιμότητα και απόκριση σε άλλα συναπτικά σήματα εισόδου (Bernander et al., 1991; Timofeev et al., 1996; Destexhe and Pare, 1999; Anderson et al., 2000; Destexhe et al., 2001; Chance et al., 2002; Fellous et al., 2003). Αυξήσεις ή μειώσεις στον υπόβαθρο συναπτικής δραστηριότητας μπορεί να ενεργοποιεί μονοπάτια αναδραστικής αναστολής ή των τοπικών δικτύων στην απόκριση των μεμονωμένων νευρώνων.

Οι ερευνητές McCormick et al. (2003) υποστηρίζουν ότι, οι μηχανισμοί που διέπουν τη παραγωγή αυθόρμητης συνεχούς δραστηριότητας θα μπορούσαν να έχουν σημαντικές εμπλοκές με αυτούς που παράγουν την παραμένουσα δραστηριότητα κατά τη διάρκεια της μνήμης εργασίας στο ίδιο νευρωνικό μικροκύκλωμα.

Υπάρχουν αποδείξεις ότι η μετάβαση από τη φάση up state στη φάση down state προκαλείται μέσω της αγωγιμότητας ιόντων καλίου (K^+) (Sanchez-Vives and McCormick 2000) του οποίου η χρονική εξέλιξη οδηγεί στην υπόθεση ότι στα κύτταρα αυτά υπάρχει χαμηλή αγωγιμότητα ρεύματος νατρίου εξαρτώμενου από κάλιο (g_{KNa}) (Sanchez-Vives et al., 2000). Η up state ξεκινάει με τη ταυτόχρονη δραστηριοποίηση ενός κρίσιμου αριθμού πυραμιδικών νευρώνων (είτε μέσω ενδογενών ιοντικών μηχανισμών είτε μέσω επαναλαμβανόμενης διέγερσης υποομάδων νευρώνων) τη στιγμή που το δίκτυο επανέρχεται από τη περίοδο αδράνειας που ακολουθείται μετά τη (προηγούμενη) up φάση (Sanchez-Vives and McCormick, 2000; Compte et al., 2003). Η αυθόρμητη μετάβαση στη down φάση έπειτα, ίσως να οφείλεται στη συσσώρευση ενδογενή K^+ στα πυραμιδικά κύτταρα η οποία ίσως είναι αποτέλεσμα της δραστηριότητας στην up φάση (Sanchez-Vives and McCormick, 2000; Compte et al., 2003). Από την άλλη μεριά, η μετάβαση στη down φάση ίσως είναι το αποτέλεσμα στην απόκριση στην ισχυρή ενεργοποίηση ανασταλτικών νευρώνων (Brunel and Wang, 2001; Shu et al., 2003) ή πιθανόν στην απόκριση στη συγχρονισμένη ενεργοποίηση μεγάλου μέρους των νευρώνων του δικτύου, οδηγώντας έτσι σε μια συγχρονισμένη ανερέθιστη περίοδο (Gutkin et al., 2001; Shu et al., 2003).

Στις τομές, η up state της βραδείας ταλάντωσης, διαδίδεται σε όλη την έκταση της τομής καθώς η περιοχή στην οποία ξεκίνησε, θέτει διαδοχικά σε ενεργότητα τις υπόλοιπες γειτονικές περιοχές (Sanchez-Vives and McCormick, 2000). Η διάδοση των up states in vivo θα πρέπει να ακολουθεί σημαντικά πιο πολύπλοκο πρότυπο, δεδομένου της τρισδιάστατης δομής του εγκεφάλου και της φλοιικής συνδεσμολογίας.



Πηγή: McCormick et al.: Persistent Cortical Activity (Figure 2). Cerebral Cortex November 2003;13:1219–1231; DOI: 10.1093/cercor/bhg104

Εικόνα 2. Συνοπτικό διάγραμμα των προτεινόμενων μηχανισμών για την παραγωγή των up and down state στα φλοιικά δίκτυα. Φλοιικά πυραμιδικά και τοπικά GABAεργικά κύτταρα είναι ισχυρά συνδεδεμένα μέσω τοπικών αξονικών συνδέσεων, έτσι, ώστε η δραστηριότητα των πυραμιδικών κυττάρων διεγείρει άλλους πυραμιδικούς νευρώνες καθώς και τοπικούς ανασταλτικούς νευρώνες. Η αναδραστική αναστολή από τους τοπικούς ενδονευρώνες ελέγχει το επίπεδο του up state. Ένα επερχόμενο σήμα εισόδου μπορεί να προκαλέσει τη μετάβαση από down σε up state. Συσσώρευση ενδοκυττάρια ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}) και νατρίου (Na^+) μπορεί να ενεργοποιήσει τη ροή K^+ με αποτέλεσμα την ανατροπή της ισορροπίας πίσω στο down state, κατά την οποία τα επίπεδα Ca^{2+} και Na^+ του κυττάρου μειώνονται, επιτρέποντας έτσι στο δίκτυο τη δημιουργία αυθόρμητα ενός ακόμη up state, ενώ η μετάβαση από τη μια φάση στην άλλη μπορεί να γίνει και μέσω ενεργοποίησης σημάτων εισόδου.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΕΧΝΗΤΟΥ ΕΓΚΕΦΑΛΟΝΩΤΙΑΙΟΥ ΥΓΡΟΥ (ACSF)

3.1.1. ΤΕΧΝΗΤΟ ΕΓΚΕΦΑΛΟΝΩΤΙΑΙΟ ΥΓΡΟ ΧΩΡΙΣ ΑΣΒΕΣΤΙΟ

Για την παρασκευή του τεχνητού εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ACSF) χωρίς ασβέστιο χρησιμοποιήθηκαν (σε mM) 125 NaCl, 3.5 KCl, 26 NaHCO₃, 3 MgCl₂ και 10 glucose τα οποία ζυγίζονται σε ζυγαριά ακριβείας. Έπειτα, όλες οι χημικές ενώσεις εκτός από το χλωριούχο μαγνήσιο (MgCl₂), προστίθενται σε 1 λίτρο απιονισμένου νερού το οποίο βρίσκεται υπό ανάδευση σε έναν αναδευτήρα. Μόλις διαλυθούν τα χημικά προστίθεται και το MgCl₂. Μετά τη πλήρη διάλυση των χημικών ενώσεων, με τη βοήθεια ενός pH-μέτρου γίνεται η ρύθμιση του pH με τη προσθήκη HCl (αραίωση 1:10) εωσότου η τιμή του μειωθεί στα 7.4. Τέλος, γίνεται η ωσμομέτρηση του υγρού σε έναν ωσμόμετρο (στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε ωσμόμετρο της εταιρίας advanced instruments μοντέλο 3320). Η αποδεκτή τιμή της ωσμογραμμομοριακότητας βρίσκεται στα 314 mosm/gr ± 10.

3.1.2. ΤΕΧΝΗΤΟ ΕΓΚΕΦΑΛΟΝΩΤΙΑΙΟ ΥΓΡΟ ΜΕ ΑΣΒΕΣΤΙΟ

Το ACSF με ασβέστιο (ACSF + Ca⁺²) περιλαμβάνει (σε mM) 125 NaCl, 3.5 KCl, 26 NaHCO₃, 2 MgCl₂, 10 glucose και 2 CaCl₂. Όλες οι χημικές ενώσεις, εκτός από το MgCl₂ και το Ca⁺² προστίθενται σε 3 λίτρα υπό ανάδευση απιονισμένου νερού. Μετά τη διάλυση των χημικών, γίνεται αρχικά η προσθήκη του Ca⁺² και μετά το πέρας ολίγων δευτερολέπτων και του MgCl₂. Το pH ρυθμίζεται στα 7.4 και η τιμή της ωσμογραμμομοριακότητας κοντά στα 314 mosm/gr κατά τον ίδιο τρόπο με το προηγούμενο (2.1.1.).

3.1.3. ΤΕΧΝΗΤΟ ΕΓΚΕΦΑΛΟΝΩΤΙΑΙΟ ΥΓΡΟ ΤΩΝ UP&DOWN STATES

Για τη παρασκευή του up&down states ACSF ζυγίζονται (σε mM) 125 NaCl, 3.8 KCl, 26 NaHCO₃, 1 MgCl₂, 10 glucose, 1.2 CaCl₂ και 1.25 NaH₂PO₄, τα οποία διαλύονται σε 1 λίτρο νερού. Η προσθήκη τους γίνεται κατά τον ίδιο τρόπο με το ACSF με ασβέστιο (βλ. 2.1.2), ενώ η τιμή του pH και της ωσμογραμμομοριακότητας ρυθμίζονται παρομοίως.

3.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

3.2.1 PICROTOXIN (πικροτοξίνη)

Στη παρούσα εργασία έγινε η χρήση της φαρμακευτικής ουσίας picrotoxin δύο διαφορετικών αραιώσεων. Για τη παρασκευή της πρώτης αραιώσης προστέθηκαν 50μl του φαρμάκου σε 100ml up&down states ACSF. Μετά από ήπια ανάδευση της φιάλης με το χέρι, αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου. Η φιάλη με τη δεύτερη αραιώση περιελάμβανε 100μl του φαρμάκου και 100ml up&down states ACSF. Μετά από ήπια ανάδευση, η φιάλη παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου.

3.2.2 AP5

Σε ένα falcon των 50ml προστέθηκαν 40μl της φαρμακευτικής ουσίας AP5 ((2R)-amino-5-phosphonovaleric acid) και συμπληρώθηκε έως τα 40ml με up&down states ACSF. Μετά από ήπια ανάδευση του falcon, αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου.

3.2.3 AP5+CNQX

Σε ένα falcon των 50ml προστέθηκαν 40μl AP5, 40μl της φαρμακευτικής ουσίας CNQX (6-κυανο-7-νιτροκινοξαλίνο-2,3-διόνη, Tocris, USA) και συμπληρώθηκε έως τα 40ml με up&down states ACSF, ενώ στη συνέχεια, το falcon αναδεύτηκε ήπια και αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου.

3.3. ΜΥΕΣ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν μύες (συνολικός αριθμός μυών, n=13) του γένους *Mus Musculus*. Οι γονότυποι των μυών ήταν κυρίως της σειράς F1 (διασταύρωση C57/B6), των οποίων (n=2) οι ηλικίες κυμαίνονταν από τρεις έως τρεισήμισι μήνες, ενώ υπήρξαν και άλλοι (n=11) της σειράς Rac* (διασταύρωση: Rac1 Fl/Fl;Rac3 +/-, Rac1 Fl/Fl;Rac3 -/- και άλλες. Όλες ήταν control) ηλικίας από ενάμιση έως τριών μηνών.

*Η σειρά Rac περιλαμβάνει μύες στους οποίους έγινε απαλοιφή της Rac1 πρωτεΐνης (Rac1 fl/fl; R26FlStopFlYFP ;Nkx2.1Tg Cre, Walmsley et al., 2003; Fogarty et al., 2007), μια ευρέως εκφραζόμενη πρωτεΐνη που εμπλέκεται σε πολλαπλές διεργασίες της ανάπτυξης του φλοιού όπως ο κυτταρικός κύκλος, η αύξηση των νευραξόνων και η νευρωνική μετανάστευση, ειδικά από τους ενδονευρώνες του φλοιού με την τεχνολογία Cre-LoxP. Στα ζώα που δεν έχουν Rac1 στους πολλαπλασιαζόμενους ενδονευρώνες, μόνο οι μισοί ενδονευρώνες φτάνουν στο φλοιό, και αυτό με χρονική καθυστέρηση. Η σημαντική μείωση των ενδονευρώνων, πιθανόν να έχει σημαντικές επιπτώσεις στην λειτουργία των νευρωνικών δικτύων λόγω διαταραχής στην ανασταλτική συναπτική λειτουργία, η οποία μπορεί να διαταράξει την ισορροπία μεταξύ διεγερτικών και ανασταλτικών δικτύων, το οποίο θα μπορούσε να οδηγήσει στη γενικευμένη υπερδιέγερση των φλοιικών δικτύων (Karagogeos et al., 2010).

