

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ - ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Ηλεκτροφυσιολογική μελέτη του μονοπατιού ‘κεντρικός αμυγδαλικός πυρήνας (CeN)-συμπαγής μοίρα της μέλαινας ουσίας (SNc)’ και του ρόλου του στη μνήμη και τη μάθηση μέσω επαγωγής της μακρόχρονης ενδυνάμωσης (LTP).

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΓΑΛΑΤΕΙΑ ΠΑΠΑΘΩΜΑ
ΛΑΡΙΣΑ 2005



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 4304/1

Ημερ. Εισ.: 01-03-2005

Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2005

ΠΑΠ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087992

Πρόλογος

Η στιγμή των ευχαριστιών είναι και αυτή ένα κομμάτι των αναμνήσεων μας, αποτελεί δηλαδή μορφή της μνήμης. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον διευθυντή του τμήματος Νευροβιολογίας του Université de Paris-Sud XI, Prof. Serge Laroche, ο οποίος με υποδέχτηκε και με έφερε σε επαφή με την εργαστηριακή ομάδα της Nicole El Massioui. Το ενδιαφέρον του για τη πορεία και την εξέλιξη του πειράματός μου, ήταν αμείωτο καθόλη τη διάρκεια της παραμονής μου.

Ευχαριστώ την Prof. Nicole El Massioui, για την εγκάρδια υποδοχή στην ομάδα της. Μετά από πολλές ώρες συζήτησης κάναμε το σχεδιασμό της παρούσας εργασίας. Μου μετέφερε ακούραστα τις γνώσεις και τις εμπειρίες της πάνω στον τομέα της νευροβιολογίας και μαζί αντιμετωπίσαμε όλες τις δυσκολίες που παρουσιάστηκαν κατά τη διεξαγωγή του πειράματος.

Ευχαριστώ εξίσου, την Prof. Valérie Doyere, η οποία συνέβαλε αποφασιστικά στην εκμάθηση των τεχνικών ηλεκτροφυσιολογίας που ήταν απαραίτητες για τη διεκπεραίωση του πειράματος. Μου απέδειξε ότι η γενναιοδωρία και το χιούμορ είναι απαραίτητα χαρακτηριστικά που πρέπει να έχει ένας ερευνητής και ότι όλα τα προβλήματα μπορούν να αντιμετωπιστούν μέσα από την προσπάθεια. Κοντά της κατάλαβα ότι το επάγγελμα του ερευνητή είναι και τρόπος ζωής.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Alexis Faure, την Ombeline Strajtmann και την Delphine Callou, με τους οποίους μοιράστηκα τον ίδιο χώρο εργασίας. Η φιλία τους και η συναδελφικότητα τους έκαναν τις ώρες δουλειάς στο εργαστήριο ευχάριστες και παραγωγικές.

Χάρη σε όλους αυτούς, αλλά και πολλούς άλλους, είχα την ευτυχία να δουλέψω σε ένα εργαστήριο όπου ήμουν καλοδεχούμενη και η ατμόσφαιρα δημιούργησε τις κατάλληλες συνθήκες για την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή :

Σταθόπουλος Κων/νος, Επίκουρος Καθηγητής

Κουρέτας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Ζίφα Αιμιλία, Λέκτορας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι : ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
I.A.1 Υπόθεση	9
I.A.2 Μάθηση και μνήμη	11
I.B.1. Αμυγδαλή – κεντρικός πυρήνας	13
I.B.2 Μέλαινα ουσία	14
II.A Φυσιολογικά μοντέλα μάθησης και μνήμης	16
II.B.1. Μακρόχρονη ενδυνάμωση LTP : Μοντέλο μελέτης των συναπτικών μεταβολών	20
II.B.2 Καθορισμός και ιδιότητες της LTP	20
II.Γ. Επαγωγή της μακρόχρονης ενδυνάμωσης	22
II.Δ. Διατήρηση της LTP	23
II.E. Μνήμη και LTP	25
II. ΣΤ. Ρόλος της σύνθεσης πρωτεϊνών στην συναπτική πλαστικότητα και στη μνήμη	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	29
III.A. Πειραματόζωα	31
III. B.1. Ηλεκτρόδια ερεθισμού	31
III.B.2 Ηλεκτρόδια καταγραφής	31
III.B.3 Προετοιμασία του επίμυ	32
III.B.4 Κάθοδος ηλεκτροδίων ερεθισμού	33
III.B.4.α. Στο επίπεδο του κεντρικού πυρήνα της αμυγδαλής	33
III.B.4.β. Στο επίπεδο της μέλαινας ουσίας	33

III.B.5 Κάθοδος των ηλεκτροδίων καταγραφής	34
III.B.5.α Στο επίπεδο του κεντρικού πυρήνα της αμυγδαλής	34
III.B.5.β. Στο επίπεδο της μέλαινας ουσίας	34
III.Γ. Τεχνικές καταγραφής του εφαρμοζόμενου δυναμικού	35
III.Δ. Ιστολογικές μελέτες	35
III.Ε. Τεχνικές τομής και χρωματισμού	36

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

39

I.V.1 Αποτελέσματα καταγραφής δυναμικών	41
I.V.2. Αποτελέσματα ανοσοχρωματισμού	49

ΚΕΦΑΛΑΙΟ V : ΣΥΖΗΤΗΣΗ

55

V.1. Γενική συζήτηση	57
V.2. Σχέση κεντρικού αμυγδαλικού πυρήνα-μέλαινας ουσίας	58
V.3. Συμπεράσματα	59

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

63

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

75

Περίληψη :

Μια πρόκληση για τις νευροεπιστήμες, αποτελεί η ταυτοποίηση όλων των κυτταρικών και μοριακών διαδικασιών της μάθησης και της μνήμης. Οι μακράς διάρκειας μορφές της μνήμης, γίνονται μέσω τροποποιήσεων στις συνάψεις που περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων και γονιδιακή έκφραση. Ένα από τα φυσιολογικά μοντέλα για την παρατήρηση των αλλαγών που συνοδεύουν τη συναπτική πλαστικότητα, είναι η μακρόχρονη ενδυνάμωση (LTP), που χαρακτηρίζεται από αύξηση της ικανότητας για συναπτική μεταβίβαση με μεγάλη διάρκεια. Η συμπαγής μοίρα της μέλαινας ουσίας (SNc), ελέγχει την εκούσια κίνηση, ρυθμίζει τη διάθεση και παράγει το νευροδιαβιβαστή ντοπαμίνη και μέσω των ντοπαμινεργικών νευρώνων της συνδέεται με άλλες εγκεφαλικές δομές. Ο κεντρικός αμυγδαλικός πυρήνας (CeN), είναι μία συνθέτη δομή με διάφορες λειτουργίες στην αντίληψη, το συναίσθημα, τη μνήμη και τη μάθηση και κάποιες υποδιαιρέσεις του συνδέονται με ντοπαμινεργικούς νευρώνες. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του μονοπατιού 'κεντρικός αμυγδαλικός πυρήνας – συμπαγής μοίρα της μέλαινας ουσίας', και του ρόλου του στη μνήμη και τη μάθηση. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν επίμυς Sprague-Dawley στους οποίους εφαρμόστηκαν τεχνικές ηλεκτροφυσιολογίας και το μοντέλο της LTP. Παρατηρήθηκε ότι οι δομές συνδέονται μεταξύ τους και μάλιστα η σύνδεση αυτή ενισχύεται μετά από εφαρμογή της LTP, γεγονός που προτείνει συμμετοχή του μονοπατιού στο σχηματισμό της μάθησης.

Λέξεις-κλειδιά : κεντρικός αμυγδαλικός πυρήνας (CeN), συμπαγής μοίρα της μέλαινας ουσίας (SNc), μακρόχρονη ενδυνάμωση (LTP), μάθηση, μνήμη.

Abstract:

The characterization of the cellular and molecular processes involved in learning and memory is a real challenge for neuroscientists. Long-term forms of memory are formed through synaptic changes, involving gene expression. The most known animal model used for identifying the changes during synaptic plasticity, is long-term potentiation (LTP), which strengthens the synaptic connections. Substantia nigra pars compacta (SNc), controls voluntary movements, modulates mood, produces the neurotransmitter dopamine and communicates with other brain structures through dopaminergic neurons. Central nucleus of the amygdala is a complex structure that has been associated with a range of cognitive functions, including emotion, learning, memory and perception. The purpose of the present paper is the study of 'central nucleus of the amygdala-substantia nigra pars compacta' pathway and its role in learning and memory. The animals used are male Sprague-Dawley albino rats in which electrophysiological techniques were applied. It was observed that the two structures are connected. Furthermore this connection is enhanced after LTP induction that suggests that the pathway participates in learning formation.

Key-words: central nucleus of the amygdala (CeN), substantia nigra pars compacta (SNc), long-term potentiation (LTP), learning, memory.

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

I. Εισαγωγή

I.A.1 Υπόθεση

Μάθηση, μνήμη, αναμνήσεις... Λέξεις που χρησιμοποιούνται τόσο συχνά στην καθημερινή μας ζωή ώστε να νομίζουμε ότι πρόκειται για απλές έννοιες. Ωστόσο οι μηχανισμοί που διέπουν αυτούς τους γενικούς όρους είναι ακόμα υπό μελέτη και η κατανόηση τους απαιτεί επιπλέον ερευνητική δραστηριότητα. Το κεντρικό πρόβλημα αποτελεί η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο λαμβάνεται και αποθηκεύεται η πληροφορία. Μετά την αποτυχία των ερευνητών να εντοπίσουν συγκεκριμένες δομές με κυρίαρχο ρόλο την αποθήκευση των αναμνήσεων, υποστηρίζεται ότι το σύνολο του κεντρικού νευρικού συστήματος (Κ.Ν.Σ.), εμπλέκεται στην επεξεργασία και αποθήκευση της πληροφορίας, αν και υπάρχουν κάποιες δομές με εξειδικευμένο ρόλο στις μνημονικές διαδικασίες. Η αντίληψη που υποστηρίζει ότι υπάρχουν εκτεταμένα δίκτυα στο Κ.Ν.Σ., χάρη στα οποία κυκλοφορεί η πληροφορία και άρα σχηματίζονται μονοπάτια μνήμης, βοήθησε στη δημιουργία μεγάλου αριθμού φυσιολογικών μοντέλων μάθησης και μνήμης. Αν και οι νευρώνες παίζουν κύριο ρόλο σε αυτά τα δίκτυα, το κλειδί για τη λειτουργία των νευρικών δικτύων είναι η δημιουργία συνδέσεων μεταξύ διάφορων δομών. Η καταγραφή μιας πληροφορίας, μεταβάλλει τη συναπτική 'αρχιτεκτονική' με τέτοιο τρόπο ώστε να ενισχύονται συγκεκριμένες συνδέσεις νευρώνων. Μεταξύ αυτών των συναπτικών μεταβολών, υπάρχει μια συγκεκριμένη με ιδιαίτερο ενδιαφέρον, που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την εργασία : το φαινόμενο της μακρόχρονης ενδυνάμωσης (LTP), που χαρακτηρίζεται από μια αύξηση της ικανότητας για συναπτική μεταβίβαση με μεγάλη διάρκεια.

Οι πιο στενά συνδεδεμένες περιοχές του εγκεφάλου με τη μάθηση και τη μνήμη είναι ο θάλαμος και ο ιππόκαμπος. Η ερευνητική δραστηριότητα στις περιοχές αυτές έχει αποκαλύψει σχεδόν όλες τις λειτουργίες και τις συνδέσεις τους με άλλες περιοχές. Εκτός όμως από το σημαντικό ρόλο του θαλάμου και του ιππόκαμπου στις μνημονικές διαδικασίες, και άλλες εγκεφαλικές δομές παίζουν ρόλο στην απόκτηση και αποθήκευση των πληροφοριών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μέλαινα ουσία (SN) των βασικών γαγγλίων καθώς και ο κεντρικός αμυγδαλικός πυρήνας (CeN). Πρόκειται για δυο δομές που έχουν μελετηθεί ξεχωριστά αλλά η μεταξύ τους σχέση είναι άγνωστη. Για

παράδειγμα υπάρχει πλήθος ερευνών για τον κεντρικό αμυγδαλικό πυρήνα. Είναι γνωστό σε ποιους πυρήνες της αμυγδαλής προβάλλει και από ποιους δέχεται πληροφορίες, με ποιες άλλες δομές συνδέεται, καθώς και ποιος είναι ο ρόλος του. Αντίστοιχα, υπάρχουν έρευνες και για τη μέλαινα ουσία. Είναι γνωστό ότι ελέγχει τις εκούσιες κινήσεις, τη διάθεση και ότι παράγει το νευροδιαβιβαστή ντοπαμίνη. Επίσης έχει μελετηθεί η σύνδεση της με πολλές δομές, ιδιαίτερα μελετημένο όμως είναι το μονοπάτι μέλαινα ουσία-θάλαμος. Ενώ είναι γνωστό ότι και οι δυο εγκεφαλικές δομές σχετίζονται με τις διαδικασίες της μνήμης και της μάθησης, δεν έχει μελετηθεί αν συνδέονται. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του μονοπατιού κεντρικός αμυγδαλικός πυρήνας (CeN)–συμπαγής μοίρα της μέλαινας ουσίας (SNc).

Για την μελέτη αυτού του μονοπατιού, πρέπει να παρατηρηθεί τι συμβαίνει στον κεντρικό αμυγδαλικό πυρήνα μετά από ερέθισμα στην μέλαινα ουσία αλλά και το αντίστροφο. Επιπλέον προκειμένου να αποδειχθεί ότι το μονοπάτι συμμετέχει στη διαδικασία της μνήμης και της μάθησης, είναι απαραίτητο να μελετηθεί τι συμβαίνει στον εγκέφαλο φυσιολογικών επίμυων (‘μάρτυρες’) και τι αλλαγές παρατηρούνται σε επίμυς στους οποίους εφαρμόζεται ένα φυσιολογικό μοντέλο μάθησης. Με βάση τον παραπάνω συλλογισμό οι επίμυς που χρησιμοποιήθηκαν ως πειραματόζωα χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες, η καθεμία από τις οποίες περιλαμβάνει τρεις επίμυς, με εξαίρεση την πρώτη ομάδα που περιλαμβάνει τέσσερις. Στις δυο πρώτες ομάδες τα ηλεκτρόδια ερεθισμού τοποθετούνται στον κεντρικό αμυγδαλικό πυρήνα και τα ηλεκτρόδια καταγραφής στη συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας. Με αυτό τον τρόπο δίνεται η δυνατότητα αποστολής σημάτων στον κεντρικό πυρήνα και ταυτόχρονα να γίνεται η καταγραφή των απαντήσεων στη μέλαινα ουσία. Στη πρώτη ομάδα εφαρμόζεται το μοντέλο της μακρόχρονης ενδυνάμωσης (LTP), ενώ η δεύτερη είναι η ομάδα ‘μάρτυρας’. Στις επόμενες δυο ομάδες τα ηλεκτρόδια αντιστρέφονται, δηλαδή τα ηλεκτρόδια ερεθισμού τοποθετούνται στη συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας και τα ηλεκτρόδια καταγραφής στον κεντρικό πυρήνα. Η τρίτη ομάδα είναι η ομάδα ‘μάρτυρας’ και η τέταρτη περιλαμβάνει τους επίμυς στους οποίους εφαρμόζεται η LTP.

Σύμφωνα με τον παραπάνω σχεδιασμό είναι δυνατή η παρατήρηση με τη βοήθεια των τεχνικών της ηλεκτροφυσιολογίας, του μονοπατιού κεντρικός αμυγδαλικός πυρήνας –συμπαγής μοίρα της μέλαινας ουσίας και η καταγραφή του ρόλου που έχει κατά τη

διαδικασία της μνήμης και μάθησης με τη μίμηση των φυσιολογικών μηχανισμών του εγκεφάλου.

I.A.2. Μάθηση και μνήμη

Ο σημαντικότερος μηχανισμός με τον οποίο περιβαλλοντικά γεγονότα διαμορφώνουν τη συμπεριφορά είναι μέσω της μάθησης και της μνήμης. Μάθηση είναι η διεργασία με την οποία ο άνθρωπος και αλλά ζώα αποκτούν γνώσεις για τον κόσμο. Μνήμη είναι η συγκράτηση ή αποθήκευση των γνώσεων αυτών. Μέχρι τα μέσα του 20ού αιώνα, οι περισσότεροι ερευνητές αμφέβαλλαν για το αν κάθε λειτουργία της μνήμης είναι δυνατόν να εντοπισθεί σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου. Επικρατούσε η άποψη ότι η μνήμη ήταν γενική ιδιότητα του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων ως συνόλου και πρόσφατες εργασίες έχουν αποδείξει ότι στη μνήμη παρεμβαίνουν πολλές περιοχές του εγκεφάλου. Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν διαφορετικοί τύποι μνήμης και ορισμένες περιοχές του εγκεφάλου είναι πολύ πιο σημαντικές για ορισμένους τύπους από ότι για άλλους. Επιπλέον διαφορετικοί τύποι μνήμης αποθηκεύονται σε διαφορετικά νευρωνικά συστήματα (Milner., 1985). Ο πρώτος που απέδειξε ότι οι μνημονικές διεργασίες στον ανθρώπινο εγκέφαλο είναι εντοπισμένες, ήταν ο Wilder Penfield, με μεθόδους ηλεκτρικού ερεθισμού σε ασθενείς που υπέφεραν από εστιακή επιληψία. Μερικές φορές διαπίστωσε ότι ο ηλεκτρικός ερεθισμός προκαλούσε εκείνο που ονόμασε εμπειρική απόκριση ή αναδρομή, κατά την οποία οι ασθενείς περιέγραφαν μια συγκεκριμένη ανάμνηση προηγούμενων εμπειριών. Αυτές οι αποκρίσεις που έμοιαζαν με μνήμη προκαλούνταν μόνο από τους κροταφικούς λοβούς και ποτέ από άλλη περιοχή. Μελέτες σε ασθενείς με βλάβες στον κροταφικό λοβό αποκάλυψαν την ύπαρξη δυο τελείως διαφορετικών τρόπων μάθησης, γεγονός το οποίο οι γνωσεοψυχολόγοι άρχισαν να εκτιμούν από τις μελέτες τους σε φυσιολογικά άτομα (Squire, 1987). Μαθαίνουμε τι είναι ο κόσμος -αποκτώντας γνώσεις για άτομα, θέσεις και πράγματα τα οποία είναι προσιτά στη συνείδηση χρησιμοποιώντας μια μορφή μνήμης η οποία συνήθως ονομάζεται έκδηλη. Η μαθαίνουμε πώς να κάνουμε πράγματα –αποκτώντας κινητικές ή αντιληπτικές ικανότητες που είναι απρόσιτες στη συνείδηση –χρησιμοποιώντας την άδηλη μνήμη. Οι άδηλες μορφές μάθησης είναι συνειρμικές ή μη συνειρμικές. Η μη

συνειρμική μάθηση παρατηρείται όταν το ζώο εκτίθεται μια φορά ή επανειλημμένα σε ένα είδος ερεθίσματος.

Δυο τύποι μη συνειρμικής μάθησης είναι πολύ κοινές στην καθημερινή ζωή: ο εθισμός και η ευαισθητοποίηση. Εθισμός είναι η ελάττωση της απόκρισης σε ένα επαναλαμβανόμενο καλοήθες ερέθισμα. Ευαισθητοποίηση είναι η ενίσχυση των αποκρίσεων σε μια μεγάλη ποικιλία ερεθισμάτων μετά από ένα έντονο ή αλγογόνο ερέθισμα (Domjan., Burkhard., 1986). Με τις πειραματικές μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία της μάθησης, έγινε δυνατή η διάκριση πολλών τύπων συνειρμικής μάθησης. Έχουν μελετηθεί διεξοδικά δυο πειραματικά μοντέλα. Η κλασική εξαρτημένη μάθηση συνίσταται στην εκμάθηση της σχέσης μεταξύ δυο ερεθισμάτων, ενώ η συντελεστική εξαρτημένη μάθηση συνίσταται στην εκμάθηση μίας σχέσης μεταξύ του ερεθίσματος και της συμπεριφοράς του οργανισμού.

Η νευρική βάση της μνήμης είναι δυνατόν να συνοψισθεί με δυο γενικεύσεις. Πρώτον, η μνήμη έχει στάδια. Μελέτες της διατήρησης και της διαταραχής της μνήμης συνηγορούν υπέρ ενός ευρέως χρησιμοποιούμενου μοντέλου αποθήκευσης μνήμης κατά στάδια. Οι πληροφορίες που φτάνουν στον εγκέφαλο υφίστανται επεξεργασία σε μια αποθήκη βραχύχρονης μνήμης. Η αποθήκη αυτή έχει πολύ περιορισμένη χωρητικότητα και όταν δεν γίνονται επαναλήψεις η μνήμη διατηρείται μόνο μερικά λεπτά (Tulving., Schacter., 1990). Αργότερα οι πληροφορίες υφίστανται μετασχηματισμό, με κάποια διεργασία, μέσα σε μια μεγαλύτερης διάρκειας μακρόχρονη αποθήκη. Δεύτερον, η μνήμη εντοπίζεται συχνά σε διαφορετικές θέσεις του νευρικού συστήματος. Σε πολλούς τύπους μάθησης, η μνήμη δεν εντοπίζεται σε μια συγκεκριμένη δομή του εγκεφάλου. Παρ' όλο που οι νευρωνικοί μηχανισμοί με τους οποίους αποταμιεύονται οι μνήμες αυτές δεν είναι γνωστοί με βεβαιότητα, είναι δυνατόν να κατασκευάσουμε υπολογιστικά μοντέλα στα οποία οι λειτουργικές μεταβολές των συγκεκριμένων συνδέσεων σε ολόκληρο το δίκτυο αντιπροσωπεύουν μια απλή μνήμη στο μοντέλο. Αυτά τα μοντέλα μάθησης αποδίδουν κατά τρόπους που θυμίζουν τη μάθηση στα ζώα. Τέτοια μοντέλα είναι ικανά να γενικεύουν, το μοντέλο μπορεί να μάθει ακόμα και όταν δοκιμάζεται με ερεθίσματα διαφορετικά από το αρχικό ερέθισμα εκπαίδευσης. Οι πληροφορίες που αποθηκεύονται σε μοντέλα κατανεμημένης επεξεργασίας δεν επηρεάζονται από μερική βλάβη του συστήματος, όπως συμβαίνει συχνά σε τραυματισμούς του εγκεφάλου.

