

نقش پروتئین S100B آستروسیتی بر تقویت حافظه در موش صحرایی

پروین بابایی^{۱،۲*}، لیلا جمالزاده^{۱،۳}، کیوان کرامتی^۳

۱. بخش فیزیولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان

۲. مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان

۳. بخش فیزیولوژی جانوری دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی دامغان

پذیرش: ۷ دی ۸۸

دریافت: ۱۲ شهریور ۸۸

چکیده

مقدمه: پروتئین S100B، پروتئینی است که از آستروسیت‌ها آزاد می‌شود و در کنترل ارتباط نوروگلیالی و احتمالاً در حافظه و شکل‌پذیری سیناپسی نقش دارد. مطالعه ارتباط عملکردی دو سلول آستروسیت و نورون از اهمیت خاصی برخوردار است. در مطالعه حاضر اثر تزریق این پروتئین به درون هیپوکامپ بر روی یادگیری در موش‌های صحرایی مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: در این تحقیق از ۴۰ موش صحرایی نر استفاده شد. حیوانات پس از جراحی و کانول‌گذاری دو طرفه در ناحیه CA1 هیپوکامپ و نیز ۷ روز ریکاوری، تحت یادگیری احترازی غیرفعال قرار گرفتند (۰/۵ میلی آمپر، ۱۰۰ هرتز، ۵ ثانیه). بلافاصله پس از آموزش، ۰/۵ میکرولیتر پروتئین S100B، به صورت دوطرفه، در دوزهای مختلف (۵ و ۵۰ و ۵۰۰ و ۵۰۰۰ نانوگرم) به گروه‌های آزمایشی و سالین به گروه کنترل تزریق شد. شاخص‌های یادگیری و حافظه شامل اولین تاخیر در پایین آمدن از سکو و کل زمان سپری شده بر روی سکو، ۲۴ ساعت بعد سنجش شد.

یافته‌ها: تزریق ۵ نانوگرم S100B، افزایش معنی داری را در شاخص اولین تاخیر در پایین آمدن از سکو ($P < 0/01$) و نیز کل زمان سپری شده بر روی سکو ($P < 0/001$) نشان داد و بطور شگفت‌آوری دوزهای ۵۰۰ و ۵۰۰۰ نانوگرم این پروتئین، در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی داری را در هر دو شاخص فوق‌الذکر نشان دادند ($P < 0/001$).

نتیجه‌گیری: نتایج ما نشان می‌دهد پروتئین آستروسیتی S100B، اثرات تعدیلی بر روی حافظه دارد، بطوریکه در دوزهای نانوگرم حافظه را تسهیل، در حالی‌که در دوزهای میکروگرم حافظه احترازی غیرفعال را تخریب می‌کند.

واژه‌های کلیدی: پروتئین S100B، یادگیری و حافظه، هیپوکامپ، موش صحرایی

مقدمه

[۵،۹،۱۸]. این پروتئین، میتوژنیک [۱۳] و نوروتروفیک [۱۴] بوده، دارای عملکرد خارج سلولی بعنوان یک فاکتور تروفیکی می‌باشد و در عملکردهای سلولی متفاوتی چون رشد سلولی، ساختار سلولی و سوخت و ساز انرژی نقش دارد [۱۹].

پیش‌بینی می‌شود پروتئین S100B، به دلیل دارا بودن ترادف‌های اسیدآمینو ای گلوتامیکی و اسپارتیکی [۹] و دخالت در هموستاز کلسیم درون سلولی [۷]، در عملکرد نورون‌های

پروتئین اتصالی کلسیم S100B، پروتئین اسیدی کوچکی است که از سلول‌های گلیالی به ویژه آستروسیت‌ها آزاد می‌شود

p_babaei@yahoo.com
www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:
وبگاه مجله:

سه ماه، وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم) استفاده شد. حیوانات به صورت ۵ تایی در یک قفس پلکسی گلاس نگهداری و به آب و غذا آزادانه دسترسی داشتند. شرایط آزمایشگاهی شامل دوره روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعته و دمای $22 \pm 2^\circ C$ و دور از استرس بود. کلیه مراحل آموزش و تست در ساعات ۹-۱۲ صبح انجام شد. در این مطالعه، موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید.