3.4. ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΤΟΜΩΝ ΑΠΟ ΕΓΚΕΦΑΛΟ ΜΥ

Για την παραλαβή των τομών αρχικά γίνεται η αφαίρεση του εγκεφάλου του μυ (*Mus Musculus*). Υπάρχουν δύο τρόποι για την αφαίρεση (στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν και οι δύο τρόποι): ο πρώτος συμπεριλαμβάνει την αναισθητοποίηση του μυ με τη χρήση του αλοθάνιου (2-bromo-2-chloro-1,1,1-trifluoroethane). Το ζώο τοποθετείται μέσα σε ένα κουτί (διαστάσεων 15x10x5cm) όπου περιλαμβάνει ένα χαρτί εμποτισμένο με το αναισθητικό, το οποίο δρα μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα μετά από εισπνοή. Ο δεύτερος τρόπος είναι η αποκοπή της συνέχειας της σπονδυλικής στήλης στο σημείο του αυχενικού σπονδύλου με τη χρήση ενός μεταλλικού αντικειμένου όπως ένα ψαλίδι.

Στη συνέχεια, γίνεται η εκτομή του κεφαλιού του μυός και αποτραβιέται προς τα πίσω η εξωτερική επιδερμίδα για να αποκαλυφτεί το κρανίο. Με τη βοήθεια ενός ξυραφιού καθαρίζεται ο ιστός μεταξύ της επιδερμίδας και του κρανίου. Γίνονται τρεις τομές, η πρώτη εκ των οποίων κατά μήκος του κρανίου (ρυγχαιο-ουραίος άξονας) με κατεύθυνση από το ουραίο (πίσω μέρος της κεφαλής) προς το ρυγχάιο (προς τη μύτη), και οι υπόλοιπες, δύο κάθετες σ' αυτόν τον άξονα προς τη κάθε πλευρά του κρανίου (το ψαλίδι τοποθετείται πάντα στην οπή της σπονδυλικής στήλης για να γίνουν οι τομές). Έπειτα, αφού αφαιρεθούν τα κομμάτια του κρανίου με τη βοήθεια μιας λαβίδας, αφαιρείται και ο εγκέφαλος από το κρανίο με ιδιαίτερα προσεκτικές κινήσεις, ξεκινώντας από τη περιοχή της παρεγκεφαλίδας, ο οποίος έπειτα τοποθετείται μέσα σε τρυβλίο Petri που περιλαμβάνει παγωμένο και υπό συνεχή οξυγόνωση (μείγμα αερίων 95% O₂ και 5% CO₂) ACSF χωρίς Ca⁺². Αμέσως, αφού μετακινηθεί ο εγκέφαλος σε μια σταθερή και επίπεδη επιφάνεια, γίνεται μια τομή με κλίση περίπου 40 μοιρών και διαγώνια (όχι τελείως κάθετη) στο ουραίο τμήμα (περιοχή παρεγκεφαλίδας), ενώ στη συνέχεια σταθεροποιείται (από τη πλευρά της τομής ώστε το εμπρόσθιο τμήμα του εγκεφάλου να εκτίθενται) στο δισκίο του μικροτόμου παλλόμενης λεπίδας (Leica VT1000S) όπου και λαμβάνονται τομές από τη περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού (εμπρόσθιο τμήμα) πάχους 400μm. Οι τομές που λαμβάνονται τοποθετούνται με τη βοήθεια πινέλου σε δοχείο που περιέχει ACSF + Ca⁺² υπό συνεχή οξυγόνωση όπου και επωάζονται για μια ώρα περίπου.

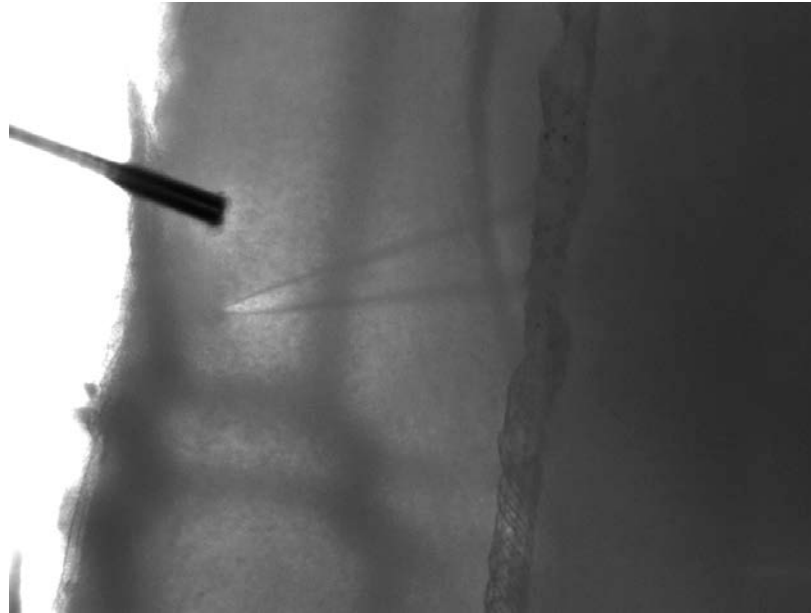
Σημαντικό για τη σωστή διεξαγωγή όλης της διαδικασίας της παραλαβής των τομών, πρωτίστως είναι η μετακίνηση των μυών στο χώρο όπου θα γίνουν οι τομές, με όσο το δυνατόν λιγότερες παρεμβολές και καταπονήσεις, οι οποίες θα μπορούσαν να επηρεάσουν την εγκεφαλική δραστηριότητα. Πολύ σημαντικό είναι να μην παραμείνει ο εγκέφαλος εκτός ACSF για μεγάλο χρονικό διάστημα, οπότε η όλη διαδικασία από τη στιγμή της εκτομής του κεφαλιού του μυός έως και τη τοποθέτηση των τομών σε δοχείο με ACSF + Ca⁺² θα πρέπει να γίνει στο ελάχιστο δυνατό χρόνο. Επίσης, η απολύμανση κάθε φορά του πάγκου εργασίας και όλων των οργάνων που χρησιμοποιούνται είναι άκρως σημαντική για την αποφυγή πιθανών παραγόντων που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τα αποτελέσματα.

3.5. ΚΑΤΑΓΡΑΦΕΣ ΤΟΠΙΚΟΥ ΠΕΔΙΟΥ

Πριν τη τοποθέτηση της προς καταγραφή τομής στο μικροσκόπιο, ρυθμίζεται καταλλήλως η ροή του υπό συνεχή οξυγόνωση ACSF + Ca⁺², του οποίου η θερμοκρασία αν δεν είναι ίση με αυτή του δωματίου τοποθετείται στο υδατόλουτρο έως ότου φτάσει την επιθυμητή θερμοκρασία (εάν χρησιμοποιηθεί υδατόλουτρο τότε ρυθμίζεται στους 30°C ώστε η θερμοκρασία του υγρού στο μικροσκόπιο να είναι ίση με αυτή του δωματίου).

Για τις καταγραφές χρησιμοποιήθηκε μικροσκόπιο φωτισμού πρόσπτωσης (Zeiss, USA) με ενσωματωμένη κάμερα (Hamamatsu, Japan). Η καταγραφή των δυναμικών τοπικού πεδίου (Local field potentials - LFPs) γίνεται εξωκυττάρια μέσω ενός ηλεκτροδίου χλωριούχου αργύρου (Εικ.3), μονωμένο με γυάλινη πιπέτα, διαμέτρου ~10 μm, που περιέχει 2M NaCl ως ηλεκτρολύτη. Το ηλεκτρόδιο ερεθισμού είναι του τύπου cluster electrode, 2-contact.

Το καταγραφόμενο σήμα φιλτράρεται με χαμηλοπερατό φίλτρο στα 0-1 kHz. Για τη λήψη των καταγραφών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα IgorPro (Wavemetrics, USA) όπου ακολουθήθηκαν αυτοσχέδιες διαδικασίες ενώ η συχνότητα λήψης είναι στα 100 kHz.



Εικόνα 3. Διάταξη των ηλεκτροδίων ερεθισμού (αριστερά) και καταγραφής (δεξιά) στην περιοχή prelimbic του προμετωπιαίου φλοιού στις στοιβάδες II-II. Τα δυο ηλεκτρόδια θα πρέπει να βρίσκονται σε τέτοια απόσταση μεταξύ τους ώστε το εφαρμοζόμενο τεχνητό ερέθισμα να μην καταγραφεί απευθείας από το ηλεκτρόδιο καταγραφής, αλλά η εκάστοτε καταγραφόμενη απόκριση να αντιστοιχεί στη δραστηριότητα των νευρώνων της περιοχής.

3.6. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΡΕΘΙΣΜΟΥ

Αρχικά, το πρωτόκολλο ερεθισμού που ακολουθείται εφαρμόζεται για τομές τοποθετημένες σε ACSF + Ca^{+2} . Ακολουθήθηκε ένα πρωτόκολλο ερεθισμού το οποίο συμπεριλάμβανε τη διαδοχική πραγματοποίηση ερεθισμού διάρκειας 0,01 ms για διάφορες αυξανόμενες εντάσεις από 0,05 έως 0,4 mA, όπου το κάθε ερέθισμα επαναλαμβάνονταν δυο φορές και στη συνέχεια της ανάλυσης των δεδομένων λαμβάνονταν ο μέσος όρος τους. Από το κάθε ερέθισμα λαμβάνεται μια καμπύλη απόκρισης ερεθισμού και επιλέγονται εκείνες με πλάτος ερεθισμού εκείνο για το οποίο η απόκριση ήταν η μισή έως δυο τρίτα της μέγιστης και μέσα στα όρια της γραμμικής φάσης της καμπύλης. Στη συνέχεια πραγματοποιούνταν δυο συζευγμένοι ερεθισμοί (paired-pulse recordings) αυξανόμενων συχνοτήτων (10, 20 και 50 Hz) κατά σειρά, με δυο επαναλήψεις το κάθε ένα. Η ένταση των ερεθισμάτων αν και επιλέγεται σε κάθε πείραμα ανάλογα τις λοιπές αποκρίσεις, συνήθως είναι 0,2 mA. Στο τέλος αυτών των ερεθισμάτων γίνονται καταγραφές της αυθόρμητης δραστηριότητας των νευρώνων με διάρκεια 5000 ms το καθένα, χωρίς τη μεσολάβηση αξιόπιστου χρόνου (inter stimulus interval είναι ίσο με 0) μεταξύ δυο διαδοχικών καταγραφών με συνεχή καταγραφή για περίπου 10 λεπτά (80-85 καταγραφές).

Μετά την αλλαγή του ACSF σε up and down states ACSF (χωρίς την αλλαγή της τομής) ακολουθείται ένα πρωτόκολλο παρόμοιο με το παραπάνω αναφερόμενο, με μόνες διαφορές τη λήψη spontaneous καταγραφών και πριν τους απλούς ερεθισμούς, για περίπου 15 λεπτά (130 καταγραφές) και οι επόμενες καταγράφονται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. [συνοπτικά έχει ως εξής: spontaneous καταγραφές για περίπου 10 λεπτά, απλοί (single) ερεθισμοί, συζευγμένοι ερεθισμοί, spontaneous καταγραφές για περίπου 20 λεπτά].

Σε όλες τις τομές που καταγράφηκαν, πραγματοποιήθηκε επίδραση με κάποια φαρμακολογική ουσία (microtoxin ή AP5 και CNQX), το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για τις καταγραφές είναι ίδια με αυτή που ακολουθήθηκε στην up and down states ACSF, με λιγότερες βέβαια spontaneous καταγραφές λόγω της ποσότητας των διαλυμάτων.

3.7. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Η ανάλυση των μετρήσεων έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος IgorPro 6.05 (Wavemetrics, USA) μέσω της οποίας έγιναν και οι καταγραφές. Για την ανάλυση λήφθηκαν υπόψη κάποιοι παράμετροι όπως το v_{peak} (η κορυφή της κοιλάδας πυροδότησης, η μέγιστη απόλυτη τιμή δυναμικού κατά την απόκριση των αξόνων), το f_{peak} (η μέγιστη απόλυτη τιμή δυναμικού κατά τη συναπτική απόκριση), το fp_{peak} (η διαφορά της τιμής F_{peak} από το πιο ψηλό σημείο της καμπύλης απόκρισης μετά την κοιλάδα πυροδότησης), το activation slope (η κλίση της καμπύλης μετά το v_{peak} , είναι μια συνάρτηση της μορφής $ax+b$), το inactivation slope που την ακολουθεί (δηλώνει την επαναφορά του δυναμικού μεμβράνης) και το x_{peak} (το χαμηλότερο σημείο στο οποίο φτάνει η κοιλάδα πυροδότησης, αποτελεί την κύρια απόκριση). Βάσει αυτών των παραμέτρων, έγινε η σύγκριση των δεδομένων με τη βοήθεια του προγράμματος Excel (Microsoft Office 2007), το οποίο χρησιμοποιήθηκε και για τη δημιουργία των γραφημάτων.