I. B. 1. Αμυγδαλή –κεντρικός αμυγδαλικός πυρήνας

Η αμυγδαλή είναι ένα ετερογενές σύνολο πυρήνων με σχήμα αμύγδαλου και βρίσκεται στο κέντρο του τηλεγέφαλου. Χωρίζεται σε πολλές κύριες περιοχές : το σύμπλεγμα του βασικού και του έξω αμυγδαλικού πυρήνα (BLNG), το σύμπλεγμα του μεσαίου και του πρόσθιου πυρήνα και τον κεντρικό αμυγδαλοειδή πυρήνα (CeN). Το BLNG σχηματίζει τον βασικό πυρήνα υποδοχής και συνδέεται με τον αισθητικό φλοιό. Ο κεντρικός αμυγδαλικός πυρήνας σχετίζεται με ελεγχόμενες και αντανακλαστικές συναισθηματικές απαντήσεις (Applegate., Kapp., Underwood., McNall., 1983) και προβάλλει από το εγκεφαλικό στέλεχος και το διεγκέφαλο (Price., Amaral., 1987). Ενώ το BLNG είναι σημαντικό για την απόκτηση συναισθηματικών απαντήσεων, ο κεντρικός πυρήνας είναι μέρος ενός ξεχωριστού υποσυστήματος που εμπλέκεται στο να κατευθύνεται και να αυξάνεται η προσοχή όταν η αξία ενός ερεθίσματος είναι άγνωστη. Ο κεντρικός αμυγδαλικός πυρήνας χορηγεί δυο κύρια συστήματα απαγωγών ιών : την τελική ταινία και τις κοιλιακές αμυγδαλόφυγες ίνες. Η τελική ταινία χορηγεί ίνες στον υποθάλαμο, καθώς και στο βασικό πυρήνα της τελικής ταινίας και στον επικλινή πυρήνα. Οι κοιλιακές αμυγδαλόφυγες ίνες καταλήγουν στο εγκεφαλικό στέλεχος, στον ραχιαίο-έσω πυρήνα του θαλάμου και στο πρόσθιο τμήμα της έλικας του προσαγωγίου (dentate gyrus). Πρόσφατα ο κεντρικός αμυγδαλικός πυρήνας των θηλαστικών χωρίστηκε και σε άλλες υποομάδες με βάση ιστοχημικά και μορφολογικά δεδομένα που έδειξαν ότι οι υποομάδες διαφέρουν σε λειτουργικές και σε διαδικασίες ελέγχου (DeOlmos., 1990 ; Sims., Williams., 1990).

Για την κατανόηση της αμυγδαλής είναι σημαντική η εκτίμηση των πυρήνων εισόδου και εξόδου της, δηλαδή του συμπλέγματος του βασικού και έξω αμυγδαλικού πυρήνα, καθώς και του κεντρικού αμυγδαλικού πυρήνα. Οι αισθητικές πληροφορίες που προέρχονται από τους αισθητικούς πυρήνες του θαλάμου και από τις πρωτοταγείς αισθητικές περιοχές του φλοιού, φτάνουν στο σύμπλεγμα του βασικού και έξω πυρήνα . Από αυτή την περιοχή εισόδου της αμυγδαλής πηγαίνουν προς τον κεντρικό αμυγδαλικό πυρήνα, ο οποίος αποτελεί την κύρια έξοδο της αμυγδαλής (Gallagher., Holland., 1992). Ο κεντρικός αμυγδαλικός πυρήνας στέλνει ίνες στην έξω περιοχή του υποθαλάμου και

σε περιοχές του εγκεφαλικού στελέχους οι οποίες ρυθμίζουν τις αυτόνομες αποκρίσεις σε ερεθίσματα με συναισθηματική φόρτιση. Επιπλέον ο αμυγδαλικός πυρήνας προβάλλει τόσο άμεσα όσο και έμμεσα στον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου, ο οποίος έχει σημασία για τη διεκπεραίωση νευροενδοκρινικών αποκρίσεων σε ερεθίσματα φόβου και στρες. Έτσι, ο ηλεκτρικός ερεθισμός του κεντρικού πυρήνα προκαλεί αύξηση του καρδιακού ρυθμού, της αρτηριακής πίεσης και του ρυθμού της αναπνοής. Όλα αυτά αποτελούν ενδείξεις που παρατηρούνται κατά την εξαρτημένη μάθηση σε σχέση με το φόβο (LeDoux., 1992). Αντίθετα βλάβη στον πυρήνα αυτό αναστέλλει τις παραπάνω ενδείξεις. Ο κεντρικός αμυγδαλικός πυρήνας προβάλλει επίσης σε συνειρμικές περιοχές ειδικά στον κογχομετωπιαίο φλοιό και στην έλικα του προσαγωγίου. Η οδός αυτή είναι σημαντική για τη συνειδητή αντίληψη του συναισθήματος. Πιο συγκεκριμένα ο κεντρικός πυρήνας παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κατάστασης εγρήγορσης και στις μεταβολές του καρδιακού ρυθμού (LeDoux., 1994).

I. B. 2. Μέλαινα ουσία

Η μέλαινα ουσία βρίσκεται στον μέσο εγκέφαλο και είναι μέρος των βασικών γαγγλίων μαζί με το κέλυφος, τον κερκοφόρο πυρήνα και την ωχρή σφαίρα. Έχει τρεις λειτουργίες : (1) Ελέγχει την εκούσια κίνηση (2) Παράγει τον νευροδιαβιβαστή ντοπαμίνη και (3) Ρυθμίζει τη διάθεση (Adams., Victor., 1993). Διακρίνεται σε δυο μοίρες, μια κοιλιακή ωχρή μοίρα, η δικτυωτή μοίρα, (pars reticulate SNr) και μια ραχιαία σκοτεινόχρωμη, τη συμπαγή μοίρα (pars compacta) SNc. Η SNc είναι μια περιοχή με μεγάλη πυκνότητα κυττάρων που αποτελείται από πλήθος ντοπαμινεργικών νευρώνων και από μια μαύρη χρωστική την νευρομελανίνη, ένα προϊόν σαν την ντοπαμίνη που παράγεται από την τυροσίνη. Σε αυτή τη χρωστική, που είναι πολυμερές της ντοπαμίνης, οφείλεται το όνομα της μέλαινας ουσίας, γιατί στον άνθρωπο η μοίρα αυτή του εγκεφάλου εμφανίζεται με μαύρη απόχρωση στις τομές. Οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες του ραχιαίου τμήματος της μέλαινας ουσίας αναφέρονται ως 'ραχιαίο σύνολο' (dorsal tier), (Haber., Ryoo., Cox., Lu., 1995 ; Lavoie., Parent., 1991) ενώ οι νευρώνες του κοιλιακού τμήματος αναφέρονται ως 'κοιλιακό σύνολο' (ventral tier), (Haber., Fudge., 1997). Οι νευρώνες της SNr συνδέονται κυρίως με το θάλαμο αλλά και με πυρήνες του

εγκεφαλικού στελέχους και χρησιμοποιούν ως νευροδιαβιβαστή το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA). Τα κύτταρα τόσο στην SNc όσο και στην SNr έχουν τριγωνικό σχήμα και διακρίνονται σε δυο τύπους. Οι μικροί νευρώνες (10-12 μm διάμετρο σώματος) με μικρούς άξονες θεωρούνται οι κύριοι νευρώνες της μέλαινας ουσίας (Parent., 1986). Αποτελούν το 10% σε σχέση με το σύνολο των νευρώνων στην SNc και το 40% στην SNr (Carpenter., 1981). Ο δεύτερος τύπος νευρώνων είναι μεγαλύτερος (15-20 μm διάμετρο σώματος) και αποτελούν τους νευρώνες που μεταφέρουν τα σήματα από την μέλαινα ουσία προς άλλες περιοχές. Η δικτυωτή μοίρα της μέλαινας ουσίας μαζί με την ωχρή σφαίρα αποτελούν τους κύριους πυρήνες εξόδου των βασικών γαγγλίων.

Η μέλαινα ουσία είναι βασικό συστατικό του μονοπατιού φλοιός-βασικά γάγγλια-φλοιός και μεσολαβεί στη διαβίβαση ερεθισμάτων από τα βασικά γάγγλια στον θάλαμο. Οι συνδέσεις μεταξύ των βασικών γαγγλίων είναι εκτεταμένες αλλά συστηματοποιημένες. Κύτταρα διαφορετικών τμημάτων του κερκοφόρου πυρήνα και του κελύφους προβάλλουν σε συγκεκριμένες μοίρες της ωχρής σφαίρας και της μέλαινας ουσίας. Έτσι, επειδή όλες οι ίνες εμφανίζουν τοπογραφική οργάνωση, συγκεκριμένες μοίρες του φλοιού επιδρούν μέσω του νεοραβδωτού σε συγκεκριμένες μοίρες της ωχρής σφαίρας και της μέλαινας ουσίας. Ο υποθαλάμιος πυρήνας δέχεται ίνες από την εξωτερική μοίρα της ωχρής σφαίρας και χορηγεί ίνες και στις δυο μοίρες της ωχρής σφαίρας και στη δικτυωτή μοίρα της μέλαινας ουσίας. Δέχεται επίσης από τον πρωτοταγή κινητικό και από τον προκινητικό φλοιό, παρέχοντας στον κινητικό φλοιό ένα μέσο για τον έλεγχο των απαγωγών ιών των βασικών γαγγλίων. Επίσης το νεοραβδωτό δέχεται σημαντικό αριθμό ντοπαμινεργικών ιών από τη συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας. (Alexander., Crutcher., 1990). Η καταστροφή των ιών αυτών έχει ως συνέπεια την νόσο Parkinson. Συνεπώς η απελευθέρωση ντοπαμίνης στην μέλαινα ουσία μπορεί να επηρεάσει τις κινητικές λειτουργίες. Αυτή η αντίληψη υποστηρίζεται από έρευνες που δείχνουν ότι η ντοπαμίνη επηρεάζει τόσο την ηλεκτρική δραστηριότητα των ντοπαμινεργικών νευρώνων (αυτό-αναστολή), όσο και την διαβίβαση γλουταμικού οξέος και γ-αμινοβουτυρικού οξέος στη μέλαινα ουσία (Aghajanian., Bunney., 1977 ; Floran et al., 1990 ; Matuszewich., Yamamoto., 1999 ; Biggs., Starr., 1997 ; Rosales et al., 1997 ; Timmerman., Westerink., 1995 ; Waszczak., Walters., 1983). Έμμεση απόδειξη για την επίδραση στις κινητικές λειτουργίες από την ενδογενή απελευθέρωση

ντοπαμίνης στη μέλαινα ουσία κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, παρέχει μια μελέτη που δείχνει ότι οι D₁ και D₂ υποδοχείς ντοπαμίνης σε αυτήν την περιοχή ελέγχουν το μυϊκό τόνο (Crocker., 1997), ενώ υπάρχουν και πιο πρόσφατες άμεσες αποδείξεις (Bergquist., Shahabi., Nissbrandt., 1999) που δείχνουν ότι η αποικοδόμηση του μονοπατιού ντοπαμίνης είναι υπεύθυνη για τα κινητικά συμπτώματα που εμφανίζονται στην ασθένεια του Parkinson. Επιπλέον το σύστημα ντοπαμίνης του μονοπατιού μέλαινα ουσία-θάλαμος, επηρεάζει και τους μηχανισμούς μάθησης και μνήμης των ασθενών με Parkinson (Thomas., Reymann., Lieury., Allain., 1996), χωρίς να είναι πλήρως γνωστό ποιες εγκεφαλικές δομές εμπλέκονται στη δυσλειτουργία των μηχανισμών αυτών.

Οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες του μέσου εγκέφαλου υποδιαιρούνται στην κοιλιακή περιοχή (VTA) και στην κύρια μέλαινα ουσία (SNc), η οποία θεωρείται η πηγή του μονοπατιού μέλαινα ουσία- θάλαμος. Η κοιλιακή περιοχή (VTA) προβάλλει στην κοιλιακή μοίρα του θαλάμου (Bjorklund., Lindvall., 1984 ; Lynd-Balta.,Haber., 1994). Σε νευρικό επίπεδο έχει αποδειχθεί ότι το σύμπλοκο SNc/VTA έχει διπλή δράση στην απελευθέρωση τη ντοπαμίνης. Η ντοπαμίνη μπορεί να απελευθερωθεί με τον κλασικό τρόπο, από τα τελικά κομβία και έτσι να μεταβάλει τη δραστηριότητα δομών- στόχος. Εναλλακτικά, μπορεί να απελευθερωθεί από το σώμα και τους δενδρίτες των νευρώνων (Cheramy et al., 1981 ; Geffen at al., 1976), και έτσι να ρυθμίσει τη δραστηριότητα γειτονικών νευρώνων καθώς και τη διαβίβαση συστημάτων που σχετίζονται με αυτές τις περιοχές. Σε λειτουργικό επίπεδο, η σωματοδενδριτική απελευθέρωση ντοπαμίνης στη μέλαινα ουσία, μπορεί να ρυθμιστεί από τη συμπεριφορά χωρίς αλλαγή στη συγκέντρωση ντοπαμίνης στο θάλαμο (Bergquist et al., 2002).

II.A. Φυσιολογικά μοντέλα μνήμης και μάθησης

Προκειμένου να είναι δυνατή η χρήση ενός μοντέλου μάθησης είναι σημαντικό να είναι σύμφωνο με τα στοιχεία που προκύπτουν από ψυχολογικές μελέτες. Έχει αναπτυχθεί πλήθος θεωριών με βάση τις παρατηρήσεις τόσο στον άνθρωπο όσο και σε ζώα και αυτό μας έδωσε τη δυνατότητα να κατανοήσουμε κάποια χαρακτηριστικά των διαδικασιών της μνήμης. Φαινόμενα όπως η παλίνδρομη αμνησία, αποτέλεσμα τραυματισμού ή μίας παρεμβαλλόμενης μάθησης, δημιούργησαν την υπόθεση ότι οι διαδικασίες αντίληψης, ακολουθούνται από διατήρηση των νευρικών διαδικασιών

(Muller et Pilzecker, 1990), επιτρέποντας έτσι την μακρόχρονη αποθήκευση των πληροφοριών. Η ύπαρξη λειτουργικών παραγόντων μνήμης, επιβεβαίωσε την παραπάνω υπόθεση και οδήγησε στο συμπέρασμα ότι ο σχηματισμός του μνημονικού μονοπατιού (καταγραφή) δεν είναι στιγμιαία (Bloch, 1970) και έδωσε γέννηση στην αντίληψη της αστάθειας του μονοπατιού και της ενεργούς μνήμης (Lewis, 1979). Μετά την καταγραφή της πληροφορίας στην μνήμη μακράς διάρκειας, η πρόσβαση στο μονοπάτι ποικίλλει ανάλογα με το χρόνο (Kamin, 1957 ; Gisquet-Verrier et Alexinsky, 1988), και η επίκληση της μνήμης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, τόσο εξωτερικούς όσο και εσωτερικούς. Τέλος η ανάμνηση ενός γεγονότος δεν καθορίζεται μόνο από ένα στοιχείο-στόχος αλλά από πολλά στοιχεία που εμπλέκονται στην αρχική κατάσταση, γεγονός που δίνει στη μνήμη πολυδιάστατο χαρακτήρα (Underwood, 1969 ; Spear, 1978). Δηλαδή η παρουσίαση ενός μόνο στοιχείου της αρχικής κατάστασης μπορεί να διευκολύνει την ενεργοποίηση του μονοπατιού μνήμης και να επάγει μια νέα ενεργή φάση της μνήμης (De Vietti et al., 1977 ; Dekeyne, 1988). Για να ανακαλέσουμε μια ανάμνηση παρεμβάλλονται οι διαδικασίες καταγραφής της πληροφορίας και οι διαδικασίες αποκατάστασης της ανάμνησης αυτής. Αν η καταγραφή της ανάμνησης δεν έχει διαταραχθεί, η μη-αποκατάσταση της αρχικής ανάμνησης αποτελεί ολικό ή μερικό δείκτη του σφάλματος της μνήμης. Η καθημερινή εμπειρία και οι ψυχαναλυτικές θεωρίες του Freud, έχουν δημιουργήσει την ιδέα ότι η έλλειψη μνήμης θα παρουσίαζε μόνο μια έλλειψη πρόσβασης στο μονοπάτι της μνήμης. Όμως η έλλειψη της εξειδίκευσης (ή ακρίβειας) της ανάμνησης μετά από ένα μεγάλο χρονικό διάλειμα, μας αφήνει να υποθέσουμε ότι το μνημονικό μονοπάτι δεν μένει εντελώς ανεπηρέαστο και ότι η έλλειψη μνήμης θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα μίας πραγματικής έλλειψης (ή αποικοδόμησης) της πληροφορίας που αποθηκεύεται στη μνήμη. Αυτές οι δυο αντιλήψεις για την έλλειψη μνήμης δεν είναι εντελώς ανεξάρτητες ούτε αναιρεί η μια την άλλη αν θεωρήσουμε ότι η φύση της μνήμης είναι πολυδιάστατη. Κάποιες πτυχές της ανάμνησης μπορεί να αποικοδομούνται και άλλες να γίνονται απλά δύσκολα προσβάσιμες.

Αναπτυχθήκαν πολλά μοντέλα μνήμης αλλά η χρήση τους δεν είναι δυνατή γιατί δεν συμφωνούν με τις φυσιολογικές ιδιότητες του νευρικού συστήματος. Τέτοια παραδείγματα είναι αυτό που υποστηρίζει μια μακρομοριακή κωδικοποίηση του

μονοπατιού της μνήμης (μια ανάμνηση= ένα μόριο), ή αυτό που υποστηρίζει μια ενδονευρική τοποθέτηση των διαδικασιών μνήμης (ένας νευρώνας κωδικοποιεί μια ανάμνηση). Αναλογιζόμενοι την πολυπλοκότητα των συνδέσεων του νευρικού συστήματος, η πιο πιθανή υπόθεση είναι ότι η κωδικοποίηση της πληροφορίας εξαρτάται από την καθιέρωση εξειδικευμένων μοτίβων για την ενεργοποίηση στο κέντρο του νευρικού δικτύου. Αυτή η αντίληψη συνδέεται με την υπόθεση ότι η επαναλαμβανόμενη και ταυτόχρονη ενεργοποίηση των νευρικών κυττάρων, σχηματίζουν βαθμιαία ένα σύνολο κυττάρων που αποκτούν κοινή λειτουργία και συνιστούν ένα κλειστό σύστημα μέσα στο οποίο γίνεται ανακύκλωση της νευρικής εισροής, η οποία συνεχίζεται και μετά την εξαφάνιση του αρχικού γεγονότος (συντήρηση), (Hebb, 1949). Αυτό το φαινόμενο της συντήρησης, είναι η βάση του φυσιολογικού μοντέλου του δυναμικού (Lashley, 1950).

Η υπόθεση σύμφωνα με την οποία η κωδικοποίηση της πληροφορίας εξαρτάται από την καθιέρωση μοτίβων ενεργοποίησης στο κέντρο του νευρικού δικτύου, επιβεβαιώθηκε πειραματικά χάρη στην καταγραφή της κυτταρικής δραστηριότητας πολλών κεντρικών δομών. Για παράδειγμα κατά τη μάθηση, παρατηρούνται κυτταρικές απαντήσεις (μεταβολή της αυθόρμητης δραστηριότητας των νευρικών κυττάρων σε απάντηση ενός σήματος), σε πολλές δομές του Κ.Ν.Σ. Οι πρώτες λεπτομερείς μελέτες πραγματοποιήθηκαν από τον Buchwald et al. (1966), στη συνέχεια με πιο συστηματικό τρόπο από τον Olds και τους συνεργάτες του (Olds et Hirano, 1969) ; Hirano et al., 1970; Olds et al., 1972).

Για τον καθορισμό των φυσιολογικών μηχανισμών που είναι υπεύθυνοι για την ενεργοποίηση του δικτύου κατά τη διάρκεια της καταγραφής της μνήμης, αναπτύχθηκαν θεωρίες που βασίζονται στην παρατήρηση των φυσιολογικών μεταβολών κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του νευρικού ιστού ή μετά από βλάβη : (1) μια διαδικασία νευρογένεσης (Altman et al., 1968), αλλά είναι δύσκολο να φανταστεί κανείς πως η γέννηση νέων νευρώνων θα μπορούσε να είναι εξειδικευμένη για την ικανότητα μάθησης και κυρίως πως η έλλειψη μνήμης και η ενεργοποίηση της από σχετικούς δείκτες μπορεί να επανέλθει, (2) μια διαδικασία συναπτογένεσης, που βασίζεται στην βλάστηση των νευρικών ιών και την αύξηση των συναπτικών κοκκίων που σχηματίζουν νέες λειτουργικές συνάψεις (Greenough, 1984), (3) αναστολή (Changeux et Danchin, 1976) ή

μια καταστολή (Mark, 1975) των μη σχετικών συνάψεων (μη ενεργές). Αυτές οι υποθέσεις για τους πιθανούς μηχανισμούς σταθεροποίησης των νευρικών δικτύων, δεν χρησιμοποιούνται γιατί δεν είχε αποδειχθεί ότι αυτά τα φαινόμενα συμβαίνουν σ'ένα ανέπαφο ιστό ενήλικου ζώου καθώς και ότι επάγονται από τη μάθηση.

