

Πανεπιστήμιο Κρήτης
Τμήμα Ιατρικής, Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών στις
«Νευροεπιστήμες»

Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας
Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας

Μεταπτυχιακή Εργασία

**Επίδραση της μορφολογίας στα
σχέδια εκφόρτισης των πυραμιδικών
κυττάρων του προμετωπιαίου
φλοιού αρουραίου**

Μαρία Ψαρρού

Ηράκλειο, Απρίλιος 2011

Περιεχόμενα	i
Ευχαριστίες	iii
Abstract	iv
Περίληψη	v
I. Εισαγωγή	1
1. Προμετωπιαίος Φλοιός.....	2
1.1 Ανατομική και Λειτουργική Οριοθέτηση.....	2
1.2 Προμετωπιαίος Φλοιός Αρουραίου.....	2
2. Πυραμιδικά Κύτταρα.....	4
2.1 Ανάπτυξη.....	4
2.2 Μορφολογικά Χαρακτηριστικά.....	5
2.3 Μετάδοση Πληροφορίας στους Δενδρίτες.....	7
2.3.1 Παθητικές και Ενεργητικές Ιδιότητες των Δενδριτών.....	8
2.3.2 Συναπτική Ολοκλήρωση.....	10
2.3.2.1 Δενδριτικά Δυναμικά NMDA.....	11
2.4 Σχέδια Εκφόρτισης.....	13
3. Μορφολογία Πυραμιδικών Κυττάρων και Σχέδια Εκφόρτισης.....	15
4. Στόχοι Μελέτης.....	17
II. Υλικά και Μέθοδοι	20
1. Περιβάλλον Προσομοίωσης NEURON.....	21
2. Μορφολογία Πυραμιδικών Κυττάρων-Μοντέλων.....	21
2.1 Δεδομένα Ψηφιακής Ανακατασκευής Πυραμιδικών Κυττάρων.....	21
2.1.1 Μετατροπή των Αρχείων Τύπου .swc σε Τύπου .hoc.....	21
2.1.2 Έλεγχος Μορφολογικών Ανακατασκευών.....	22
2.2 Ψηφιακή ανακατασκευή Ολοκληρωμένης Κυτταρικής Δομής.....	22
2.3 Ψηφιακή Ανακατασκευή Πυραμιδικών Κυττάρων με Σώμα Μέσου Όγκου..	22
2.4 Ψηφιακή Ανακατασκευή Πυραμιδικών Κυττάρων με Σώμα Μέσου Όγκου,	23
και με ένα «Απλό» ή ένα «Σύνθετο» Κορυφαίο Δενδριτικό Πλέγμα.....	
2.5 Υπολογισμός Μορφολογικών Παραμέτρων.....	23
3. Μέσο Ηλεκτρονικό Μήκος.....	24
4. Βιοφυσικά Χαρακτηριστικά Πυραμιδικών Κυττάρων-Μοντέλων.....	24
4.1 Παθητικές Ιδιότητες.....	25
4.2 Ενεργητικές Ιδιότητες.....	25
5. Πρωτόκολλα Διέγερσης.....	25
5.1 Προσομοίωση Τεχνικής Καθήλωσης Σταθερού Ρεύματος.....	26
5.1.1 Καταγραφή Σχεδίων Εκφόρτισης Πυραμιδικών Κυττάρων με την	26
Φυσιολογική τους Μορφολογία.....	
5.1.2 Καταγραφή Σχεδίων Εκφόρτισης Πυραμιδικών Κυττάρων σε Διάφορες	26
Τιμές της Αγωγιμότητας των Ca^{++} εξαρτώμενων διαύλων K^{+}	
5.1.3 Καταγραφή Σχεδίων Εκφόρτισης Πυραμιδικών Κυττάρων με Σώμα	27
Μέσου Όγκου.....	
5.1.4 Καταγραφή Σχεδίων Εκφόρτισης Πυραμιδικών Κυττάρων με Σώμα	27
Μέσου Όγκου, και με ένα «Απλό» ή ένα «Σύνθετο» Κορυφαίο Δενδριτικό	
Πλέγμα.....	

5.1.5 Καταγραφή του Ρεύματος των Ca^{++} εξαρτώμενων διαύλων K^+	27
5.2 Προσομοίωση Συναπτικής Διέγερσης.....	27
5.3 Κατηγοριοποίηση Σχεδίων Εκφόρτισης.....	28
6. Στατιστική Ανάλυση.....	28
6.1 Ανάλυση Διακύμανσης.....	28
6.2 Δοκιμασία t.....	29
6.3 Ομαδοποίηση Δεδομένων.....	29
6.3.1 Δενδρογράμματα.....	29
6.3.1.1 Κανονικοποίηση Δεδομένων.....	29
6.3.1.2 Κατασκευή Δενδρογραμμάτων.....	30
6.3.2 Αλγόριθμος k-μέσης τιμής.....	30
III. Αποτελέσματα	32
1. Μορφολογική Ανάλυση και Μελέτη Σχεδίων Εκφόρτισης.....	33
1.1 Καταγραφή Μορφολογικών Χαρακτηριστικών και Σχεδίων Εκφόρτισης....	34
1.2 Επίδραση των Ca^{++} εξαρτώμενων διαύλων K^+ στα Σχέδια Εκφόρτισης.....	36
1.2.1 Συσχέτιση του Ρεύματος των Ca^{++} εξαρτώμενων διαύλων K^+ (fAHP) με τα Σχέδια Εκφόρτισης.....	41
1.3 Επίδραση του Όγκου του Σώματος στα Σχέδια Εκφόρτισης.....	41
1.3.1 Αντικατάσταση του Αρχικού Σώματος με ένα Σώμα Μέσου Όγκου.....	43
1.4 Ανάλυση Ομάδων.....	47
1.4.1.1 Συσχέτιση του Όγκου των Δενδριτών και των Σχεδίων Εκφόρτισης..	48
1.4.1.2 Συσχέτιση Αριθμού Σημείων Διακλάδωσης και Σχεδίων Εκφόρτισης	51
1.4.1.3 Καταγραφή του Μέσου Ηλεκτρονικού Μήκους.....	53
1.4.2 Δενδρογράμματα.....	54
1.5 Συσχέτιση των Βασικών Δενδριτικών Πλεγμάτων με τα Σχέδια Εκφόρτισης.....	56
1.5.1 Αλγόριθμος k-μέσης τιμής.....	57
2. Μελέτη δυναμικών ενεργείας με ενεργοποίηση Συναπτικών Μηχανισμών.....	59
3. Σύνοψη αποτελεσμάτων.....	63
IV. Συζήτηση	64
1. Ανάλυση Αποτελεσμάτων.....	65
2. Μελλοντικές Κατευθύνσεις.....	70
Βιβλιογραφία	72
Παράρτημα	76

Ευχαριστίες

*"I can no other answer make but thanks,
and thanks, and ever thanks..."*

-Sebastian, Twelfth Night, Act 3, scene 3

William Shakespeare

Η εργασία αυτή είναι το αποτέλεσμα της άμεσης ή έμμεσης αλληλεπίδρασης πολλών ατόμων. Για αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω, όλους εκείνους που χωρίς την παρουσία και την ενεργό συμμετοχή τους, θα ήταν αδύνατη η υλοποίησή της.

Ευχαριστώ, τις επιβλέπουσες καθηγήτριες, Παναγιώτα Ποϊράζη και Κυριακή Σιδηροπούλου, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν, και την ευκαιρία που μου έδωσαν να εντρυφήσω σε ένα επιστημονικό πεδίο που έως τώρα μου ήταν άγνωστο. Οι επιστημονικές συμβουλές τους και η καλοπροαίρετη ανθρώπινη φύση τους, ήταν καθοριστικοί και σημαντικοί παράγοντες για την πορεία της εργασίας, και την αντιμετώπιση οποιοδήποτε εμποδίου.

Την Νάση Παπουτσή και τον Γιώργο Καστελλάκη, γιατί ήταν δίπλα μου σε κάθε βήμα. Τους ευχαριστώ θερμά για όλες τις γνώσεις που μου μετάδωσαν, και για την υπομονή και την επιμονή τους να απαντήσουν σε κάθε απορία μου. Νιώθω τυχερή που μοιράστηκα μαζί τους το ίδιο γραφείο (και τον ίδιο ασπροπίνακα...), γιατί με τις ενδιαφέρουσες και γεμάτες θετική ενέργεια προσωπικότητες τους δημιουργούν πάντα ένα υπέροχο κλίμα.

Τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου (Ξένια, Δάφνη, Νέστορας, Αναστάσης, Μαρία) για την καλή χημεία. Ευχαριστώ πολύ την Ελευθερία Τζαμαλή, για την βοήθεια της στο να διαφωτιστούν «σκοτεινά» μαθηματικά σημεία της εργασίας.

Τους Βαγγελιώ και Βάλια, Αλίκη, Μαρία, Τιάννα, Νάντια, Μιχάλη, Μάριο, τα υπόλοιπα τανγοπαιδα, τους Ειρήνη, Γιώτα, Πέπη, Ηρώ (και πολλούς άλλους...) για την υπομονή, την υποστήριξη τους, και κυρίως επειδή η συναναστροφή μαζί τους οδηγεί πάντα σε αλληλοεξέλιξη χαρακτήρων. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Μιχάλη για την «στατιστικά σημαντική» βοήθεια του.

Την οικογένεια μου γιατί πάντα είναι εκεί για μένα, με οποιοδήποτε τρόπο μπορούν.

Περίληψη

Τα πυραμιδικά κύτταρα, συνιστούν την πλειονότητα των νευρικών κυττάρων του εγκεφαλικού φλοιού και η δράση τους συσχετίζεται με ανώτερες γνωστικές και συναισθηματικές λειτουργίες. Πρόκειται για νευρώνες με χαρακτηριστική δομή, αποτελούμενη από ένα πυραμοειδές κυτταρικό σώμα, από το οποίο εκφύονται δύο εκτενή και πολύπλοκα δενδριτικά πλέγματα και ένας μακρύς διακλαδισμένος άξονας. Τα συστατικά της μορφολογικά χαρακτηριστικά των πυραμιδικών νευρώνων παρουσιάζουν εξαιρετική ποικιλομορφία ανάλογα την περιοχή ή τη στιβάδα στην οποία ανήκουν. Αυτοί οι νευρώνες δέχονται πλήθος συναπτικών σημάτων καθ' όλη την έκταση της δομής τους και ο χωροχρονικός συνεντοπισμός τους δημιουργεί τοπικά δενδριτικά δυναμικά που, καθορίζουν το σχέδιο εκφόρτισης τους. Με βάση τη συχνότητα των δυναμικών ενεργείας που παράγονται, σε ένα δεδομένο σωματικό ερέθισμα, προκύπτουν δύο γενικές ηλεκτροφυσιολογικές κατηγορίες πυραμιδικών κυττάρων: (1) αυτά που εκφορτίζουν τονικά δυναμικά ενεργείας (Regular Spiking-RS), και (2) αυτά που εκφορτίζουν ομάδες (ριπές) 2-5 δυναμικών ενεργείας (Intrinsic Bursting-IB). Επιστημονικές *in vitro* και *in silico* μελέτες, συσχετίζουν τα σχέδια εκφόρτισης των πυραμιδικών νευρώνων με τα ιδιαίτερα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, γίνεται ανάλυση της μορφολογίας πυραμιδικών κυττάρων, που ανήκουν στην στιβάδα V του προμετωπιαίου φλοιού αρουραίου και εξετάζεται η επίδραση των επιμέρους τμημάτων της δομής των κυττάρων στα σχέδια εκφόρτισης τους. Δίδεται ιδιαίτερη σημασία στο βασικό δενδριτικό πλέγμα, καθότι μέχρι του παρόντος, οι μελέτες αφορούν κυρίως τους κορυφαίους δενδρίτες. Επιπλέον, εξετάζονται κάποια χαρακτηριστικά της εκπόλωσης που προκαλείται από την ενεργοποίηση του NMDA υποδοχέα τοπικά στους βασικούς δενδρίτες. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι τα πιο πολύπλοκα κορυφαία και τα πιο απλά βασικά δενδριτικά πλέγματα συσχετίζονται με σχέδια εκφόρτισης με ομάδες δυναμικών ενεργείας. Επίσης, τα πιο απλά βασικά δενδριτικά πλέγματα, συσχετίζονται τόσο με δημιουργία μεγαλύτερου αριθμού δυναμικών ενεργείας, όσο και με μικρότερο χρόνο μετάδοσής τους στο σώμα, μετά από την ενεργοποίηση των NMDA υποδοχέων. Συμπερασματικά, φαίνεται η μορφολογία των πυραμιδικών κυττάρων να έχει επίδραση στα σχέδια εκφόρτισης τους και κατ' επέκταση στον τρόπο με τον οποίο κωδικοποιούν ένα ερέθισμα.

Λέξεις-κλειδιά: μορφολογία, σχέδια εκφόρτισης, πυραμιδικοί νευρώνες στιβάδας V, βασικό δενδριτικό πλέγμα, δενδριτικά δυναμικά NMDA

Abstract

Pyramidal cells are the most abundant type of neurons found in the cerebral cortex and their action has been associated with higher cognitive and emotional functions. These neurons have characteristic structure, consisting of a triangular shaped soma whereon descend two extended and complex dendritic trees, and a long bifurcated axon. All the morphological components of the pyramidal neurons exhibit significant variability across different brain areas and layers. Pyramidal neurons receive numerous synaptic inputs along their structure, whose integration in space and in time generates local dendritic spikes that shape their firing pattern. Two major electrophysiological categories of pyramidal cells have been established, based on the action potential frequency, generated from a fixed somatic stimulus: (1) cells that fire repetitive action potentials (Regular Spiking-RS) and (2) cells that fire clusters of 2-5 action potentials (Intrinsic Bursting-IB). *In vitro* and *in silico* scientific studies, correlate the firing patterns of the pyramidal neurons to their morphological features. This dissertation study provides a morphology analysis of the pyramidal cells, residing in the layer V of the rat prefrontal cortex and exams the influence of each part of the cell structure to their firing pattern. The role of the basal dendritic tree is pointed out, due to the so far focusing of the scientific approach on the apical tree. Moreover, the properties of the local generated NMDA dendritic spikes and their contribution to the somatic action potentials are investigated. The results suggest a correlation of the more complex apical and simpler basal trees to bursting firing patterns. Additionally, the more simple basal trees are correlated to greater number and lower latency of action potentials that are generated from the activation of the NMDA receptor. Consequently, it appears that the morphology of the pyramidal cells influences their firing patterns and, as a step further, the information coding that these neurons support.

Keywords: morphology, firing patterns, layer V pyramidal neurons, basal tree, NMDA spikes

Εισαγωγή

I. Εισαγωγή

1. Προμετωπιαίος Φλοιός

1.1 Ανατομική και Λειτουργική Οριοθέτηση

Η αντιστοιχία των ομόλογων φλοιϊκών περιοχών ανάμεσα στα διάφορα είδη είναι πολύπλοκη υπόθεση, λόγω της δομικής και λειτουργικής ετερογένειας που παρουσιάζεται. Για την χαρτογράφηση των εγκεφαλικών περιοχών που ορίζουν τον προμετωπιαίο φλοιό, λαμβάνονται υπόψη τα εξής κριτήρια: (1) το είδος και η σχετική πυκνότητα των συνδέσεων με εγκεφαλικές περιοχές, (2) η παρουσία και συγκεκριμένη κατανομή διαφόρων νευροδιαβιβαστών και των υποδοχέων τους, (3) η λειτουργία (δηλαδή, οι ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες της εκάστοτε περιοχής, και οι συμπεριφορές που ελέγχονται από αυτήν), (4) η εμβρυολογική ανάπτυξη, και (5) η κυτταροαρχιτεκτονική οργάνωση (Uylings HB *et al.*, 2003).

1.2 Προμετωπιαίος Φλοιός Αρουραίου

Ο προμετωπιαίος φλοιός του αρουραίου είναι περίπου χίλιες φορές μικρότερος σε όγκο από αυτόν του ανθρώπου. Η αύξηση αυτή του φλοιϊκού όγκου θεωρείται ότι συνδράμει με την εξελικτική διαφοροποίηση των φλοιϊκών περιοχών, απαραίτητη για την επιτέλεση πιο πολύπλοκων γνωστικών λειτουργιών. Τοπογραφικά μπορεί να χωριστεί σε τρεις περιοχές: (1) τον έσω προμετωπιαίο φλοιό (medial Prefrontal Cortex-mPFC), στον οποίο ραχιαία εντοπίζονται ο προκεντρικός φλοιός (Precentral Cortex-PC, ή περιοχή Fr2), και το πρόσθιο προσαγωγίο (Anterior Cingulate-AC), και πιο κοιλιακά η προμεταιχμιακή (Prelimbic-PL), η υπομεταιχμιακή (Infralimbic-IL) και η έσω κογχική (Medial Orbital-MO) περιοχή, (2) τον κογχικό προμετωπιαίο φλοιό (Orbital Prefrontal Cortex-OPC), και (3) τον έξω προμετωπιαίο φλοιό (Ilateral Prefrontal Cortex-IPFC) (Heidbreder CA and HJ Groenewegen, 2003 ; Seamans JK *et al.*, 2008 ; Uylings HB *et al.*, 2003).

Πληθώρα δεδομένων σε ανατομικό και λειτουργικό επίπεδο υποδεικνύουν ότι ο έσω προμετωπιαίος φλοιός του αρουραίου μπορεί να θεωρηθεί αντίστοιχος του έξω ραχιαίου προμετωπιαίου φλοιού των πρωτευόντων. Οι συνδέσεις του έσω προμετωπιαίου φλοιού του αρουραίου με τις διάφορες εγκεφαλικές περιοχές ακολουθούν σε μεγάλο βαθμό το ίδιο πρότυπο με αυτές του έξω ραχιαίου προμετωπιαίου φλοιού των πρωτευόντων (δέχεται πληροφορίες από τον προκινητικό φλοιό, τις συνειρμικές περιοχές του βρεγματικού και κροταφικού φλοιού, αλλά και από δομές του μεταιχμιακού συστήματος), αν και έχουν κοινά στοιχεία με αυτές του

προκινητικό φλοιό των πρωτεύοντων (Heidbreder CA and HJ Groenewegen, 2003 ; Seamans JK *et al.*, 2008 ; Uylings HB *et al.*, 2003).

Αναφορικά με τις οδούς των νευροδιαβιβαστών στον εγκέφαλο, ο έσω προμετωπιαίος φλοιός του αρουραίου όχι μόνο δέχεται χολινεργικές και μονοαμινονεργικές εννερώσεις, αλλά προβάλλει άμεσα σε αυτά τα κυκλώματα. (Heidbreder CA and HJ Groenewegen, 2003 ; Seamans JK *et al.*, 2008 ; Uylings HB *et al.*, 2003).

Οι λειτουργίες που επιτελεί ο προμετωπιαίος φλοιός του αρουραίου, παρόλο που προορίζονται για να εξυπηρετήσουν τις πολύ συγκεκριμένες συμπεριφορές που είναι απαραίτητο να υιοθετήσει το ζώο για να επιβιώσει στο δικό του οικολογικό θώκο, παρουσιάζουν κοινά χαρακτηριστικά με αυτές των υπόλοιπων θηλαστικών, και δη των πρωτεύοντων. Βλάβες στον έσω προμετωπιαίου φλοιού του αρουραίου, παράγουν σοβαρές αδυναμίες σε συμπεριφορές που αφορούν την απόκτηση και διατήρηση της μνήμης εργασίας, τον στρατηγικό σχεδιασμό και την λήψη αποφάσεων, την διαχείριση της προσοχής και απόκρισης σε διάφορα ερεθίσματα, τις συγκινησιακές-συναισθηματικές αποκρίσεις, τις κινητικές αλληλουχίες, και τις τυπικές για το είδος συμπεριφορές (Seamans JK *et al.*, 2008).

Η εμβρυολογική ανάπτυξη του προμετωπιαίου φλοιού είναι καλά διατηρημένη ανάμεσα στα θηλαστικά. Ο τελικός εγκέφαλος αναπτύσσεται από τον προσεγέφαλο, που είναι το πιο πρόσθιο μέρος του νευρικού σωλήνα, και αποτελείται από τον διεγέφαλο και τον τελεγέφαλο. Από τα νευροεπιθηλιακά κύτταρα του τελεγέφαλου προέρχονται οι δομές του τελικού εγκέφαλου, συμπεριλαμβανομένου των εγκεφαλικών ημισφαιρίων, του ιππόκαμπου, και του θαλάμου (Ayala R *et al.*, 2007 ; Fishell G and C Hanashima, 2008 ; Zhang ZW, 2004).

Σχετικά με την κυτταροαρχιτεκτονική του δομή, ο προμετωπιαίος φλοιός του αρουραίου παρουσιάζει την ίδια εξάστιβη οργάνωση με αυτή των πρωτεύοντων Η οργάνωση του σε κυτταροαρχιτεκτονικό επίπεδο συνίσταται στην παρουσία έξι κυτταρικών στιβάδων, παράλληλων προς την επιφάνεια του φλοιού, τις: (I) μοριώδη στιβάδα, που είναι ακκυταρική και καταλαμβάνεται από δενδρίτες ή άξονες νευρικών κυττάρων που εντοπίζονται σε βαθύτερες στιβάδες, (II) έξω κοκκώδη στιβάδα, που απαρτίζεται από μικρά κοκκώδη κύτταρα, (III) έξω στιβάδα πυραμοειδών κυττάρων, που περιέχει ποικιλία κυττάρων, πολλά από αυτά πυραμοειδή σε διάφορα μεγέθη, (IV) έσω κοκκώδη στιβάδα, που και εδώ εντοπίζονται πολλά κοκκώδη κύτταρα, (V)

έσω στιβάδα πυραμοειδών κυττάρων, που περιέχει κυρίως πυραμοειδή κύτταρα, με τυπικά μεγαλύτερο μέγεθος από αυτά τις στιβάδας III, και (VI) στιβάδα πολύμορφων κυττάρων, που παρουσιάζει ετερογένεια στους νευρώνες (βλ. Εικόνα 1) (Kandel ER et al, 2000).

Ειδοποιός διαφορά είναι ότι ο έσω προμετωπιαίος φλοιός του αρουραίου δεν διαθέτει την έσω κοκκώδη στιβάδα (στιβάδα IV), συνεπώς χαρακτηρίζεται ως μη κοκκώδης φλοιός, σε αντίθεση με τον κοκκώδη έξω ραχιαίο προμετωπιαίο φλοιό των πρωτεύοντων. Εν τούτοις, προσομοιάζει στον πρόσθιο προσαγωγίο φλοιό των πρωτεύοντων (Anterior Cingulate Cortex-ACC) (Seamans JK *et al.*, 2008).

2. Πυραμιδικά Κύτταρα

Τα πυραμιδικά κύτταρα ή πυραμιδικοί νευρώνες μελετήθηκαν εκτενώς στις αρχές του 19^{ου} αιώνα, με πρωτεργάτη τον Santiago Ramón y Cajal. Πρόκειται για τον πιο διαδεδομένο τύπο νευρικών κυττάρων σε όλη την έκταση του εγκεφαλικού φλοιού των θηλαστικών, των πτηνών, των ιχθύων, των ερπετών, αλλά όχι και των αμφιβίων. Εντοπίζονται σε δομές που σχετίζονται κυρίως με πολύπλοκες γνωστικές λειτουργίες, όπως αυτές του τελικού εγκέφαλου, του εγκεφαλικού φλοιού, της αμυγδαλής, και του ιππόκαμπου, ενώ δεν υπάρχουν στον οσφρητικό λοβό, στο ραβδωτό, τον μέσο και τον οπίσθιο εγκέφαλο και την σπονδυλική στήλη (Elston GN, 2003 ; Spruston N, 2008).

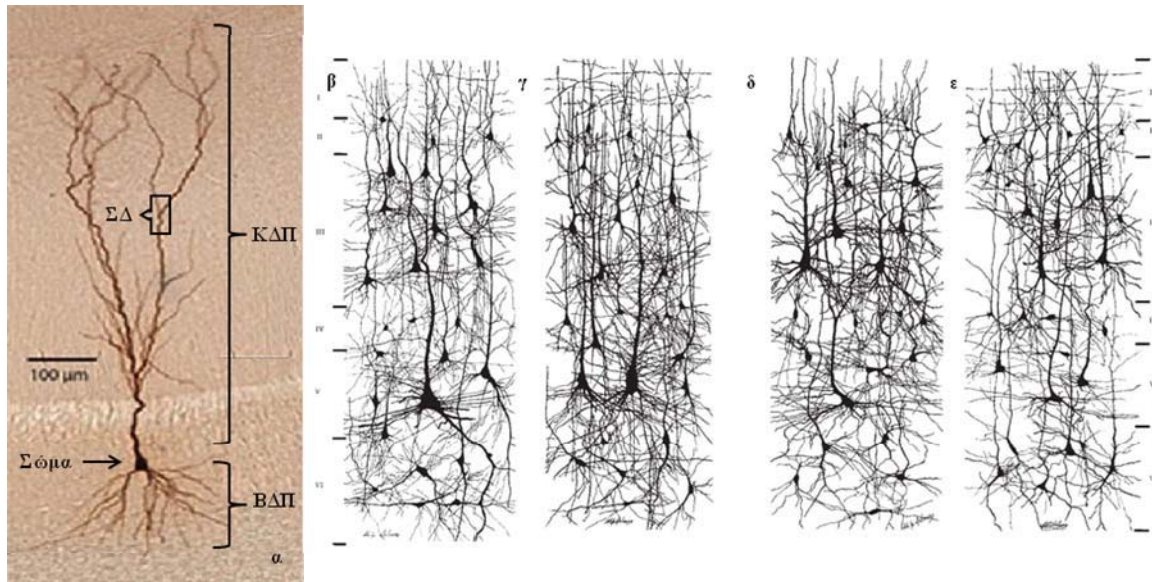
2.1 Ανάπτυξη

Οι πυραμιδικοί νευρώνες προέρχονται από τον τελευταίο κύκλο κυτταρικής διαίρεσης των νευροβλαστών των κοιλιακών ζωνών πολλαπλασιασμού του ραχιαίου τμήματος του τελεγκεφάλου. Στην συνέχεια μεταναστεύουν κατά μήκος του σώματος των ακτινωτών νευρογλοιακών κυττάρων (που είναι επίσης νευροβλάστες), για να φτάσουν στον τελικό προορισμό τους στον εγκέφαλο (Ayala R *et al.*, 2007 ; Fishell G and C Hanashima, 2008 ; Zhang ZW, 2004).

Η οργάνωση των νευρώνων του φλοιού σε στιβάδες φαίνεται να σχετίζεται με τον χρόνο γέννησης τους. Τα πυραμιδικά κύτταρα που γεννιούνται σε πρώιμα στάδια της φλοιϊκής ανάπτυξης καταλήγουν σε βαθύτερες στιβάδες (στιβάδες V και VI), ενώ αυτοί που γεννιούνται σε μετέπειτα στάδια καταλήγουν σε επιπολής στιβάδες (στιβάδες II και III) (Ayala R *et al.*, 2007 ; Fishell G and C Hanashima, 2008 ; Zhang ZW, 2004).

2.2 Μορφολογικά Χαρακτηριστικά

Η δομή των πυραμιδικών κυττάρων είναι αυτή των πολύπολων νευρώνων, δηλαδή έχουν ένα νευράξονα και πολλές αποφυάδες. Το κυτταρικό τους σώμα έχει χαρακτηριστικό τριγωνικό σχήμα, και σε αυτό οφείλουν την ονομασία τους. Το δενδριτικό τους πλέγμα, αποτελείται από δύο καλά διαχωρισμένα τμήματα, τους



Εικόνα 1 Πυραμιδικά κύτταρα. Τα πυραμιδικά κύτταρα παρουσιάζουν μεγάλη μορφολογική ποικιλομορφία ανάμεσα στις διαφορετικές εγκεφαλικές περιοχές και κυτταρικές στιβάδες (α) Δομή ενός πυραμιδικού κυττάρου (β) Φλοιϊκές κυτταρικές στιβάδες περιοχής παρακεντρικού λοβίου (γ) Φλοιϊκές κυτταρικές στιβάδες περιοχής πρόσθιας κεντρικής έλικας (δ) Φλοιϊκές κυτταρικές στιβάδες περιοχής άνω μετωπιαίας έλικας (ε) Φλοιϊκές κυτταρικές στιβάδες περιοχής οπίσθιας κεντρικής έλικας (ΚΔΠ: Κορυφαίο Δενδριτικό Πλέγμα, ΒΔΠ: Βασικό Δενδριτικό Πλέγμα, ΣΔ: Σημεία Διακλάδωσης) (από Elston GN, 2003)

βασικούς και τους κορυφαίους δενδρίτες. Από την βάση του σώματος εκφύονται οι πολυάριθμοι βασικοί δενδρίτες, οι οποίοι είτε διακλαδίζονται αρκετές φορές, είτε όχι. Από την κορυφή του σώματος εκφύεται ένας κύριος κορυφαίος δενδρίτης, ο οποίος είναι μεγάλου μήκους και συνδέει το σώμα με μία συστάδα κορυφαίων δενδριτών. Ο δενδρίτης αυτός συνήθως, διακλαδίζεται, σε διάφορες αποστάσεις από το σώμα, με αποτέλεσμα να καταλήγει σε δύο «δίδυμες» συστάδες κορυφαίων δενδριτών, οι οποίες διακλαδίζονται ακόμα μερικές φορές. Επιπλέον, κορυφαίοι δενδρίτες, που διακλαδίζονται μία η δύο φορές, ξεπροβάλλουν, υπό διάφορες γωνίες, παράπλευρα του κύριου δενδρίτη. Συνήθως, ο αριθμός και η έκταση των δενδριτών εξαρτώνται από το πλήθος των συναπτικών επαφών που πραγματοποιούν οι άλλοι νευρώνες πάνω τους. Οι επαφές αυτές γίνονται είτε απευθείας στο στέλεχος ενός δενδριτικού κλάδου, είτε σε εξειδικευμένες περιοχές υποδοχής, τις άκανθες. Ο νευράξονας των

κυττάρων εκφύεται και αυτός από την βάση του σώματος και εκτείνεται σε αρκετά μεγάλη απόσταση, σχηματίζοντας πολλά παρακλάδια (Elston GN, 2003 ; Spruston N, 2008).

Τα πυραμιδικά κύτταρα είναι από τα μεγαλύτερα νευρικά κύτταρα του εγκεφάλου. Το σώμα τους έχει διάμετρο περίπου στα 20 μm . Η διάμετρος των δενδριτών ποικίλει από λιγότερο από μισό μικρόμετρο σε μερικά μικρόμετρα. Το μήκος ενός τυπικού δενδρίτη είναι συνήθως μερικές εκατοντάδες μικρόμετρα. Η γραμμική απόσταση από το ένα σημείο του δενδριτικού πλέγματος στο άλλο (δηλαδή, ανάμεσα στις πιο απομακρυσμένες τελικές απολήξεις των βασικών και κορυφαίων δενδριτών) ποικίλει από περίπου 200 μm σε μεγαλύτερα του 1mm. Λόγω των πολλαπλών διακλαδώσεων, το συνολικό μήκος του δενδριτικού πλέγματος μπορεί να φτάσει τα αρκετά εκατοστά. Το μήκος του νευράξονα είναι ακόμα πιο μεγάλο, και μπορεί να φτάσει σε δεκάδες εκατοστά. Το συνολικό του μήκος, αθροίζοντας και τις διακλαδώσεις του είναι πολύ μεγαλύτερο (Elston GN, 2003 ; Spruston N, 2008).

Παρόλη την στερεότυπη δομή των πυραμιδικών κυττάρων, παρουσιάζεται ποικιλομορφία, ανάμεσα στις διαφορετικές εγκεφαλικές περιοχές (π.χ. ιππόκαμπος και νεοφλοιός), κυτταρικές στιβάδες (π.χ. στιβάδα III και στιβάδα V) και είδη (πχ άνθρωπος και άλλα πρωτεύοντα) (Εικόνα 1). Για παράδειγμα, οι βασικοί δενδρίτες της στιβάδας II/III της μαϊμούς Macaque είναι μικρότεροι, απλούστεροι και έχουν μικρότερη πυκνότητα σε άκανθες στον πρωτοταγή οπτικό φλοιό σε σχέση με ανώτερες οπτικές φλοιϊκές περιοχές, σε αντίθεση με τους βασικούς δενδρίτες των κυττάρων του προμετωπιαίου φλοιού. Εντούτοις, τα πλέγματα των βασικών δενδριτών του ανθρώπου είναι τα πιο πολύπλοκα και με μεγαλύτερη πυκνότητα σε άκανθες, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα πρωτεύοντα. Άλλο παράδειγμα είναι οι πυραμιδικοί νευρώνες τις στιβάδας V, που έχουν μακρύτερους κορυφαίους δενδρίτες, με λιγότερους παράπλευρους, αναφορικά με τα πυραμιδικά κύτταρα της στιβάδας II/III. Συγκρίνοντας, τα πυραμιδικά κύτταρα CA3 του ιππόκαμπου με αυτά της CA1 περιοχής, παρατηρείται στα πρώτα ο κύριος κορυφαίος δενδρίτης να διακλαδίζεται παραδώθε του σώματος, και να φέρει μία ομάδα από ευμεγέθεις άκανθες στα πρώτα 100 μm του (Elston GN, 2003 ; Spruston N, 2008).

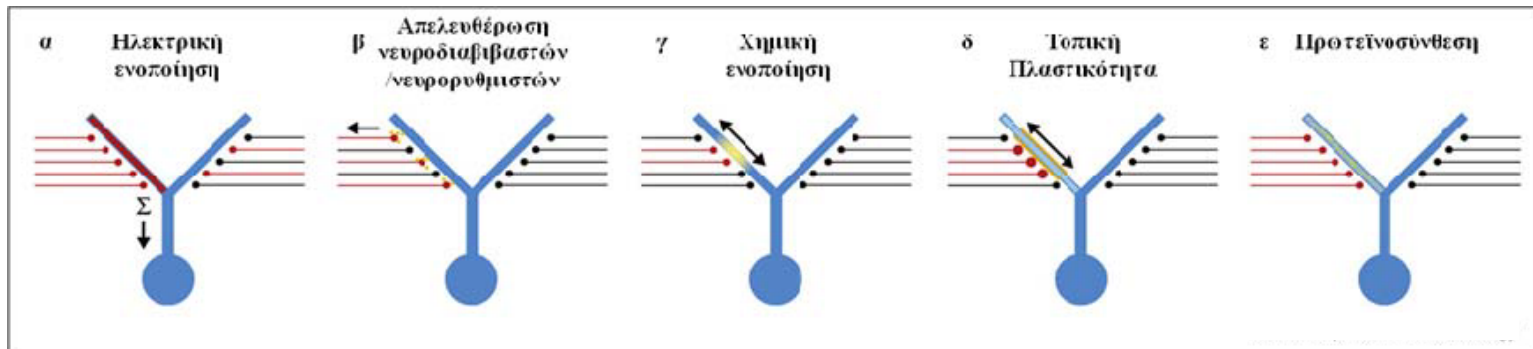
Ακόμα, διαφοροποιήσεις μπορεί να παρουσιάζονται και μέσα στην ίδια την στιβάδα, όπως στην στιβάδα V του εγκεφαλικού φλοιού στον ενήλικα αρουραίο. Τα πυραμιδικά κύτταρα του εγκεφάλου ενηλίκων τρωκτικών έχουν διαφορετικά μεγέθη

σώματος, ενώ αυτά που έχουν μεγαλύτερο τείνουν να καταλαμβάνουν συνήθως το πάνω μέρος της στιβάδας, και αυτά με μικρότερο σώμα το κάτω. Λαμβάνοντας υπόψη επιπλέον χαρακτηριστικά, όπως η περιοχή προβολής τους, η μορφολογία τους, και οι ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες τους, τα κύτταρα αυτά μπορούν να διαχωριστούν σε πρώτη φάση σε δύο μεγάλες κατηγορίες. Έτσι, τα τύπου I πυραμιδικά κύτταρα της στιβάδας V, προβάλλουν στο άνω διδύμιο, στην σπονδυλική στήλη, ή στην γέφυρα, έχουν συστάδα πλούσια από κορυφαίους δενδρίτες και εκφορτίζουν δυναμικά ενεργείας σε ομάδες. Τα τύπου II πυραμιδικά κύτταρα προβάλλουν στο ετερόπλευρο ημισφαίριο ή στο ομόπλευρο ραβδωτό, ο κορυφαίος τους δενδρίτης δεν έχει πολλούς παράπλευρους, δεν καταλήγει σε συστάδα και εκφορτίζουν δυναμικά ενεργείας τονικά (Molnar Z and AF Cheung, 2006). Περαιτέρω ανάλυση, βασιζόμενη μόνο σε μορφολογικά χαρακτηριστικά, των νευρώνων της στιβάδας V του πρωτοταγή οπτικού φλοιού του επιμύ, οδηγεί στην κατηγοριοποίηση τους σε πέντε κύριες ομάδες τις: (1) που περιλαμβάνει ευμεγέθεις (αναφορικά με το σώμα και το δενδριτικό τους πλέγμα) πυραμιδικούς νευρώνες με τον κύριο κορυφαίο τους δενδρίτη να καταλήγει σε μία συστάδα στην στιβάδα I, (2) που αντιστοιχεί σε πυραμιδικούς νευρώνες που είτε οι κορυφαίοι τους δενδρίτες δεν έχουν συστάδα κορυφαίων δενδριτών και εκτείνονται μέχρι την στιβάδα III, είτε είναι μη πυραμιδικοί νευρώνες, πολωμένοι, με τους δενδρίτες τους να διακλαδίζονται μη συμμετρικά γύρω από το σώμα, (3) που περιέχει πυραμιδικά κύτταρα με λιγότερο εκτεταμένο πυραμιδικό πλέγμα, (4) που απαρτίζεται από μικρού μεγέθους (αναφορικά με το σώμα και το δενδριτικό τους πλέγμα) πυραμιδικούς νευρώνες, και (5) που αποτελείται από μικρά σε μέγεθος πυραμιδικά κύτταρα με πολυάριθμους διακλαδισμένους κύριους δενδρίτες, ή με λιγότερους και με μικρότερα σε έκταση δενδριτικά δέντρα, ή να έχουν διαγώνιο προσανατολισμό (και όχι τον τυπικό κάθετο αναφορικά με τις φλοιϊκές στιβάδες) (Tsiola A *et al.*, 2003).