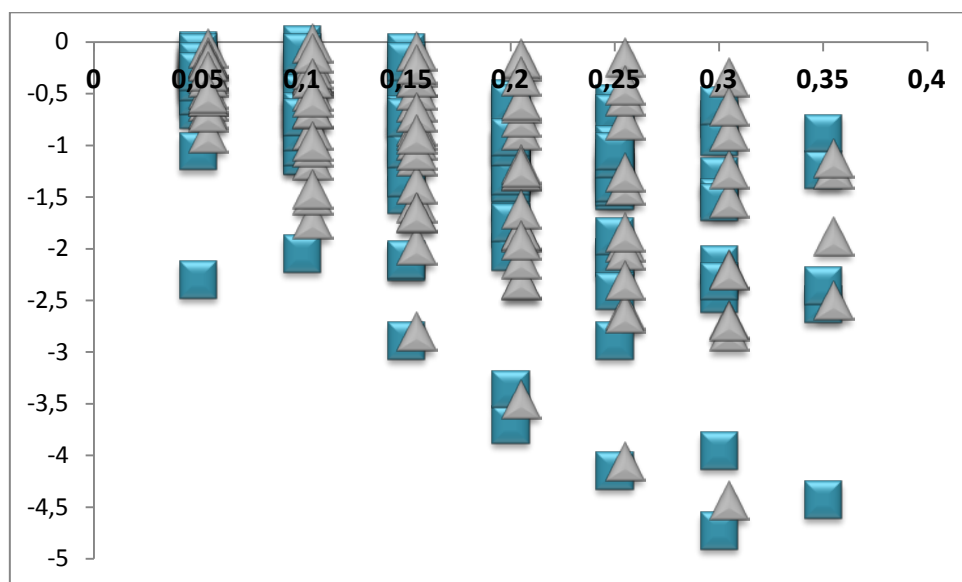
Η στατιστική ανάλυση έγινε βάσει της συνάρτησης TTEST στο πρόγραμμα Excel.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΑΠΟΚΡΙΣΕΙΣ ΝΕΥΡΩΝΩΝ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ACSF

Η παρούσα μελέτη εστιάστηκε κυρίως στην αυθόρμητη δραστηριότητα των νευρώνων της στοιβάδας II της υποπεριοχής prelimbic του προμετωπιαίου φλοιού καθώς και σε οποιοδήποτε παράγοντα που αφορά αυτή. Ως εκ τούτου, εξετάστηκε η σύσταση του τεχνητού εγκεφαλονωτιαίου υγρού (normal και up and down acsf, βλ. Υλικά και Μέθοδοι) και η επίδραση που αυτή έχει στην απόκριση των νευρώνων.

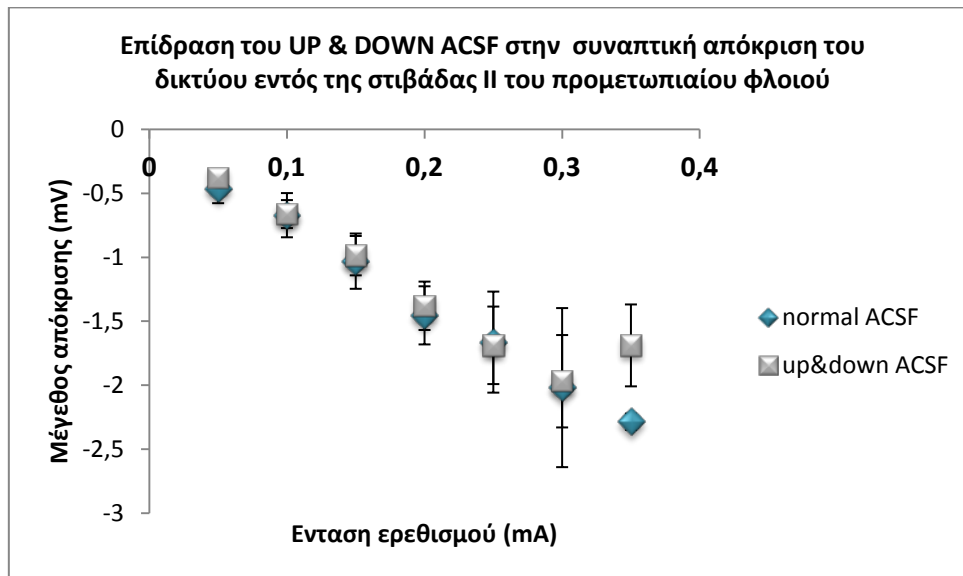
Παρακάτω αναρτώνται γραφήματα (1-4) που δείχνουν την απόκριση των νευρώνων σε απλούς παλμούς αυξανόμενης έντασης ρεύματος (σε mA) (γράφ. 1 και 2), σε συζευγμένους παλμούς διαφορετικών συχνοτήτων (γράφ. 3) καθώς και την επίδραση των acsfs στη συναπτική διευκόλυνση (γράφ. 4), όταν οι τομές επωάζονται κατά τη διάρκεια των μετρήσεων σε normal και up and down acsf.



Γράφημα 1. Αποκρίσεις νευρώνων (σε mV) προμετωπιαίου φλοιού σε αυξανόμενες εντάσεις ρεύματος (0,05 έως 0,4 mA) όντας οι τομές επωασμένες (κατά τη διάρκεια εξέλιξης των πειραμάτων) σε κανονικό acsf (μπλε) και up and down states acsf (γκρι).

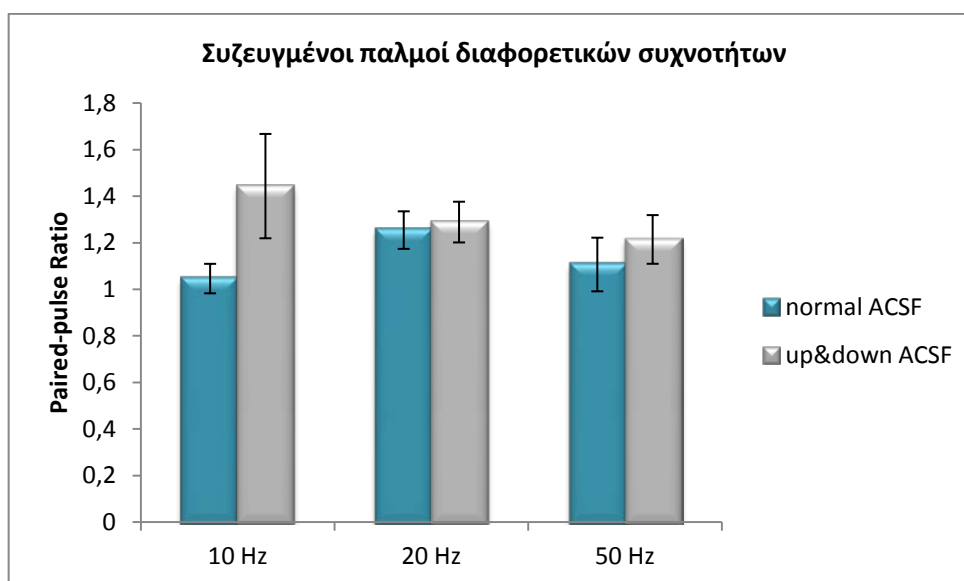
Στο γράφημα 1 αναρτώνται όλες οι μετρήσεις αποκρίσεων σε απλούς παλμούς διαφορετικών ρευμάτων όντας οι τομές σε περιβάλλον normal και up and down acsf. Φαίνεται πως σε χαμηλές εντάσεις η απόκριση των νευρώνων της μελετώμενης περιοχής δεν επηρεάζεται σημαντικά από το είδος του χρησιμοποιούμενου acsf, ενώ υπάρχει διαφοροποίηση στις μεγαλύτερες εντάσεις ρεύματος όπου η απόκριση των νευρώνων είναι ανάλογη της εντάσεως, αν και όσον αφορά το είδος του acsf δε φαίνεται κάποια αξιολογή διαφορά. Με άλλα λόγια, οι νευρώνες της περιοχής αποκρίνονται ανάλογα την ένταση του εφαρμοζόμενου ρεύματος, όπου αυξάνεται η απόκριση σε μεγαλύτερες εντάσεις, αλλά η χρήση διαφορετικής σύστασης acsf δε φαίνεται να παίζει ουσιαστικό ρόλο στην απόκριση (τουλάχιστον μέχρι την ένταση ρεύματος 0,3 mA).

Αυτή η παρατήρηση επιβεβαιώνεται και από το παρακάτω γράφημα (γράφ. 2) το οποίο λαμβάνει υπόψη του τον μέσο όρο (δύο μετρήσεις με διαφορά ενός λεπτού, για κάθε ένταση ρεύματος) των αποκρίσεων σε απλούς παλμούς διαφορετικής εντάσεως. Το αποτέλεσμα δείχνει παρόμοιο με τη προηγούμενη παρατήρηση. Η απόκριση είναι ανάλογη της εντάσεως, αν και στα μεγαλύτερης έντασης ρεύματα υπάρχει μεγάλη διασπορά, πράγμα που δείχνει πως αυτή η εκθετική αύξηση συνεχίζεται ως ένα σημείο, πέραν του οποίου η απόκριση δεν είναι ανάλογη της εφαρμοζόμενης έντασης ρεύματος.



Γράφημα 2. Απόκριση των νευρώνων της στοιβάδας II του προμετωπιαίου φλοιού σε κανονικό acsf (μπλε) και up and down states acsf (γκρι) σε διαφορετικές εντάσεις ρεύματος.

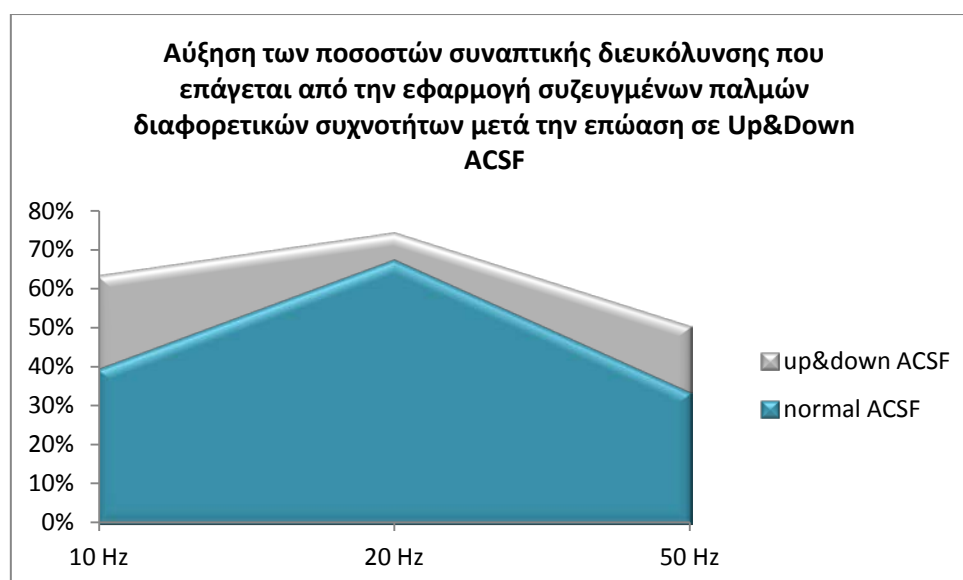
Το αποτέλεσμα της μέτρησης των αποκρίσεων στους συζευγμένους παλμούς αυξανόμενων συχνοτήτων (10, 20 και 50 Hz) ενισχύει τη παρατήρηση ότι το είδος του χρησιμοποιούμενου acsf δεν επηρεάζει σημαντικά την απόκριση των νευρώνων στα εφαρμοζόμενα τεχνητά ερεθίσματα. Βάσει του γραφήματος φαίνεται μια μικρή αύξηση στον



Γράφημα 3. Αποκρίσεις νευρώνων του προμετωπιαίου φλοιού σε αυξανόμενης συχνότητας συζευγμένους παλμούς.

