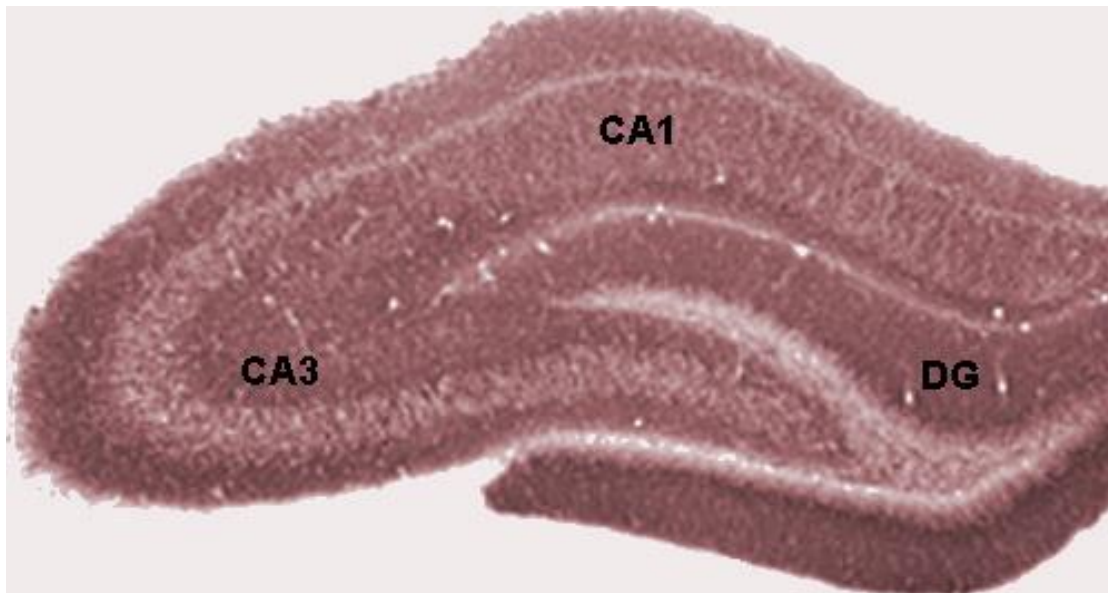




Επίδραση νευροστεροειδών στη συμπεριφορά
και στη μακρόχρονη ενδυνάμωση του
ιπποκάμπου σε ποντίκια

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



ΠΑΠΑΝΤΩΝΙΟΥ ΧΡΗΣΤΟΣ Α.Μ.: 1628

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΣΙΔΗΡΟΠΟΥΛΟΥ ΚΥΡΙΑΚΗ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Δομή ιπποκάμπου

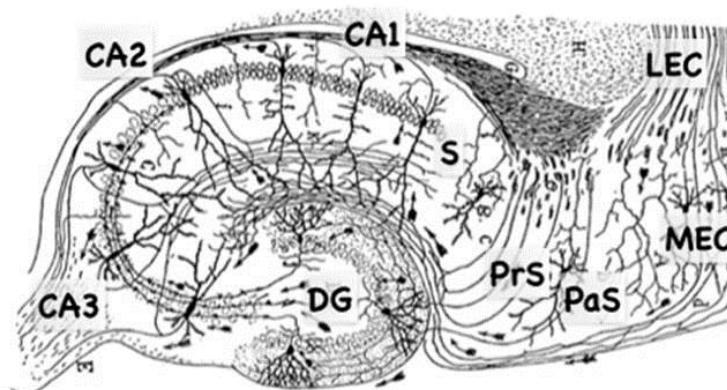
Ο ιπποκάμπος σχηματισμός είναι μια ομάδα περιοχών του εγκεφάλου και αποτελείται από τον ιππόκαμπο, το υπόθεμα, το προϋπόθεμα, το παραϋπόθεμα και τον ενδορινικό φλοιό. Η βασική διάταξη και τα ινώδη μονοπάτια του ιπποκάμπου σχηματισμού είναι κατά πολύ η ίδια σε όλα τα θηλαστικά (*The Hippocampus Book (Google eBook), 2007*).

Ο ιπποκάμπος αποτελείται από δυο κύρια μέρη, το Αμμώνιο κέρασ (cornu Ammonis) και την οδοντωτή έλικα (dentate gyrus) τα οποία διαχωρίζονται από την ιπποκάμπια αύλακα (hippocampal sulcus). Κάτω από την ιπποκάμπια αύλακα βρίσκεται το υπόθεμα, που καταλαμβάνει την έσω/ανώτερη καμπυλότητα της παραϊπποκάμπιας έλικας και διατρέχει άνω-πλαγίως στα όρια με τον ιππόκαμπο. Ο ιππόκαμπος, ο οποίος αντιπροσωπεύει τον αλλόφλοιο, διαχωρίζεται από τον κροταφικό νεοφλοιό (συγκεκριμένα τον ενδορινικό φλοιό και το υπόλοιπο από την παραϊπποκάμπια έλικα) μέσω της ζώνης μετάβασης (περιαλλοφλοιός) του υποθέματος (Tien, Felsberg, & Crain, 1992).

Το Αμμώνιο κέρασ αποτελείται από έξι στοιβάδες: τη σκάφη (alveus), τη στοιβάδα πολύμορφων κυττάρων (stratum oriens), τη στοιβάδα πυραμιδικών κυττάρων (stratum pyramidale), την ακτινωτή στοιβάδα (stratum radiatum), τη βοθριώδη στοιβάδα (stratum lacunosum) και τη μοριώδη στοιβάδα (stratum moleculare). Η σκάφη, καλύπτει μέρος του ιπποκάμπου που προεξέχει μέσα στο κροταφικό κέρασ (temporal horn) του σώματος πλάγιας κοιλίας (lateral ventricle) και είναι το κύριο απαγωγό μονοπάτι ακολουθούμενο από άξονες ιπποκάμπου και υποθέματος. Η σκάφη συνεχίζει εσωτερικά για να δημιουργήσει την παρυφή του ιπποκάμπου, το οποίο, με τη σειρά του, ενώνεται με την ψαλίδα. Η βοθριώδης στοιβάδα περιλαμβάνει κάποιες από τις απαγωγές ίνες του ιπποκάμπου. Οι υπόλοιπες τέσσερις στοιβάδες είναι φαιά ουσία και αποτελούνται κυρίως από πυραμιδικούς νευρώνες, δενδρίτες, και άξονες παράπλευρης αύλακας. Εξ αιτίας των διαφορετικών όψεων και διαφορετικών συνδέσεων των πυραμιδικών νευρώνων, το Αμμώνιο κέρασ συνήθως διαχωρίζεται σε τέσσερις περιοχές, CA1, CA2, CA3 και CA4 (το CA είναι τα αρχικά του Cornu Ammonis, δηλαδή του Αμμωνείου κέρατος (*The Hippocampus Book (Google eBook), 2007*)). Η CA1 είναι παρακείμενη στο

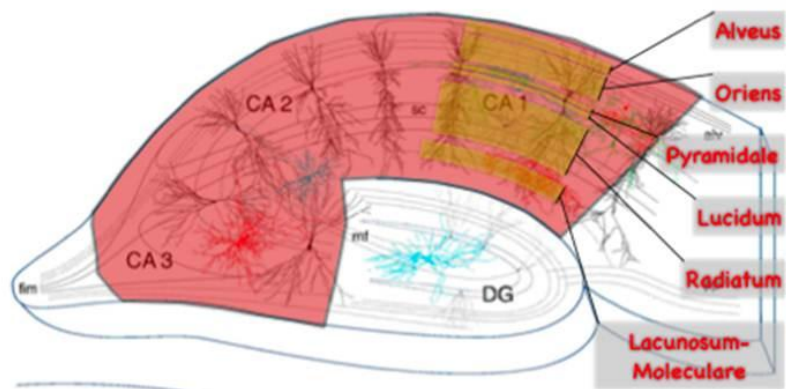
υπόθεμα και είναι μακράν η μεγαλύτερη από αυτές τις περιοχές. Περιλαμβάνει μικρούς, διασκορπισμένους νευρώνες, οι οποίοι διαχωρίζονται σε δυο υποστοιβάδες. Η CA2 περιλαμβάνει πυραμιδικά κύτταρα πακεταρισμένα σε μια μονή, πυκνή στοιβάδα. Γενικά εμφανίζεται στην (ή κοντά στην) ανώτερη πλευρά του Αμμωνίου κέρατος. Η CA3 εντοπίζεται στην (ή κοντά στην) καμπύλη του Αμμωνίου κέρατος όπως εισέρχεται στο χείλος της οδοντωτής έλικας. Η CA4 αποτελείται από διάσπαρτο πληθυσμό πυραμιδικών κυττάρων που απλώνονται μέσα στο χείλος αυτό (Tien et al., 1992).

Η οδοντωτή έλικα είναι μια τριστρωματική φλοιώδης περιοχή με χαρακτηριστικό σχήμα V ή U (*The Hippocampus Book (Google eBook), 2007*). Περιβάλλει τμήμα της CA4 του Αμμωνίου κέρατος και διαχωρίζεται από τις CA1-CA3 και το υπόθεμα από τη σχισμή του ιπποκάμπου. Η σχισμή αυτή, συνήθως σβήνεται κατά την ανάπτυξη, όμως, συχνά παραμένει μια κοιλότητα (Tien et al., 1992). Έχει σχετικά παρόμοια δομή σε όλα τα επίπεδα του ιπποκάμπειου σχηματισμού και, τυπικά, δεν διαχωρίζεται σε υποπεριοχές (*The Hippocampus Book (Google eBook), 2007*). Παρόλα αυτά, μπορούμε να ξεχωρίσουμε τις δυο πιο προεξέχουσες στοιβάδες μέσα στην οδοντωτή έλικα, που είναι η πυκνά πακεταρισμένη στοιβάδα των κυτταρικών σωμάτων που ονομάζεται κοκκώδης στοιβάδα, και τα γειτονικά νευροπίλημα, δηλαδή η μοριακή στοιβάδα (Tien et al., 1992).

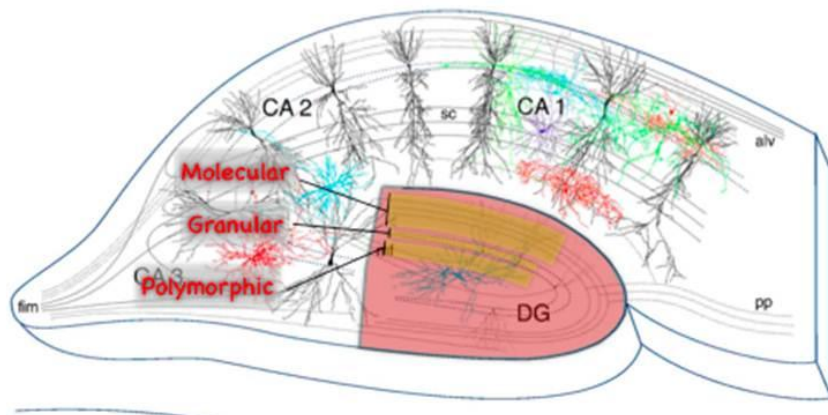


Ανατομία ιπποκάμπειου σχηματισμού:

- CA1 – CA3: δομές του hippocampus proper,
- DG: οδοντωτή έλικα,
- S: υπόθεμα (PrS: προϋπόθεμα, PaS: παραϋπόθεμα,
- LEC: Πλάγιος ενδορινικός φλοιός,
- MEC: Μέσος ενδορινικός φλοιός (πηγή: R. Cajal, (1911)).



Εικόνα 2: Περιοχή του Αμμωνείου κέρατος (CA1–CA3 περιοχές) του ιπποκάμπου και οι στοιβάδες του.

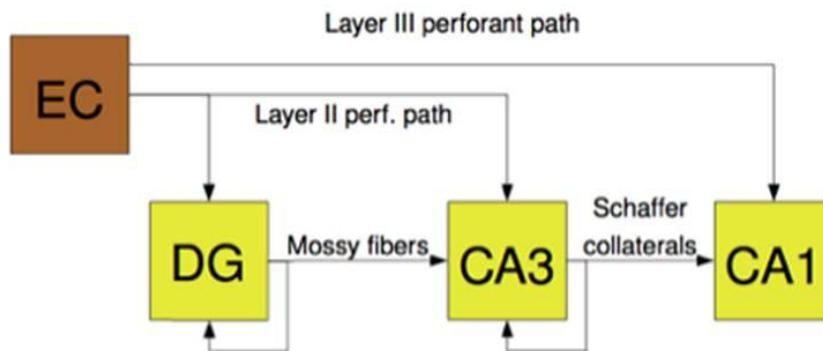


Εικόνα 3: Περιοχή της οδοντωτής έλικας και οι στοιβάδες της.

1.2 Συναπτικές οδοί ιπποκάμπου

Ο ενδορινικός φλοιός μπορεί, για ευκολία, να θεωρηθεί ως το πρώτο βήμα στο εγγενές ιπποκάμπειο κύκλωμα. Η προτεραιότητα που δίνεται στο συγκεκριμένο φλοιό βασίζεται στο γεγονός ότι πολλές από τις νεοφλοιικές εισαγωγές που φτάνουν στον ιπποκάμπειο σχηματισμό, το καταφέρνουν μέσω του φλοιού αυτού. Τα κύτταρα στις επιφανειακές στοιβάδες του ενδορινικού φλοιού διεγείρουν τους άξονες που προεκβάλλουν στην οδοντωτή έλικα. Οι προβολές από τον ενδορινικό φλοιό στην οδοντωτή έλικα δημιουργούν μέρος από το κυρίως ιπποκάμπειο μονοπάτι εισαγωγής, που ονομάζεται διατρητικό μονοπάτι (perforant path). Αν και ο ενδοκρινικός φλοιός παρέχει την κύρια εισαγωγή στην οδοντωτή έλικα, αυτή, δεν προεκβάλλει πίσω στο φλοιό. Έτσι, αυτό το μονοπάτι είναι μη ανταποκριτικό, ή μονόδρομο (nonreciprocated or unidirectional) (*The Hippocampus Book (Google eBook)*, 2007).

Ομοίως, τα βασικά κύτταρα της οδοντωτής έλικας, τα κοκκώδη κύτταρα (granule cells), διεγείρουν τους άξονες που ονομάζονται ποώδεις ίνες (mossy fibers) και συνδέονται με τα πυραμιδικά κύτταρα της CA3 περιοχής του ιπποκάμπου. Όμως, τα κύτταρα της CA3 δεν προεκβάλλουν πίσω στα κοκκώδη κύτταρα. Τα πυραμιδικά κύτταρα, με τη σειρά τους, είναι η πηγή της βασικής εισαγωγής ρεύματος στη CA1 περιοχή του ιπποκάμπου και συγκεκριμένα στους παράλληλους άξονες Schaffer (Schaffer collateral axons). Ακολουθώντας το μοτίβο των προηγούμενων, η CA1 δεν προεκβάλλει πίσω στη CA3. Η περιοχή CA1 προβάλλει μονόδρομα προς το υπόθεμα, παρέχοντας την βασική διεγερτική εισαγωγή (*The Hippocampus Book (Google eBook)*, 2007).



Εικόνα 4: Συναπτικές οδοί ιπποκάμπου.

1.3 Διαφορά δυναμικού V_e

Η σχέση μεταξύ της ηλεκτρικής ενεργότητας σε μεμονωμένους νευρώνες στον εγκέφαλο των θηλαστικών και η συμπεριφορά τους σε νευρικά συστήματα παραμένει μια από τις πλέον ενδιαφέρουσες ερωτήσεις της νευροεπιστήμης (Suter, Smith, & Dudek, 1999).

Οι συνεισφορές του ηλεκτρικού ρεύματος από όλες τις ενεργές κυτταρικές διαδικασίες εντός ενός τόμου εγκεφαλικού ιστού, υπερέχουν σε μια δεδομένη περιοχή στο εξωκυτταρικό μέσο και δημιουργούν ένα δυναμικό V_e (μετριέται σε Volts), σε σχέση με ένα δυναμικό αναφοράς. Η διαφορά των V_e ανάμεσα σε δυο περιοχές δημιουργεί ένα ηλεκτρικό πεδίο (διάνυσμα του οποίου το πλάτος μετριέται σε Volts ανά απόσταση) που ορίζεται ως η αρνητική χωρική κλίση του V_e (Buzsáki, Anastassiou, & Koch, 2012).

Υπάρχουν διάφορες τεχνικές καταγραφής των ηλεκτρικών αυτών πεδίων, κυριότερες από τις οποίες είναι, συνοπτικά, οι εξής: εξωκυτταρικές καταγραφές (extracellular recordings), καταγραφές ρεύματος (Current-Clamp), καταγραφές τάσης (Voltage-Clamp) και τεχνική καθήλωσης κηλίδων (Patch-Clamp). Οι εξωκυτταρικές καταγραφές πραγματοποιούνται για να αντλήσουν πληροφορίες που αφορούν την

ενεργότητα μεμονωμένων νευρώνων (single-unit recordings), την ενεργότητα πολλών κυττάρων την ίδια στιγμή (multiple-unit recordings) ή τη συγχρονισμένη ενεργότητα πολλών νευρώνων (field potentials). Οι εξωκυτταρικές καταγραφές έχουν πλεονεκτήματα σε σχέση με τις πιο δύσκολες και λιγότερο σταθερές ενδοκυττάρειες τεχνικές (Suter et al., 1999). Ανιχνεύουν τα ηλεκτρικά πεδία με εξωκυτταρικά τοποθετημένα ηλεκτρόδια με επιμέρους ανάλυση του χρόνου και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να ερμηνεύσουν πολλές πτυχές της νευρωνικής επικοινωνίας και του νευρωνικού υπολογισμού. Ένα μεγάλο πλεονέκτημα των εξωκυττάρειων καταγραφών είναι ότι, σε αντίθεση με τις άλλες μεθόδους που χρησιμοποιούνται για μελέτη της ενεργότητας των πεδίων, οι βιοφυσικές ιδιότητες που σχετίζονται με τις μετρήσεις αυτές είναι καλά κατανοητές (Buzsáki et al., 2012).