2.3 Μετάδοση Πληροφορίας στους Δενδρίτες

Ο κυριότερος ρόλος των δενδριτών είναι η συλλογή σημάτων, προερχόμενων από τα υπόλοιπα κύτταρα του νευρωνικού κυκλώματος, και η μεταφορά τους στο σώμα για την γένεση των δυναμικών ενεργείας. Εν τούτοις, ο αρχικός χαρακτηρισμός τους ως απλοί ηλεκτρικοί αγωγοί, είναι πλέον φτωχός. Η μετάδοση της πληροφορίας μέσα σε ένα δενδρίτη είναι συνδυαστικό αποτέλεσμα των μορφολογικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών του. Έτσι, ο λειτουργικός τους ρόλος αναβαθμίζεται σε

θεμελιώδη μονάδα υψηλής επεξεργασίας και μετάδοσης σήματος (Branco T and M Hausser, 2010 ; London M and M Hausser, 2005, ; Stuart G et al, 1999) (βλ. Εικόνα 2).



Εικόνα 2 Διαφορετικές μορφές λειτουργικής διαμερισματοποίησης ενός δενδρίτη. Απεικονίζεται η σχηματική αναπαράσταση απλοποιημένων δενδρικών πλεγμάτων, όπου υποδεικνύεται ότι η ενοποίηση και μετάδοση της πληροφορίας γίνεται σε πολλαπλά τοπικά επίπεδα, στα πλαίσια των δενδρικών κλάδων (α) Η ηλεκτρική ενοποίηση των συναπτικών σημάτων γίνεται αρχικά τοπικά σε ένα δενδρίτη, που έπειτα μεταφέρεται στο υπόλοιπο δενδρικό πλέγμα, (β) Οι δενδρίτες μπορούν να απελευθερώσουν κλασσικούς νευροδιαβιβαστές (γλουταμινικό οξύ, GABA) ή νευρορρυθμιστές (ενδοκανναβινοειδή, BDNF), που μπορούν να δράσουν αναδραστικά και σε κάποιες περιπτώσεις ενεργοποιούν αυτοκρινείς υποδοχείς (γ) Η συναπτική διέγερση μπορεί να προκαλέσει σύνθετα ενδοκυτταρικά φαινόμενα τα οποία μετατρέπονται και ενοποιούνται ως βιοχημικά σήματα, που επηρεάζουν τις γειτονικές περιοχές. Για παράδειγμα, η αύξηση της συγκέντρωσης του Ca^{++} που καθοδικά πυροδοτεί την ενεργοποίηση πολλών βιοχημικών μονοπατιών, μπορεί τοπικά να προκληθεί είτε από την είσοδο του μέσω ενεργοποιημένων συνάψεων, είτε μετά από την ενεργοποίηση των τασσοεξαρτώμενων διαύλων ασβεστίου, είτε ως αποτέλεσμα της δράσης πολυάριθμων δεύτερων μονοπατιών. Το μέγεθος της χωρικής διάδοσης της επίδρασης της αυξημένης συγκέντρωσης Ca^{++} εξαρτάται από την πηγή Ca^{++} , τα δεύτερα μονοπάτια που ενεργοποιήθηκαν, την τοπική δενδρική γεωμετρία, καθώς και το φίλτράρισμα του Ca^{++} (δ) Τα βιοχημικά σήματα (ειδικά το Ca^{++}) σχετίζονται άμεσα με την πλαστικότητα, επομένως, η διαμερισματοποίησης τους μετατρέπει τον δενδρίτη σε μονάδα πλαστικότητας. Συνεπώς, ένας δενδρίτης δεν μπορεί μόνο να επιτελέσει υπολογισμούς της πληροφορίας, αλλά και να την αποθηκεύσει τοπικά (ε) Η συναπτική διέγερση συνδέεται με την τοπική πρωτεϊνοσύνθεση, που επιδρά στην πλαστικότητα, και την ρύθμιση της μορφολογίας, τόσο κατά την ανάπτυξη των δενδριτών, όσο και σε αλλαγές που εξαρτώνται από κάποια εμπειρία (από Branco T and M Hausser, 2010)

2.3.1 Παθητικές και Ενεργητικές Ιδιότητες των Δενδριτών

Οι παθητικές και ενεργητικές ιδιότητες ενός δενδρικού κλάδου, καθορίζουν σημαντικά τον τρόπο μετάδοσης των διαφόρων ηλεκτρικών σημάτων, τον χωροχρονικό εντοπισμό τους (διαμερισματοποίηση) μέσα στο δενδρικό πλέγμα, και την μεταξύ τους αλληλεπίδραση στα εκάστοτε σημεία του δενδρικού πλέγματος.

Οι παθητικές ιδιότητες του δενδρίτη αναφέρονται στα μορφολογικά χαρακτηριστικά του, όπως μήκος και διάμετρος ανάμεσα σε δύο σημεία διακλάδωσης, στις ηλεκτρικές ιδιότητες της μεμβράνης του, δηλαδή, την αντίσταση της μεμβράνης, την χωρική σταθερά της, και την σταθερά απόστασης. Επίσης, οι εν

ηρεμία διάυλοι ιόντων επηρεάζουν τις παθητικές ιδιότητες. Συνεπώς, ο κάθε δενδριτικός κλάδος ενός δενδριτικού πλέγματος, αντιστοιχεί σε ένα τμήμα με συγκεκριμένες ηλεκτρικές ιδιότητες, και γι αυτό συνιστούν απαραίτητη προϋπόθεση για την μετάδοση του ηλεκτρικού σήματος (Branco T and Hausser M, 2010 ; London M and Hausser M, 2005 ; Stuart G et al 1999).

Λόγων των παθητικών του ιδιοτήτων, ένας δενδρίτης επηρεάζει την μετάδοση των ηλεκτρικών σημάτων, δρώντας ως παθητικό φίλτρο, και υλοποιώντας παράλληλη επεξεργασία των εισερχόμενων σημάτων και τοπικούς υπολογισμούς. Στην πρώτη περίπτωση, ο δενδρίτης μπορεί να θεωρηθεί σαν ένα αγωγίμο μέσο με μέση αντίσταση, που φιλτράρει γραμμικά το ηλεκτρικό σήμα. Το φιλτράρισμα εξασθενεί το πλάτος και την συχνότητα του σήματος, ανάλογα με το μήκος του δενδρίτη. Στην δεύτερη περίπτωση, γίνεται μη γραμμική αλληλεπίδραση μεταξύ πολλαπλών σημάτων που συνεντοπίζονται χωροχρονικά στον δενδριτικό κλάδο. Όταν δύο διεγερτικά σήματα, φτάσουν ταυτόχρονα, και έχουν κοντινά σημεία εισόδου σε ένα δενδρίτη, τότε καθένα από αυτά εκπολώνει την μεμβράνη, μειώνοντας, έτσι το εύρος του άλλου σήματος. Το συνολικό αποτέλεσμα δράσης των διεγερτικών σημάτων είναι μία απόκριση που αντιστοιχεί σε υπογραμμική, και όχι αλγεβρική, άθροιση του εύρους τους. Το εύρος ενός διεγερτικού σήματος που δρα ταυτόχρονα με ένα ανασταλτικό, επηρεάζεται από την βραχυκυκλωτική ή διακλαδωτική επίδραση των δεύτερων. Κατά αυτόν τον τρόπο η αποτελεσματικότητα ενός διεγερτικού σήματος εξαρτάται από το εύρος και το σημείο εισόδου των ανασταλτικών σημάτων. Με άλλα λόγια, ένα διεγερτικό σήμα που έχει κοντινό σημείο εισόδου με ένα ανασταλτικό, θα έχει επίδραση αν και μόνο δράσει αυτό, και όχι το ανασταλτικό σήμα (London M and M Hausser, 2005)

Σε κάθε δενδρίτη εντοπίζεται μια πληθώρα τασοελεγχόμενων διαύλων, στους οποίους οφείλονται οι ενεργές ιδιότητες του. Η έκφραση αυτών των καναλιών δεν είναι η ίδια για κάθε δενδρικό κλάδο, αποδίδοντας στο δενδριτικό πλέγμα περαιτέρω λειτουργική εξειδίκευση. Έτσι, κατά μήκος των κορυφαίων δενδριτών παρατηρείται ομοιόμορφη έκφραση τασοελεγχόμενων καναλιών Na^+ , μη ομοιόμορφη κατανομή πολλών διαφορετικών τύπων τασοελεγχόμενων καναλιών Ca^{++} (τύπου-T, τύπου-L, τύπου-P/Q, τύπου-N και τύπου-R). Επιπλέον, κανάλια που ενεργοποιούνται με υπερπόλωση (Hyperpolarization-activated channels-HCN) εντοπίζονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στους πιο απομακρυσμένους κορυφαίους δενδρίτες. Στα πυραμιδικά κύτταρα της στιβάδας V εκφράζονται μη ομοιόμορφα στο σώμα και στους δενδρίτες

κανάλια K^+ τύπου-A. Τα κανάλια αυτά παίζουν σημαντικό ρόλο στην επεξεργασία και την διάδοση των ηλεκτρικών σημάτων, καθώς με την δράση τους επιτρέπουν την μετάδοση της πληροφορίας, όχι μόνο από τους δενδρίτες προς τον άξονα, αλλά και προς την αντίθετη κατεύθυνση (οπισθοδιάδοση-backpropagation). Έτσι, είναι δυνατή η αλληλεπίδραση των σωματικών δυναμικών ενεργείας με τους δενδρίτες και η εκ νέου δημιουργία δυναμικών ενεργείας, χωρίς επιπρόσθετο συναπτικό σήμα. Επιπλέον, μπορούν να προάγουν ή να μειώσουν την ισχύ των συναπτικών σημάτων, που σχετίζονται στενά χρονικά και χωροταξικά, δημιουργώντας τοπικά δενδριτικά δυναμικά. Τέτοια δυναμικά δημιουργούνται από τασοεξαρτώμενους διάλους Na^+ , Ca^{++} και από υποδοχείς-διάλους NMDA, ενώ η δράση τους περιορίζεται από κανάλια K^+ τύπου-A (Remy S et al, 2010).

Ένας άλλος αντίκτυπος των ενεργητικών ιδιοτήτων των δενδριτών είναι στην ταυτόχρονη ανίχνευση των σημάτων, δηλαδή στη δυνατότητα γένεσης σωματικών δυναμικών ενεργείας από την άθροιση σημάτων που απέχουν χωρικά, αλλά φτάνουν ταυτόχρονα. Συνδυάζοντας συναπτικά σήματα, και τοπικά δενδριτικά δυναμικά, δίνεται η δυνατότητα πολλών εναλλακτικών μηχανισμών ταυτόχρονης ανίχνευσης (London M and M Hausser, 2005 ; Spruston N, 2008 ; Stuart G et al, 1999).

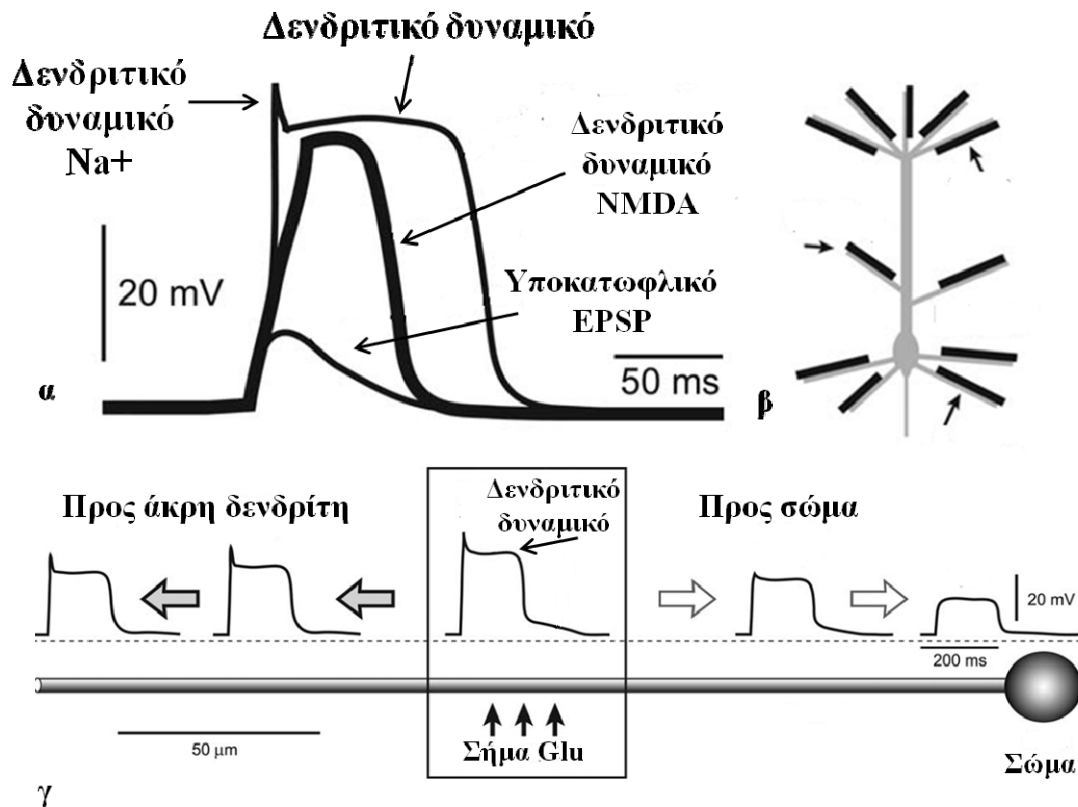
2.3.2 Συναπτική Ολοκλήρωση

Οι πυραμιδικοί νευρώνες δέχονται πλήθος συναπτικών σημάτων σε όλη την έκταση της δομής τους. Στο σώμα και στον άξονα καταφθάνουν ανασταλτικά GABAεργικά σήματα, ενώ οι δενδρίτες λαμβάνουν ως επί το πλείστον, διεργετικά σήματα, από πολλαπλές πηγές. Έτσι, οι πιο κοντινοί στο σώμα, δενδρίτες δέχονται σήματα από την ίδια ή παραπλήσια περιοχή, ενώ οι πιο απομακρυσμένοι δενδρίτες, όπως η συστάδα των κορυφαίων δενδριτών, από θαλαμικές ή άλλες φλοιϊκές εγκεφαλικές περιοχές. Η μορφολογική ποικιλομορφία των βασικών και κορυφαίων δενδριτών, ίσως έχει επίδραση στον τρόπο που ενοποιείται η πληροφορία που φτάνει στις συνάψεις τους. Συνέπεια, των παραπάνω είναι η λειτουργική διαμερισματοποίηση του πυραμιδικού νευρώνα, σε περιοχές που είτε λαμβάνουν διαφορετικά συναπτικά σήματα, είτε έχουν συνάψεις με διαφορετικές ιδιότητες (Spruston N, 2008)

2.3.2.1 Δενδριτικά Δυναμικά NMDA

Στην συστάδα των κορυφαίων, στους βασικούς και πλευρικούς δενδρίτες, απαντάται υψηλή πυκνότητα διεγερτικών γλουταμινεργικών συνάψεων, που φτάνει το 85% του συνόλου τους, στους πυραμιδικούς νευρώνες της στιβάδας V. Η ταυτόχρονη ενεργοποίηση 10-50 τέτοιου είδους γειτονικών συνάψεων πυροδοτεί την έναρξη τοπικών δενδριτικών δυναμικών NMDA, που οφείλονται στην δέσμευση του γλουταμινικού οξέος στον ιοντοτροπικό υποδοχέα συζευγμένο με διάυλο ιόντων Na^+ και Ca^{++} , NMDAR. Απόρροια αυτού είναι σε υψηλές συγκεντρώσεις γλουταμινικού οξέος, να αποδεσμεύεται από τον NMDAR ο αναστολέας του, Mg^{++} , και να γίνεται εισροή στο κύτταρο ιόντων Na^+ και Ca^{++} , που προκαλούν εκπόλωση (Antic SD et al, 2010).

Τα δενδριτικά δυναμικά NMDA, που δημιουργούνται με αυτόν τον τρόπο, χαρακτηρίζονται από κυματομορφές με πλάτος 40-50mV (κατά την διάρκεια του πλατό/κόρου διαγράμματος) και διάρκεια 50-100ms. Πρόκειται για ένα φαινόμενο, που είναι πολύ εντοπισμένο, και απαιτεί ένα μικρό δενδριτικό τμήμα μήκους 10-40μm. Αφού πυροδοτηθεί ένα δενδριτικό δυναμικό NMDA διαδίδεται από το σημείο έναρξης του, προς δύο κατευθύνσεις. Η μία είναι προς το σώμα και η άλλη προς το τέρμα του δενδριτικού κλάδου. Στην πρώτη κατεύθυνση, το πλάτος της κυματομορφής μειώνεται σημαντικά, καθώς πλησιάζει το κυτταρικό σώμα. Εν τούτοις, υπερκατωφλικά γλουταμινεργικά σήματα με σημείο εισόδου στην μέση και στις εγγύτερες περιοχές προς το σώμα ενός μονήρη βασικού δενδρίτη, μπορούν να προκαλέσουν πολλαπλές σωματικές εκπολώσεις πλάτους 10-20mV. Στην δεύτερη κατεύθυνση, το πλάτος της κυματομορφής μειώνεται πολύ λιγότερο, και έτσι, μπορεί να διατηρηθεί ένα απομακρυσμένο αναφορικά με το σώμα μέρος ενός δενδριτικού κλάδου σε κατάσταση υπερπόλωσης (πχ η συστάδα κορυφαίων δενδριτών) (βλ Εικόνα 3). Η διάρκεια και το πλάτος των κυματομορφών των δυναμικών ενεργείας που προκαλούνται στο σώμα, εξαρτώνται από το γλουταμινεργικό σήμα. Συγκεκριμένα, η διάρκεια των σωματικών δυναμικών ενεργείας παρουσιάζει θετική συσχέτιση με την ένταση του σήματος, ενώ το πλάτος τους, μη γραμμική/δυναμική (Antic SD et al, 2010)

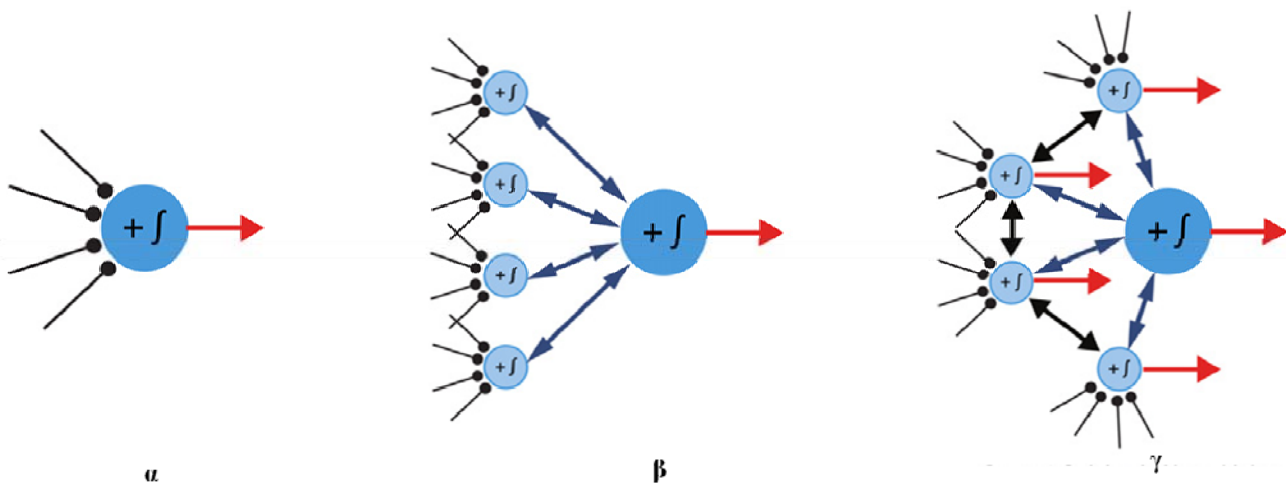


Εικόνα 3 Δενδρικά δυναμικά NMDA. (α) Στους λεπτούς δενδρίτες (βασικοί, κορυφαιοί παράπλευροι και της κορυφιαίας συστάδας) των πυραμιδικών κυττάρων αδύναμα υποκατωφλικά γλουταμινεργικά σήματα παράγουν εκπολώσεις τύπου EPSP. Δυνατότερα υπερκατωφλικά σήματα παράγουν δενδριτικά δυναμικά. Τα δενδριτικά δυναμικά χαρακτηρίζονται από ένα αρχικό μικρό δενδριτικό δυναμικό Na^+ , πού είναι αποτέλεσμα της ενεργοποίησης του AMPAR από το γλουταμινεργικό σήμα. Αυτό προκαλεί μια αργή απόκριση ρεύματος Ca^{++} , που πυροδοτεί την δημιουργία του δενδριτικού δυναμικού NMDA. (β) Τα βέλη υποδεικνύουν τα σημεία γένεσης των δενδριτικών δυναμικών NMDA στο πυραμιδικό κύτταρο (γ) Το δενδριτικό δυναμικό διαδίδεται από το σημείο έναρξης του, προς δύο κατευθύνσεις, κατά τις οποίες το πλάτος της κυματομορφής μεταβάλλεται (από Antic SD et al, 2010)

Η λειτουργική σημασία των δενδριτικών δυναμικών NMDA, είναι ότι ανεξάρτητα από το σημείο εκκίνησης τους (βασικοί, κορυφαιοί ή πλευρικοί δενδρίτες), δημιουργούν κατάλληλες συνθήκες για τον χωροχρονικό συνδυασμό ενεργών συναπτικών σημάτων, ή για μακροχρόνιες και βραχυπρόθεσμες συναπτικές τροποποιήσεις (πχ Long Term Potentiation-LTP, Long Term Depression-LTD). Επιπλέον, λόγω της μεγάλης διάρκειας, του μήκους τους, και της τοπικής τους δράσης, καθιστούν το δενδριτικό κυτταρικό υπόβαθρο, λειτουργική υπομονάδα για πιο πολύπλοκους υπολογισμούς, στην συνολική επεξεργασία των σημάτων που δέχονται οι πυραμιδικοί νευρώνες (Antic SD et al, 2010)

2.4 Σχέδια Εκφόρτισης

Κάθε νευρικό κύτταρο, μπορεί να αντιπροσωπεύεται από ένα μοντέλο-νευρώνα, που περιλαμβάνει λειτουργικές περιοχές: με στοιχεία εισόδου, ολοκλήρωσης, αγωγής και εξόδου της πληροφορίας. Όπως, έχει ήδη αναφερθεί οι δενδριτικοί κλάδοι είναι θεμελιώδεις μονάδες για την υπολογιστική επεξεργασία του σήματος από τα πυραμιδικά κύτταρα. Λόγω των βιοφυσικών, βιοχημικών και μορφολογικών τους ιδιοτήτων, προσφέρουν πολλαπλά επίπεδα για την επεξεργασία του σήματος (Poirazi P *et al.*, 2003 ; Sidiropoulou K *et al.*, 2006). Έτσι, ένα νευρικό κύτταρο μπορεί από ένα απλό μοντέλο, όπου όλη η πληροφορία ενοποιείται στο σώμα, να θεωρηθεί ένα μοντέλο νευρωνικού δικτύου δύο και πλέον επιπέδων, (London M and M Hausser, 2005). Οι πλευρικοί δενδρίτες αποτελούν το πρώτο επίπεδο, συναθροίζοντας τα εισερχόμενα σήματα, με μία σιγμοειδή καμπύλη. Στο δεύτερο επίπεδο, τα σήματα εξόδου κάθε δενδρίτη συναθροίζονται γραμμικά στο σώμα (Poirazi P *et al.*, 2003). Το μοντέλο-νευρώνα μπορεί να αποκτήσει ένα ακόμα επίπεδο επεξεργασίας της πληροφορίας αν ληφθεί υπόψη και η ικανότητα των νευρώνων να απελευθερώνουν νευροδιαβιβαστές. Σε αυτό το επίπεδο, γίνεται ενοποίηση της πληροφορίας, που προκύπτει και από την αλληλεπίδραση των επιμέρους δενδριτικών κλάδων (Branco T and M Hausser, 2010). Το τελικό αποτέλεσμα της συλλογής και επεξεργασίας των διαφόρων σημάτων, από ένα νευρώνα, είναι η παραγωγή δυναμικών ενεργείας (βλ. Εικόνα 4).



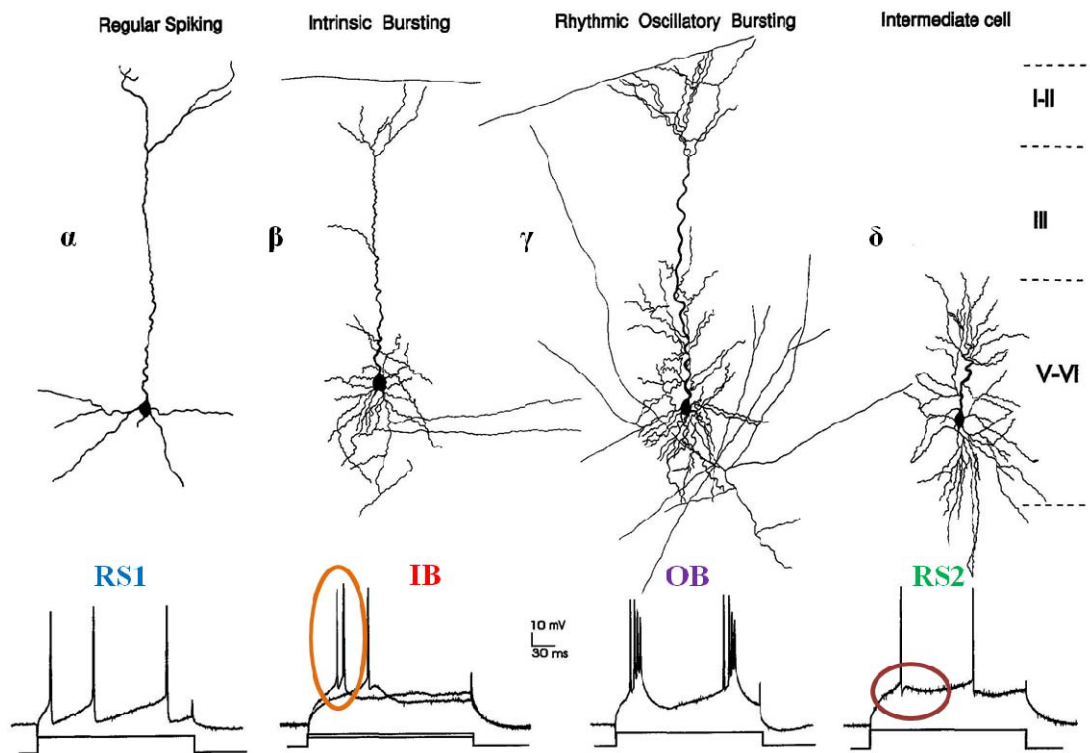
Εικόνα 4 Μοντέλα νευρωνικών δικτύων επεξεργασίας της πληροφορίας. (α) Μοντέλο νευρώνα-σημείου (β) Μοντέλο νευρωνικού δικτύου δύο επιπέδων (γ) Μοντέλο νευρωνικού δικτύου με πολλαπλά επίπεδα (από Branco T and M Hausser, 2010)

Στα πυραμιδικά κύτταρα παρατηρείται μια ποικιλομορφία στα σήματα εξόδου που παράγουν. Με άλλα λόγια διαφορετικοί πυραμιδικοί νευρώνες έχουν διαφορετικά σχέδια εκφόρτισης, που θεωρείται ότι εξυπηρετούν τις ποικίλες λειτουργίες τους. Τα πυραμιδικά κύτταρα μπορούν να ταξινομηθούν με βάση την συχνότητα των δυναμικών ενεργείας που παράγουν, σε ένα δεδομένο σωματικό ερέθισμα, σε δύο γενικές κατηγορίες: αυτά που εκφορτίζουν συνεχόμενα δυναμικά ενεργείας (Regular Spiking-RS), και αυτά που εκφορτίζουν ομάδες 2-5 δυναμικών ενεργείας (Intrinsic Bursting-IB). Τα RS κύτταρα είναι τα πιο διαδεδομένα στον νεοφλοιό, ενώ τα IB απαντώνται κυρίως στην στιβάδα V (Connors BW and MJ Gutnick, 1990 ; Contreras D, 2004). Τα δυναμικά ενεργείας των πυραμιδικών κυττάρων συνοδεύει, συνήθως, μία μεθεκπόλωση (After Depolarization-ADP). Υπεύθυνα για αυτό το φαινόμενο είναι τασοεξαρτώμενα κανάλια Na^+ , και/ή Ca^{++} . Για να περιοριστεί η επαναπόλωση είναι απαραίτητο τα κανάλια K^+ να κλείσουν γρήγορα. Η ποικιλία στο εύρος της μεθεκπόλωσης συνεισφέρει στην διαφοροποίηση μεταξύ των RS και IB νευρώνων (Contreras D, 2004 ; Spruston N, 2008).

Κάθε ξεχωριστό δυναμικό ενεργείας των RS κυττάρων, συνήθως ακολουθεί ένας συνδυασμός μεθυπερπόλωσης (Afterhyperpolarization-AHP) Όταν δοθεί σε ένα RS πυραμιδικό κύτταρο το κατώτερο δυνατό σήμα, για να διεγερθεί (κατωφλικό σήμα), παράγει μόνο ένα δυναμικό ενεργείας. Η αύξηση της έντασης του σήματος συνοδεύεται από μείωση του μεσοδιαστήματος των δυναμικών ενεργείας. Ένα παρατεταμένο σήμα, σταθερής έντασης προκαλεί προσαρμογή συχνότητας των RS. Στα IB κύτταρα, το κάθε ξεχωριστό δυναμικό ενεργείας ακολουθεί μία ισχυρή μεθεκπόλωση. Μέσα στην ομάδα, κάθε δυναμικό ενεργείας, έχει μικρότερο πλάτος από το αμέσως προηγούμενο του. Η απόκριση ενός IB πυραμιδικού κυττάρου σε ένα κατωφλικό σήμα, είναι συνήθως μία ομάδα δυναμικών ενεργείας. Παρατεταμένο σήμα οδηγεί στην παραγωγή ενός περιοδικού προτύπου όπου εναλλάσσονται ομάδες δυναμικών ενεργείας με μονήρη δυναμικά ενεργείας (Connors BW and MJ Gutnick, 1990 ; Contreras D, 2004).

Ηλεκροφυσιολογικές μελέτες στον mPFC του αρουραίου, αποκαλύπτουν την ύπαρξη τεσσάρων πληθυσμών πυραμιδικών κυττάρων, που διαφοροποιούνται με βάση το σχέδιο εκφόρτισης τους. Οι κατηγορίες αυτές είναι: (1) νευρώνες που εκφορτίζουν συνεχόμενα δυναμικά ενεργείας (Regular Spiking-RS), στους οποίους κάθε εκφόρτιση δυναμικού ενεργείας ακολουθεί μια ισχυρή μεθυπερπόλωση, η οποία ρυθμίζει και την προσαρμογή της συχνότητας των δυναμικών ενεργείας σε ένα συρμό

δυναμικών ενεργειάς, (2) νευρώνες που εκφορτίζουν συνεχόμενα δυναμικά ενεργειάς σε ομάδα (Intrinsic Bursting-IB), οι οποίοι αρχικά εκφορτίζουν μία ομάδα των δύο δυναμικών ενεργειάς, και ακολουθούν μονήρη δυναμικά ενεργειάς με μεθεκπόλωση, (3) νευρώνες που εκφορτίζουν συνεχόμενα δυναμικά ενεργειάς σε επαναλαμβανόμενες ομάδες (Rhythmic Oscillatory Bursting-ROB), με κάθε δυναμικό ενεργειάς να ακολουθείται από μια ισχυρή μεθυπερπόλωση, και (4) τους ενδιάμεσους νευρώνες (Intermediate-IM), οι οποίοι έχουν ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες ενδιάμεσες αυτών των ομάδων RS και IB, δηλαδή, εκφορτίζουν μονήρη δυναμικά ενεργειάς που ακολουθούν μια ταχεία μεθυπερπόλωση, μια μεθεκπόλωση και μία ενδιάμεσου πλάτους μεθυπερπόλωση (Yang CR *et al.*, 1996) (βλ. Εικόνα 5).



Εικόνα 5 Σχέδια εκφόρτισης πυραμιδικών κυττάρων στιβάδας V προμετωπιαίου φλοιού αρουραίου. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιείται η κατηγοριοποίηση σε RS1, RS2, IB, OB, που αντιστοιχεί σε RS, IB, ROB και IM. Σε κύκλο υποδεικνύονται (β) οι ομάδες δυναμικών ενεργειάς που χαρακτηρίζουν τα σχέδια εκφόρτισης IB, και (δ) η μεθεκπόλωση που χαρακτηρίζει τα σχέδια εκφόρτισης IM (RS: Regular Spiking, RS1: Regular Spiking 1, RS2: Regular Spiking 2, IB: Intrinsic Bursting, ROB: Rhythmic Oscillatory Bursting, OB: Oscillatory Bursting, IM: Intermediate) (από Yang CR *et al.*, 1996)

3. Μορφολογία Πυραμιδικών Κυττάρων και Σχέδια Εκφόρτισης

Η δομική ποικιλομορφία των πυραμιδικών κυττάρων θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην λειτουργική τους εξειδίκευση. Επιστημονικές μελέτες έχουν συσχετίσει τα σχέδια εκφόρτισης των πυραμιδικών κυττάρων με τα επιμέρους

μορφολογικά χαρακτηριστικά τους. Συγκεντρωτικά, οι νευρώνες που αποδίδουν σχέδιο εκφόρτισης με συνεχόμενα δυναμικά ενεργείας (Regular Spiking-RS), φαίνεται να έχουν μικρότερο και πιο στρόγγυλο σώμα. Ο κύριος κορυφαίος τους δενδρίτης είναι λεπτός, και δεν καταλήγει πάντα σε συστάδα κορυφαίων δενδριτών, και φέρει λιγοστούς λεπτούς πλευρικούς δενδρίτες, οι οποίοι συνήθως δεν διακλαδίζονται. Το βασικό τους δενδριτικό πλέγμα είναι απλό, χωρίς πολλές διακλαδώσεις. Επίσης, οι δενδρίτες τους φέρουν λιγότερες Αντίθετα, οι νευρώνες που εκφορτίζουν ομάδες δυναμικών ενεργείας (Intrinsic Bursting-IB), έχουν πιο πολύπλοκη μορφολογία. Το σώμα τους είναι συνήθως μεγαλύτερο και στενόμακρο. Ο κύριος κορυφαίος δενδρίτης τους είναι παχύς, και φέρει πάντα συστάδα κορυφαίων δενδριτών, η οποία είναι πλούσια σε διακλαδώσεις. Επιπλέον, ξεπροβάλλουν πολλοί πλευρικοί δενδρίτες, που διακλαδίζονται περεταιίρω. Το βασικό δενδριτικό τους πλέγμα είναι και αυτό πιο σύνθετο, με πολλές διακλαδώσεις. Οι δενδρίτες τους φέρουν πολλές άκανθες άκανθες (Bilkey DK and PA Schwartzkroin, 1990 ; Chagnac-Amitai Y *et al.*, 1990 ; Mason A and A Larkman, 1990 ; Yang CR *et al.*, 1996).

Επιπλέον, πληροφορία για την πιθανή επίδραση της μορφολογίας των δενδριτών στα σχέδια εκφόρτισης των δενδριτών έχει παραχθεί από υπολογιστικές μελέτες. Στις εργασίες αυτές χρησιμοποιούνται ψηφιακές αναπαραστάσεις νευρικών κυττάρων, και μελετάται η επίδραση της μορφολογίας τους στα σχέδια εκφόρτισης με την προσομοίωση πρωτόκολλων διέγερσης με παροχή ρεύματος είτε στο σώμα, είτε στο δενδριτικό πλέγμα. Όταν σε διαμερισματοποιημένους νευρώνες-μοντέλα, που φέρουν τις ίδιες βιοφυσικές ιδιότητες, αλλά διαφέρουν στο μέγεθος και το σχήμα του δενδριτικού τους πλέγματος, προσομοιάζεται διέγερση του σώματος με σταθερό ρεύμα, παράγονται διαφορετικά σχέδια εκφόρτισης. Όσο πιο πολύπλοκη είναι η δομή του δενδριτικού πλέγματος, τόσο πιο κοντά στο πρότυπο του IB είναι το σχέδιο εκφόρτισης που αποδίδει ο νευρώνας-μοντέλο. Τα ίδια αποτελέσματα παράγονται και από μοντέλα δύο τμημάτων, που το ένα αντιστοιχεί στο δενδριτικό πλέγμα, και το άλλο στον άξονα και το σώμα μαζί. Η μεταβολή της ηλεκτρικής αντίστασης (σύνδεσης) μεταξύ των δύο τμημάτων, ή της αναλογίας της δενδριτικής προς το σύνολο της αξονικής και σωματικής, επιφάνειας τους, παράγει ένα εύρος σχεδίων εκφόρτισης, από RS σε IB, (Mainen ZF and TJ Sejnowski, 1996 ; Pinsky PF and J Rinzel, 1994).