ρυθμό, το οποίο δηλώνει συναπτική διευκόλυνση (αφού βρίσκεται πάνω από τη τιμή 1), όταν χρησιμοποιείται το up and down acsf. Ωστόσο, μόνο στη περίπτωση της συχνότητας των 10 Hz αυτή η διαφορά έχει τάση για στατιστικά σημαντική (βάσει της συνάρτησης TTEST).

Αυξημένη συναπτική διευκόλυνση (η οποία βάση του προγράμματος IGOR PRO αντιστοιχεί στην ισότητα xreak2-xreak1) παρατηρείται στη περίπτωση επώασης των τομών σε up and down acsf βάση των αποτελεσμάτων του γραφήματος 4. Υπάρχει σαφή αύξηση κατά περίπου 20% στο ποσοστό της συναπτικής διευκόλυνσης η οποία επάγεται από την εφαρμογή συζευγμένων παλμών διαφορετικών συχνοτήτων μετά την επώαση σε Up&Down ACSF.



Γράφημα 4. Συναπτική διευκόλυνση των νευρώνων (εκφρασμένη σε ποσοστό) μετά την εφαρμογή συζευγμένων παλμών αυξανόμενης συχνότητας όταν οι τομές καταγράφονταν επωασμένες σε κανονικό (μπλε) και up and down state's acsf (γκρι).

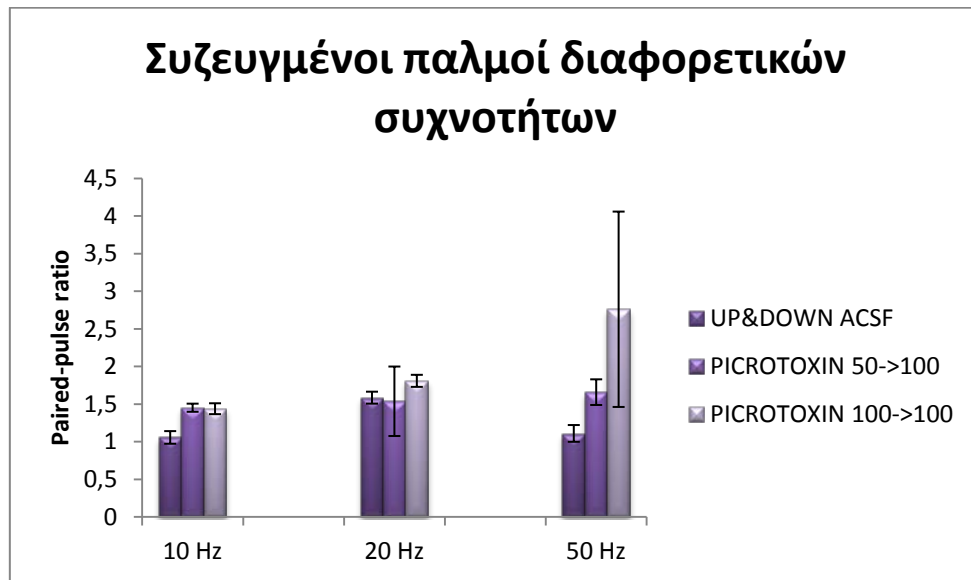
4.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΗΝ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΝΕΥΡΩΝΩΝ

4.2.1 PICROTOXIN

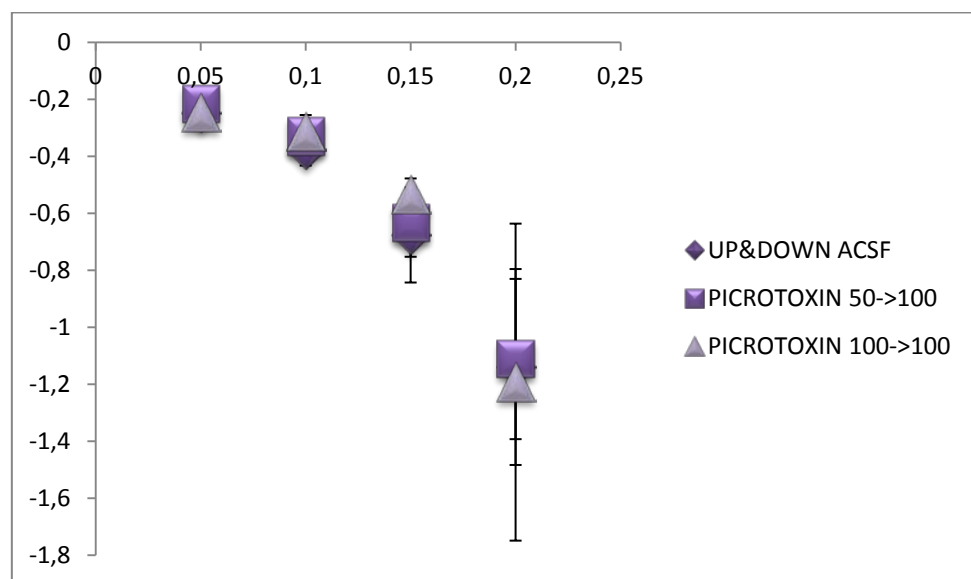
Η πικροτοξίνη (picrotoxin) είναι μια δηλητηριώδης κρυσταλλική φυτική ένωση, με ισχυρή δράση. Λειτουργεί ως μη-συναγωνιστικός αγωνιστής των GABA_A υποδοχέων (ιοντοτρόπος υποδοχέας που ελέγχει έναν διάυλο χλωρίου). Όντας το GABA (προσδέεται στους GABA_A υποδοχείς) ένας ανασταλτικός διαβιβαστής, η έγχυση της πικροτοξίνης έχει αντίθετες επιδράσεις από εκείνες του GABA αφού προσδεμένο στον υποδοχέα αποτρέπει τη δέσμευση του GABA άρα και της αναστολής που επιφέρει (Ehrenberger et al., 1982).

Η επίδραση της πικροτοξίνης στη συναπτική διευκόλυνση φαίνεται να είναι ελαφρώς θετική σε σύγκριση με αυτή του up and down acsf. Όπως φαίνεται από το γράφημα 5, υπάρχει μια αύξηση (στατιστικά σημαντική) στο ρυθμό συζευγμένων παλμών σε acsf που περιέχει πικροτοξίνη σε σχέση με αυτό που δεν περιέχει, η οποία και φαίνεται ξεκάθαρα στη περίπτωση των 10 και 50 Hz. Στη περίπτωση του 20 Hz, αν και η πικροτοξίνη της πρώτης

αραιώσης (50 μl φαρμάκου σε 100 ml up&down states acsf) εμφανίζει μεγάλη διασπορά, ωστόσο, αν συγκριθεί ο ρυθμός διευκόλυνσης του up&down state acsf με αυτόν της πικροτοξίνης μικρότερης αραιώσης (100 μl σε 100 ml acsf), η διαφορά έχει τάση για στατιστικά σημαντική. Η σύγκριση των δύο αραιώσεων της πικροτοξίνης, αν και αναμένονταν να υπάρχει κάποια διαφορά, δείχνει πως η επίδραση της πικροτοξίνης διαφορετικών αραιώσεων στη συναπτική απόκριση είναι μη σημαντική, ή αλλιώς η πικροτοξίνη διαφορετικών αραιώσεων έχει παρόμοια αποτελέσματα. Αυτό φαίνεται και στο γράφημα 6, το οποίο δείχνει την απόκριση των νευρώνων ανάλογα την ένταση ρεύματος που εφαρμόζεται.



Γράφημα 5. Η επίδραση της φαρμακευτικής ουσίας πικροτοξίνη διαφορετικών αραιώσεων (ανοιχτόχρωμο μωβ: πικροτοξίνη 50 μl σε 100 ml up&down states acsf, γκρι: πικροτοξίνη 100 μl σε 100 ml) στην απόκριση των νευρώνων σε ερεθίσματα συζευγμένων παλμών διαφορετικών συχνοτήτων.



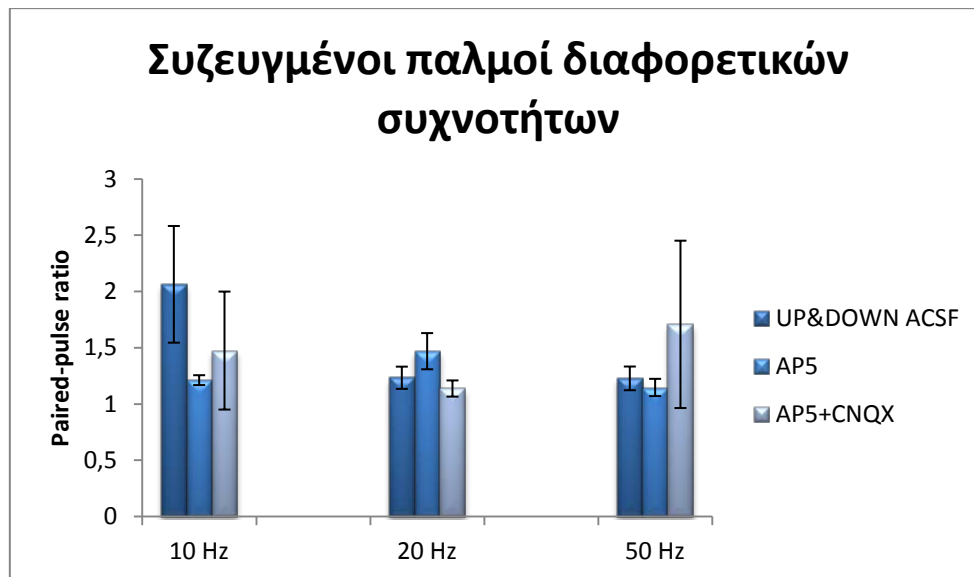
Γράφημα 6. Αποκρίσεις νευρώνων (σε mV) σε διάφορες εντάσεις ρεύματος (εκφρασμένες σε mA) με (δύο αραιώσεων-ανοιχτόχρωμο μωβ και γκρι) ή χωρίς (μωβ) την επώση των τομών σε acsf που περιέχει πικροτοξίνη.

4.2.2. AP5 και CNQX

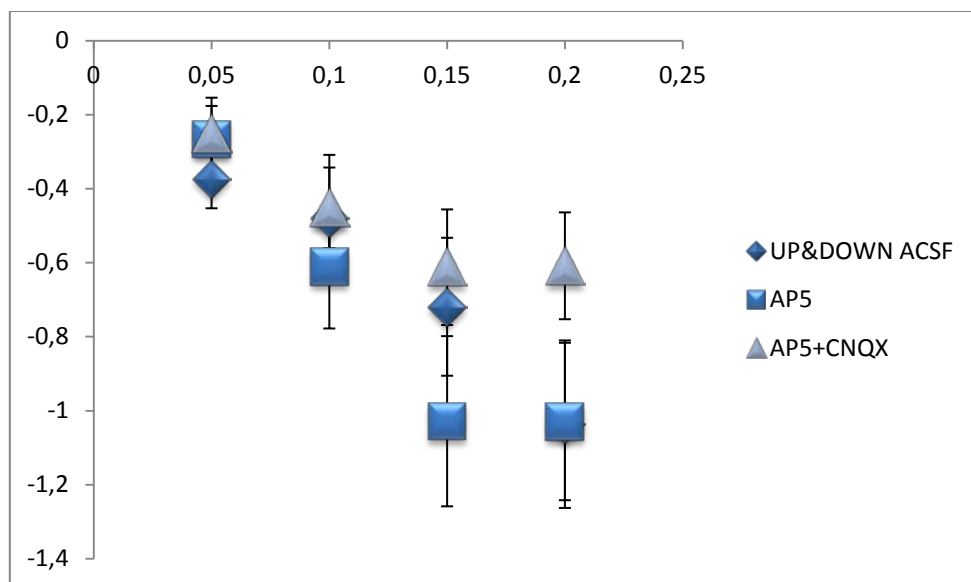
Η φαρμακολογική ουσία AP5 ή APV ((2*R*)-amino-5-phosphonovaleric acid; (2*R*)-amino-5-phosphonopentanoate) είναι ο επιλεκτικός ανταγωνιστής NMDA υποδοχέων (ιοντοτρόπος υποδοχέας του γλουταμινικού οξέος), το οποίο προσδένεται στη θέση δέσμευσης του γλουταμινικού, του φυσικού προσδέτη των υποδοχέων αυτών, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση των γεγονότων που θα μεσολαβούσαν μετά τη πρόσδεση του γλουταμινικού στον υποδοχέα του (Laube et al., 1997). Ο AP5 είναι ένας ισχυρός ανταγωνιστής αφού μπλοκάρει αποτελεσματικά σε μικρές συγκεντρώσεις λόγω της ταχείας δράσης του.