به منظور سازگاری با شرایط محیطی نوری و دمایی و دوری از استرس، حیوانات به مدت ۳ روز و هر روز ۵ دقیقه در اتاق آزمایش به آزمایشگر، محیط آزمایش و سکو سازش داده شدند. ۷ روز قبل از آزمایشات رفتاری، حیوانات با تزریق درون صفاقی مخلوطی از کتامین و زیلازین با غلظت ۱۰۰ mg/kg و ۲۵ (نسبت ۴ به ۱)، بیهوش شده و سپس به منظور جراحی در دستگاه استروتاکسی قرار گرفتند.

همچنین کانول‌های راهنما از سرسوزن‌های ۲۲ G، با طول ۰/۹ میلی‌متر تهیه شده و پس از بررسی و اطمینان از باز بودن دو طرف آن، در ناحیه CA1 هیپوکامپ خلفی، با تنظیمات: $V: -2.8mm$ و $L: \pm 2$ ، $AP: -3$ از برگما مطابق اطلس مغز پاکسینوس [۲۱] قرار داده شدند و سپس با سیمان دندانپزشکی فیکس شدند. برای تزریق نیز از سرسوزن شماره ۲۷ و سرنگ هامیلتون استفاده گردید. حیوانات به ۵ گروه آزمایشی و کنترل (۸ تایی) تقسیم شدند: گروه ۱ (سالین)، گروه ۲ (۵ نانوگرم)، گروه ۳ (۵۰ نانوگرم)، گروه ۴ (۵۰۰ نانوگرم)، گروه ۵ (۵۰۰۰ نانوگرم). موش‌های صحرائی نر که در ناحیه CA1 هیپوکامپ آنها به صورت دو طرفه، کانول گذاری شده بودند، ۷ روز پس از ریکاوری، تحت یادگیری احترازی غیرفعال (step down passive avoidance) (شوک الکتریکی ۰/۵ میلی آمپر و ۱۰۰ هرتز، به مدت ۵ ثانیه) آموزش دیده شدند و ۲۴ ساعت بعد مجدداً تست شدند. بلافاصله پس از آموزش، ۰/۵ میکرولیتر پروتئین S100B (سیگما) در دوزهای مختلف (۵، ۵۰، ۵۰۰، ۵۰۰۰ نانوگرم)، به صورت دوطرفه به گروه‌های آزمایشی و هم‌حجم آن سالین به گروه کنترل تزریق شد.

آزمایشات رفتاری در یک اتاق تاریک و درون یک جعبه سرپوشیده که کف آن از میله‌هایی موازی به منظور عبور جریان الکتریکی (شوک) تشکیل شده بود، انجام شد [۳، ۱۶]. در مرکز این جعبه، سکویی قرار داشت که در روز آزمایش حیوان بر روی

مغزی مؤثر باشد. بر طبق داده‌های حاصل از مطالعات دانشمندان، این پروتئین به احتمال زیاد، ارتباط نورونی- گلیالی را کنترل کرده و بر مکانیسم‌های شکل‌پذیری سیستم عصبی و حافظه اثر می‌گذارد [۳]. هیپوکامپ بویژه ناحیه CA1 آن به عنوان یکی از ساختارهای مهم مغزی، نقش مهمی در حافظه و یادگیری به ویژه در ذخیره اطلاعات از حافظه کوتاه مدت به حافظه بلند مدت دارد [۱۶، ۲۳].

در انسان افزایش S100B در بیماری‌های تحلیل برنده عصبی چون آلزایمر، پارکینسون، MS [۲، ۲۰] و نیز پس از آسیب‌های مغزی [۱۳، ۱۴] مشاهده شده است، عبارتی میزان این پروتئین در خارج سلول، بعنوان یک شاخص فعالیت سلول‌های گلیالی متعاقب آسیب مغزی محسوب می‌شود [۱۸]. علی‌رغم وجود گزارشات فراوان مبنی بر افزایش این ماده به هنگام آسیب‌های مغزی و معرفی آن به عنوان یک نشانگر زیستی معتبر آسیب مغزی [۱۴]، اهمیت و دلیل این افزایش مشخص نیست.