Ιστορικά, το V_e αναφέρεται ως ηλεκτροεγκεφαλογράφημα (electroencephalogram, EEG) όταν καταγράφεται από το δέρμα της κεφαλής, ως ηλεκτροφλοιογράφημα (electrocorticogram, ECoG) όταν καταγράφεται από τη φλοιική επιφάνεια, και ως δυναμικό τοπικού πεδίου (local field potential, LFP) όταν καταγράφεται με ηλεκτρόδιο μικρού μεγέθους από το εσωτερικό του εγκεφάλου (Buzsáki et al., 2012).

Κάθε ευερέθιστη μεμβράνη και κάθε τύπος διαμεμβρανικού ρεύματος συμβάλλουν στον εξωκυττάριο χώρο. Κάθε διαμεμβρανικό ρεύμα, ανεξάρτητα από την προέλευσή του, οδηγεί τόσο σε ενδοκυτταρική, όσο και εξωκυτταρική απόκλιση της τάσης. Η εξωκυτταρική αυτή απόκλιση είναι το LFP. Τα χαρακτηριστικά της κυματομορφής του LFP, όπως είναι το πλάτος ή η συχνότητα, εξαρτώνται από την αναλογική συνεισφορά όλων των πηγών και των διαφόρων ιδιοτήτων του εγκεφαλικού ιστού. Όσο μεγαλύτερη είναι η απόσταση του ηλεκτροδίου καταγραφής από την πηγή του ρεύματος, τόσο λιγότερες πληροφορίες συλλέγει το LFP για τα όσα διαδραματίζονται στις περιοχές των πηγών (Buzsáki et al., 2012).

Όλοι οι τύποι νευρικών κυττάρων συνεισφέρουν στον εξωκυττάριο χώρο, η συνεισφορά αυτή, όμως, εξαρτάται, εν μέρει, από το είδος το κυττάρου. Τα πυραμιδικά κύτταρα (Pyramidal cells) αποτελούν τον μεγαλύτερο αριθμό των νευρικών κυττάρων. Έχουν μακρείς και παχείς δενδρίτες οι οποίοι δημιουργούν ισχυρά δίπολα κατά μήκος του σωματοδενδριτικού άξονα. Τα δίπολα αυτά δημιουργούν ένα ανοιχτό πεδίο, δεδομένου ότι υπάρχει σημαντικός χωρικός διαχωρισμός της ενεργής πηγής από τα ρεύματα επιστροφής. Αυτό επάγει ουσιαστική κίνηση ιόντων στο εξωκυττάριο μέσο. Ως εκ τούτου, οι νευρώνες που δημιουργούν ανοιχτά πεδία, όπως οι πυραμιδικοί, έχουν μεγάλη συνεισφορά στο εξωκυττάριο πεδίο (Buzsáki et al., 2012). Αντίθετα, οι σφαιρικοί συμμετρικοί νευρώνες, όπως τα θαλαμοφλοιώδη κύτταρα (thalamocortical cells), οι οποίοι

εκφύουν δενδρίτες ίδιου μήκους προς όλες τις διευθύνσεις, δημιουργούν ένα κλειστό πεδίο (LORENTE de NO, 1947). Όμως, ένα αυστηρά κλειστό πεδίο δημιουργείται μόνο όταν ενεργοποιούνται ταυτόχρονα πολλοί δενδρίτες. Καθώς κάτι τέτοιο είναι σπάνιο, η εκπόλωση ενός μεμονωμένου δενδρίτη δημιουργεί ένα μικρό δίπολο ακόμα και στα σφαιρικά συμμετρικά κύτταρα (Lindén, Pettersen, & Einevoll, 2010).

Υποθέτοντας ότι έχουμε ένα ομοιογενές μέσο, οι δυο πιο σημαντικές ορίζουσες της δύναμης του εξωκυττάρου πεδίου είναι η χωρική ευθυγράμμιση των νευρώνων και ο χρονικός συγχρονισμός των διπόλων που δημιουργούνται (Lindén et al., 2011). Στον ιππόκαμπο των τρωκτικών, τα σώματα των πυραμιδικών κυττάρων καταλαμβάνουν μερικές, μόνο, σειρές. Αντίθετα, στον ανθρώπινο ιππόκαμπο, τα σώματα των κυττάρων είναι τοποθετημένα κάθετα μεταξύ τους και δημιουργούν ένα ευρύτερο σωματικό στρώμα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, τα ρεύματα που πηγάζουν από το σώμα, να ρέουν προς αντίθετη κατεύθυνση από τα ρεύματα που προέρχονται από τους δενδρίτες των γειτονικών κυττάρων, ακυρώνοντας αποτελεσματικά το ένα το άλλο. Αυτό εξηγεί, εν μέρει, γιατί το πλάτος του LFP μειώνεται από τον αρουραίο στη γάτα και από τη γάτα στα πρωτεύοντα (Buzsáki, 2002; Kahana, Seelig, & Madsen, 2001). Ένας άλλος λόγος που το μέγεθος του εγκεφάλου επηρεάζει το μέγεθος του εξωκυτταρικού ρεύματος είναι ότι τα θηλαστικά με μικρότερο εγκέφαλο έχουν μικρότερους πυραμιδικούς νευρώνες, οι οποίοι και πακετάρονται πιο πυκνά σε σχέση με αυτούς των θηλαστικών με μεγαλύτερο εγκέφαλο (Herculano-Houzel, Collins, Wong, & Kaas, 2007), οδηγώντας σε μικρότερη αγωγιμότητα.

1.4 Βραχύχρονη – Μακρόχρονη μνήμη

Η αποθήκευση της μνήμης αποτελείται από δυο, τουλάχιστον, διαφορετικές χρονικές φάσεις: βραχύχρονη μνήμη (short – term memory), η οποία διαρκεί από λεπτά μέχρι ώρες, και η μακρόχρονη μνήμη (long – term memory), που μπορεί να διαρκέσει για μέρες, μήνες, ή και ακόμα περισσότερο (Polster, Nadel, & Schacter, 1991; Squire, 1992). Σύνομη αναστολή είτε της πρωτεϊνοσύνθεσης, είτε της μεταγραφής, μπλοκάρει επιλεκτικά την μακρόχρονη μνήμη, χωρίς να επηρεάζει τη βραχύχρονη μνήμη (Castellucci, Blumenfeld, Goelet, & Kandel, 1989; Crow & Forrester, 1990; H. P. Davis & Squire, 1984; Tully, Preat, Boynton, & Del Vecchio, 1994). Σε αντίθεση με την επαγωγή της, η διατήρηση της μακρόχρονης μνήμης είναι ανεξάρτητη από νέα πρωτεϊνοσύνθεση και μεταγραφή (H. P. Davis & Squire, 1984).

Υπάρχει μια καθαρή διάκριση ανάμεσα στους μηχανισμούς που εμπλέκονται στη βραχύχρονη και μακρόχρονη προσυναπτική διευκόλυνση (ένας κυτταρικός μηχανισμός που συμβάλλει στην ευαισθητοποίηση). Η βραχύχρονη διευκόλυνση περιλαμβάνει μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις προϋπαρχόντων πρωτεϊνών και διαμεσολαβείται από cAMP – εξαρτόμενη πρωτεϊνική κινάση A (PKA) και πρωτεϊνική κινάση C (PKC) (Byrne, Zwartjes, Homayouni, Critz, & Eskin, 1993; Castellucci et al., 1989; Ghirardi et al., 1992; Montarolo et al., 1986). Αντίθετα, η μακρόχρονη διευκόλυνση απαιτεί νέα πρωτεϊνοσύνθεση και cAMP – διαμεσολαβούμενη γονιδιακή έκφραση, μέσα από την ενεργοποίηση του CREB-1 (cAMP response element binding-1) και απαλλαγής από την καταστολή του CREB-2 (Alberini, Ghirardi, Metz, & Kandel, 1994; Bartsch et al., 1995; Dash, Hochner, & Kandel, 1990; Montarolo et al., 1986). Η βραχύχρονη μνήμη και μάθηση χρειάζονται την PKA, ενώ η μακρόχρονη μνήμη χρειάζεται γονιδιακή έκφραση που ξεκινά από την CREB (Bourtchuladze et al., 1994; Tully et al., 1994; Yin et al., 1994).

1.5 Επαγωγή μακρόχρονης ενδυνάμωσης (LTP)

Η σαφής μάθηση περιλαμβάνει την απόκτηση πληροφοριών σχετικά με ανθρώπους, μέρη και αντικείμενα, και σχετίζεται, σε μεγάλο βαθμό, με δομές που βρίσκονται μέσα στον κροταφικό λοβό, συμπεριλαμβανομένου και του ιπποκάμπου (Hirsh, 1974; SCOVILLE & MILNER, 1957). Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, μέσα στον ιπποκάμπο, υπάρχουν τρία βασικά σειριακά και διεγερτικά συναπτικά μονοπάτια: το διατρητικό (perforant), το μονοπάτι ποώδων ινών (mossy fiber) και τα παράλληλα μονοπάτια Schaffer (Schaffer collateral pathways), τα οποία συνδέουν τον ενδορυνικό φλοιό (entorhinal cortex) με την οδοντωτή έλικα (dentate gyrus), την οδοντωτή έλικα με την περιοχή CA3 και την περιοχή CA3 με την περιοχή CA1, αντίστοιχα (Amaral, 1993; Andersen, Sundberg, Sveen, & Wigström, 1977). Βλάβη σε οποιοδήποτε από τα τρία αυτά σειριακά μονοπάτια θεωρείται ότι είναι επαρκής για να προκαλέσει σοβαρή βλάβη στη μνήμη των ανθρώπων (Zola-Morgan, Squire, & Amaral, 1986).

Οι νευρώνες του ιπποκάμπου μπορούν να υποβληθούν σε μακράς διάρκειας αύξηση της συναπτικής τους αποδοτικότητας μετά από σύντομο ερέθισμα υψηλής συχνότητας σε οποιοδήποτε από τα τρία αυτά διεγερτικά μονοπάτια (Bliss & Lomo, 1973). Σε μη αναισθητοποιημένα ζώα, η αύξηση της συναπτικής ισχύος, που εξαρτάται από την ενεργότητα, μπορεί να διαρκέσει για ώρες ή μέρες και ονομάζεται

μακρόχρονη ενδυνάμωση (long-term potentiation, LTP). Το LTP έχει μελετηθεί διεξοδικά σε φέτες ιπποκάμπου (Andersen et al., 1977; Bliss & Collingridge, 1993). Όσον αφορά τη συμπεριφορική μνήμη, το LTP και στις τρεις περιοχές του ιπποκάμπου αποτελείται από, τουλάχιστον δυο, βιοχημικά διακριτές χρονικές φάσεις. Υπάρχει μια πρώιμη φάση, διάρκειας 1 -2 ωρών, η οποία είναι ανεξάρτητη από σύνθεση πρωτεϊνών και RNA, και μια μεταγενέστερη, πιο ανθεκτική φάση (L-LTP), η οποία ξεκινά μετά από 1 -2 ώρες και διαρκεί μέχρι και 8 ώρες σε εγκεφαλικές φέτες (Huang, Nguyen, Abel, & Kandel, n.d.). Αυτό το L-LTP απαιτεί εκ νέου σύνθεση πρωτεϊνών και RNA, και ενεργοποίηση της PKA για την πλήρη έκφρασή του (Frey, Huang, & Kandel, 1993; Huang & Kandel, n.d.; Huang, Li, & Kandel, 1994; Nguyen, Abel, & Kandel, 1994; Nguyen & Kandel, 1996).

Η κύρια πυροδότηση για την επαγωγή του LTP φαίνεται να είναι μια τοπική αύξηση στη συγκέντρωση του Ca^{2+} στον προσυναπτικό νευρώνα. Στη συνέχεια, η άφιξη ενός δυναμικού ενεργείας, προκαλεί την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών από τα προσυναπτικά άκρα των περισσότερων χημικών συνάψεων, στη μορφή διακριτών, πολυμοριακών πακέτων, γνωστά και ως κβάντα (quanta). Ο νευροδιαβιβαστής κάθε τέτοιου πακέτου απελευθερώνεται, και στη συνέχεια δρά σε υποδοχείς στην κυτταρική μεμβράνη του μετασυναπτικού κυττάρου, παράγοντας μια ηλεκτρική απόκριση χαρακτηριστικού μεγέθους, γνωστό ως κβαντικό μέγεθος (quantal size). Μια συναπτική σύνδεση, μπορεί να ενδυναμωθεί με ποικίλους τρόπους. Σε αυτούς, μπορεί να περιλαμβάνεται η αύξηση του αριθμού των πακέτων που απελευθερώνονται, η πιθανότητα απελευθέρωσης και το κβαντικό μέγεθος, καθώς και οποιοσδήποτε συνδυασμός αυτών (A. U. Larkman & Jack, 1995). Η τοποθεσία έκφρασης του LTP μπορεί να περιλαμβάνει τόσο προσυναπτικές, όσο και μετασυναπτικές αλλαγές, σε ποικίλο βαθμό, ανάλογα με τις συνθήκες (Kullmann & Nicoll, 1992; A. Larkman, Hannay, Stratford, & Jack, 1992; Liao, Jones, & Malinow, 1992).

Το πρωτόκολλο ερεθισμού για επαγωγή LTP στον ιππόκαμπο ποικίλλει αρκετά, όμως, τυπικά, επάγουμε LTP εφαρμόζοντας μια σειρά από υψηλής συχνότητας (100-Hz) ερεθισμούς, οι οποίοι διαρκούν 1 δευτερόλεπτο (Bliss & Collingridge, 1993; Bliss & Lomo, 1973). Δεν είναι ξεκάθαρο το αν οι νευρόνες του ιπποκάμπου πυροδοτούν *in vivo* στα 100-Hz για ένα ολόκληρο δευτερόλεπτο. Τα πυραμιδικά κύτταρα της περιοχής CA1 συνήθως πυροδοτούν σύντομες (30- με 40-msec) εξάρσεις των τριών ή τεσσάρων κορυφών (KANDEL & SPENCER, 1961; Ranck, 1973), με τις εξάρσεις να επαναλαμβάνονται στη συχνότητα "Θ" (Green, Maxwell, Schindler, & Stumpf, 1960). Το Θ είναι ένα ηλεκτροεγκεφαλογραφικό κύμα, συχνότητας 5- με 12-Hz, το οποίο εμφανίζεται όταν τα ζώα είναι απασχολημένα σε

εξερευνητική, προσεκτική συμπεριφορά (Bland, 1986; GRASTYAN, LISSAK, MADARASZ, & DONHOFFER, 1959; Vanderwolf, 1969). Ο Θ ρυθμός μπορεί να ξεκινήσει LTP, επειδή σύντομες εξάρσεις (30-msec) ερεθισμού (100 Hz) μεταφέρονται επανηλειμμένα σε 5-Hz για 1-2 δευτερόλεπτα (ερεθισμός "O-burst") προκαλούν LTP αποτελεσματικά στον ιππόκαμπο αρουραίων *in vitro* (Larson & Lynch, 1986; Larson, Wong, & Lynch, 1986) και *in vivo* (Staubli & Lynch, 1987).

1.6 LTP και μνήμη – μάθηση

Το LTP εμφανίζει πολλές ιδιότητες που καθιστούν ικανό το ρόλο του στην κωδικοποίηση και αποθήκευση των πληροφοριών. Ωστόσο, ίσως να μην είναι λογικό να περιμένουμε ότι όλες οι ιδιότητες της ενεργοεξαρτώμενης συναπτικής πλαστικότητας καθρεπτίζονται απ'ευθείας στις ιδιότητες της μνήμης. Η μνήμη είναι ιδιότητα όλου του οργανισμού, ενώ η πλαστικότητα είναι ιδιότητα των συνάψεων. Υπάρχει η υπόθεση ότι η συναπτική πλαστικότητα συμμετέχει στη διαδικασία της μνήμης. Τέσσερα κριτήρια σχετίζονται με την εκτίμηση αυτή:

- **Ανιχνευσιμότητα:** αν ένα ζώο αναπτύξει μνήμη για μια προηγούμενη εμπειρία, πρέπει να ανιχνεύεται αλλαγή στη συναπτική διευκόλυνση κάπου στο νευρικό του σύστημα,
- **Μιμιτισμός:** αν υπήρχε πιθανότητα να επάγουμε, τεχνητά, το κατάλληλο μοτίβο αλλαγής του συναπτικού βάρους, το ζώο πρέπει να εμφανίζει μνήμη για μια εμπειρία του παρελθόντος, η οποία δεν συνέβει στην πράξη,
- **Πρόδρομη αλλαγή:** παρεμβάσεις που εμποδίζουν την επαγωγή αλλαγών του συναπτικού βάρους κατά τη διάρκεια μιας διαδικασίας μάθησης, πρέπει να βλάψουν τη μνήμη του ζώου για αυτή την εμπειρία,
- **Ανάδρομη αλλαγή:** παρεμβάσεις που αλλάζουν τη χωρική κατανομή των αλλαγών του συναπτικού βάρους που επάγονται από μια προηγούμενη εμπειρία μάθησης (βλέπε ανιχνευσιμότητα) πρέπει να αλλάζει τη μνήμη του ζώου για αυτή την εμπειρία. (S. J. Martin & Morris, 2002).