Η δράση της φαρμακολογικής ουσίας CNQX (6-cyano-7-nitroquinoline-2,3-dione) είναι η αποτελεσματική αναστολή των μη-NMDA ή AMPA υποδοχέων (ο δεύτερος ιοντοτρόπος υποδοχέας γλουταμινικού) (Imamachi et al., 1999).

Η επίδραση των δύο φαρμάκων στη συναπτική απόκριση δεν είναι εντελώς ξεκάθαρη βάση των αποτελεσμάτων (γράφ. 7 και 8). Ωστόσο, φαίνεται να υπάρχει μείωση της απόκρισης με χρήση του AP5 (γράφ. 7) στη περίπτωση των 10 Hz σε σύγκριση με αυτή χωρίς τη χρήση κανενός φαρμάκου (up&down state acsf), ενώ χρήση και των δύο φαρμακολογικών ουσιών μαζί προκαλεί ακόμη περισσότερη μείωση της απόκρισης (γράφ. 7: 10 Hz, μπλε και γκρι, και γράφ 8: η στήλη του 0,15 mA) μια και που οι δυο σημαντικότεροι υποδοχείς (NMDA και AMPA) στη μεταγωγή σήματος, έχουν μπλοκαριστεί.

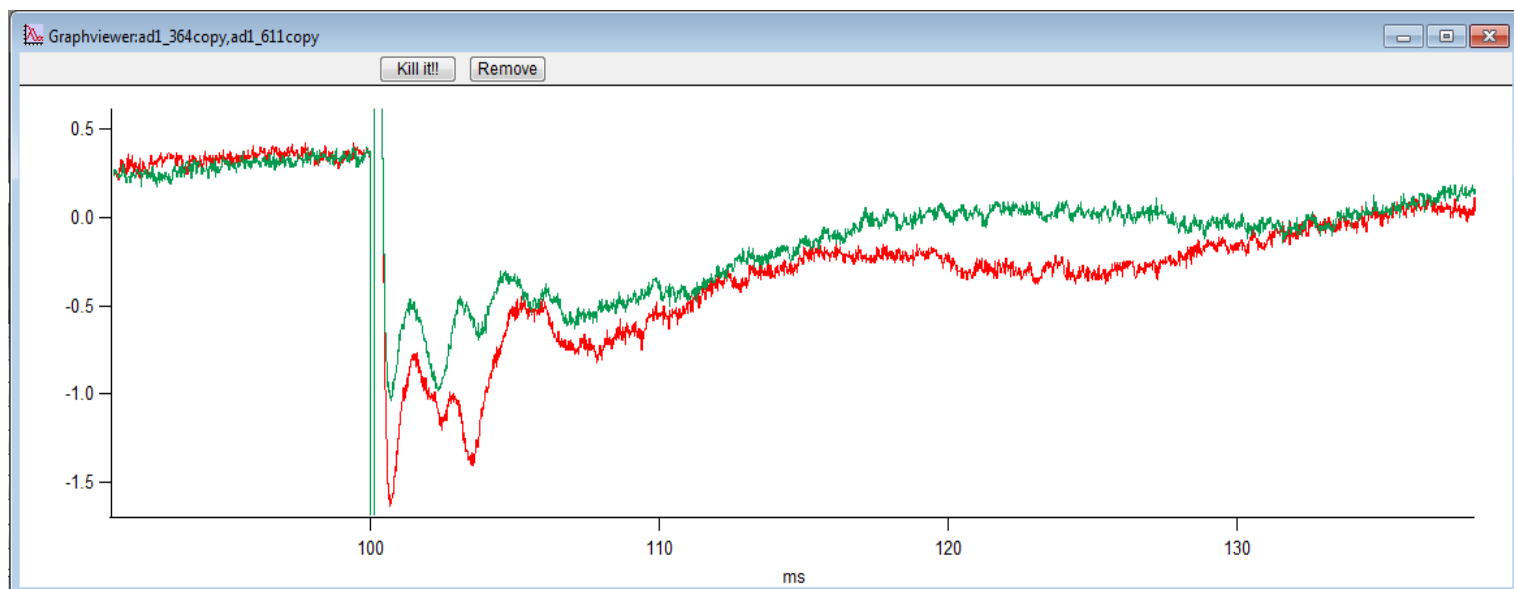


Γράφημα 7. Η επίδραση των φαρμακευτικών ουσιών AP5 και CNQX στην απόκριση των νευρώνων όταν διεγερθούν με συζευγμένους παλμούς διαφορετικών συχνοτήτων.

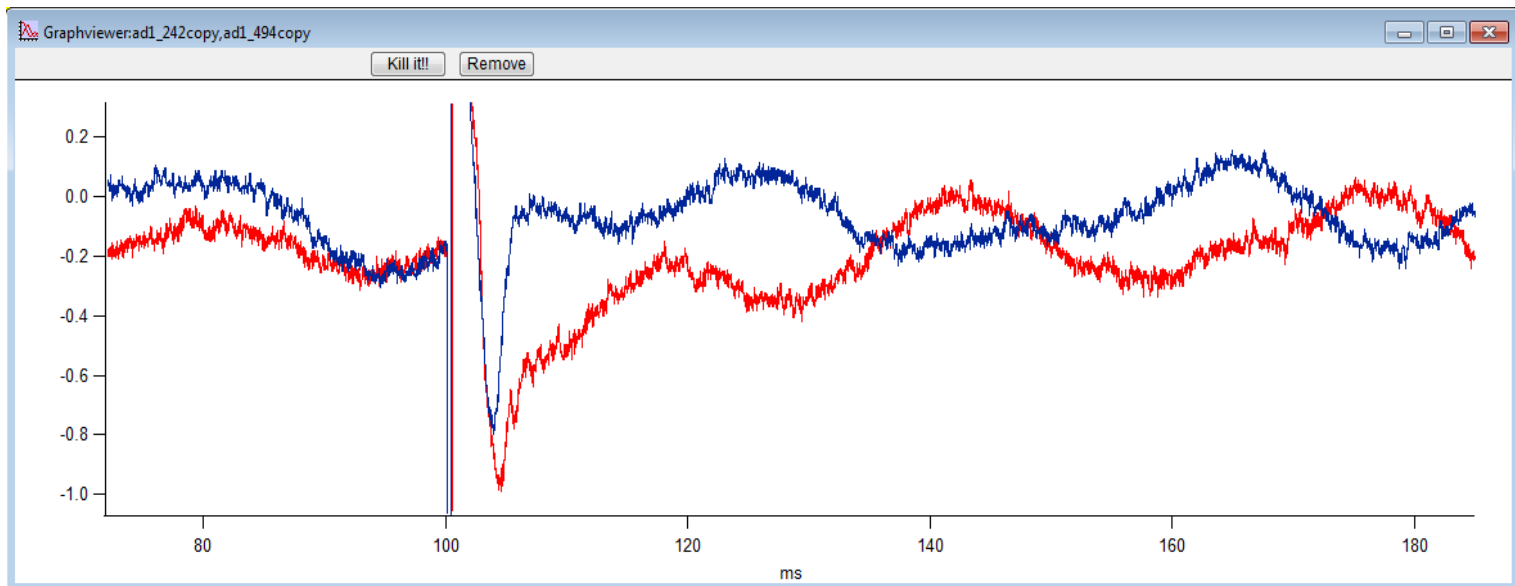


Γράφημα 8. Απόκριση (εκφρασμένη σε mV) σε διαφορετικές εντάσεις ρεύματος (σε mA) του νευρωνικού δικτύου στον προμετωπιαίο φλοιό, επωασμένες σε up&down states acsf (μπλε), acsf με AP5 (γαλάζιο) και acsf με AP5 και CNQX (γκρι).

Παρακάτω (Εικ. 4 και 5) φαίνονται οι αποκρίσεις των νευρώνων όπως αυτά μετρήθηκαν στο χρησιμοποιούμενο πρόγραμμα, όπου φαίνεται η μείωση που προκαλεί το AP5 (Εικ. 4) καθώς και το AP5 σε συνδυασμό με το CNQX (Εικ. 5) όπου η μείωση είναι εντονότερη όπως αναμένονταν, στην απόκριση του νευρωνικού δικτύου σε σύγκριση με την απόκριση που λαμβάνεται όταν οι τομές είναι επωασμένες σε up&down states acsf.

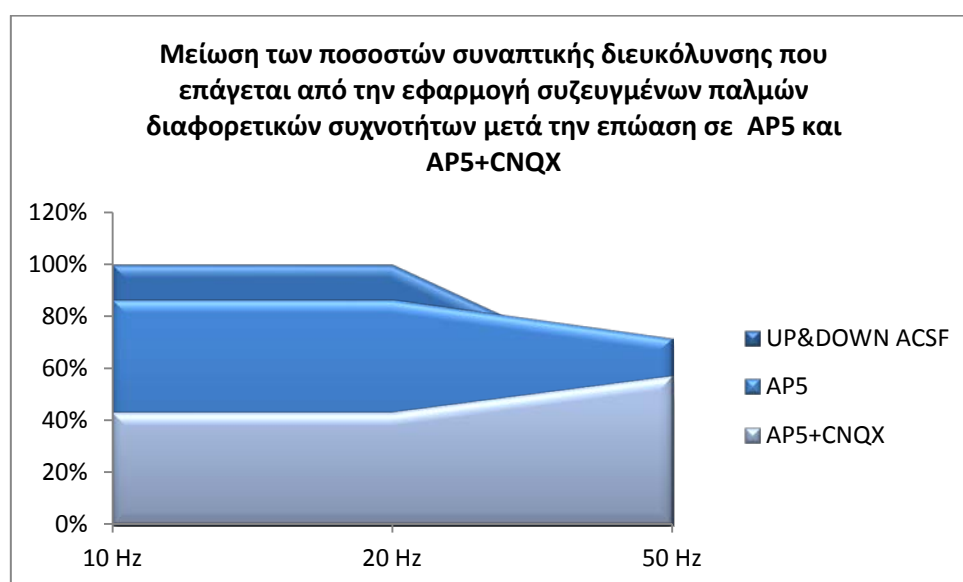


Εικόνα 4. Επίδραση της φαρμακολογικής ουσίας AP5 (πράσινο) στην απόκριση (εκφρασμένη σε mV) των νευρώνων της στοιβάδας II του προμετωπιαίου φλοιού, σε σχέση με την απόκριση όταν η τομή είναι επωασμένη σε up&down states acsf (κόκκινο). [Πραγματοποιήθηκε ερέθισμα απλού παλμού εντάσεως 0,15 mA. Το γράφημα δηλώνει δυναμικό (εκφρασμένη σε mV) σε σχέση με το χρόνο (σε ms)].