Η μορφολογία του κορυφαίου δενδριτικού πλέγματος, όσο αναφορά το συνολικό μήκος του, την τοπολογία των δενδριτών του και το πρότυπο διακλάδωσης τους φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στα σχέδια εκφόρτισης των πυραμιδικών κυττάρων. Νευρώνες-μοντέλα, όπου γίνεται προσομοίωση παροχής ρεύματος είτε στο σώμα, είτε στο δενδριτικό πλέγμα, μεταβάλλουν το σχέδιο εκφόρτισης τους, από IB σε RS, για συγκεκριμένο αριθμό κορυφαίων δενδριτών που προστίθενται ή αφαιρούνται. Συναφές αποτέλεσμα έχει και η αλλαγή στην τοπολογία του δενδρίτη μέσα στο κορυφαίο δενδριτικό πλέγμα. Παρατηρείται ότι τα πιο ασύμμετρα κορυφαία δενδριτικά πλέγματα σχετίζονται με IB σχέδια εκφόρτισης (van Elburg RA and A van Ooyen, 2010)

Ανάλογα συμπεράσματα έχουν εξαχθεί και σε νευρώνες-μοντέλα της CA3 περιοχής του ιππόκαμπου. Κύτταρα με μεγαλύτερα δενδριτικά πλέγματα έχουν σχέδια εκφόρτισης IB, και χρειάζονται περισσότερο εκπολωτικό ρεύμα σε προσομοιώσεις με τεχνική καθήλωσης με σταθερό ρεύματος, για να μεταβούν από RS σχέδια εκφόρτισης σε IB. Επίσης, διαφορές στον τρόπο σύνδεσης του κορυφαίου δενδριτικού πλέγματος και στον βαθμό που αυτός επιτρέπει την δημιουργία οπισθομετάδοσης του ρεύματος, επηρεάζει το σχέδιο εκφόρτισης των κυττάρων, ως προς την διάρκεια και το είδος του (Krichmar JL *et al.*, 2002). Σε γαγγλιακά κύτταρα-μοντέλα του αμφιβληστροειδή, φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση της συνολικής επιφάνειας του σώματος και δενδριτικών πλεγμάτων με το σχέδιο εκφόρτισης, με κύτταρα με μεγαλύτερη επιφάνεια να δίνουν σχέδια εκφόρτισης πιο κοντά σε IB τύπο. Εντούτοις, δεν παρατηρείται κάποια αντίστοιχη συσχέτιση του σχεδίου εκφόρτισης και της πολυπλοκότητας του δενδριτικού πλέγματος (Sheasby BW and JF Fohlmeister, 1999).

4. Στόχοι Μελέτης

Συνοψίζοντας, οι έως τώρα μελέτες συσχετίζουν την μορφολογία των πυραμιδικών κυττάρων με τα σχέδια εκφόρτισης τους. Στις *in vitro* μελέτες, ο τρόπος προσέγγισης του ζητήματος, γίνεται με κυτταρομορφομετρικές καταγραφές και συσχέτιση με τα σχέδια εκφόρτισης. Στις *in silico* μελέτες, χρησιμοποιούνται τόσο πλήρεις ψηφιακές αναπαραστάσεις νευρώνων, όσο και πιο απλοποιημένα μοντέλα νευρικών κυττάρων, και με διάφορες τεχνικές προσομοίωσης διέγερσης, συσχετίζονται τα μορφολογικά χαρακτηριστικά με τα σχέδια εκφόρτισης. Επιπλέον, στου ίδιου τύπου μελέτες, χρησιμοποιούνται και νευρώνες-μοντέλα με

τροποποιημένη ψηφιακή αναπαράσταση, ή με εκ νέου ψηφιακή ανακατασκευή κάποιον τμημάτων της δομής του. Και στους δύο τρόπους ερευνητικής προσέγγισης, δεν γίνεται κάποια κατάταξη, που να αντιστοιχίζει κάθε σχέδιο εκφόρτισης με συγκεκριμένες τιμές του συνόλου των μορφολογικών χαρακτηριστικών των πυραμιδικών κυττάρων. Ενώ, γίνεται συσχέτιση με το σχέδιο εκφόρτισης, όσο αναφορά τα μορφομετρικά χαρακτηριστικά του σώματος, δεν εξετάζεται η επίδραση του σε αυτό. Επίσης, γίνεται εκτενή ανάλυση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των δενδριτικών πλεγμάτων (όσο αναφορά το συνολικό δενδρικό μήκος, τον όγκο, τον τρόπο σύνδεσης των δενδριτών και την τοπολογία τους), αλλά δεν εξετάζεται το πώς επηρεάζει η διαφορετικότητα στην δομή των δύο αυτών κυτταρικών τμημάτων στην διαμόρφωση του σχεδίου εκφόρτισης. Τέλος, δεν μελετάται, πως επιδρούν οι ενεργητικές ιδιότητες, και συγκεκριμένοι συναπτικοί μηχανισμοί στο σχέδιο εκφόρτισης.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, εξετάζονται τα παραπάνω επιστημονικά ερωτήματα, χρησιμοποιώντας τις ψηφιακές αναπαραστάσεις πυραμιδικών κυττάρων της στιβάδας V, του προμετωπιαίου φλοιού αρουραίου. Αρχικά, γίνεται ομαδοποίηση αναφορικά με τα σχέδια εκφόρτισης τους των πυραμιδικών κυττάρων, με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους, χρησιμοποιώντας την μέθοδο του δενδρογράμματος. Αν κάποιο μορφολογική παράμετρος ή συνδυασμός τους έχει σημαντική επίδραση στο σχέδιο εκφόρτισης, τότε αναμένεται οι ηλεκτροφυσιολογικές κατηγορίες των πυραμιδικών κυττάρων, να χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένες μορφολογικά χαρακτηριστικά. Όσο αναφορά την επίδραση της μορφολογίας του σώματος στο σχέδιο εκφόρτισης, γίνεται ψηφιακή ανακατασκευή της μορφολογίας των πυραμιδικών κυττάρων-μοντέλων με αντικατάσταση του φυσικού σώματος με ένα μέσου όγκου, και παρατηρείται η μετάπτωση στα σχέδια εκφόρτισης. Αν ο όγκος του σώματος έχει σημαντική επίδραση στην διαμόρφωση των σχεδίων εκφόρτισης, αναμένεται μεγάλη μεταβολή στο σχέδιο εκφόρτισης, και να ακολουθεί κάποιον κανόνα. Στην συνέχεια οι ψηφιακές ανακατασκευές των πυραμιδικών κυττάρων-μοντέλων που φέρουν σώματα μέσου όγκου, τροποποιούνται περισσότερο με την αντικατάσταση του κορυφαίου δενδριτικού πλέγματος, με ένα «απλό», ή με ένα «σύνθετο» δενδριτικό πλέγμα, αναφορικά με την πολυπλοκότητα της μορφολογίας του, και εξετάζεται η μετάπτωση των σχεδίων εκφόρτισης. Αν υπάρχει κάποια επίδραση της αναλογίας της μορφολογικής πολυπλοκότητας των δενδριτικών πλεγμάτων με τα σχέδια εκφόρτισης, αναμένεται μεταβολή στο σχέδιο

εκφόρτισης, πιθανόν με κάποιο κανόνα. Επίσης, χρησιμοποιώντας, τις ψηφιακές αναπαραστάσεις των πυραμιδικών κυττάρων-μοντέλων, χωρίς καμία περαιτέρω τροποποίηση τους, μειώνεται η αγωγιμότητα συγκεκριμένου τύπου διαύλων που επηρεάζουν την μεθυπερπόλωση (SK κανάλια) (Weatherall *et al.*, 2010), και εξετάζεται η επίδραση στο σχέδιο εκφόρτισης. Αν η αγωγιμότητα αυτών των διαύλων είναι μειωμένη, αναμένεται η μορφολογία να έχει μεγαλύτερη επιρροή στην διαμόρφωση των σχεδίων εκφόρτισης, και επομένως, να υπάρχει η ανάλογη μεταβολή τους. Επίσης, μελετάται ιδιαίτερα ο ρόλος του βασικού δενδριτικού πλέγματος. Γίνεται ομαδοποίηση των κυττάρων με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του βασικού δενδριτικού πλέγματος, χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο k-μέσης τιμής, και εξετάζεται αν οι ομάδες που προκύπτουν αντιστοιχούν στην ηλεκτροφυσιολογική κατηγοριοποίηση με βάση τα σχέδια εκφόρτισης, που προκύπτουν από την αντικατάσταση του κορυφαίου δενδριτικού πλέγματος, με ένα «απλό», ή με ένα «σύνθετο» δενδριτικό πλέγμα. Αν η μορφολογία του βασικού δενδριτικού πλέγματος, έχει κάποια επίδραση στο σχέδιο εκφόρτισης, αναμένεται η ομαδοποίηση με βάση τον αλγόριθμο k-μέσης τιμής, να αποδώσει ομάδες που να αντιστοιχούν σε ένα τύπο σχεδίου εκφόρτισης και σε συγκεκριμένο σύνολο παραμέτρων της μορφολογίας του βασικού δενδριτικού πλέγματος. Σχετικά, με την επίδραση των συναπτικών μηχανισμών εξετάζονται κάποια χαρακτηριστικά των δυναμικών ενεργείας που άγονται από την ενεργοποίηση του υποδοχέα NMDA, σε διαφορετικές αναλογίες ρεύματος NMDA προς AMPA, και αναλύονται σε σχέση με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του βασικού δενδριτικού πλέγματος, και τα σχέδια εκφόρτισης που προκύπτουν από την αντικατάσταση του κορυφαίου δενδριτικού πλέγματος, με ένα «απλό», ή με ένα «σύνθετο» δενδριτικό πλέγμα. Αν η μορφολογία του βασικού δενδριτικού πλέγματος, επιδρά στα χαρακτηριστικά των δυναμικών που άγονται μέσω του υποδοχέα NMDA, τότε αναμένεται μια συσχέτιση με τις παραμέτρους των χαρακτηριστικών αυτών. Ανάλογα αναμένεται, τα σχέδια εκφόρτισης, να συσχετίζονται με τα χαρακτηριστικά των δυναμικών που άγονται μέσω του υποδοχέα NMDA, και κατ' επέκταση με την μορφολογία του βασικού δενδριτικού πλέγματος.

Υλικά και Μέθοδοι

II. Υλικά και Μέθοδοι

1. Περιβάλλον Προσομοίωσης NEURON

Το περιβάλλον προσομοιώσεως NEURON (Hines ML and Carnevale NT, 1997) είναι κατάλληλο για την μοντελοποίηση τόσο μεμονωμένων κυττάρων, όσο και νευρωνικών δικτύων. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιούνται τα διάφορα εργαλεία του προγράμματος, για την μορφολογική αναπαράσταση των πυραμιδικών κυττάρων και για τα πειράματα προσομοίωσης καθήλωσης με σταθερό ρεύμα καθώς και συναπτικής διέγερσης. Τα εκάστοτε εργαλεία που χρησιμοποιούνται αναφέρονται στις επόμενες παραγράφους. Οι προσομοιώσεις εκτελούνται σε διακομιστή Xeon.

2. Μορφολογία Πυραμιδικών Κυττάρων-Μοντέλων

2.1. Δεδομένα Ψηφιακής Ανακατασκευής Πυραμιδικών Κυττάρων

Οι μορφολογίες των κυττάρων που χρησιμοποιούνται είναι ανακατασκευές πραγματικών πυραμιδικών κυττάρων της στιβάδα V του προμετωπιαίου φλοιού του αρουραίου (Bergstrom HC *et al.*, 2008). Τα αρχεία που αντιπροσωπεύουν τις μορφολογίες αυτές είναι καταχωρημένα στην βάση δεδομένων του πανεπιστημίου George Mason, ΗΠΑ (www.neuromorpho.org, Smith Lab). Τα κύτταρα αυτά προέρχονται από την μελέτη των Bergstrom *et al.* 2008 (Bergstrom HC *et al.*, 2008), στην οποία εξετάζεται η επίδραση της χρόνιας χορήγησης κοκαΐνης στην μορφολογία των δενδριτικών πλεγμάτων, έφηβων (P29-43) και ενήλικων (P80-94) αρουραίων. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιούνται τα αρχεία τύπου .swc που κωδικοποιούν 56 ανακατασκευές πυραμιδικών κυττάρων, τα οποία αντιπροσωπεύουν νευρώνες και από τις δύο ηλικιακές ομάδες, στους οποίους όμως δεν έχει γίνει μεταχείριση με κοκαΐνη. Οι πυραμιδικοί νευρώνες αποκτούν την ηλεκτροφυσιολογική τους ταυτότητα μετά την δεύτερη εβδομάδα από την γέννηση (P15-21) (Molnar Z and Cheung AF, 2006). Επομένως, τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται στην μελέτη των Bergstrom *et al.* 2008 (Bergstrom HC *et al.*, 2008) είναι ήδη διαφοροποιημένα ηλεκτροφυσιολογικά, και για αυτό, σε αυτή την εργασία, αντιμετωπίζονται ως μια ενιαία αρχική ομάδα.

2.1.1 Μετατροπή των Αρχείων Τύπου .swc σε Τύπου .hoc

Σε πρώτη φάση, γίνεται μετατροπή των ψηφιακών ανακατασκευών των αρχείων τύπου .swc, και των 56 πυραμιδικών κυττάρων σε αρχεία τύπου .hoc. Χρησιμοποιείται η μέθοδος Import3D του εργαλείου Miscellaneous, του

προγράμματος NEURON Η διαδρομή είναι: NEURON Main Menu/Tools/Miscellaneous/Import 3D/choose a file/, όπου φορτώνεται το εκάστοτε αρχείο τύπου .swc. Έπεται εξαγωγή των αρχείων με export/CellBuilder/Management/Export/, όπου χρησιμοποιούνται οι παράμετροι Topology, Subset, Geometry, Membrane, και στην συνέχεια η εντολή στην ίδια καρτέλα export to file, που οδηγεί στην τελική μετατροπή και αποθήκευση σε αρχεία τύπου .hoc. Με αυτή τη διαδικασία τα αρχεία τύπου .hoc που κωδικοποιούν τις μορφολογίες των 56 κυττάρων είναι αναγνωρίσιμα από το λειτουργικό περιβάλλον NEURON.

2.1.2 Έλεγχος Μορφολογικών Ανακατασκευών

Η ακεραιότητα των μορφολογικών ανακατασκευών που αντιπροσωπεύουν τα αρχεία τύπου .hoc ελέγχεται χρησιμοποιώντας το εργαλείο Point Manager, που επιτρέπει τον έλεγχο της ακριβούς συνδεσμολογίας των ψηφιακών ανακατασκευών. Σε αυτή την περίπτωση φορτώνονται τα αρχεία τύπου .hoc με την διαδρομή NEURON Main Menu/File/load hoc. Η διαδρομή για το εργαλείο Point Manager είναι NEURON Main Menu/Tools/Point Processes/Managers/Point Manager.

2.2 Ψηφιακή Ανακατασκευή Ολοκληρωμένης Κυτταρικής Δομής

Μετά τον αρχικό έλεγχο των μορφολογικών αρχείων που ανακτήθηκαν με την προηγούμενη διαδικασία, διαπιστώνεται ότι τα 54 από τα 56 κύτταρα-μοντέλα δεν διαθέτουν μορφολογική ανακατασκευή του άξονα. Για αυτό τον λόγο στα αρχεία τύπου .hoc αυτών των κυττάρων συμπληρώνονται γραμμές κώδικα που αντιπροσωπεύουν την μορφολογία ενός τυπικού άξονα πυραμιδικών κυττάρων. Τα κύτταρα-μοντέλα επανελέγχονται για την σωστή σύνδεση όλων των τμημάτων τους, με το εργαλείο Point Manager του NEURON (βλ. 2.1.2 Έλεγχος Μορφολογικών Ανακατασκευών).

2.3 Ψηφιακή Ανακατασκευή Πυραμιδικών Κυττάρων με Σώμα Μέσου Όγκου

Αρχικά, για το σύνολο των κυττάρων βρίσκεται το κυτταρικό σώμα του οποίου ο όγκος αντιστοιχεί στον μέσο όγκο των κυτταρικών σωμάτων (κυτταρικό σώμα με όγκο $V_{L_m} = 819.2262937 \mu\text{m}^3$ του πυραμιδικού νευρώνα 35-2). Η ψηφιακή ανακατασκευή των πυραμιδικών κυττάρων με ένα σώμα μέσου όγκου γίνεται με την αντικατάσταση των γραμμών του κώδικα στα αρχεία τύπου .hoc που αντιστοιχούν στο αρχικό σώμα, με αυτές που κωδικοποιούν το σώμα με τον μέσο όγκο. Έπειτα,

ελέγχονται τα τροποποιημένα αρχεία για την σωστή ψηφιακή αναπαράσταση της μορφολογίας (βλ. 2.1.2 Έλεγχος Μορφολογικών Ανακατασκευών).

2.4 Ψηφιακή Ανακατασκευή Πυραμιδικών Κυττάρων με Σώμα Μέσου Όγκου, και με ένα «Απλό» ή ένα «Σύνθετο» Κορυφαίο Δενδριτικό Πλέγμα

Χρησιμοποιούνται τα αρχεία τύπου .hoc που κωδικοποιούν τα πυραμιδικά κύτταρα με το σώμα μέσου όγκου (βλ. 2.3. Ψηφιακή Ανακατασκευή Πυραμιδικών Κυττάρων με Σώμα Μέσου Όγκου) . Η επιλογή ενός «απλού» και ενός «σύνθετου» κορυφαίου δενδριτικού πλέγματος, γίνεται με βάση την έκταση και την μορφολογία των διακλαδώσεών τους. Ως «απλό» χαρακτηρίζεται το κορυφαίο δενδριτικό πλέγμα του πυραμιδικού κυττάρου h-2b, με 9 κορυφαίους δενδρίτες, συνολικού μήκους 810.099175μm, και 5 σημεία διακλάδωσης, Ως «σύνθετο» χαρακτηρίζεται το κορυφαίο δενδριτικό πλέγμα του πυραμιδικού κυττάρου C3_5, με 25 κορυφαίους δενδρίτες, συνολικού μήκους 1833.189498 μm, και 13 σημεία διακλάδωσης Η ψηφιακή ανακατασκευή των πυραμιδικών κυττάρων με «απλό» ή «σύνθετο» κορυφαίο δενδριτικό πλέγμα γίνεται με την αντικατάσταση των γραμμών του κώδικα στα αρχεία τύπου .hoc που αντιστοιχούν στο αρχικό κορυφαίο δενδριτικό πλέγμα, με αυτές που κωδικοποιούν απλό» ή «σύνθετο» κορυφαίο δενδριτικό πλέγμα. Έπειτα, ελέγχονται τα τροποποιημένα αρχεία για την σωστή ψηφιακή αναπαράσταση της μορφολογίας (βλ. 2.1.2 Έλεγχος Μορφολογικών Ανακατασκευών).

2.5 Υπολογισμός Μορφολογικών Παραμέτρων

Το σώμα, κάθε δενδριτικός κλάδος, και κάθε τμήμα του άξονα αντιπροσωπεύεται από ένα κυλινδρικό τμήμα στο περιβάλλον προσομοιώσεις NEURON. Επομένως, οι πληροφορίες που ανακτώνται από το πρόγραμμα είναι το μήκος L (σε μm) και η διάμετρος d (σε μm). Για τον υπολογισμό του όγκου V_{L_i} του κάθε επιμέρους τμήματος χρησιμοποιείται ο εξής τύπος:

$$V_{L_i} = \pi L_i \left(\frac{d_i}{2} \right)^2$$

όπου V_{L_i} είναι ο όγκος (σε μm^3) του τμήματος i , L_i το μήκος (σε μm) του τμήματος i , και d_i η διάμετρος (σε μm) του τμήματος i .

3. Μέσο Ηλεκτρονικό Μήκος

Το ηλεκτρονικό μήκος κάθε δενδριτικού κλάδου, προκύπτει από την κανονικοποίηση του φυσικού του μήκους L_i με την ηλεκτρονική σταθερά του δενδρίτη λ_i , που δίνεται από τον τύπο:

$$\lambda_i = \sqrt{\frac{d_i R_m}{4R_a}}$$

όπου λ_i είναι η ηλεκτρονική σταθερά του δενδρίτη i , d_i είναι η διάμετρος του δενδρίτη i , R_m είναι η αντίσταση της μεμβράνης και R_a είναι η ενδοκυτταρική αντίσταση. Το ηλεκτρονικό μήκος EL_i κάθε δενδρίτη i , δίνεται από τον τύπο:

$$EL_i = \frac{\lambda_i}{L_i}$$

όπου EL_i είναι το ηλεκτρονικό μήκος κάθε δενδρίτη i , λ_i είναι η ηλεκτρονική σταθερά του δενδρίτη i , και L_i το φυσικό μήκος κάθε δενδρίτη i . Το μέγεθος EL_i που προκύπτει είναι χωρίς διαστάσεις. Το μέσο ηλεκτρονικό μήκος MEL (Mean Electronic Length-MEL), αφορά ολόκληρο το δενδριτικό πλέγμα και είναι ο μέσος όρος των επιμέρους ηλεκτρονικών μηκών των δενδριτών του, δηλαδή:

$$MEL = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n EL_i$$

όπου MEL είναι το μέσο ηλεκτρονικό μήκος, n το σύνολο των δενδριτών i , και EL_i το ηλεκτρονικό μήκος κάθε δενδρίτη i .

4. Βιοφυσικά Χαρακτηριστικά Πυραμιδικών Κυττάρων-Μοντέλων

Τα βιοφυσικά χαρακτηριστικά που περιλαμβάνουν οι νευρώνες-μοντέλα, είναι τα τυπικά των πυραμιδικών κυττάρων της στιβάδας V του προμετωπιαίου φλοιού. Έτσι, όλα τα πυραμιδικά κύτταρα-μοντέλα έχουν την ίδια ποικιλία, ως προς τον τύπο, κατανομή και αγωγιμότητα, όλων των γνωστών παθητικών και ενεργητικών ιδιοτήτων τους (Sidirovoulou K *et al.*, submitted).

4.1 Παθητικές Ιδιότητες

Όλα τα πυραμιδικά κύτταρα-μοντέλα έχουν την ίδια ενδοκυτταρική αντίσταση είναι $R_a = 210 \Omega \cdot \text{cm}$, ειδική μεμβρανική χωρητικότητα με τιμή για το σώμα $1.2 \mu\text{F} \cdot \text{cm}^{-2}$, και για τους δενδρίτες $2.0 \mu\text{F} \cdot \text{cm}^{-2}$. Η αντίσταση της μεμβράνης R_m , δεν είναι ομοιόμορφη, αλλά ειδική για κάθε επιμέρους δενδρίτη. Το δυναμικό ηρεμίας για όλους τους νευρώνες είναι στα -66 mV .

4.2 Ενεργητικές Ιδιότητες

Οι ενεργητικές ιδιότητες των πυραμιδικών κυττάρων-μοντέλων περιλαμβάνουν τις εξής: δύο τύπους ρευμάτων Na^+ τύπου Hodgkin–Huxley (παροδικό: I_{Naf} , και συνεχές I_{Nap}), τρία τασοεξαρτώμενα ρεύματα K^+ (I_{Kdr} , I_A , I_D), ένα ταχύ Ca^{++} και τασοεξαρτώμενο ρεύμα K^+ (I_{fAHP}), ένα αργό εξαρτώμενο από Ca^{++} ρεύμα K^+ (I_{sAHP}), ένα ενεργοποιούμενο από υπερπόλωση μη ειδικό κατιοντικό ρεύμα (I_h), ένα χαμηλού-τάσης ενεργοποιούμενου ρεύμα Ca^{++} (I_{CaT}), τρεις τύπους ρευμάτων Ca^{++} και τασοεξαρτώμενων ρευμάτων Ca^{++} (I_{CaN} ; I_{CaR} ; I_{CaL}), και το εξαρτώμενο από Ca^{++} μη επιλεκτικό κατιοντικό ρεύμα (CAN). Οι μαθηματικές εξισώσεις που ορίζουν τα διαφορετικά τασοεξαρτώμενα ρεύματα ασβεστίου (I_{CaN} ; I_{CaR} ; I_{CaL} , I_{CaT}). , I_{sAHP} , I_A και I_h είναι αυτές που περιγράφονται από τους Poirazi *et al.*, 2003 (Poirazi P *et al.*, 2003). Οι μαθηματικές εξισώσεις που ορίζουν τα I_{Kdr} , I_D , I_{fAHP} , I_{Nap} και I_{Naf} είναι αυτές που περιγράφονται από τους Durstewitz and Gabriel, 2007 (Durstewitz D and Gabriel T, 2007). Επιπλέον, περιλαμβάνονται τέσσερα συναπτικά ρεύματα τα: AMPA, NMDA, GABA-A and GABA-B, με τις εξισώσεις τους να περιγράφονται από τους Poirazi *et al.*, 2003 (Poirazi P *et al.*, 2003).

5. Πρωτόκολλα Διέγερσης

Για την διέγερση των πυραμιδικών κυττάρων και την καταγραφή των δυναμικών ενεργείας τους ακολουθούνται δύο πρωτόκολλα, τα οποία τροποποιούνται σύμφωνα με τις ανάγκες τις κάθε πειραματικής διαδικασίας. Τα πρωτόκολλα αυτά είναι η προσομοίωση τεχνικής καθήλωσης σταθερού ρεύματος, και η προσομοίωση συναπτικής διέγερσης. Οι προσομοιώσεις γίνονται στο περιβάλλον του NEURON, και εκτελούνται σε διακομιστή Xeon. Η επεξεργασία των κυματομορφών γίνεται σε περιβάλλον IgorPro (Wavemetrics, Inc.) ή σε περιβάλλον Matlab (MathWorks, Inc).

5.1 Προσομοίωση Τεχνικής Καθήλωσης Σταθερού Ρεύματος

Στο περιβάλλον NEURON η προσομοίωση τεχνικής καθήλωσης σταθερού ρεύματος αντιστοιχεί στην διεργασία IClamp. Κατά την διαδικασία αυτή προσομοιώνεται η εισαγωγή ενός ηλεκτροδίου στο μέσο του σώματος, και την καταγραφή της ηλεκτρικής δραστηριότητας των νευρώνων ανάλογη της παροχής διαφόρων ερεθισμάτων ρεύματος. Τα ορίσματα της διεργασίας IClamp είναι τα εξής: (1) del , που ορίζει το χρονικό σημείο της εισαγωγής ρεύματος, αναφορικά με την μηδενική στιγμή έναρξης του πειράματος, (2) dur , που ορίζει την χρονική διάρκεια του ερεθίσματος, και (3) amp , που ορίζει το πλάτος του ερεθίσματος. Σε όλες τις προσομοιώσεις τεχνικής καθήλωσης σταθερού ρεύματος, οι τιμές των ορισμάτων της διεργασίας IClamp είναι $del=100ms$, $dur=500ms$ ενώ το amp διαφέρει ανάλογα με το πειραματική διαδικασία.

5.1.1 Καταγραφή Σχεδίων Εκφόρτισης Πυραμιδικών Κυττάρων με την Φυσιολογική τους Μορφολογία

Μετά την ψηφιακή ανακατασκευή της ολοκληρωμένης κυτταρικής δομής των πυραμιδικών κυττάρων-μοντέλων (βλ. 2.2. Ψηφιακή Ανακατασκευή Ολοκληρωμένης Κυτταρικής Δομής) καταγράφεται η μεταβολή στο δυναμικό μεμβράνης τους, χρησιμοποιώντας την διεργασία IClamp με το όρισμα amp να κυμαίνεται με διαδοχικά βήματα της τάξης $0.05nA$, από $-0.2nA$ έως $0.2nA$ (ή μέχρι να δημιουργηθεί δυναμικό ενεργείας).

5.1.2 Καταγραφή Σχεδίων Εκφόρτισης Πυραμιδικών Κυττάρων σε Διάφορες Τιμές της Αγωγιμότητας των Ca^{++} εξαρτώμενων διαύλων K^+

Για την εξέταση της επίδρασης της αγωγιμότητας των ενεργοποιούμενων από Ca^{++} διαύλων K^+ , χρησιμοποιούνται τα πυραμιδικά κύτταρα-μοντέλα με φυσιολογική μορφολογία (βλ. 2.2. Ψηφιακή Ανακατασκευή Ολοκληρωμένης Κυτταρικής Δομής) και καταγράφεται η μεταβολή στο δυναμικό μεμβράνης τους, χρησιμοποιώντας την διεργασία IClamp με το όρισμα amp να κυμαίνεται από $0.1nA$ μέχρι να δημιουργηθεί δυναμικό ενεργείας. Η καταγραφή γίνεται με μειωμένη αγωγιμότητα κατά 10 φορές, κατά το 1/3 και κατά το ήμισυ.

5.1.3 Καταγραφή Σχεδίων Εκφόρτισης Πυραμιδικών Κυττάρων με Σώμα Μέσου

Όγκου

Μετά την ψηφιακή ανακατασκευή της κυτταρικής δομής των πυραμιδικών κυττάρων-μοντέλων με ένα σώμα μέσου όγκου (βλ. 2.3 Ψηφιακή Ανακατασκευή Πυραμιδικών Κυττάρων με Σώμα Μέσου Όγκου) καταγράφεται η μεταβολή στο δυναμικό μεμβράνης τους, χρησιμοποιώντας την διεργασία IClamp με το όρισμα amp να κυμαίνεται με διαδοχικά βήματα της τάξης 0.05nA, από 0.1nA έως 0.2nA(ή μέχρι να δημιουργηθεί δυναμικό ενεργείας).

5.1.4 Καταγραφή Σχεδίων Εκφόρτισης Πυραμιδικών Κυττάρων με Σώμα Μέσου Όγκου, και με ένα «Απλό» ή ένα «Σύνθετο» Κορυφαίο Δενδριτικό Πλέγμα

Μετά την ψηφιακή ανακατασκευή της κυτταρικής δομής των πυραμιδικών κυττάρων-μοντέλων με ένα σώμα μέσου όγκου, και με ένα «απλό» ή ένα «σύνθετο» κορυφαίο δενδριτικό πλέγμα (βλ. 2.4. Ψηφιακή Ανακατασκευή Πυραμιδικών Κυττάρων με Σώμα Μέσου Όγκου, και με ένα «Απλό» ή ένα «Σύνθετο» Κορυφαίο Δενδριτικό Πλέγμα) καταγράφεται η μεταβολή στο δυναμικό μεμβράνης τους, χρησιμοποιώντας την διεργασία IClamp με το όρισμα amp να κυμαίνεται με διαδοχικά βήματα της τάξης 0.05nA, από 0.1nA έως 0.4nA.

5.1.5 Καταγραφή του Ρεύματος των Ca^{++} εξαρτώμενων διαύλων K^{+}

Χρησιμοποιούνται τα πυραμιδικά κύτταρα-μοντέλα με ένα σώμα μέσου όγκου (βλ. 2.3 Ψηφιακή Ανακατασκευή Πυραμιδικών Κυττάρων με Σώμα Μέσου Όγκου) και καταγράφεται το ρεύμα που άγεται από τους των Ca^{++} εξαρτώμενους διαύλους K^{+} , χρησιμοποιώντας την διεργασία IClamp με το όρισμα amp=0.1nA και με μειωμένη την αγωγιμότητα των ενεργοποιούμενων από Ca^{++} διαύλων K^{+} κατά 10 φορές. Τα δεδομένα επεξεργάζονται σε περιβάλλον Matlab (MathWorks, Inc) όπου υπολογίζεται η μέγιστη τιμή του ρεύματος που άγουν αυτοί οι διάυλοι.

5.2 Προσομοίωση Συναπτικής Διέγερσης

Στο πρωτόκολλο (Poirazi P *et al.*, 2003) της προσομοίωσης συναπτικής διέγερσης, που εφαρμόζεται, χρησιμοποιούνται τα πυραμιδικά κύτταρα-μοντέλα με σώμα μέσου όγκου, και με ένα «απλό» κορυφαίο δενδριτικό πλέγμα. Η προσομοίωση συναπτικής διέγερσης αφορά μόνο τους βασικούς δενδρίτες και καταγράφονται τα σωματικά δυναμικά ενεργείας. Η διέγερση γίνεται με ταυτόχρονη ενεργοποίηση διαφορετικού αριθμού συνάψεων (από 15 έως 45, προσθέτοντας 5 συνάψεις κάθε

φορά), με τυχαία επιλογή βασικών δενδριτών για 10 επαναλήψεις. Το ερέθισμα που δίνεται είναι 2 παλμοί στα 50Hz. Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιείται για αναλογία ρευμάτων iNMDA προς iAMPA 1:1 και 2:1.

5.3 Κατηγοριοποίηση Σχεδίων Εκφόρτισης

Η κατηγοριοποίηση των σχεδίων εκφόρτισης των πυραμιδικών κυττάρων, που παράγονται από τα πρωτόκολλα διέγερσης, βασίζεται στην κατηγοριοποίηση των Yang *et al.*, 1996 (Yang CR *et al.*, 1996). Ορίζονται τέσσερις ηλεκτροφυσιολογικές κατηγορίες, με τις ακόλουθες αντιστοιχίες στην ηλεκτροφυσιολογική κατηγοριοποίηση κατά Yang *et al.*, 1996 (Yang CR *et al.*, 1996): (1) RS1 (Regular Spiking 1-RS1), που αντιστοιχεί στην κατηγορία RS, (2) RS2 (Regular Spiking 2-RS2), που αντιστοιχεί στην κατηγορία IM, (3) IB (Intrinsic Bursting-IB) που αντιστοιχεί στην κατηγορία IB, και (4) OB (Oscillatory Bursting-OB), που αντιστοιχεί στην κατηγορία ROB (βλ. Εισαγωγή, 2.4 Σχέδια Εκφόρτισης)

6. Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων γίνεται, είτε με την βοήθεια του λογισμικού R (R Development Core Team, 2010), είτε με το λογισμικό Matlab (MathWorks, Inc), είτε με το πρόγραμμα Microsoft Excel (Microsoft, Co),

6.1 Ανάλυση Διακύμανσης

Η Ανάλυση διακύμανσης αποτελεί μέθοδο ανάλυσης δεδομένων, η οποία χρησιμοποιείται για τη σύγκριση των μέσων πολλών πληθυσμών. Βασίζεται στην σύγκριση μεταβλητότητας τόσο μεταξύ των πληθυσμών, όσο και στο εσωτερικό των πληθυσμών. Αν η μεταβλητότητα μεταξύ των πληθυσμών είναι περίπου ίση με τη μεταβλητότητα στο εσωτερικό των πληθυσμών, τότε γίνεται η παραδοχή της υπόθεσης, ότι δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ των μέσων των πληθυσμών. Αν η μεταβλητότητα μεταξύ των πληθυσμών είναι μεγαλύτερη από τη μεταβλητότητα στο εσωτερικό των πληθυσμών, τότε γίνεται η παραδοχή της υπόθεσης, ότι οι μέσοι των πληθυσμών είναι διάφοροι μεταξύ τους.

Πριν την ανάλυση της διακύμανσης, εφαρμόζεται ο έλεγχος καλής προσαρμογής Kolmogorov-Smirnov, για να διαπιστωθεί, αν οι κατανομές των δεδομένων είναι συμβατές με την κανονική. Τα αποτελέσματα δείχνουν μη κανονική κατανομή των πληθυσμών των δεδομένων, οπότε ακολουθείται η μη παραμετρική ανάλυση διακύμανσης Kruskal-Wallis. Και οι δυο αναλύσεις πραγματοποιούνται στο

λογισμικό περιβάλλον R (R Development Core Team, 2010). Οι εντολές που εφαρμόζονται είναι η `ks.test`, για τον έλεγχο Kolmogorov-Smirnov, και η `kruskal.test`, για τον έλεγχο Kruskal-Wallis.

6.2 Δοκιμασία t

Ο έλεγχος t είναι μια στατιστική δοκιμασία σημαντικότητας, που εξετάζει αν δύο δείγματα δεδομένων είναι δυνατό να προέρχονται από τον ίδιο πληθυσμό και αν υπάρχει ισότητα ανάμεσα στις μέσες τιμές τους. Η δοκιμασία t πραγματοποιείται με την βοήθεια του προγράμματος Microsoft Excel (Microsoft, Co). Η εντολή που αντιστοιχεί στην δοκιμασία t είναι η `TTEST` και τα ορίσματα της είναι τα εξής: (1) `Array1`, που είναι η πρώτη σειρά δεδομένων που εξετάζονται, (2) `Array2`, που είναι η δεύτερη σειρά δεδομένων που εξετάζονται, (3) `Tails`, που καθορίζει αν η κατανομή θα είναι μονόπλευρη ή δίπλευρη, και (4) `Type`, που ορίζει το είδος της δοκιμασίας t. Στην παρούσα μελέτη, οι τιμές είναι για το όρισμα `Tails=2`, που αντιστοιχεί σε δίπλευρη κατανομή, και για το όρισμα `Type=3`, που αντιστοιχεί σε δείγματα με άνιση διακύμανση.