Διάφορες έρευνες έχουν δείξει ότι το LTP μπορεί να είναι βιολογικό υπόστρωμα για τουλάχιστον κάποιες μορφές μνήμης και μάθησης. Μερικά στοιχεία που το αποδεικνύουν είναι ότι το LTP είναι πιο εύκολα αποδείξιμο στον ιππόκαμπο, μια περιοχή του εγκεφάλου γνωστή για τη θεμελιώδη σημασία της απόκτησης μνήμης. Επίσης, ρυθμικά "ξεσπάσματα" ενεργότητας που επάγουν LTP μιμούμενα

το φυσικό ρυθμό του Θ καταγράφονται στον ιππόκαμπο κατά τη διαδικασία της εξερευνητικής δραστηριότητας. Αναστολείς του LTP του ιπποκάμπου μπλοκάρουν, επίσης την ιπποκάμπεια μάθηση και την διατήρηση των εργασιών. Ποικίλες βιοχημικές μεταβολές που συμβαίνουν μετά την επαγωγή του LTP συμβαίνουν, επίσης, κατά τη διαδικασία της απόκτησης μνήμης (Lynch et al., 2004).

1.7 Υποδοχείς που σχετίζονται με το LTP

Είναι ευρέως αποδεκτό το ότι η επαγωγή LTP στην περιοχή CA1 του ιπποκάμπου περιλαμβάνει μια αύξηση στη συγκέντρωση του Ca^{2+} στο μετασυναπτικό κύτταρο, εξ' αιτίας της εισόδου που διαμεσολαβείται σε μεγάλο βαθμό, αλλά όχι απαραίτητα αποκλειστικά (Huber, Mauk, & Kelly, 1995; Wyllie, Manabe, & Nicoll, 1994), από τους υποδοχείς γλουταμινικού τύπου NMDA (NMDARs) (a U. Larkman & Jack, 1995). Αυτοί οι υποδοχείς, είναι γνωστό ότι εμπλέκονται και σε διαδικασίες μνήμης και μάθησης (Tsien, 2000). Την τελευταία δεκαετία, έχουν βρεθεί αποδείξεις ότι η πρωτεΐνη κινάση της τυροσίνης Src, ρυθμίζει αυξάνοντας τη λειτουργία του NMDAR (Lev et al., 1995; Yu, Askalan, Keil, & Salter, 1997), ο οποίος περιβάλλει την παραγωγή του NMDAR – εξαρτώμενου συναπτικού δυναμικού και πλαστικότητας (Lau & Huganir, 1995; Yang, Ma, Chen, Wang, & Lee, 2003). Από την άλλη πλευρά, τρέχοντα μοντέλα μακρόχρονης διευκόλυνσης στη συναπτική αποτελεσματικότητα προτείνουν έναν μηχανισμό που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση εξωκυτταρικών σηματο-ρυθμιζόμενων πρωτεϊνικών κινασών (extracellular signal-regulated protein kinases, ERKs), οι οποίες είναι ισομορφές της μιτογονο-ενεργοποιημένης πρωτεϊνικής κινάσης (isoforms of mitogen- activated protein kinase, MAPK) (Kelleher, Govindarajan, Jung, Kang, & Tonegawa, 2004). Οι ERKs, αποτελούν κρίσιμα σημεία σύγκλισης στα σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τη γονιδιακή μεταγραφή κατά τη διαδικασία της επαγωγής LTP και της μακρόχρονης μνήμης (S. Davis, Vanhoutte, Pages, Caboche, & Laroche, 2000; Impey, Obrietan, & Storm, 1999). Η μετατόπιση του ενεργοποιημένου MAPK μέσα στον πυρήνα (K. C. Martin et al., 1997), υποδηλώνει ότι ενεργοποίηση της κινάσης αυτής είναι ένα από τα βασικά βήματα στους μοριακούς μηχανισμούς για τη διατήρηση της συναπτικής αποτελεσματικότητας (Xia, Dudek, Miranti, & Greenberg, 1996). Η ERK, που ενεργοποιείται από εισροή Ca^{2+} μέσα από τον NMDAR (Kurino, Fukunaga, Ushio, & Miyamoto, 1995), μεσολαβεί σε μια αύξηση στη φωσφορυλίωση της cAMP αποκριτικής στοιχειο-δεσμευτικής πρωτεΐνης (cAMP response element-

binding protein, CREB) (Perkinton, Ip, Wood, Crossthwaite, & Williams, 2002), οδηγώντας σε αλλαγές στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την συναπτική πλαστικότητα (Adams & Sweatt, 2002; Sgambato, Pagès, Rogard, Besson, & Caboche, 1998). Υπάρχουν ενδείξεις ότι η ERK απαιτείται για τις διαδικασίες επαγωγής και έκφρασης των διαφόρων μορφών της συναπτικής πλαστικότητας και της συμπεριφοράς της μνήμης (Blum, Moore, Adams, & Dash, 1999; Coogan, O'Leary, & O'Connor, 1999; Impey et al., 1999; Schafe, Nadel, Sullivan, Harris, & LeDoux, n.d.).

Αρκετές έρευνες έχουν, επίσης, δείξει ότι αυξημένη έκφραση των AMPA υποδοχέων στην μεμβράνη των μετασυναπτικών κυττάρων είναι πιθανό να αποτελεί πρωταρχική απαίτηση που οδηγεί σε LTP. Οι AMPA υποδοχείς εισάγονται στην μετασυναπτική μεμβράνη μετά την επαγωγή LTP. Η έκφραση των AMPA υποδοχέων στα κύτταρα είναι μια δυναμική διαδικασία και ελέγχεται από έναν κύκλο εξωκύττωσης και ενδοκύττωσης (Lynch et al., 2004).

1.8 Νευροστεροειδή – DHEA

Τα νευροστεροειδή συντίθενται στο κεντρικό και περιφεριακό νευρικό σύστημα, κυρίως στα μυελινομένα γλιακά κύτταρα, αλλά επίσης και στα αστροκύτταρα και τους νευρώνες. Τα νευροενεργά στεροειδή, τα οποία δρουν στο νευρικό σύστημα, επηρεάζουν τη λειτουργία και διάκριση των νευρώνων (Brinton & Wang, 2006) και προβλέπουν την νευροπροστασία ενάντια στην ισχαιμία και το εγκεφαλικό (Cutler, Pettus, Hoffman, & Stein, 2005). Οι νευροπροστατευτικές δράσεις περιλαμβάνουν ανάκτηση της λειτουργίας της κίνησης μετά από τραυματισμό της σπονδυλικής στήλης (di Michele et al., 2000), ρύθμιση της μυελίνωσης (Chávez-Delgado et al., 2005), πολλαπλασιασμό των νευρωνικών βλαστικών κυττάρων (Wang, Johnston, Ball, & Brinton, 2005), νευρογένεση στον ιππόκαμπο (Keller, Zamparini, Borodinsky, Gravielle, & Fiszman, 2004) και επαγωγή της αναλγησίας (Pathirathna et al., 2005).

Η Διυδροεπιανδροστερόνη (Dehydroepiandrosterone, DHEA) είναι ένα στεροειδές, το οποίο παράγεται στα επινεφρίδια, στους νευρώνες και στη γλοία (Baulieu & Robel, 1998). Ο φυσιολογικός ρόλος της εγκεφαλικής DHEA φαίνεται να είναι τοπικός ενώ αυτή που παράγεται από τα επινεφρίδια, που αντιπροσωπεύει τη σχεδόν απόλυτη πηγή της κυκλοφορικής DHEA, είναι συστηματικός. Η απότομη μείωση τόσο της εγκεφαλικής, όσο και της κυκλοφορικής DHEA με το πέρασμα της

ηλικίας έχει συσχετιστεί με ηλικιοεξαρτώμενες νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Baulieu & Robel, 1998; Compagnone & Mellon, 2000). Υποστηρίζεται πειραματικά ότι η DHEA προστατεύει τους νευρώνες από επιβλαβείς καταστάσεις (Ioannis Charalampopoulos, Remboutsika, Margioris, & Gravanis, 2008), όπως ανοξία (Compagnone & Mellon, 2000). Επίσης, αυξάνει παροδικά τα επίπεδα mRNA του νευρικού αυξητικού παράγοντα (nerve growth factor, NGF), εμφανίζει νευροπροστατευτικές ιδιότητες σε διάφορων τύπων προσβολές του κεντρικού νευρικού συστήματος (Marx et al., 2000) και λειτουργεί αποτελεσματικά ενάντια σε τραυματισμούς της σπονδυλικής στήλης (Gubba, Fawcett, & Herbert, 2004).

Πρόσφατες έρευνες που μελετούν την φυσιοπαθολογική σημασία των νευροστεροειδών στην ασθένεια του Alzheimer (AD) έχει δείξει σημαντική μείωση της συγκέντρωσης των νευροστεροειδών σε μεμονωμένες εγκεφαλικές περιοχές ασθενών με AD συγκρινόμενων με φυσιολογικά άτομα ίδιας ηλικίας (Ioannis Charalampopoulos, Remboutsika, et al., 2008). Αυτές οι μελέτες υποστηρίζουν έναν πιθανό νευροπροστατευτικό ρόλο των ενδογενών νευροστεροειδών στην AD. Είναι, επίσης, ενδιαφέρον ότι η DHEA μπορεί να ενισχύσει την κινητική ενεργότητα σε πιθήκους που πασχουν από hemi-Parkinson (Bélanger, Grégoire, Bédard, & Di Paolo, 2003). Επιπλέον, επηρεάζει το κατεχολαμινεργικό σύστημα, ρυθμίζοντας και αυξάνοντας την έκφραση της υδροξυλάσης της τυροσίνης και, έτσι, αυξάνοντας *de novo* τη σύνθεση και απελευθέρωση της κατεχολαμίνης (I Charalampopoulos et al., 2005). Τα νευροστεροειδή DHEA και αλλοπρεγνανολόνη επάγουν νευρογένεση σε ποικίλα πειραματικά μοντέλα (Suzuki, Wright, Marwah, Lardy, & Svendsen, 2004; Wang et al., 2005).

1.9 Υποδοχείς που σχετίζονται με τη DHEA

Η DHEA ασκεί τις δράσεις της είτε διαφοροποιώντας άμεσα (σε μικρομοριακές συγκεντρώσεις) τον γ-αμινοβουτιρικό οξικό τύπο A (γ-aminobutyric acid type A, GABA_A), το N-μέθυλο-D-ασπαρτατικό (N-methyl-D-aspartate, NMDA), ή τους σ1 υποδοχείς (σαπερόνες που ρυθμίζονται από σηματοδότηση Ca²⁺ και φαίνεται να εμπλέκονται σε νευροψυχιατρικές ασθένειες (Dong & Zheng, 2012)) , ή ακολουθεί την μετατροπή της σε οιστρογόνα και ανδρογόνα (Lazaridis et al., 2011). Επίσης, μπορεί να επηρεάζει την εγκεφαλική λειτουργία με απευθείας πρόσδεση σε πρωτεΐνες του εγκεφάλου που συνδέονται με μικροσωληνίσκους των δενδριτών (dendritic brain microtubule-associated protein, MAP2C) (Laurine et al., 2003). Σε

νανομοριακές συγκεντώσεις, η DHEA προστατεύει τα συμπαθοαδρενεργικά PC12 κύτταρα από απόπτωση (Bélanger, Grégoire, Bédard, & Di Paolo, 2006). Ενεργοποίηση των μεμβρανικών θέσεων πρόσδεσης της DHEA έχει σαν αποτέλεσμα μια οξεία, παροδική και διαδοχική φωσφορυλίωση των προ-επιβιωτικών MEK/ERK κινασών, οι οποίες, με τη σειρά τους, ενεργοποιούν τους μεταγραφικούς παράγοντες CREB και NFκB, που παρέχουν τον μεταγραφικό έλεγχο των αντιαποπτωτικών Bcl-2 πρωτεϊνών (Lazaridis et al., 2011). Παράλληλα, ενεργοποίηση των μεμβρανικών θέσεων πρόσδεσης της DHEA, επάγει τη φωσφορυλίωση των PI3K/Akt κινασών, οδηγώντας σε φωσφορυλίωση/απενεργοποίηση των προ-αποπτωτικών Bad πρωτεϊνών και προστασία των PC12 κυττάρων από απόπτωση (Ioannis Charalampopoulos, Margioris, & Gravanis, 2008).

Τα αντι-αποπτωτικά μονοπάτια στα συμπαθοαδρενεργικά κύτταρα που ξεκινούν από την DHEA σε μεμβρανικό επίπεδο μοιάζουν εντυπωσιακά με αυτά που είναι ευαίσθητα στο νευρικό αυξητικό παράγοντα των νευροτροφινών (neurotrophin nerve growth factor, NGF). Ο NGF προωθεί την επιβίωση και σώζει από απόπτωση τα παράγωγα συμπαθητικών νευρώνων της νευρικής ακρολοφίας (neural crest-derived sympathetic neurons) (συμπεριλαμβανομένων των σχετιζόμενων σε αυτά συμπαθοαδρενεργικών κυττάρων) και τους αισθητικούς νευρώνες που σχετίζονται με την αλγαισθησία (noniception) (Lazaridis et al., 2011). Ο NGF συνδέεται με μεγάλη συγγένεια στον διαμεμβρανικό υποδοχέα κινάσης τυροσίνης TrkA και με μικρότερη συγγένεια στον $p75^{NTP}$ υποδοχέα, μια μεμβρανική πρωτεΐνη που ανήκει στην υπεροικογένεια των TNF υποδοχέων (Reichardt, 2006). Ελέγχει την ανταπόκριση των αισθητικών κυττάρων μέσα από επαγωγή της φωσφορυλίωσης του TrkA και τη ρύθμιση των επιπέδων κάθε υποδοχέα (Zhou, Valletta, Grimes, & Mobley, 1995). Απουσία του TrkA, ο $p75^{NTP}$ παράγει σήματα κυτταρικού θανάτου. Η DHEA ελέγχει την απόκριση των κυττάρων που έχουν υποδοχείς NGF, ελέγχοντας τα επίπεδα των υποδοχέων TrkA και $p75^{NTP}$ μιμούμενο τον NGF. Πειράματα έχουν δείξει ότι η DHEA μπορεί να προσδεθεί απευθείας στις πρωτεΐνες TrkA και $p75^{NTP}$. Πρόσδεση του DHEA στους υποδοχείς NGF έχει αντι-αποπτωτικές δράσεις (Lazaridis et al., 2011).

1.10 DHEA και BNN 27

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα φυσικά νευροστεροειδή, όπως η DHEA, εμφανίζουν σημαντικές νευροπροστατευτικές και νευρογενείς ιδιότητες, τόσο

in vivo, όσο και *in vitro*. Όμως, τα νευροστεροειδή αυτά, καταλήγουν να μεταβολίζονται σε οιστρογόνα, ανδρογόνα, ή προγεστερόνες στον ανθρώπινο οργανισμό, γεγονός που οδηγεί σε σημαντικές γενικευμένες ενδοκρινικές παρενέργειες, όπως ορμονο-εξαρτώμενες νεοπλασίες (Compagnone & Mellon, 2000), περιορίζοντας, έτσι, σημαντικά την κλινική τους χρήση (Calogeropoulou et al., 2009).

Για το λόγο αυτό, σχεδιάστηκαν DHEA-ανάλογα με σκοπό να βελτιώσουν την αντιαποπρωτική – νευροπροστατευτική τους ενεργότητα και να αναστείλλουν τη μετατροπή σε οιστρογόνα ή ανδρογόνα. Ένα από αυτά είναι το παράγωγο 27 (derivative 27 ή BNN 27). Πειράματα έδειξαν ότι το BNN 27, έχει πράγματι, παρόμοιες αντιαποπρωτικές δράσεις με την DHEA (Calogeropoulou et al., 2009). Παρόλα αυτά, το BNN 27 είναι ένα, σχετικά, νέο προϊόν, του οποίου οι δράσεις δεν έχουν, ακόμα μελετηθεί πλήρως.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα πειράματα έγιναν το χρονικό διάστημα ανάμεσα στα μέσα Οκτωβρίου 2012 ως και τα μέσα Μαΐου 2012. Χρησιμοποιήθηκαν, συνολικά, 12 εγκεφαλικές τομές οι οποίες προέρχονταν από αρσενικά ποντίκια BL6/129 καθώς και ποντίκια ελέγχου με γονότυπο $Rac1^{+/+}/Nkx2.1^{+/+}$, $Rac1^{+fl}/Nkx2.1^{+/+}$, $Rac1^{fl/fl}/Nkx2.1^{+/+}$ ηλικίας 3 – 5 μηνών. Οι έξι από αυτές επώαστηκαν σε ACSF χωρίς BDNF και οι υπόλοιπες έξι σε ACSF με BDNF.

2.1 Πρωτόκολλο προετοιμασίας εγκεφαλικών τομών

Η ανάπτυξη του πρωτοκόλλου της προετοιμασίας εγκεφαλικών τομών (brain slice preparation) είναι από τα πιο σημαντικά ορόσημα για την εξέλιξη των νευροεπιστημών. Αναπτύχθηκε πρώτη φορά από τον Henry McIlwain τη δεκαετία του 1950 για βιοχημικές μελέτες σε ιστούς εγκεφάλου. Για να αποδείξει ότι το πρωτόκολλο λειτουργεί, χρησιμοποίησε τεχνικές ηλεκτροφυσιολογίας πάνω στις τομές αυτές. Βρήκε ότι οι τομές, όχι μόνο ήταν μεταβολικά ζωντανές, αλλά περιείχαν και νευρώνες με υγιή δυναμικά ενεργείας στις μεμβράνες τους. Άρα, οι εγκεφαλικές τομές μπορούν να διατηρηθούν *in vitro* και να μελετηθούν ηλεκτροφυσιολογικά (Collingridge, 1995). Το πρωτόκολλο αυτό έχει εξελιχθεί σε ένα πολύ ισχυρό εργαλείο για τη μελέτη ηλεκτροφυσιολογικής συμπεριφοράς νευρώνων σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Η αυξανόμενη χρήση του πρωτοκόλλου αντικατοπτρίζει τη μοναδική ευκαιρία που παρέχει για τη μελέτη της ηλεκτρικής συμπεριφοράς μεμονωμένων νευρώνων και της λειτουργίας του νευρικού συστήματος. Επιπροσθέτως, η προετοιμασία τομών παρέχει την ικανότητα ελέγχου του εξωτερικού περιβάλλοντος και μελέτης των νευροφυσιολογικών αποκρίσεων απουσία της συγχυτικής επίδρασης των αναισθητικών, τα οποία συνήθως απαιτούνται σε διαφορετικά πρωτόκολλα (Suter et al., 1999). Ένα τέτοιο πρωτόκολλο (φυσικά περισσότερο εξελιγμένο και προσαρμοσμένο στις ανάγκες του πειράματός μας) χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση και επώαση των εγκεφαλικών τομών του πειράματός μας.