Μια ακόμα υπόθεση που υποστηρίζεται και από πειραματικά αποτελέσματα, προτείνει ότι η ενεργοποίηση του δικτύου πραγματοποιείται χάρη σε μια μεταβολή της ικανότητας για συναπτική μεταβίβαση στο επίπεδο των ήδη υπάρχοντων συνάψεων. Πιο συγκεκριμένα αυτή η μεταβολή είναι αύξηση της συναπτικής ικανότητας. Για αυτή την ικανότητα δημιουργίας συνάψεων θα μπορούσε να είναι υπεύθυνη η πρόκληση μακρόχρονης ενδυνάμωσης, LTP. Οι Bloch et Laroche (1984) πρότειναν μια σχηματικοποίηση του νευρικού δικτύου, με τη μορφή ενός στρώματος με πολλές εισόδους και εξόδους, στο εσωτερικό του οποίου υπάρχει ένα μοτίβο ενεργοποίησης, που ξεκινά κατά τη διάρκεια καταγραφής της πληροφορίας.

Η δραστηριότητα στο δίκτυο αντιπροσωπεύει την ενεργή μορφή της μνήμης, αναπαριστώντας όχι μόνο τα ερεθίσματα-στόχους αλλά και όλους τους παράγοντες της κατάστασης καθώς και τη σχέση ανάμεσα σε αυτά τα γεγονότα. Η φάση της μνήμης μακράς διάρκειας χαρακτηρίζεται από έλλειψη δραστηριότητας στο εξειδικευμένο δίκτυο (ανενεργή κατάσταση), αλλά το μονοπάτι της μνήμης παραμένει δυναμικά ενεργό από μια μόνιμη ενεργοποίηση των σημείων ένωσης (συνάψεις ή σύνολο συνάψεων). Η πλήρης ή μερική αποκατάσταση της μνήμης εξαρτάται από την ενεργοποίηση ενός μοτίβου στο κέντρο του δικτύου (από άσχετα ερεθίσματα), με τρόπο ώστε να ανακατασκευαστεί μια εσωτερική αναπαράσταση της αρχικής κατάστασης (ενεργή κατάσταση). Αύξηση του παράγοντα της συναπτικής μεταβίβασης, που χαρακτηρίζει την ενεργοποίηση των σημείων σύνδεσης και ένα φαινόμενο παρόμοιο με αυτό της LTP, θα μπορούσε να αποτελεί ένα ενδιάμεσο μηχανισμό ο οποίος θα προετοιμάζει τις συναπτικές αλλαγές μακράς διάρκειας (πέραςμα από την ενεργή στην μη ενεργή κατάσταση, Bloch et Laroche, 1984).

II.B.1.

Μακρόχρονη ενδυνάμωση, LTP : Μοντέλο μελέτης των συναπτικών μεταβολών

Οι μεταβολές μακράς διάρκειας της ικανότητας της συναπτικής μεταβίβασης στο επίπεδο των μονοσυναπτικών ενώσεων μετά από επαναλαμβανόμενη ενεργοποίηση της σχετικής οδού, είναι ένα φαινόμενο που έχει μελετηθεί κατά κόρον. Αυτές οι μεταβολές, σχετίζονται με μια αύξηση ή ελάττωση της μετασυναπτικής απάντησης που επιμένει μετά την αναστολή των επαναλαμβανόμενων ερεθισμάτων. Οι Larrabee και Bronk (1947), ήταν οι πρώτοι που εφάρμοσαν μια μετά ενισχυτική συναπτική διευκόλυνση (PPT, *potentialisation post tetanique*), στο επίπεδο της μεταβίβασης στα γάγγλια, αύξηση που μπορεί να διαρκέσει περισσότερο λεπτά. Το φαινόμενο αυτό μελετήθηκε και στα μονοσυναπτικά αντανακλαστικά (Lloyd, 1949) και στη συνέχεια παρατηρήθηκε σε πολλά μονοπάτια του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος (Hughes, 1958) και μελετήθηκαν οι μηχανισμοί του, ιδιαίτερα στις νευρομυκικές συνδέσεις (Magleby et Zengel, 1975). Οι Bliss και Lomo (1973) εφάρμοσαν σε αναισθητοποιημένο κουνέλι μεταβολές με μεγάλη διάρκεια (πάνω από 30 λεπτά), στο επίπεδο της έλικας του προσαγωγίου, μετά από επαναλαμβανόμενη ενεργοποίηση. Το φαινόμενο αυτό που επιβεβαιώθηκε και σε ξυπνητό κουνέλι (Bliss et Gardner-Medwin, 1973), ονομάστηκε LTP. Κατόπιν οι πειραματικές εφαρμογές της LTP αυξήθηκαν τόσο σε ζώα (αναισθητοποιημένα ή όχι), καθώς και *in vitro* και έτσι υπάρχει αρκετή βιβλιογραφία που δείχνει ότι μπορεί να εφαρμοστεί σε πολλές δομές του νευρικού συστήματος. Η LTP παρατηρήθηκε στον αρουραίο (Douglas et Goddard, 1975), την γάτα (Sakamoto et al. 1987), την σαύρα (Larson et Lynch, 1985) και στα ασπόνδυλα (Walter et Byrne, 1985).

II.B.2. Καθορισμός και ιδιότητες.

Η LTP καθορίζεται ως η μακράς διάρκειας αύξηση της ικανότητας της συναπτικής μεταβίβασης μετά από επαναλαμβανόμενη ενεργοποίηση της αισθητικής οδού. Μετά το ερέθισμα παρατηρούνται τουλάχιστον δυο στοιχεία μακράς διάρκειας : (1) η συναπτική ενδυνάμωση, που είναι μια αύξηση του μετασυναπτικού ενισχυτικού δυναμικού (PPSE), που ακολουθείται από μια αύξηση της κυτταρικής εκπόλωσης και

(2) η ενδυνάμωση E-S ('EPSP/spike'), που αναφέρεται σε μια βοηθητική αύξηση της κυτταρικής εκπόλωσης. Οι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την ενδυνάμωση E-S, δεν είναι ακόμα πλήρως γνωστοί, αλλά φαίνεται ότι αυτή η παράμετρος είναι ανεξάρτητη της συναπτικής ενδυνάμωσης (Taube et Schawrtzkroin, 1988) και μπορεί να αντικατοπτρίζει μια διαφορά μεταξύ της συναπτικής ενδυνάμωσης στο επίπεδο των κυττάρων-στόχος και των αναστολέων των νευρώνων που εφαρμόζονται στην ορθόδρομη αναστολή (feed-forward inhibition) (Andersen et al., 1980 ; Abraham et al., 1985 ; Abraham et al., 1987 ; Chavez-Noriega et al., 1989). Ο όρος LTP αναφέρεται στην συναπτική ενδυνάμωση. Από τη στιγμή της ανακάλυψής της, η LTP παρατηρήθηκε σε πολλούς συναπτικούς πληθυσμούς, ιδιαίτερα στο επίπεδο του ιππόκαμπου αλλά και σε άλλες δομές του Κ.Ν.Σ., όπως στον σώματο-αισθητικό φλοιό (Voronin, 1985), τον οπτικό φλοιό (Artola et Singer, 1987), τον κινητικό φλοιό (Sakamoto et al., 1987), σε βαθύτερα στρώματα της παρεγκεφαλίδας (Racine et al., 1986) και τέλος στον οοσφρητικό βολβό (Gervais et al., 1990).

Υπάρχουν πέντε κύριες ιδιότητες της LTP:

1. Η πρώτη προκύπτει από τον ορισμό της. Παρατηρείται αρκετή ώρα μετά το πέρας των ερεθισμάτων που την έχουν ενεργοποιήσει, έως και πολλές βδομάδες σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε (Bliss et Gardner-Medwin, 1973 ; Douglas et Goddard, 1975 ; Barnes et McNaughton, 1980, 1985).
2. Επάγεται γρήγορα χάρη στα ερεθίσματα υψηλής συχνότητας και πολύ μικρής διάρκειας (Douglas et Goddard, 1975 ; Douglas, 1977).
3. Η συναπτική ενδυνάμωση είναι εξειδικευμένη (μονοσυναπτικό χαρακτήρα), για τις ενεργοποιημένες συνάψεις από το ερέθισμα. Παραδείγματος χάριν, η LTP που προκαλείται από ένα σήμα στους κορυφαίους δενδρίτες δεν επηρεάζει ένα ανεξάρτητο σήμα στους βασικούς δενδρίτες (Andersen et al., 1977 ; Andersen et al., 1980 ; McNaughton, 1980).
4. Απαιτεί το συνδυασμό μιας προσυναπτικής ενεργοποίησης και μιας ικανοποιητικής μετασυναπτικής εκπόλωσης. Αυτό το συμπέρασμα προήλθε από το γεγονός ότι για την επαγωγή της LTP απαιτείται το μετασυναπτικό στοιχείο να είναι υπερπολωμένο (Malinow et Miller, 1986). Επιπλέον η εφαρμογή απλών ερεθισμάτων μπορεί να επάγει την LTP αν το μετασυναπτικό στοιχείο είναι επαρκώς εκπολωμένο (Kelso et

al., 1986 ; Sastry et al., 1986 ; Wingstrom et al., 1986). Τέλος μια μόνο εκπόλωση δεν επαρκεί για να επάγει την LTP, αλλά απαιτείται και μια προσυναπτική δραστηριότητα (Hvalby et al., 1987).

5. Έχει ιδιότητες συνεργασίας ή συσχέτισης. Η επαγωγή της LTP απαιτεί την ενεργοποίηση αρκετών συνάψεων (McNaughton et al., 1978). Για παράδειγμα η κοινή ενεργοποίηση δυο ινών του δικτύου που συγκλίνουν στον ίδιο κυτταρικό πληθυσμό προκαλεί μια LTP πιο ισχυρή από αυτή που προκαλείται μετά από ξεχωριστή ενεργοποίηση κάθε ίνας. Όταν ένα ασθενές και ένα ισχυρό διεγερτικό σήμα φτάνουν χωριστά στην ίδια περιοχή των δενδριτών ενός πυραμιδοειδούς κυττάρου, το ασθενές σήμα θα ενδυναμωθεί μόνο αν ενεργοποιηθεί σε συνδυασμό με το ισχυρό. Επιπλέον ένας συναπτικός πληθυσμός που φαίνεται ότι δεν ενδυναμώνεται από την ενεργοποίηση μίας μόνο οδού, μπορεί να ενδυναμωθεί μετά από κοινή ενεργοποίηση της ίδιας οδού και μίας άλλης. Αυτές οι ιδιότητες παρατηρήθηκαν στην έλικα του προσαγωγίου (McNaughton et al., 1978 ; Levy et Steward, 1979, 1983 ; Levy et al., 1983 ; Winson et Dahl, 1986 ; White et al., 1988 ; Lopez et al., 1990) και στην περιοχή CA1 του υπόκαμπου (Barrionuevo et Brown, 1983 ; Gustafsson et Wigstrom, 1986 ; Lee, 1983 ; Sastry et al., 1986). Αυτή η συνεργατική δραστηριότητα έχει συνειρμικά στοιχεία όμοια με εκείνα που συναντάμε στην κλασική εξαρτημένη μάθηση.

II.Γ. Επαγωγή της μακρόχρονης ενδυνάμωσης, LTP

Κατά την παράθεση των ιδιοτήτων της LTP αναφέρθηκε ότι για την επαγωγή της είναι απαραίτητη μια προσυναπτική δραστηριότητα και μια μετασυναπτική εκπόλωση. Σημαντικό ρόλο στην επαγωγή της LTP παίζουν και οι NMDA υποδοχείς. Η συναπτική μεταβίβαση επιτρέπει τη είσοδο μονοθενών ιόντων και έτσι η επαγωγή της LTP απαιτεί την ενεργοποίηση των NMDA υποδοχέων (Collingridge et Bliss, 1987) : η εφαρμογή ενός εξειδικευμένου ανταγωνιστή για τους συγκεκριμένους υποδοχείς, το 2-αμινο-5-φωσφονοβαλερικό οξύ (APV) μπλοκάρει την επαγωγή της LTP. Κατά τη φυσιολογική συναπτική διαβίβαση, επικρατούν οι μη NMDA υποδοχείς, δεδομένου ότι οι διάλυτοι-υποδοχείς NMDA αποκλείονται από Mg^{2+} . Ο διάλυλος των NMDA

υποδοχέων είναι τασεο- ελεγχόμενος, δηλαδή για την ενεργοποίηση του απαιτείται ένα συγκεκριμένο επίπεδο εκπόλωσης του μετασυναπτικού κυττάρου από ισχυρά συνεργαζόμενα σήματα προερχόμενα από πολλούς προσυναπτικούς νευρώνες, που προκαλεί την απελευθέρωση ιόντων μαγνησίου. Η απελευθέρωση αυτή των θετικώς φορτισμένων Mg^{2+} επιτρέπει την είσοδο ιόντων νατρίου και κυρίως ασβεστίου μέσω του διαύλου (Nowak et al., 1984 ; Coan et Collingrindge, 1985 ; Ascher et Nowak, 1987).

Το ασβέστιο πυροδοτεί την LTP. Είναι από μόνο του επαρκές και απαραίτητο για να την επάγει. Ελάττωση της ενδοκυτταρικής ή εξωκυτταρικής συγκέντρωσης ασβεστίου (με προσθήκη EGTA), αναστέλλει την επαγωγή της LTP (Dunwiddie et Lynch, 1978 ; Lynch et al., 1983). Ενδιαφέρον είναι επίσης το γεγονός ότι αύξηση της εξωκυτταρικής συγκέντρωσης του ασβεστίου επάγει αύξηση της συναπτικής μεταβίβασης (Bliss et al., 1986 ; Reymann et al., 1986), η οποία μπλοκάρεται από έναν ανταγωνιστή των NMDA υποδοχέων, τον APV (Errington et al., 1987). Επιπλέον ο κορεσμός της συναπτικής ενδυνάμωσης από ένα παράγοντα (ασβέστιο ή σήμα ηλεκτρικής διέγερσης) αποτρέπει την συμπληρωματική αύξηση (Bliss et al., 1986 ; Reymann et al., 1986). Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η LTP επάγεται είτε από ηλεκτρική διέγερση ή από το ασβέστιο που ενεργοποιεί τους ίδιους μηχανισμούς.

II.Δ. Διατήρηση της LTP

Θεωρητικά στη διατήρηση της LTP, εμπλέκονται διάφοροι μηχανισμοί. Οι κύριοι είναι : (1) αυξημένη απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών (προσυναπτικός μηχανισμός), (2) αύξηση της ευαισθησίας ή του αριθμού των υποδοχέων (μετασυναπτικός μηχανισμός), (3) μεταβολή της μορφολογίας των συνάψεων (προ- και μετασυναπτικός). Από μελέτες *in vivo*, *in vitro* και *ex vivo*, αποδείχθηκε ότι η επαγωγή της LTP με διέγερση ή με ασβέστιο, προκαλεί αύξηση της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών (γλουταμικό και ασπαρτικό οξύ), η οποία μετριέται 2,5, 4,5 λεπτά και 3 ώρες μετά την επαγωγή (Lynch et al., 1985 ; Bliss et al., 1986 ; Feasey et al., 1986). Επιπλέον αυτή η αύξηση της απελευθέρωσης μπλοκάρεται από διαδικασίες που αποτρέπουν την LTP, όπως η εφαρμογή του APV (Errington et al., 1987). Τέλος αυτή η απελευθέρωση έχει μεγάλη διάρκεια, έως και 3 μέρες μετά την επαγωγή (Bliss et al., 1987).

Ο υπεύθυνος μηχανισμός για αυτή την απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών θα μπορούσε να επέμβει στον κύκλο της φωσφοινοσιτόλης. Η υδρόλυση των φωσφοινοσιτιδίων από τη φωσφωλιπάση C παράγει δυο δεύτερα μηνύματα (την τριφωσφορική ινοσιτόλη, IP_3 , και τη διακυλογλυκερόλη, DAG), που εμπλέκονται σε μηχανισμούς μεταγωγής σήματος στο Κ.Ν.Σ. (Berridge et Irvine, 1984). Μετά από επαγωγή της LTP παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης των δεύτερων μηνυμάτων (Bar et al., 1984 ; Clements et al., 1988 ; Lynch et al., 1988). Η τριφωσφορική ινοσιτόλη είναι ικανή να αυξήσει την ενδοκυτταρική συγκέντρωση του ασβεστίου, μεταβάλλοντας έτσι την κατανομή του στα διαφορά ενδοκυτταρικά διαμερίσματα (Berridge et Irvine, 1984). Η διακυλογλυκερόλη αυξάνει τη συγγένεια της πρωτεϊνικής κίνησης C για το ασβέστιο και επάγει τη μετακίνηση της από το κυτόπλασμα στην μεμβράνη (Nishizuka, 1984). Αυτή η μετακίνηση της πρωτεϊνικής κίνησης C, παρατηρήθηκε μετά την LTP (Akers et al., 1986). Θα μπορούσε όμως να χρησιμοποιηθεί η διαδικασία φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών από πρωτεϊνικές κινάσες εξαρτώμενες από το σύστημα ασβεστίου/καλμοδουλίνης (Wang et al., 1988). Αυτό επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι η καλμοδουλίνη δεν αυξάνει την απελευθέρωση του γλουταμικού σε μια σύναψη έως ότου ο ιστός να ενδυναμωθεί (Lynch et Bliss, 1986).

Εκτός από τις προσυναπτικές τροποποιήσεις φαίνεται ότι για τη διατήρηση της LTP εμπλέκονται εξίσου και μετασυναπτικές τροποποιήσεις. Σύμφωνα με την υπόθεση των Baudry και Lynch (1980), η είσοδος ασβεστίου σε μετασυναπτικό επίπεδο ενεργοποιεί μια πρωτεάση (καλπαΐνη), η οποία επάγει τις τροποποιήσεις των πρωτεϊνών του κυττοσκελετού (φοντρίνη). Αυτές οι τροποποιήσεις είναι υπεύθυνες για τις μορφολογικές αλλαγές των συνάψεων και για την αύξηση του αριθμού των μετασυναπτικών υποδοχέων, οδηγώντας έτσι σε αύξηση της συναπτικής διαβίβασης. Κάποιες από τις μετά- και προσυναπτικές τροποποιήσεις που παρατηρούνται μετά την επαγωγή της LTP είναι : αύξηση της επιφάνειας των δενδριτικών κόμβων (Van Harreveld et Fifkova, 1975), αύξηση των συνάψεων (Lee et al., 1980 ; Chang et Greenough, 1984), αύξηση της μετασυναπτικής πυκνότητας (Desmond et Levy, 1986) και τέλος αύξηση της πυκνότητας των μετασυναπτικών ενδομεμβρανικών συμπλόκων (Greenough et al., 1986).

II.E. LTP και Μνήμη

Η LTP από τη στιγμή της ανακάλυψης της θεωρήθηκε ως πιθανό μοντέλο των συναπτικών τροποποιήσεων που επάγονται κατά τη διαδικασία της μνήμης και αυτό για δυο λόγους : (1) είναι από τα πιο απλά μοντέλα, παρατεταμένης αύξησης της συναπτικής διαπερατότητας μετά από επαναλαμβανομένη ενεργοποίηση της νευρικής οδού, (2) υπάρχει ομοιότητα μεταξύ κάποιων ιδιοτήτων της και της διαδικασίας μάθησης και μνήμης. Καταρχήν παρόλο που η LTP δεν είναι μόνιμη, η μεγάλη της διάρκεια (έως και αρκετές βδομάδες), την έκανε υποψήφιο μοντέλο για τη μελέτη των φυσιολογικών μηχανισμών της μνήμης. Επιπλέον, όπως στη διαδικασία της μνήμης μπορεί να απομνημονευθεί ένα γεγονός πολύ σύντομης διάρκειας, έτσι και η LTP επάγεται ακόμα και μ'ένα ερέθισμα κάποιων milliseconds. Επίσης οι συνθήκες επαγωγής της LTP μπορούν να μιμηθούν τις φυσιολογικές δραστηριότητες. Επάγεται χάρη σε ερεθίσματα που μοιάζουν με εκπολώσεις αυθόρμητης δραστηριότητας των κυττάρων του υπόκαμπου (Swanson et al., 1982) και αυτά τα ερεθίσματα είναι ικανοποιητικά, εφόσον επαναλαμβάνονται με την ίδια συχνότητα στο ρυθμό θ του υπόκαμπου (Larson et al., 1986 ; Rose et Dunwiddie, 1986 ; Greenstein et al., 1988). Η μελέτη των μηχανισμών της LTP έφερε στην επιφάνεια το εξής ερώτημα : τι συνέπειες θα είχε στη μάθηση το μπλοκάρισμα των συναπτικών τροποποιήσεων που επάγονται κατά την LTP; Η έγχυση ενός εξειδικευμένου ανταγωνιστή των NMDA υποδοχέων, το APV (που μπλοκάρει την επαγωγή της LTP στον υπόκαμπο), απέδειξε διαταραχές στην απόκτηση κάποιων μορφών μάθησης. Αυτό αλλά και άλλα πολλά πειραματικά δεδομένα, έδειξαν ότι η καταστολή των NMDA υποδοχέων που αποτρέπουν την επαγωγή της LTP προκαλούν διαταραχές και στη μάθηση.