6.3 Ομαδοποίηση Δεδομένων

Για την ομαδοποίηση των δεδομένων και την εύρεση των πιθανών συσχετισμών τους χρησιμοποιούνται δύο μέθοδοι, τα δένδρογράμματα και η τιμή k-μέσης τιμής. Και οι δύο αναλύσεις πραγματοποιούνται στο λειτουργικό περιβάλλον Matlab (MathWorks, Inc).

6.3.1 Δενδρογράμματα

Τα δενδρογράμματα είναι το αποτέλεσμα της ιεραρχικής κατάταξης μιας σειράς δεδομένων σε ομάδες. Κάθε ομάδα, και η συσχέτιση της με τις υπόλοιπες, απεικονίζεται υπό την μορφή ενός γραμμικού πολυκλαδικού διαγράμματος. Η ιεράρχηση είναι πολυεπίπεδη, με τις ομάδες του ενός επιπέδου, να ενοποιούνται σε μία μεγαλύτερη ομάδα στο αμέσως επόμενο επίπεδο. Το ύψος, στο οποίο έχει γίνει η σύνδεση μεταξύ δύο ομάδων, αντιπροσωπεύει και την μεταξύ τους απόσταση. Έτσι, ο κατάλληλος βαθμός ομαδοποίησης μπορεί να αποφασιστεί ανάλογα με το υπό εξέταση ζήτημα.

6.3.1.1 Κανονικοποίηση Δεδομένων

Η μεγάλη διαφορά στην τάξη μεγέθους των απόλυτων τιμών των δεδομένων επιβάλλει την αναγωγή τους σε κοινή κλίμακα, για την καλύτερη σύγκριση τους. Γι

αυτό τον λόγο, πριν την ομαδοποίηση των δεδομένων, με την ανάλυση των δενδρογραμμάτων γίνεται κανονικοποίηση τους σε κλίμακα 0-1, με την παρακάτω μέθοδο:

$$v' = \frac{v - \min_a}{\max_a - \min_a}$$

όπου v' είναι η τιμή του δεδομένου μετά την κανονικοποίηση, v είναι η τιμή του δεδομένου πριν την κανονικοποίηση, \min_a είναι η ελάχιστη τιμή του πληθυσμού που ανήκει το δεδομένο, και \max_a είναι η μέγιστη τιμή του πληθυσμού που ανήκει το δεδομένο.

6.3.1.2 Κατασκευή Δενδρογραμμάτων

Στο περιβάλλον της Matlab (MathWorks, Inc), τα δενδρογράμματα παράγονται από την στατιστική λειτουργία dendrogram. Τα ορίσματα της λειτουργίας dendrogram είναι τα εξής: (1) pdist, που υπολογίζει την μαθηματική απόσταση μεταξύ των δεδομένων που εισάγονται για ομαδοποίηση και, (2) linkage, που δημιουργεί το δενδρόγραμμα, σύμφωνα με τα δεδομένα που παράγει το όρισμα pdist. Στην παρούσα μελέτη, οι τιμές της λειτουργίας dendrogram που χρησιμοποιούνται είναι για το όρισμα pdist, η μέθοδος euclidean, που υπολογίζει την ευκλείδεια απόσταση μεταξύ των δεδομένων, και για το όρισμα linkage, η μέθοδος single, που κατασκευάζει ένα δενδρόγραμμα με βάση την μικρότερη απόσταση των δεδομένων που παράγει το όρισμα pdist.

6.3.2 Αλγόριθμος k-μέσης τιμής

Ο αλγόριθμος k-μέσης τιμής είναι μία διαιρετική μέθοδος ομαδοποίησης, που σε αντίθεση με την ιεραρχική κατάταξη, η ομαδοποίηση των δεδομένων γίνεται σε ένα μόνο επίπεδο ομάδων. Κατά αυτή την κατάταξη, οι παρατηρήσεις των δεδομένων αντιμετωπίζονται σαν διανύσματα που δημιουργούν ένα χώρο, και διαχωρίζονται κατά τρόπο τέτοιο, ώστε τα δεδομένα της μίας ομάδας να είναι όσο πιο κοντά γίνεται μεταξύ τους. και όσο πιο μακριά γίνεται από τα δεδομένα των άλλων ομάδων. Αρχικά, γίνεται ο διαχωρισμός σε k σύνολα, που ο αριθμός τους ορίζεται από πριν. είτε τυχαία είτε χρησιμοποιώντας στοχαστικά δεδομένα. Στη συνέχεια υπολογίζεται το μεσαίο ή το κεντροειδές του κάθε συνόλου, και υλοποιείται νέος διαχωρισμός, ώστε το κάθε σημείο να σχετίζεται με το κοντινότερο κεντροειδές. Έπειτα, τα κεντροειδή επαναυπολογίζονται για τις νέες ομάδες, και επαναλαμβάνονται τα δυο

βήματα, ωστόσο τα σημεία δεν μπορούν να αλλάξουν ομάδες (ή εναλλακτικά τα κεντροειδή παραμένουν αμετάβλητα). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης με τον αλγόριθμο k-μέσης τιμής, μπορούν να απεικονιστούν με το διάγραμμα silhouette. Το διάγραμμα χρησιμοποιεί μια ένα εύρος τιμών από -1 έως +1, με τις οποίες χαρακτηρίζει πόσο κοντά είναι ένα δεδομένο στην ομάδα που έχει ομαδοποιηθεί. Έτσι, δεδομένα με τιμές κοντά στο +1, απέχουν πολύ από τις γειτονικές ομάδες, δεδομένα με τιμές κοντά στο 0, δεν μπορούν να καταταχθούν με ακρίβεια στην μία ή στην άλλη ομάδα, και δεδομένα με τιμές κοντά στο -1, είναι πιθανόν να έχουν καταταχθεί στην λάθος ομάδα.

Στο περιβάλλον της Matlab (MathWorks, Inc), ο αλγόριθμος k-μέσης τιμής παράγεται από την στατιστική λειτουργία kmeans. Τα ορίσματα της λειτουργίας kmeans είναι τα εξής: (1) k, που ορίζει τον αρχικό αριθμό των ομάδων, και (2) distance, που ορίζει τον τρόπο που θα υπολογιστεί η απόσταση των διανυσμάτων των δεδομένων στον χώρο. Στην παρούσα μελέτη, οι τιμές της λειτουργίας kmeans που χρησιμοποιούνται είναι για το όρισμα k, 2,3,4,5,6,7, διαδοχικά, και για το όρισμα distance, η μέθοδος sqEuclidean, που υπολογίζει το τετράγωνο της ευκλείδειας απόστασης, με κάθε κεντροειδές να είναι η μέση τιμή των σημείων κάθε ομάδας. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης, απεικονίζονται διαγραμματικά με την χρήση της εντολής silhouette. Τα ορίσματα της λειτουργίας silhouette είναι τα εξής: (1) X, που ορίζει τα δεδομένα προς ομαδοποίηση, (2) clust, που ορίζει την μέθοδο ομαδοποίησης και (3) distance, που ορίζει την μέτρηση απόστασης που χρησιμοποιείται για την ομαδοποίηση. Στην παρούσα μελέτη, οι τιμές της λειτουργίας silhouette για το όρισμα X, είναι τα υπό εξέταση δεδομένα, για το όρισμα clust, είναι η λειτουργία kmeans, και για το όρισμα distance, η μέθοδος sqEuclidean, που υπολογίζει το τετράγωνο της ευκλείδειας απόστασης.

Αποτελέσματα

III. Αποτελέσματα

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιούνται 56 ψηφιακά ανακατασκευασμένοι πυραμιδικοί νευρώνες της στιβάδας V, που προέρχονται από τον mPFC του αρουραίου (Bergstrom HC *et al.*, 2008). Στην πλειονότητα των ψηφιακών αναπαραστάσεων των νευρώνων, δεν έχει ανακατασκευαστεί το αξονικό τμήμα του κυττάρου. Για την καλύτερη δυνατή προσομοίωση των πυραμιδικών νευρώνων, προστίθεται ο ίδιος άξονας, που προέρχεται από έναν νευρώνα της ομάδας των 56 πυραμιδικών κυττάρων. Μετά και από αυτή την προσθήκη, επανεξετάζονται οι καινούργιες ψηφιακές αναπαραστάσεις για όλα τους νευρώνες, και αφού επιβεβαιώνεται η σωστή συνδεσμολογία όλων των κυτταρικών τμημάτων μεταξύ τους, ακολουθεί η πειραματική διαδικασία, που χωρίζεται σε δύο φάσεις. Τα νευρικά κύτταρα, ανάλογα με τις ανάγκες του κάθε πειράματος, ενεργοποιούνται είτε στο σώμα με προσομοίωση τεχνικής καθήλωσης σταθερού ρεύματος, είτε κατά μήκος του βασικού δενδριτικού πλέγματος με τυχαία προσομοίωση συναπτικού σήματος. Η προπαρασκευαστική φάση είναι λεπτομερής περιγραφή των επιμέρους μορφολογικών χαρακτηριστικών των νευρώνων και συσχετισμός τους, με τα σχέδια εκφόρτισης τους, εφαρμόζοντας προσομοίωση τεχνικής καθήλωσης σταθερού ρεύματος. Στην επόμενη φάση, εξετάζονται κάποια χαρακτηριστικά της εκπόλωσης που προκαλείται από την ενεργοποίηση των συναπτικών μηχανισμών (AMPA και NMDA υποδοχείς), τοπικά στους δενδρίτες, στα βασικά δενδριτικά πλέγματα, εφαρμόζοντας τυχαία προσομοίωση συναπτικού σήματος.

1. Μορφολογική Ανάλυση και Μελέτη Σχεδίων Εκφόρτισης

Για την μελέτη της επίδρασης της μορφολογίας στα σχέδια πυροδότησης, κρίνεται αναγκαίο να εξεταστεί η επίδραση κάθε επιμέρους διαμερίσματος του κυττάρου ξεχωριστά. Αρχικά, αναλύεται η επίδραση την μορφολογικών χαρακτηριστικών του σώματος, και έπειτα των δενδριτικών πλεγμάτων. Η ανάλυση, δεν περιλαμβάνει και τον άξονα των κυττάρων, καθότι είναι ο ίδιος στην συντριπτική πλειοψηφία, οπότε θεωρείται, ότι η οποιαδήποτε ενδεχόμενη επίδραση του θα είναι όμοια για όλα τα κύτταρα.

1.1 Καταγραφή Μορφολογικών Χαρακτηριστικών και Σχεδίων Εκφόρτισης

Τα πυραμιδικά κύτταρα αναλύονται λεπτομερώς για τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των επιμέρους τμημάτων τους. Έτσι, για το καθένα από αυτά καταγράφονται, το μήκος και η διάμετρος του σώματος, το μήκος και η διάμετρος του κάθε δενδρίτη, και υπολογίζεται το συνολικό δενδριτικό μήκος, τόσο στο κορυφαίο, όσο και στο βασικό δενδριτικό πλέγμα. Με βάση, αυτά υπολογίζεται το εμβαδόν της επιφάνειας του σώματος και του κάθε δενδρίτη, αλλά και το συνολικό εμβαδό των κορυφαίων και βασικών δενδριτικών πλεγμάτων, για τον κάθε νευρώνα (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, 2.5 Υπολογισμός Μορφολογικών Παραμέτρων). Στα δενδριτικά πλέγματα καταγράφονται, επιπλέον, ο συνολικός αριθμός των σημείων διακλάδωσης των δενδριτικών κλάδων, αλλά και η συγκεκριμένη συνδεσμολογία του κάθε δενδριτικού πλέγματος. Έτσι, ο κάθε δενδρίτης κατατάσσεται ανάλογα με την τάξη του σημείου διακλάδωσης, από όπου εκφύεται. Αν εκφύεται απευθείας από το σώμα χαρακτηρίζεται πρωτοταγής. Ένας πρωτοταγής δενδρίτης διακλαδίζεται σε δύο δευτεροταγείς, κάθε δευτεροταγής σε δύο τριτοταγείς και ούτω κάθε εξής. Επίσης, καταγράφεται και η απόσταση από το σώμα για κάθε δενδρίτη. Απόρροια αυτής της ανάλυσης είναι η δημιουργία μιας βάσης μορφολογικών δεδομένων, απαραίτητη για την διεξαγωγή της υπόλοιπης μελέτης (βλ. Πίνακας 1, Πίνακας 3 και Παράρτημα).

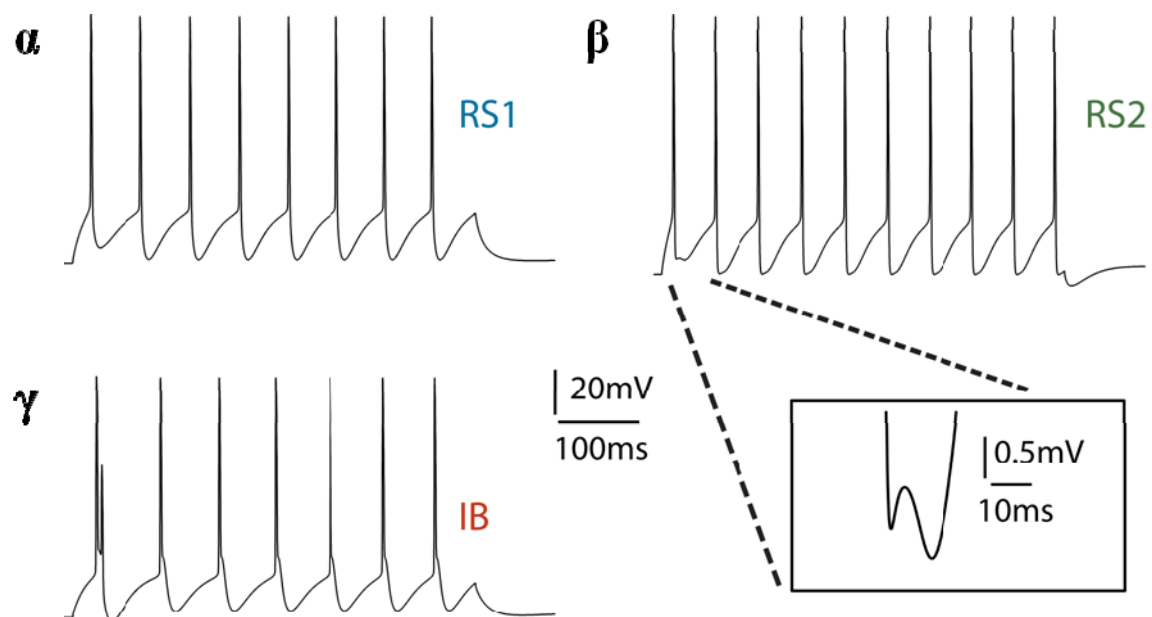
<i>Πυραμιδικό κύτταρο</i>	<i>Μήκος σώματος(μm)</i>	<i>Διάμετρος σώματος(μm)</i>	<i>Σημεία διακλάδωσης βασικού δενδριτικού πλέγματος</i>	<i>Συνολικό μήκος δενδριτών βασικού δενδριτικού πλέγματος(μm)</i>	<i>Σημεία διακλάδωσης κορυφαίου δενδριτικού πλέγματος</i>	<i>Συνολικό μήκος δενδριτών κορυφαίου δενδριτικού πλέγματος(μm)</i>
<i>0-2</i>	11.59	11.85	12	1285.15	6	843.75
<i>0-2a</i>	12.39	9.90	14	1519.03	5	776.77
<i>0-2b</i>	8.69	9.77	16	1436.05	9	1203.06
<i>0-2c</i>	10.69	8.09	15	1565.07	7	1029.74
<i>30-3</i>	15.66	9.61	20	1474.98	10	779.23
<i>30-3a</i>	9.07	7.85	13	900.05	5	697.22
<i>30-3b</i>	70.87	10.95	11	982.95	6	931.51
<i>33-3</i>	13.69	11.12	19	1678.99	6	812.74
<i>35-2</i>	8.94	10.80	24	1663.20	6	1025.88
<i>35-3</i>	9.46	9.30	18	1359.91	7	728.05
<i>35-3a</i>	9.85	8.68	22	1520.29	6	785.07
<i>36-4</i>	9.19	11.98	19	1516.94	1	500.11
<i>36-4a</i>	12.39	9.60	20	1886.84	7	1154.74
<i>36-4b</i>	12.90	10.47	24	1800.77	12	1392.82
<i>37-3</i>	13.21	11.41	17	2220.95	11	1475.55
<i>37-4</i>	11.17	9.51	13	1242.18	10	1437.46
<i>37-4a</i>	10.41	9.88	21	1590.78	8	861.59

39-4a	8.80	8.28	15	1629.89	9	1703.11
39-5	8.49	10.02	14	1604.45	5	684.03
45-3	10.27	10.04	21	2721.07	11	1459.62
45-3a	13.73	9.43	14	1380.98	7	1009.57
45-4	8.66	8.08	10	1138.63	7	828.34
47-2a	10.90	11.23	8	958.09	10	1258.51
47-2b	9.78	8.89	11	1146.26	6	812.67
47-3-hf	9.15	10.64	27	2601.08	6	1077.40
48-3a	20.03	10.67	8	509.91	4	650.32
48-3b	9.86	7.66	10	925.32	7	679.25
48-3c	11.58	10.30	18	1316.03	2	272.14
48-3d	9.06	7.96	19	1751.44	12	1177.54
48-4	16.80	9.96	14	913.67	7	824.29
A5-1B2	15.83	10.42	18	1564.46	7	1139.95
C3_4	12.41	12.07	15	1000.05	15	1585.65
C3_5	10.63	11.27	12	1065.02	13	1833.19
C3_6	14.21	10.94	16	1994.43	2	383.11
G3-1B2	16.78	11.14	16	1456.77	8	1036.42
G4_1	14.70	11.21	14	995.26	12	1450.56
G4_2	10.41	7.49	15	1364.63	14	1511.49
h-2	8.89	8.22	8	651.38	5	810.10
h-2a	11.15	7.70	15	1633.43	7	745.79
h-2b	14.09	6.58	12	1146.84	10	1690.22
H2-3	9.25	10.15	13	1292.77	13	1646.94
j-2	9.87	6.99	16	1371.55	10	1057.84
j-3	10.08	8.07	21	2204.32	5	953.52
j-3a	15.33	9.32	15	1688.67	6	951.11
J3	15.00	13.38	8	864.08	4	919.82
L-2	10.23	8.74	24	2071.41	8	1035.17
L-2a	10.48	10.88	15	1129.50	3	459.13
L-2b	12.43	10.27	12	941.91	8	666.54
n-3	9.29	11.22	13	1268.45	8	1019.95
n-3a	13.51	9.29	16	1267.31	7	912.47
n-3b	11.35	8.75	8	644.37	9	1244.77
q-3	9.58	7.49	13	1018.80	2	309.36
q-3a	8.43	7.34	9	804.42	7	952.98
q-3b	9.75	9.50	13	1458.43	2	626.98
q-4	19.34	13.01	10	1416.27	10	491.68
q-4a	14.70	11.21	9	644.34	9	1150.04

Πίνακας 1 Συγκεντρωτικός πίνακας μορφολογικών χαρακτηριστικών. Παρουσίαση των κυριότερων μορφολογικών χαρακτηριστικών για κάθε πυραμιδικό κύτταρο

Επόμενο, βήμα μετά την μορφολογική ανάλυση είναι η ταξινόμηση των πυραμιδικών κυττάρων με βάση το σχέδιο εκφόρτισης τους. Για το σκοπό εφαρμόζεται προσομοίωση τεχνικής καθήλωσης σταθερού ρεύματος (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, 5.1.1 Καταγραφή Σχεδίων Εκφόρτισης Πυραμιδικών Κυττάρων με την

Φυσιολογική τους Μορφολογία). Παρατηρείται να χωρίζονται τα κύτταρα σε τρεις πληθυσμούς, RS1 (n=52), RS2 (n=3) και IB (n=1) (βλ. Εικόνα 1 και Πίνακας 2), δεδομένα που συμφωνούν, αλλά όχι στο ποσοστά τους, με την μελέτη των Yang *et al*, 1996 (Yang CR *et al.*, 1996) (βλ. Εισαγωγή, Εικόνα 5, και Υλικά και Μέθοδοι, 5.3 Κατηγοριοποίηση Σχεδίων Εκφόρτισης). Με τις παραπάνω πειραματικές διαδικασίες, δίδεται μια πρώτη εικόνα για τα μορφολογικά και ηλεκτροφυσιολογικά χαρακτηριστικά των πυραμιδικών κυττάρων που μελετούνται.



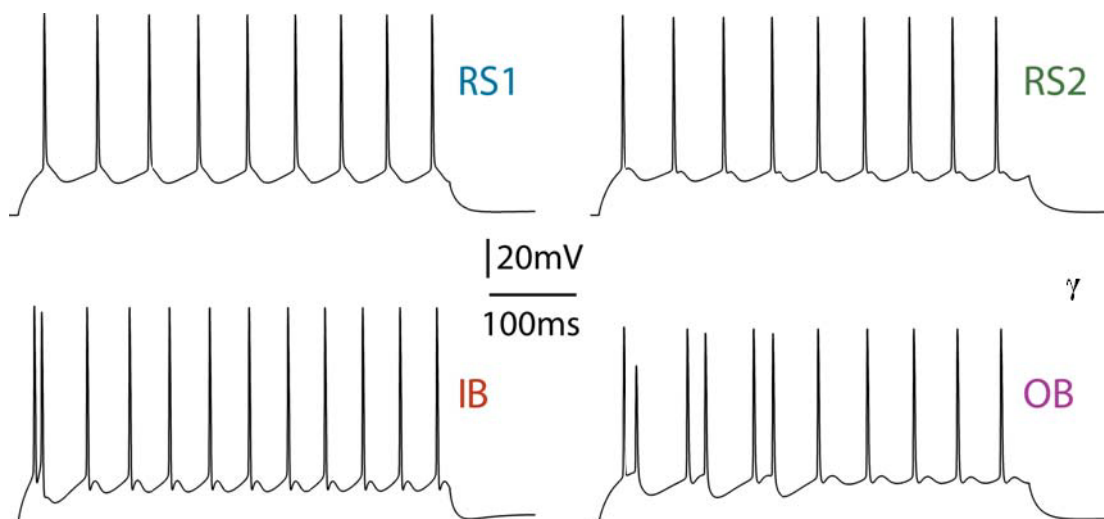
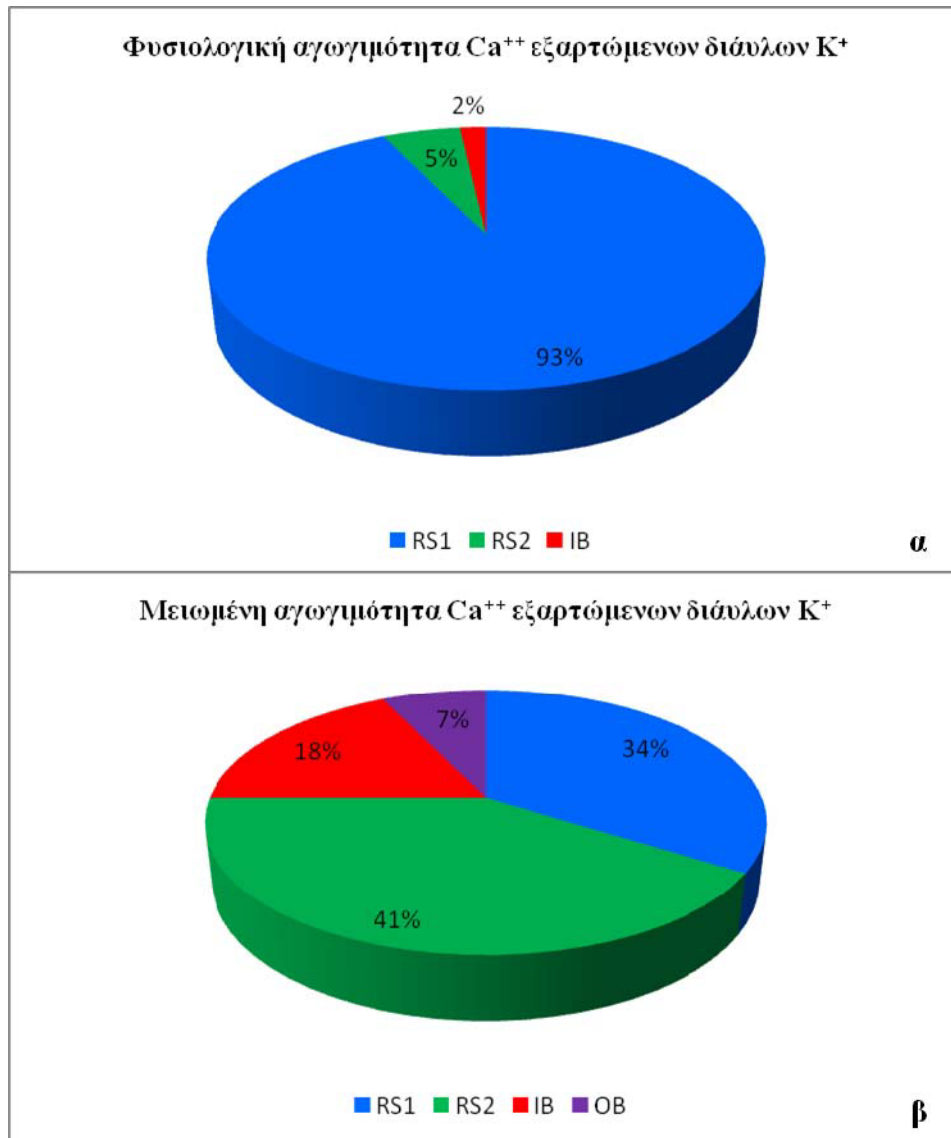
Εικόνα 6 Φυσικά σχέδια εκφόρτισης των πυραμιδικών κυττάρων. (α) Κυματομορφή σχεδίου εκφόρτισης RS1 (πυραμιδικό κύτταρο 0-2a) (β) Κυματομορφή σχεδίου εκφόρτισης RS2. (πυραμιδικό κύτταρο 48-3a). Στην παράθεση, απεικονίζεται η μεθεκπόλωση (γ) Κυματομορφή σχεδίου εκφόρτισης IB (πυραμιδικό κύτταρο C3_4) (RS1: Regular Spiking 1, RS2: Regular Spiking 2, IB: Intrinsic Bursting)

1.2 Επίδραση των Ca^{++} εξαρτώμενων διαύλων K^+ στα Σχέδια Εκφόρτισης

Κατά την διάρκεια ενός δυναμικού ενεργείας, ανοίγουν διάφορα τασοεξαρτώμενα κανάλια, μεταξύ αυτών και Ca^{++} εξαρτώμενα κανάλια K^+ , τα οποία ενεργοποιούνται λόγω της εισροής ιόντων Ca^{++} . Συνέπεια αυτού, είναι να ακολουθεί την εκπόλωση του δυναμικού ενεργείας, μια υπερπόλωση (μεθυπερπόλωση, After Hyperpolarization-AHP) της κυτταρικής μεμβράνης, που καθιστά λιγότερο πιθανή την δημιουργία ενός νέου δυναμικού ενεργείας. Ανάλογα με την χρονική διάρκεια της μεθυπερπόλωσης, διακρίνεται σε: (1) γρήγορη (fast-Hyperpolarization-fAHP), (2) μεσαία (medium-Hyperpolarization-mAHP), και (3) αργή (slow-Hyperpolarization-

sAHP). Στα νευρικά κύτταρα εντοπίζονται Ca^{++} εξαρτώμενα κανάλια K^+ που ελέγχουν και την διάρκεια της μεθυπερπόλωσης. Τα κανάλια αυτά διακρίνονται, ανάλογα με την αγωγιμότητα τους στα ιόντα K^+ σε 2 τύπους, στα: (1) BK κανάλια, με μεγάλη αγωγιμότητα, και (2) SK κανάλια με μικρή αγωγιμότητα. Οι διάλυτοι BK ελέγχουν την fAHP (Cui J *et al.*, 2009), ενώ οι διάλυτοι SK την sAHP (Weatherall KL *et al.*, 2010).

Η αρχική μορφολογική και ηλεκτροφυσιολογική ανάλυση των υπό εξέταση πυραμιδικών κυττάρων, δεν αποδίδει κάποια άμεση συσχέτιση, μεταξύ μορφολογίας και σχεδίου εκφόρτισης, λόγω της δημιουργίας μιας μεγάλης ομάδας που περιλαμβάνει κύτταρα με σχέδιο εκφόρτισης RS1 (n=52), και την μικρή ή καθόλου αντιπροσώπευση των άλλων ηλεκτροφυσιολογικών ομάδων (RS2 (n=3) και IB (n=1)) (βλ. Πίνακας 2). Γι αυτό ακολουθεί πειραματισμός, αλλάζοντας τις ενεργητικές ιδιότητες των πυραμιδικών νευρώνων, που θα μπορούν να ενισχύσουν την επίδραση της μορφολογίας στα σχέδια εκφόρτισης. Επιλέγεται η μελέτη των Ca^{++} εξαρτώμενων διαύλων K^+ που ευθύνονται για την γρήγορη μεθυπερπόλωση (fAHP). Σε πυραμιδικά κύτταρα, με μειωμένη αγωγιμότητα των διαύλων BK, καταστέλλεται σε μεγάλο βαθμό το φαινόμενο της sAHP, και είναι πιο πιθανή η γένεση δυναμικών ενεργείας. Χρησιμοποιώντας προσομοίωση τεχνικής καθήλωσης σταθερού ρεύματος, αλλά με μειωμένη αγωγιμότητα των Ca^{++} εξαρτώμενων διαύλων K^+ (κανάλια BK) κατά 10 φορές, επαναλαμβάνεται η ταξινόμηση των πυραμιδικών κυττάρων, με βάση το σχέδιο εκφόρτισης τους (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, 5.1.2 Καταγραφή Σχεδίων Εκφόρτισης Πυραμιδικών Κυττάρων σε Διάφορες Τιμές της Αγωγιμότητας των Ca^{++} εξαρτώμενων διαύλων K^+). Παρατηρείται ότι η αρχική κατηγοριοποίηση να μεταβάλλεται σε μεγάλο βαθμό (βλ. Εικόνα 2), και αποκαλύπτεται και ένας τέταρτος πληθυσμός κυττάρων, τα OB (βλ. Εισαγωγή, Εικόνα 5, και Υλικά και Μέθοδοι, 5.3 Κατηγοριοποίηση Σχεδίων Εκφόρτισης). Οπότε, οι υπό μελέτη νευρώνες επαναπροσδιορίζονται σε τέσσερις νέες κατηγορίες, τις RS1 (n=19), RS2 (n=23), IB (n=10), OB (n=4).



Εικόνα 7 Επίδραση της μειωμένης αγωγιμότητας των Ca^{++} εξαρτώμενων διαύλων K^+ στα σχέδια εκφόρτισης. Κάθε ποσοστό αντιπροσωπεύει τον υπόπληθυσμο των πυραμιδικών κυττάρων με το συγκεκριμένο σχέδιο εκφόρτισης (αν θεωρηθεί ότι ο συνολικός πληθυσμός αντιστοιχεί στο 100%). (α) Ποσοστό σχεδίων εκφόρτισης με φυσιολογική αγωγιμότητα Ca^{++} εξαρτώμενων διαύλων K^+ των υπό μελέτη πυραμιδικών κυττάρων, (n=56), RS1=52, RS2=3, IB=1 (β) Σχέδια εκφόρτισης με μειωμένη

αγωγιμότητα Ca^{++} εξαρτώμενων διαύλων K^+ κατά 10 φορές των υπό μελέτη πυραμιδικών κυττάρων ($n=56$), $RS1=19$, $RS2=23$, $IB=10$, $OB=4$ (γ) Κυματομορφές σχεδίων εκφόρτισης με μειωμένη αγωγιμότητα Ca^{++} εξαρτώμενων διαύλων K^+ κατά 10 φορές ($RS1$: πυραμιδικό κύτταρο 45-3, $RS2$: πυραμιδικό κύτταρο 37-4, IB : πυραμιδικό κύτταρο G3-1B2, OB : πυραμιδικό κύτταρο j-3) ($RS1$: Regular Spiking 1, $RS2$: Regular Spiking 2, IB : Intrinsic Bursting, OB : Oscillatory Bursting)

Από την μεταβολή των σχεδίων εκφόρτισης, δεν παρατηρείται κάποια άμεση συσχέτιση του προηγούμενου σχεδίου εκφόρτισης, με το καινούργιο κάθε κύτταρο. Για παράδειγμα τα κύτταρα 0-2, 37-3 και 37-4a, έχουν και τα 3 αρχικό σχέδιο εκφόρτισης $RS1$, που ή παραμένει το ίδιο ($RS1$), ή μεταβάλλεται σε $RS2$ και IB αντίστοιχα. Ανάλογα τα κύτταρα $G4_1$ και $G4_2$, έχουν αρχικό σχέδιο εκφόρτισης παραμένει το ίδιο ($RS2$), ή μεταβάλλεται σε IB αντίστοιχα. Συνεπώς, το σχέδιο εκφόρτισης ενός κυττάρου μετά την μείωση του ρεύματος Ca^{++} εξαρτώμενων διαύλων K^+ , δεν φαίνεται να συσχετίζεται με την αναπαραγωγή ενός συγκεκριμένου σχεδίου εκφόρτισης (βλ. Πίνακας 2). Εν τούτοις, το αποτέλεσμα αυτό είναι πιο κοντά στην ηλεκτροφυσιολογική κατηγοριοποίηση κατά Yang *et al.*, 1996 (Yang CR *et al.*, 1996) και για αυτό το λόγο, οι επόμενες πειραματικές διαδικασίες, όπου έχει γίνει αντικατάσταση του αρχικού σώματος κάθε νευρώνα με αυτό που αντιπροσωπεύει την διάμεσο τιμή όγκου, πραγματοποιούνται με μειωμένη συγκέντρωση των Ca^{++} εξαρτώμενων διαύλων K^+

<u>Σχέδια εκφόρτισης</u> <u>Πυραμιδικό κύτταρο</u>	Φυσιολογική αγωγιμότητα Ca^{++} εξαρτώμενων διαύλων K^+	Μειωμένη αγωγιμότητα Ca^{++} εξαρτώμενων διαύλων K^+	Σώμα μέσου όγκου	«Απλό» κορυφαίο δενδριτικό πλέγμα	«Σύνθετο» κορυφαίο δενδριτικό πλέγμα2
0-2	RS1	RS1	RS1	RS2	OB
0-2a	RS1	RS1	RS1	RS2	OB
0-2b	RS1	RS2	RS1	RS2	OB
0-2c	RS1	RS1	RS1	RS2	OB
30-3	RS1	RS2	RS1	RS2	OB
30-3a	RS1	RS2	RS1	RS2	OB
30-3b	RS1	RS2	RS1	RS2	OB
33-3	RS1	RS2	RS1	RS2	OB
35-2	RS1	RS2	RS2	RS2	OB
35-3	RS1	IB	RS1	RS2	OB
35-3a	RS1	RS2	RS1	RS2	OB
36-4	RS1	RS2	RS1	RS2	OB
36-4a	RS1	OB	RS2	RS2	OB
36-4b	RS1	RS1	RS1	RS2	OB

37-3	RS1	RS2	RS1	RS1	OB
37-4	RS1	RS2	RS2	RS2	OB
37-4a	RS1	IB	RS1	RS2	OB
39-4a	RS1	IB	RS1	RS2	OB
39-5	RS1	RS2	RS1	RS2	OB
45-3	RS1	RS1	IB	RS2	OB
45-3a	RS1	RS1	IB	RS1	OB
45-4	RS1	RS1	IB	RS2	OB
47-2a	RS1	RS1	OB	RS2	OB
47-2b	RS1	RS1	RS2	RS2	OB
47-3-hf	RS1	RS1	IB	RS2	OB
48-3a	RS2	RS2	RS2	IB	OB
48-3b	RS1	RS1	IB	RS2	OB
48-3c	RS1	RS1	IB	RS2	OB
48-3d	RS1	RS1	RS2	RS2	OB
48-4	RS1	RS2	RS2	RS2	OB
A5-1B2	RS1	RS2	RS2	RS2	OB
C3_4	IB	OB	RS2	RS2	OB
C3_5	RS1	OB	RS2	RS2	OB
C3_6	RS1	RS2	RS1	RS2	OB
G3-1B2	RS1	IB	RS2	IB	OB
G4_1	RS2	RS2	RS1	RS2	OB
G4_2	RS2	IB	RS1	IB	OB
h-2	RS1	RS2	RS2	RS2	OB
h-2a	RS1	IB	RS2	IB	OB
h-2b	RS1	IB	RS2	RS2	OB
H2-3	RS1	IB	RS2	IB	OB
j-2	RS1	RS1	RS2	RS2	OB
j-3	RS1	RS2	RS2	IB	OB
j-3a	RS1	OB	RS1	RS2	OB
J3	RS1	IB	RS2	RS2	OB
L-2	RS1	RS1	RS2	RS1	OB
L-2a	RS1	RS1	RS2	RS1	OB
L-2b	RS1	RS1	RS2	RS2	OB
n-3	RS1	RS2	RS2	RS2	OB
n-3a	RS1	RS2	RS2	RS2	OB
n-3b	RS1	RS1	RS2	RS2	OB
q-3	RS1	RS1	RS2	RS2	OB
q-3a	RS1	RS2	IB	RS2	OB
q-3b	RS1	RS2	RS2	IB	OB
q-4	RS1	IB	OB	RS1	OB
q-4a	RS1	RS2	OB	RS2	OB