2.2 Διαδικασία παραλαβής των εγκεφαλικών τομών

Αρχικά, θανατώνουμε το ποντίκι και το αποκεφαλίζουμε. Σπρώχνουμε το δέρμα του κεφαλιού, έτσι ώστε να αποκαλυφθεί το κρανίο του. Με ένα ξυράφι, καθαρίζουμε το κρανίο από υπολείμματα ιστών ή αίματος. Στη συνέχεια, πραγματοποιούμε τρεις τομές στο κρανίο, μια κατά μήκος του εμπρόσθιου-οπίσθιου άξονα, και δυο κάθετα και εκατερωθεν της πρώτης, κοντά στο ύψος της παρεγκεφαλίδας. Μετά, αφαιρούμε τα κομμάτια του κρανίου με μια λαβίδα, αφήνοντας, έτσι, εκτεθειμένο τον εγκέφαλο. Βάζουμε μια μικρή σπάτουλα ανάμεσα στο κάτω μέρος του εγκεφάλου και στο κρανίο, και αφαιρούμε προσεκτικά τον εγκέφαλο. Τοποθετούμε τον εγκέφαλο σε μια παγωμένη επιφάνεια και, με ένα ξυράφι, αφαιρούμε την παρεγκεφαλίδα κάνοντας μια εγκάρσια τομή. Μια άλλη εγκάρσια τομή θα πραγματοποιηθεί λίγο πριν την περιοχή του εγκεφάλου (κόβουμε, δηλαδή, περίπου το $\frac{1}{4}$ του εγκεφάλου). Αφού γίνουν οι τομές, κολλάμε τον εγκέφαλο (με την πλευρά που βρισκόταν η παρεγκεφαλίδα προς τα κάτω) σε μια μικρή στρογγυλή επιφάνεια, την οποία, στη συνέχεια, στερεοποιούμε σε μικροτόμο παλλόμενης λεπίδας (vibratome) (Leica VT1000S). Η διαδικασία από τη στιγμή που θα θανατώσουμε το ποντίκι, μέχρι να βάλουμε τον εγκέφαλο στη vibratome πρέπει να είναι όσο το δυνατό πιο σύντομη (1-2 λεπτά το πολύ). Επίσης, ο εγκέφαλος πρέπει να βρίσκεται σε θερμοκρασία 4-8°C. Για το λόγο αυτό, τόσο κατά τη διάρκεια, όσο και αφού αφαιρέσουμε τον εγκέφαλο, τον βουτάμε μέσα σε παγωμένο, τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό (artificial cerebrospinal fluid, ACSF) στο οποίο παρέχουμε συνεχή ροή μείγματος αερίων O₂ (95%) και CO₂ (5%). Το ACSF που χρησιμοποιούμε σε αυτή την περίπτωση περιέχει τα εξής συστατικά: NaCl (125mM), KCl (3.5mM), NaHCO₃ (26mM), MgCl₂ (3mM), NaH₂PO₄ (1.26mM) και Glucose (10mM). Έχει pH=7.4 και osm=310mosm/l. Όπως παρατηρούμε, το συγκεκριμένο ACSF δεν περιέχει ασβέστιο, επειδή, στην παρούσα φάση, θέλουμε τα νευρικά κύτταρα του εγκεφάλου να παραμείνουν, μεν, ζωντανά, αλλά ταυτόχρονα και όσο το δυνατόν πιο αδρανή. Χρησιμοποιούμε το ίδιο ACSF όταν βάλουμε τον εγκέφαλο στη vibratome, ξανά με συνεχή παροχή O₂ (95%) και CO₂ (5%). Οι εγκεφαλικές τομές που παίρνουμε γίνονται με εγκάρσια τομή του εγκεφάλου και έχουν πάχος 400μM. Αφού γίνουν οι τομές, παραλαμβάνουμε τις τομές που κόπηκαν στην περιοχή του ιπποκάμπου, και τις επωάζουμε σε ACSF, με συνεχή ροή O₂ (95%) και CO₂ (5%), σε θερμοκρασία δωματίου (25-27°C). Το ACSF που χρησιμοποιούμε για να επωάσουμε τις control τομές έχει τα παρακάτω συστατικά: NaCl (125mM), KCl

(3.5mM), NaHCO_3 (26mM), MgCl_2 (1mM), CaCl_2 (2mM) και Glucose (10mM). Έχει $\text{pH}=7.4$ και $\text{osm}=310\text{mosm/l}$. Τα ίδια χαρακτηριστικά έχει και το ACSF για τις τομές που επωάζονται σε BNN 27, μόνο που περιέχει επιπλέον 1nM BNN 27. Οι control τομές επωάζονται για τουλάχιστον μια ώρα, ενώ αυτές με το BNN 27 για τουλάχιστον δυο ώρες. Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία απομόνωσης των εγκεφαλικών τομών, καθαρίζουμε τα όργανα και τον πάγκο με απιονισμένο νερό.

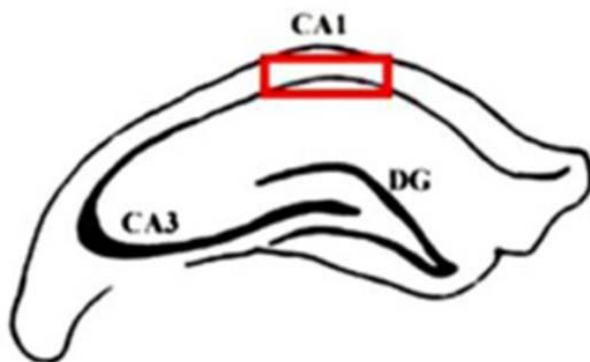
Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στα παρακάτω: Αρχικά, θα πρέπει να είμαστε πολύ προσεκτικοί τόσο κατά τη μεταφορά, όσο και κατά το χειρισμό του ποντικίου όσο αυτό είναι ακόμα ζωντανό, καθώς, αν το αγχώσουμε υπερβολικά, αυτό μπορεί να επηρεάσει τις καταγραφές μας. Έπειτα, απαιτούνται λεπτές κινήσεις, τόσο κατά την αφαίρεση του εγκεφάλου, όσο και κατά την παραλαβή και μεταφορά των τομών, επειδή, οποιαδήποτε λάθος κίνηση μπορεί να καταστρέψει μηχανικά τον εγκέφαλο (πόσο μάλλον την περιοχή του εγκεφάλου που μας ενδιαφέρει να μελετήσουμε) και έτσι να μην μπορούμε να πάρουμε αποτελέσματα. Τέλος, θα πρέπει να διατηρήσουμε τα εγκεφαλικά κύτταρα όσο το δυνατό πιο ζωντανά γίνεται. Για το λόγο αυτό, ο εγκέφαλος, καθώς και οι τομές, δεν πρέπει να μένουν έξω από το ACSF για μεγάλο χρονικό διάστημα, αλλά και τα όργανα που θα έρθουν σε επαφή μαζί τους να μην έχουν καθαριστεί με σαπούνι, καθώς αυτό μπορεί να δημιουργήσει ανεπανόρθωτες βλάβες στα κύτταρά τους.

2.3 Τοποθέτηση τομής στο μικροσκόπιο και καταγραφή αποκρίσεων

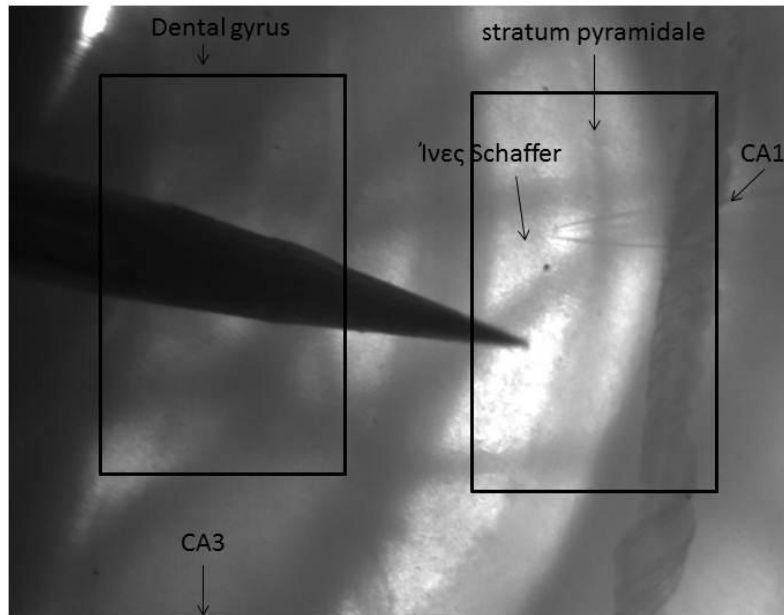
Η προς μελέτη εγκεφαλική τομή τοποθετείται στη βάση μικροσκοπίου φωτισμού πρόσπτωσης (Zeiss, USA) υπό συνεχή ροή ACSF που περιέχει NaCl (125mM), KCl (3.5mM), NaHCO_3 (26mM), MgCl_2 (1mM), CaCl_2 (2mM) και Glucose (10mM), και παροχή O_2 (95%) και CO_2 (5%). Το πείραμα γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου. Καταγράφουμε δυναμικά τοπικού πεδίου (LFP) με τη μέθοδο των εξωκυττάρων καταγραφών (extracellular recordings). Για την επαγωγή των δυναμικών τοπικού πεδίου, χρησιμοποιούμε μεταλλικά συγκεντρικά ηλεκτρόδια ερεθισμού, ενώ για την καταγραφή των δυναμικών αυτών, χρησιμοποιούμε ηλεκτρόδιο χλωριούχου αργύρου, μονωμένο με γυάλινη πιπέτα, διαμέτρου $\sim 10 \mu\text{m}$, που περιέχει 2M NaCl ως ηλεκτρολύτη.

Η περιοχή του ιπποκάμπου που μας ενδιαφέρει να μελετήσουμε είναι η CA1 περιοχή, και συγκεκριμένα, θέλουμε να δούμε την απόκριση βασικών δενδριτών των

πυραμιδικών κυττάρων της στιβάδας “stratum pyramidale” σε ερεθισμούς που φθάνουν μέσω της οδού των παράπλευρων ινών Schaffer. Για το λόγο αυτό, τοποθετούμε τα ηλεκτρόδια ερεθισμού και καταγραφής κοντά στη στοιβάδα των σωμάτων των πυραμιδικών κυττάρων (όχι όμως πάνω σε αυτή) με σκοπό να βρούμε το πεδίο των βασικών δενδριτών των κυττάρων αυτών. Το ηλεκτρόδιο ερεθισμού βρίσκεται πιο κοντά στην περιοχή CA3 σε σχέση με το ηλεκτρόδιο καταγραφής, αφού η κατεύθυνση του ρεύματος είναι από τη CA3 προς τη CA1 περιοχή. Η τοποθέτηση των ηλεκτροδίων γίνεται με τη βοήθεια μικροχειριστών, για μεγαλύτερη ακρίβεια και λεπτότητα στις κινήσεις των ηλεκτροδίων. Το μικροσκόπιο είναι συνδεδεμένο με μια camera (Hamamatsu, Japan), με την οποία μπορούμε να βλέπουμε την τομή από την οθόνη του υπολογιστή, αλλά και να φωτογραφίζουμε την τομή όποτε αυτό κρίνεται απαραίτητο. Για την επεξεργασία των καταγραφών χρησιμοποιούμε το software IgorPro (Wavemetrics, USA <http://www.wavemetrics.com/>).



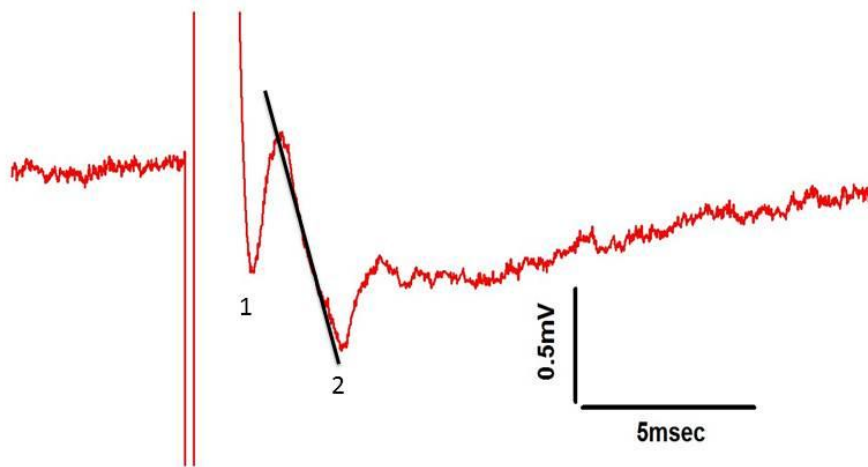
Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση του ιπποκάμπου (το κόκκινο κουτί δείχνει την CA1 περιοχή).



Εικόνα 6: Τοποθέτηση ηλεκτροδίων για την καταγραφή της απόκρισης των πυραμιδικών κυττάρων στην περιοχή CA1 του ιπποκάμπτου. Ηλεκτρόδιο ερεθισμού: μαύρο, ηλεκτρόδιο καταγραφής: διάφανο (η περιοχή CA3 δεν φαίνεται).

2.4 Τυπική μορφή απόκρισης

Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται μια τυπική απόκριση στην περιοχή CA1 του ιπποκάμπτου μετά από ηλεκτρικό ερεθισμό. Το πρώτο “ελάχιστο” αντιστοιχεί στη μέγιστη απόλυτη τιμή του δυναμικού κατά την απόκριση των αξόνων και ονομάζεται κορυφή της κοιλάδας πυροδότησης (Volley peak ή Vpeak). Το δεύτερο και μεγαλύτερο “ελάχιστο” αντιστοιχεί στη μέγιστη απόλυτη τιμή δυναμικού κατά τη συναπτική απόκριση και είναι αυτό που μας ενδιαφέρει να μετρήσουμε. Ονομάζεται κορυφή (μέγιστη τιμή) δυναμικού πεδίου (Field peak ή Fpeak). Η κλίση της ευθείας μας δείχνει το πόσο γρήγορα φτάνει το δυναμικό στο μέγιστο σημείο της απόκρισης. Ονομάζεται κλίση ενεργοποίησης (Activation slope ή Actslope).



Εικόνα 7: Μορφή μιας τυπικής απόκρισης. 1: Vpeak, 2: Fpeak, κλίση ευθείας: Actslope.

2.5 Πρωτόκολλο επαγωγής μακρόχρονης ενδυνάμωσης (LTP protocol)

Αρχικά, δίνουμε ερεθισμούς διάρκειας 0,01ms μεταβαλλόμενης έντασης ρεύματος (input – output), ξεκινώντας από τα 0.05mA και φτάνοντας στα 0.3mA. Για κάθε ένταση ρεύματος δίνουμε δυο ερεθισμούς και ανάμεσα σε δυο ερεθισμούς μεσολαβεί χρόνος διάρκειας 1min. ώστε να περιορίζεται το ηλεκτρικό φορτίο που διοχετεύεται στη φέτα μετά τον ερεθισμό.

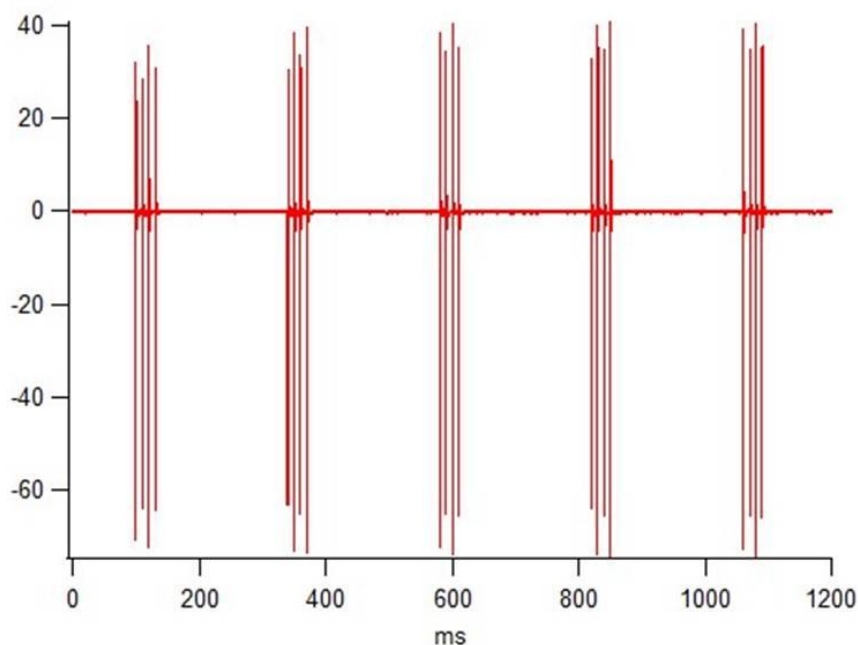
Στη συνέχεια, για να μελετήσουμε πιθανή μεταβολή στην προσυναπτική ιδιότητα, μετράμε την συζευγμένη διευκόλυνση (paired-pulse facilitation, PPF), μια μορφή βραχύχρονης πλαστικότητας, στην οποία η ποσότητα της PPF είναι αντιστρόφως ανάλογη με την πιθανότητα απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστή από τα προσυναπτικά κύτταρα (Chen, Dai, & Sokabe, 2006). Για το λόγο αυτό, δίνουμε δυο συζευγμένους ερεθισμούς (paired-pulse recordings) διαφορετικών συχνοτήτων (10, 20, 50 Hz) (από δυο φορές το κάθε ζεύγος) διάρκειας 0,01ms και εντάσεως 0,1-0,15mA ο καθένας. Η διάρκεια ανάμεσα σε δυο ζεύγη είναι 1min.