Εικόνα 5. Απόκριση των νευρώνων της στοιβάδας II του προμετωπιαίου φλοιού όταν η τομή είναι επωασμένη σε up&down states acsf (κόκκινο) και σε acsf που περιέχει AP5 και CNQX (μπλε). Φαίνεται η επίδραση που έχουν οι δυο αναστολείς. Πραγματοποιήθηκε τεχνητό ερέθισμα απλού παλμού εντάσεως 0,15 mA

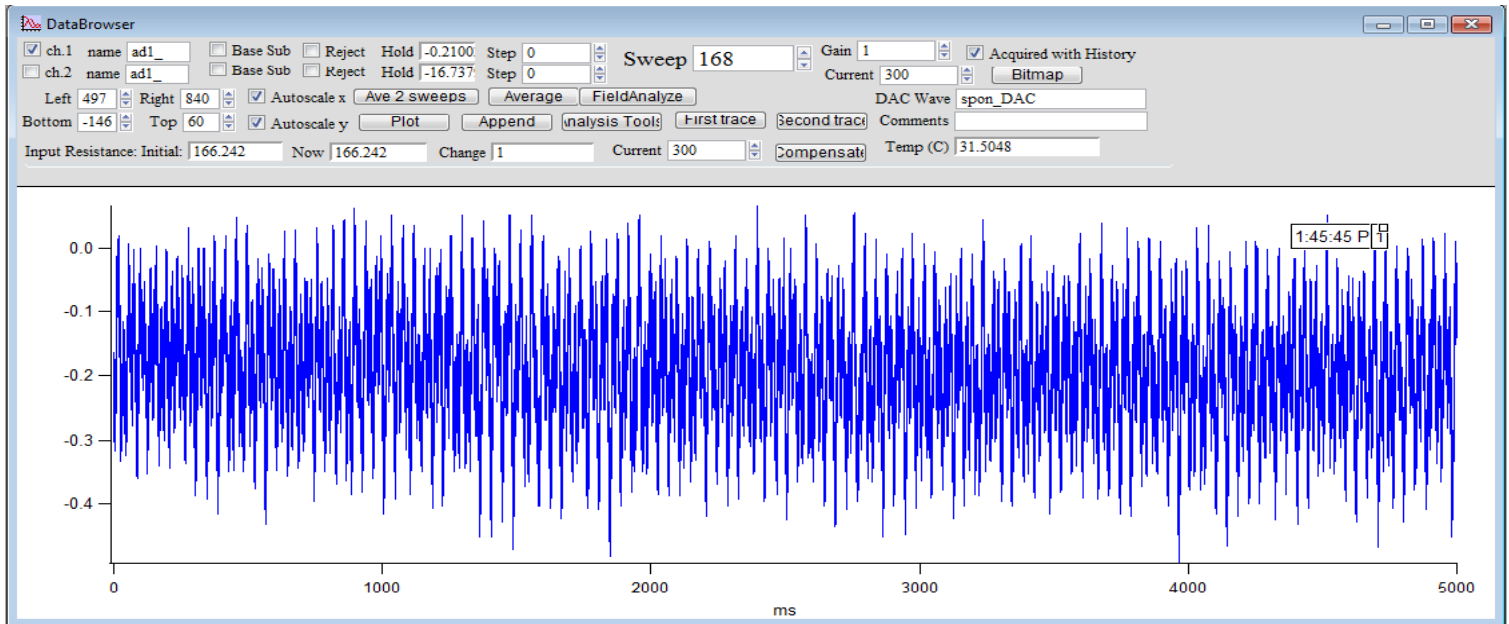
Η επίδραση των δύο φαρμακολογικών ουσιών στην απόκριση των νευρώνων φαίνεται λίγο καλύτερα στο παρακάτω γράφημα (γράφ. 9), το οποίο παρουσιάζει τη συναπτική διευκόλυνση (εκφρασμένη σε ποσοστά) στη περίπτωση χρήσης (γαλάζιο και γκρι) ή μη (μπλε) των δυο φαρμακολογικών ουσιών. Φαίνεται σαφή μείωση της συναπτικής διευκόλυνσης, καθώς μπλοκάρονται αρχικά οι NMDA (λόγω AP5) και έπειτα και οι AMPA υποδοχείς (λόγω CNQX) των νευρώνων.



Γράφημα 9. Ποσοστιαία συναπτική διευκόλυνση του νευρωνικού δικτύου μετά από εφαρμογή συζευγμένων παλμών, σε acsf χωρίς (μπλε) και acsf με φαρμακολογικές ουσίες (γαλάζιο: AP5, γκρι: AP5 και CNQX). Παρατηρείται αξιοσημείωτη μείωση στη συναπτική διευκόλυνση λόγω χρήσης των δυο αναστολέων των υποδοχέων.

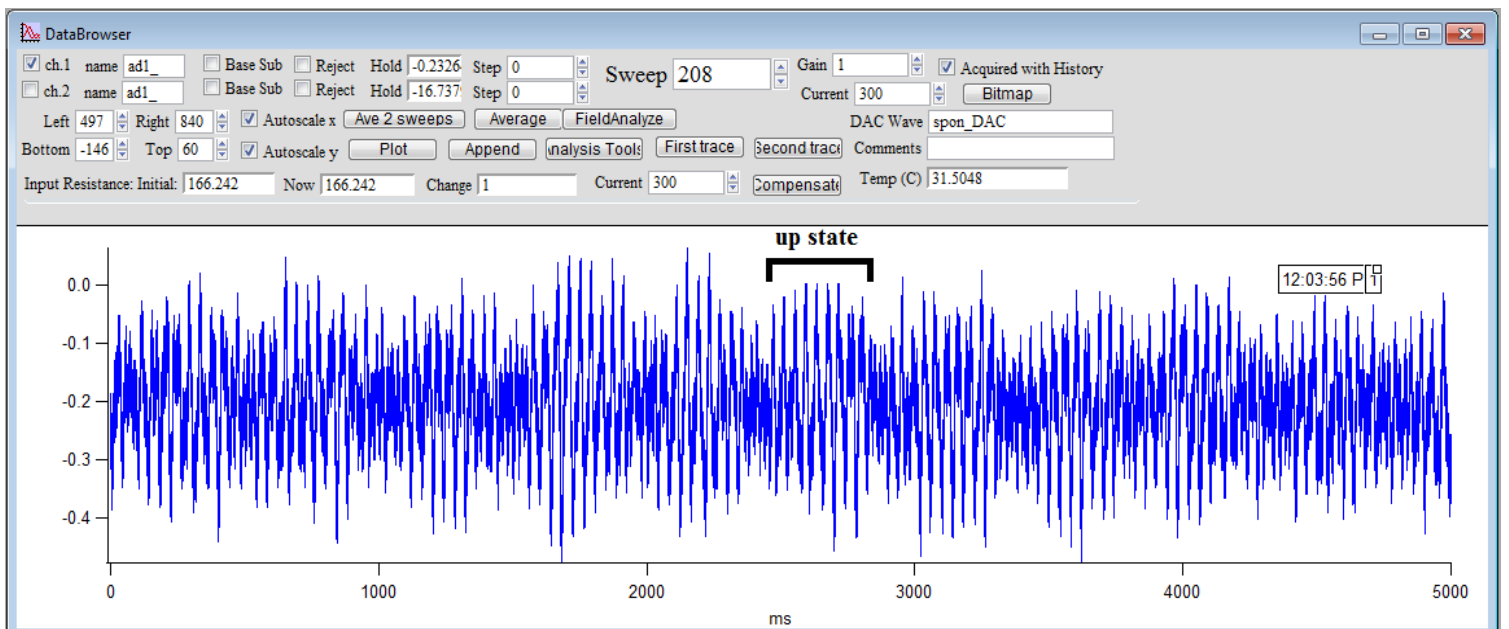
4.3. SPONTANEOUS ΚΑΤΑΓΡΑΦΕΣ (UP AND DOWN STATES)

Η αυθόρμητη δραστηριότητα των νευρώνων του προμετωπιαίου φλοιού δημιουργεί συγκεκριμένου τύπου ταλαντώσεις στις οποίες παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές up και down φάσεις.



Εικόνα 6. Γράφημα από το πρόγραμμα IGOR PRO 6.05 το οποίο είναι χαρακτηριστικό της απουσίας των up και down states.

Οι δυο εικόνες δείχνουν σαφέστατα τη διαφορά μεταξύ απουσίας (εικ. 6) και εμφάνισης (εικ. 7) των δυο φάσεων. Όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα, τα up states χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερο δυναμικό και



Εικόνα 7. Γράφημα από το πρόγραμμα IGOR PRO 6.05 το οποίο δείχνει τα up και down states που εμφανίζουν οι νευρώνες της μελετούμενης περιοχής του προμετωπιαίου φλοιού, στη καταγεγραμμένη χρονική διάρκεια (5000 ms). Φαίνονται ξεκάθαρα τα up states και οι μικρής έντασης και διάρκειας ταλαντώσεις (down states) μεταξύ αυτών. [Το γράφημα δείχνει το δυναμικό μεμβράνης σε mV (άξονας ψ) σε σχέση με το χρόνο].

μεγαλύτερη διάρκεια και σχέση με τα down states που παρεμβάλλονται μεταξύ δυο διαδοχικών up states, τα οποία αντιστοιχούν σε κάποιου είδους περίοδο αποσιώπησης.

Για την εξέταση αυτής της spontaneous δραστηριότητας χρησιμοποιήθηκαν δυο acsf (βλ. Υλικά και Μέθοδοι), κανονική και up&down state acsf, όπου αυτό που παρατηρήθηκε ήταν ότι τα up και down states εμφανίζονται και στις δυο περιπτώσεις. Ωστόσο, η πιθανότητα εμφάνισης τους αυξάνεται κατά πολύ όταν οι τομές επωάζονται σε up&down state acsf, πράγμα που υποστηρίζει ότι αυτό το acsf κατά κάποιο τρόπο ενισχύει την εμφάνιση τους. Αυτό που παρατηρείται από τα αποτελέσματα των μετρήσεων, είναι ότι αυτές οι δύο καταστάσεις εμφανίζονται περισσότερο στο ειδικό acsf παρά στο κανονικό, αφού υπάρχουν περιπτώσεις μη εμφάνισης των up και down states σε κανονικό acsf ενώ παρατηρούνται μετά την αλλαγή του acsf στην ίδια τομή.

Η χρήση των φαρμακευτικών ουσιών PICROTOXIN, AP5 και CNQX κατά τις spontaneous καταγραφές, δε φαίνεται να είχαν κάποια επίδραση στην εμφάνιση των up και down states, αφού αυτά στη πλειοψηφία των μετρήσεων καταγράφηκαν κανονικά. Υπήρξαν ωστόσο, και περιπτώσεις όπου καταγράφηκαν κάποια up και down states σε acsf ελεύθερο φαρμάκων (μόνο στη περίπτωση χρήσης των AP5 και CNQX, ανάλογη παρατήρηση για τη πικροτοξίνη δεν έγινε), ενώ μετά τη χρήση των φαρμακευτικών ουσιών (αλλαγή του acsf στην ίδια τομή με αυτό που περιέχει τους αναστολείς) δεν παρατηρήθηκαν αυτές οι δυο φάσεις. Η επίδραση του AP5 μόνο του και σε συνδυασμό με το CNQX στις spontaneous καταγραφές είχε παρόμοια αποτελέσματα. Δεν υπήρξε περίπτωση εμφάνισης up και down states με χρήση του AP5 και απουσία αυτών μετά την αλλαγή του acsf σε acsf που περιείχε AP5 και CNQX μαζί, και αντίστροφα.

5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ/ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Φαίνεται πως, βάσει των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης, η χρήση του up και down states acsf προκαλεί την αύξηση σε κάποιο βαθμό της απόκρισης των νευρώνων κατά την εφαρμογή τεχνητών ερεθισμάτων απλού παλμού κυρίως μεγάλης εντάσεως (από 0,3mA και άνω). Αυτό φαίνεται και λογικό αφού στις μικρές εντάσεις ρεύματος οι νευρώνες αποκρίνονται κατά το ελάχιστο, μια και που ένα τέτοιο σχετικά ασθενές ερέθισμα δεν μπορεί να ενεργοποιήσει πλήρως έναν νευρώνα, ο οποίος θα πρέπει να μεταβάλλει το δυναμικό μεμβράνης του με σκοπό να δημιουργήσει δυναμικό ενεργείας ή απλά ένα συναπτικό δυναμικό. Οπότε όσο ισχυρότερο το ερέθισμα τόσο μεγαλύτερη θα είναι και η απόκριση των νευρώνων. Βέβαια, αυτό ισχύει ως ένα σημείο πέραν του οποίου αυτή η αναλογία δεν ισχύει, γι' αυτό και δεν χρησιμοποιήθηκαν ρεύματα άνω των 0,4 mA.