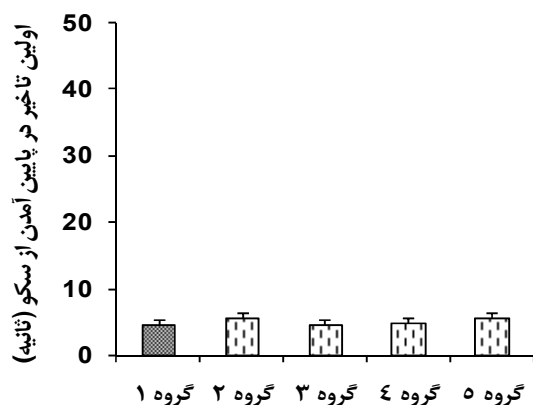
مطالعات پیشین نشان می‌دهد تزریق پروتئین S100B در کرمینه مخچه موش‌های صحرائی در دوزهای آپوتوزی (۵۰ و ۵۰۰ نانوگرم) اثر تخریبی و در دوز ۵ نانوگرم (آنتی آپوتوزی) اثر تسهیلی برفراگیری رفتار تدافعی دارد [۲۷]. همچنین موش‌های تراریخته فاقد ژن S100B افزایش شکل‌پذیری سیناپسی در هیپوکامپ [۱۹] و موش‌های تراریخته با بیان بیش از حد تخریب LTP و یادگیری [۴] را نشان می‌دهند.

Mello e Souza و همکاران (۲۰۰۱) نشان دادند غلظت‌های بالای S100B، حافظه بلندمدت را در یادگیری احترازی غیرفعال تسهیل می‌کند [۱۶].

از آنجا که عملکرد این پروتئین مترشح از آستروسیتها مشخص نشده است و مطالعات صورت گرفته حاکی از تناقض و پیچیدگی در عملکرد مغزی این پروتئین می‌باشد لذا در این تحقیق بر آن هستیم که اثر دوزهای مختلف پروتئین S100B را بر روی مرحله تقویت حافظه در یادگیری احترازی غیر فعال بر روی موش صحرائی‌های مورد مطالعه قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از ۴۰ موش صحرائی نر بالغ نژاد ویستار (سن

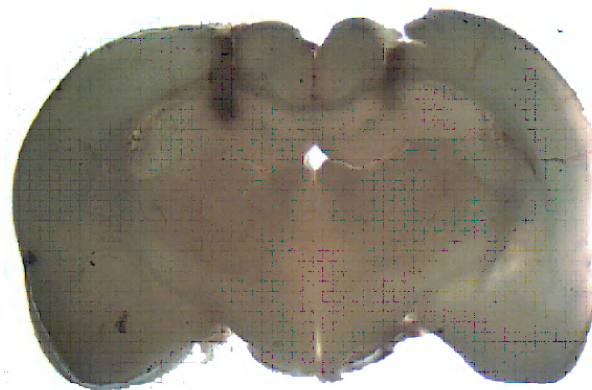


شکل ۲- مقایسه یادگیری گروههای آزمایشی و کنترل در مرحله آموزش در یادگیری اخترازی غیر فعال. میانگین زمان اولین تاخیر در پایین آمدن از سکو در مرحله آموزش در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی داری نشان نداد. سطح معنی داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد. عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که در مرحله آموزش، مقایسه بین زمان اولین تاخیر در پایین آمدن از سکو در گروه‌های مختلف در مقایسه با گروه کنترل، تفاوت معنی داری نداشت ($P > 0.05$) (شکل ۲).

بررسی آماری نشان داد که بین گروههای آزمایش در شاخص زمان اولین تاخیر در پایین آمدن از سکو ($P < 0.001$) و $F_{3,35} = 24/01$)، و نیز میزان کل زمان سپری شده بر روی سکو ($P < 0.001$ و $F_{3,35} = 41/82$)، اختلاف معنی دار وجود دارد. موش‌هایی که بلافاصله پس از آموزش، دوز ۵ نانوگرم S100B به صورت داخل CA1 دریافت کرده بودند، در مقایسه با گروه کنترل در مرحله تست افزایش معنی داری را در زمان اولین تاخیر در پایین آمدن از سکو ($P < 0.01$)، و نیز میزان کل زمان سپری شده بر روی سکو نشان دادند ($P < 0.001$)، در حالیکه موش‌هایی که بلافاصله پس از آموزش، دوزهای ۵۰۰ و ۵۰۰۰ نانوگرم پروتئین S100B دریافت کرده بودند، در مقایسه با گروه کنترل در مرحله تست، کاهش بسیار معنی داری را در هر دو شاخص مذکور نشان دادند ($P < 0.001$). اما در گروهی که بلافاصله پس از آموزش، ۵۰ نانوگرم S100B