II. ΣΤ. Ρόλος της σύνθεσης πρωτεϊνών στην συναπτική πλαστικότητα και στη μνήμη

Οι μακράς διάρκειας μορφές μνήμης δημιουργούνται από μεταβολές στις συνάψεις, οι οποίες επάγονται από υψηλά επίπεδα δραστηριότητας, χρειάζονται χρόνο για να εδραιωθούν και περιλαμβάνουν γονιδιακή έκφραση. Παρόλο που αυτό το

συμπέρασμα είναι γενικά αποδεκτό, βασίζεται κυρίως σε έμμεσες αποδείξεις. Ο λόγος που συμβαίνει αυτό είναι γιατί οι ακριβείς θέσεις όπου συμβαίνουν οι αλλαγές δεν έχουν περιγραφεί ακόμα πλήρως, με εξαίρεση απλά νευρικά συστήματα. Στα θηλαστικά όμως είναι δύσκολο να καθοριστεί η θέση αποθήκευσης της μνήμης μακράς διάρκειας εξαιτίας της πολυπλοκότητας των νευρικών συστημάτων που μεσολαβούν ακόμα και στις πιο απλές μορφές μνήμης. Είναι δύσκολο να καταγραφούν όλα τα μονοπάτια που ενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια της μάθησης λόγω του εύρους των διαδικασιών αλλά και της παράλληλης επεξεργασίας τους στο Κ.Ν.Σ. Εξίσου δύσκολος είναι και ο διαχωρισμός μεταξύ των μονοπατιών που είναι βασικά για τη διαδικασία της μάθησης και αυτών που είναι βοηθητικά. Ακόμα και αν υποθέσουμε ότι μπορούμε να καταγράψουμε όλα τα μονοπάτια της μνήμης και της μάθησης, είναι μια πρόκληση να καταφέρουμε να υπολογίσουμε την μεταφορά πληροφορίας πριν και μετά την αποθήκευση της μνήμης ώστε να καθοριστούν οι θέσεις πλαστικότητας.

Ο πιο διαδεδομένος τρόπος για να ξεπεραστούν οι παραπάνω δυσκολίες είναι η χρήση μοντέλων μάθησης που μιμούνται τους μηχανισμούς αποθήκευσης της μνήμης. Για αυτό το λόγο η μακρόχρονη ενδυνάμωση (LTP), έχει μελετηθεί εκτενώς και χρησιμοποιείται ευρέως σε πειράματα νευροφυσιολογίας. Το ενδιαφέρον με την LTP είναι ότι όχι μόνο μιμείται τη διαδικασία αποθήκευσης μνήμης αλλά χρησιμοποιεί κοινούς μηχανισμούς με αυτή. Γνωρίζουμε αρκετά όσον αφορά τους μηχανισμούς επαγωγής της LTP, καθώς και για τα αρχικά κυτταρικά και μοριακά γεγονότα που συμβαίνουν κατά τη συναπτική πλαστικότητα. Όμως υπάρχουν λιγότερες πληροφορίες για τα γεγονότα που συμβαίνουν αργότερα κατά την εξαρτωμένη από την πρωτεϊνική σύνθεση συναπτική τροποποίηση, εκτός από το γεγονός ότι μπλοκάρεται με την αναστολή της σύνθεσης πρωτεϊνών. Η ανάγκη για πρωτεϊνική σύνθεση μπορεί να σημαίνει ότι οι πρωτεΐνες που απαιτούνται για τις συναπτικές τροποποιήσεις συντίθενται είτε από mRNA που υπάρχει ή ότι συντίθεται mRNA σαν αποτέλεσμα της μεταγραφικής δραστηριότητας. Υπάρχουν αποδείξεις ότι για μερικές τουλάχιστον μορφές συναπτικής πλαστικότητας απαιτείται και μεταγραφή αλλά και μετάφραση (Nguyen et al., 1994). Δηλαδή μια γενικά αποδεκτή άποψη είναι ότι κατάλληλα μοτίβα δραστηριότητας σε συνάψεις, επάγουν την σύνθεση συγκεκριμένων πρωτεϊνών που είναι βασικές για τις συναπτικές τροποποιήσεις. Αυτές οι τροποποιήσεις συμβαίνουν σε επιλεγμένους

πληθυσμούς συνάψεων (εξειδίκευση συνάψεων), σε ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα που διαρκεί για αρκετές ώρες μετά το γεγονός που τις πυροδοτεί.

Κατά την εξαρτωμένη από την πρωτεϊνική σύνθεση φάση της συναπτικής πλαστικότητας, αναμένεται : (1) Τα μοριακά γεγονότα θα πρέπει να πυροδοτούνται από μοτίβα δραστηριότητας που οδηγούν στην ενίσχυση της συναπτικής τροποποίησης. Για την LTP αυτό σημαίνει ότι η ενεργοποίηση των NMDA υποδοχέων είναι απαραίτητη (Link, Konietzko, Kauselmann, Krug, Schwanke, Frey, Kuhl, 1995) (2) Τα κατάλληλα μοτίβα συναπτικής δραστηριότητας θα πρέπει να επάγουν τη γονιδιακή έκφραση. Δηλαδή θα πρέπει να υπάρχει ένας μηχανισμός που επιτρέπει τη σηματοδότηση από τη σύναψη στον μεταγραφικό μηχανισμό του νευρώνα. (3) Η γονιδιακή επαγωγή και η σύνθεση νέων πρωτεϊνών πρέπει να συμβούν σε ένα ορισμένο χρονικό περιθώριο που αρχίζει τη στιγμή του ερεθίσματος και τελειώνει μερικές ώρες μετά (Nguyen, Abel, Kandel., 1994). (4) Οι διαδικασίες θα πρέπει να είναι ικανές για την παραγωγή εξειδικευμένων τροποποιήσεων στις συνάψεις στις οποίες εφαρμόστηκαν τα κατάλληλα μοτίβα δραστηριότητας. Οι νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες που είναι βασικές για την συναπτική πλαστικότητα μπορούν να μετακινηθούν εξειδικευμένα στις συνάψεις που θα τροποποιηθούν. Εναλλακτικά, μπορούν να κατανεμηθούν ευρέως γιατί η συναπτική εξειδίκευση έχει χαθεί από την αλληλεπίδραση μεταξύ της πρωτεΐνης και άλλων μορίων στις τροποποιημένες συνάψεις (Frey., Morris., 1997). (5) Τα μοριακά γεγονότα θα πρέπει να επάγονται στους νευρώνες από τη συμπεριφορά (6) Μπλοκάρισμα των μοριακών γεγονότων θα πρέπει να μπλοκάρει και τη συναπτική τροποποίηση (Otani, Marshall, Tate, Goddard, Abraham, 1989).

Η επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης για παράδειγμα των γονιδίων c-Fos, zif 268, Arc, χρησιμοποιήθηκε πρόσφατα για το χαρακτηρισμό των μηχανισμών που είναι υπεύθυνοι για τις κυτταρικές τροποποιήσεις κατά τη διάρκεια του σχηματισμού της μνήμης. Κατά τη διάρκεια της μάθησης η έκφραση φτάνει σε υψηλά επίπεδα ενώ μετά τη μάθηση επανέρχεται σε φυσιολογικά (Hess et al., 1995 ; Bertaina-Anglade et al., 2000 ; Guzowski et al, 2001 ; Kelly, Deadwyler, 2002 ; Vann et al., 2000). Ένα εργαλείο όμως, τα 'χρόνια FRAs', είναι ιδιαίτερα χρήσιμο στη μελέτη της κυτταρικής δραστηριότητας μετά από επαναλαμβανόμενα ερεθίσματα. Αυτό συμβαίνει γιατί παρατηρείται σταδιακή αύξηση στην νευρική έκφραση αυτών των αντιγόνων μετά από επανειλημμένη χορήγηση

κοκαΐνης, μορφίνης ή ψυχωτικών φαρμάκων (Rosen et al., 1994 ; Hope et al., 1994 ; Nye et al., 1995 ; Pennypacker et al., 1995 ; Moratalla et al., 1996). Σε αντίθεση με τα γονίδια c-Fos, κάθε ερέθισμα επάγει ένα μικρό επίπεδο FRA πρωτεϊνών, που οδηγούν σε σταδιακή αύξηση του συνολικού επιπέδου πρωτεϊνών στα κύτταρα που παραμένουν στον εγκέφαλο για βδομάδες ή και μήνες μετά τον ερεθισμό (Nestler, 1999). Η έκφραση της Fga-1 πρωτεΐνης, που χαρακτηρίζεται ως 'χρόνια FRA' (Kovacs, 1998), αρχίζει στα κύτταρα όταν το μέγιστο επίπεδο του c-Fos έχει επιτευχθεί και είναι ακόμα ανιχνεύσιμο για 9-24 ώρες μετά το ερέθισμα (Gruda et al. 1994). Η επαγωγή της Fga-1 με τη μάθηση έχει αποδειχθεί σε νευρώνες του υπόκαμπου σε επίμυς (Paratcha et al., 2000) και προτείνει ότι αυτή η πρωτεΐνη έχει ιδιαίτερο ρόλο στη δημιουργία μεταβολών μακράς διάρκειας μετά από επαναλαμβανόμενα ερεθίσματα.

II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

III. Υλικά και μέθοδοι

III. A. Πειραματόζωα

Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν είναι αρσενικοί albinos επίμυς του γένους Sprague-Dawley, από το κέντρο εκτροφής IFFA CREDO, (Saint-Germain sur L'Arbresle, France). Κατά την άφιξη τους στο εργαστήριο η ηλικία τους είναι 7-8 βδομάδες και ζυγίζουν 240-300 gr. Την ημέρα της άφιξης τους τοποθετούνται σε πλαστικά κουτιά ανά δυάδες, όπου και έχουν πρόσβαση σε νερό και τροφή όταν το επιθυμούν. Η αίθουσα φύλαξης ζώων έχει κύκλο 12 h φως- 12 h σκοτάδι (το φως ανάβει στις 8:00 πμ), τα επίπεδα υγρασίας είναι ελεγχόμενα και η θερμοκρασία διατηρείται σταθερή στους 25⁰ C. Οι επίμυς εξοικειώνονται καθημερινά με την ανθρώπινη επαφή και ζυγίζονται ως τη στιγμή της εγχείρησής τους, η οποία λαμβάνει χώρα σε ηλικία περίπου 9-11 βδομάδων. Όλα τα πειράματα έγιναν σύμφωνα με τους κανονισμούς της EEC (86/609/EEC) και της Εθνικής Γαλλικής Επιτροπής (French National Committee 87/848), που εξασφαλίζουν τη φροντίδα και τη σωστή χρήση των πειραματόζωων.

III. B.1. Ηλεκτρόδια ερεθισμού

Τα ηλεκτρόδια που χρησιμοποιούνται είναι διπολικά ομόκεντρα. Κατασκευάζονται από ανοξειδωτο χαλύβδινο σύρμα, διαμέτρου 150 μm το οποίο εισάγεται σε ένα χαλύβδινο σωλήνα με διάμετρο 300 μm (βλ. Σχήμα 6/ Παράρτημα).

III. B.2 Ηλεκτρόδια καταγραφής

Τα ηλεκτρόδια καταγραφής που χρησιμοποιούνται για την παρούσα εργασία είναι απλά, κατασκευάζονται από ένα σύρμα νικελίου-χρωμίου 62 μm, που τοποθετείται σ' ένα σωλήνα ίδιο με αυτό των ηλεκτροδίων ερεθισμού. Διαθέτει μια προέκταση από σύρμα νικελίου που τοποθετούμε στον εγκέφαλο και λειτουργεί ως γείωση (βλ. Σχήμα 7/ Παράρτημα).

III.B.3 Προετοιμασία του επίμυ

Για τη χειρουργική φάση ο επίμυς αναισθητοποιείται με ουρεθάνιο (urethane) με ενδοπεριτοναϊκή ένεση. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο χρήσης του ουρεθάνιου η συνηθισμένη δόση είναι 150 mg/100 g επίμυ και πρέπει να ενεθεί σε δύο δόσεις . Χορηγούμε ως πρώτη δόση το 75% της ολικής δόσης και το υπόλοιπο 25% μετά από 30 λεπτά περίπου. Όταν το ζώο αναισθητοποιηθεί ξυρίζεται το δέρμα του κρανίου και τοποθετείται σε μια στερεοταξική συσκευή συγκράτησης (βλ. Σχήμα 1./Παράρτημα), που επιτρέπει τη συντήρηση του κεφαλιού σε μια θέση σύμφωνα με τον άτλαντα των Paxinos et Watson (1982), με την επιφάνεια του κρανίου σε οριζόντια θέση. Όλες οι συντεταγμένες που αναφέρονται στην παρούσα εργασία μετρήθηκαν με βάση αυτό τον άτλαντα. Η συγκράτηση του κεφαλιού σε όλη τη διάρκεια του πειράματος, εξασφαλίζεται με την τοποθέτηση των δοντιών και των αυτιών του επίμυ σε κατάλληλες υποδοχές της στερεοταξικής συσκευής. Για τη αποφυγή των θερμικών σοκ λόγω πτώσης της θερμοκρασίας του επίμυ, τοποθετείται κάτω από το σώμα του μια θερμοφόρα. Αυτή συνδέεται με μια συσκευή ελέγχου της θερμοκρασίας που μας ενημερώνει για τη θερμοκρασία του επίμυ ανά πάσα στιγμή. Όταν εφαρμόζονται οι τεχνικές ερεθισμού και καταγραφής θα πρέπει να μην είναι στην πρίζα, γιατί παρεμβάλλει στα δυναμικά. Μετά τη διαμήκη τομή στο δέρμα, η επιφάνεια του κρανίου καθαρίζεται ώστε να είναι ευδιάκριτο το σημείο bregma (βλ. Σχήμα 2./Παράρτημα). Κατά τη διάρκεια του πειράματος προστίθεται φυσιολογικός ορός στην επιφάνεια του κρανίου για να παραμένει ενυδατωμένος. Για καλύτερη οπτική επαφή με την κρανιακή επιφάνεια χρησιμοποιούνται τέσσερις λαβίδες που απομακρύνουν το δέρμα και στερεώνονται δίπλα από την στερεοταξική συσκευή. Στη συνέχεια σύμφωνα με τον υπολογισμό των συντεταγμένων στις οποίες θα γίνει η τοποθέτηση των ηλεκτροδίων, μαρκάρεται το σημείο στο κρανίο του επίμυ και με τη βοήθεια της οδοντιατρικής εγγλυφίδας δημιουργούνται τρύπες στα μαρκαρισμένα σημεία. Με τη βοήθεια ειδικού μεγεθυντικού φακού και κατάλληλων λαβίδων, καθαρίζονται οι τρύπες από πιθανά υπολείμματα μικρών κομματιών κρανιακών οστών, που προέρχονται από τη χρήση της οδοντιατρικής εγγλυφίδας. Είναι σημαντικό να μη μείνει κανένα οστό γιατί κάτι τέτοιο θα μπορούσε να εμποδίσει ή να επηρεάσει την κάθοδο ή την καθετότητα των ηλεκτροδίων. Αφού

ολοκληρωθεί ο καθαρισμός θα πρέπει το ο εγκεφαλικός φλοιός να είναι ορατός μέσα από τις τρύπες.

III.B.4 Κάθοδος ηλεκτροδίων ερεθισμού

III.B.4.α. Στο επίπεδο του κεντρικού πυρήνα της αμυγδαλής

Για τον ερεθισμό του κεντρικού πυρήνα (CeN) της αμυγδαλής, εμφυτεύεται ένα ηλεκτρόδιο ερεθισμού στις παρακάτω συντεταγμένες : 2,6 mm κάτω από το σημείο bregma και 4,5 mm δεξιά. Το ηλεκτρόδιο πρέπει να κατέβει γρήγορα σε 1 mm βάθος, ώστε να μην έρθει σε επαφή η άκρη του με το αίμα. Στη συνέχεια κατεβαίνει 0,5 mm ανά 15 min. Η κάθοδος γίνεται σταθερά και με αργό ρυθμό. Γρήγορη κάθοδος προκαλεί μηχανική πίεση στον εγκέφαλο με αποτέλεσμα το σημείο εισόδου του ηλεκτροδίου να συμπιεστεί προς τα κάτω, γεγονός που μεταβάλλει τις συντεταγμένες εμφύτευσης του ηλεκτροδίου. Το τελικό βάθος στο οποίο σταματά η κάθοδος είναι περίπου 6,9-7,0 mm από την επιφάνεια του φλοιού του εγκεφάλου.

III.B.4.β. Στο επίπεδο της μέλαινας ουσίας

Για τον ερεθισμό της μέλαινας ουσίας, εμφυτεύεται ένα ηλεκτρόδιο ερεθισμού στις παρακάτω συντεταγμένες : 5,20 mm κάτω από το bregma και 2,8 mm δεξιά. Η κάθοδος του ηλεκτροδίου γίνεται όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο και για τον κεντρικό πυρήνα της αμυγδαλής. Το τελικό βάθος στο οποίο φτάνει το ηλεκτρόδιο ερεθισμού είναι περίπου 6,8 mm από την επιφάνεια του εγκεφαλικού φλοιού.

III.B.5 Κάθοδος των ηλεκτροδίων καταγραφής

III.B.5.α Στο επίπεδο του κεντρικού πυρήνα της αμυγδαλής

Για τον ερεθισμό της μέλαινας ουσίας και την καταγραφή της δραστηριότητας του κεντρικού πυρήνα, εμφυτεύεται ένα ηλεκτρόδιο καταγραφής στον πυρήνα αυτό. Η διαδικασία είναι παρόμοια μ' αυτή της καθόδου ενός ηλεκτροδίου ερεθισμού. Η κάθοδος του ηλεκτροδίου καταγραφής δίνει τη δυνατότητα ελέγχου της κυτταρικής δραστηριότητας στα εγκεφαλικά στρώματα από τα οποία περνάει το ηλεκτρόδιο.

III.B.5.β. Στο επίπεδο της μέλαινας ουσίας

Για τον ερεθισμό του κεντρικού πυρήνα της αμυγδαλής, το ηλεκτρόδιο καταγραφής εμφυτεύεται στην μέλαινα ουσία. Η κάθοδος είναι όμοια με την κάθοδο ενός ηλεκτροδίου ερεθισμού. Είναι πολύ σημαντικό να ελέγχεται η καθετότητα όλων των ηλεκτροδίων, πριν αρχίσει η κάθοδος τους στον εγκέφαλο των επίμυων.

II.Γ.1. Τεχνικές ερεθισμού

II.Γ.1.Α. Απλά ερεθίσματα

Απλά, μοναδικά ερεθίσματα εφαρμόζονται στο επίπεδο του κεντρικού αμυγδαλικού πυρήνα και της μέλαινας ουσίας, χάρη σε μια συσκευή ερεθισμού με μια μονάδα μόνωσης. Αυτή η συσκευή παράγει συνεχείς ωθήσεις διάρκειας 100 μsec , η ένταση των οποίων κυμαίνεται από 0 έως 1 mA.

II.Γ.1.Β. Ερεθίσματα υψηλής συχνότητας

Για τα ερεθίσματα υψηλής συχνότητας, 8 απλά ερεθίσματα που εφαρμόζονται με απόσταση 2,5 msec μεταξύ τους, σχηματίζουν ένα σήμα ερεθισμού. Το σήμα έχει

διάρκεια 20 msec και συχνότητα 400 Hz. Τέτοια σήματα εφαρμόζονται πάντα σε ομάδες των 7 σημάτων, με απόσταση μεταξύ τους ένα δευτερόλεπτο.

Εκτός από τα παραπάνω ερεθίσματα χρησιμοποιήθηκε και το πρωτόκολλο θ (θ). Σύμφωνα με αυτό, εφαρμόζονται 10 απλά ερεθίσματα. Το σήμα έχει διάρκεια 100 msec και συχνότητα 5 Hz. Εφαρμόζεται σε ομάδες των 10 σημάτων για τρεις φορές και η συνολική του διάρκεια είναι μία ώρα.

III.Γ.2. Τεχνικές καταγραφής του εφαρμοζόμενου δυναμικού

Το σήμα συλλέγεται από το ηλεκτρόδιο καταγραφής και περνάει από ένα προσαρμογέα αντίστασης (είσοδος 10 k Ω , έξοδος 3 k Ω). Τα εφαρμοζόμενα δυναμικά ενισχύονται (σε προ-ενισχυτή Grass) και φιλτράρονται (0,1-3000 Hz). Στη συνέχεια τα δυναμικά παρουσιάζονται στην οθόνη μιας συσκευής ψηφιακής μνήμης (Tektronix 468, βλ. Σχ.5/Παράρτημα), είτε άμεσα είτε μετά από εξαγωγή του μέσου όρου τεσσάρων συνεχόμενων εφαρμοζόμενων δυναμικών. Επομένως οι διαφορετικές παράμετροι των δυναμικών μετρούνται άμεσα με τη βοήθεια της συσκευής η οποία συνδέεται με έναν υπολογιστή. Οι παράμετροι των δυναμικών είναι :

1. Το εύρος της κυτταρικής εκπόλωσης (h, εκφράζεται σε mV), υπολογίζεται από τη διαφορά μεταξύ του πρώτου μέγιστου και του επόμενου ελάχιστου, από το ίχνος του ηλεκτροδίου.
2. Η κλίση (p, εκφράζεται σε mV/msec), υπολογίζεται από τη διαφορά του εύρους δυο σημείων με διαφορετικές λανθάνουσες καταστάσεις (latencies), σε σχέση με το artifact του ερεθισμού.
3. Η λανθάνουσα κατάσταση της κυτταρικής εκπόλωσης (latency (l), εκφράζεται σε msec), υπολογίζεται στο πρώτο μέγιστο του ίχνους του ηλεκτροδίου σε σύγκριση με το artefact του ερεθισμού.