Αυτή η διαφοροποίηση στην απόκριση των νευρώνων με αλλαγή του acsf φαίνεται και από την εφαρμογή συζευγμένων παλμών διαφορετικών συχνοτήτων (10, 20 και 50 Hz). Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της απόκρισης σε συζευγμένους παλμούς όταν οι τομές διατηρούνταν σε κανονικό acsf και όταν διατηρούνταν σε up και down states acsf παρατηρήθηκε κυρίως σε παλμούς συχνότητας 10 Hz (γραφ. 3), ενώ στις άλλες συχνότητες οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο μικρό μέγεθος δείγματος στο οποίο στηρίχτηκαν τα αποτελέσματα αυτά. Βάση των αποτελεσμάτων από την εφαρμογή των συζευγμένων παλμών, βρέθηκε επίσης, αύξηση στο ποσοστό της συναπτικής διευκόλυνσης όταν χρησιμοποιούνταν up και down states acsf αντί του κανονικού. Ωστόσο, και αυτό δεν αποτελεί κανόνα, αλλά θα πρέπει να γίνουν περαιτέρω σχετικές μελέτες για τη διεξαγωγή ασφαλέστερων αποτελεσμάτων.

Το up και down states acsf φαίνεται να παίζει καίριο ρόλο στην εμφάνιση των χαρακτηριστικών up και down φάσεων, όπου ενισχύει στην ουσία την εμφάνιση ή παρατήρηση αυτών στις καταγραφές. Βάση των αποτελεσμάτων, αυτό γίνεται ευνόητο όταν παρατηρούνται up and down states στη μεγαλύτερη πλειοψηφία των καταγραφών σε up and down states acsf και λιγότερο σε καταγραφές με κανονικό acsf. Παρόμοια αυθόρμητη δραστηριότητα έχει καταγραφεί και από άλλους ερευνητές (Sanchez-Vives and McCormick, 2000; Compte et al., 2003; Shu et al., 2003) όταν οι τομές διατηρούνταν σε acsf ανάλογο του up και down states acsf που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα μελέτη.

Τα αποτελέσματα για τις spontaneous καταγραφές βασίστηκαν στην εξέταση για ύπαρξη ή μη των up και down states στη κάθε μέτρηση που πραγματοποιήθηκε. Δεν εξετάστηκε πως η αλλαγή του acsf από κανονικό σε up and down states acsf και η χρήση φαρμακολογικών ουσιών επηρεάζουν τη συχνότητα των up και των down states στη κάθε μέτρηση, τη διάρκεια και την εκπόλωση του κάθε up state, όπου μια τέτοια ανάλυση απαιτεί ένα εξειδικευμένο λογισμικό για διεξαγωγή αξιόπιστων συμπερασμάτων.

Επίδραση σε κάποιο βαθμό στην εμφάνιση των up και down states, φαίνεται να έχει η αύξηση της συγκέντρωσης του χλωριούχου καλίου (KCl) του κανονικού acsf (από 0,13γρ σε 0,14γρ για μισό λίτρο acsf) και η αύξηση της θερμοκρασίας του acsf (από θερμοκρασία δωματίου στους 50°C στο υδατόλουτρο) κατά την επώαση των τομών κατά τη διάρκεια των μετρήσεων, όπου παρατηρήθηκε αύξηση στον αριθμό των εμφανίσεων των δυο φάσεων αυτών.

Η χρήση της φαρμακολογικής ουσίας CNQX οδηγεί σε ταχεία και πλήρη κατάργηση των up states στον οπτικό και προμετωπιαίο φλοιό (McCormick et al., 2003). Επίσης, η αναστολή των NMDA υποδοχέων (από το AP5) οδηγεί και αυτή στην εξαφάνιση των up states στον προμετωπιαίο φλοιό και σε εξαφάνιση ή μείωση αυτών στον οπτικό φλοιό (Sanchez-Vives and McCormick, 2000). Για τον λόγο αυτό η δημιουργία των up states βασίζεται στην ενεργοποίηση των NMDA και μη-NMDA υποδοχέων των νευρώνων γλουταμινεργικής σύναψης. Παρουσία ωστόσο, των CNQX και AP5 στο acsf, ένα υποσύνολο νευρώνων της στοιβάδας V παραμένουν αυθόρμητα ενεργά (Compte et al., 2003) πιθανόν μέσω εσωτερικών ιοντικών μηχανισμών. Όπως υποστηρίζουν οι McCormick et al., (2003) αυτή οι αυθόρμητα ενεργοποιημένοι νευρώνες της στοιβάδας V συμμετέχουν στην έναρξη των αυθόρμητα παραγόμενων up states. Αν παρόμοιο φαινόμενο λαμβάνει χώρα και στη στοιβάδα II (στην οποία εστιάστηκε η παρούσα μελέτη) του προμετωπιαίου φλοιού, δηλαδή να παραμένει αυθόρμητα ενεργό κάποιο σύνολο νευρώνων της στοιβάδας αυτής, αυτό θα εξηγούσε το γεγονός ότι στη παρούσα μελέτη βρέθηκε μη επίδραση των φαρμακολογικών ουσιών CNQX και AP5 στην εμφάνιση των up και down states.

Σε αντίθεση με τις επιδράσεις των ιοντοτρόπων υποδοχέων γλουταμινικού, τοπική ή πλήρη επώαση των τομών με acsf που περιέχει αναστολείς $GABA_A$ υποδοχέων (πικροτοξίνη, bicuculline) οδηγεί στη μετάβαση από up states σε επιληπτικού τύπου δραστηριότητα συμπεριλαμβανομένου παροξυσμικών συνεχών πυροδοτήσεων (paroxysmal bursts of spikes) και διεγερτικών μετασυναπτικών δυναμικών (Sanchez-Vives and McCormick, 2000). Αυτή η παρατήρηση δεν υποστηρίζεται από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, όπου βρέθηκε η πικροτοξίνη να μην έχει ιδιαίτερη επίδραση στην εμφάνιση των up και down states. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι το δείγμα στο οποίο στηρίχθηκαν τα αποτελέσματα αυτά, δεν ήταν αρκετά ικανοποιητικό, καθώς και στη συγκέντρωση της πικροτοξίνης που χρησιμοποιήθηκε εδώ η οποία πιθανόν να διέφερε με αυτήν που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα των εκάστοτε ερευνητών.

6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Amit DJ, Brunel N: **Model of global spontaneous activity and local structured activity during delay periods in the cerebral cortex.** Cereb Cortex 1997, 7: 237–252.
- Anderson JS, Carandini M, Ferster D: **Orientation tuning of input conductance, excitation, and inhibition in cat primary visual cortex.** J Neurophysiol 2000, 84:909–926.
- Bazhenov M Timofeev I Steriade M Sejnowski TJ: **Model of thalamocortical slow-wave sleep oscillations and transitions to activated states.** J. Neurosci 2002, 22:8691-8704
- Beaulieu C: **Numerical data on neocortical neurons in adult rat, with special reference to the GABA population.** Brain research 1993, 609(1-2):284-292.
- Bernander O, Douglas RJ, Martin KAC, Koch C: **Synaptic background activity influences spatiotemporal integration in single pyramidal cells.** Proc Natl Acad Sci USA 1991, 88:11569–11573
- Bugbee NM, Goldman-Rakic PS: **Columnar organization of corticocortical projections in squirrel and rhesus monkeys: similarity of column width in species differing in cortical volume.** The Journal of comparative neurology 1983, 220(3):355-364.
- Brunel N, Wang XJ: **Effects of neuromodulation in a cortical network model of object working memory dominated by recurrent inhibition.** J Comp Neurosci 2001, 11:63–85.
- Cauli B, Audinat E, Lambolez B, Angulo MC, Ropert N, Tsuzuki K, Hestrin S, Rossier J: **Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells.** J Neurosci 1997, 17(10):3894-3906
- Camperi M, Wang X-J: **A model of visuospatial memory in prefrontal cortex: recurrent network and cellular bistability.** J Comp Neurosci 1998, 5:383–405.
- Chance FS, Abbott LF, ReyesAD: **Gain modulation from background synaptic input.** Neuron 2002, 35:773–782.
- Compte A, Sanchez-Vives MV, McCormick DA, Wang XJ: **Cellular and network mechanisms of slow oscillatory activity (<1 Hz) in a cortical network model.** J Neurophysiol 2003 (n press).
- Compte A, Brunel N, Goldman-Rakic PS, Wang X-J: **Synaptic mechanisms and network dynamics underlying spatial working memory in a cortical network model.** Cereb Cortex 2000, 10:910–923.
- Connors, B.W. and Gutnick, M.J.: **Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons.** Trends in neurosciences 1990, 13(3):99-104.

- Contreras D, Steriade M: **Cellular basis of EEG slow rhythms, a study of dynamic corticothalamic relationships.** J Neurosci 1995, 15:604–622.
- Contreras D, Timofeev I, Steriade M: **Mechanisms of long lasting hyperpolarizations underlying slow sleep oscillations in cat corticothalamic networks.** J Physiol (Lond) 1996, 494:251–264.
- Cowan RL, Wilson CJ: **Spontaneous firing patterns and axonal projections of single corticostriatal neurons in the rat medial agranular cortex.** J Neurophysiol 1994, 71:17–32.
- DeFelipe J, Farinas I: **The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs.** Progress in neurobiology 1992, 39(6):563-607.
- DeFelipe J: **Neocortical neuronal diversity: chemical heterogeneity revealed by colocalization studies of classic neurotransmitters, neuropeptides, calcium-binding proteins, and cell surface molecules.** Cereb Cortex 1993, 3(4):273-289.
- DeFelipe J: **Cortical interneurons: from Cajal to 2001.** Prog Brain Res 2002, 136:215-238.
- Demeulemeester H, Vandesande F, Orban GA, Heizmann CW, Pochet R: **Calbindin D-28K and parvalbumin immunoreactivity is confined to two separate neuronal subpopulations in the cat visual cortex, whereas partial coexistence is shown in the dorsal lateral geniculate nucleus.** Neuroscience letters 1989, 99(1-2):6-11.
- Destexhe A, Pare´ D: **Impact of network activity on the integrative properties of neocortical pyramidal neurons in vivo.** J Neurophysiol 1999, 81:1531–1547.
- Destexhe A, Rudolph M, Fellous J-M, Sejnowski TJ: **Fluctuating synaptic conductances recreate in vivo-like activity in neocortical neurons.** Neuroscience 2001, 107:13–24.
- Destexhe A, Rudolph M, Pare D: **The high-conductance state of neocortical neurons in vivo.** Nat. Rev. Neurosci 2003, 4:739-751.
- Durstewitz D, Seamans JK, Sejnowski TJ: **Neurocomputational models of working memory.** Nat Neurosci 2000, 3:1184–1191
- Edgley SA & Lidiert M: **The discharges of cerebellar Golgi cells during locomotion in the cat.** J Physiol 1987, 392, 315–332.
- Ehrenberger K., Benkoe E., Felix D.: **Suppressive Action of Picrotoxin, a GABA Antagonist, on Labyrinthine Spontaneous Nystagmus and Vertigo in Man.** Acta Oto-Laryngologica 1982, 93 (3–4): 269–273

- Feldman ML, Peters A: **The forms of non-pyramidal neurons in the visual cortex of the rat.** The Journal of comparative neurology 1978, 179(4):761-793
- Fellous JM, Rudolph M, Destexhe A, Sejnowski TJ: **Synaptic background noise controls the input/output characteristics of single cells in an in vitro model of in vivo activity.** Neuroscience 2003, in press.
- Forti Lia, Cesana Elisabetta, Mapelli Jonathan, D'Angelo Egidio: **Ionic mechanisms of autorhythmic firing in rat cerebellar Golgi cells.** J Physiol 2006, 574.3
- Fuster JM, Jervey JP: **Inferotemporal neurons distinguish and retain behaviorally relevant features of visual stimuli.** Science 1981, 212:952–955.
- Fuster JM: **Memory in the cerebral cortex.** Cambridge 1995, MA: MIT Press.
- Goldman-Rakic PS: **Architecture of the prefrontal cortex and the central executive.** Annals of the New York Academy of Sciences 1995, 769:71-83.
- Goldman PS, Nauta WJ: **Columnar distribution of cortico-cortical fibers in the frontal association, limbic, and motor cortex of the developing rhesus monkey.** Brain research 1977, 122(3):393-413.
- Gutkin BS, Laing CR, Colby CL, Show CC, Ermentrout GB: **Turning on and off with excitation: the role of spike-timing asynchrony and synchrony in sustained neural activity.** J Comp Neurosci 2001, 11:121–134.
- Gupta A, Wang Y, Markram H: **Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons and synapses in the neocortex.** Science New York, NY 2000, 287(5451):273-278.
- Imamachi Noritaka, Yoji Saito, Kaoru Hara, Shinichi Sakura, Yoshihiro Kosaka: **The Non-NMDA Glutamate Receptor Antagonist CNQX Augments Lidocaine Antinociception Through a Spinal Action in Rats.** Anesth Analg 1999, 89:416 –21.
- Haider B, Duque A, Hasenstaub AR, McCormick DA: **Neocortical network activity in vivo is generated through a dynamic balance of excitation and inhibition.** J. Neurosci 2006, 26:4535-4545
- Haj-Dahmane S, Andrade R (1998) **Ionic mechanism of the slow afterdepolarization induced by muscarinic receptor activation in rat prefrontal cortex.** J Neurophysiol 80:1197–1210.
- Hendry SH, Jones EG, DeFelipe J, Schmechel D, Brandon C, Emson PC: **Neuropeptide-containing neurons of the cerebral cortex are also GABAergic.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1984a, 81(20):6526-6530.
- Hendry SH, Jones EG, Emson PC: **Morphology, distribution, and synaptic relations of somatostatin- and neuropeptide Y-immunoreactive neurons in rat and monkey neocortex.** J Neurosci 1984b, 4(10):2497-2517.