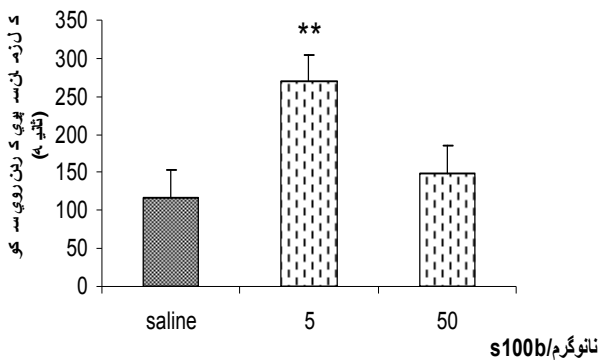


شکل ۱- فوتومیکروگراف از برش کرونال مغز نشان دهنده محل کانول گذاری در ناحیه CA1 هیپوکامپ می باشد.

آن قرار می‌گرفت و به محض اینکه هر ۴ پای خود را بر روی میله‌ها می‌گذاشت، شوک الکتریکی (۵ ثانیه، ۰/۵ میلی آمپر، ۱۰۰ هرتز) دریافت می‌کرد. ۲۴ ساعت بعد حیوان در شرایط کاملاً مشابه با روز آزمایش بر روی سکو گذاشته شده، به محض بسته شدن در جعبه کرومومتر زمان سنج روشن شده و به مدت ۳۰۰ ثانیه رفتار حیوان مشاهده و بررسی می‌شد. اولین تاخیر در پایین آمدن از سکو و کل زمان سپری شده بر روی سکو به عنوان شاخص‌های یادگیری و حافظه سنجش شدند.

بعد از پایان آزمایشات رفتاری، ۰/۵ میکرولیتر ماده رنگی متیلن بلو، به منظور رنگ‌آمیزی و مشخص شدن موقعیت کانول از طریق کانول‌ها و در هر دو طرف تزریق شد. حیوانات کشته شده و مغزشان در فرمالین ۱۰٪ فیکس و برش‌هایی از مغز در ناحیه رنگ‌آمیزی شده تهیه شد تا از صحت جایگیری مناسب کانول در ناحیه CA1 هیپوکامپ اطمینان حاصل شود (شکل ۱). تنها حیواناتی که ناحیه تزریق در هر دو طرف هیپوکامپشان صحیح بود، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. در این مطالعه دو معیار سنجش حافظه شامل اولین تاخیر در پایین آمدن از سکو و کل زمان سپری شده بر روی سکو برحسب ثانیه و در مدت زمان پایش ۳۰۰ ثانیه ثبت گردید.

پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون کولموگوروف-اسمیرنوف، نتایج، برای مقایسه گروههای آزمایشی و کنترل، با آنالیز واریانس یک طرفه بررسی شده و در مواردی که اختلاف معنی دار بود، از آزمون tukey برای مقایسه‌های Post Hoc استفاده شد. همچنین $P < 0.05$ به



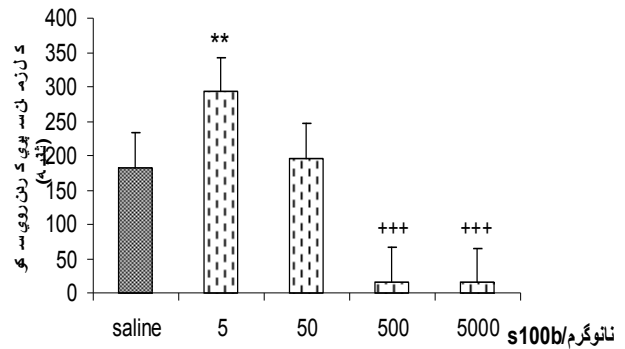
شکل ۵- نتایج حاصل از تزریق درون هیپوکامپی S100B بر شاخص کل زمان سپری شده بر روی سکو ۷ روز پس از آموزش در تست یادگیری احترازی غیر فعال. $(P < 0.01)$ ** سطح معنی داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

در پایین آمدن از سکو ($P < 0.001$) و نیز میزان کل زمان سپری شده بر روی سکو تنها در گروه آزمایشی ۵ نانوگرم نشان داد ($P < 0.01$). هیچ تفاوت معنی داری در گروه دریافت کننده دوز ۵۰ نانوگرم، در مقایسه با گروه کنترل، در تست حافظه ۷ روز پس از آموزش، مشاهده نشد ($P > 0.05$) (شکل‌های ۵ و ۶).