Ακολουθούν δεκαπέντε (15) ερεθισμοί διάρκειας 0,01ms και εντάσεως 0,1-0,15mA ο καθένας οι οποίοι απέχουν χρονικά 1min. Οι ερεθισμοί αυτοί, μας δείχνουν τη συμπεριφορά των νευρώνων πριν την επαγωγή του LTP (baseline).

Έπειτα, πραγματοποιείται η επαγωγή της μακρόχρονης ενδυνάμωσης χρησιμοποιώντας δυο ακολουθίες Θ ρυθμού (theta burst trains) καθμιά από τις οποίες αποτελείται από 5 ερεθίσματα των 100Hz τα οποία επαναλαμβάνονται 5 φορές με συχνότητα 5Hz. Οι δυο αυτές ακολουθίες απέχουν μεταξύ τους 20sec.

Εν συνεχεία, καταγράφουμε την απόκριση των νευρώνων δίνοντας πενήντα (50) περίπου ερεθισμούς διάρκειας 0,01ms και εντάσεως 0,1-0,15mA ο καθένας οι οποίοι απέχουν χρονικά 1min. Η μακρόχρονη ενδυνάμωση φαίνεται ως αύξηση της συναπτικής απόκρισης σε σχέση με τη συναπτική απόκριση πριν το πρωτοκόλλο επαγωγής LTP.

Τέλος, δίνουμε δυο συζευγμένους ερεθισμούς (paired-pulse recordings) διαφορετικών συχνοτήτων (10, 20, 50 Hz) (από τρεις φορές το κάθε ζεύγος) διάρκειας 0,01ms και εντάσεως 0,1-0,15mA ο καθένας. Η διάρκεια ανάμεσα σε δυο ζεύγη είναι 1min.



Εικόνα 8: Theta burst train.

2.6 Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Στα αποτελέσματα των πειραμάτων μας εξετάζουμε τις εξής παραμέτρους που σχετίζονται με την απόκριση των εγκεφαλικών τομών:

Fpeak: μέγιστη απόλυτη τιμή δυναμικού κατά τη συναπτική απόκριση,

Fpreak: η διαφορά της τιμής Fpeak από το πιο ψηλό σημείο της καμπύλης απόκρισης μετά την κοιλάδα πυροδότησης,

Active slope (Actslope): η κλίση της καμπύλης μετά την κοιλάδα πυροδότησης, μια συνάρτηση της μορφής $ax+b$. Μας δείχνει το πόσο γρήγορα φτάνει το δυναμικό στο μέγιστο σημείο της απόκρισης.

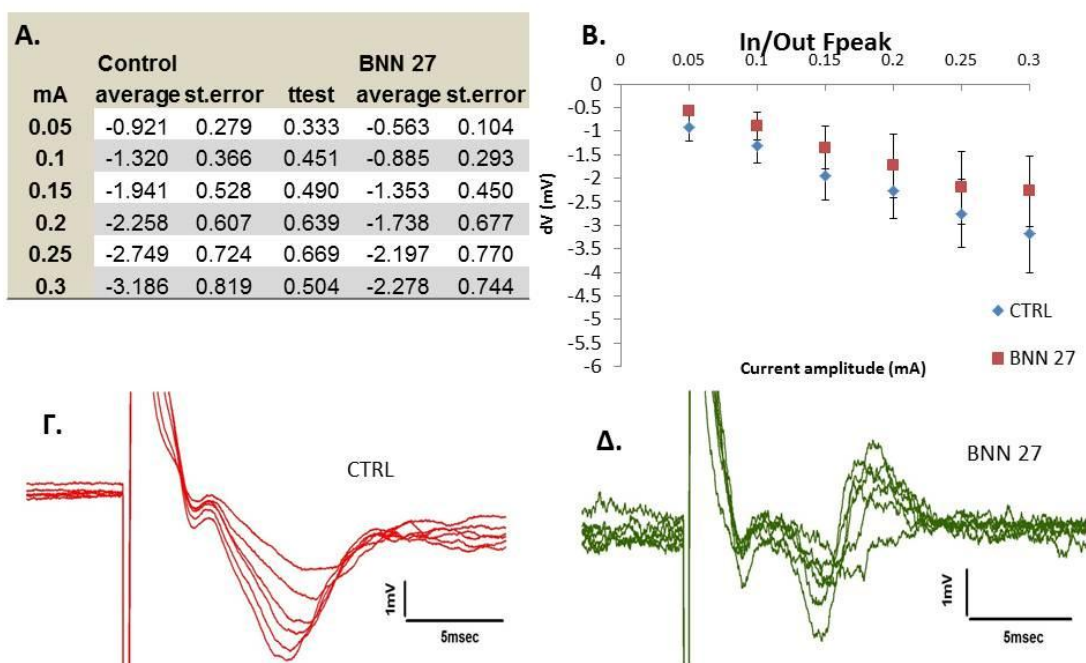
Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων μας χρησιμοποιούμε και πάλι το IgorPro. Για την ανάλυση του input – output βρίσκουμε το μέσο όρο των δυο τιμών που πήραμε από ερεθισμό σε κάθε τιμή ρεύματος. Μελετάμε τα Fpeak, Fpreak και Actslope. Για την ανάλυση της PPF βρίσκουμε ξανά το μέσο όρο των τιμών για κάθε συχνότητα. Εδώ, μας ενδιαφέρει να μελετήσουμε το λόγο της απόκρισης του δεύτερου ερεθισμού, σε σχέση με αυτήν του πρώτου για κάθε ζεύγος ερεθισμών (δηλαδή $Fpeak2/Fpeak1$). Στην περίπτωση του LTP, κανονικοποιούμε τις τιμές των δεδομένων μας (Fpeak, Fpreak και Actslope) και στη συνέχεια παίρνουμε το μέσο όρο τους ανά 5λεπτα. Έτσι, έχουμε δυο 5λεπτα πριν την επαγωγή του LTP (baseline) και 10 5λεπτα μετά από αυτή.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

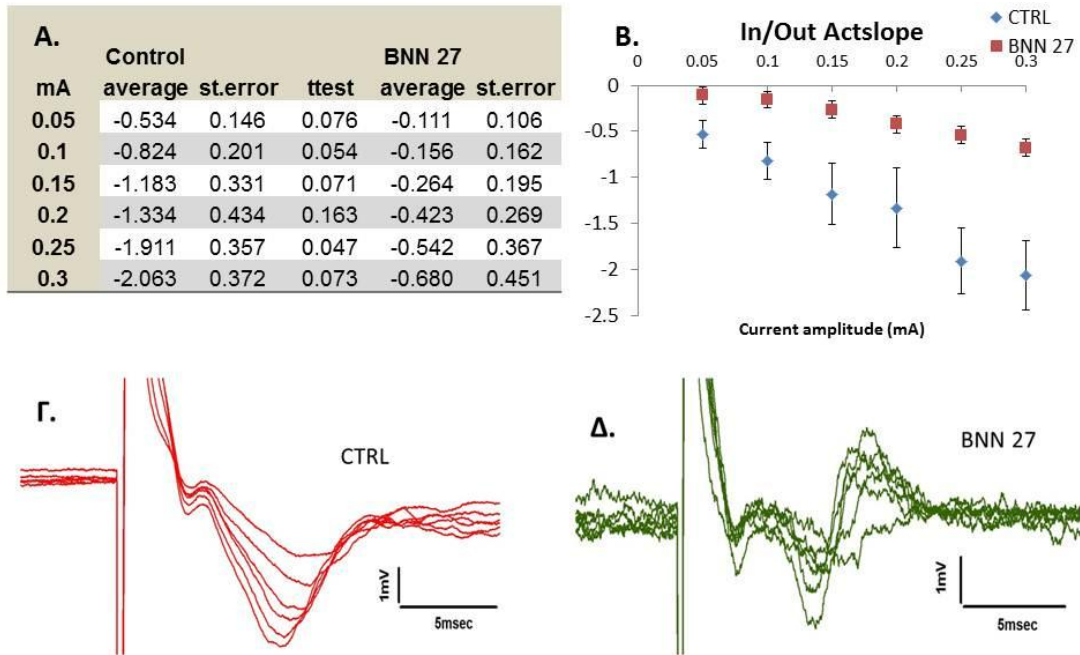
3.1 Παρουσίαση αποτελεσμάτων

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η σύγκριση της συμπεριφοράς των νευρώνων του ιπποκάμπου κατά την επαγωγή μακρόχρονης ενδυνάμωσης (LTP) ανάμεσα σε εγκεφαλικές τομές που έχουν επωαστεί σε κανονικό ACSF (τομές ελέγχου, control) και σε τομές που έχουν επωαστεί σε ACSF που περιέχει και 1nM BNN 27.

Αρχικά, μετράμε τις τρεις παραμέτρους (F_{peak} , F_{rpeak} και Act_{slope}) στις αποκρίσεις των τομών στους ερεθισμούς μεταβαλλόμενης έντασης ρεύματος (input – output), 0,05mA – 0.3mA.



Γράφημα 1: Σύγκριση του F_{peak} ανάμεσα σε control και BNN 27 τομές κατά τη διαδικασία input – output.
 A: Πίνακας που δείχνει τη μέση τιμή και το στατιστικό εύρος του F_{peak} για τομές ελέγχου και τομές μετά από επώαση σε BNN-27, για έξι διαφορετικές εντάσεις ρεύματος.
 B: Γραφική παράσταση που αναπαριστά τα αποτελέσματα του πίνακα στο A.
 Γ, Δ: Αντιπροσωπευτικές αποκρίσεις του F_{peak} για τομές ελέγχου (A) και BNN 27 (B).

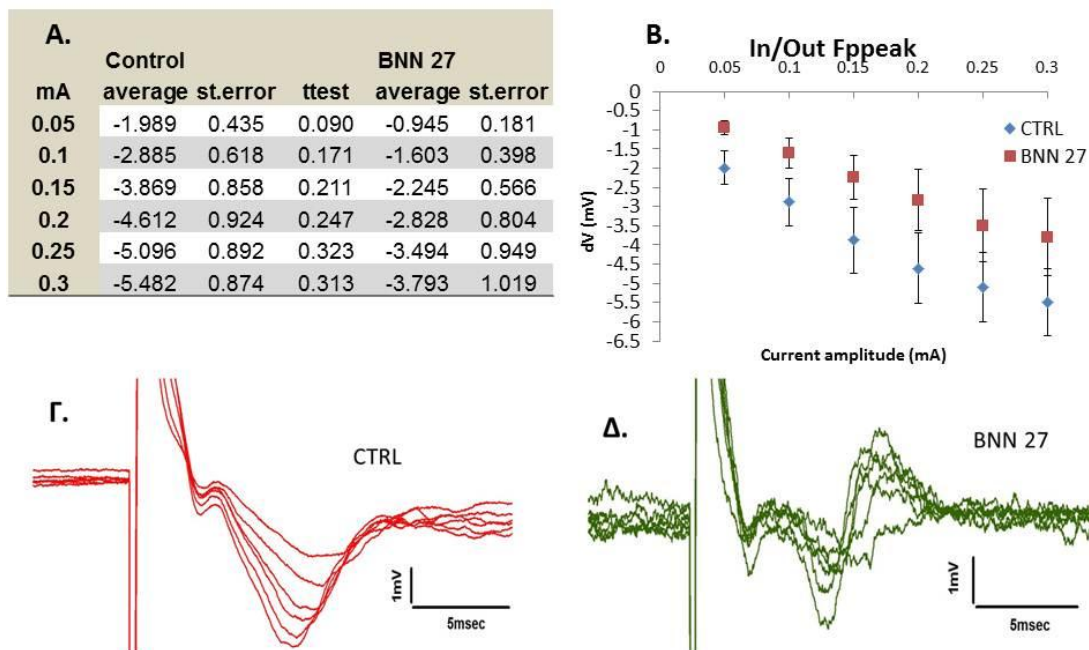


Γράφημα 2: Σύγκριση του Actslope ανάμεσα σε control και BNN 27 τομές κατά τη διαδικασία input – output.

A: Πίνακας που δείχνει τη μέση τιμή και το στατιστικό εύρος του Actslope για φέτες ελέγχου και φέτες μετά από επώαση σε BNN-27, για έξι διαφορετικές εντάσεις ρεύματος.

B: Γραφική παράσταση που αναπαριστά τα αποτελέσματα του πίνακα στο A.

Γ, Δ: Αντιπροσωπευτικές αποκρίσεις του Actslope για τομές ελέγχου (A) και BNN 27 (B).



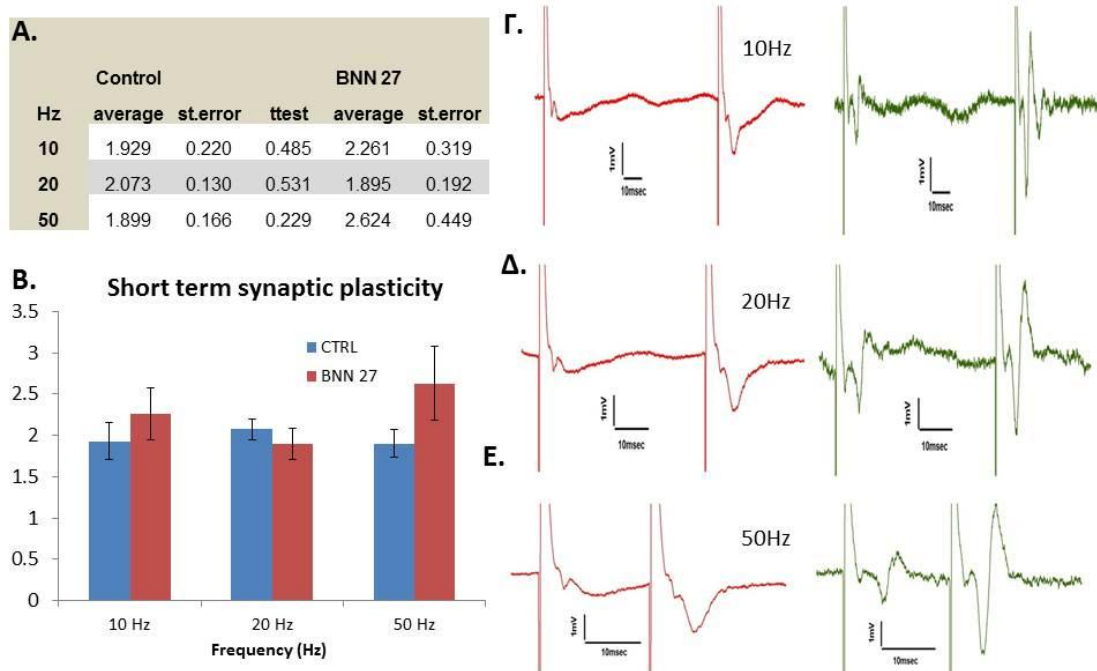
Γράφημα 3: Σύγκριση του Fppeak ανάμεσα σε control και BNN 27 τομές κατά τη διαδικασία input – output.

A: Πίνακας που δείχνει τη μέση τιμή και το στατιστικό εύρος του Fppeak για τομές ελέγχου και τομές μετά από επώαση σε BNN-27, για έξι διαφορετικές εντάσεις ρεύματος.

B: Γραφική παράσταση που αναπαριστά τα αποτελέσματα του πίνακα στο A.

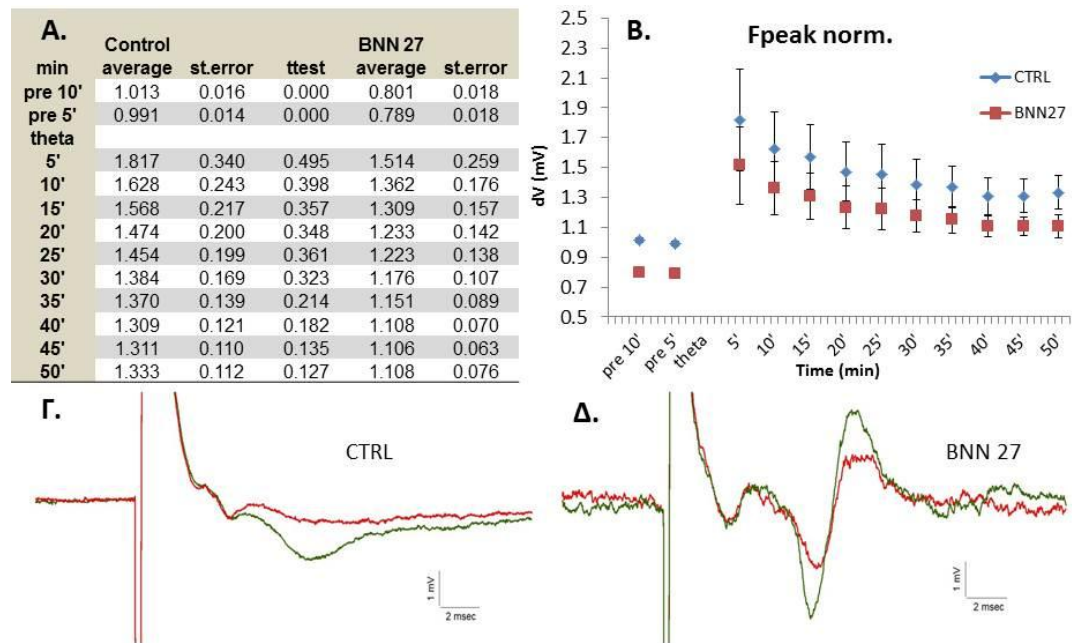
Γ, Δ: Αντιπροσωπευτικές αποκρίσεις του Fppeak για τομές ελέγχου (A) και BNN 27 (B).