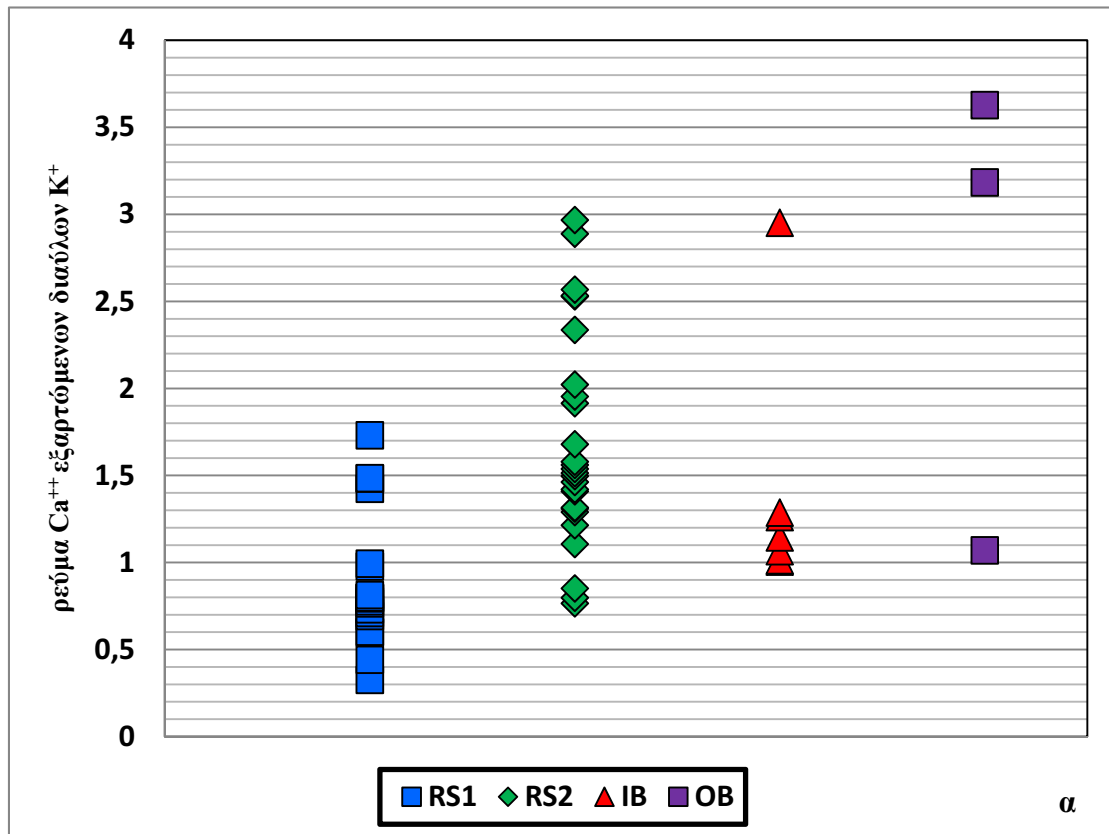
Πίνακας 2 Συγκεντρωτικός πίνακας σχεδίων εκφόρτισης. Σε κάθε στήλη καταγράφεται το σχέδιο εκφόρτισης κάθε πυραμιδικού κυττάρου, ανάλογα με την πειραματική διαδικασία (βλ. κείμενο για λεπτομέρειες). (*RS1: Regular Spiking 1, RS2: Regular Spiking 2, IB: Intrinsic Bursting, OB: Oscillatory Bursting*)

1.2.1 Συσχέτιση του Ρεύματος των Ca^{++} εξαρτώμενων διαύλων K^+ (fAHP) με τα Σχέδια Εκφόρτισης

Δεδομένη της εκ νέου κατηγοριοποίησης του πληθυσμού των πυραμιδικών νευρώνων σε RS1, RS2, IB, OB, που απέδωσε η μείωση της αγωγιμότητας των ενεργοποιούμενων από Ca^{++} εξαρτώμενων διαύλων K^+ που ευθύνονται για την γρήγορη μεθυπερόλωση (fAHP) (βλ. Αποτελέσματα, 1.2 Επίδραση των Ca^{++} εξαρτώμενων διαύλων K^+ στα Σχέδια Εκφόρτισης), καταγράφεται η μέγιστη τιμή του ρεύματος που διέρχεται από αυτούς του διαύλους, κατά την διάρκεια προσομοίωση τεχνικής καθήλωσης σταθερού ρεύματος (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, 5.1.5. Καταγραφή του ρεύματος των Ca^{++} εξαρτώμενων διαύλων K^+), προκειμένου να ελεγχθεί αν υπάρχει κάποια συσχέτιση ανάμεσα στις διάφορες ηλεκτροφυσιολογικές κατηγορίες. Στην συνέχεια γίνεται στατιστικός έλεγχος t, για το αν υπάρχει διαφορά στην μέγιστη τιμή ρεύματος των Ca^{++} εξαρτώμενων διαύλων K^+ που καταγράφεται, για κάθε πιθανό ζεύγος των ηλεκτροφυσιολογικών κατηγοριών (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, 6.2 Δοκιμασία t). Δεν παρατηρείται κάποια σημαντική στατιστική διαφορά, ανάμεσα στις διάφορες κατηγορίες, με εξαίρεση τις ομάδες RS1 και RS2. Ο έλεγχος t δίνει στατιστικά σημαντική διαφορά (τιμη-p τείνει στο 0, από δοκιμασία t) ανάμεσα σε αυτές τις κατηγορίες (βλ. Εικόνα 3). Τα αποτελέσματα αυτά ίσως, να οφείλονται σε μικρό στατιστικό δείγμα. Εν τούτοις, ίσως, το ρεύμα, που άγεται από τους Ca^{++} εξαρτώμενους διαύλους K^+ να μην έχει καθοριστικό παράγοντα, μόνο σε συνδυασμό με την μορφολογία στο σχέδιο εκφόρτισης, αλλά να απαιτούνται και άλλες ενεργητικές ιδιότητες των πυραμιδικών κυττάρων.

1.3 Επίδραση του Όγκου του Σώματος στα Σχέδια Εκφόρτισης

Για την διερεύνηση της επίδρασης της μορφολογίας στο σχέδιο εκφόρτισης κάθε κυττάρου, εξετάζονται τα επιμέρους τμήματα της δομής των νευρώνων. Το πρώτο μορφολογικό χαρακτηριστικό του κυττάρου που εξετάζεται είναι ο όγκος του σώματος του. Έχει παρατηρηθεί ότι τα πυραμιδικά κύτταρα της στιβάδας V, έχουν



Τιμή-p				
	RS1	RS2	IB	OB
RS1	-	0.00	0.12	0.16
RS2	-	-	0.32	0.36
IB	-	-	-	0.25
OB	-	-	-	-

β

Εικόνα 3 Καταγραφή του ρεύματος των Ca^{++} εξαρτώμενων διαύλων K^{+} . (α) Διάγραμμα διασποράς της μέγιστης τιμής ρεύματος των Ca^{++} εξαρτώμενων διαύλων K^{+} που καταγράφεται ανά ηλεκτροφυσιολογική κατηγορία (β) Τιμές-p για την διαφορά του μέσου όρου της μέγιστης τιμής ρεύματος των Ca^{++} εξαρτώμενων διαύλων K^{+} που καταγράφεται για κάθε ζεύγος ηλεκτροφυσιολογικής κατηγορίας (RS1: Regular Spiking 1, RS2: Regular Spiking 2, IB: Intrinsic Bursting, OB: Oscillatory Bursting, κατακόρυφος άξονας: τιμές μέγιστης τιμής ρεύματος, σε nA).

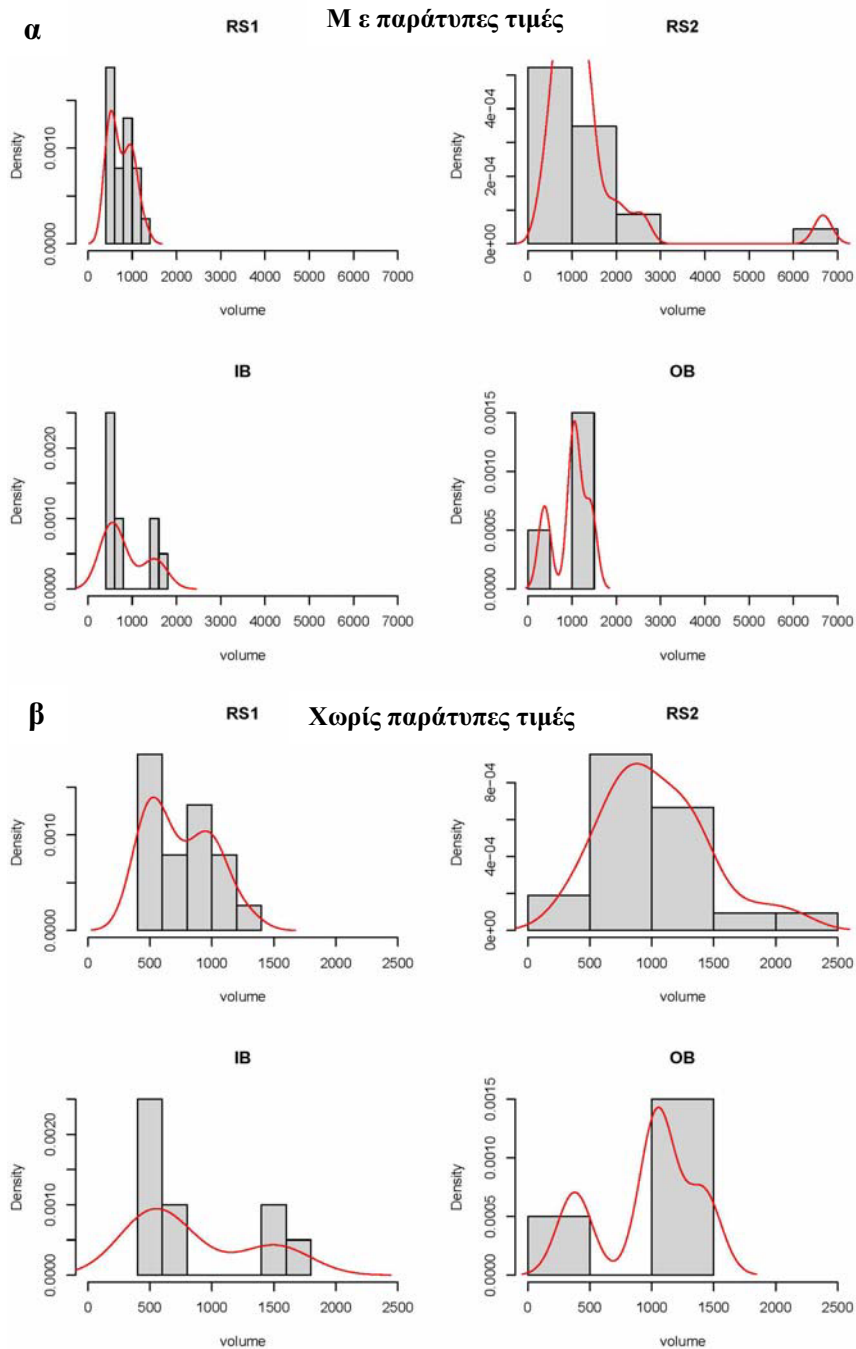
μεγάλη ποικιλομορφία στο μέγεθος του σώματος τους, και αυτά που πυροδοτούν δυναμικά ενεργείας κατά ομάδες (IB, OB) τείνουν να έχουν μεγαλύτερο σώμα από αυτά που εκφορτίζουν τονικά (RS1, RS2) (Mason A and Larkman A, 1990). Με βάση αυτό το δεδομένο, γίνεται διερευνητική στατιστική ανάλυση, για να διαπιστωθεί, αν ο όγκος του σώματος μπορεί να συσχετιστεί με το σχέδιο εκφόρτισης των ηλεκτροφυσιολογικών κατηγοριών RS1, RS2, IB, OB (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, 6.1 Ανάλυση Διακύμανσης). Αρχικά, η κάθε κατηγορία εξετάζεται, ως προς την κατανομή του πληθυσμού της. Γίνονται, δύο αναλύσεις, όπου στην πρώτη περιλαμβάνονται οι παράτυπες τιμές (outliers) όγκου για κάθε κατηγορία, ενώ στην

δεύτερη όχι. Σε όλες τις αναλύσεις, προκύπτουν δικόρυφες κατανομές (βλ. Εικόνα 4). Αυτό, ίσως, να οφείλονται στο μικρό στατιστικό δείγμα, τόσο στο σύνολο του ($n=56$), όσο και στις επιμέρους κατηγορίες (RS1 ($n=19$), RS2 ($n=23$), IB ($n=10$), OB($n=4$)), και όχι σε κάποιο πραγματικό βιολογικό παράγοντα, δεδομένης της ετερογένειας που υπάρχει στα πυραμιδικά κύτταρα της στοιβάδα V (Tsiola A *et al.*, 2003)

Όπως, φαίνεται από τα θηκογράμματα (boxplots) (βλ. Εικόνα 5) στα οποία συνοψίζονται τα βασικά περιγραφικά μέτρα της κατανομής κάθε κατηγορίας υπάρχει μια σχετική αλληλοεπικάλυψη, του όγκου του σώματος ανάμεσα στις ομάδες των RS1, RS2, IB, OB, και δεν υπάρχει κάποια εμφανή διαφοροποίηση. Στην συνέχεια η παρατήρηση αυτή ελέγχεται στατιστικά. Τα αποτελέσματα, είτε συμπεριληφθούν οι παράτυπες τιμές όγκου (τιμή- $p=0.07$, από ανάλυση Kruskal -Wallis), είτε όχι (τιμή- $p=0.16$ από ανάλυση Kruskal-Wallis), δείχνουν ότι δεν υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά, που να μπορεί να συσχετίσει άμεσα τον όγκο των σωμάτων των τεσσάρων ομάδων, με το σχέδιο εκφόρτισης τους. Συνεπώς, ο όγκος του σώματος δεν φαίνεται να είναι ειδοποιό χαρακτηριστικό των τεσσάρων ομάδων, αν και το συμπέρασμα αυτό είναι περισσότερο πιθανό, παρά απόλυτο, λόγω του μικρού δείγματος κυττάρων.

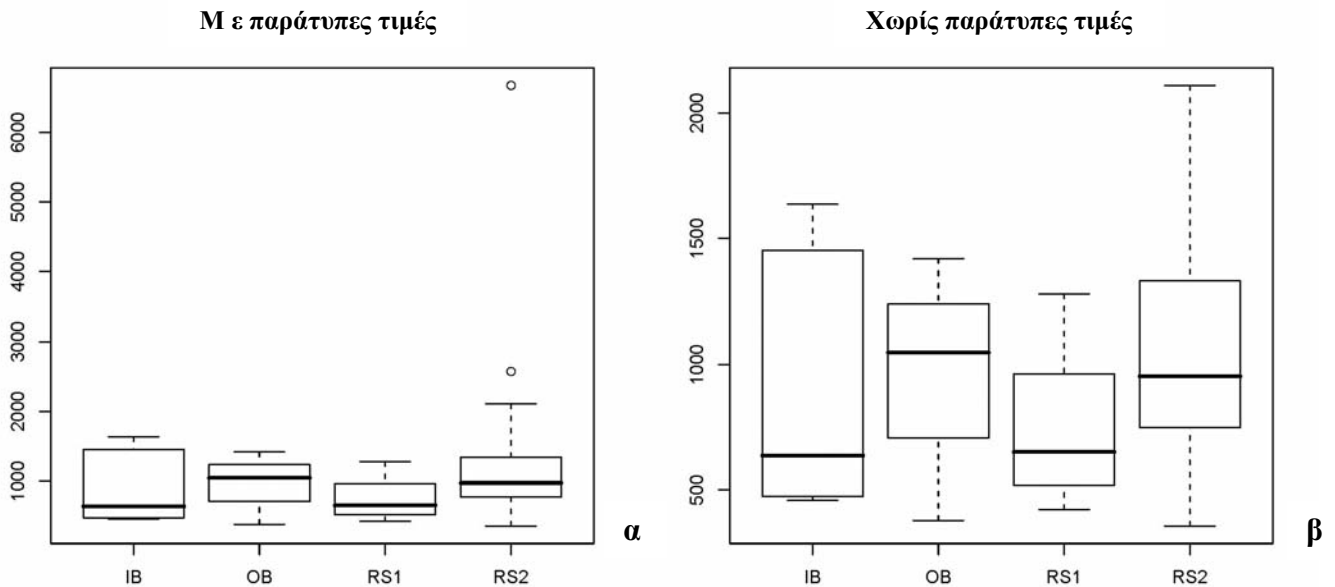
1.3.1 Αντικατάσταση του Αρχικού Σώματος με ένα Σώμα Μέσου Όγκου

Η επίδραση του όγκου του σώματος στο σχέδιο εκφόρτισης κάθε πυραμιδικού κυττάρου εξετάζεται περαιτέρω, με την αντικατάσταση του αρχικού σώματος κάθε νευρώνα με αυτό που αντιπροσωπεύει την διάμεσο τιμή όγκου ($V_{Lm}=819.23\mu\text{m}^3$) του συνόλου των κυτταρικών σωμάτων (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, 2.3. Ψηφιακή Ανακατασκευή Πυραμιδικών Κυττάρων με Σώμα Μέσου Όγκου). Όλα τα υπόλοιπα μορφολογικά χαρακτηριστικά των νευρώνων παραμένουν, ως έχουν. Στα τροποποιημένα κύτταρα γίνεται προσομοίωση τεχνικής καθήλωσης σταθερού ρεύματος, και καταγράφεται το σχέδιο εκφόρτισης τους. Με μία πρώτη ανάλυση, φαίνεται, τα σχέδια εκφόρτισης σε πολλούς από τους νευρώνες κάθε πληθυσμού, να μεταβάλλονται. Μια πιο προσεκτική παρατήρηση, όμως, αποκαλύπτει ότι αυτή η αλλαγή, δεν σχετίζεται με τη μεταβολή του όγκου του σώματος (βλ. Πίνακας 3). Για παράδειγμα, απαντώνται κύτταρα, που ο αρχικός όγκος του κυτταρικού σώματος τους



Εικόνα 4 Ιστογράμματα και πολύγωνα κατανομής σχετικών συχνοτήτων του όγκου σώματος. Απεικονίζεται η κατανομή του όγκου του σώματος (σε μm^3) για κάθε ηλεκτροφυσιολογική κατηγορία των πυραμιδικών κυττάρων. (α) Στο δείγμα περιλαμβάνονται και οι παράτυπες τιμές όγκου σώματος για κάθε κατηγορία (πυραμιδικά κύτταρα: G4_1 με $VL=2571.51\mu\text{m}^3$, και 30-3 με $VL=6668.89\mu\text{m}^3$) (β) Στο δείγμα δεν περιλαμβάνονται και οι παράτυπες τιμές όγκου σώματος. (RS1: Regular Spiking 1, RS2: Regular Spiking 2, IB: Intrinsic Bursting, OB: Oscillatory Bursting, volume: όγκος σώματος σε μm^3 , density: πυκνότητα συχνότητας)

είναι παραπλήσιος με την διάμεσο τιμή που επιλέχτηκε, και αναμενόμενα διατηρούν το ίδιο σχέδιο εκφόρτισης(π.χ. το πυραμιδικό κύτταρο 45-3a έχει αρχικό όγκο κυτταρικού σώματος $VL=813.23\mu\text{m}^3$ και σχέδιο εκφόρτισης RS1 πριν και μετά την αντικατάσταση του σώματος). Απαντώνται, όμως και κύτταρα με σημαντική διαφορά



Εικόνα 5 Θηκογράμματα του όγκου σώματος. Συνοψίζονται τα βασικά περιγραφικά μέτρα της κατανομής του όγκου του σώματος (σε μm^3) για κάθε ηλεκτροφυσιολογική κατηγορία των πυραμιδικών κυττάρων. (α) Στο δείγμα περιλαμβάνονται και οι παράτυπες τιμές όγκου σώματος για κάθε κατηγορία (πυραμιδικά κύτταρα: G4_1 με $VL=2571.51\mu\text{m}^3$, και 30-3 με $VL=6668.89\mu\text{m}^3$) (β) Στο δείγμα δεν περιλαμβάνονται και οι παράτυπες τιμές όγκου σώματος (RS1: Regular Spiking 1, RS2: Regular Spiking 2, IB: Intrinsic Bursting, OB: Oscillatory Bursting κατακόρυφος άξονας: όγκος σώματος σε μm^3)

ανάμεσα στις τιμές του αρχικού όγκου τους σώματος τους και στην διάμεσο τιμή κυτταρικού όγκου σώματος, που και πάλι διατηρούν το σχέδιο εκφόρτισης τους (π.χ. το πυραμιδικό κύτταρο h-2a με αρχικό όγκο κυτταρικού σώματος $VL=458.78\mu\text{m}^3$ και σχέδιο εκφόρτισης IB, πριν και μετά την αντικατάσταση του σώματος).

Πυραμιδικά Κύτταρα	Φυσιολογικός όγκος σώματος (μm^3)	Σχέδια εκφόρτισης φυσιολογικού όγκου σώματος	Σώμα μέσου όγκου (μm^3)	Σχέδια εκφόρτισης σώματος μέσου όγκου
0-2	548.8	RS1	819.23	RS1
0-2a	1278.73	RS1	819.23	RS1
0-2b	651.53	RS2	819.23	RS1

<i>0-2c</i>	896.49	RS1	819.23	RS1
<i>30-Map</i>	959.06	RS2	819.23	RS1
<i>30-3a</i>	813.29	RS2	819.23	RS1
<i>30-3b</i>	443.83	RS2	819.23	RS1
<i>33-3</i>	1078.25	RS2	819.23	RS1
<i>35-2</i>	606.98	RS2	819.23	RS2
<i>35-3</i>	813.63	IB	819.23	RS1
<i>35-3a</i>	455.05	RS2	819.23	RS1
<i>36-4</i>	964.86	RS2	819.23	RS1
<i>36-4a</i>	451.28	OB	819.23	RS2
<i>36-4b</i>	519.69	RS1	819.23	RS1
<i>37-3</i>	613.94	RS2	819.23	RS1
<i>37-4</i>	515.37	RS2	819.23	RS2
<i>37-4a</i>	1045.29	IB	819.23	RS1
<i>39-4a</i>	1029.74	IB	819.23	RS1
<i>39-5</i>	422.02	RS2	819.23	RS1
<i>45-3</i>	458.78	RS1	819.23	IB
<i>45-3a</i>	582.47	RS1	819.23	IB
<i>45-4</i>	792.95	RS1	819.23	IB
<i>47-2a</i>	474.3	RS1	819.23	OB
<i>47-2b</i>	1636.8	RS1	819.23	RS2
<i>47-3-hf</i>	1451.58	RS1	819.23	IB
<i>48-3a</i>	1451.58	RS2	819.23	RS2
<i>48-3b</i>	471.14	RS1	819.23	IB
<i>48-3c</i>	478.46	RS1	819.23	IB
<i>48-3d</i>	691.31	RS1	819.23	RS2
<i>48-4</i>	952.76	RS2	819.23	RS2
<i>A5-1B2</i>	6668.89	RS2	819.23	RS2
<i>C3_4</i>	1135.44	OB	819.23	RS2
<i>C3_5</i>	438.67	OB	819.23	RS2
<i>C3_6</i>	1330.45	RS2	819.23	RS1
<i>G3-1B2</i>	819.23	IB	819.23	RS2
<i>G4_1</i>	642.59	RS2	819.23	RS1
<i>G4_2</i>	1111.16	IB	819.23	RS1
<i>h-2</i>	1351.54	RS2	819.23	RS2
<i>H2-3</i>	798.42	IB	819.23	RS2
<i>h-2a</i>	670.11	IB	819.23	RS2
<i>h-2b</i>	1790.44	IB	819.23	RS2
<i>j-2</i>	1310.01	RS1	819.23	RS2
<i>J3</i>	1349.01	RS2	819.23	RS2
<i>j-3</i>	1336.45	OB	819.23	RS1
<i>j-3a</i>	2571.51	IB	819.23	RS2

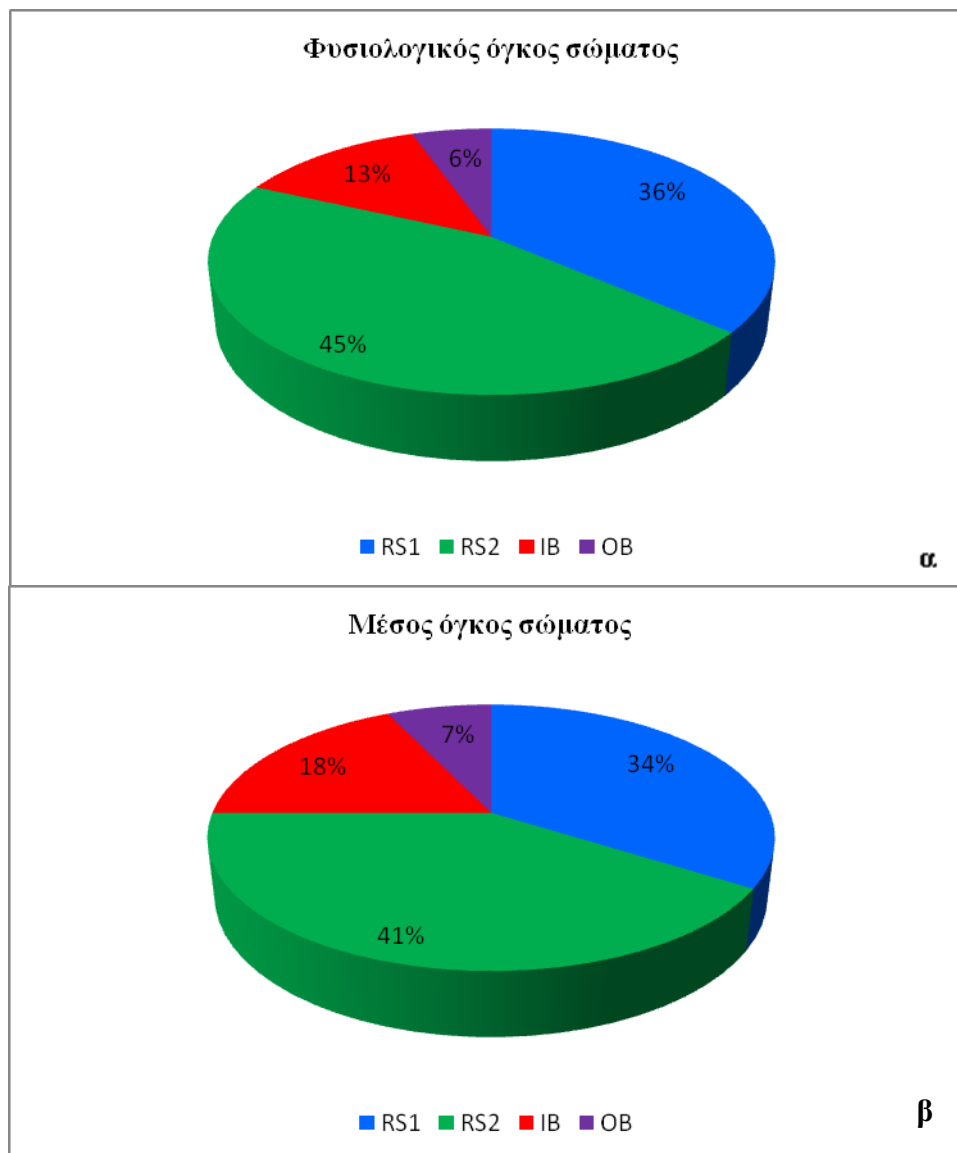
<i>L-2</i>	748.68	RS1	819.23	RS2
<i>L-2a</i>	2109.12	RS1	819.23	RS2
<i>L-2b</i>	917.74	RS1	819.23	RS2
<i>n-3</i>	973.91	RS2	819.23	RS2
<i>n-3a</i>	915.52	RS2	819.23	RS2
<i>n-3b</i>	682.17	RS1	819.23	RS2
<i>q-3</i>	356.51	RS1	819.23	RS2
<i>q-3a</i>	378.4	RS2	819.23	IB
<i>q-3b</i>	1036.29	RS2	819.23	RS2
<i>q-4</i>	1419.01	IB	819.23	OB
<i>q-4a</i>	1059.76	RS2	819.23	OB

Πίνακας 3 Σύγκριση σχεδίων εκφόρτισης πριν και μετά την αντικατάσταση του φυσιολογικού σώματος με ένα μέσου όγκου. Οι αλλαγές που παρατηρούνται στο σχέδιο εκφόρτισης, πιθανόν, δεν οφείλονται αποκλειστικά στην μεταβολή του όγκου του σώματος (βλ. κείμενο για λεπτομέρειες). (*RS1*: Regular Spiking 1, *RS2*: Regular Spiking 2, *IB*: Intrinsic Bursting, *OB*: Oscillatory Bursting)

Εξετάζοντας, και την συνολική μεταβολή των σχεδίων εκφόρτισης σε επίπεδο πληθυσμού, παρατηρείται το συνολικό ποσοστό του σχεδίου εκφόρτισης για κάθε ηλεκτροφυσιολογική κατηγορία να κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα, πριν και μετά την αντικατάσταση του φυσιολογικού σώματος με ένα μέσου όγκου. Συνεπώς, ο όγκος του σώματος δεν μπορεί να καθορίσει απόλυτα το σχέδιο εκφόρτισης των πυραμιδικών κυττάρων (βλ. Εικόνα 6).

1.4 Ανάλυση Ομάδων

Στην συνέχεια γίνεται προσπάθεια συσχέτισης των ηλεκτροφυσιολογικών κατηγοριών RS1, RS2, IB, OB νευρώνων με χαρακτηριστικά, που αφορούν τις ιδιότητες των κορυφαίων και βασικών δενδριτικών πλεγμάτων τους. Αρχικά, εξετάζονται μορφολογικά χαρακτηριστικά, όπως ο όγκος των κορυφαίων και βασικών δενδριτικών πλεγμάτων, και τα σημεία διακλάδωσης τους. Στην συνέχεια, μελετώνται στοιχεία που σχετίζονται με τις ενεργητικές και παθητικές ιδιότητες των πυραμιδικών κύτταρων.

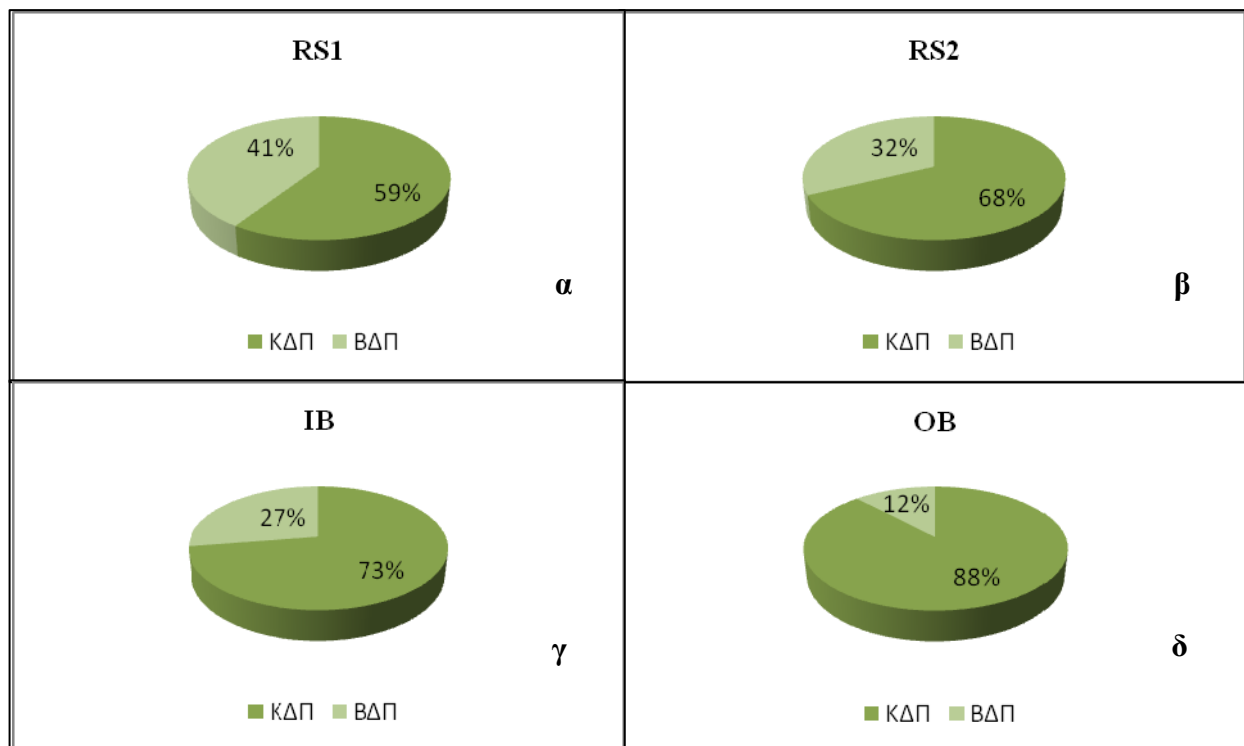


Εικόνα 6 Επίδραση του μέσου όγκου σώματος στα σχέδια εκφόρτισης. (α) Σχέδια εκφόρτισης με φυσιολογικό όγκο σώματος των υπό μελέτη πυραμιδικών κυττάρων ($n=56$), RS1=19, RS2=23, IB=10, OB=4 (β) Σχέδια εκφόρτισης με μέσο όγκο σώματος ($V_{Lm}=819.23\mu\text{m}^3$) των υπό μελέτη πυραμιδικών κυττάρων ($n=56$), RS1=20, RS2=25, IB=7, OB=3 (RS1: Regular Spiking 1, RS2: Regular Spiking 2, IB: Intrinsic Bursting, OB: Oscillatory Bursting)

1.4.1.1 Συσχέτιση του Όγκου των Δενδριτών και των Σχεδίων Εκφόρτισης

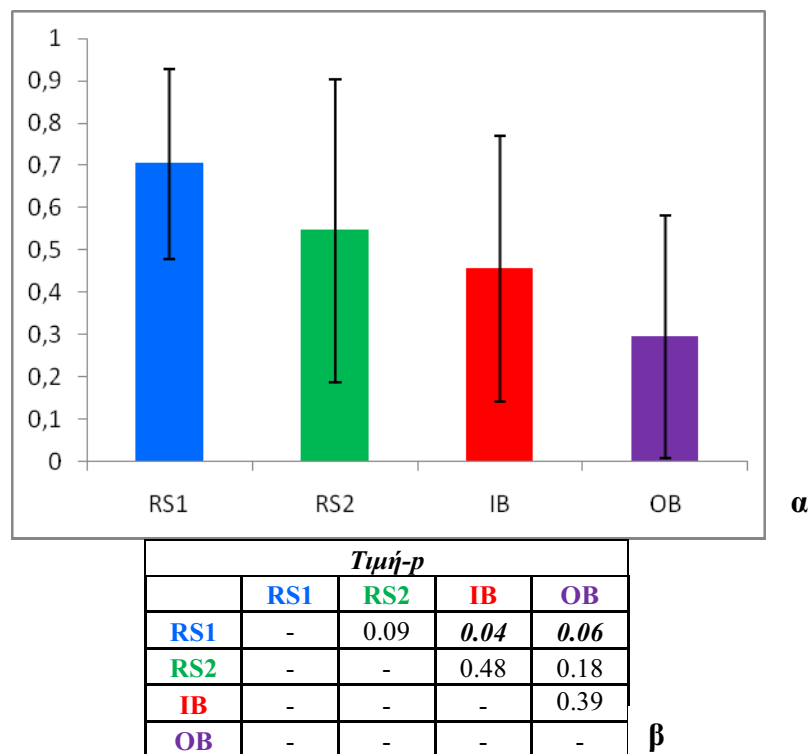
Τα δενδριτικά πλέγματα, έχουν μεγάλο όγκο, λόγω της εκτεταμένης δομής τους. Σε αυτή την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιούνται οι ψηφιακές ανακατασκευές πυραμιδικών κυττάρων, που φέρουν το αρχικό τους σώμα (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, 2.2. Ψηφιακή Ανακατασκευή Ολοκληρωμένης Κυτταρικής Δομής), ενώ η ηλεκτροφυσιολογική κατηγοριοποίηση είναι αυτή που προκύπτει με μειωμένη αγωγιμότητα Ca^{++} εξαρτώμενων διαύλων K^+ (βλ. Πίνακας 2 και Αποτελέσματα, 1.2 Επίδραση των Ca^{++} εξαρτώμενων διαύλων K^+ στα Σχέδια Εκφόρτισης). Για κάθε ομάδα RS1, RS2, IB, OB των πυραμιδικών κυττάρων, υπολογίζεται ο μέσος όρος του

συνολικού όγκου του βασικού και κορυφαίου πλέγματος κάθε νευρώνα. Στην συνέχεια γίνεται σύγκριση της αναλογίας του όγκου του κορυφαίου προς το βασικό δενδριτικό πλέγμα, για κάθε κατηγορία. Παρατηρείται, ότι και στις τέσσερις ομάδες τα κορυφαία δενδριτικά πλέγματα έχουν περισσότερο όγκο, σε σχέση με τα βασικά. Συγκεκριμένα, στον πληθυσμό των νευρώνων που εκφορτίζουν δυναμικά ενεργειακά (κύτταρα RS1 και RS2) η αναλογία όγκου κορυφαίου προς βασικού δενδριτικού πλέγματος είναι περίπου 3:2, ενώ στα κύτταρα που εκφορτίζουν δυναμικά ενεργειακά σε ομάδες (κύτταρα IB και OB), η αντίστοιχη αναλογία είναι περίπου 4:1. Επιπλέον, παρατηρείται μία αύξηση του όγκου του κορυφαίου δενδριτικού πλέγματος, και μείωση του όγκου του βασικού δενδριτικού πλέγματος στις κατηγορίες των πυραμιδικών κυττάρων, κατά την σειρά RS1, RS2, IB, OB, παρατήρηση που συμφωνεί με τι έως τώρα μελέτες (βλ. Εικόνα 7).