III.Δ. Ιστολογικές μελέτες

Στο τέλος κάθε μέρας, μια ώρα μετά το πέρας του χειρουργικού μέρους του πειράματος, παραλαμβάνεται ο εγκέφαλος κάθε επίμυ. Το αναισθητοποιημένο ζώο

τοποθετείται ανάσκελα με τα τέσσερα άκρα του στερεωμένα. Μετά από βαθιά τομή του συνόλου δέρματος-μυών-πλευρών, ανυψώνεται ο θώρακας και στερεώνεται η ξιφοειδής απόφυση, καθιστώντας ορατή τη θέση της καρδιάς. Μπλοκάρεται το κατερχόμενο τμήμα της αρτηρίας, ώστε να αποτραπεί η διάχυση των προϊόντων στο κάτω μέρος του σώματος του επίμυ. Μια αντλία εισάγεται στην αριστερή κοιλία της καρδιάς, ενώ χαράσσεται το δεξί τμήμα της. Διαχέονται ενδοκαρδιακά με αργό ρυθμό 100 mL διαλύματος φυσιολογικού ορού (NaCl 9‰), που περιέχει 5% ηπαρίνη και 1% νιτρικό νάτριο, ώστε να μειωθεί η ροή του αίματος και στη συνέχεια 300 mL διαλύματος φορμαλδεΰδης (4°C) σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M, ώστε να ακινητοποιηθούν οι εγκεφαλικοί ιστοί. Κατόπιν με τη βοήθεια λαιμητόμου διαχωρίζεται το κεφάλι του επίμυ από το σώμα του και παραλαμβάνεται ο εγκέφαλος. Ο εγκέφαλος τοποθετείται σε διάλυμα φορμαλδεΰδης 4% και φυλάσσεται στο ψυγείο για οχτώ μέρες τουλάχιστον πριν τις ιστολογικές τομές.

III.E. Τεχνικές τομής και χρωματισμού

Ο εγκέφαλος πλένεται με τρεχούμενο νερό, και ψύχεται σε μια καρβονική πλάκα. Στη συνέχεια τοποθετείται πάνω σε μια μικροτόμο κατάψυξης, όπου και γίνονται τομές πάχους 40 μm. Οι τομές συλλέγονται και αποθηκεύονται στους -20°C σ' ένα κρυοπροστατευτικό διάλυμα (γλυκερόλη και αιθυλένιο γλυκόλης 30% σε 0,1 M φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος). Κάθε 12^η τομή βάφεται με 0,15% γαλλοκυανίνη (Guip, Poole, UK), ώστε να ταυτοποιηθούν οι δομές που βάφονται ανοσολογικά. Σε κάθε 12^η τομή από το σύνολο του εγκεφάλου (από τον οσφρητικό βολβό ως την παρεγκεφαλίδα), εφαρμόστηκε απλός ανοσοχρωματισμός για το αμινο-τελικό ακρο του Fra-1 που προέρχεται από επίμυ (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Ελεύθερες τομές επωάζονται σε PBS που περιέχει 5% φυσιολογικό ορό κατσίκας (NGS) και 0,3% Triton X-100 για 30 περίπου λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια οι τομές επωάζονται για 48 h σε θερμοκρασία δωματίου σε PBS που περιέχει 3,5% NGS, 0,3% Triton X-100, 0,5% βοδινό ορό αλβουμίνης, 0,05% αζίδιο του νατρίου και το Fra-1 αντίσωμα (1:5000). Κατόπιν οι τομές υφίστανται επεξεργασία με τη μέθοδο υπεροξειδάσης της αβιδίνης-βιοτίνης και ενίσχυση τυραμίνης (Berghorn et al., 1994),

χρησιμοποιώντας Vectastain, VIP kits (Vector Laboratories, Burlingame, CA) και BLAST kit (NEN life Science Products, Boston, MA).

Για την ταυτοποίηση των νευρώνων της μέλαινας ουσίας που είναι ανοσοδραστικοί με το Fra-1, εφαρμόζεται διπλός ανοσοχρωματισμός για το Fra-1 και την υδροξυλάση της τυροσίνης (TH). Η υδροξυλάση της τυροσίνης είναι το πρώτο ένζυμο της σύνθεσης κατεχολαμινών και άρα είναι δείκτης ντοπαμίνης στη μέλαινα ουσία, η οποία δεν περιέχει νευρώνες αδρεναλίνης ή νοραδρεναλίνης (Bjorklund & Lindvall, 1984). Οι τομές επωάζονται για δυο μέρες σε θερμοκρασία δωματίου σε PBS που περιέχει 3.5% NGS, 0.3% Triton X-100, 0.5% BSA, 0.05% αζίδιο του νατρίου, το πολυκλωνικό αντί-Fra-1 (Santa Cruz 1:1000) και το μονοκλωνικό αντίσωμα αντί-TH (Sigma, κλώνος TH-2, 1:400). Στη συνέχεια οι τομές επωάζονται για μια ώρα σε PBS που περιέχει 3,5% triton X-100, 1:3000 διάλυμα IgG κατσίκας κατά κουνελιού (Vector) και διάλυμα Alexa Fluor 568 1:250 με θραύσματα $F(ab')_2$ (Molecular Probes, Eugene, Or). Μετά από την ενίσχυση τυραμίνης, οι τομές επωάζονται σε PBS που περιέχει 3,5% NGS, 0,3% Triton X-100, 1:500 διάλυμα στρεπταβιδίνης Alexa Fluor 488 και διάλυμα Alexa Fluor 568 (1:250) ενωμένο με θραύσματα $F(ab')_2$ (Molecular Probes). Οι τομές τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρους πλάκες με Vectashield (Vector) και αποθηκεύονται στους 4 °C. Για την ανάλυση των τομών χρησιμοποιείται ένα σύστημα ανάλυσης εικόνας που αποτελείται από ένα μικροσκόπιο Olympus Provis (Olympus France, Rungis, France) με ένα ηλεκτρονικά ελεγχόμενο κινούμενο επίπεδο πάνω στο οποίο τοποθετούνται οι αντικειμενοφόρες πλάκες, μια βιντεοκάμερα Sony HAD Power 3CCD, έναν υπολογιστή Olympus Pentium II και το software του Olympus, C.A.S.T.-Grid (Olympus, Albertslund, Danemark).

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

IV. Αποτελέσματα

Πριν τη καταγραφή των αποτελεσμάτων θα βοηθούσε μια υπενθύμιση των τεσσάρων ομάδων στις οποίες χωρίσαμε τα πειραματόζωα και πάνω στις οποίες στηρίζεται η λογική του πειράματος.

Ομάδα 1	Ομάδα 2	Ομάδα 3	Ομάδα 4
Ερέθισμα στον CeN-καταγραφή στην SNc		Ερέθισμα στην SNc-καταγραφή στον CeN	
LTP	‘Μάρτυρας’	‘Μάρτυρας’	LTP
Rat3, Rat4, Rat5, Rat6	Rat7, Rat8, Rat9	Rat10, Rat11, Rat12	Rat13, Rat14, Rat15

I.V.1 Αποτελέσματα καταγραφής των δυναμικών

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν μετά την εφαρμογή των τεχνικών ηλεκτροφυσιολογίας για κάθε επίμυ ξεχωριστά αλλά και για όλους μαζί σε ένα συγκεντρωτικό πίνακα, είναι τα παρακάτω. Στον συγκεντρωτικό πίνακα οι επίμυς συμβολίζονται ως NN12-3, NN12-4...NN12-15, γιατί η αποικία που χρησιμοποιήθηκε ονομάζεται NN12.

Πίνακας 1.

rat3 (ερέθισμα στον CE- καταγραφή στην SN)

	κλίση	Εύρος	Εμβαδόν	Λανθάνουσα κατάσταση (latency,msec)
CE-SN (LTP)	ppse			
Αρχικές τιμές	0.68165	1.427825	4.953125	5.48
Post (μετά το ερέθισμα)	0.826175	1.387475	5.278425	5.62
% αλλαγής	21.2	-2.83	6.57	2.55

Στον πίνακα αυτό δίνονται οι αρχικές τιμές των τεσσάρων παραμέτρων των δυναμικών (κλίση, εύρος, εμβαδόν, λανθάνουσα κατάσταση), που μετρήθηκαν με τη βοήθεια μίας ψηφιακής συσκευής και του υπολογιστή με τον οποίο είναι συνδεδεμένη. Κάτω από τις αρχικές τιμές δίνονται οι τιμές των παραμέτρων μετά την εφαρμογή της μακρόχρονης ενδυνάμωσης LTP. Τέλος, παρουσιάζεται το % ποσοστό αλλαγής των

τιμών μετά την εφαρμογή του φυσιολογικού μοντέλου της μακρόχρονης ενδυνάμωσης. Παρατηρείται μια αύξηση κατά 21 % της κλίσης (ppse), ενώ στις υπόλοιπες τιμές η αύξηση είναι σχεδόν αμελητέα.

Πίνακας 2.

rat6 (ερέθισμα στον CE- καταγραφή στην SN)

	κλίση	Εύρος	Εμβαδόν	Λανθάνουσα κατάσταση (latency,msec)
CE-SN (LTP)	ppse			
Αρχικές τιμές	0.353705	0.71977	7.22252	12.048
post(μετά ερέθισμα) το	0.506255	0.749805	7.869075	12.564
% αλλαγής	43.13	4.17	8.95	4.28

Από την καταγραφή των δυναμικών του επίμυ 6 πριν και μετά την εφαρμογή της μακρόχρονης ενδυνάμωσης, προκύπτει αύξηση της κλίσης κατά 43,1 %. Όπως παρατηρείται στις τιμές του πίνακα 1, έτσι και εδώ η αύξηση των υπόλοιπων παραμέτρων είναι μικρή.

Πίνακας 3.

rat7 (ερέθισμα στον CE- καταγραφή στην SN)

	κλίση	Εύρος	Εμβαδόν	Λανθάνουσα κατάσταση (latency,msec)
CE-SN (CTL)	ppse			
Αρχικές τιμές	0.38439	0.434535	2.688045	13.64
post(μετά ερέθισμα) το	0.369725	0.412215	2.60578	13.608
% αλλαγής	-3.82	-5.14	-3.06	-0.23

Ο επίμυς 7 είναι ‘μάρτυρας’, που σημαίνει ότι δεν έχει εφαρμοστεί το μοντέλο της μακρόχρονης ενδυνάμωσης. Έτσι μετά το ερέθισμα που εφαρμόζεται στον κεντρικό αμυγδαλικό πυρήνα παρατηρείται ελάττωση της κλίσης κατά 3,82 % και του εύρους και 5,14 %.

Πίνακας 4.

rat8 (ερέθισμα στον CE- καταγραφή στην SN)

	κλίση	Εύρος	Εμβαδόν	Λανθάνουσα κατάσταση (latency,msec)
CE-SN (CTL)	ppse			
Αρχικές τιμές	0.377535	0.38782	1.03155	6.012
post	0.33477	0.368305	1.01805	6.34
% αλλαγής	-11.33	-5.03	-1.31	5.46

Στον επίμυ 8, το ποσοστό ελάττωσης της κλίσης είναι 11,3 %. Με εξαίρεση τις τιμές της λανθάνουσας κατάστασης, οι υπόλοιπες παράμετροι εμφανίζονται μεγαλύτερες πριν το ερέθισμα.

Πίνακας 5.

rat9 (ερέθισμα στον CE- καταγραφή στην SN)

CE-SN (CTL)	κλίση ppse	Εύρος	Εμβαδόν	Λανθάνουσα κατάσταση (latency,msec)
Αρχικές τιμές	2.23125	1.30802	3.664045	5.72
post	2.14005	1.26905	3.436425	5.8
%αλλαγής	-4.09	-2.98	-6.21	1.4

Οι τιμές είναι παρόμοιες με αυτές των πινάκων 3 και 4. Παρατηρείται ελάττωση των παραμέτρων των δυναμικών μετά την εφαρμογή του ερεθίσματος του κεντρικού αμυγδαλικού πυρήνα.

Πίνακας 6.

rat10 (ερέθισμα στην SN- καταγραφή στον CE)

CE-SN (CTL)	κλίση ppse	Εύρος	Εμβαδόν	Λανθάνουσα κατάσταση (latency,msec)
Αρχικές τιμές	0.59727	0.87544	2.970055	4.816
post	0.506728	0.94122	3.30794	5.296
% αλλαγής	-15.16	7.51	11.38	9.97

Στον επίμυ 10 τα ηλεκτρόδια καταγραφής και ερεθισμού έχουν αντιστραφεί. Δηλαδή ο πίνακας 6 δίνει τις τιμές των παραμέτρων των δυναμικών του κεντρικού αμυγδαλικού πυρήνα μετά από ερέθισμα της συμπαγής μοίρας της μέλαινας ουσίας. Παρατηρείται μια 'περίεργη' τιμή για την κλίση (-15,16 %) και για τις υπόλοιπες παραμέτρους που θα εξηγηθούν παρακάτω.

Πίνακας 7.

rat11 (ερέθισμα στην SN- καταγραφή στον CE)

CE-SN (CTL)	κλίση ppse	Εύρος	Εμβαδόν	Λανθάνουσα κατάσταση (latency,msec)
Αρχικές τιμές	1.544935	0.935515	3.014885	4.156
post	1.52872	0.961135	2.983615	4.112
% αλλαγής	-1.05	2.74	-1.04	-1.06

Οι τιμές του πίνακα 7 για τον επίμυ 11 εμφανίζουν μια μικρή ελάττωση, (εκτός του εύρους). Έτσι η κλίση παρουσιάζεται ελαττωμένη κατά 1,05 %.

Πίνακας 8.

rat12 (ερέθισμα στην SN- καταγραφή στον CE)

	κλίση	Εύρος	Εμβαδόν	Λανθάνουσα κατάσταση (latency,msec)
CE-SN (CTL)	ppse			
Αρχικές τιμές	3.42265	1.279875	1.774215	2.484
post	3.482435	1.282105	1.72716	2.484
% αλλαγής	1.75	0.17	-2.65	0

Οι τιμές για τον επίμυ 12 είναι παρόμοιες με αυτές του πίνακα 7.

Πίνακας 9.

rat13 (ερέθισμα στην SN- καταγραφή στον CE)

	κλίση	Εύρος	Εμβαδόν	Λανθάνουσα κατάσταση (latency,msec)
CE-SN (LTP)	ppse			
Αρχικές τιμές	1.56445	1.872875	8.825775	5.8
post	1.7002	2.0148	9.8395	5.84
% αλλαγής	8.68	7.58	11.49	0.69

Στον επίμυ 13 εφαρμόστηκε το μοντέλο της μακρόχρονης ενδυνάμωσης. Έτσι από την καταγραφή των δυναμικών στον κεντρικό αμυγδαλικό πυρήνα προκύπτει αύξηση όλων των τιμών των παραμέτρων.

Πίνακας 10.

rat14 (ερέθισμα στην SN- καταγραφή στον CE)

	κλίση	Εύρος	Εμβαδόν	Λανθάνουσα κατάσταση (latency,msec)
CE-SN (LTP)	ppse			
Αρχικές τιμές	4.606475	1.86495	3.624225	2.72
post	4.710925	1.872975	3.73865	2.6
% αλλαγής	2.27	0.43	3.16	-4.41

Στον επίμυ 14 παρατηρείται μικρή αύξηση της κλίσης κατά 2.27 %.

Πίνακας 11.

rat15 (ερέθισμα στην SN- καταγραφή στον CE)

	κλίση	Εύρος	Εμβαδόν	Λανθάνουσα κατάσταση (latency,msec)
CE-SN (LTP)	ppse			
Αρχικές τιμές	0.030275	0.2327	0.499125	6

post	0.054675	0.211125	0.4548	5.76
% αλλαγής	80.59	-9.27	-8.88	-4

Στον επίμυ 15 παρατηρείται μια υπερβολική αύξηση της κλίσης κατά 80.59 %, η οποία εξηγείται παρακάτω.

Πίνακας 12. (όλες οι ομάδες)

			κλίση ppse	Εύρος	Εμβαδόν	Λανθάνουσα κατάσταση (latency,msec)	
CE-SN	CTL	NN12-7	-3.82	-5.14	-3.06	-0.23	
		NN12-8	-11.33	-5.03	-1.31	5.46	
		NN12-9	-4.09	-2.98	-6.21	1.40	
	LTP	NN12-3	21.20	-2.83	6.57	2.55	
		NN12-6	43.13	4.17	8.95	4.28	
	CTL	Μέσος όρος	-6.41	-4.38	-3.53	2.21	
	LTP	Μέσος όρος	32.17	0.67	7.76	3.42	
	SN-CE	CTL	NN12-10	-15.16	7.51	11.38	9.97
			NN12-11	-1.05	2.74	-1.04	-1.06
			NN12-12 (1)	1.75	0.17	-2.65	0.00
NN12-12 (2)			3.11	36.07	51.60	2.85	
LTP			NN12-13	8.68	7.58	11.49	0.69
LTP		NN12-14	2.27	0.43	3.16	-4.41	
		NN12-15 (1)	80.59	-9.27	-8.88	-4.00	
		NN12-15 (2)	21.40	20.57	27.72	-3.20	
CTL		Μέσος όρος	-2.84	11.62	14.82	2.94	
LTP		Μέσος όρος	28.24	4.83	8.37	-2.73	

Τιμές ελέγχου

Κλίση ppse	Εύρος	Εμβαδόν	Λανθάνουσα κατάσταση (latency,msec)
0.38	0.43	2.69	13.64
0.38	0.39	1.03	6.01
2.23	1.31	3.66	5.72

0.68	1.43	4.95	5.48
0.35	0.72	7.22	12.05

0.60	0.88	2.97	4.82
1.54	0.94	3.01	4.16
3.42	1.28	1.77	2.48
0.39	0.46	4.67	20.24

1.56	1.87	8.83	5.80
4.61	1.86	3.62	2.72
0.03	0.23	0.50	6.00
0.16	0.51	8.24	24.34

Στον παραπάνω πίνακα, φαίνονται αρχικά οι τιμές που προκύπτουν για τις τέσσερις παραμέτρους μετά από ερέθισμα στον κεντρικό αμυγδαλικό πυρήνα και καταγραφή στη μέλαινα ουσία. Πρώτα δίνονται οι τιμές για τους επίμυς ‘μάρτυρες’, μετά για αυτούς στους οποίους εφαρμόστηκε η LTP και τέλος δίνεται ο μέσος όρος και για τις δύο ομάδες. Παρατηρούμε ότι από την ομάδα στη οποία εφαρμόστηκε η LTP (ομάδα 1), καταγράφονται οι τιμές μόνο για δύο επίμυς (rat3, rat6) από τους τέσσερις που συνολικά αποτελούν αυτή την ομάδα. Από τη σύγκριση των μέσων όρων των ομάδων 1 και 2, προκύπτει ότι όλες οι τιμές αυξήθηκαν μετά από την εφαρμογή της LTP, με την κλίση να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αύξηση. Από -6,41 mV/msec στην ομάδα ‘μάρτυρα’, έφτασε τα 32,17 mV/msec στο LTP group. Στον επίμυ 3 παρατηρείται μια ενδεικτική αύξηση της κλίσης κατά 21,2 %.

Ομοίως δίνονται και οι τιμές μετά από ερέθισμα στη μέλαινα ουσία και καταγραφή στον κεντρικό πυρήνα. Παρατηρούμε ότι για τον επίμυ 15, δίνονται δύο τιμές. Αυτό συμβαίνει γιατί η πρώτη τιμή που πήραμε έδειξε ότι πρόκειται για μια πολύ γρήγορη απάντηση (αντιδρομική) η διαδικασία τυποποίησης έγινε δύο φορές. Το ίδιο ισχύει και για τον επίμυ 12. Από τη σύγκριση των μέσων όρων των ομάδων 2 και 3, δε βγαίνουν τόσο ξεκάθαρα συμπεράσματα όπως από τη σύγκριση των ομάδων 1 και 2. Πιο συγκεκριμένα παρατηρείται αύξηση μόνο στις τιμές κλίσης μετά από την εφαρμογή της

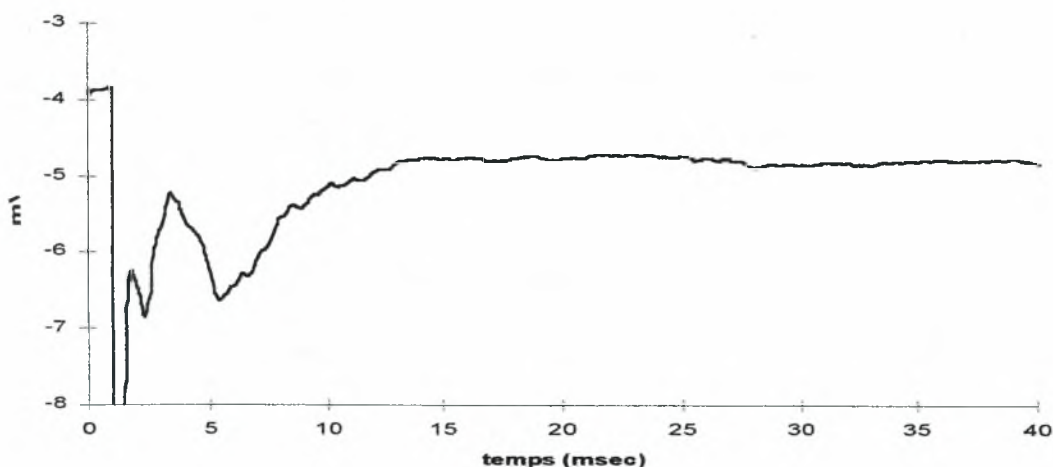
LTP. Οι τιμές των υπόλοιπων παραμέτρων εμφανίζονται πιο ψηλές στις ομάδες 'μάρτυρα'. Μια ενδεικτική αύξηση της κλίσης κατά 9 % παρατηρείται στον επίμυ 13.