- Hikosaka O, Sakamoto M, Usui S: **Functional properties of monkey caudate neurons. III. Activities related to expectation of target and reward.** J Neurophysiol 1989, 61:814–832.
- Hirata Y, Sawaguchi T: **Functional columns in the primate prefrontal cortex revealed by optical imaging in vitro.** Neuroscience research 2008, 61(1):1-10.
- Holcman D and Tsodyks M: **The emergence of up and down states in cortical networks.** PLOS Computational Biology 2006, 2:174-181.
- Jones EG, Hendry SH: **Peptide-containing neurons of the primate cerebral cortex.** Research publications - Association for Research in Nervous and Mental Disease 1986, 64:163-178
- Jones EG: **Varieties and distribution of non-pyramidal cells in the somatic sensory cortex of the squirrel monkey.** The Journal of comparative neurology 1975, 160(2):205-267
- Karagogeos D, Vidaki M, Doulgeraki K, Tybulevicz V, Kessaris N, Pachnis V: **Rac1 function in cortical interneuron development.** In FENS Forum 2010; Amsterdam; 2010.
- Kawaguchi Y: **Groupings of nonpyramidal and pyramidal cells with specific physiological and morphological characteristics in rat frontal cortex.** Journal of neurophysiology 1993, 69(2):416-431
- Kawaguchi Y, Kubota Y: **Correlation of physiological subgroupings of nonpyramidal cells with parvalbumin- and calbindinD28k-immunoreactive neurons in layer V of rat frontal cortex.** Journal of neurophysiology 1993, 70(1):387-396.
- Kawaguchi Y, Kubota Y: **Physiological and morphological identification of somatostatin- or vasoactive intestinal polypeptide-containing cells among GABAergic cell subtypes in rat frontal cortex.** J Neurosci 1996, 16(8):2701-2715.
- Kawaguchi Y, Kubota Y: **GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex.** Cereb Cortex 1997, 7(6):476-486.
- Laube, B; Hirai H, Sturgess M, Betz H, Kuhse J: **Molecular determinants of antagonists discrimination by NMDA receptor subunits: Analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit.** Neuron 1997, 18 (3): 493–503.
- Lisman JE, Fellous J-M, Wang X-J: **A role for NMDA-receptor channels in working memory.** Nat Neurosci 1998, 4:273–275.
- Llinas RR: **The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function.** Science New York, NY 1988, 242(4886):1654-1664.

- Lund JS, Wu CQ: **Local circuit neurons of macaque monkey striate cortex: IV. Neurons of laminae 1-3A.** J Comp Neurol 384: 109–126, 1997.
- Mainen ZF, Sejnowski TJ: **Influence of dendritic structure on firing pattern in model neocortical neurons.** Nature 1996, 382(6589):363-366.
- Marder E, Abbott LF, Turrigiano GG, Liu Z, Golowasch J: **Memory from dynamics of intrinsic membrane currents.** Proc Natl Acad Sci USA 1996, 93:13481–13486.
- Martin KA, Whitteridge D: **Form, function and intracortical projections of spiny neurones in the striate visual cortex of the cat.** The Journal of physiology 1984, 353:463-504.
- McCormick DA, Connors BW, Lighthall JW, Prince DA: **Comparative electrophysiology of pyramidal and sparsely spiny stellate neurons of the neocortex.** Journal of neurophysiology 1985, 54(4):782-806.
- McCormick David A., Yousheng Shu, Andrea Hasenstaub, Mavi Sanchez-Vives, Mathilde Badoual, Thierry Bal: **Persistent cortical activity: mechanisms of generation and effects on neuronal excitability.** Cerebral Cortex 2003;13:1219–1231.
- Metherate R, Ashe JH: **Ionic flux contributions to neocortical slow waves and nucleus basalis-mediated activation: whole-cell recordings in vivo.** J Neurosci 1993, 13:5312–5323.
- Miles FA, Fuller JH, Braitman DJ, Dow BM: **Long-term adaptive changes in primate vestibuloocular reflex. III. Electrophysiological observations in flocculus of normal monkeys.** J Neurophysiol 1980, 43, 1437–1476
- Peters A, Jones EG: **Classification of Cortical.** Plenum Pub Corp; 1984:107.
- Peters A, Sethares C: **Organization of pyramidal neurons in area 17 of monkey visual cortex.** The Journal of comparative neurology 1991, 306(1):1-23.
- Peters A, Fairen A: **Smooth and sparsely-spined stellate cells in the visual cortex of the rat: a study using a combined Golgi-electron microscopic technique.** The Journal of comparative neurology 1978, 181(1):129-171.
- Pesaran B, Pezaris JS, Sahani M, Mitra PP, Andersen RA: **Temporal structure in neuronal activity during working memory in macaque parietal cortex.** Nat Neurosci 2002, 5:805–811.
- Porter JT, Cauli B, Staiger JF, Lambolez B, Rossier J, Audinat E: **Properties of bipolar VIPergic interneurons and their excitation by pyramidal neurons in the rat neocortex.** The European journal of neuroscience 1998, 10(12):3617-3628.
- Ramirez JM, Tryba AK & Pena F: **Pacemaker neurons and neuronal networks: an integrative view.** Curr Opin Neurobiol 2004, 14, 665–674

- Ramnani Narender and Owen Adrian M.: **Anterior prefrontal cortex: insights into function from anatomy and neuroimaging**. Volume 5. Nature Publishing Group, 2004.
- Ren JQ, Aika Y, Heizmann CW, Kosaka T: **Quantitative analysis of neurons and glial cells in the rat somatosensory cortex, with special reference to GABAergic neurons and parvalbumin-containing neurons**. Experimental brain research Experimentelle Hirnforschung 1992, 92(1):1-14.
- Rigas P and Castro-Alamancos MA: **Thalamocortical up states: Differential effects of intrinsic and extrinsic cortical inputs on persistent activity**. J. Neurosci 2007, 27:4261-4272.
- Roberts AC, Robbins TW, Weiskrantz L, Royal Society . Discussion M, Royal society . Discussion m: **The prefrontal cortex: Executive and cognitive functions**: Hogrefe & Huber; 1998.
- Rogers JH, Resibois A: **Calretinin and calbindin-D28k in rat brain: patterns of partial co-localization**. Neuroscience 1992, 51(4):843-865.
- Rudolph M, Pospischil M, Timofeev I, Destexhe A: **Inhibition determines membrane potential dynamics and controls action potential generation in awake and sleeping cat cortex**. J. Neurosci 2007, 16:5280-5290.
- Sanchez-Vives MV, McCormick DA: **Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex**. Nat Neurosci 2000, 3:1027-1034.
- Sanchez-Vives MV, Nowak L, McCormick DA: **Membrane mechanisms underlying contrast adaptation in cat area 17 in vivo**. J Neurosci 2000, 20:4267-4285
- Sawaguchi T, Matsumura M, Kubota K: **Delayed response deficit in monkeys by locally disturbed prefrontal neuronal activity by bicuculline**. Behavioural brain research 1988, 31(2):193-198.
- Schüz, A.: **Neuroanatomy in a computational perspective**, in Handbook of Brain Theory and Neural Networks, 2nd ed., M.A. Arbib (ed.), pp. 733-737, Cambridge, MA: The MIT Press, 2003.
- Sidiropoulou K, Lu FM, Fowler MA, Xiao R, Phillips C, Ozkan ED, Zhu MX, White FJ, Cooper DC: **Dopamine modulates an mGluR5-mediated depolarization underlying prefrontal persistent activity**. Nature neuroscience 2009, 12(2):190-199.
- Somogyi P, Hodgson AJ, Smith AD, Nunzi MG, Gorio A, Wu JY: **Different populations of GABAergic neurons in the visual cortex and hippocampus of cat contain somatostatin- or cholecystokinin-immunoreactive material**. J Neurosci 1984, 4(10):2590-2603.
- Steriade M, Nunez A, Amzica F: **A novel slow (<1 Hz) oscillation of neocortical neurons in vivo: depolarizing and hyperpolarizing components**. J Neurosci 1993, 13:3252-3265.
- Steriade M, Timofeev I, Grenier F: **Natural waking and sleep states, a view from inside neocortical neurons**. J Neurophysiol 2001, 85:1969-1985.

- Stern EA, Kincaid AE, Wilson CJ: **Spontaneous subthreshold membrane potential fluctuations and action potential variability of rat corticostriatal and striatal neurons in vivo.** J Neurophysiol 1997, 77:1697–1715.
- Susan M. Courtney, Laurent Petit, James V. Haxby, Leslie G. Ungerleider: **The role of prefrontal cortex in working memory: examining the contents of consciousness.** Phil.Trans. R. Soc. Lond. B (1998) 353, 1819-1828.
- Surmeier DJ, Mercer JN, Chan CS: **Autonomous pacemakers in the basal ganglia: who needs excitatory synapses anyway?** Curr Opin Neurobiol 2005, 15, 312–318.
- Schulman JA & Bloom FE: **Golgi cells of the cerebellum are inhibited by inferior olive activity.** Brain Res 1981, 210, 350–355.
- Shu Y, Hasenstaub A, McCormick DA: **Turning on and off recurrent balanced cortical activity.** Nature 2003, 423:288–293.
- Timofeev I, Contreras D, Steriade M: **Synaptic responsiveness of cortical and thalamic neurons during different phases of slow sleep oscillation in cat.** J Physiol (Lond) 1996, 494:265–278.
- Thomson AM, Deuchars J: **Temporal and spatial properties of local circuits in neocortex.** Trends in neurosciences 1994, 17(3):119-126.
- Valverde F: **Intrinsic neocortical organization: some comparative aspects.** Neuroscience 1986, 18(1):1-23.
- Vos BP, Maex R, Volny-Luraghi A & De Schutter E: **Cerebellar Golgi cells in the rat: receptive fields and timing of responses to facial stimulation.** Eur J Neurosci 1999, 11, 2621–2634.
- Wang H, Stradtman GG, 3rd, Wang XJ, Gao WJ: **A specialized NMDA receptor function in layer 5 recurrent microcircuitry of the adult rat prefrontal cortex.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2008, 105(43):16791-16796.
- Wang X-J: **Synaptic basis of cortical persistent activity: the importance of NMDA receptors to working memory.** J Neurosci 1999, 19:9587–9603.
- Wang XJ: **Synaptic reverberation underlying mnemonic persistent activity.** Trends Neurosci 2001, 24: 455–463.
- Wells Richard B: **Cortical neurons and circuits: a tutorial introduction.** April, 2005.
- Yuste R, MacLean JN, Smith, J. and Lasner A: **The cortex as a central pattern generator.** Nature Reviews Neuroscience 2005, 6:477-483.