Στη συνέχεια, μετράμε το λόγο της δεύτερης προς την πρώτη απόκριση (Freak2/Freak1) σε κάθε ζεύγος συζευγμένων ερεθισμών πριν την επαγωγή LTP.



Γράφημα 4: Η επίδραση του νευροστεροειδούς BNN-27 στη διευκόλυνση συζευγμένων παλμών
 Α. Πίνακας που δείχνει τη μέση τιμή και το στατιστικό εύρος της διευκόλυνσης συζευγμένων παλμών για τομές ελέγχου και τομές μετά από επώαση σε BNN-27, για τρεις διαφορετικές συχνότητες,
 Β. Ραβδογράμματα που αναπαριστούν τα αποτελέσματα του πίνακα στο Α,
 Γ, Δ, Ε. Αντιπροσωπευτικές αποκρίσεις συζευγμένων παλμών για συχνότητες 10Hz (Γ), 20Hz, (Δ) 50Hz (Ε).

Έπειτα, μετράμε τις τρεις παραμέτρους (Fpeak, F_{rpeak} και Actslope) στις αποκρίσεις των φετών στους απλούς ερεθισμούς, πριν (baseline) και μετά την επαγωγή LTP.

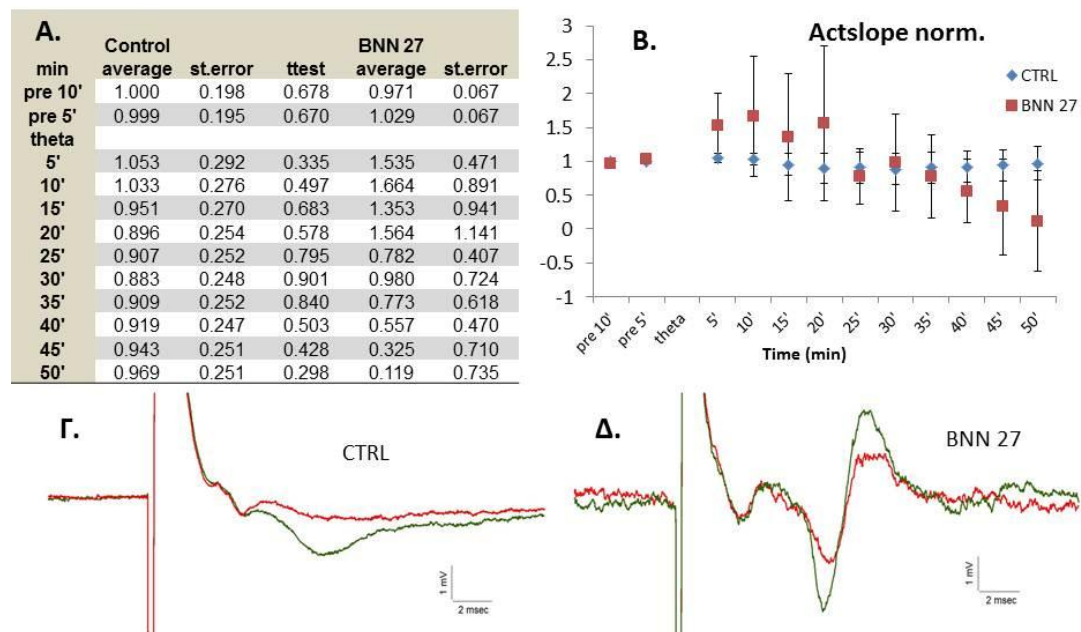


Γράφημα 5: Η επίδραση του νευροστεροειδούς BNN-27 στην επαγωγή μακρόχρονης ενδυνάμωσης.

A: Πίνακας που δείχνει τη μέση τιμή και το στατιστικό εύρος του F_{rpeak} για τομές ελέγχου και τομές μετά από επώαση σε BNN-27, για 10min πριν και 50min μετά την επαγωγή LTP,

B: Γραφική παράσταση που αναπαριστά τα αποτελέσματα του πίνακα στο A,

Γ, Δ: Αντιπροσωπευτικές αποκρίσεις του F_{rpeak} (control: (Γ), BNN 27: (Δ)) πριν (κόκκινο) και μετά την επαγωγή LTP (πράσινο).



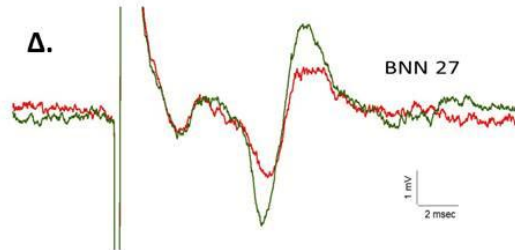
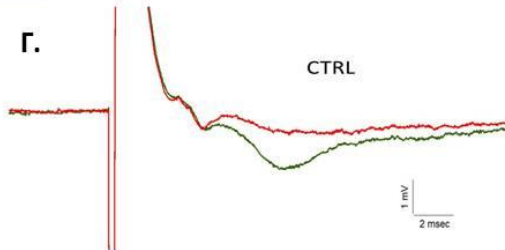
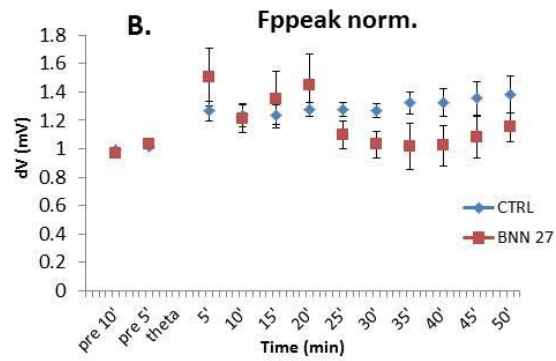
Γράφημα 6: Η επίδραση του νευροστεροειδούς BNN-27 στην επαγωγή μακρόχρονης ενδυνάμωσης.

A: Πίνακας που δείχνει τη μέση τιμή και το στατιστικό εύρος του Actslope για τομές ελέγχου και τομές μετά από επώαση σε BNN-27, για 10min πριν και 50min μετά την επαγωγή LTP,

B: Γραφική παράσταση που αναπαριστά τα αποτελέσματα του πίνακα στο A,

Γ, Δ: Αντιπροσωπευτικές αποκρίσεις του Actslope (control: (Γ), BNN 27: (Δ)) πριν (κόκκινο) και μετά την επαγωγή LTP (πράσινο).

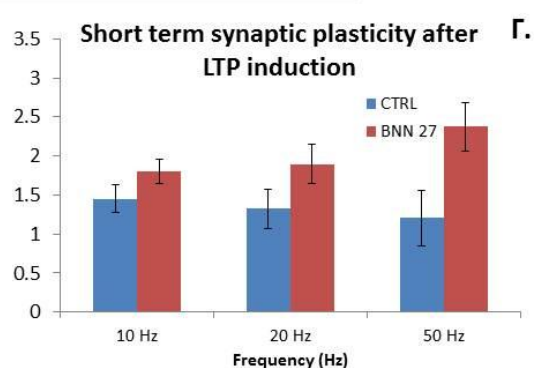
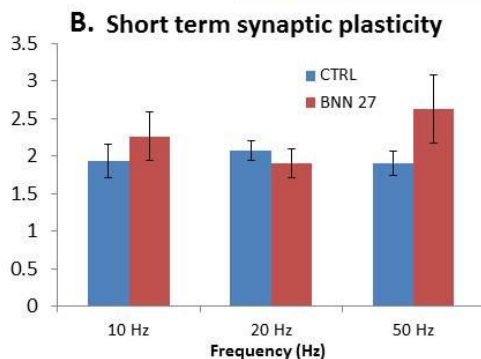
min	Control			BNN 27		
	average	st.error	ttest	average	st.error	ttest
pre 10'	0.989	0.006	0.522	0.966	0.034	
pre 5'	1.013	0.006	0.547	1.034	0.034	
theta						
5'	1.265	0.067	0.294	1.502	0.204	
10'	1.237	0.081	0.837	1.210	0.099	
15'	1.238	0.070	0.612	1.347	0.196	
20'	1.276	0.047	0.456	1.449	0.218	
25'	1.275	0.049	0.143	1.099	0.099	
30'	1.270	0.051	0.052	1.030	0.096	
35'	1.322	0.076	0.121	1.018	0.162	
40'	1.326	0.099	0.113	1.022	0.143	
45'	1.355	0.116	0.169	1.081	0.144	
50'	1.383	0.127	0.187	1.151	0.104	



Γράφημα 7: Η επίδραση του νευροστεροειδούς BNN-27 στην επαγωγή μακρόχρονης ενδυνάμωσης.
 A: Πίνακας που δείχνει τη μέση τιμή και το στατιστικό εύρος του Fpeak για τομές ελέγχου και τομές μετά από επώαση σε BNN-27, για 10min πριν και 50min μετά την επαγωγή LTP,
 B: Γραφική παράσταση που αναπαριστά τα αποτελέσματα του πίνακα στο A,
 Γ, Δ: Αντιπροσωπευτικές αποκρίσεις του Fpeak (control: (Γ), BNN 27: (Δ)) πριν (κόκκινο) και μετά την επαγωγή LTP (πράσινο).

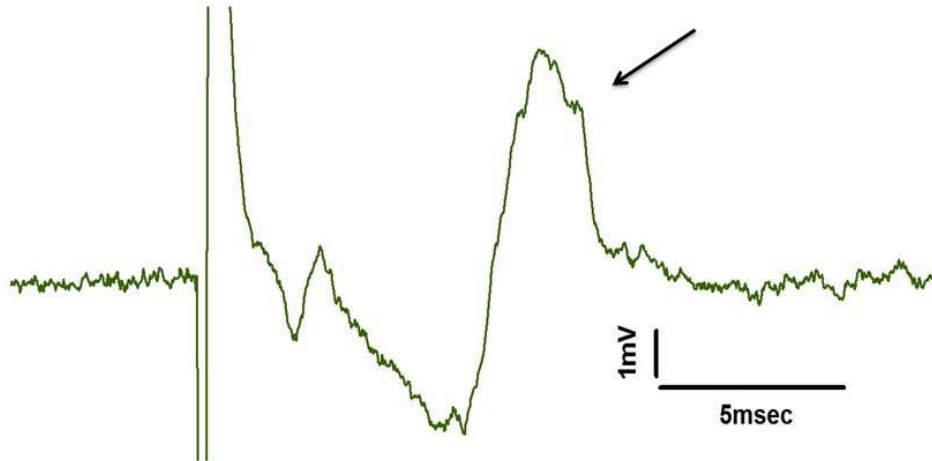
Τέλος, μετράμε το λόγο της δεύτερης προς την πρώτη απόκριση (Fpeak2/Fpeak1) σε κάθε ζεύγος συζευγμένων ερεθισμών μετά την επαγωγή του LTP.

Hz	Control			BNN 27		
	average	st.error	ttest	average	st.error	ttest
10	1.929	0.220	0.485	2.261	0.319	
20	2.073	0.130	0.531	1.895	0.192	
50	1.899	0.166	0.229	2.624	0.449	
LTP						
10	1.450	0.178	0.240	1.802	0.157	
20	1.322	0.251	0.206	1.892	0.253	
50	1.205	0.356	0.062	2.373	0.308	



Γράφημα 8: Η επίδραση του νευροστεροειδούς BNN-27 στη διευκόλυνση συζευγμένων παλμών πριν και μετά την επαγωγή της μακρόχρονης ενδυνάμωσης.
 A: Πίνακας που δείχνει τη μέση τιμή και το στατιστικό εύρος της διευκόλυνσης συζευγμένων παλμών για τομές ελέγχου και τομές μετά από επώαση σε BNN-27, για τρεις διαφορετικές συχνότητες, πριν και μετά το LTP,
 B, Γ: Ραβδογράμματα που αναπαριστούν τα αποτελέσματα του πίνακα στο A πριν (B) και μετά το LTP (Γ).

Παρατηρούμε ότι, στις τομές που έχουν επωαστεί με BNN 27 κυρίως, εμφανίζεται, εκτός της κανονικής απόκρισης, και μια απόκριση προς τα πάνω.



Εικόνα 9: Παράδειγμα απόκρισης προς τα πάνω.

3.2 Ανάλυση αποτελεσμάτων

Για τη μελέτη των ιδιοτήτων των συναπτικών αποκρίσεων στο μονοπάτι CA3-CA1 του ιπποκάμπου, καταγράψαμε δυναμικά τοπικού πεδίου μετά από ερεθισμούς μεταβαλλόμενης έντασης. Από την ανάλυση της μέγιστης απόκρισης (F_{peak}), παρατηρούμε ότι οι τομές ελέγχου εμφανίζουν μεγαλύτερη απόκριση σε σχέση με τις τομές που έχουν επωαστεί σε BNN 27, σε όλες τις εντάσεις ρεύματος που τους δώθηκε, ενώ ο ρυθμός αύξησης της απόκρισης όσο αυξάνει το ρεύμα είναι ανάλογος και στις δυο κατηγορίες εγκεφαλικών τομών (γράφημα 1A). Επίσης, παρατηρούμε ότι η τιμή της κλίσης ενεργοποίησης (activation slope) των τομών ελέγχου μεταβαίνει πιο γρήγορα στο μέγιστο σημείο της απόκρισης (μεγαλύτερη η κλίση της ευθείας $ax+b$) από αυτό των BNN 27. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του F_{rpeak} (μέτρηση της μέγιστης απόκρισης από την προηγούμενη κορυφή της απόκρισης, βλ. Μέθοδοι) μας δίνει παρόμοια στοιχεία με αυτή του F_{peak} .

Εκτός από τη διαφορά στη μέγιστη απόκριση, παρατηρούμε και μια ποιοτική αλλαγή στη συναπτική απόκριση, στις τομές μετά από επώαση του BNN 27. Πιο συγκεκριμένα, ενώ στις control τομές, μετά την απόκριση επιστρέφουμε στο baseline, στις BNN 27 τομές μετά την φυσιολογική απόκριση, διακρίνουμε και μια απόκριση προς τα πάνω, και στη συνέχεια επιστροφή στο baseline (Εικόνα 9).

Για να μελετήσουμε την βραχύχρονη πλαστικότητα, δώσαμε συζευγμένους ερεθισμούς (paired pulse), στους οποίους οι συνάψεις στα CA1 κύτταρα του ιπποκάμπου εμφανίζουν διευκόλυνση. Η διευκόλυνση συζευγμένων παλμών, όπως φαίνεται από το λόγο Fpeak2/Fpeak1 είναι μεγαλύτερη στις τομές που έχουν επωαστεί με BNN 27 σε σύγκριση με τις τομές ελέγχου (Γράφημα 4B). Ειδικά, όταν οι συζευγμένοι παλμοί δίνονται με συχνότητα 50 Hz.

Επίσης, μελετήσαμε την επίδραση του νευροστεροειδούς BNN 27 στις ιδιότητες της μακρόχρονης ενδυνάμωσης.

Κατά την επαγωγή του LTP, παρατηρούμε τα εξής: Αρχικά, από την ανάλυση του Fpeak, βλέπουμε ότι, πριν την επαγωγή του LTP (baseline), η απόκριση των control τομών είναι μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή των BNN 27. Μετά την επαγωγή του LTP, η απόκριση των control τομών αυξήθηκε κατά 80%, ενώ αυτή των BNN 27 αυξήθηκε κατά 70%. Άρα, μεγαλύτερη αύξηση της απόκρισης στις control τομές. Το φαινόμενο αυτό (δηλαδή μεγαλύτερη απόκριση στις control τομές) διατηρείται καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος (50min μετά την επαγωγή LTP) στο τέλος του οποίου, η απόκριση των control τομών μειώθηκε σε επίπεδο του 30% υψηλότερο από αυτό της αρχικής, ενώ αυτή των BNN 27 τομών μειώθηκε σε επίπεδο του 20% υψηλότερο από αυτό της αρχικής. Η ανάλυση του Actslope δεν έδειξε κάποια σημαντική μεταβολή πριν και μετά την επαγωγή του LTP τόσο στις control, όσο και στις BNN 27 τομές. Επίσης, δεν παρατηρείται κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή του Actslope ανάμεσα στις control και στις BNN 27 τομές. Παρόμοια αποτελέσματα με αυτά του Actslope είχαμε και από την ανάλυση του Fpeak.