Παρακάτω δίνεται για κάθε ομάδα από ένα ενδεικτικό σχεδιάγραμμα που απεικονίζει το δυναμικό της περιοχής στην οποία καταγράφουμε. Έτσι, από την ομάδα 1, διαλέξαμε τον επίμυ 3 (rat 3), από την ομάδα 2 τον επίμυ 9 (rat 9) και από τις ομάδες 3 και 4, διαλέξαμε τους επίμους 11 και 13 αντίστοιχα. Στην καμπύλη 1 φαίνεται το δυναμικό των νευρώνων του πλευρικού τμήματος της συμπαγής μοίρας της μέλαινας ουσίας, μετά από την εφαρμογή της LTP. Στην καμπύλη 2 φαίνεται και πάλι το δυναμικό των νευρώνων της μέλαινας ουσίας αλλά σε έναν επίμυ 'μάρτυρα'. Στην καμπύλη 3 απεικονίζεται το δυναμικό των νευρώνων του κεντρικού αμυγδαλικού πυρήνα ενός επίμυ 'μάρτυρα'. Τέλος στην καμπύλη 4 παρατηρούμε το δυναμικό νευρώνων του πλευρικού τμήματος του κεντρικού πυρήνα μετά την εφαρμογή της LTP.

Κάθε δυναμικό διακρίνεται σε τρία μέρη : το (a), το οποίο είναι το artifact του ερεθίσματος, το (b), το οποίο είναι η απάντηση μετά το ηλεκτρικό σήμα και το (c), το οποίο είναι το δυναμικό πεδίου.

Καμπύλη 1. Ομάδα 1: Δυναμικό των νευρώνων της μέλαινας ουσίας του rat 3 (LTP)

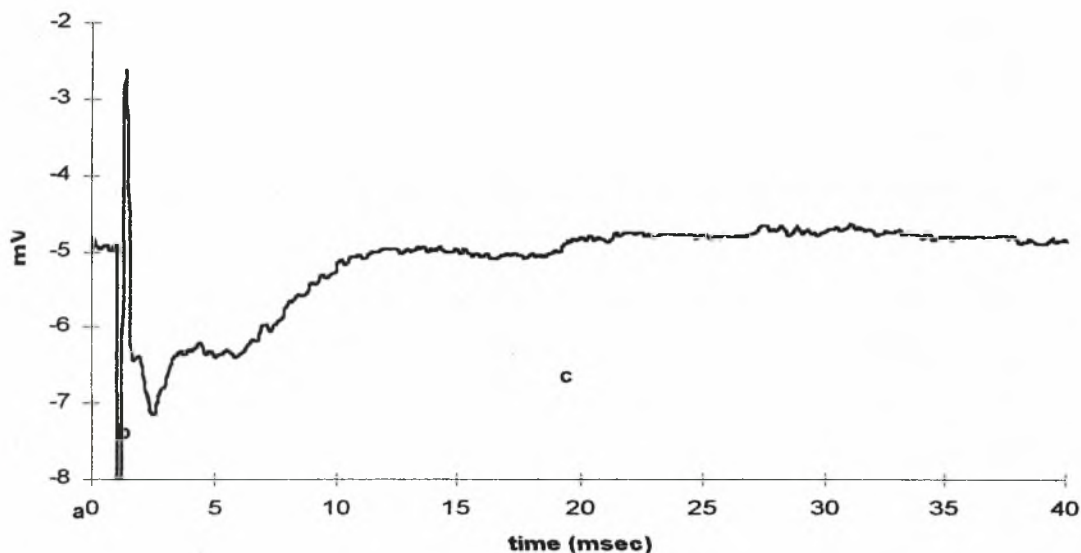
NN12-R3 (réponse SN par stimulation CE)



Στην παραπάνω καμπύλη απεικονίζεται το δυναμικό των νευρώνων της συμπαγής μοίρας της μέλαινας ουσίας του επίμυ 3, μετά από εφαρμογή της μακρόχρονης

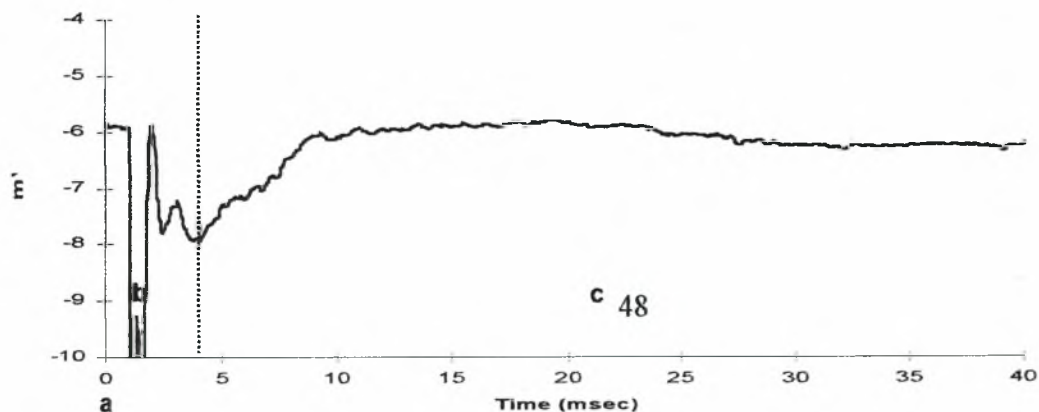
ενδυνάμωσης. Μετά το artifact του ερεθίσματος διακρίνονται δύο θετικές κορυφές του δυναμικού. Όπως αναφέρθηκε και στον πίνακα 1 η αύξηση της κλίσης είναι 21,2 %.

Καμπύλη 2. Ομάδα 2: Δυναμικό των νευρώνων της μέλαινας ουσίας του rat 9 ('μάρτυρας')



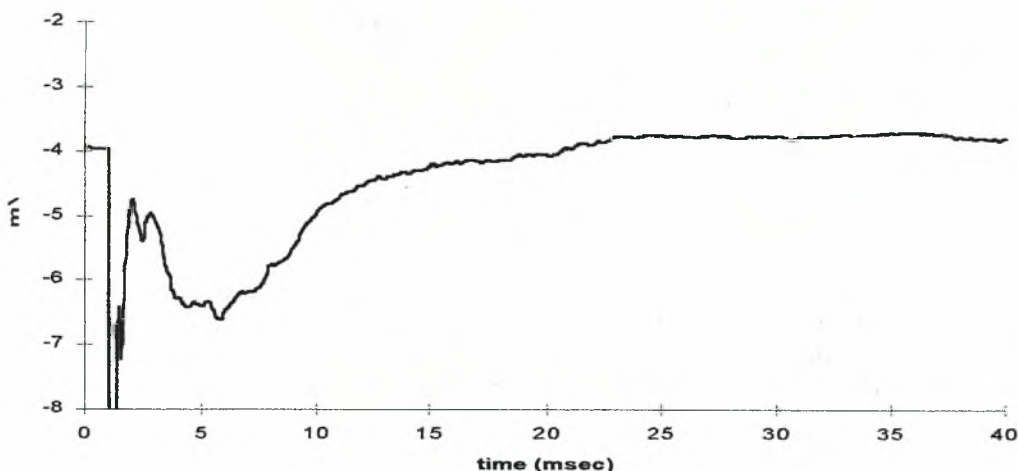
Στην καμπύλη 2 καταγράφεται το δυναμικό των νευρώνων της μέλαινας ουσίας του επίμυ 9. Στον επίμυ αυτό δεν εφαρμόστηκε το μοντέλο της μακρόχρονης ενδυνάμωσης, είναι δηλαδή 'μάρτυρας'. Μετά το artifact του ερεθίσματος (a), παρατηρείται μια αρνητική κορυφή, η οποία εξηγείται από την πτώση του δυναμικού. Όπως αναφέρεται στον πίνακα 5, η κλίση ελαττώνεται μετά τη εφαρμογή του ερεθίσματος κατά 4,09 %.

Καμπύλη 3. Ομάδα 3: Δυναμικό από τις καταγραφές στην αμυγδαλή του rat 11 ('μάρτυρας')



Η καμπύλη 3 απεικονίζει το δυναμικό του κεντρικού αμυγδαλικού πυρήνα του επίμυ 11, ο οποίος είναι 'μάρτυρας'. Μετά το artifact παρατηρείται μια μεγάλη κορυφή που πιθανόν προκλήθηκε από απότομη αύξηση του δυναμικού. Αυτή η αύξηση οφείλεται κατά πάσα πιθανότητα από παρεμβολή κάποιας συσκευής στη συσκευή καταγραφής δυναμικού.

Καμπύλη 4. Ομάδα 4: Δυναμικό των νευρώνων του CeN του rat 13 (LTP)

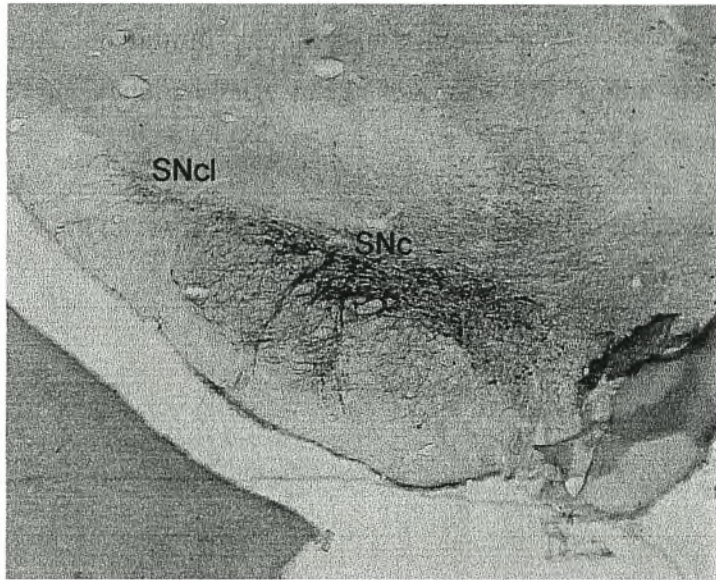


Η παραπάνω καμπύλη απεικονίζει την καταγραφή του δυναμικού των νευρώνων του κεντρικού αμυγδαλικού πυρήνα μετά από εφαρμογή του μοντέλου της μακρόχρονης ενδυνάμωσης. Μετά το artifact του ερεθίσματος παρατηρούνται δυο θετικές κορυφές.

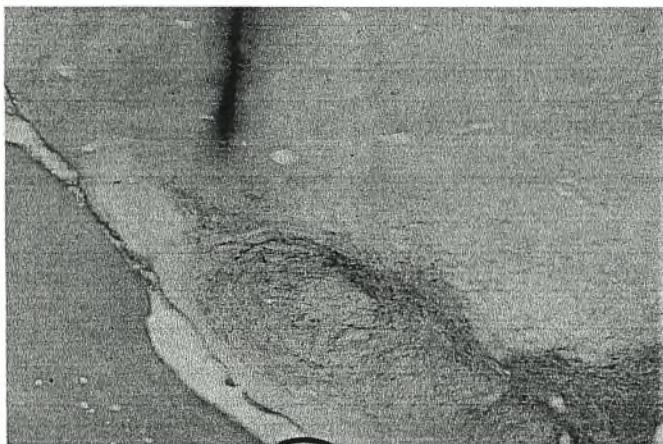
I.V.2. Αποτελέσματα ανοσοχρωματισμού

Μετά την τοποθέτηση των εγκεφαλικών τομών σε αντικειμενοφόρους πλάκες και την εφαρμογή των τεχνικών χρωματισμού όπως αυτές περιγράφηκαν στο τμήμα III.E. της εργασίας, οι τομές είναι πλέον έτοιμες για παρατήρηση με τη βοήθεια του μικροσκοπίου. Βάση αυτής της παρατήρησης διαπιστώνεται η σωστή ή όχι τοποθέτηση των ηλεκτροδίων στις δομές υπό μελέτη. Παρατηρώντας το ίχνος του ηλεκτροδίου σε τομές πριν και μετά την περιοχή του ενδιαφέροντος μας, είναι δυνατόν να διαπιστωθεί η τοποθέτηση των ηλεκτροδίων στις συντεταγμένες που υπολογίστηκαν αρχικά. Επιπλέον γίνονται ορατοί οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες της συμπαγής μοίρας της μέλαινας ουσίας,

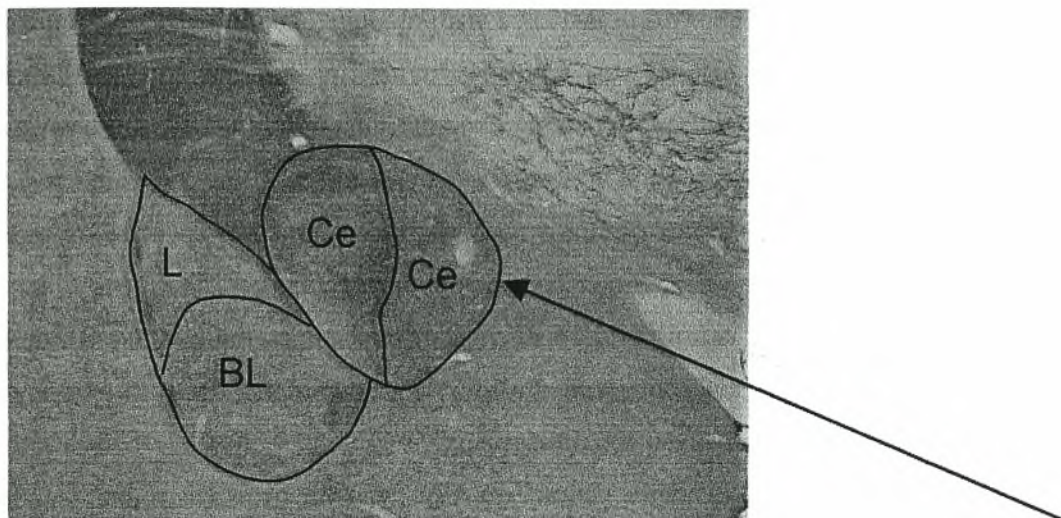
που ενεργοποιούνται μετά από ερέθισμα στον κεντρικό αμυγδαλικό πυρήνα αλλά και οι νευρώνες του κεντρικού πυρήνα. Παρακάτω δίνονται κάποιες ενδεικτικές φωτογραφίες.



Εικόνα 1: Στην εικόνα αυτή διακρίνονται οι ενεργοποιημένοι νευρώνες της συμπαγής μοίρας της μέλαινας ουσίας μετά από ερέθισμα στον κεντρικό αμυγδαλικό πυρήνα. Η συμπαγής μοίρα της μέλαινας ουσίας είναι μια εγκεφαλική δομή που εντοπίζεται εύκολα κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση μετά το χρωματισμό της. Αυτό οφείλεται στη νευρομελανίνη των ντοπαμινεργικών της νευρώνων.



Εικόνα 2: Παρατηρείται το ίχνος του ηλεκτροδίου καταγραφής στο πλευρικό τμήμα της μέλαινας ουσίας, και διακρίνονται οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες. Ακολουθώντας το ίχνος του ηλεκτροδίου στις ιστολογικές τομές, είναι δυνατή η διαπίστωση της σωστής τοποθέτησης των ηλεκτροδίων.



Εικόνα 3: Απεικόνιση της αμυγδαλής. Με μαύρο βέλος ο κεντρικός πυρήνας (Ce) όπου εμφυτεύονται τα ηλεκτρόδια. Φαίνονται οι ίνες της αμυγδαλής που χρωματίστηκαν από την υδροξυλάση της τυροσίνης (TH).



Εικόνα 4: Πεδίο δυναμικού στους νευρώνες του κεντρικού αμυγδαλικού πυρήνα (CeN) μετά από ερέθισμα των νευρώνων της συμπαγής μοίρας της μέλαινας ουσίας (SNc).

Σε όλη τη διάρκεια του πειραματικού μέρους της εργασίας υπάρχουν κάποια κρίσιμα σημεία στα οποία απαιτείται προσοχή καθώς απροσεξία ή λάθος οδηγεί σε άλλες

συντεταγμένες. Αυτό σημαίνει ότι τα ηλεκτρόδια θα εντοπίζονται σε άλλες εγκεφαλικές δομές και επομένως θα είναι αδύνατο να καταλήξουμε σε κάποια συμπεράσματα.

Έτσι, όσον αφορά τον επίμυ 4, μετά την παρατήρηση στο μικροσκόπιο, αποδείχθηκε ότι τα ηλεκτρόδια δεν ήταν τοποθετημένα στις σωστές συντεταγμένες. Στον επίμυ 5 δεν ήμασταν σε θέση να καταγράψουμε τα αποτελέσματα γιατί η προέκταση από σύρμα νικελίου που τοποθετούμε στον εγκέφαλο ως γείωση ερχόταν σε επαφή με το σύρμα νικελίου-χρωμίου του ηλεκτροδίου καταγραφής. Τέλος στον επίμυ 10 η 'περίεργη' τιμή της κλίσης (-15,16 mV/msec) που παρατηρήθηκε, οφείλεται στο ότι η θερμοφόρα δεν αποσυνδέθηκε από την πρίζα Έχει αναφερθεί ότι αυτό έχει σαν συνέπεια παρεμβολή στην καταγραφή του δυναμικού.

Παρόλο που υπήρξαν επίμυς που δεν ήταν δυνατόν να συμπεριληφθούν στα αποτελέσματα, υπάρχει ένας τουλάχιστον επίμυς σε κάθε ομάδα για τον οποίο και τα δύο ηλεκτρόδια βρήκαν το στόχο τους. Αυτό δίνει τη δυνατότητα εξαγωγής κάποιων συμπερασμάτων για το μονοπάτι κεντρικός αμυγδαλικός πυρήνας – συμπαγής μοίρα της μέλαινας ουσίας.

Οι πίνακες 1-11 καθώς και ο συγκεντρωτικός πίνακας 12, προκύπτουν μετά από επεξεργασία των αποτελεσμάτων από τις μεθόδους ηλεκτροφυσιολογίας. Τα αποτελέσματα ηλεκτροφυσιολογίας προκύπτουν κατά τη φάση στην οποία ο επίμυς είναι αναισθητοποιημένος. Βρίσκεται σωστά τοποθετημένος στην στερεοταξική συσκευή συγκράτησης και τα ηλεκτρόδια έχουν τοποθετηθεί στις συντεταγμένες που υπολογίστηκαν. Ο επίμυς παραμένει σε αυτή τη θέση για μισή ώρα περίπου και στη συνέχεια εφαρμόζονται οι τεχνικές ερεθισμού όπως περιγράφηκαν στην παράγραφο Π.Γ.1. Οι τιμές των δυναμικών που μετρούνται με τις μεθόδους αυτές, υφίστανται μια διαδικασία τυποποίησης (normalisation), και στη συνέχεια εκφράζονται ως ποσοστά της αλλαγής σε σχέση με τις φυσιολογικές τιμές. Η διαδικασία τυποποίησης που χρησιμοποιήθηκε είναι η ακόλουθη :

$$V_i (N) = (100 \times V_i/V_m) - 100$$

Όπου : $V_i (N)$ είναι η τιμή τυποποίησης στο test i για ένα δεδομένο ζώο (%)

V_i είναι η τιμή στο test i , σε mV και σε mV/msec

V_m είναι η μέση τιμή που υπολογίζεται σε όλη την περίοδο του ελέγχου, σε mV και σε mV/msec

Μετά από την παραπάνω επεξεργασία των δυναμικών, κατασκευάζονται οι πίνακες αποτελεσμάτων. Οι πίνακες περιέχουν τις παραμέτρους των δυναμικών οι οποίες είναι, το εύρος της κυτταρικής εκπόλωσης, η κλίση, η λανθάνουσα κατάσταση και το εμβαδόν.

Οι καμπύλες 1 έως 4 κατασκευάζονται με βάση τους πίνακες 1, 5, 7 και 9 αντίστοιχα. Οι 1 και 2 απεικονίζουν το δυναμικό που καταγράφεται στη συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας μετά από ερέθισμα στον κεντρικό αμυγδαλικό πυρήνα. Η καμπύλη 1, δείχνει το δυναμικό του επίμυ 3 (ομάδα 1-LTP) και η καμπύλη 2, το δυναμικό του επίμυ 9 (ομάδα 2-‘μάρτυρας’). Οι καμπύλες 3 και 4 απεικονίζουν το δυναμικό που καταγράφεται στον κεντρικό πυρήνα της αμυγδαλής μετά από ερέθισμα στη συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας. Η 3 δείχνει το δυναμικό του επίμυ 11 (ομάδα 3-‘μάρτυρας’) και η 4 το δυναμικό του επίμυ 13 (ομάδα 4-LTP).