Εικόνα 7 Αναλογία όγκου των δενδριτικών πλεγμάτων. Κάθε ποσοστό αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο του συνολικού όγκου του βασικού και κορυφαίου πλέγματος κάθε νευρώνα (αν θεωρηθεί ότι ο συνολικός όγκος του βασικού και κορυφαίου πλέγματος, αντιστοιχεί στο 100%). (α) Η αναλογία ΚΔΠ:ΒΔΠ στην κατηγορία RS1 είναι περίπου 2:3 (β) Η αναλογία ΚΔΠ:ΒΔΠ στην κατηγορία RS2 είναι περίπου 2:1. (γ) Η αναλογία ΚΔΠ:ΒΔΠ στην κατηγορία IB είναι περίπου 2:1. (δ) Η αναλογία ΚΔΠ:ΒΔΠ στην κατηγορία OB είναι περίπου 4:1 (RS1: Regular Spiking 1, RS2: Regular Spiking 2, IB: Intrinsic Bursting, OB: Oscillatory Bursting, ΚΔΠ: Κορυφαίο Δενδριτικό Πλέγμα, ΒΔΠ: Βασικό Δενδριτικό Πλέγμα)

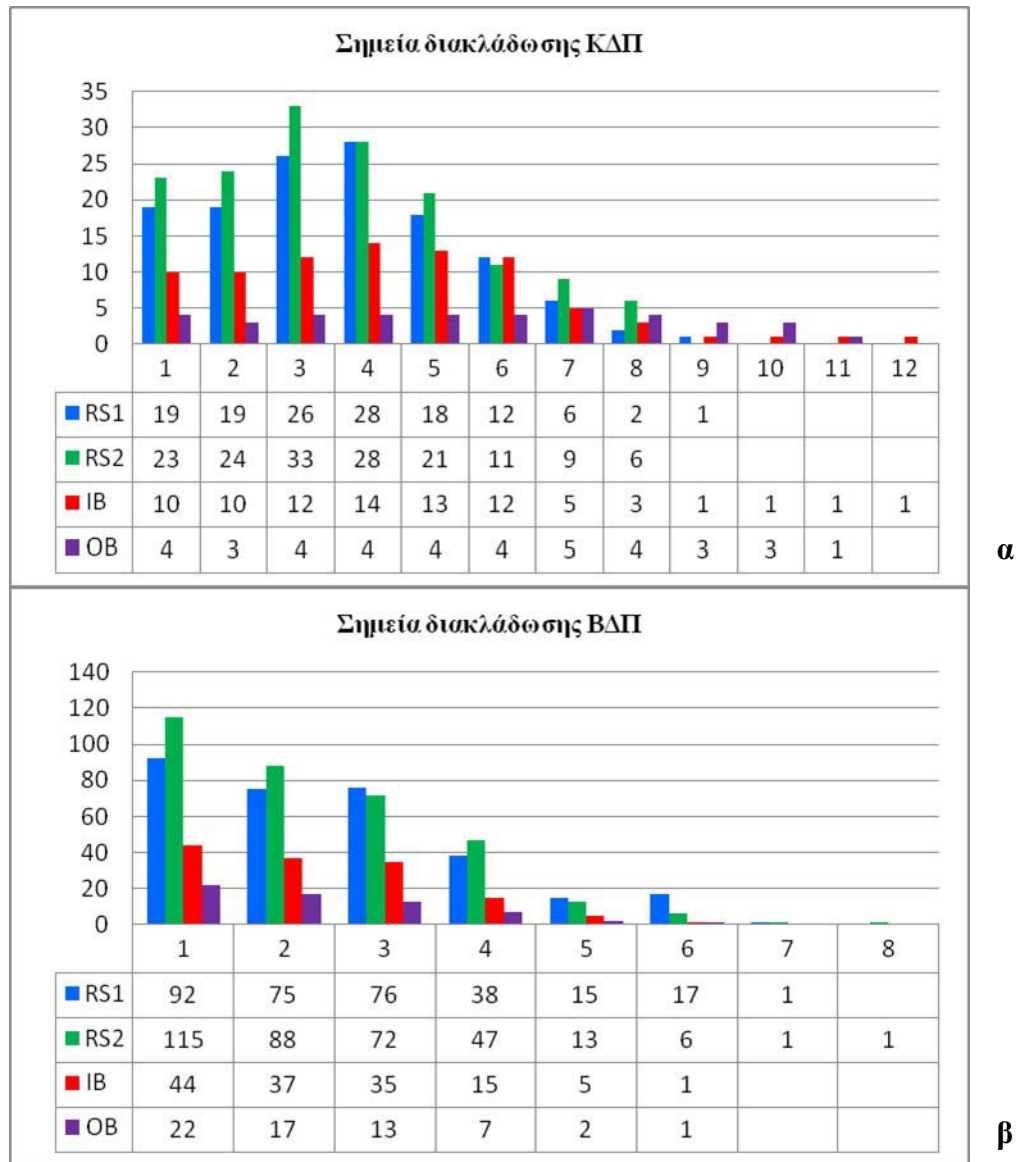
Η παραπάνω υπόθεση εξετάζεται και στατιστικά, με τον έλεγχο t (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, 6.2 Δοκιμασία t). Αρχικά, υπολογίζεται η αναλογία η αναλογία όγκου κορυφαίου προς βασικού δενδριτικού πλέγματος, για κάθε κύτταρο ξεχωριστά, και στην συνέχεια γίνεται έλεγχος t, για τον μέσο όρο της αναλογίας αυτής για κάθε πιθανό ζεύγος των ηλεκτροφυσιολογικών κατηγοριών. Τα αποτελέσματα των ελέγχων αυτών δείχνουν σημαντική διαφορά ανάμεσα στις κατηγορίες RS1 και IB (τιμή-p=0.04 από δοκιμασία t), και οριακά σημαντική ανάμεσα στις κατηγορίες RS1-OB (τιμή-p=0.06 από δοκιμασία t) (βλ. Εικόνα 8). Συνεπώς, φαίνεται να υπάρχει κάποια τάση να μειώνεται ο όγκος των βασικών δενδριτικών πλεγμάτων σε σχέση με αυτό των κορυφαίων, στις κατηγορίες IB, OB. Αυτό, ίσως, αντικατοπτρίζει κάποια επίδραση της μορφολογίας των δενδριτικών πλεγμάτων, στην διαμόρφωση των σχεδίων εκφόρτισης.



Εικόνα 8 Μέσος όρος αναλογίας όγκου κορυφαίου προς βασικού δενδριτικού πλέγματος. (α) Για κάθε ηλεκτροφυσιολογική κατηγορία απεικονίζεται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση της αναλογίας κορυφαίου προς βασικού δενδριτικού πλέγματος. RS1: $\mu = 0.70$, $s = 0.22$, RS2: $\mu = 0.54$, $s = 0.36$, IB: $\mu = 0.45$, $s = 0.31$, OB: $\mu = 0.29$, $s = 0.29$ (β) Τιμές-p για την διαφορά του μέσου όρου της αναλογίας κορυφαίου προς βασικού δενδριτικού πλέγματος, για κάθε ζεύγος ηλεκτροφυσιολογικής κατηγορίας (RS1: Regular Spiking 1, RS2: Regular Spiking 2, IB: Intrinsic Bursting, OB: Oscillatory Bursting, κατακόρυφος άξονας: τιμές μέσης τιμής μ , σε μm^3)

1.4.1.2 Συσχέτιση Αριθμού Σημείων Διακλάδωσης και Σχεδίων Εκφόρτισης

Στα πλαίσια της αναλυτικής μελέτης των επιμέρους μορφολογικών χαρακτηριστικών και της συσχέτισης τους, με τα σχέδια εκφόρτισης των πυραμιδικών κυττάρων τους, ελέγχεται ο βαθμός διακλάδωσης των δενδριτικών πλεγμάτων. Βασικό χαρακτηριστικό της μορφολογίας, τόσων των βασικών, όσο και των κορυφαίων δενδριτικών πλεγμάτων, είναι η πολύπλοκη συνδεσμολογία ανάμεσα στους πολυάριθμους δενδριτικούς κλάδους τους. Και σε αυτή την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιούνται οι ψηφιακές ανακατασκευές πυραμιδικών κυττάρων, που φέρουν το φυσιολογικό τους σώμα (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, 2.2. Ψηφιακή Ανακατασκευή Ολοκληρωμένης Κυτταρικής Δομής), ενώ η ηλεκτροφυσιολογική κατηγοριοποίηση είναι αυτή που προκύπτει με μειωμένη αγωγιμότητα Ca^{++} εξαρτώμενων διαύλων K^+ (βλ. Πίνακας 2 και Αποτελέσματα, 1.2 Επίδραση των Ca^{++} εξαρτώμενων διαύλων K^+ στα σχέδια εκφόρτισης). Για κάθε μία από τις τέσσερις ηλεκτροφυσιολογικές κατηγορίες, γίνεται στο σύνολο των νευρώνων που την απαρτίζουν, κατάταξη των δενδριτών τους, με βάση το σημείο διακλάδωσης από όπου εκφύονται, και για τα δύο δενδρικά πλέγματα (βασικό και κορυφαίο). Συγκρίνοντας τις ηλεκτροφυσιολογικές κατηγορίες των πυραμιδικών κυττάρων, παρατηρείται, ότι οι RS1 και RS2 ομάδες έχουν, αναφορικά με το τελικό σημείο διακλάδωσης τους, λιγότερο εκτεταμένα κορυφαία δενδρικά πλέγματα σε σχέση με τις IB και OB ομάδες (μέχρι και 9 σημεία διακλάδωσης για τις RS1 και RS2, και μέχρι και 12 σημεία διακλάδωσης για τις IB και OB ομάδες). Η έκταση των βασικών δενδριτικών πλεγμάτων είναι παρόμοια και για τις τέσσερις ομάδες (μέχρι και 8 σημεία διακλάδωσης για τις RS1 και RS2, και μέχρι και 6 σημεία διακλάδωσης για τις IB και OB ομάδες). Ανάλογα αποτελέσματα προκύπτουν και από τον στατιστικό έλεγχο t (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, 6.2 Δοκιμασία t), όπου οι ηλεκτροφυσιολογικές κατηγορίες (με εξαίρεση την σύγκριση ανάμεσα στις ομάδες RS1 και RS2) φαίνεται να διαφέρουν ως προς τον βαθμό έκτασης του κορυφαίου δενδριτικού πλέγματος, αναφορικά με τον αριθμό των σημείων διακλάδωσης του. Στο βασικό δενδρικό πλέγμα σημαντική στατιστική διαφορά παρατηρείται μόνο ανάμεσα στις κατηγορίες RS1 και OB. Επομένως, και ο βαθμός διακλάδωσης των δενδριτικών πλεγμάτων, φαίνεται να συσχετίζεται με τα σχέδια εκφόρτισης (βλ. Εικόνα 9).



α

β

Τιμή-p				
ΚΔΠ	RS1	RS2	IB	OB
RS1	-	0.33	0.06	0.01
RS2	-	-	0.01	0.00
IB	-	-	-	0.05
OB	-	-	-	-

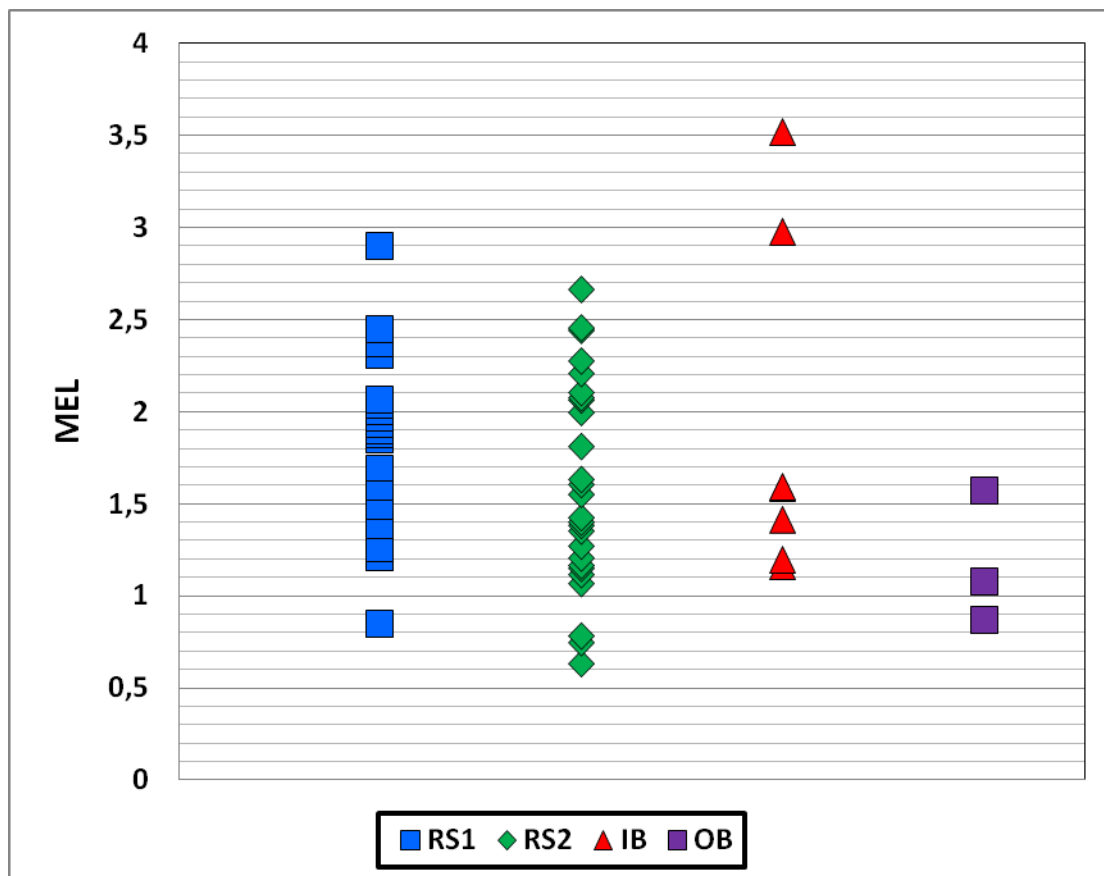
Τιμή-p				
ΒΔΠ	RS1	RS2	IB	OB
RS1	-	0.93	0.19	0.04
RS2	-	-	0.28	0.08
IB	-	-	-	0.17
OB	-	-	-	-

γ

Εικόνα 9 Σημεία διακλάδωσης κορυφαίων και βασικών δένδριτικών πλεγμάτων. (α) ΚΔΠ. Οι ηλεκροφυσιολογικές κατηγορίες RS1 και RS2, έχουν λιγότερο διακλαδισμένο κορυφαίο δένδριτικό πλέγμα σε σύγκριση με τις IB και OB (β) ΒΔΠ. Ο βαθμός διακλάδωσης των βασικών δένδριτικών πλεγμάτων είναι παρόμοιος σε όλες τις ηλεκτροφυσιολογικές κατηγορίες (γ) Τιμές-p για την διαφορά του αριθμού των σημείων διακλάδωσης του κορυφαίου και του βασικού δένδριτικού πλέγματος, για κάθε ζεύγος ηλεκτροφυσιολογικής κατηγορίας (RS1: Regular Spiking 1, RS2: Regular Spiking 2, IB: Intrinsic Bursting, OB: Oscillatory Bursting, ΚΔΠ: Κορυφαίο Δένδριτικό Πλέγμα, ΒΔΠ: Βασικό Δένδριτικό Πλέγμα, κατακόρυφος άξονας: αριθμός σημείων διακλάδωσης, οριζόντιος άξονας: βαθμός διακλάδωσης, πίνακια: συνολικός αριθμός σημείων διακλάδωσης ανά βαθμό διακλάδωσης και ανά ηλεκτροφυσιολογική κατηγορία).

1.4.1.3 Καταγραφή του Μέσου Ηλεκτρονικού Μήκους

Το μέσο ηλεκτρονικό μήκος ενός δενδριτικού πλέγματος είναι ο μέσος όρος όλων των ηλεκτρονικών μηκών των δενδριτικών κλάδων, αφού πρώτα έχει το καθένα διαιρεθεί με το μήκος του δενδριτικού κλάδου που αντιστοιχεί. Έτσι, προκύπτει ένα μέτρο σύγκρισης των παθητικών ιδιοτήτων του κάθε δενδρίτη, και κατ' επέκταση ολόκληρου του δενδριτικού πλέγματος (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, 3. Μέσο Ηλεκτρονικό Μήκος). Γι αυτό το λόγο εξετάζεται, αν τα σχέδια εκφόρτισης μπορούν να



α

Τιμή-p				
	RS1	RS2	IB	OB
RS1	-	0.11	0.85	0.06
RS2	-	-	0.41	0.16
IB	-	-	-	0.10
OB	-	-	-	-

β

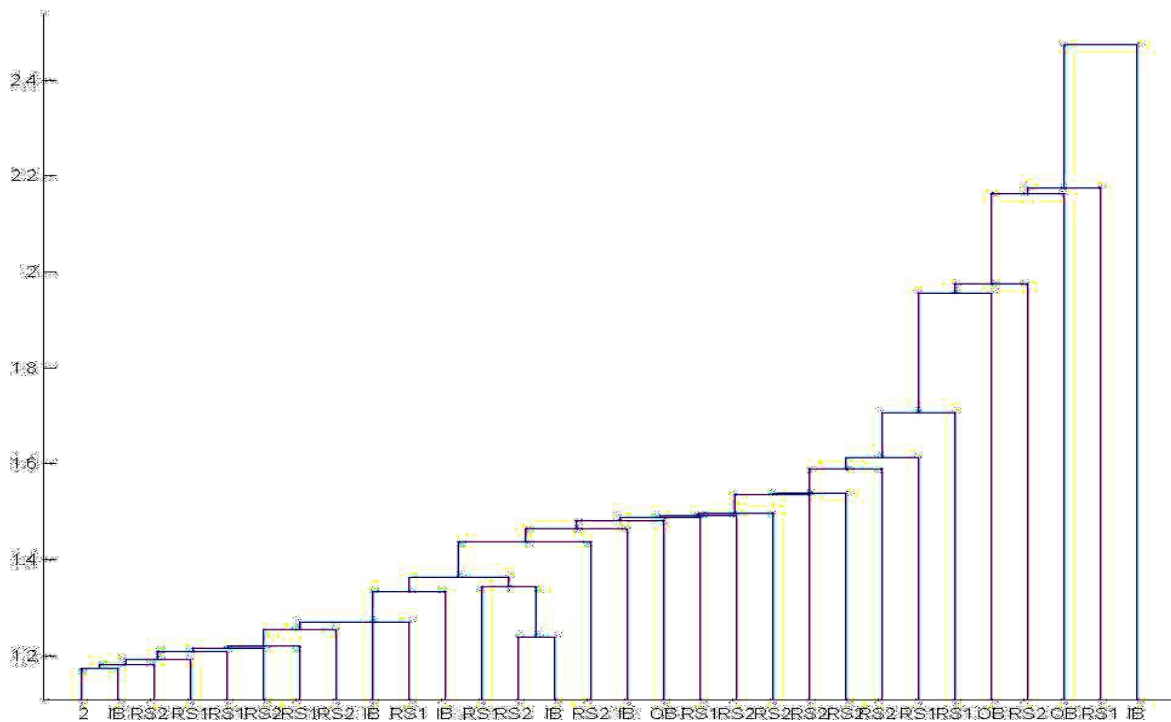
Εικόνα 10 Μέσο ηλεκτρονικό μήκος βασικού δενδριτικού πλέγματος. (α) Διάγραμμα διασποράς του μέσου ηλεκτρονικού μήκους του βασικού δενδριτικού πλέγματος για κάθε ηλεκτροφυσιολογική κατηγορία. (β) Τιμές-p για την διαφορά του μέσου όρου του μέσου ηλεκτρονικού μήκους του βασικού δενδριτικού πλέγματος για κάθε ζεύγος ηλεκτροφυσιολογικής κατηγορίας (RS1: Regular Spiking 1, RS2: Regular Spiking 2, IB: Intrinsic Bursting, OB: Oscillatory Bursting, MEL Mean Electronic Length, κατακόρυφος άξονας: τιμές μέσου ηλεκτρονικού μήκους).

συσχετιστούν, με το μέσο ηλεκτρονικό μήκος, και επομένως με τις παθητικές ιδιότητες των πυραμιδικών κυττάρων. Επιλέγεται, το βασικό δενδριτικό πλέγμα, για την μελέτη, διότι η έως τώρα επιστημονική έρευνα, έχει επικεντρωθεί στο κορυφαίο δενδριτικό πλέγμα (βλ. Εισαγωγή). Επίσης, προκειμένου να περιοριστούν οι μορφολογικοί παράγοντες, που πιθανόν να επιδρούν στο σχέδιο εκφόρτισης, ακολουθείται η ηλεκτροφυσιολογική κατηγοριοποίηση που προκύπτει με την αντικατάσταση του αρχικού σώματος με ένα σώμα μέσου όγκου (βλ Πίνακας 2 και Αποτελέσματα, 1.3.1 Αντικατάσταση του Αρχικού Σώματος με ένα Σώμα Μέσου Όγκου). Αρχικά, υπολογίζεται το μέσο ηλεκτρονικό μήκος του βασικού δενδριτικού πλέγματος, για κάθε κύτταρο και ακολουθεί στατιστικός έλεγχος t, για το αν υπάρχει διαφορά στο μέσο ηλεκτρονικό μήκος, για κάθε πιθανό ζεύγος των ηλεκτροφυσιολογικών κατηγοριών (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, 6.2 Δοκιμασία t). Τα αποτελέσματα του ελέγχου δεν αποδίδουν στατιστικά σημαντικές διαφορές, ανάμεσα στις διάφορες ηλεκτροφυσιολογικές κατηγορίες. Η μόνη περίπτωση με οριακά σημαντική στατιστική διαφορά, είναι το ζεύγος RS1-OB (τιμή-p= 0.06 από δοκιμασία t) (βλ. Εικόνα 10). Αν και αυτό το αποτέλεσμα, θα μπορούσε να έχει βιολογική σημασία, λόγω μικρού στατιστικού δείγματος, θεωρείται περισσότερο ενδεικτικό. Συμπερασματικά, το μέσο ηλεκτρονικό μήκος δεν μπορεί να προβλέψει τα σχέδια εκφόρτισης των πυραμιδικών κυττάρων. Είναι απαραίτητες επομένως και οι ενεργητικές ιδιότητες των πυραμιδικών νευρώνων, για την δημιουργία των σχεδίων εκφόρτισης τους.

1.4.2 Δενδρογράμματα

Επόμενο, βήμα είναι η εύρεση του κατάλληλου συνδυασμού των ιδιοτήτων (μορφολογικών, ενεργητικών, παθητικών) των πυραμιδικών κυττάρων, που θα μπορεί να προβλέψει το σχέδιο εκφόρτισης τους. Γι αυτό πραγματοποιείται ανάλυση ομάδων (cluster analysis). Η ανάλυση ομάδων εφαρμόζεται με την μέθοδο της ομαδοποίησης με δενδρογράμματα, για τον εντοπισμό ομάδων σε πολυδιάστατα σύνολα δεδομένων, και την εν συνεχεία κατηγοριοποίηση τους με βάση αυτά τα δεδομένα (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, 6.3.1 Δενδρογράμματα). Γίνεται προσπάθεια ομαδοποίησης των νευρώνων με κάθε μία από τις παρακάτω παραμέτρους: όγκος σώματος, σημεία διακλαδώσεων κορυφαίων και βασικών δενδριτικών πλεγμάτων, συνολικό μήκος όλων των χ-ταγή δενδρίτων στα κορυφαία και στα βασικά δενδριτικά πλέγματα, τιμές του ρεύματος των Ca^{++} εξαρτώμενων διαύλων K^+ , και μέσου ηλεκτρονικού μήκους των βασικών

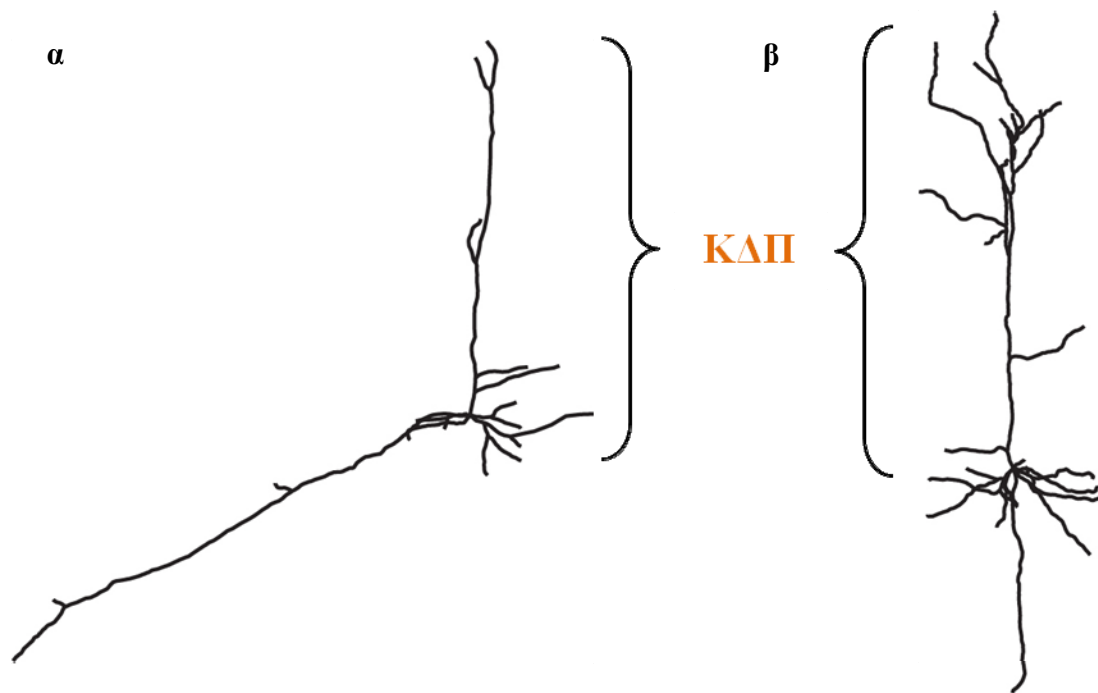
δενδριτικών πλεγμάτων. Κάθε μία παράμετρος δοκιμάζεται μόνη της, ή με οποιοδήποτε πιθανό συνδυασμό με τις υπόλοιπες. Επίσης, δοκιμάζονται και όλες οι “δυνατές μέθοδοι σύνδεσης των δεδομένων. Παρόλα αυτά δεν επιτυγχάνεται ομαδοποίηση των ιδιοτήτων των πυραμιδικών κυττάρων που να αντιστοιχεί στην ηλεκτροφυσιολογική κατηγοριοποίηση τους. Αυτό, αποδίδεται στο μικρό στατιστικό δείγμα, και όχι στην βιολογική σημασία των παραμέτρων που εξετάζονται (Εικόνα 11).



Εικόνα 11 Αντιπροσωπευτικό δενδρόγραμμα. Χρησιμοποιούνται οι εξής παράμετροι για την ομαδοποίηση: όγκος σώματος, συνολικός όγκος βασικών και κορυφαίων денδριτών, συνολικός αριθμός σημείων διακλάδωσης κορυφαίων και βασικών денδριτικών πλεγμάτων, σημεία διακλαδώσεων κορυφαίων και βασικών денδριτικών πλεγμάτων, συνολικό μήκος όλων των χ-ταγή денδρίτων στα κορυφαία και στα βασικά денδρικά πλέγματα, μήκος όλων των χ-ταγή денδρίτων στα κορυφαία και στα βασικά денδρικά πλέγματα, τιμές του ρεύματος των Ca^{++} εξαρτώμενων διαύλων K^{+} , και μέσου ηλεκτρονικού μήκους των βασικών денδριτικών πλεγμάτων. Η ομάδα «2» αντιπροσωπεύει 10 RS1, 12 RS2, 4 1B και 1OB πυραμιδικά κύτταρα. Τα σχέδια εκφόρτισης που χρησιμοποιούνται είναι που προκύπτει με μειωμένη αγωγιμότητα Ca^{++} εξαρτώμενων διαύλων K^{+}

1.5 Συσχέτιση των Βασικών Δενδριτικών Πλεγμάτων με τα Σχέδια Εκφόρτισης

Τα δύο δενδριτικά πλέγματα (κορυφαίο και βασικό) κάθε πυραμιδικού νευρώνα, διαφέρουν ως προς τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους. Προκειμένου να εξεταστεί ποιά η επίδραση του κορυφαίου και του βασικού δενδριτικού πλέγματος στην διαμόρφωση του σχεδίου εκφόρτισης, τροποποιείται η ψηφιακή αναπαράσταση της δομής όλων των πυραμιδικών κυττάρων σε δύο φάσεις. Αρχικά, γίνεται αντικατάσταση του αρχικού σώματος κάθε νευρώνα με αυτό που αντιπροσωπεύει την διάμεσο τιμή όγκου ($V_{Lm} = 819.23 \mu\text{m}^3$) του συνόλου των κυτταρικών σωμάτων, που έχουν οι πυραμιδικοί νευρώνες, που χρησιμοποιούνται για αυτή την μελέτη (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, 2.4 Ψηφιακή Ανακατασκευή Πυραμιδικών Κυττάρων με Σώμα Μέσου Όγκου, και με ένα «Απλό» ή ένα «Σύνθετο» Κορυφαίο Δενδριτικό Πλέγμα).



Εικόνα 12 «Απλό» και «Σύνθετο» κορυφαίο δενδριτικό πλέγμα. (α) «Απλό» ΚΔΠ του πυραμιδικού νευρώνα h-2b. Μορφολογικά χαρακτηριστικά: 9 κορυφαίους δενδρίτες, συνολικού μήκους 810.01 μm , με 5 σημεία διακλάδωσης (β) «Σύνθετο» ΚΔΠ του πυραμιδικού νευρώνα C3_5. Μορφολογικά χαρακτηριστικά: 25 κορυφαίους δενδρίτες, συνολικού μήκους 1833.19 μm και 13 σημεία διακλάδωσης) (ΚΔΠ: Κορυφαίο Δενδριτικό Πλέγμα)

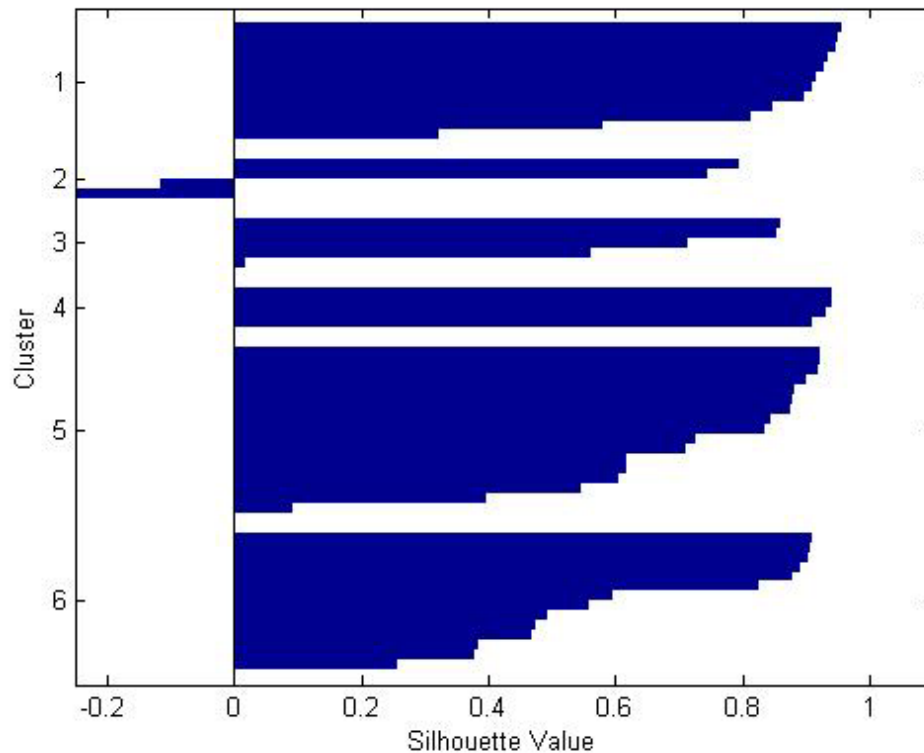
Έπειτα, από το σύνολο των ίδιων κυττάρων, επιλέγονται δύο κορυφαία δενδριτικά πλέγματα, που χαρακτηρίζονται με βάση την έκτασή τους, ως «απλό», και «σύνθετο» (βλ. Εικόνα 12). Τα κριτήρια για την επιλογή τους, είναι ο βαθμός διακλάδωσης τους και ο αριθμός, και το μήκος των δενδριτών τους. Στα, ήδη, τροποποιημένα κύτταρα γίνεται αντικατάσταση του κορυφαίου δενδριτικού τους πλέγματος, σε πρώτη φάση

με το «απλό» (από το h-2b πυραμιδικό κύτταρο, με 9 κορυφαίους δενδρίτες, συνολικού μήκους 810.01 μ m, με 5 σημεία διακλάδωσης), και έπειτα με το «σύνθετο» (από το C3_5 πυραμιδικό κύτταρο, με 25 κορυφαίους δενδρίτες, συνολικού μήκους 1833.19 μ m και 13 σημεία διακλάδωσης). Έτσι, προκύπτουν δύο ομάδες πυραμιδικών νευρώνων, που το κάθε κύτταρο της ομάδας έχει κοινό σώμα και κοινό κορυφαίο δενδριτικό πλέγμα, και διαφέρει μόνο ως προς το βασικό του δενδριτικό πλέγμα, με τα υπόλοιπα μέλη της ομάδας του. Ακολουθεί προσομοίωση τεχνικής καθήλωσης σταθερού ρεύματος, και καταγράφεται το σχέδιο εκφόρτισης τους (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, 5.1.4 Καταγραφή Σχεδίων Εκφόρτισης Πυραμιδικών Κυττάρων με Σώμα Μέσου Όγκου, και με ένα «Απλό» ή ένα «Σύνθετο» Κορυφαίο Δενδριτικό Πλέγμα). Παρατηρείται ότι και στις δύο ομάδες κυττάρων, το σχέδιο εκφόρτισης μεταβάλλεται. Στην ομάδα, με το «σύνθετο» κορυφαίο δενδριτικό πλέγμα, όλα τα σχέδια εκφόρτισης, μεταπίπτουν σε OB. Αντίθετα, στην ομάδα με το «απλό» κορυφαίο δενδριτικό πλέγμα, προκύπτει μια ποικιλία σχεδίων εκφόρτισης. Τα περισσότερα πυραμιδικά κύτταρα αποκτούν σχέδιο εκφόρτισης RS2 (n=44), κάποια από αυτά RS1 (n=5) και τα υπόλοιπα IB (n=7). Πρέπει να σημειωθεί, ότι σε αυτή την ομάδα, κανένα από τα κύτταρα δεν απέδωσε σχέδιο εκφόρτισης OB (n=0) (βλ. Πίνακας 2). Επομένως, η μορφολογία των κορυφαίων δενδριτικών πλεγμάτων, φαίνεται να έχει επίδραση στα σχέδια εκφόρτισης.

1.5.1 Αλγόριθμος k-μέσης τιμής

Λόγω της σημαντικής επίδρασης, του βασικού δενδριτικού πλέγματος στην περίπτωση του απλού κορυφαίου δενδρίτη στα σχέδια εκφόρτισης των πυραμιδικών κυττάρων, εξετάζεται κατά πόσο τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του βασικού δενδριτικού πλέγματος, μπορούν να ομαδοποιήσουν τους πυραμιδικούς νευρώνες στις ομάδες, αντίστοιχες της ηλεκτροφυσιολογικής κατηγοριοποίησης που προέκυψε, από αυτή την επίδραση (βλ. Πίνακας 2 και Αποτελέσματα, 1.5 Συσχέτιση των Βασικών Δενδριτικών Πλεγμάτων με τα Σχέδια Εκφόρτισης). Χρησιμοποιείται η μέθοδος ομαδοποίησης με τον αλγόριθμο k-μέσης τιμής (k-means), κατά την οποία οι

παρατηρήσεις των δεδομένων, αντιμετωπίζονται σαν διανύσματα που δημιουργούν



Ομάδες	Σχέδια εκφόρτισης		
	RS1	RS2	IB
1		12	
2	3	1	
3	1	4	
4			4
5	1	15	1
6		12	2

β

Εικόνα 13 *Διάγραμμα Silhouette για 6 ομάδες, με τον συνδυασμό του συνολικού μήκους και του συνολικού αριθμού όλων των χ-ταγή δενδρίτων στο βασικό δενδριτικό πλέγμα.* (α) Απεικονίζονται οι 6 ομάδες που προκύπτουν από την ανάλυση με τον αλγόριθμο k-μέσης τιμής. Όσο πιο κοντά στο +1 είναι οι τιμές silhouette των δεδομένων, τόσο πιο καλά διαχωρισμένα είναι τα δεδομένα από τις γειτονικές ομάδες. Τιμές silhouette κοντά στο 0, δείχνουν μη ισχυρό διαχωρισμό των δεδομένων, ενώ τιμές silhouette, κοντά στο -1, δείχνουν δεδομένα που πιθανόν έχουν καταταχθεί σε λάθος ομάδα. (β) Πίνακας με τον αριθμό κυττάρων από κάθε ηλεκτροφυσιολογική κατηγορία που αντιστοιχεί σε κάθε ομάδα του διαγράμματος Silhouette (RS1: Regular Spiking 1, RS2: Regular Spiking 2, IB: Intrinsic Bursting, OB: Oscillatory Bursting, κατακόρυφος άξονας: cluster: ομάδες δεδομένων, οριζόντιος άξονας: silhouette value: τιμές silhouette).