به طور کلی بر طبق این داده‌ها، پروتئین S100B در دوزهای ۵۰۰ و ۵۰۰۰ نانوگرم موجب تخریب حافظه و در دوز ۵ نانوگرم موجب تسهیل مرحله تقویت حافظه در یادگیری احترازی غیرفعال می‌شود، به عبارتی حافظه را افزایش می‌دهد.

بحث

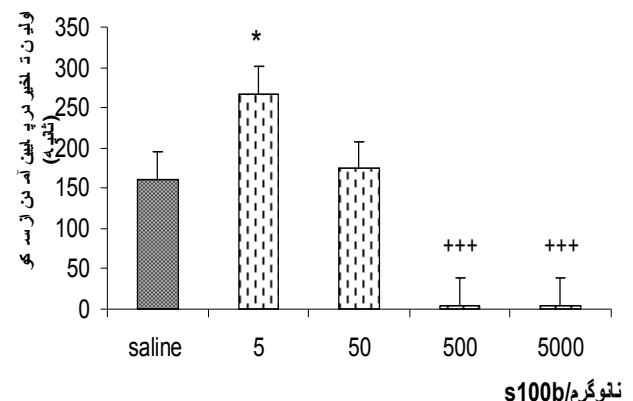
در مطالعه حاضر اثر تزریق پروتئین S100B به درون ناحیه CA1 هیپوکامپ بر روی یادگیری احترازی غیر فعال در موش-های صحرایی نر بررسی شد. نتایج ما نشان داد که تزریق دوزهای مختلف پروتئین S100B، بلافاصله پس از آموزش اثرات وابسته به دوزی بر روی حافظه دارد، بطوریکه پس از تزریق به ناحیه CA1 هیپوکامپ، در دوز پایین حافظه را تسهیل، در حالیکه در دوزهای بالا حافظه را کاهش می‌دهد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد این پروتئین آستروسیتی به نوعی بر نورونهای دخیل در روند حافظه تاثیر گذاشته که این تاثیر بیانگر یک نقش فرای حفاظتی سلولهای مترشحه آن



شکل ۳- نتایج حاصل از تزریق درون هیپوکامپی S100B بر شاخص کل زمان سپری شده بر روی سکو، ۲۴ ساعت پس از آموزش در تست یادگیری احترازی غیر فعال، $(P < 0.01)$ ** $(P < 0.001)$ +++ سطح معنی داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

دریافت کرده بود، در مقایسه با گروه کنترل در هیچ یک از دو شاخص تفاوت معنی داری نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد ($P > 0.05$) (شکل‌های ۳ و ۴).

همچنین ۷ روز پس از روز آموزش حیوانات مجدداً تحت تست حافظه و یادگیری قرار گرفتند. نتایج این تست نشان داد که بین گروههای آزمایش در شاخص زمان اولین تاخیر در پایین آمدن از سکو ($P < 0.001$ و $F_{2,21} = 57/303$)، و نیز میزان کل زمان سپری شده بر روی سکو ($P < 0.01$ و $F_{2,21} = 10/308$)، اختلاف معنی دار وجود دارد. تست تعقیبی tukey اختلاف معنی داری را در زمان اولین تاخیر



شکل ۴- نتایج حاصل از تزریق درون هیپوکامپی S100B بر زمان اولین تاخیر در پایین آمدن از سکو ۲۴ ساعت پس از آموزش در تست یادگیری احترازی غیر فعال. $(P < 0.05)$ * $(P < 0.001)$ +++ سطح معنی داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