Μετά τις τεχνικές χρωματισμού, όπως αυτές περιγράφηκαν στο κεφάλαιο III.E, τις ακολουθεί η τοποθέτηση των εγκεφαλικών τομών σε αντικειμενοφόρους πλάκες και η παρατήρηση τους στο μικροσκόπιο. Αυτός είναι ο μόνος τρόπος επιβεβαίωσης της σωστής τοποθέτησης των ηλεκτροδίων στις προκαθορισμένες θέσεις. Από τα αποτελέσματα καταγραφής δυναμικών μπορούμε να υποθέσουμε αν είμαστε στη σωστή θέση αλλά ποτέ δε μπορούμε να είμαστε σίγουροι. Αντίθετα η μικροσκοπική παρατήρηση των τομών, δε μπορεί να μας οδηγήσει σε λάθος συμπεράσματα. Μερικές φορές ήταν δυνατή η παρατήρηση του ίχνους του ηλεκτροδίου στις περιοχές-στόχους, ακόμα και στη φάση που ο εγκέφαλος ήταν τοποθετημένος στη μικροτόμο. Με τη βοήθεια του μικροσκοπίου Olympus Provis και το ηλεκτρονικά ελεγχόμενο κινούμενο επίπεδο τοποθέτησης των αντικειμενοφόρων πλακών, η παρατήρηση των πλακών με τις εγκεφαλικές τομές ήταν εύκολη. Επιπλέον με τη χρήση της βιντεοκάμερας, δίνεται η δυνατότητα λήψης φωτογραφιών των περιοχών επιθυμούμε. Οι πιο ενδεικτικές από αυτές είναι οι εικόνες 1-4 που παρατίθενται στα αποτελέσματα.

V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

V. Συζήτηση

V.1. Γενική συζήτηση

Ξεκινάει με μερικά κύτταρα στην άκρη ενός εμβρύου. Εγκεφαλικά κύτταρα που πολλαπλασιάζονται με ένα εκπληκτικό ρυθμό, 1,500,000/λεπτό. Μέσα σε πέντε μήνες, ένα έμβρυο έχει προχωρήσει στην ανάπτυξη των περισσότερων νευρώνων που θα χρειαστεί να έχει ποτέ, περίπου 100 δισεκατομμύρια. Αλλά δεν είναι ο αριθμός των νευρώνων που κάνει τον εγκέφαλο να λειτουργεί σωστά. Είναι το γεγονός ότι επικοινωνούν το ένα με το άλλο. Ο κάθε μικροσκοπικός νευρώνας μπορεί να κάνει μέχρι και 10,000 διασυνδέσεις. Όταν διασυνδέονται οι νευρώνες, αρχίζουν να σχηματίζονται δίκτυα και επιτρέπουν σε ηλεκτροχημικά μηνύματα να μεταβιβάζονται μέσα από αυτά. Σε δύο χρόνια από την εμβρυογέννηση αυτοί οι 100 δισεκατομμύρια νευρώνες θα κάνουν 1000 τρισεκατομμύρια διασυνδέσεις. Γνωρίζαμε για δεκαετίες ότι τα γονίδια είναι υπεύθυνα για τη βασική δομή των δικτύων του εγκεφάλου. Αλλά αυτό που αρχίσαμε να καταλαβαίνουμε είναι ότι οι εμπειρίες μας είναι αυτές που συμπληρώνουν τον εγκέφαλο και μας κάνουν αυτό που είμαστε. Η αίσθηση, η κίνηση, ακόμα και το παιχνίδι, σχηματίζουν τον εγκέφαλο ενός παιδιού. Κάθε εμπειρία ενισχύει κάποιες διασυνδέσεις. Αυτές είναι που θα διατηρηθούν κατά τη διάρκεια της ζωής και θα δημιουργήσουν τις αισθήσεις μας, την ικανότητα μας να φανταζόμαστε, να μαθαίνουμε, ακόμα και να αγαπάμε. Με άλλα λόγια αυτός μας κάνει αυτό που είμαστε.

Η ικανότητα για μάθηση είναι μεγαλύτερη όταν είμαστε πολύ νέοι αλλά όσο μεγαλώνουμε μειώνεται. Υπάρχουν κρίσιμα παράθυρα για να κάνουμε τις απαραίτητες διασυνδέσεις για μερικές από τις πιο σημαντικές μας λειτουργίες. Κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας, ο εγκέφαλος δημιουργεί δισεκατομμύρια επιπλέον διασυνδέσεις από αυτές που θα χρησιμοποιήσει ποτέ, δίνοντας έτσι σε μας αναρίθμητες επιλογές για το τι μαθαίνουμε και σε τι μπορούμε να διαπρέψουμε. Αλλά είναι η περίπτωση του 'χρησιμοποίησε το ή χάσε το' (use it or lose it). Αυτό σημαίνει ότι καθώς τελειώνει η παιδική ηλικία, αρχίζει μια διαδικασία 'κλαδέματος'. Οι διασυνδέσεις που χρησιμοποιούνται συχνά δυναμώνουν ενώ αυτές που χρησιμοποιούνται σπάνια πεθαίνουν. Όταν πλέον είμαστε έφηβοι μόνο οι μισές έχουν μείνει.

Η αμυγδαλή είναι από τις πρώτες δομές που αναπτύσσεται καθώς εξελίσσεται ο εγκέφαλος. Είναι εκεί που εδρεύουν οι ενστικτώδεις αντιδράσεις, όπως του φόβου και του θυμού. Δε προκαλεί έκπληξη το ότι ο εγκέφαλος των εφήβων τη χρησιμοποιεί περισσότερο από ότι ο εγκέφαλος των ενήλικων. Καθώς ωριμάζουμε ισχυρότερες διασυνδέσεις δημιουργούνται μεταξύ των διάφορων δομών στους εγκεφάλους. Ο μετωπικός φλοιός κάνει πιο εγκρατείς τις ενστικτώδεις αντιδράσεις της αμυγδαλής. Είναι εκεί που εδρεύουν ο σχεδιασμός, η λογική και η ηθική κρίση. Ένας ενεργός μετωπικός φλοιός είναι σημάδι συναισθηματικής ωριμότητας και εξυπνάδας.

Το θαύμα του ανθρώπινου εγκέφαλου ανυψώνεται από τις πιθανότητες που βρίσκονται μπροστά μας. Με την κατανόηση της λειτουργίας του εγκέφαλου, κατανοούμε στην ουσία τι είμαστε εμείς σαν άνθρωποι και αυτό επιτρέπει όχι μόνο να καταλάβουμε ξεχωριστές λειτουργίες σαν τη μνήμη, την ομιλία, την όραση, αλλά θα μας επιτρέψουν επίσης να μελετήσουμε θέματα όπως η ανθρώπινη φαντασία και συνείδηση. Ο ανθρώπινος εγκέφαλος θεωρείται το πιο 'ιερό' μας όργανο. Είναι αυτό που μας καθορίζει σαν ανθρώπινα όντα και μας κάνει ξεχωριστούς. Το να καταλάβουμε τον ίδιο μας εγκέφαλο είναι μια απάντηση στη βαθυστόχαστη πρόκληση που βγήκε από το μυαλό ενός μεγάλου φιλόσοφου, 'Γνώθι σαυτόν'.

V.2. Σχέση κεντρικού αμυγδαλικού πυρήνα –μέλαινας ουσίας

Ο κεντρικός πυρήνας της αμυγδαλής είναι σημαντικός για την σύνδεση μίας συγκεκριμένης συμπεριφοράς με ένα επακόλουθο ενισχυτικό γεγονός (Gallagher., Holland., 1994), δηλαδή για της δημιουργία συντελεστικής εξαρτημένης μάθησης, η οποία όπως έχει αναφερθεί είναι μορφή της συνειρμικής μάθησης. Σε πειράματα με εξαρτημένα (φως, ήχος) και ανεξάρτητα ερεθίσματα (φαγητό), έχει βρεθεί ότι οι φυσιολογικοί επίμυς μπορούν να μάθουν και να συσχετίσουν τα δυο ερεθίσματα, ενώ αυτοί που έχουν υποστεί βλάβη στον αμυγδαλικό πυρήνα αντιδρούν μόνο στα ανεξάρτητα. Για παράδειγμα σε πειράματα για την προσέγγιση φαγητού, οι φυσιολογικοί επίμυς αποκτούν απαντήσεις στα εξαρτημένα ερεθίσματα και στη συνέχεια μαθαίνουν να προσεγγίζουν το φαγητό, γίνεται δηλαδή σύζευξη ενός ερεθίσματος με την απόκριση (Holland., 1984). Οι επίμυς με βλάβη στην αμυγδαλή τους μπορούν να μάθουν να

πλησιάζουν το φαγητό αλλά δεν αναπτύσσουν απαντήσεις στα εξαρτημένα οπτικά ή ακουστικά ερεθίσματα (Gallagher et al., 1990). Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι έχει παρατηρηθεί σε επίμυς με βλάβη στον κεντρικό πυρήνα, ότι αναπτύσσουν απαντήσεις σε ανεξάρτητα ερεθίσματα όταν αυτά παρουσιάζονται για πρώτη φορά στο ζώο και δεν απαιτείται η συσχέτιση τους με κάποιο άλλο ερέθισμα (Senanes., Campbell., 1989 ; Gallagher et al., 1990).

Ο κεντρικός αμυγδαλικός πυρήνας συνδέεται με πολλές περιοχές του μέσου εγκεφάλου και του εγκεφαλικού στελέχους. Ανάμεσα στις περιοχές- στόχους του κεντρικού πυρήνα είναι και η συμπαγής μοίρα της μέλαινας ουσίας (SNc), η οποία συνδέεται με το σύστημα ντοπαμίνης με το πλευρικό τμήμα του θαλάμου (Gonzales., Chesselet., 1990). Βλάβη στον πλευρικό θάλαμο και στο σύστημα ντοπαμίνης του μονοπατιού μέλαινα ουσία- θάλαμος στους επίμυς προκαλεί βλάβη στη δημιουργία απαντήσεων σε αισθητικά ερεθίσματα (Ljungberg., Ungerstedt., 1967). Αυτή η αδυναμία απορρόφησης αισθητικών πληροφοριών (Carli et al. 1985) εξαρτάται από το πλευρικό και όχι από το μεσαίο θάλαμο (Carli et al., 1989 ; Fairley., Marshall., 1989).

Έχει βρεθεί ότι για τη σωστή ανάπτυξη της συνειρμικής μάθησης δεν είναι απαραίτητη η σωστή λειτουργία του θαλάμου αλλά απαιτείται η σωστή λειτουργία της μέλαινας ουσίας. Αυτό το γεγονός επιβεβαιώνεται και από δεδομένα ηλεκτροφυσιολογίας που δείχνουν ότι οι νευρώνες της μέλαινας ουσίας απαντούν σε εξαρτημένα ερεθίσματα (Miller et al., 1981 ; Steinfels et al., 1983 ; Ljungberg et al., 1992; Mirenowicz., Schultz., 1996). Με την παρούσα εργασία αποδεικνύεται ότι προβολή του κεντρικού πυρήνα στην μέλαινα ουσία συνεισφέρει στην δραστηριότητα των νευρώνων αυτών.

V.3. Συμπεράσματα

Τα συμπεράσματα μας συνοψίζονται στα παρακάτω:

1. Ερέθισμα στον κεντρικό αμυγδαλικό πυρήνα (CeN) προκαλεί απάντηση στη συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας (SNc), που εκδηλώνεται ως ενεργοποίηση των νευρώνων της δομής αυτής.

2. Μετά από εφαρμογή του φυσιολογικού μοντέλου μάθησης της μακρόχρονης ενδυνάμωσης (LTP), το δυναμικό των νευρώνων της μέλαινας ουσίας που προκαλείται από ερέθισμα στον κεντρικό πυρήνα της αμυγδαλής, αυξήθηκε κατά 21,2 %.
3. Ερέθισμα στην SNc, προκαλεί απάντηση στον CeN, δηλαδή ενεργοποίηση των αμυγδαλικών νευρώνων.
4. Μετά από εφαρμογή της LTP στη συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας, το δυναμικό των αμυγδαλικών νευρώνων αυξήθηκε κατά 9 %.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abraham, W. C., Bliss, T.V.P. (1985). An analysis of the increase in granule cell excitability accompanying habituation in the dentate gyrus of the anesthetized rat. Brain Res., 331, 303-313.

Abraham, W. C., Bliss, T.V.P., Goddard, G.V. (1985). Heterosynaptic changes accompany long-term but not short-term potentiation of the perforant path in the anaesthetized rat. J. Physiol. (Lond), 363, 335-349.

Abraham, W. C., Gustafsson, B., Wingstrom, H. (1987) Long-term potentiation involves enhanced synaptic excitation relative to synaptic inhibition in guinea-pig hippocampus. J. Physiol. (Lond), 394, 367-380.

Adams, R.D, Victor, M. (1993). Principles of Neurology, 5th ed. New York : McGraw-Hill.

Alexander, G.E., Crutcher, M.D. (1990). Functional architecture of basal ganglia circuits : Neural substrates of parallel processing. Trends Neurosci. 13: 266-271.

Akers, R.F., Lovinger, D.M., Colley, P.A., Linden, D.J., Routtenberg, A. (1986). Translocation of the protein kinase C activity may mediate hippocampal long-term potentiation. Science, 231, 587-589.

Altman, J., Das, D.G., Anderson, W.J. (1968). Effects of infantile handling of morphological development of the rat brain : An exploratory study. Dev. Psychol., 1 10-20.

Andersen, P., Sundberg, S.H., Sveen, O., Swann, J.W., Wingstrom, H. (1980). Possible mechanisms for long-lasting potentiation of synaptic transmission in hippocampal slices from guinea pigs. J. Physiol. (Lond), 302, 463-482.

Andersen, P., Sundberg, S. H., Sveen, O., Wingstrom, H. (1977). Specific long-lasting potentiation of synaptic transmission in hippocampal slices. Nature, 266, 736-737.

Artola, A., Singer, W. (1987). Long-term potentiation and NMDA receptors in rat visual cortex. Nature, 330, 649-652.

Ascher, P., Nowak, L. (1987). Electrophysiological studies of NMDA receptors. Trends Neurosci. 10, 284-288.

Bar, P.R., Wiengant, F., Lopes da Silva, F.H., Gispen, W.H. (1984). Tetanic stimulation affects the metabolism of phosphoinositides in hippocampal tissue. *Brain Res.*, 321, 381-385.

Barnes, C.A., McNaughton, B.L. (1980). Spatial memory and hippocampal synaptic plasticity in senescent and middle-aged rats. In : *The Psychobiology of Aging: Problems and Perspectives* (ed. D. Stein), Elsevier/North Holland, New York, pp.253-272.

Barnes, C.A., McNaughton, B.L. (1985). An age comparison of the rates of acquisition and forgetting of spatial information in relation to long-term enhancement of hippocampal synapses. *Behav. Neurosci.*, 99, 1040-1048.

Barrionuevo, G., Brown, T.H. (1983). Associative long-term potentiation in hippocampal slices. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 7347-7351.

Baudry, M., Lynch, G. (1980). An hypothesis regarding the cellular mechanisms responsible for long-term synaptic potentiation in the hippocampus. *Exp. Neurol.*, 68, 202-204.

Bergquist, F., Shahabi, H.N., Nissbrandt, H. (2000). Somatodendritic dopamine release in rat nigra influences motor performance on the accelerating rod. *Gotecorg University, Sweden*.

Doyere, V., Scafe, G.E., Sigurdsson T., LeDoux E. (2003). Long-term potentiation in freely moving rats reveals asymmetries in thalamic and cortical inputs to the lateral amygdala. *European Journal of Neuroscience*, Vol. 17, pp. 2703-2715

Berridge, M.J., Irvine, R.F. (1984). Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, 312, 315-321.

Bliss, T.V.P., Douglas, R.M., Errington, M.L., Lynch, M.A. (1986). Correlation between long-term potentiation and release of endogenous amino acids from dentate gyrus of anaesthetized rats. *J. Physiol.*, 377, 391-408.

Bliss, T.V.P., Errington, M.L., Laroche, S., Lynch, M.A. (1987). Increase in K^+ -stimulates, Ca^{2+} -dependent release of (3H) glutamate from rat dentate gyrus three days after induction of long-term potentiation. *Neurosci. Lett.*, 83, 107-112.

Bliss, T.V.P., Gardner-Medwin, A. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol. (Lond.)*, 232, 357-374.

- Bliss, T.V.P., Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. J. Physiol. (Lond.) 232, 331-356.
- Bloch, V., (1970). Facts and hypotheses concerning memory consolidation processes. Brain Res., 24, 561-575.
- Bloch, V., Laroche, S. (1984). Facts and hypotheses related to the search for the engram. In : Neurobiology of Learning and Memory (eds, G. Lynch, J.L. McGaugh and N.M. Weinberger), The Guilford Press, New York, pp. 249-260.
- Chang, F.L., Greenough, W.T. (1984). Transient and enduring morphological correlates of synaptic activity And efficacy change in the rat hippocampal slice. Brain. Res., 309, 35-46.
- Changeux, J.P., Danchin, A. (1976). Selective stabilization of developing synapses as a mechanism for the specification of neuronal networks. Nature, 264, 705-712.
- Chavez-Noriega, L.E., Bliss, T.V.P., Halliwell, J.V. (1989). The EPSP-spike (E-S) component of long-term potentiation in the rat hippocampal slice is modulated by GABAergic but not cholinergic mechanisms. Neurosci. Lett., 104, 58-64.
- Clements, M.P., Lynch, M.A., Bliss, T.V.P. (1988). The increase in phosphoinositides turnover associated with long-term potentiation may be mediated through a GTP binding protein. Neurosci. Res. Comm., 3, 11-19.
- Coan, E.J., Collingridge, G.L. (1985). Magnesium ions block an NMDA receptor mediated component of the synaptic transmission in rat hippocampus. Neurosci. Lett., 53, 21-26.
- Collingridge, G.L. Bliss, T.V.P. (1987). NMDA receptors- their role in long-term potentiation. Trends Neurosci. 10, 288-293.
- Dekeyne. A. (1988). Rôle des informations contextuelles dans la réactivation et la discrimination des souvenirs : approche des mécanismes de l'évocation mnésique. Thèse de Doctorat, Université Paris XI.
- Desmond, N.L., Levy, W.B. (1986). Changes in the postsynaptic density with long-term potentiation in the dentate gyrus. J. Comp. Neurol., 253, 476-482.
- De Vietti, T.L., Conger, G.L., Kirkpatrick, B.R. (1977). Comparison of the enhancement gradients oh retention obtained with stimulation of the mesencephalic reticular formation after training or memory reactivation. Physiol. Behav. 19, 549-554.

Domjan, M., and Burkhard, B. 1986. The principles of learning and behavior, 2nd ed. Monterey, Calif.: Brooks/Cole.

Douglas, R.M. (1977). Long-lasting synaptic potentiation in the rat dentate gyrus following brief high-frequency stimulation. Brain. Res., 126, 361-365.

Douglas, R.M., Goddard, G. (1975). Long-term potentiation of the perforant path-granule cell synapse in the rat hippocampus. Brain. Res., 86, 205-215.

Dunwiddie, T.V. Lynch, G. (1978). Long-term potentiation and depression synaptic responses in the hippocampus: Localization and frequency dependency. J. Physiol., 276, 353-361.

Errington, M.L., Lynch, M.A., Bliss, T.V.P. (1987). Long-term potentiation in the dentate gyrus : induction and increased glutamate release are blocked by D (-) amino-phosphonovalerate. Neuroscience, 20, 279-284.

Feasey, K.J., Lynch, M.A., Bliss, T.V.P. (1986). Long-term potentiation is associated with an increase in calcium-dependent, potassium-stimulated release of (¹⁴C) glutamate from hippocampal slices : An ex vivo study in the rat. Brain Res., 364, 39-44.

Gallagher, M., and Holland, P.C. 1992. Understanding the function of the central nucleus: Is simple conditioning enough? In J. Aggleton (ed), *The Amygdala*:

Gervais, R., Mouly, A. -M., Elaagouby, K., Levy, F. (1990). Olfactory bulb plasticity. In : Chemosensory Information Processing, NATO AST Series, Vol. H 39 (ed.D. Shild), Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Gisquet-Verrier, P., Alexinsky, T. (1988). Time-dependent fluctuations of retention performance in an aversively motivated task. Anim. Learn. Behav., 16, 58-66.

Greenough, W.T. (1984). Possible structural substrates of plastic neural phenomena. In : Neurobiology of Learning and Memory (eds. G. Lynch, J.L. McGaugh and N.M. Weinberger), The Guilford Press, New-York, pp. 470-478.

Greenstein, Y.J., Pavlides, C., Wilson, J. (1988). Long-term potentiation in the dentate gyrus is preferentially induced at theta rhythm periodicity. Brain Res., 438, 331-334.

Gustafsson, B., Wingstrom, H. (1986). Hippocampal long-lasting potentiation produced by pairing single volleys and brief conditioning tetani evoked in separate afferents. J. Neurosci., 6, 1575-1582.

Hebb, D.O. (1949). *The Organization of Behavior*. Wiley, New York.

Hirano, T., Best, P., Olds, J. (1970). Unites during habituation, discrimination learning and extinction. Electroenceph. Clin. Neurophysiol., 28, 127-135.

Hughes, J.R. (1958) Post-tetanic potentiation. Physiol.Rev., 38, 91-113.

Kamin, L.J. (1957). The retention of incompletely learned avoidance response. J.Comp. Physiol., 50, 457-460.

Kelso, S.R., Ganong, A.H., Broen, T.H. (1986). Hebbian synapses in hippocampus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83, 5326-5330.