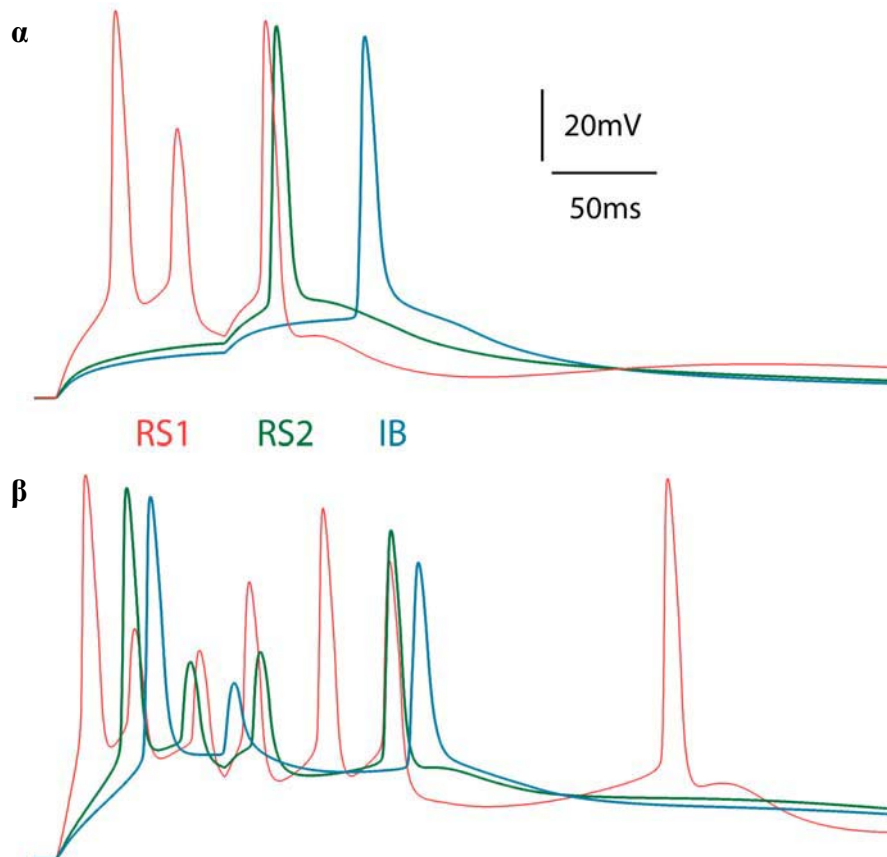
ένα διανυσματικό χώρο, και διαχωρίζονται σε k ομάδες, κατά τρόπο τέτοιο, ώστε τα μακριά γίνεται από τα δεδομένα των άλλων ομάδων (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, 6.3.2 Αλγόριθμος k-μέσης τιμής). Σε αυτή την προσπάθεια ομαδοποίησης των νευρώνων εξετάζονται οι εξής παράμετροι που αφορούν μόνο τους βασικούς δενδρίτες:

συνολικό μήκος και συνολικός αριθμός όλων των χ-ταγή δενδρίτων στο δενδριτικό πλέγμα, αριθμός διακλαδώσεων, και μέσου ηλεκτρονικού μήκους του δενδριτικού πλέγματος. Γίνονται διάφοροι συνδυασμοί των παραμέτρων αυτών, και δοκιμάζονται ομαδοποιήσεις από 2 έως 7 ομάδες (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, 6.3.2 Αλγόριθμος k-μέσης τιμής). Η καλύτερη ομαδοποίηση γίνεται για 6 ομάδες, με τον συνδυασμό του συνολικού μήκους και του συνολικού αριθμού όλων των χ-ταγή δενδρίτων στο βασικό δενδριτικό πλέγμα. Σε αυτή την περίπτωση αποκαλύπτεται μία ομάδα που αποτελείται μόνο από κύτταρα με σχέδιο εκφόρτισης IB. Επιπλέον, προκύπτει μια αμιγής ομάδα RS2 κυττάρων και τρεις με προσμίξεις από RS1 και IB κύτταρα. Τα περισσότερα κύτταρα RS1 σχηματίζουν μια μικρή ομάδα, με ένα μόνο κύτταρο RS2, να συμπεριλαμβάνεται στην ίδια ομάδα. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι είναι δυνατή η ομαδοποίηση των κυττάρων στις κατηγορίες που αντιστοιχούν στα σχέδια εκφόρτισης τους με τη χρήση συγκεκριμένων μορφολογικών χαρακτηριστικών (βλ. Εικόνα 13)

2. Μελέτη δυναμικών ενεργείας με ενεργοποίηση Συναπτικών Μηχανισμών

Τα πυραμιδικά κύτταρα δέχονται πλήθος συναπτικών σημάτων, που έχουν ως αποτέλεσμα την δημιουργία τοπικών δενδριτικών δυναμικών. Αυτά τα δυναμικά ενεργείας διαμορφώνονται σημαντικά από τους υποδοχείς NMDA, στους βασικούς δενδρίτες. Επιπλέον, στα πυραμιδικά κύτταρα εντοπίζονται και υποδοχείς AMPA, που διεγείρονται και αυτοί από το γλουταμινικό οξύ και υποστηρίζουν γρήγορα διεργετικά μετασυναπτικά ρεύματα (Antic SD *et al.*, 2010). Λόγω της επίδρασης του βασικού δενδριτικού πλέγματος στα σχέδια εκφόρτισης, όπως υποδεικνύεται από τα προηγούμενα αποτελέσματα, ακολουθεί η εξέταση κάποιων χαρακτηριστικών των δυναμικών ενεργείας που προκαλούνται μετά από ενεργοποίηση συναπτικών μηχανισμών. Για αυτό τον σκοπό, χρησιμοποιούνται τα τροποποιημένα πυραμιδικά κύτταρα της ομάδας που φέρει το «απλό» κορυφαίο δενδριτικό πλέγμα (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, 2.4. Ψηφιακή Ανακατασκευή Πυραμιδικών Κυττάρων με σώμα μέσου όγκου, και με ένα «απλό» ή ένα «σύνθετο» κορυφαίο δενδριτικό πλέγμα), στα οποία γίνεται προσομοίωση διέγερσης των κυττάρων μέσω συναπτικών ερεθισμάτων (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, 4.2 Προσομοίωση Συναπτικής Διέγερσης). Εφαρμόζονται διαδοχικά δύο συνθήκες από 10 επαναλήψεις, όπου στην πρώτη προσομοίωση, η αναλογία του ρεύματος NMDA προς το ρεύμα AMPA είναι 1:1 (Wang H *et al.*,

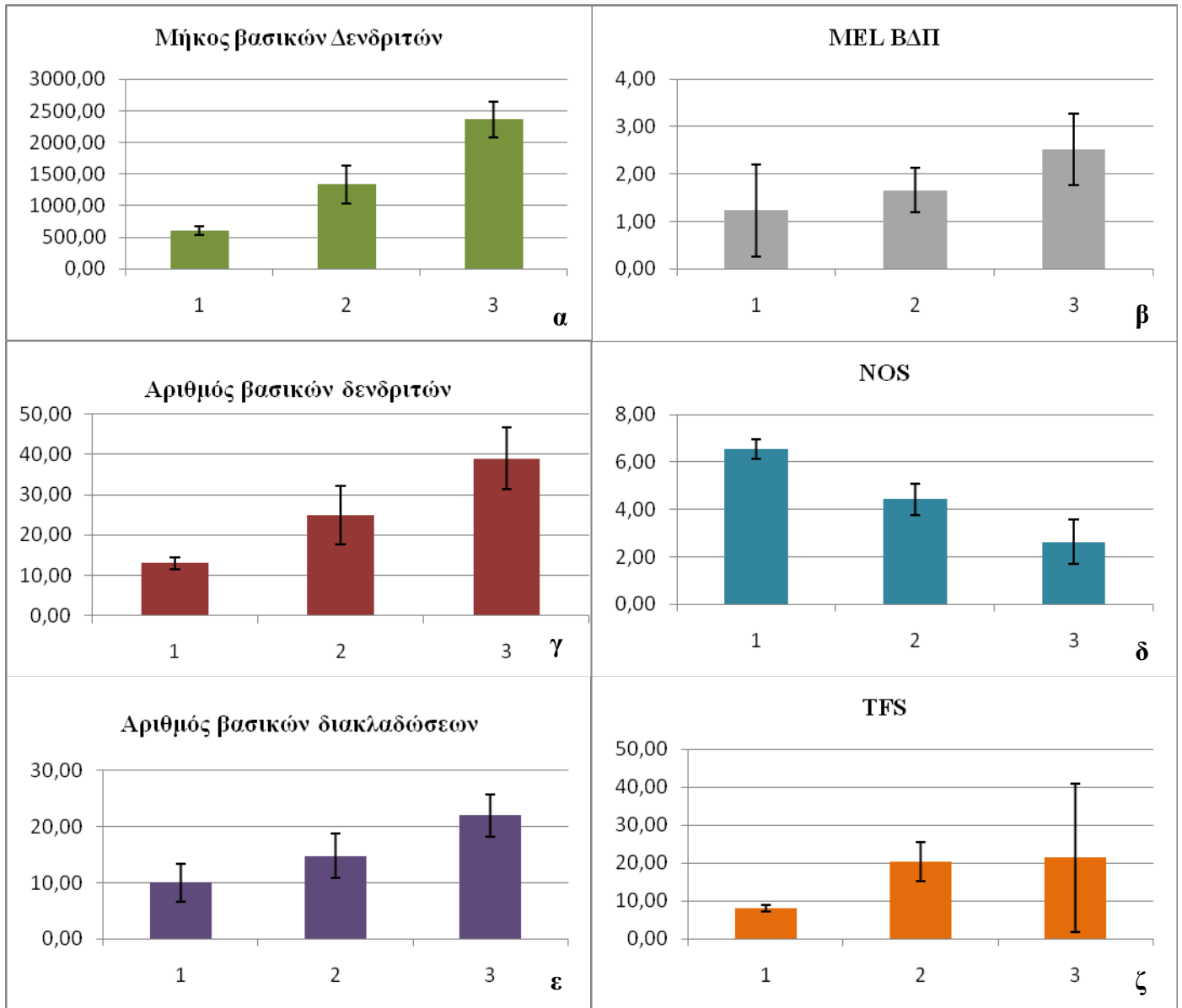
2008), ενώ στην δεύτερη διπλασιάζεται η αναλογία του ρεύματος NMDA προς το ρεύμα AMPA (Seamans *et al.*, 2001)



Εικόνα 14 Δυναμικά ενεργείας προκαλούμενα από την ενεργοποίηση των NMDA υποδοχέων. Απεικονίζονται οι κυματομορφές των δυναμικών ενεργείας πυραμιδικών κυττάρων με διαφορετικά σχέδια εκφόρτισης (RS1: πυραμιδικό κύτταρο L-2a, RS2: πυραμιδικό κύτταρο: 39-4a, IB: πυραμιδικό κύτταρο 48-3a) όπως αυτές προκύπτουν από την συναπτική ενεργοποίηση, των NMDA υποδοχέων (α) Η αναλογία ρεύματος NMDA προς το ρεύμα AMPA είναι 1:1 (β) Η αναλογία του ρεύματος NMDA προς το ρεύμα AMPA είναι 2:1 (RS1: *Regular Spiking 1*, RS2: *Regular Spiking 2*, IB: *Intrinsic Bursting*),

Καταγράφεται, αντίστοιχα, η χρονική στιγμή που παράγεται το πρώτο δυναμικό ενεργείας στο σώμα (Time to First Spike-TFS), που είναι ένδειξη του χρόνου μετάδοσης της πληροφορίας από τα βασικά δενδρτικά πλέγματα στο σώμα, και ο μέσος όρος του αριθμού των σωματικών δυναμικών ενεργείας (Number Of Spike-NOS), που είναι ένδειξη του είδους της πληροφορίας (κωδικοποίηση), που παράγεται στα βασικά δενδρτικά πλέγματα. Στην συνέχεια, επιχειρείται η συσχέτιση των χαρακτηριστικών αυτών με το σχέδιο εκφόρτισης, το συνολικό μήκος και τον συνολικό αριθμό όλων των χ-ταγή δενδρίτων στο βασικό δενδρτικό πλέγμα, τον αριθμό διακλαδώσεων, και του μέσου ηλεκτρονικού μήκους του βασικού δενδρτικού πλέγματος. Η καλύτερη συσχέτιση των χαρακτηριστικών των δυναμικών ενεργείας,

του σχεδίου εκφόρτισης των κυττάρων και των μορφολογικών χαρακτηριστικών του βασικού δενδριτικού πλέγματος, γίνεται με την κατάταξη των κυττάρων ανάλογα με το συνολικό μήκος των βασικών δενδριτών. Προκύπτουν τρεις ομάδες: (1) ομάδα 1, που είναι αμιγής ομάδα IB κυττάρων, (2) ομάδα 2, που είναι μεγάλη και περιλαμβάνει την πλειονότητα των RS2 κυττάρων, τα υπόλοιπα IB και ένα RS1, και την (3) ομάδα 3, που περιλαμβάνει ένα RS1 και τέσσερα κύτταρα RS2. Οι ομάδες αυτές είναι αντίστοιχες των ομάδων, που αποδίδει ο αλγόριθμος k-μέσης τιμής (βλ. Αποτελέσματα 1.5.1 Αλγόριθμος k-μέσης τιμής και Εικόνα 13 και Εικόνα 15). Τα κύτταρα που περιλαμβάνονται στην Ομάδα 1, φαίνεται να έχουν πιο απλό βασικό δενδριτικό πλέγμα όσο αναφορά το συνολικό μήκος και τον αριθμό των βασικών δενδριτών, αλλά και τον αριθμό των βασικών διακλαδώσεων, και μικρότερο μέσο ηλεκτρονικό μήκος. Επιπλέον, έχουν μεγαλύτερο μέσο όρο δυναμικών ενεργείας, και μικρότερο χρόνο μετάδοσης του σήματος. Τα κύτταρα που περιλαμβάνονται στην Ομάδα 2, φαίνεται να έχουν ενδιάμεσο βασικό δενδριτικό πλέγμα όσο αναφορά το συνολικό μήκος και τον αριθμό των βασικών δενδριτών, αλλά και τον αριθμό των βασικών διακλαδώσεων, και ενδιάμεσο μέσο ηλεκτρονικό μήκος. Επιπλέον, έχουν ενδιάμεσο μέσο όρο δυναμικών ενεργείας, και ενδιάμεσο χρόνο μετάδοσης του σήματος. Τα κύτταρα που περιλαμβάνονται στην Ομάδα 3, φαίνεται να έχουν το πιο πολύπλοκο βασικό δενδριτικό πλέγμα όσο αναφορά το συνολικό μήκος και τον αριθμό των βασικών δενδριτών, αλλά και τον αριθμό των βασικών διακλαδώσεων, και μεγαλύτερο ηλεκτρονικό μήκος. Επιπλέον, έχουν και τον μικρότερο μέσο όρο δυναμικών ενεργείας, και μεγαλύτερο χρόνο μετάδοσης του σήματος. Συγκεντρωτικά, υποδεικνύεται, ότι η επίδραση της μορφολογίας των βασικών δενδριτικών πλεγμάτων είναι σημαντική για την ενοποίηση συναπτικών ερεθισμάτων, καθότι επηρεάζει, τόσο την ακρίβεια της χρονικής στιγμής της μετάδοσης του σήματος, όσο και της κωδικοποίησης του (βλ. Εικόνα 14 και Εικόνα 15).



Ομάδες	Σχέδια εκφόρτισης		
	RS1	RS2	IB
1			4
2	1	43	3
3	1	4	

η

Εικόνα 15 Συσχέτιση μορφολογικών χαρακτηριστικών του ΒΑΠ και κάποιων χαρακτηριστικών των δυναμικών ενεργειάς που άγονται μέσω των υποδοχέων NMDA. Τα πυραμιδικά κύτταρα έχουν χωριστεί σε 3 ομάδες, με βάση την κατάταξη που δίνει το συνολικό μήκος των βασικών δενδριτών. Σε όλα τα διαγράμματα απεικονίζετε ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση του χαρακτηριστικού που αποδίδουν, στο σύνολο των πυραμιδικών κυττάρων κάθε ομάδας. (α) Διάγραμμα μήκους βασικών δενδριτών, Ομάδα 1: $\mu = 612.50\mu\text{m}$, $s = 68.47$, Ομάδα 2: $\mu = 1338.96\mu\text{m}$, $s = 298.74$, Ομάδα 3: $\mu = 2363.76\mu\text{m}$, $s = 280.75$, (β) Διάγραμμα MEL ΒΑΠ, Ομάδα 1: $\mu = 1.23$, $s = 0.96$, Ομάδα 2: $\mu = 1.66$, $s = 0.47$, Ομάδα 3: $\mu = 2.51$, $s = 0.75$, (γ) Διάγραμμα αριθμού βασικών δενδριτών, Ομάδα 1: $\mu = 13$, $s = 1.41$, Ομάδα 2: $\mu = 24.94$, $s = 7.28$, Ομάδα 3: $\mu = 39$, $s = 7.71$, (δ) Διάγραμμα NOS, Ομάδα 1: $\mu = 6.55$, $s = 0.42$, Ομάδα 2: $\mu = 4.42$, $s = 0.64$, Ομάδα 3: $\mu = 2.64$, $s = 0.92$, (ε) Διάγραμμα αριθμού βασικών διακλαδώσεων, Ομάδα 1: $\mu = 10$, $s = 3.37$, Ομάδα 2: $\mu = 14.74$, $s = 3.98$, Ομάδα 3: $\mu = 22$, $s = 3.74$, (ζ) Διάγραμμα TFS, Ομάδα 1: $\mu = 8.09$, $s = 0.98$, Ομάδα 2: $\mu = 20.41$, $s = 5.12$, Ομάδα 3: $\mu = 21.39$, $s = 19.66$ (η) Πίνακας με τον αριθμό κυττάρων από κάθε ηλεκτροφυσιολογική κατηγορία που αντιστοιχεί σε κάθε ομάδα που δίνει η κατάταξη με βάση το συνολικό μήκος των βασικών δενδριτών (RS1:

Regular Spiking 1, RS2: Regular Spiking 2, IB: Intrinsic Bursting, OB: Oscillatory Bursting, MEL: Mean Electronic Length, NOS: Number of Spikes, TFS: Time of First Spike ΒΔΠ: Βασικό Δενδριτικό Πλέγμα)

3. Σύνοψη αποτελεσμάτων

Τα παραπάνω αποτελέσματα συνοψίζονται ως εξής: (1) Ο όγκος του σώματος συσχετίζεται με τα σχέδια εκφόρτισης, αλλά δεν είναι καθοριστικός παράγοντας διαφοροποίησης τους. (2) Τα σύνθετα κορυφαία δενδριτικά πλέγματα όσο αναφορά τον όγκο, το μήκος και τον αριθμό των κορυφαίων δενδριτών και τον αριθμό των κορυφαίων διακλαδώσεων τους σχετίζονται με σχέδια εκφόρτισης IB και OB. (3) Τα απλά βασικά δενδριτικά πλέγματα όσο αναφορά τον όγκο, το μήκος και τον αριθμό των βασικών δενδριτών, τον αριθμό των βασικών διακλαδώσεων σχετίζονται με σχέδια εκφόρτισης IB. (4) Καμιά μορφολογική παράμετρος των κορυφαίων και βασικών δενδριτικών πλεγμάτων δεν έχει ειδοποιό επίδραση από μόνη της, στην ηλεκτροφυσιολογική κατηγοριοποίηση, αλλά μόνο συνδυασμό τους. (5) Οι βιοφυσικές ιδιότητες παθητικές, αναφορικά με το μέσο ηλεκτρονικό μήκος, και ενεργητικές ιδιότητες, αναφορικά με το ρεύμα που άγεται από τους Ca^{++} εξαρτώμενων διαύλους K^{+} (fAHP), δεν είναι καθοριστικοί παράγοντες αυτές καθαυτές για την ηλεκτροφυσιολογική κατηγοριοποίηση. (6) Τα δυναμικά ενεργείας που άγονται μέσω του υποδοχέα NMDA, έχουν μικρότερο χρόνο μετάδοσης και πιο πολύπλοκη κωδικοποίηση στα απλά βασικά δενδριτικά πλέγματα, και σχετίζονται με σχέδια εκφόρτισης IB.

Συζήτηση

IV. Συζήτηση

1. Ανάλυση Αποτελεσμάτων

Οι πυραμιδικοί νευρώνες συνιστούν την πλειονότητα των κυττάρων του εγκεφάλου. Χαρακτηρίζονται, από ιδιαίτερα πολύπλοκη δομή, που αποτελείται από ένα τριγωνικού σχήματος κυτταρικό σώμα, απ' όπου εκφύονται το βασικό και κορυφαίο δενδριτικό πλέγμα. Στο βασικό δενδριτικό πλέγμα, οι δενδρίτες είναι πολυάριθμοι, και είτε διακλαδίζονται αρκετές φορές, είτε όχι ενώ στο κορυφαίο δενδριτικό πλέγμα, ξεχωρίζει ο κύριος κορυφαίος δενδρίτης (apical trunk), ο οποίος είναι μεγάλου μήκους, και συνδέει το σώμα με μία συστάδα κορυφαίων δενδριτών (apical tuft). Επιπλέον, κορυφαίοι δενδρίτες, που διακλαδίζονται μία ή δύο φορές, ξεπροβάλλουν, υπό διάφορες γωνίες, παράπλευρα του κύριου δενδρίτη (oblique dendrites). Τα κύτταρα αυτά συμμετέχουν σε εξαιρετικά πολύπλοκους υπολογισμούς, προκειμένου να συντονίσουν τον οργανισμό με το εξωτερικό και εσωτερικό του περιβάλλον, χωρίς να είναι γνωστή η ακριβής λειτουργικότητα της μοναδικής κυτταροαρχιτεκτονικής δομής τους. Το πρώτο βήμα στον χαρακτηρισμό, του νευροβιολογικού υπόβαθρου πολύπλοκων γνωστικών λειτουργιών είναι η διερεύνηση τόσο του ρόλου των ιδιαίτερων δομικών χαρακτηριστικών των πυραμιδικών κυττάρων, όσο και της μορφολογικής ποικιλομορφίας, που παρατηρείται μεταξύ των πυραμιδικών κυττάρων, στην ικανότητά τους να πραγματοποιούν διαφορετικούς υπολογισμούς (Branco T and Hausser M, 2010 ; Elston GN, 2003 ; London M and M Hausser M, 2005 ; Stuart G et al, 1999 ; Spruston N, 2008).

Αντιστοίχως, το βασικό επιστημονικό ερώτημα, που εξετάζει η παρούσα εργασία, είναι το πώς μπορεί να συσχετιστεί η μορφολογία των πυραμιδικών κυττάρων με τα σχέδια εκφόρτισης τους. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιούνται μοντέλα πυραμιδικών νευρώνων με διαφορετικά μορφολογικά χαρακτηριστικά, και εξετάζεται το σχέδιο εκφόρτισης, που αυτά αποδίδουν. Αρχικά, καταγράφονται με λεπτομέρεια τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των πυραμιδικών κυττάρων, και έπειτα μελετάται η συσχέτιση τους με τα σχέδια εκφόρτισης. Δίνεται ιδιαίτερη σημασία στο βασικό δενδριτικό πλέγμα, καθότι, μέχρι του παρόντος, οι επιστημονικές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στο κορυφαίο δενδριτικό πλέγμα. Προκειμένου, τα αποτελέσματα να είναι όσο πιο κοντά γίνεται στην βιολογική πραγματικότητα, δεν επιχειρείται καμία επέμβαση στην δομή των επιμέρους κυτταρικών τμημάτων, τα οποία είναι ακριβείς γεωμετρικά αναπαραστάσεις της δομής πραγματικών νευρώνων.

Εν τούτοις, για τις ανάγκες της πειραματικής διαδικασίας, γίνεται τροποποίηση της βασικής δομής των νευρώνων, αντικαθιστώντας ολόκληρα κυτταρικά τμήματα (σώμα, βασικό δενδριτικό πλέγμα, κορυφαίο δενδριτικό πλέγμα), με άλλα που προέρχονται από τον πληθυσμό που μελετάται, χωρίς καμία επιπλέον αλλαγή στα λεπτομερή μορφολογικά χαρακτηριστικά των τμημάτων αυτών. Με αυτό τον τρόπο δημιουργούνται ετερογενείς πληθυσμοί πυραμιδικών κυττάρων που διαφοροποιούνται μεταξύ τους, σε ένα, ή το πολύ δύο γεωμετρικά χαρακτηριστικά γεγονός που διευκολύνει την αποσαφήνιση του ρόλου τους στον καθορισμό του σχεδίου εκφόρτισης. Στη συνέχεια γίνεται και επιπλέον διερεύνηση του ρόλου συγκεκριμένων βιοφυσικών μηχανισμών στην απόκριση του κυττάρου.

Η λεπτομερής μορφολογική ανάλυση αποκαλύπτει έναν πληθυσμό κυττάρων, που φέρει τα τυπικά χαρακτηριστικά των πυραμιδικών κυττάρων της στιβάδας V (Larkman AU, 1991a, 1991b, 1991c). Έτσι, καταγράφεται μεγάλο εύρος στο μέγεθος του σώματος και στην πολυπλοκότητα των δενδριτικών πλεγμάτων, καθώς και στο μήκος και τον αριθμό των δενδριτών τους. Η πρώτη καταγραφή με προσομοίωση τεχνική καθήλωσης σταθερού ρεύματος δίνει 3 διαφορετικούς ηλεκτροφυσιολογικούς πληθυσμούς (RS1, RS2 και IB). Ο μικρός αριθμός διαφορετικών σχεδίων εκφόρτισης πιθανόν να οφείλεται στο μικρό στατιστικό δείγμα. Το σχέδιο εκφόρτισης, που παράγει κάθε κύτταρο σε αυτό το πείραμα είναι συνδυασμός των ενεργητικών και παθητικών ιδιοτήτων των δενδριτών, καθώς και της μορφολογίας του κυττάρου ως σύνολο. Προκειμένου, να γίνει πιο διακριτή η επίδραση της μορφολογίας στα σχέδια εκφόρτισης, επαναλαμβάνεται η προσομοίωση τεχνικής καθήλωσης σταθερής τάσης, αλλά με μειωμένη αγωγιμότητα των Ca^{++} εξαρτώμενων διαύλων K^+ (BK διάυλοι). Τα κανάλια αυτά, υπό φυσιολογικές συνθήκες, ευθύνονται για την γρήγορη μεθυπερπόλωση (fAHP) και περιορίζουν την συχνότητα εκφόρτισης των δυναμικών ενεργείας (Cui J *et al.*, 2009). Επομένως, μειώνοντας την αγωγιμότητα των διαύλων αυτών, αυξάνεται η πιθανότητα γένεσης νέων δυναμικών ενεργείας κατά την προσομοίωση ενός διεργετικού σωματικού ερεθίσματος, καθώς περιορίζεται το φαινόμενο της μεθυπερπόλωσης. Κατά την πειραματική διαδικασία, η μείωση του ρεύματος των Ca^{++} εξαρτώμενων διαύλων K^+ σε όλους τους πυραμιδικούς νευρώνες, αναδεικνύει πιο έντονα την επίδραση των μορφολογικών χαρακτηριστικών στην πρότυπα εκφόρτισης των κυττάρων. Τα καινούργια σχέδια εκφόρτισης, που προκύπτουν για κάθε κύτταρο, δεν εξαρτώνται από το πρότερο σχέδιο εκφόρτισης του κυττάρου, εφόσον δεν παρατηρείται κάποια συσχέτιση του σχεδίου εκφόρτισης

πριν και μετά την μείωση του ρεύματος BK. Συγχρόνως, η αλλαγή αυτή αποκαλύπτει και έναν τέταρτο ηλεκτροφυσιολογικό πληθυσμό, τα κύτταρα OB. Έτσι, υποδεικνύεται ότι το σχέδιο εκφόρτισης κάθε νευρώνα είναι αποτέλεσμα πολύπλοκων υπολογισμών, με παραμέτρους τόσο τους ιοντικούς μηχανισμούς και όσο την μορφολογία των πυραμιδικών δενδριτικών πλεγμάτων.

Η πολύπλευρη αυτή διαμόρφωση του σχεδίου εκπόλωσης, προκύπτει και από τη μελέτη της επίδρασης του όγκου του σώματος στα σχέδια εκφόρτισης. Διαπιστώνεται, ότι ο όγκος του σώματος δεν καθορίζει από μόνος του το σχέδιο εκφόρτισης ενός πυραμιδικού νευρώνα, (παρόλο που σε αρκετά κύτταρα υπάρχει μετάπτωση σε διαφορετικό σχέδιο όταν γίνεται αντικατάσταση του αρχικού σώματος τους με ένα μέσου όγκου). Εν τούτοις, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη το μικρό στατιστικό δείγμα στους IB και OB πληθυσμούς, καθώς είναι αδύνατη η παρατήρηση της διαφοροποίησης στο σχήμα και στον όγκο του σώματος ανάμεσα στα RS και IB κύτταρα που υποδεικνύεται σε άλλες μελέτες (Bilkey DK and PA Schwartzkroin, 1990 ; Chagnac-Amitai Y *et al.*, 1990 ; Kasper EM *et al.*, 1994 ; Mason A and Larkman A, 1990 ; Yang CR *et al.*, 1996). Πέρα, όμως, από τα πλαίσια του στατιστικού λάθους, ίσως η επίδραση του μεγέθους του σώματος στο σχέδιο εκφόρτισης να καλύπτεται από την επίδραση των άλλων κυτταρικών τμημάτων, δηλαδή του βασικού και κορυφαίου δενδριτικού πλέγματος. Τέλος, ο διαφορετικός όγκος του σώματος, μπορεί να εξυπηρετεί περισσότερο χωροταξικά θέματα. Με άλλα λόγια, σε ένα κύτταρο που έχει αρκετά εκτεταμένα δενδριτικά πλέγματα, όπως οι πυραμιδικοί νευρώνες με σχέδια εκφόρτισης σε ομάδες δυναμικών ενεργειών, ίσως είναι απαραίτητο και ένα μεγαλύτερο και πιο πεπλατυσμένο σώμα, για να μπορεί να στηρίξει αυτή την μορφολογία.

Οι έως τώρα επιστημονικές μελέτες αναφέρουν ότι οι νευρώνες που πυροδοτούν με ριπές δυναμικών ενεργειών (bursts) φέρουν πιο εκτεταμένα και πολύπλοκα δενδριτικά πλέγματα με μεγαλύτερο όγκο, σε σχέση με αυτούς που εκφορτίζουν τονικά δυναμικά ενεργειών. Αυτό υποστηρίζεται και από πειραματικά δεδομένα (Bilkey DK and PA Schwartzkroin, 1990 ; Chagnac-Amitai Y *et al.*, 1990 ; Kasper EM *et al.*, 1994 ; Mason A and Larkman A, 1990; Yang CR *et al.*, 1996), αλλά και από θεωρητικές προσεγγίσεις (Mainen ZF and TJ Sejnowski, 1996 ; van Elburg RA and van Ooyen A, 2010). Ποσοτική ανάλυση των σημείων διακλάδωσης, του αριθμού των δενδριτών ανά σημείο διακλάδωσης, και του συνολικού όγκου των κορυφαίων και βασικών δενδριτικών πλεγμάτων επιβεβαιώνει τα παραπάνω

αποτελέσματα και στα κύτταρα που χρησιμοποιούνται σε αυτή την μελέτη. Πιο συγκεκριμένα, τα πυραμιδικά κύτταρα με σχέδια εκφόρτισης IB και OB φαίνεται να σχετίζονται με πιο σύνθετα κορυφαία δενδριτικά πλέγματα όσο αναφορά τον όγκο, το μήκος, τον αριθμό των κορυφαίων δενδριτών και τον αριθμό των κορυφαίων διακλαδώσεων τους, και με πιο απλά βασικά δενδριτικά πλέγματα όσο αναφορά τα ίδια μορφολογικά χαρακτηριστικά. Το αντίθετο ισχύει για τα πυραμιδικά κύτταρα με σχέδιο εκφόρτισης RS1 και RS2 (δηλαδή, πιο απλά κορυφαία και πιο σύνθετα βασικά δενδριτικά πλέγματα). Ωστόσο, η προσπάθεια ομαδοποίησης, των κυττάρων που αντιστοιχούν στις τέσσερις ηλεκτροφυσιολογικές κατηγορίες (RS1, RS2, IB, OB) με την μέθοδο του δενδρογράμματος δεν δείχνει μια σαφή κατηγοριοποίηση. Την ίδια έκβαση, έχουν και οι ομαδοποιήσεις με βάση τον όγκο σώματος, με βάση το συνολικό μήκος όλων των χ -ταγή δενδριτών στα κορυφαία και στα βασικά δενδριτικά πλέγματα, με βάση τις τιμές του ρεύματος των Ca^{++} εξαρτώμενων διάυλων K^+ και με βάση το μέσο ηλεκτρονικό μήκος των βασικών δενδριτικών πλεγμάτων. Δεδομένου ότι οι δενδρίτες έχουν πληθώρα παθητικών και ενεργητικών χαρακτηριστικών, πιθανόν καμία από αυτές τις παραμέτρους να μην έχει από μόνη της καταλυτική επίδραση στο σχέδιο εκφόρτισης. Από την άλλη, ούτε ο οποιοσδήποτε συνδυασμός τους δεν είναι ικανός να αποδώσει ομάδες στο δενδρογράμμα, για τις τέσσερις ηλεκτροφυσιολογικές κατηγορίες. Αυτό, πιθανόν, οφείλεται, στο μικρό στατιστικό δείγμα του αρχικού πληθυσμού. Αξιοσημείωτο είναι ότι, απλουστεύοντας τις παραμέτρους της πειραματικής διαδικασίας, με τη χρήση κυττάρων με ίδιο σώμα και κορυφαίο δενδριτικό πλέγμα, αλλά διαφορετικό βασικό δενδριτικό πλέγμα, αναδεικνύεται μια συστηματική συσχέτιση των μορφολογικών χαρακτηριστικών του βασικού δενδριτικού πλέγματος με το σχέδιο εκφόρτισης.

Η πλειονότητα των συναπτικών σημάτων που δέχονται οι πυραμιδικοί νευρώνες τις στιβάδας V, είναι στο βασικό δενδριτικό τους πλέγμα (Larkman AU, 1991). Μέχρι πρόσφατα, λόγω έλλειψης κατάλληλης τεχνολογικής προσέγγισης, η επιστημονική έρευνα, είχε επικεντρωθεί στο κορυφαίο δενδριτικό πλέγμα (Hausser M *et al.*, 2000). Γι' αυτό το λόγο, στην παρούσα εργασία, εξετάζεται ο βαθμός που μπορεί να επιδράσει η μορφολογία του βασικού δενδριτικού πλέγματος στην διαμόρφωση του σχεδίου εκφόρτισης, συγκριτικά με την επίδραση της μορφολογία του κορυφαίου. Παρατηρείται ότι ένα κορυφαίο δενδριτικό πλέγμα με σύνθετη μορφολογία έχει καταλυτική δράση στο σχέδιο εκφόρτισης, μεταβαλλόντας όλα τα κύτταρα σε OB, ανεξάρτητα από τη μορφολογία του βασικού δενδριτικού πλέγματος.

Αντίθετα, ένα μορφολογικά απλό κορυφαίο δενδριτικό πλέγμα, δεν επιφέρει τα ίδια αποτελέσματα. Επομένως, το βασικό δενδριτικό πλέγμα παίζει ρόλο στην διαμόρφωση του σχεδίου εκφόρτισης. Και σ' αυτή την περίπτωση δεν ακολουθείται κάποιος κανόνας στην μετάπτωση από το ένα σχέδιο εκφόρτισης σε ένα άλλο. Ωστόσο, οι ηλεκτροφυσιολογικές κατηγορίες κυττάρων που προκύπτουν δεν περιλαμβάνουν την OB, αλλά μόνο τις RS1, RS2 και IB. Η ομαδοποίηση με αλγόριθμο k-μέση τιμής, χρησιμοποιώντας ως παραμέτρους το συνολικό μήκος, και τον συνολικό αριθμό όλων των χ-ταγή δενδρίτων του βασικού δενδριτικού πλέγματος, επιτυγχάνει να παράγει ομάδες που αντιστοιχούν στις ηλεκτροφυσιολογικές κατηγορίες, που προκύπτουν από την επίδραση του βασικού δενδριτικού πλέγματος. Μια υπόθεση που μπορεί να γίνει είναι ότι η επίδραση του βασικού δενδριτικού πλέγματος, οφείλεται στον βαθμό της έκτασης του, ή στον όγκο του. Τα αποτελέσματα δείχνουν μια τάση των κύτταρων με σχέδια εκφόρτισης IB και OB, να έχουν πιο απλά βασικά, και πιο σύνθετα κορυφαία δενδριτικά πλέγματα (αναφορικά με τον όγκο, το μήκος και τον αριθμό των βασικών δενδριτών, τον αριθμό των βασικών διακλαδώσεων), σε σύγκριση με τα κύτταρα με σχέδια εκφόρτισης RS1 και RS2. Αυτός, όμως, ο συνδυασμός μορφολογικών παραμέτρων δεν μπορεί να είναι απόλυτα καθοριστικός για το σχέδιο εκφόρτισης, καθότι, ακόμα και με απλό κορυφαίο δενδριτικό πλέγμα, πολλά κύτταρα διατηρούν το ίδιο σχέδιο εκφόρτισης, παρόλο που διαθέτουν πιο πολύπλοκο βασικό δενδριτικό πλέγμα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μορφολογία των κορυφαίων και βασικών δενδριτικών πλεγμάτων διαφέρει σημαντικά στην τοπολογία της. Τα κορυφαία δενδριτικά πλέγματα καταλήγουν σε έναν παχύ κορυφαίο δενδρίτη, που μεταφέρει το σήμα στο σώμα. Αντίθετα, τα βασικά δενδριτικά πλέγματα αποτελούνται από μικρότερα σε μήκος δενδριτικά πλέγματα και από μονήρεις δενδρίτες, που εκφύονται απευθείας από το σώμα. Επομένως, ακόμα και στην περίπτωση που το βασικό και το κορυφαίο δενδριτικό πλέγμα έχουν ίδιο όγκο και συνολικό μήκος, λόγω της ιδιαίτερης διακλάδωσης του καθενός, το συνολικό σήμα που θα αποφέρει το καθένα από αυτά στο σώμα, δεν μπορεί να είναι το ίδιο, άρα ούτε και η επίδραση τους στο σχέδιο εκφόρτισης. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στην οπισθοδιάδοση του ρεύματος που δημιουργείται και η οποία επηρεάζεται σημαντικά από την μορφολογία του δενδριτικού πλέγματος.