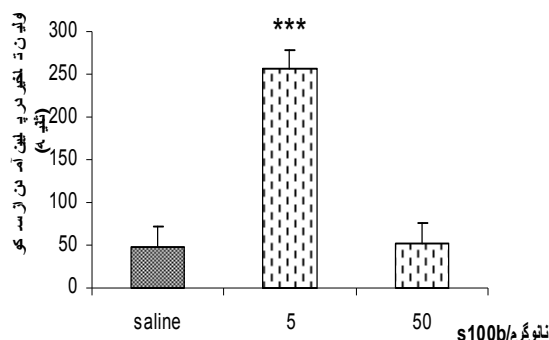
پروتئین یک نقش تعدیلی بر روی فرآیندهای مربوط به حافظه و یادگیری داشته باشد. بر طبق نظر Donato (۲۰۰۸)، نتایج حاصل از تجویز مقادیر مختلف نانو و میکرومولار S100B در مطالعات invitro از یک سو و تغییرات این پروتئین در بیماری‌هایی نظیر آلزایمر و سندروم دان مبین نقش دوگانه تنظیمی آن در دوزهای بالا و پایین می باشد [۲].

با در نظر گرفتن زمان تزریق پروتئین در مطالعه حاضر یعنی بلافاصله پس از یادگیری احترازی مهارتی، می توان نتیجه گیری کرد یادگیری ارتباط بین محرک دورکننده (شوک) و سکو و نیز ذخیره آن بصورت حافظه طولانی مدت به نوعی توسط مقادیر مختلف S100B تعدیل می‌شود. در این مرحله زمانی که مرحله تقویت حافظه و تبدیل حافظه کوتاه مدت به بلندمدت می‌باشد، روندهای درون سلولی مربوط به شکل‌پذیری سیناپسی صورت می‌گیرد. از طرف دیگر انجام تست ۷ روز پس از آموزش نشان دهنده پایداری و ماندگاری اثر پروتئین در افزایش حافظه را نشان می‌دهد.

مکانیسم‌های پیام‌رسانی S100B در تعدیل حافظه هنوز شناخته نشده است [۱۶، ۲۰]. مطالعات صورت گرفته بر اثرات نوروتروفیکی این پروتئین نشان می‌دهد که احتمالا S100B، در غلظت‌های پایین به رسپتور خود، RAGE، موجود بر غشای نورونی، متصل شده و با تولید میزان کم گونه‌های اکسیژن فعال Reactive oxygen species (ROS) و افزایش بیان فاکتور ضد آپوپتوزی Bcl-2 سبب بقای نورونی می‌گردد. اما در مقابل S100B در غلظت‌های بالا، باز هم به صورت وابسته به RAGE، ولی این بار با تولید میزان بسیار زیادی ROS و بتا آمیلوئید موجب اثرات مرگ نورونی می‌گردد [۲].

همچنین پروتئین S100B می‌تواند غلظت کلسیم درون-سلولی و پروتئین کیناز C را هم در نورون‌ها و هم در آستروسیت‌ها از طریق اثرگذاری بر کانال‌های غشایی و ذخایر درونی کلسیم افزایش دهد که این افزایش کلسیم درون سلولی در پاسخ به یادگیری احترازی غیرفعال، برای بیان مرحله آغازین حافظه کوتاه مدت ضروری است [۲۰]. ارتباط این پروتئین با کلسیم در تغییر فعالیت نورونها نیاز به مطالعات آینده دارد.

مکانیسم احتمالی دیگر S100B در راستای تعدیل حافظه می‌تواند تغییر نفوذپذیری غشای نورونی نسبت به نوروترانسمیترهایی چون گابا باشد [۱۰] و کاهش غلظت خارج



شکل ۶- نتایج حاصل از تزریق درون هیپوکامپی S100B بر زمان اولین تاخیر در پایین آمدن از سکو ۷ روز پس از آموزش در تست یادگیری احترازی غیر فعال (P < ۰/۰۰۱) *** سطح معنی داری P < ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

می باشد.

پاسخ وابسته به دوز مشاهده شده در پژوهش حاضر، توسط مطالعه Kleindienst و همکاران (۲۰۰۶) تایید می‌شود. آنها نیز اثرات دوگانه نوروتروفیکی در غلظت‌های نانومولار و آپوپتوتیک در غلظت‌های میکرومولار گزارش نموده اند [۱۸].

مطالعات صورت گرفته بر روی موش‌های تراریخته با بیان بیش از حد S100B، نشان دهنده تخریب LTP و یادگیری فضایی بوده است [۴] که به نوعی در توافق با نتایج ماست.