Μελετώντας τα αποτελέσματα από τους συζευγμένους παλμούς πριν και μετά το LTP καταλήγουμε στα παρακάτω συμπεράσματα: Ο λόγος Fpeak2/Fpeak1 των control τομών μειώθηκε μετά το LTP, και συγκεκριμένα, από ~2 ήταν πριν το LTP, μειώθηκε στο 1 – 1,5. Από την άλλη, ο λόγος αυτός στις BNN 27 τομές μειώθηκε, μεν, αλλά σε μικρότερο βαθμό, ενώ παρέμεινε σταθερά μεγαλύτερος σε σχέση με αυτόν των control τομών.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

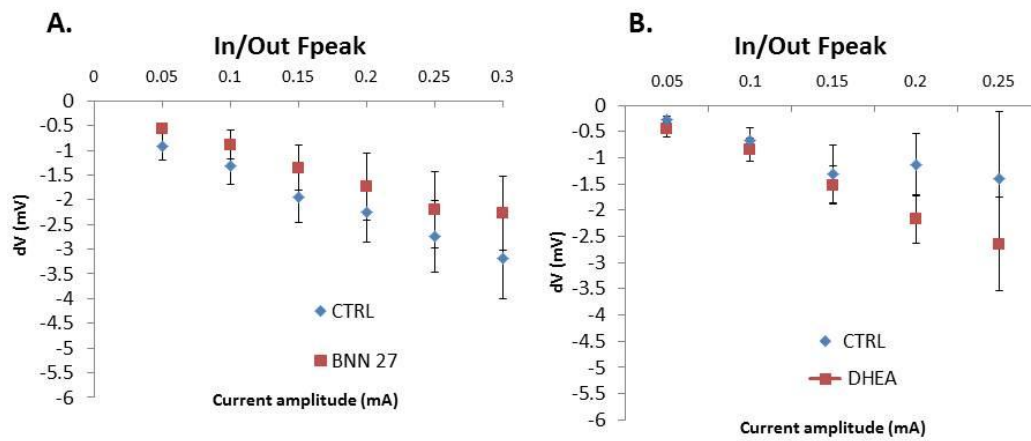
4.1 Συμπεράσματα

Από τη στιγμή που, αυξάνοντας την ένταση του ρεύματος στους ερεθισμούς μεταβαλλόμενης έντασης, αυξάνει και η απόκριση, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι αυξάνει η συνεισφορά των νευρικών κυττάρων στο δυναμικό τοπικού πεδίου. Η αύξηση αυτή γίνεται σε μικρότερο βαθμό στις BNN 27 τομές.

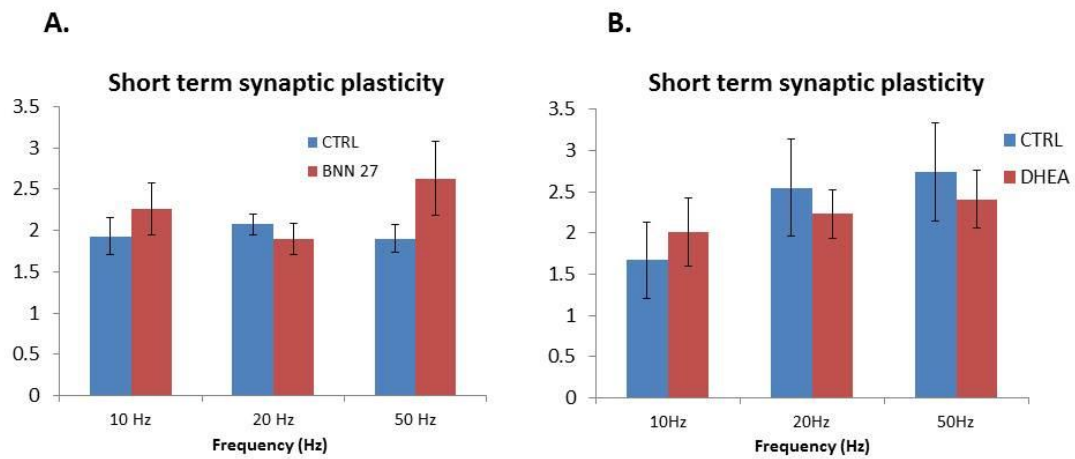
Όπως αναφέραμε και στην εισαγωγή, η ποσότητα της συζευγμένης διευκόλυνσης (paired-pulse facilitation, PPF) είναι αντιστρόφως ανάλογη με την πιθανότητα απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστή από τα προσυναπτικά κύτταρα (Chen, Dai, et al., 2006). Αφού οι BNN 27 τομές εμφανίζουν μεγαλύτερη PPF από τις control, υποθέτουμε ότι οι πρώτες εκλύουν μικρότερη ποσότητα νευροδιαβιβαστών από τα προσυναπτικά κύτταρα σε σχέση με τις δεύτερες. Η μικρότερη αυτή έκλυση νευροδιαβιβαστών, θα μπορούσε να αποτελεί και αιτία μειωμένης απόκρισης των BNN 27 τομών σε σχέση με τις control.

Ο BNN 27 είναι, όπως έχουμε αναφέρει, παράγωγο της DHEA, με παρόμοιες αντιαποπρωτικές δράσεις με αυτή. Από τη στιγμή που ο BNN 27 δημιουργήθηκε μετατρέποντας τα μονοπάτια της DHEA που οδηγούν στον μεταβολισμό της σε οιστρογόνα, ανδρογόνα, ή προγεστερόνες, υπάρχει περίπτωση να έχουν επηρεαστεί και άλλες ιδιότητές της. Οπότε, ορισμένες δράσεις του BNN 27 μπορεί να έχουν ίδια ή αντίθετα αποτελέσματα σε σχέση με ανάλογες δράσεις της DHEA.

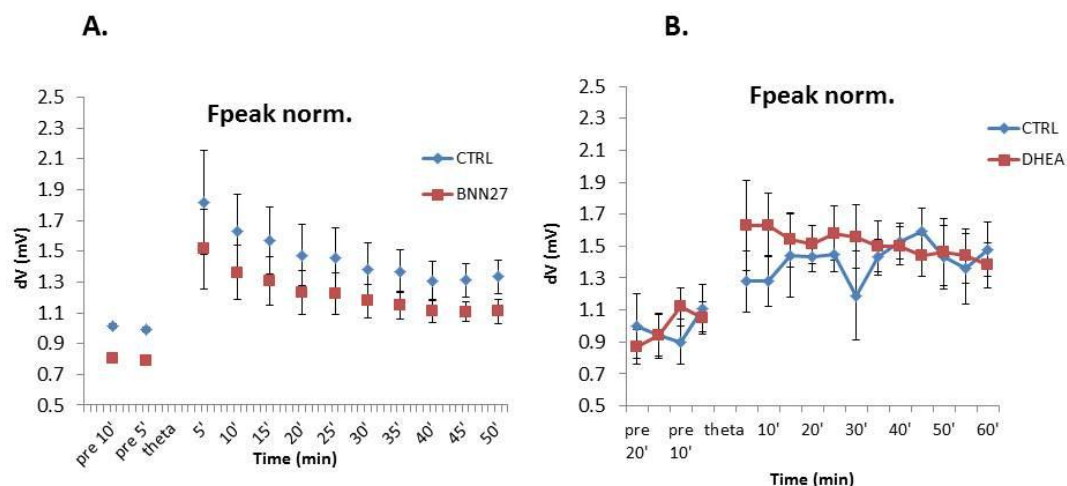
Σύμφωνα με έρευνες που έχουν γίνει πάνω στη δράση της DHEA στην επαγωγή του LTP (Chen, Miyamoto, et al., 2006) (εδώ έχει χρησιμοποιηθεί Dehydroepiandrosterone sulfate, DHEAS η οποία, όμως, έχει ανάλογες δράσεις με την DHEA), η DHEA αυξάνει την μακρόχρονη ενδυνάμωση μέσω της ενίσχυσης της ενεργότητας των NMDAR. Πειράματα που συγκρίνουν απόκριση στη μακρόχρονη ενδυνάμωση (με τη χρήση του πρωτοκόλλου επαγωγής LTP που χρησιμοποιήθηκε σε αυτό το πείραμα) ανάμεσα σε εγκεφαλικές τομές που έχουν επωαστεί σε ACSF παρουσία νανομοριακής ποσότητας DHEA και σε control εγκεφαλικές φέτες έχουν πραγματοποιηθεί και στο εργαστήριό μας, (από Alexandra Hovserian) και έδειξαν, επίσης, αύξηση της μακρόχρονης ενδυνάμωσης λόγω της DHEA.



Γράφημα 9: Σύγκριση In/Out Fpeak ανάμεσα στα πειράματα με BNN 27 (A) και DHEA (B).



Γράφημα 10: Σύγκριση Short term synaptic plasticity ανάμεσα στα πειράματα με BNN 27 (A) και DHEA (B).



Γράφημα 11: Σύγκριση Fpeak ανάμεσα στα πειράματα με BNN 27 (A) και DHEA (B).

Όπως βλέπουμε από τις γραφικές παραστάσεις που συγκρίνουν τα πειράματα με DHEA και BNN 27, οι δράσεις του BNN 27 είναι αντίθετες από τις δράσεις της DHEA. Πιο συγκεκριμένα, ενώ η απόκριση των BNN 27 τομών είναι μικρότερη από αυτή των control τομών κατά τη διαδικασία του input – output, στην ίδια διαδικασία η απόκριση των DHEA τομών είναι μεγαλύτερη από αυτή των control. Όσον αφορά τα αποτελέσματα των συζευγμένων παλμών, οι BNN 27 τομές έχουν αυξημένη PPF σε σχέση με τις control, ενώ οι DHEA έχουν ίση, αν όχι μικρότερη. Τέλος, οι BNN 27 τομές εμφανίζουν μικρότερη μακρόχρονη ενδυνάμωση σε σχέση με τις control, ενώ, αντίθετα, οι DHEA παρουσιάζουν μεγαλύτερη (τουλάχιστον στα 30 πρώτα λεπτά).

Ένα πιθανό μοντέλο, το οποίο θα μπορούσε να δικαιολογήσει τα παραπάνω αποτελέσματα είναι το εξής: η DHEA έχει μεγάλη συγγένεια πρόσδεσης με τον NMDAR αλλά μικρότερη με τον GABA_A. Αποτέλεσμα αυτού, είναι περισσότερη έκλυση νευροδιαβιβαστή από τα προσυναπτικά κύτταρα, οπότε και μειωμένη PPF, και επίσης, περισσότερη εισροή νευροδιαβιβαστή στα μετασυναπτικά κύτταρα, οπότε μεγαλύτερη μακρόχρονη ενδυνάμωση. Για να έχει αντίθετες δράσεις το BNN 27, θα πρέπει να έχει μειωμένη συγγένεια στον NMDAR και αυξημένη συγγένεια στον GABA_A. Η αυξημένη PPF στις BNN 27 τομές, καθώς και η μειωμένη μακρόχρονη ενδυνάμωση, δικαιολογούν τη μειωμένη συγγένεια με τον NMDAR. Το γεγονός ότι

σχεδόν σε όλες τις BNN 27 τομές είχαμε, μετά την κανονική απόκριση, και μια απόκριση προς τα πάνω, είναι δείγμα λειτουργίας ανασταλτικών ενδονευρώνων (οι οποίοι, όπως γνωρίζουμε, ασκούν τις δράσεις τους μέσω GABA_A), κάτι που μπορεί να δικαιολογηθεί με την αυξημένη συγγένεια του BNN 27 προς τους GABA_A.

Φυσικά ο μικρός αριθμός δειγμάτων, καθώς και η έλλειψη σημαντικότητας (significance, μετριέται με τη βοήθεια του Ttest) δεν μας επιτρέπουν να εξάγουμε συμπεράσματα με μεγάλη ασφάλεια.

4.2 Προτάσεις για έρευνα στο μέλλον

Μια πιθανή μελέτη για το μέλλον, θα μπορούσε να είναι η πραγματοποίηση περισσότερων παρόμοιων πειραμάτων με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, με σκοπό την επαλήθευση (ή την κατάρριψη) των αποτελεσμάτων που αντλήθηκαν από αυτό το πείραμα. Ακόμα, μεγάλο ενδιαφέρον θα παρουσίαζε μια πειραματική διαδικασία, κατά την οποία θα χρησιμοποιούνταν τόσο DHEA, όσο και BNN 27 τομές, όπου εκεί θα φαινόταν καλύτερα αν, τελικά, τα δυο αυτά νευροστεροειδή έχουν παρόμοιες ή αντίθετες δράσεις, καθώς η σύγκριση δεδομένων που βρίσκονται στο ίδιο πείραμα είναι σαφώς ακριβέστερη από τη σύγκριση δεδομένων διαφορετικών πειραμάτων.

Είπαμε πως ο μεταβολισμός της DHEA σε οιστρογόνα, ανδρογόνα και προγεστερόνες, (οδηγώντας σε απόπτωση των κυττάρων) περιορίζει την κλινική της χρήση. Από τη στιγμή που φαίνεται ότι το BNN 27 μπορεί να επάγει LTP, έστω και σε μικρό βαθμό, και αφού είναι εξ' αρχής σχεδιασμένο να μην ακολουθεί το παραπάνω μονοπάτι μεταβολισμού, μπορεί να γίνει έλεγχος για το αν είναι δυνατή η χρήση του ως φάρμακο για διάφορες νευροεκφυλιστικές παθήσεις (πχ. Alzheimer's).

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams, J. P., & Sweatt, J. D. (2002). Molecular psychology: roles for the ERK MAP kinase cascade in memory. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 42, 135-63. doi:10.1146/annurev.pharmtox.42.082701.145401
- Alberini, C. M., Ghirardi, M., Metz, R., & Kandel, E. R. (1994). C/EBP is an immediate-early gene required for the consolidation of long-term facilitation in Aplysia. *Cell*, 76(6), 1099-114. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8137425>
- Amaral, D. G. (1993). Emerging principles of intrinsic hippocampal organization. *Current opinion in neurobiology*, 3(2), 225-9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8390320>
- Andersen, P., Sundberg, S. H., Sveen, O., & Wigström, H. (1977). Specific long-lasting potentiation of synaptic transmission in hippocampal slices. *Nature*, 266(5604), 736-7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/195210>
- Bartsch, D., Ghirardi, M., Skehel, P. A., Karl, K. A., Herder, S. P., Chen, M., Bailey, C. H., et al. (1995). Aplysia CREB2 represses long-term facilitation: relief of repression converts transient facilitation into long-term functional and structural change. *Cell*, 83(6), 979-92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8521521>
- Baulieu, E. E., & Robel, P. (1998). Dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) as neuroactive neurosteroids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(8), 4089-91. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=34265&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Bland, B. H. (1986). The physiology and pharmacology of hippocampal formation theta rhythms. *Progress in neurobiology*, 26(1), 1-54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2870537>
- Bliss, T. V., & Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361(6407), 31-9. doi:10.1038/361031a0
- Bliss, T. V., & Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of physiology*, 232(2), 331-56. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1350458&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Blum, S., Moore, A. N., Adams, F., & Dash, P. K. (1999). A mitogen-activated protein kinase cascade in the CA1/CA2 subfield of the dorsal hippocampus is essential

- for long-term spatial memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(9), 3535-44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10212313>
- Bourtchuladze, R., Frenguelli, B., Blendy, J., Cioffi, D., Schutz, G., & Silva, A. J. (1994). Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell*, 79(1), 59-68. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7923378>
- Brinton, R. D., & Wang, J. M. (2006). Therapeutic potential of neurogenesis for prevention and recovery from Alzheimer's disease: allopregnanolone as a proof of concept neurogenic agent. *Current Alzheimer research*, 3(3), 185-90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16842093>
- Buzsáki, G. (2002). Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron*, 33(3), 325-40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11832222>
- Buzsáki, G., Anastassiou, C. a., & Koch, C. (2012). The origin of extracellular fields and currents — EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(6), 407-420. Nature Publishing Group. doi:10.1038/nrn3241
- Byrne, J. H., Zwartjes, R., Homayouni, R., Critz, S. D., & Eskin, A. (1993). Roles of second messenger pathways in neuronal plasticity and in learning and memory. Insights gained from Aplysia. *Advances in second messenger and phosphoprotein research*, 27, 47-108. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8418826>
- Bélanger, N., Grégoire, L., Bédard, P., & Di Paolo, T. (2003). Estradiol and dehydroepiandrosterone potentiate levodopa-induced locomotor activity in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine monkeys. *Endocrine*, 21(1), 97-101. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12777709>
- Bélanger, N., Grégoire, L., Bédard, P. J., & Di Paolo, T. (2006). DHEA improves symptomatic treatment of moderately and severely impaired MPTP monkeys. *Neurobiology of aging*, 27(11), 1684-93. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.028
- Calogeropoulou, T., Avlonitis, N., Minas, V., Alexi, X., Pantzou, A., Charalampopoulos, I., Zervou, M., et al. (2009). Novel dehydroepiandrosterone derivatives with antiapoptotic, neuroprotective activity. *Journal of medicinal chemistry*, 52(21), 6569-87. doi:10.1021/jm900468p
- Castellucci, V. F., Blumenfeld, H., Goelet, P., & Kandel, E. R. (1989). Inhibitor of protein synthesis blocks long-term behavioral sensitization in the isolated gill-withdrawal reflex of Aplysia. *Journal of neurobiology*, 20(1), 1-9. doi:10.1002/neu.480200102
- Charalampopoulos, I., Dermitzaki, E., Vardouli, L., Tsatsanis, C., Stournaras, C., Margioris, A. N., & Gravanis, A. (2005). Dehydroepiandrosterone sulfate and allopregnanolone directly stimulate catecholamine production via induction of tyrosine hydroxylase and secretion by affecting actin polymerization. *Endocrinology*, 146(8), 3309-18. doi:10.1210/en.2005-0263