Larabee, M.G., Bronk, D.W. (1947). Prolonged facilitation of synaptic excitation in sympathetic ganglia. J. Neurophysiol., 10, 139-154.

Larson, J., Lynch, G. (1985). Long-term potentiation in lizard cerebral cortex. Soc. Neurosci. Abstr., 11,777.

Larson, J., Wong, D., Lynch, G., (1986). Patterned stimulation at the theta frequency is optimal for the induction of hippocampal long-term potentiation. Brain Res., 368, 347-250.

Lashley, K.S. (1950). In search of the engram. Symp. Soc. Exp. Biol., 4, 454-482.

Lee, K.S. (1983). Cooperativity among afferents for the induction of long-term potentiation in the CA1 region of the hippocampus. J. Neurosci., 3, 1369-1372.

LeDoux, J. E. 1992. Brain mechanisms of emotion and emotional learning . Curr. Opin. Neurobiol. 2:2191-197.

LeDoux, J. E. 1994. Emotion, memory and the brain. Sci. Am. 270(6):50-57.

Lee, K.S .Schottler, F., Oliver, M., Lynch, G. (1980). Brief bursts of high-frequency stimulation produce two types of structural change in rat hippocampus. J. Neurophysiol. 44, 247-258.

Levy, W.B., Steward, O. (1979). Synapses as associative memory elements in the hippocampus formation. Brain Res. 175, 233-245.

Levy, W.B., Steward, O. (1983). Temporal contiguity requirements for long-term associative potentiation/depression in the hippocampus. Neuroscience. 8, 791-797.

Lewis, D.(1979). Psychobiology of active and inactive memory. Psychol. Bull. 86, 1054-1083.

Link, W., Konietzko, G., Kauselmann, G., Krug, M., Schwanke, B., Frey, U., Kuhl, K.,(1995). Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. Proceedings of National Academy of Sciences USA, 92, 5734-5738.

Lloyd, D.P.C.(1949). Post-tetanic potentiation of response in monosynaptic reflex pathways of spinal cord. J.Gen. Physiol., 33, 147-170.

Lopez, H.S., Burger, B., Dickstein, R., Desmond, N.L., Levy, W.B. (1990). Associative synaptic potentiation and depression : Quantification of dissociable modifications in the hippocampal dentate gyrus favors a particular class of synaptic modification equations. Synapse, 5, 33-47.

Lynch, G., Larson, J., Kelso, S., Barrionuevo, G., Schottler, F.(1983). Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. Nature, 305, 719-721.

Lynch, M.A., Bliss, T.V.P. (1986). Long-term potentiation of synaptic transmission in the hippocampus : Effect of calmoduline and oleoyl-acetyl-glycerol (OAG) on release of ³H glutamate. Neurosci. Lett., 65, 171-176.

Lynch, M.A., Clements, M.P., Errington, M.L., Bliss, T.V.P. (1988). Increased hydrolysis of phosphatidylinositol-4, 5-biphosphate in long-term potentiation. Neurosci. Lett., 84, 291-296.

Lynch, M.A., Errington, M.L., Bliss, T.V.P. (1985). Long-term potentiation of synaptic transmission in the dentate gyrus : Increased release of (¹⁴C) glutamate without increase in receptor binding. Neurosci. Lett., 62, 123-129.

Lynch M.A., (2003). Long- term and memory. Physio. Rev., 84 : 87-136.

Magleby, K.L., Zengel , J.E. (1975). A dual effect of repetitive stimulation on post-tetanic potentiation of transmitter release at the frog neuromuscular junction. J. Physiol. (Lond.), 245, 163-182.

Malinow, R., Miller, J.P. (1986). Postsynaptic hyperpolarization during conditioning reversibly blocks induction of long-term potentiation. Nature, 320, 529-530.

Mark, R. (1975). Memory and nerve cell connections, Oxford University Press, Oxford.

McNaughton, B.L. (1978). The dynamics of synaptic modulation in the medial and lateral components of the perforant pathway to the fascia dentate in the rat. Thesis of Doctor of Philosophy, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia.

McNaughton, B.L. (1980). Evidence for two physiologically distinct perforant pathways to the fascia dentate. Brain Res., 199, 1-19.

Milner, B. 1985. Memory and the human brain. In : How we know. Shaffo, M. (ed). San Francisco: Harper and row.

Muller, G.E., Pilzecker, A. (1990). Experimentelle Beitrage zur Lehre vom Gedachtniss. Z. Psychol. Phsyiol. Sinnesorg., 1, 1-300.

Neurobiological aspects of emotion, memory and mental dysfunction. New York: Wiley-Liss, pp.307-321.

Nishizuka, Y. (1984). The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. Nature, 308, 693-697.

Nguyen, P., Abel, T., Kandel, E.R., (1994). Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP. Science, 265, 1104-1107.

Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P.,Herbet., A., Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. Nature, 307, 462-465.

Olds, J.,Disterhoft, J.F., Segal, M., Kornblith, C.L., Hirsh, R. (1972). Learning centers of rat brain mapped by measuring latencies of conditioned unit responses. J. Neurophysiol., 35, 202-219.

Olds, J., Hirano, T. (1969). Conditioned responses of hippocampal and other neurons. Electroenceph. Clin. Neurophysiol., 26, 159-166.

Otani, S., Abraham, W.C., (1989). Inhibition of protein synthesis in the dentate gyrus but not the entorhinal cortex, blocks maintenance of long-term potentiation in rats. Neuroscience Letters, 106, 175-180.

Paxinos , G., Watson, C. (1982). The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press.

Racine, R.J., Wilson, D.A., Gingell, R., Sunderland, D. (1986). Long-term potentiation in the interpositus and vestibular nuclei in the rat. Exp. Brain Res., 63, 158-162.

Reymann, K.G., Matthies, H.K., Frey, U., Vorobyev, V.S., Matthies, H. (1982) Monosynaptic activation of the hippocampus as a conditioned stimulus : behavioral effects. Physiol. Behav., 29, 1007-1012.

Rose, G.M., Dunwiddie, T.V. (1987). Induction of hippocampal long-term potentiation using physiologically patterned stimulation. Neurosci. Lett., 69, 244-248.

- Sakamoto, T., Porter, L.L., Asanuma, H. (1987). Long-lasting potentiation of synaptic potentials in the motor cortex produced by stimulation of the sensory cortex in the cat : a basis of motor learning. Brain Res., 413, 360-364.
- Sastry, B.R., Goh, J.W., Auyeung, A. (1986). Associative induction of posttetanic and long-term potentiation in CA1 neurons of rat hippocampus. Science, 231, 988-990.
- Schultz, W. (1998) Predictive reward signal of dopamine neurons. Institute of Physiology and Program in Neuroscience, University of Fribourg, Switzerland.
- Spear, N.E. (1978) The processing of memories: forgetting and retention, Lawrence Erlbaum Associates, Publishers, Hillsdale, N.J.
- Squire, L. R. 1987. Memory and brain. New York: Oxford University Press.
- Swanson, L.W., Teyler, T.J., Thompson, R.F. (1982) Hippocampal long-term potentiation : mechanisms and implication for memory. Neurosci. Res. Program Bull., 20, 780.
- Taube, J.S., Schwartzkroin, P.A. (1988) Mechanisms of long-term potentiation: EPSP/spike dissociation, intradendritic recordings, and glutamate sensitivity. J. Neurosci., 8, 1632-1644.
- Tulving, E. and Schacter, D. L. 1990. Priming and human memory systems. Science 247: 301-306.
- Underwood, B.J. (1969) Attributes of memory. Psychol. Rev., 76. 559-573.
- Van Harreveld, A., Fifkova, e. (1975). Swelling of dendritic spines in the fascia dentate after stimulation of the perforant fibers as a mechanism for post-tetanic potentiation. Exp. Neurol., 49, 736-749.
- Voronin, L.L. (1985) Synaptic plasticity at archcortical and neocortical levels. Neirofiziologiya, 16,651-665.
- Walter, E.T., Byrne, J.H. (1985) Long-term enhancement produced by activity-dependent modulation of Aplysia sensory neurons. J Neurosci., 5, 662-672.
- Wang, J.K.T., Walaas, S.I., Greengard, P. (1988). Protein phosphorylation in nerve terminals: comparison of calcium/calmodulin-dependent and calcium/diacylglycerol-dependent systems. J. Neurosci., 8, 281-288.
- White, G., Levy, W.B., Steward, O. (1988) Evidence that associative interactions between synapses during the induction of long-term potentiation occur within local dendritic domains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85, 2368-2372.

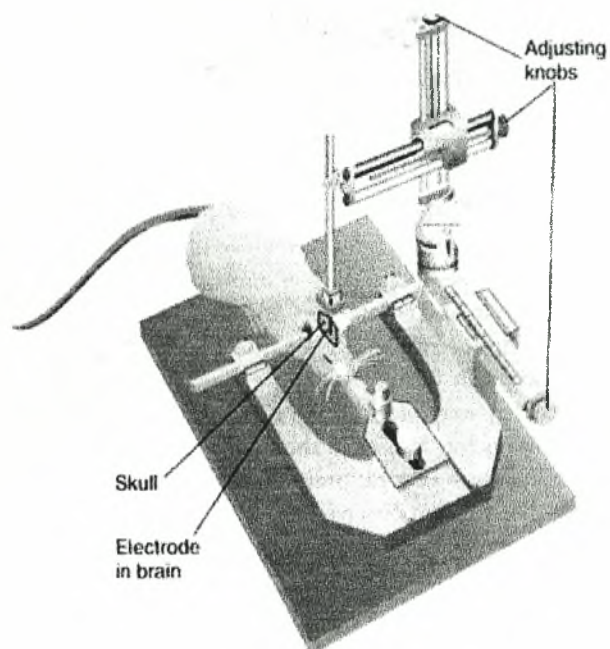
Wingstrom, H., Gustafsson, B., Huang, Y.Y., Abraham, W.C. (1986) Hippocampal long-lasting potentiation is induced by pairing single afferent volleys with intracellularly injected depolarizing current pulses. Acta Physiol. Scand. 126, 317-319.

Winson, J., Dahl, D. (1979). Long-term potentiation in dentate gyrus : induction by asynchronous volleys is separate afferents. Science. 234, 985-988.

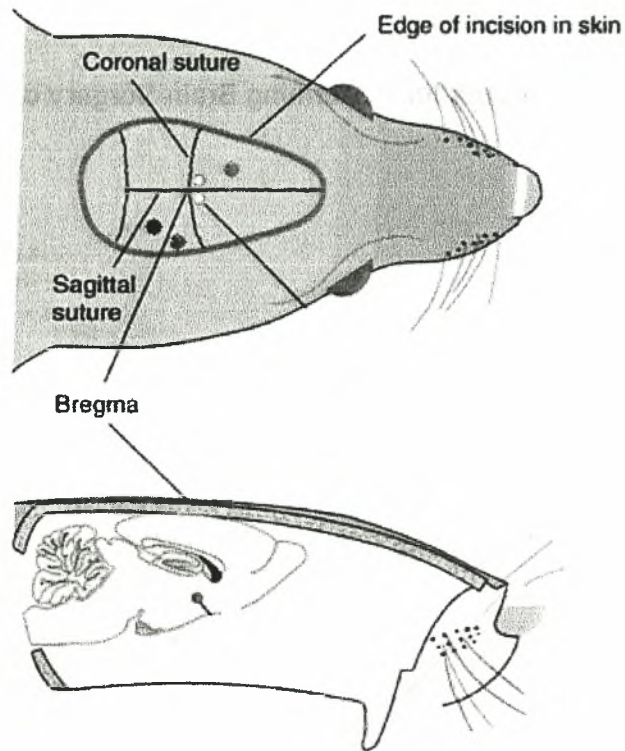
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

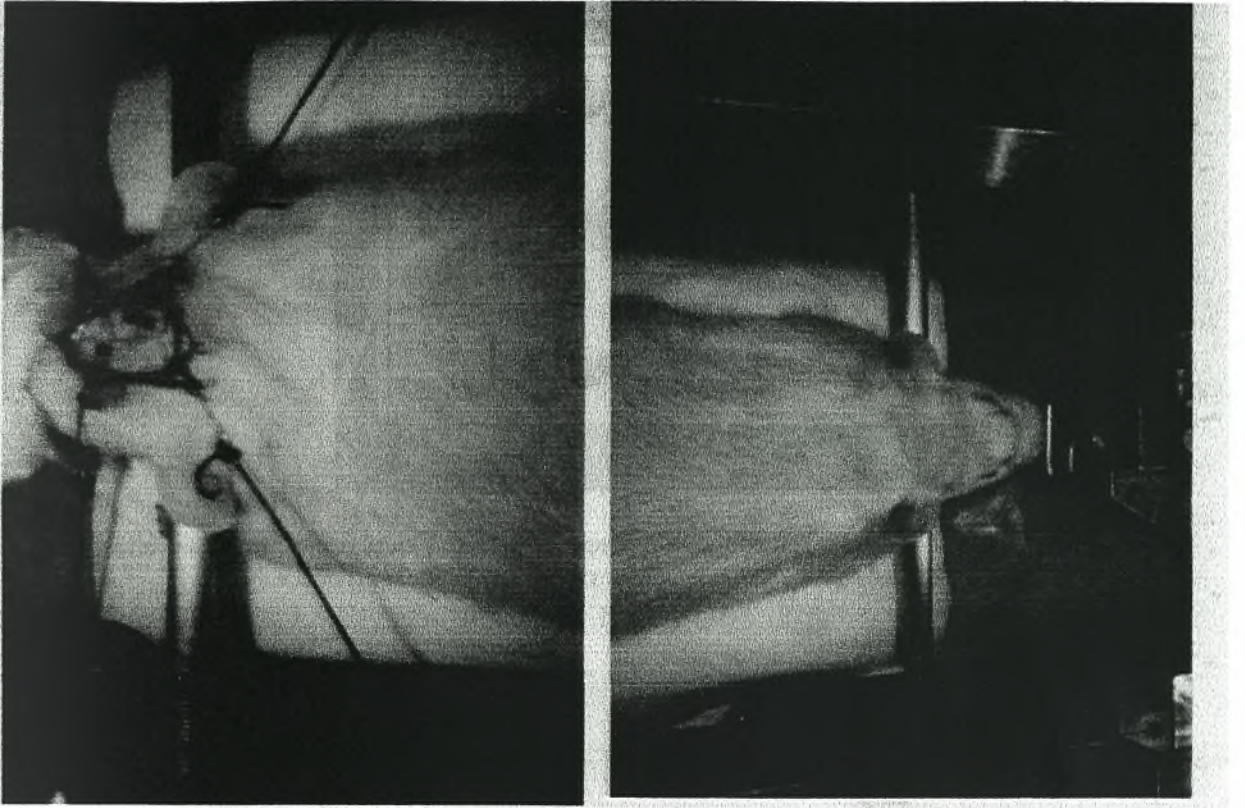
► Stereotaxic Apparatus for Performing Brain Surgery on Rats



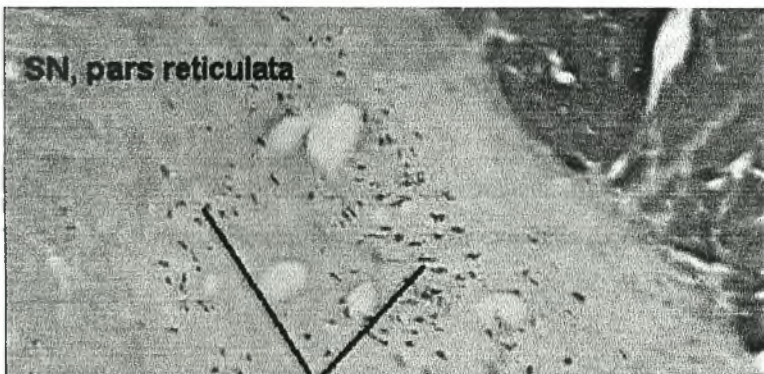
Σχήμα 1: Αναπαράσταση της στερεοταξικής συσκευής συγκράτησης του επίμυ, για χειρουργική επέμβαση στον εγκέφαλο. Διακρίνονται οι δύο ράβδοι που εισέρχονται στις κοιλότητες των αυτιών και η υποδοχή στερέωσης των δοντιών του ζώου. Δεξιά φαίνεται ο μηχανισμός ρύθμισης, με τη βοήθεια του οποίου μετακινείται το ηλεκτρόδιο προς όλες τις κατευθύνσεις (μπροστά-πίσω, δεξιά-αριστερά). Στην παρούσα εργασία υπήρχε ένας ίδιος μηχανισμός και από την αριστερή πλευρά της συσκευής, αφού είχαμε δυο ηλεκτρόδια.



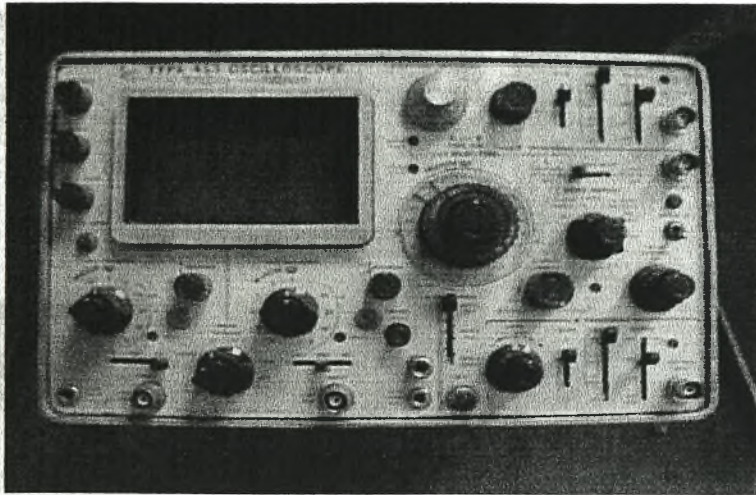
Σχήμα 2: Πάνω βλέπουμε πως φαίνεται μετά από διαμήκη τομή το κρανίο ενός επίμυ. Το σημείο εκκίνησης της τομής είναι λίγο κάτω από το ευθεία που ορίζουν τα μάτια του ζώου. Η κόκκινη κουκίδα υποδεικνύει (κατά προσέγγιση), τη θέση εισόδου του ηλεκτροδίου που έχει ως στόχο τον κεντρικό αμυγδαλικό πυρήνα, η μαύρη τη θέση εισόδου με στόχο τη συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας και η γκρι τη θέση εισόδου της προέκτασης νικελίου του ηλεκτροδίου καταγραφής. Το σημείο bregma φαίνεται και στη πάνω και στη κάτω φωτογραφία με τα μαύρα βέλη.



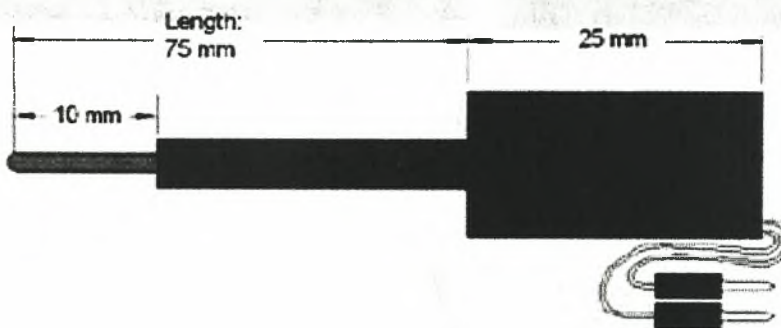
Σχήμα 3 : Αριστερά, φαίνεται το κρανίο ενός επίμυ μετά από τομή. Διακρίνονται οι σπές που έγιναν για την κάθοδο των ηλεκτροδίων. Δεξιά, ο επίμυς έχει τοποθετηθεί στη στερεοταξική συσκευή συγκράτησης.



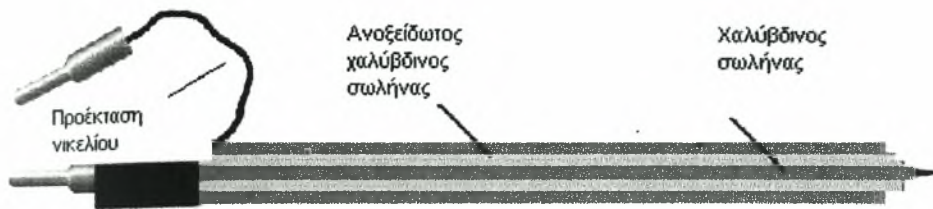
Σχήμα 4 : Διακρίνεται η συμπαγής μοίρα της μέλαινας ουσίας. Οι μαύρες κουκκίδες είναι ντοπαμινεργικοί νευρώνες.



Σχήμα 5: Oscilloscope Tektronix 453. Ψηφιακή συσκευή εμφάνισης δυναμικών των νευρώνων της περιοχής στην οποία καταγράφουμε με τη βοήθεια των ηλεκτροδίων.



Σχήμα 6 : Ηλεκτρόδιο ερεθισμού. Κατασκευάζεται από ανοξείδωτο χαλύβδινο σύρμα, διαμέτρου 150 μm το οποίο εισάγεται σε ένα χαλύβδινο σωλήνα με διάμετρο 300 μm .



Σχήμα 7 : Ηλεκτρόδιο καταγραφής. Κατασκευάζεται από σύρμα νικελίου-χρωμίου και διαθέτει μια πρόεκταση που λειτουργεί ως γείωση.

Συντομεύσεις :

SN : substantia nigra

SNC : substantia nigra, pars compacta

SNr : substantia nigra, pars reticulata

CeN : central nucleus

LTP : long term potentiation

Fra-1 : fos related antigen 1

FRA : fos related antigen

TH : tyrosine hydroxylase