Ένα βασικό χαρακτηριστικό των δενδριτικών πλεγμάτων των πυραμιδικών νευρώνων, είναι οι πολυάριθμες γλουταμινεργικές συνάψεις που δέχονται. Η

ταυτόχρονη ενεργοποίηση 10-50 γειτονικών γλουταμινεργικών συνάψεων προκαλεί την γένεση των τοπικών δενδριτικών δυναμικών ενεργείας NMDA. Όταν τα δυναμικά αυτά έχουν σημείο έναρξης το κορυφαίο δενδριτικό πλέγμα φέρουν ένα μεγάλο τμήμα του σε μία συνεχόμενη εκπολωτική κατάσταση. Στην περίπτωση που έχουν αφετηρία το βασικό δενδριτικό πλέγμα τότε φέρουν το σώμα σε αυτή την συνεχής εκπολωτική φάση. Επιπλέον, ασχέτως του σημείου γένεσης τους, δίνουν επιπλέον υπολογιστική δύναμη στο νευρικό κύτταρο, λόγω των ευνοϊκών συνθηκών που δημιουργούν για τον χωροχρονικό συνδυασμό των συναπτικών σημάτων και της πληροφορίας που δέχεται ο νευρώνας (Antic SD *et al.*, 2010). Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης υποδεικνύουν ότι τα πυραμιδικά κύτταρα με πιο απλό βασικό δενδριτικό πλέγμα (ως προς το μήκος και τον αριθμό των βασικών δενδριτών και τον αριθμό των βασικών διακλαδώσεων), και με μικρότερο μέσο ηλεκτρονικό μήκος, έχουν μεγαλύτερο μέσο όρο δυναμικών ενεργείας, μικρότερο χρόνο διάδοσης του σήματος που άγεται μέσω των υποδοχέων NMDA, και σχέδιο εκφόρτισης IB. Πυραμιδικά κύτταρα με ενδιάμεσης πολυπλοκότητας με βασικό δενδριτικό πλέγμα, και μικρό μέσο ηλεκτρονικό μήκος παρουσιάζουν ενδιάμεσο μέσο όρο δυναμικών ενεργείας ενδιάμεσο χρόνο μετάδοσης του σήματος, και σχέδιο εκφόρτισης RS2. Τέλος, τα πυραμιδικά κύτταρα με πιο πολύπλοκο βασικό δενδριτικό πλέγμα όσο, και μεγαλύτερο ηλεκτρονικό μήκος, παρουσιάζουν τον μικρότερο μέσο όρο δυναμικών ενεργείας, τον μεγαλύτερο χρόνο μετάδοσης του σήματος και σχέδιο εκφόρτισης RS1. Συμπερασματικά, η μορφολογία του βασικού δενδριτικού πλέγματος, επηρεάζει τον τρόπο με τον οποίο θα διαδοθεί ένα συναπτικό σήμα στο σώμα, και άρα έχει επίδραση στο σχέδιο εκφόρτισης του. Ένα «απλό» σε σύγκριση με ένα «σύνθετο» βασικό δενδριτικό πλέγμα, φέρει τα πιθανά σημεία εισόδου γλουταμινεργικών σημάτων σε εγγύτερες περιοχές προς το σώμα. Οπότε, σε ένα απλό βασικό δενδριτικό πλέγμα είναι πιο πιθανό να προκληθούν πολλαπλές σωματικές εκπολώσεις σε μικρότερο χρονικό διάστημα, που συσχετίζονται με σχέδια εκφόρτισης IB και OB. Αυτή η επίδραση της μορφολογίας είναι εξέχουσας σημασίας, ειδικά, στα πλαίσια ενός νευρικού δικτύου κυττάρων, όπου το κάθε κύτταρο μπορεί να συνεισφέρει διαφορετικά στην ολοκλήρωση και μετάδοση μιας πληροφορίας.

2. Μελλοντικές Κατευθύνσεις

Σε αυτή την μελέτη πραγματοποιήθηκε μια πρώτη ανάλυση όλων των επιμέρους μορφολογικών χαρακτηριστικών, παθητικών και ενεργητικών

χαρακτηριστικών και συναπτικών ιδιοτήτων των πυραμιδικών κυττάρων καθώς και η συσχέτιση τους, με τα σχέδια ηλεκτρικής εκφόρτισης που παρουσιάζουν. Μελλοντικές κατευθύνσεις της εργασίας αυτής, περιλαμβάνουν τη περαιτέρω εξέταση όλων των ενεργητικών και παθητικών ιδιοτήτων που συμβάλλουν στην διαμόρφωση των δυναμικών ενεργείας, και συσχέτιση τους με τα σχέδια εκφόρτισης. Επιπλέον, μπορεί να γίνει έλεγχος και χαρακτηρισμός των ιδιοτήτων των δυναμικών ενεργείας, και συσχέτιση τους με την μορφολογία. Επόμενο βήμα, είναι η περιγραφή του τρόπου, που συνεισφέρουν χωροχρονικά, και τα υπόλοιπα συναπτικά σήματα, στις ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες των κυττάρων. Αφού, καθοριστεί με ακρίβεια, η συνδυαστική επίδραση όλων των παραπάνω παραμέτρων, η ανάλυση μπορεί να συνεχιστεί σε επίπεδο νευρωνικού δικτύου. Εκεί, μπορεί να διαπιστωθεί, πως επιδρούν τα επιμέρους μορφολογικά, παθητικά και ενεργητικά χαρακτηριστικά των κυττάρων, στα πλαίσια ενός νευρικού δικτύου. Τέλος, μπορεί να συσχετιστεί η μεταβολή των μορφολογικών και κατ' επέκταση των λειτουργικών χαρακτηριστικών των πυραμιδικών κυττάρων, με τις διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες.

Βιβλιογραφία

Βιβλιογραφία

- Antic SD, Zhou WL, Moore AR, Short SM, Ikonomu KD (2010) The decade of the dendritic NMDA spike. *Journal of neuroscience research* 88: 2991-3001.
- Ayala R, Shu T, Tsai LH (2007) Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. *Cell* 128: 29-43.
- Bergstrom, H.C., McDonald, C.G., French, H.T., and Smith, R.F. (2008). Continuous nicotine administration produces selective, age-dependent structural alteration of pyramidal neurons from prelimbic cortex. *Synapse (New York, N.Y)* 62, 31-39.
- Bilkey DK, Schwartzkroin PA (1990) Variation in electrophysiology and morphology of hippocampal CA3 pyramidal cells. *Brain research* 514: 77-83.
- Branco T, Hausser M (2010) The single dendritic branch as a fundamental functional unit in the nervous system. *Current opinion in neurobiology* 20: 494-502.
- Chagnac-Amitai Y, Luhmann HJ, Prince DA (1990) Burst generating and regular spiking layer 5 pyramidal neurons of rat neocortex have different morphological features. *The Journal of comparative neurology* 296: 598-613.
- Connors BW, Gutnick MJ (1990) Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. *Trends in neurosciences* 13: 99-104.
- Contreras D (2004) Electrophysiological classes of neocortical neurons. *Neural Netw* 17: 633-646.
- Cui J, Yang H, Lee US (2009) Molecular mechanisms of BK channel activation. *Cell Mol Life Sci* 66:852-875.
- Durstewitz, D., and Gabriel, T. (2007). Dynamical basis of irregular spiking in NMDA-driven prefrontal cortex neurons. *Cereb Cortex* 17, 894-908.
- Elston GN (2003) Cortex, cognition and the cell: new insights into the pyramidal neuron and prefrontal function. *Cereb Cortex* 13: 1124-1138.
- Fishell G, Hanashima C (2008) Pyramidal neurons grow up and change their mind. *Neuron* 57: 333-338.
- Hausser M, Spruston N, Stuart GJ (2000) Diversity and dynamics of dendritic signaling. *Science (New York, NY)* 290: 739-744.
- Heidbreder CA, Groenewegen HJ (2003) The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 27: 555-579.
- Hines ML, Carnevale NT (1997) The NEURON simulation environment. *Neural Comput* 9:1179-1209.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. (2000) *Principles of Neural Science*, 4th ed. McGraw-Hill, New York

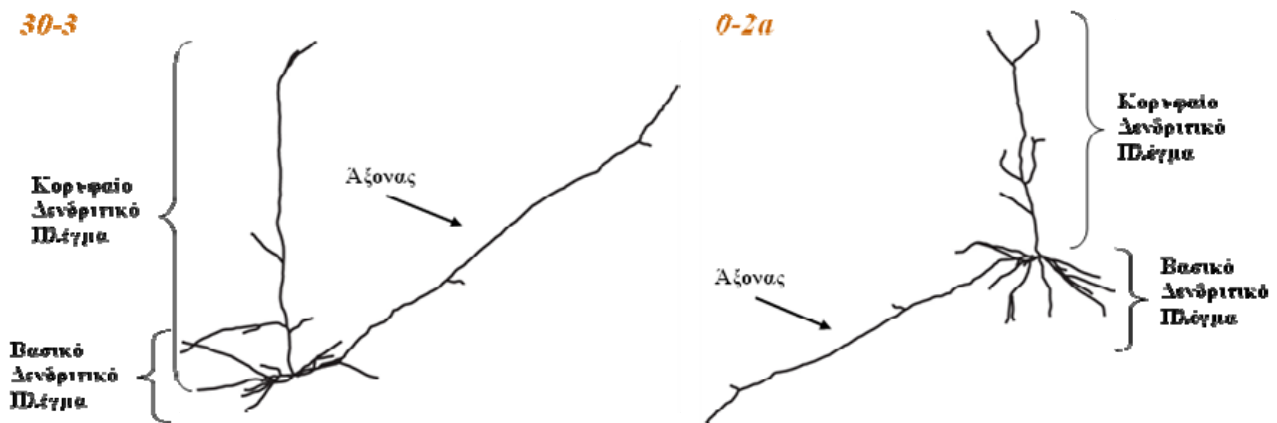
- Kasper EM, Larkman AU, Lubke J, Blakemore C (1994) Pyramidal neurons in layer 5 of the rat visual cortex. I. Correlation among cell morphology, intrinsic electrophysiological properties, and axon targets. *The Journal of comparative neurology* 339: 459-474.
- Krichmar JL, Nasuto SJ, Scorcioni R, Washington SD, Ascoli GA (2002) Effects of dendritic morphology on CA3 pyramidal cell electrophysiology: a simulation study. *Brain research* 941: 11-28.
- Larkman AU (1991a) Dendritic morphology of pyramidal neurones of the visual cortex of the rat: I. Branching patterns. *The Journal of comparative neurology* 306: 307-319.
- Larkman AU (1991b) Dendritic morphology of pyramidal neurones of the visual cortex of the rat: II. Parameter correlations. *The Journal of comparative neurology* 306: 320-331.
- Larkman AU (1991c) Dendritic morphology of pyramidal neurones of the visual cortex of the rat: III. Spine distributions. *The Journal of comparative neurology* 306: 332-343.
- London M, Häusser M (2005) Dendritic computation. *Annual review of neuroscience* 28: 503-532.
- Mainen ZF, Sejnowski TJ (1996) Influence of dendritic structure on firing pattern in model neocortical neurons. *Nature* 382: 363-366.
- Mason A, Larkman A (1990) Correlations between morphology and electrophysiology of pyramidal neurons in slices of rat visual cortex. II. Electrophysiology. *J Neurosci* 10: 1415-1428.
- Molnar Z, Cheung AF (2006) Towards the classification of subpopulations of layer V pyramidal projection neurons. *Neuroscience research* 55: 105-115.
- Pinsky PF, Rinzel J (1994) Intrinsic and network rhythmogenesis in a reduced Traub model for CA3 neurons. *Journal of computational neuroscience* 1: 39-60.
- Poirazi P, Brannon T, Mel BW (2003a) Arithmetic of subthreshold synaptic summation in a model CA1 pyramidal cell. *Neuron* 37: 977-987.
- Poirazi P, Brannon T, Mel BW (2003b) Pyramidal neuron as two-layer neural network. *Neuron* 37: 989-999.
- R Development Core Team (2010) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria
- Remy S, Beck H, Yaari Y (2010) Plasticity of voltage-gated ion channels in pyramidal cell dendrites. *Current opinion in neurobiology* 20: 503-509.
- Seamans JK, Durstewitz D, Christie BR, Stevens CF, Sejnowski TJ (2001) Dopamine D1/D5 receptor modulation of excitatory synaptic inputs to layer V prefrontal cortex neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:301-306.

- Seamans JK, Lapish CC, Durstewitz D (2008) Comparing the prefrontal cortex of rats and primates: insights from electrophysiology. *Neurotoxicity research* 14: 249-262.
- Sheasby BW, Fohlmeister JF (1999) Impulse encoding across the dendritic morphologies of retinal ganglion cells. *Journal of neurophysiology* 81: 1685-1698.
- Sidiropoulou K, Pissadaki EK, Poirazi P (2006) Inside the brain of a neuron. *EMBO reports* 7: 886-892.
- Sidiropoulou K and Poirazi P (submitted) Persistent activity in a single neuron model: Biophysical mechanisms and differences between regular spiking and intrinsic bursting neuron models
- Spruston N (2008) Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nature reviews* 9: 206-221.
- Stuart G, Spruston N, Häusser M, (1999) *Dendrites*, 1st ed Oxford, UK: Oxford Univ. Press.
- Tsiola A, Hamzei-Sichani F, Peterlin Z, Yuste R (2003) Quantitative morphologic classification of layer 5 neurons from mouse primary visual cortex. *The Journal of comparative neurology* 461: 415-428.
- Uylings HB, Groenewegen HJ, Kolb B (2003) Do rats have a prefrontal cortex? *Behavioural brain research* 146: 3-17.
- van Elburg RA, van Ooyen A (2010) Impact of dendritic size and dendritic topology on burst firing in pyramidal cells. *PLoS computational biology* 6: e1000781.
- Wang H, Stradtman GG, 3rd, Wang XJ, Gao WJ (2008) A specialized NMDA receptor function in layer 5 recurrent microcircuitry of the adult rat prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:16791-16796.
- Weatherall KL, Goodchild SJ, Jane DE, Marrion NV (2010) Small conductance calcium-activated potassium channels: from structure to function. *Prog Neurobiol* 91:242-255.
- Yang CR, Seamans JK, Gorelova N (1996) Electrophysiological and morphological properties of layers V-VI principal pyramidal cells in rat prefrontal cortex in vitro. *J Neurosci* 16: 1904-1921.
- Zhang ZW (2004) Maturation of layer V pyramidal neurons in the rat prefrontal cortex: intrinsic properties and synaptic function. *Journal of neurophysiology* 91: 1171-1182.

Παράρτημα

Παράρτημα: Ψηφιακές Αναπαραστάσεις Πυραμιδικών Κυττάρων

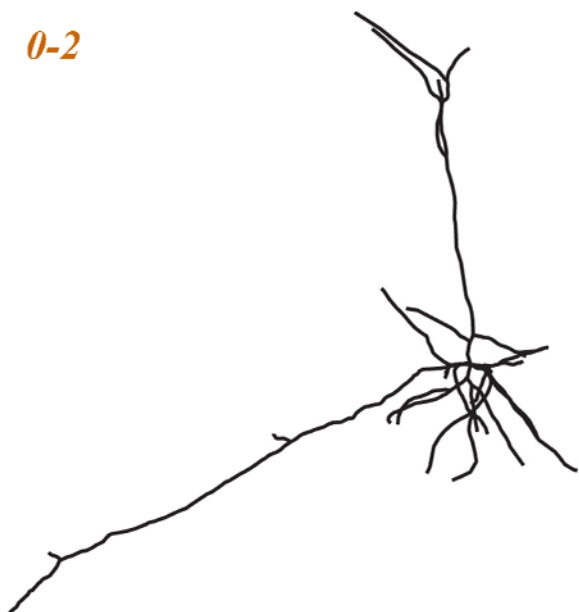
Στην μελέτη χρησιμοποιούνται 56 ψηφιακές αναπαραστάσεις πυραμιδικών κυττάρων της στιβάδας V (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, 2.1. Δεδομένα Ψηφιακής Ανακατασκευής Πυραμιδικών Κυττάρων), του προμετωπιαίου φλοιού αρουραίου (Bergstrom et al., 2008). Παρακάτω, παρουσιάζονται οι ολοκληρωμένες ψηφιακές μορφολογικές αναπαραστάσεις τους (βλ. Υλικά και Μέθοδοι, 2.2 Ψηφιακή Ανακατασκευή Ολοκληρωμένης Κυτταρικής Δομής) (βλ. Εικόνα 1).



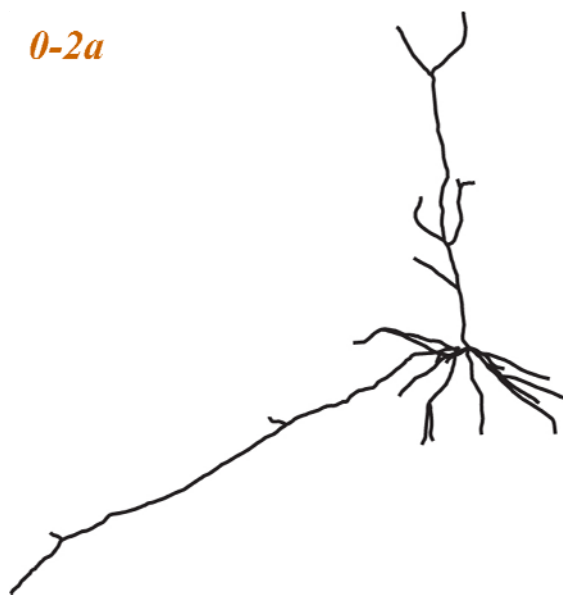
Πυραμидικό Κύτταρο	Σελίδα	Πυραμидικό Κύτταρο	Σελίδα	Πυραμидικό Κύτταρο	Σελίδα	Πυραμидικό Κύτταρο	Σελίδα
0-2	78	37-3	80	48-3d	82	j-3	85
0-2a	78	37-4	80	48-4	82	j-3a	85
0-2b	78	37-4a	80	A5-1B2	83	J3	85
0-2c	78	39-4a	80	C3_4	83	L-2	85
30-3	78	39-5	81	C3_5	83	L-2a	85
30-3a	78	45-3	81	C3_6	83	L-2b	85
30-3b	79	45-3a	81	G3-1B2	83	n-3	86
33-3	79	45-4	81	G4_1	83	n-3a	86
35-2	79	47-2a	81	G4_2	84	n-3b	86
35-3	79	47-2b	81	h-2	84	q-3	86
35-3a	79	47-3-hf	82	h-2a	84	q-3a	86
36-4	79	48-3a	82	h-2b	84	q-3b	86
36-4a	80	48-3b	82	H2-3	84	q-4	87
36-4b	80	48-3c	82	j-2	84	q-4a	87

Εικόνα 1 Μορφολογικές αναπαραστάσεις; πυραμιδικών κυττάρων (α) Οι απεικονίσεις των κυττάρων έχουν διαταχθεί με τέτοιο τρόπο, ώστε ο κύριος κορυφαίος δενδρίτης, και κατά συνέπεια το κορυφαίο δενδριτικό πλέγμα έχει κλίση κατακόρυφη πάντα προς τα πάνω, το βασικό δενδριτικό πλέγμα βρίσκεται πάντα κάτω από το κορυφαίο δενδριτικό πλέγμα διακλαδιζόμενο στην εγγύτερη περιοχή, και ο άξονας των βρίσκεται παράπλευρα, με κλίση είτε δεξιά προς τα πάνω είτε αριστερά προς τα κάτω (β) Πίνακας με παραπομπές στις σελίδες του κειμένου για την εύρεση της απεικόνισης της μορφολογικής αναπαραστάσης κάθε πυραμιδικού κυττάρου

0-2



0-2a



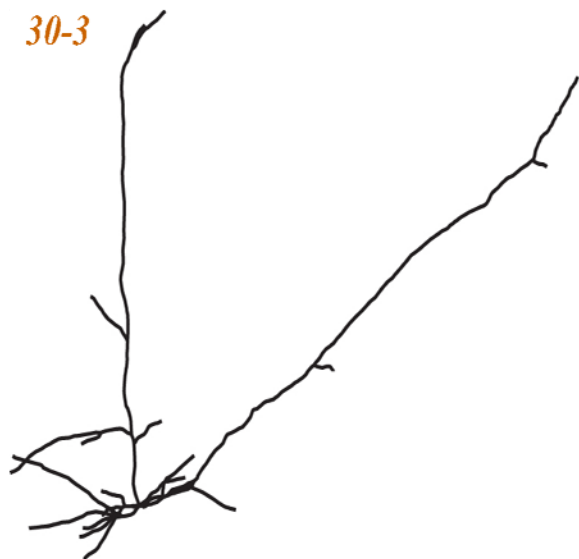
0-2b



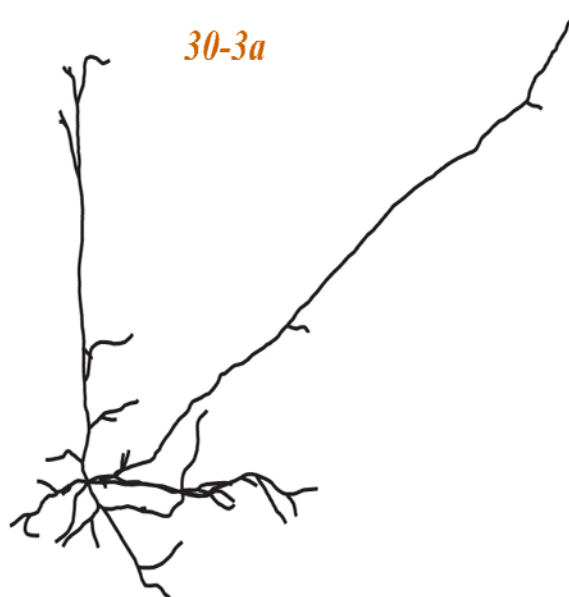
0-2c

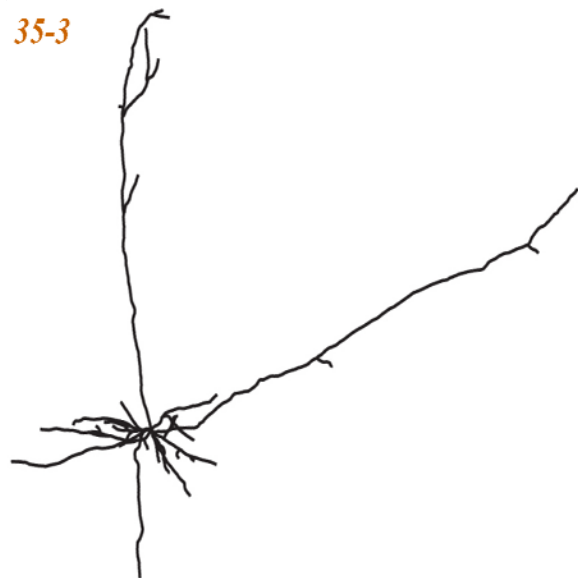
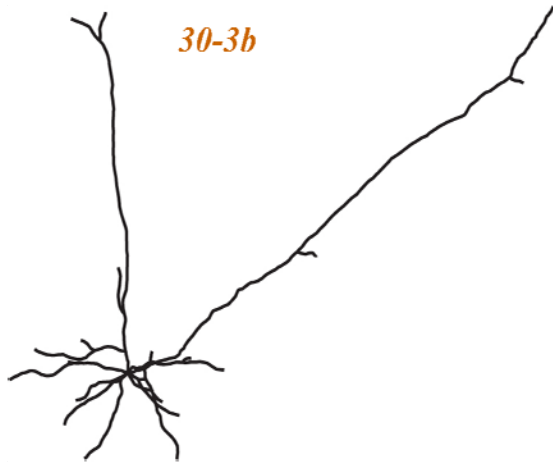


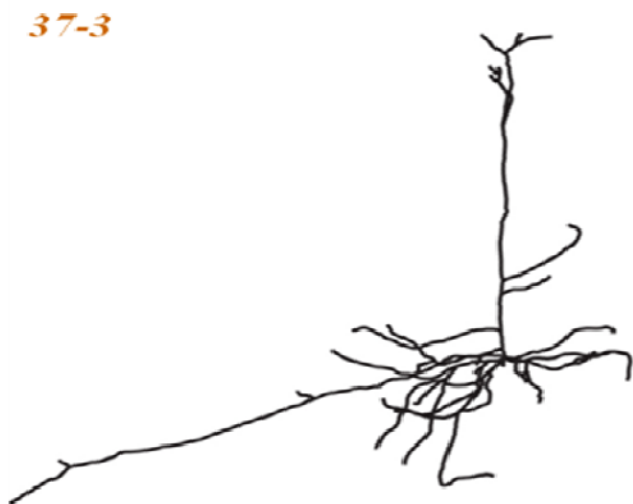
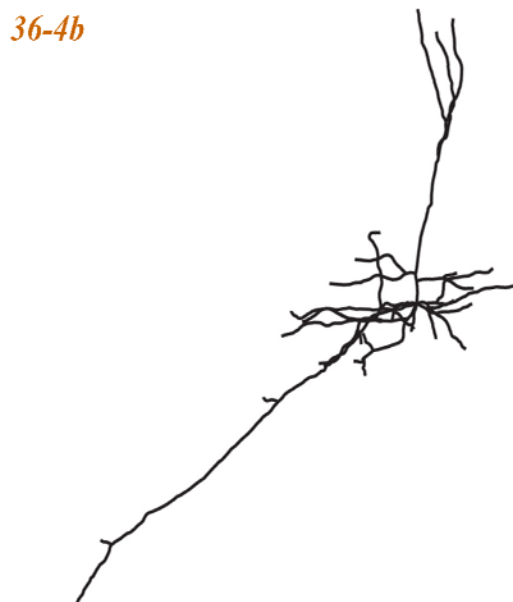
30-3



30-3a







39-5



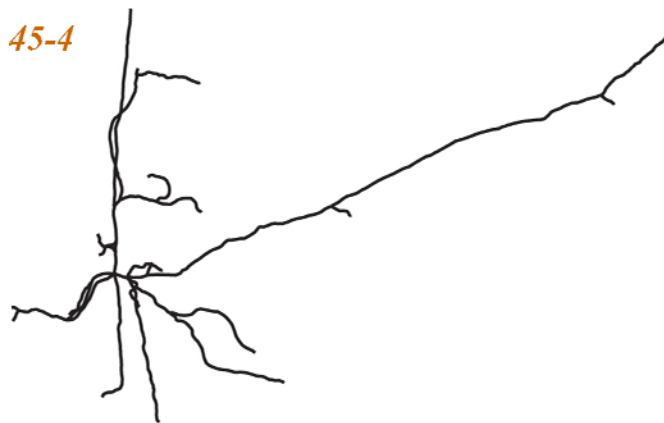
45-3



45-3a



45-4



47-2a



47-2b



47-3-hf



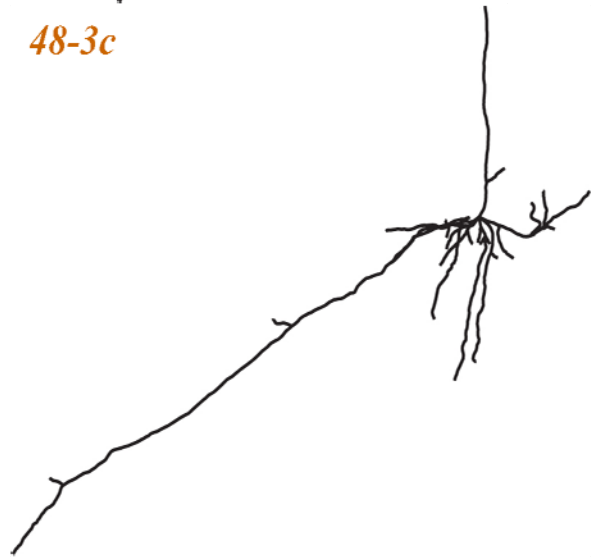
48-3a



48-3b



48-3c



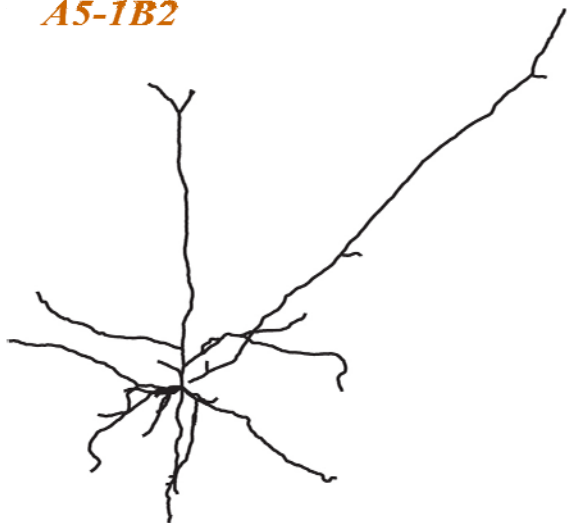
48-3d



48-4



A5-1B2



C3_4



C3_5



C3_6



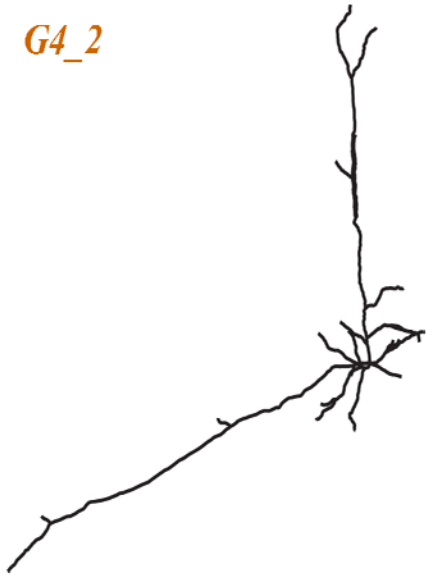
G3-1B2



G4_1



G4_2



h-2



h-2a



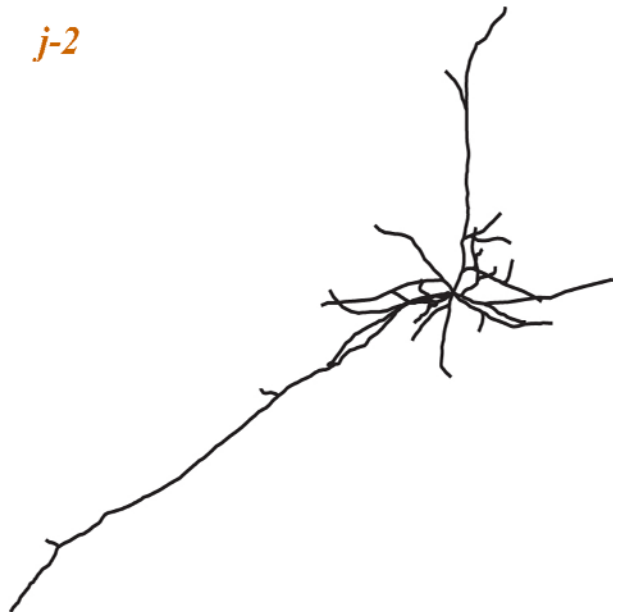
h-2b

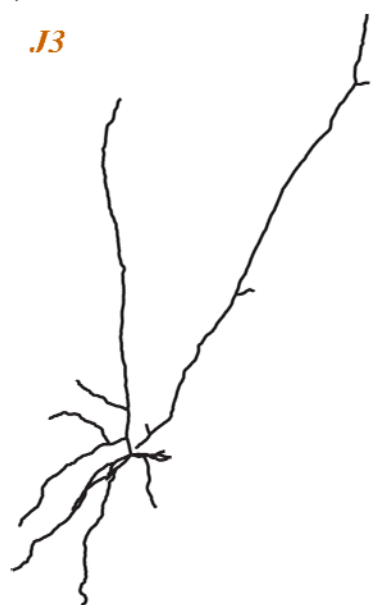
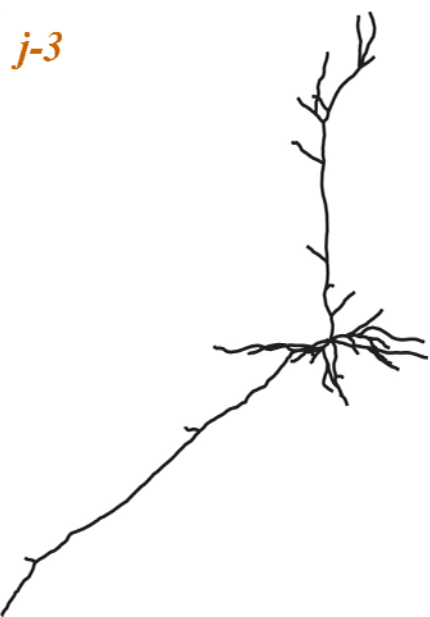


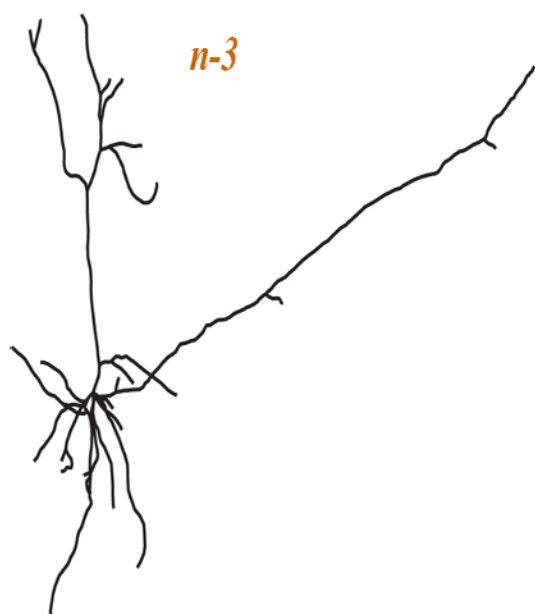
H2-3



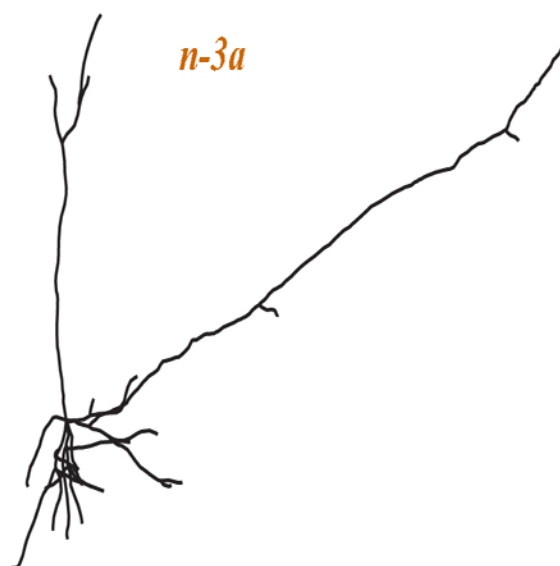
j-2







n-3



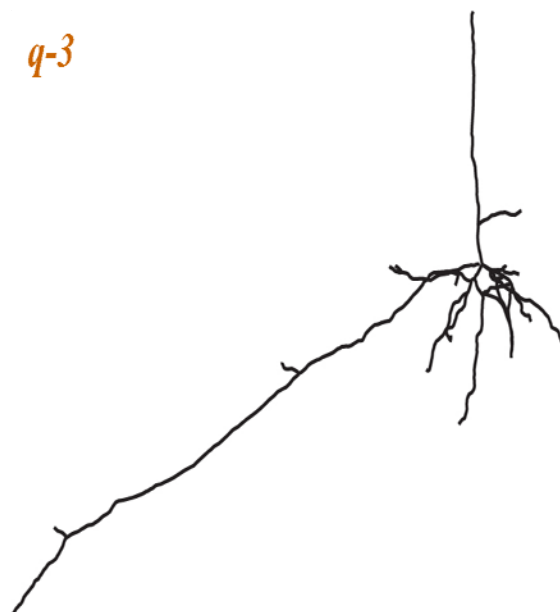
n-3a

n-3b

q-3



q-3a



q-3b



q-4



q-4a