- Charalampopoulos, Ioannis, Remboutsika, E., Margioris, A. N., & Gravanis, A. (2008). Neurosteroids as modulators of neurogenesis and neuronal survival. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, *19*(8), 300-7. doi:10.1016/j.tem.2008.07.004
- Charalampopoulos, Ioannis, Margioris, A. N., & Gravanis, A. (2008). Neurosteroid dehydroepiandrosterone exerts anti-apoptotic effects by membrane-mediated, integrated genomic and non-genomic pro-survival signaling pathways. *Journal of neurochemistry*, *107*(5), 1457-69. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19013851>
- Chen, L., Dai, X.-N., & Sokabe, M. (2006). Chronic administration of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) primes for facilitated induction of long-term potentiation via sigma 1 (sigma1) receptor: optical imaging study in rat hippocampal slices. *Neuropharmacology*, *50*(3), 380-92. doi:10.1016/j.neuropharm.2005.10.015
- Chen, L., Miyamoto, Y., Furuya, K., Dai, X.-N., Mori, N., & Sokabe, M. (2006). Chronic DHEAS administration facilitates hippocampal long-term potentiation via an amplification of Src-dependent NMDA receptor signaling. *Neuropharmacology*, *51*(3), 659-70. doi:10.1016/j.neuropharm.2006.05.011
- Chávez-Delgado, M. E., Gomez-Pinedo, U., Feria-Velasco, A., Huerta-Viera, M., Castañeda, S. C., Toral, F. A. L.-D., Parducz, A., et al. (2005). Ultrastructural analysis of guided nerve regeneration using progesterone- and pregnenolone-loaded chitosan prostheses. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, *74*(1), 589-600. doi:10.1002/jbm.b.30243
- Collingridge, G. L. (1995). The brain slice preparation: a tribute to the pioneer Henry McIlwain. *Journal of neuroscience methods*, *59*(1), 5-9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7475251>
- Compagnone, N. A., & Mellon, S. H. (2000). Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Frontiers in neuroendocrinology*, *21*(1), 1-56. doi:10.1006/frne.1999.0188
- Coogan, A. N., O'Leary, D. M., & O'Connor, J. J. (1999). P42/44 MAP kinase inhibitor PD98059 attenuates multiple forms of synaptic plasticity in rat dentate gyrus in vitro. *Journal of neurophysiology*, *81*(1), 103-10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9914271>
- Crow, T., & Forrester, J. (1990). Inhibition of protein synthesis blocks long-term enhancement of generator potentials produced by one-trial in vivo conditioning in Hermisenda. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *87*(12), 4490-4. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=54141&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Cutler, S. M., Pettus, E. H., Hoffman, S. W., & Stein, D. G. (2005). Tapered progesterone withdrawal enhances behavioral and molecular recovery after traumatic brain injury. *Experimental neurology*, *195*(2), 423-9. doi:10.1016/j.expneurol.2005.06.003

- Dash, P. K., Hochner, B., & Kandel, E. R. (1990). Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of *Aplysia* sensory neurons blocks long-term facilitation. *Nature*, *345*(6277), 718-21. doi:10.1038/345718a0
- Davis, H. P., & Squire, L. R. (1984). Protein synthesis and memory: A review. *Psychological Bulletin*, *96*(3), 518-559. US: American Psychological Association. doi:10.1037/0033-2909.96.3.518
- Davis, S., Vanhoutte, P., Pages, C., Caboche, J., & Laroche, S. (2000). The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *20*(12), 4563-72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10844026>
- Dong, Y., & Zheng, P. (2012). Dehydroepiandrosterone sulphate: action and mechanism in the brain. *Journal of neuroendocrinology*, *24*(1), 215-24. doi:10.1111/j.1365-2826.2011.02256.x
- Frey, U., Huang, Y. Y., & Kandel, E. R. (1993). Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Science (New York, N. Y.)*, *260*(5114), 1661-4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8389057>
- GRASTYAN, E., LISSAK, K., MADARASZ, I., & DONHOFFER, H. (1959). Hippocampal electrical activity during the development of conditioned reflexes. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, *11*(3), 409-30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13663816>
- Ghirardi, M., Braha, O., Hochner, B., Giorgio Montarolo, P., Kandel, E. R., & Dale, N. (1992). Roles of PKA and PKC in facilitation of evoked and spontaneous transmitter release at depressed and nondepressed synapses in *aplysia* sensory neurons. *Neuron*, *9*(3), 479-489. doi:10.1016/0896-6273(92)90185-G
- Green, J. D., Maxwell, D. S., Schindler, W. J., & Stumpf, C. (1960). RABBIT EEG "THETA" RHYTHM: ITS ANATOMICAL SOURCE AND RELATION TO ACTIVITY IN SINGLE NEURONS. *J Neurophysiol*, *23*(4), 403-420. Retrieved from <http://jn.physiology.org>
- Gubba, E. M., Fawcett, J. W., & Herbert, J. (2004). The effects of corticosterone and dehydroepiandrosterone on neurotrophic factor mRNA expression in primary hippocampal and astrocyte cultures. *Brain research. Molecular brain research*, *127*(1-2), 48-59. doi:10.1016/j.molbrainres.2004.05.004
- Herculano-Houzel, S., Collins, C. E., Wong, P., & Kaas, J. H. (2007). Cellular scaling rules for primate brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(9), 3562-7. doi:10.1073/pnas.0611396104
- Hirsh, R. (1974). The hippocampus and contextual retrieval of information from memory: a theory. *Behavioral biology*, *12*(4), 421-44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4217626>
- Huang, Y. Y., & Kandel, E. R. (n.d.). Recruitment of long-lasting and protein kinase A-dependent long-term potentiation in the CA1 region of hippocampus requires

- repeated tetanization. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 1(1), 74-82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10467587>
- Huang, Y. Y., Li, X. C., & Kandel, E. R. (1994). cAMP contributes to mossy fiber LTP by initiating both a covalently mediated early phase and macromolecular synthesis-dependent late phase. *Cell*, 79(1), 69-79. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7923379>
- Huang, Y. Y., Nguyen, P. V., Abel, T., & Kandel, E. R. (n.d.). Long-lasting forms of synaptic potentiation in the mammalian hippocampus. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 3(2-3), 74-85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10456078>
- Huber, K. M., Mauk, M. D., & Kelly, P. T. (1995). Distinct LTP induction mechanisms: contribution of NMDA receptors and voltage-dependent calcium channels. *Journal of neurophysiology*, 73(1), 270-9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7714571>
- Impey, S., Obrietan, K., & Storm, D. R. (1999). Making new connections: role of ERK/MAP kinase signaling in neuronal plasticity. *Neuron*, 23(1), 11-4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10402188>
- KANDEL, E. R., & SPENCER, W. A. (1961). Electrophysiology of hippocampal neurons. II. After-potentials and repetitive firing. *Journal of neurophysiology*, 24, 243-59. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13751138>
- Kahana, M. J., Seelig, D., & Madsen, J. R. (2001). Theta returns. *Current opinion in neurobiology*, 11(6), 739-44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11741027>
- Kelleher, R. J., Govindarajan, A., Jung, H.-Y., Kang, H., & Tonegawa, S. (2004). Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell*, 116(3), 467-79. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15016380>
- Keller, E. A., Zamparini, A., Borodinsky, L. N., Gravielle, M. C., & Fiszman, M. L. (2004). Role of allopregnanolone on cerebellar granule cells neurogenesis. *Brain research. Developmental brain research*, 153(1), 13-7. doi:10.1016/j.devbrainres.2004.07.009
- Kullmann, D. M., & Nicoll, R. A. (1992). Long-term potentiation is associated with increases in quantal content and quantal amplitude. *Nature*, 357(6375), 240-4. doi:10.1038/357240a0
- Kurino, M., Fukunaga, K., Ushio, Y., & Miyamoto, E. (1995). Activation of mitogen-activated protein kinase in cultured rat hippocampal neurons by stimulation of glutamate receptors. *Journal of neurochemistry*, 65(3), 1282-9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7643105>
- LORENTE de NO, R. (1947). A study of nerve physiology. *Studies from the Rockefeller institute for medical research. Reprints. Rockefeller Institute for Medical Research*, 131, 1-496. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20261875>

- Larkman, a U., & Jack, J. J. (1995). Synaptic plasticity: hippocampal LTP. *Current opinion in neurobiology*, 5(3), 324-34. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7580155>
- Larkman, A., Hannay, T., Stratford, K., & Jack, J. (1992). Presynaptic release probability influences the locus of long-term potentiation. *Nature*, 360(6399), 70-3. doi:10.1038/360070a0
- Larson, J., & Lynch, G. (1986). Induction of synaptic potentiation in hippocampus by patterned stimulation involves two events. *Science (New York, N. Y.)*, 232(4753), 985-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3704635>
- Larson, J., Wong, D., & Lynch, G. (1986). Patterned stimulation at the theta frequency is optimal for the induction of hippocampal long-term potentiation. *Brain research*, 368(2), 347-50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3697730>
- Lau, L. F., & Huganir, R. L. (1995). Differential tyrosine phosphorylation of N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *The Journal of biological chemistry*, 270(34), 20036-41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7544350>
- Laurine, E., Lafitte, D., Grégoire, C., Séréé, E., Loret, E., Douillard, S., Michel, B., et al. (2003). Specific binding of dehydroepiandrosterone to the N terminus of the microtubule-associated protein MAP2. *The Journal of biological chemistry*, 278(32), 29979-86. doi:10.1074/jbc.M303242200
- Lazaridis, I., Charalampopoulos, I., Alexaki, V.-I., Avlonitis, N., Pediaditakis, I., Efsthopoulos, P., Calogeropoulou, T., et al. (2011). Neurosteroid dehydroepiandrosterone interacts with nerve growth factor (NGF) receptors, preventing neuronal apoptosis. *PLoS biology*, 9(4), e1001051. doi:10.1371/journal.pbio.1001051
- Lev, S., Moreno, H., Martinez, R., Canoll, P., Peles, E., Musacchio, J. M., Plowman, G. D., et al. (1995). Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca(2+)-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature*, 376(6543), 737-45. doi:10.1038/376737a0
- Liao, D., Jones, A., & Malinow, R. (1992). Direct measurement of quantal changes underlying long-term potentiation in CA1 hippocampus. *Neuron*, 9(6), 1089-97. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1334418>
- Lindén, H., Pettersen, K. H., & Einevoll, G. T. (2010). Intrinsic dendritic filtering gives low-pass power spectra of local field potentials. *Journal of computational neuroscience*, 29(3), 423-44. doi:10.1007/s10827-010-0245-4
- Lindén, H., Tetzlaff, T., Potjans, T. C., Pettersen, K. H., Grün, S., Diesmann, M., & Einevoll, G. T. (2011). Modeling the spatial reach of the LFP. *Neuron*, 72(5), 859-72. doi:10.1016/j.neuron.2011.11.006
- Lynch, M. A., Introduction, I., Erk, B., Potentiation, L.-term, Age, D., & Cognition, E. (2004). Long-Term Potentiation and Memory, 87-136.

- Martin, K. C., Michael, D., Rose, J. C., Barad, M., Casadio, A., Zhu, H., & Kandel, E. R. (1997). MAP kinase translocates into the nucleus of the presynaptic cell and is required for long-term facilitation in *Aplysia*. *Neuron*, *18*(6), 899-912. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9208858>
- Martin, S. J., & Morris, R. G. M. (2002). New life in an old idea: the synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. *Hippocampus*, *12*(5), 609-36. doi:10.1002/hipo.10107
- Marx, C. E., Jarskog, L. F., Lauder, J. M., Gilmore, J. H., Lieberman, J. A., & Morrow, A. L. (2000). Neurosteroid modulation of embryonic neuronal survival in vitro following anoxia. *Brain research*, *871*(1), 104-12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10882789>
- Montarolo, P., Goelet, P., Castellucci, V., Morgan, J., Kandel, E., & Schacher, S. (1986). A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in *Aplysia*. *Science*, *234*(4781), 1249-1254. doi:10.1126/science.3775383
- Nguyen, P. V., Abel, T., & Kandel, E. R. (1994). Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP. *Science (New York, N.Y.)*, *265*(5175), 1104-7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8066450>
- Nguyen, P. V., & Kandel, E. R. (1996). A macromolecular synthesis-dependent late phase of long-term potentiation requiring cAMP in the medial perforant pathway of rat hippocampal slices. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *16*(10), 3189-98. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8627357>
- Pathirathna, S., Brimelow, B. C., Jagodic, M. M., Krishnan, K., Jiang, X., Zorumski, C. F., Mennerick, S., et al. (2005). New evidence that both T-type calcium channels and GABAA channels are responsible for the potent peripheral analgesic effects of 5alpha-reduced neuroactive steroids. *Pain*, *114*(3), 429-43. doi:10.1016/j.pain.2005.01.009
- Perkinton, M. S., Ip, J. K., Wood, G. L., Crossthwaite, A. J., & Williams, R. J. (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase is a central mediator of NMDA receptor signalling to MAP kinase (Erk1/2), Akt/PKB and CREB in striatal neurones. *Journal of neurochemistry*, *80*(2), 239-54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11902114>
- Polster, M. R., Nadel, L., & Schacter, D. L. (1991). Cognitive Neuroscience Analyses of Memory: A Historical Perspective. *Journal of Cognitive Neuroscience*, *3*(2), 95-116. doi:10.1162/jocn.1991.3.2.95
- Ranck, J. B. (1973). Studies on single neurons in dorsal hippocampal formation and septum in unrestrained rats. I. Behavioral correlates and firing repertoires. *Experimental neurology*, *41*(2), 461-531. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4355646>
- Reichardt, L. F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, *361*(1473), 1545-64. doi:10.1098/rstb.2006.1894

- SCOVILLE, W. B., & MILNER, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 20(1), 11-21. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=497229&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Schafe, G. E., Nadel, N. V., Sullivan, G. M., Harris, A., & LeDoux, J. E. (n.d.). Memory consolidation for contextual and auditory fear conditioning is dependent on protein synthesis, PKA, and MAP kinase. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 6(2), 97-110. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=311283&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Sgambato, V., Pagès, C., Rogard, M., Besson, M. J., & Caboche, J. (1998). Extracellular signal-regulated kinase (ERK) controls immediate early gene induction on corticostriatal stimulation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(21), 8814-25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9786988>
- Squire, L. R. (1992). Memory and the hippocampus: A synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychological Review*, 99(2), 195-231. US: American Psychological Association. doi:10.1037/0033-295X.99.2.195
- Staubli, U., & Lynch, G. (1987). Stable hippocampal long-term potentiation elicited by "theta" pattern stimulation. *Brain research*, 435(1-2), 227-34. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3427453>
- Suter, K. J., Smith, B. N., & Dudek, F. E. (1999). Electrophysiological recording from brain slices. *Methods (San Diego, Calif.)*, 18(2), 86-90. doi:10.1006/meth.1999.0761
- Suzuki, M., Wright, L. S., Marwah, P., Lardy, H. A., & Svendsen, C. N. (2004). Mitotic and neurogenic effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on human neural stem cell cultures derived from the fetal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(9), 3202-7. doi:10.1073/pnas.0307325101
- The Hippocampus Book (Google eBook)*. (2007). (p. 832). Oxford University Press. Retrieved from http://books.google.com/books?id=hSs_RETvWlIC&pgis=1
- Tien, R. D., Felsberg, G. J., & Crain, B. (1992). Normal anatomy of the hippocampus and adjacent temporal lobe: high-resolution fast spin-echo MR images in volunteers correlated with cadaveric histologic sections. *AJR. American journal of roentgenology*, 159(6), 1309-13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1442407>
- Tsien, J. Z. (2000). Linking Hebb's coincidence-detection to memory formation. *Current opinion in neurobiology*, 10(2), 266-73. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10753792>
- Tully, T., Preat, T., Boynton, S. C., & Del Vecchio, M. (1994). Genetic dissection of consolidated memory in Drosophila. *Cell*, 79(1), 35-47. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7923375>

- Vanderwolf, C. H. (1969). Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, 26(4), 407-18. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4183562>
- Wang, J. M., Johnston, P. B., Ball, B. G., & Brinton, R. D. (2005). The neurosteroid allopregnanolone promotes proliferation of rodent and human neural progenitor cells and regulates cell-cycle gene and protein expression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(19), 4706-18. doi:10.1523/JNEUROSCI.4520-04.2005
- Wyllie, D. J., Manabe, T., & Nicoll, R. A. (1994). A rise in postsynaptic Ca²⁺ potentiates miniature excitatory postsynaptic currents and AMPA responses in hippocampal neurons. *Neuron*, 12(1), 127-38. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7507335>
- Xia, Z., Dudek, H., Miranti, C. K., & Greenberg, M. E. (1996). Calcium influx via the NMDA receptor induces immediate early gene transcription by a MAP kinase/ERK-dependent mechanism. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 16(17), 5425-36. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8757255>
- Yang, Y. C., Ma, Y. L., Chen, S. K., Wang, C. W., & Lee, E. H. Y. (2003). Focal adhesion kinase is required, but not sufficient, for the induction of long-term potentiation in dentate gyrus neurons in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(10), 4072-80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12764094>
- Yin, J. C., Wallach, J. S., Del Vecchio, M., Wilder, E. L., Zhou, H., Quinn, W. G., & Tully, T. (1994). Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in Drosophila. *Cell*, 79(1), 49-58. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7923376>
- Yu, X. M., Askalan, R., Keil, G. J., & Salter, M. W. (1997). NMDA channel regulation by channel-associated protein tyrosine kinase Src. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5300), 674-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9005855>
- Zhou, J., Valletta, J. S., Grimes, M. L., & Mobley, W. C. (1995). Multiple levels for regulation of TrkA in PC12 cells by nerve growth factor. *Journal of neurochemistry*, 65(3), 1146-56. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7543930>
- Zola-Morgan, S., Squire, L. R., & Amaral, D. G. (1986). Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 6(10), 2950-67. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3760943>
- di Michele, F., Lekieffre, D., Pasini, A., Bernardi, G., Benavides, J., & Romeo, E. (2000). Increased neurosteroids synthesis after brain and spinal cord injury in rats. *Neuroscience letters*, 284(1-2), 65-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10771163>