برخی مطالعات با استفاده از آنتی‌بادی ضد پروتئین S100B نشان دادند که تزریق آنتی‌بادی به درون نیمکره‌های مغز جوجه، بلافاصله پس از آموزش، تشکیل حافظه بلندمدت [۲۰] و نیز LTP را در ناحیه CA1 در اسلایس‌های هیپوکامپی مهار می‌کند [۱۵]. همچنین تزریق آنتی‌بادی ضد پروتئین S100B در مغز موش صحرایی موجب کاهش حافظه در یادگیری ماز [۱۲]، رفلکس شرطی شدن [۶]، Handedness [۹] و نیز رفتار دفاعی [۱۷] می‌گردد. این مطالعات به نوعی موید نتایج تحقیق حاضر می‌باشد.

درحالیکه نتایج مطالعه Mello e Souza و همکارانش [۱۶] با تزریق این پروتئین در ناحیه CA1 هیپوکامپ نشان-دهنده به اشباع رسیدن اثر تسهیلی دوزهای بالای S100B بر حافظه می‌باشد که با نتیجه کارما توافق ندارد. هرچند مطالعات صورت گرفته از نظر روش و پروتوکول یادگیری، نوع حیوان و مدت زمان تزریق یکی نیست. اما به نظر چنین می‌رسد این

با توجه به اینکه میزان این پروتئین پس از آسیب‌های مغزی افزایش می‌یابد [۱۶، ۱۴، ۱۳] و میزان بیان ژن آن بستگی به بر اساس یافته‌های تحقیق ما اثر تعدیلی بر عملکرد نورون در جهت تعدیل حافظه دارد بیانگر این مطلب است که آستروسیتها برخلاف تصورات قبلی که صرفاً یک سلول نگهدارنده و حمایتی تلقی میشدند، از پویایی بیشتری در سیستم اعصاب برخوردار هستند. مطالعات آینده جهت بررسی مکانیسم‌های درون سلولی عملکرد تعدیل حافظه ناشی از این پروتئین ضروری است.

سلولی این نوروترانسمیتر مهاری موجب افزایش فعالیت نورونی در هیپوکامپ و تقویت حافظه می‌گردد [۱۶].
 وضعیت عملکردی سلول دارد [۲]، به نظر می‌رسد زمانی که آسیبی به نورونها و سلولهای مغزی وارد می‌شود، این پروتئین به دلیل خواص نوروتروفیکی و حفاظت عصبی، با افزایش میزان خود در مغز و به ویژه هیپوکامپ باعث نورونز و ترمیم سلولهای آسیب دیده شود [۱۴، ۱۳] که این فرآیند متعاقباً با افزایش عملکردهای شناختی همراه خواهد بود.
 با توجه به اینکه این پروتئین یک فراورده گلیالی است و

References

- [1] Donato R, Functional roles of S100 proteins, calcium binding proteins of the EF-hand type. *Biochem Biophys Acta* 1450 (1999) 191-231.
- [2] Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, Tubaro C, Giambanco I, S100B's double life: Intracellular regulator and extracellular signal. *Biochem Biophys Acta* (2008) 1-14.
- [3] Epstein OI, Pavlov IF, Shtark MB, Improvement of memory by means of ultra-Low doses of antibodies to S-100B antigen. *Evid Based Complement Altern Med* 3 (2006) 1-5.
- [4] Gerlai R, Woytowicz JM, Marks A, Roder J, Overexpression of a calcium-binding protein, S100b, in astrocytes alters synaptic plasticity and impairs spatial learning in transgenic mice. *Learn Mem* 2 (1995) 26-39.
- [5] Goncalves DS, Lenz G, Karl JD, Goncalves CA, Rodnight R, Extracellular S100B protein modulates ERK in astrocytes cultures. *NeuroReport* 11 (2000) 807-9.
- [6] Gromov A, Syrovatskaia LP, Ovinova GV, Functional role of the neurospecific S100 protein in the processes of memory. *Neurosci Behav Physiol* 22 (1992) 25-29.
- [7] Heizmann CW, Ca²⁺-Binding S100 Proteins in the Central Nervous System. *Neurochem Res* 24 (1999) 1097-1100.
- [8] Hu J, Castets F, Guevara JL, Van Eldik LJ, S100 beta stimulates inducible nitric oxide synthase activity and mRNA levels in rat cortical astrocytes. *J Biol Chem* 271 (1996) 2543-7.
- [9] Hyden H, Lange PW, S100 brain protein: correlation with behavior. *Proc Natl Acad Sci US* 67 (1970) 1959-1966.
- [10] Hyden H, Lange PW, The effect of S100 protein on the plasma membrane function of neurons. *Cell Mol Neurobiol* 1 (1981) 313-7.
- [11] Izquierdo I, Medina JH, Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem* 68 (1997) 285-316.
- [12] Karpiak SE, Serokosz M, Rapport MM, Effects of antisera to S100 protein and to synaptic membrane fraction on maze performance and EEG. *Brain Res* 102 (1976) 313-21.
- [13] Kleindienst A, McGinn MJ, Harvey HB, Colello RJ, Hamm RJ, Bullock MR, Enhanced hippocampal neurogenesis by intraventricular S100B infusion is associated with improved cognitive recovery after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 22 (2005) 645-655.
- [14] Kleindienst A, Bullock MR, A critical analysis of the role of the neurotrophic protein S100B in acute brain injury. *J Neurotrauma* 23 (2006) 1185-1200.
- [15] Lewis D, Teyler TJ, Anti-S100 serum blocks long-term potentiation in the hippocampal slice. *Brain Res* 383 (1986) 159-64.
- [16] Mello e Souza T, Rohden A, Meinhardt M, Goncalves CA, Quillfeldt JA, S100B infusion into the rat hippocampus facilitates memory for the inhibitory avoidance task but not for the open-field habituation. *Physiol Behav* 1 (2000) 29-33.
- [17] Motin VG, Nikitin VP, Sherstnev VV, Effects of antibodies against protein S100b on synaptic

- transmission and long-term potentiation in CA-1 hippocampal neurons in rats. *Bull Exp Biol Med* 133 (2002) 110-113.
- [18] Nardin P, Tramontina F, Leite MC, Tramontina AC, Quincozes-Santos A, de Almeida LM, Battastini AM, Gottfried C, Gonçalves CA, S100B content and secretion decrease in astrocytes cultured in high-glucose medium. *Neurochem Int* 50 (2007) 774-782.
- [19] Nishiyama H, Knopfel T, Endo S, Itohara S, Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA (PNAS)* 99 (2002) 4037-4042.
- [20] O'Dowd BS, Zhao WQ, Ng KT, Robinson SR, Chicks injected with antisera of either S100a or S100b protein develop amnesia for a passive avoidance task. *Neurobiol Learn Mem* 67 (1997) 197-206.
- [21] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 1986.
- [22] Riedel G, Micheau J, Function of the hippocampus in memory formation: Desperately seeking resolution. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatr* 25 (2001) 835-853.
- [23] Robertson LT, Memory and the Brain, *J Dental Edu* 66 (2001) 30-42.
- [24] Rothermundt M, Peters M, Prehn J, Arolti V, S100B in Brain Damage and Neurodegeneratin. *Micros Res Tech* 60 (2003) 614-632.
- [25] Sherstnev VV, Gruden' MA, Storozheva ZI, Proshin AT, Hetrochronous involvement of neurotrophic factors in the neurochemical organization of learning and memory processes in adult organisms. *Neurosci Behav Physiol* 33 (2003)a 31-38.
- [26] Sherstnev VV, Storozheva ZI, Gruden' MA, Proshin AT, The Involvement of neurotrophic factors in the central mechanisms of behavior in adult animals. *Neurosci Behav Physiol* 30 (2000) 255-260.
- [27] Sherstnev VV, Storozheva ZI, Proshin AT, Makhmutov RY, Puzyrev AV, S100B Protein in Pro and Antiapoptotic Doses Produces Different Effects on Defensive Behavior in Adult Rats. *Bull Exp Biol Med* 136 (2003) 543-547.
- [28] Slezak M, Pfrieger FW, Soltys Z, Synaptic plasticity, astrocytes and morphological homeostasis. *J Physiol Paris* 99 (2006) 84-91.
- [29] Walz R, Roesler R, Madruga M, Rodrigues C, Godfried C, Medina JH, Izquierdo I, Time-dependent impairment of inhibitory avoidance retention in rats by posttraining infusion of a mitogen-activated protein kinase inhibitor into cortical and limbic structures. *Neurobiol Learn Mem* 73 (2000) 11-20.