

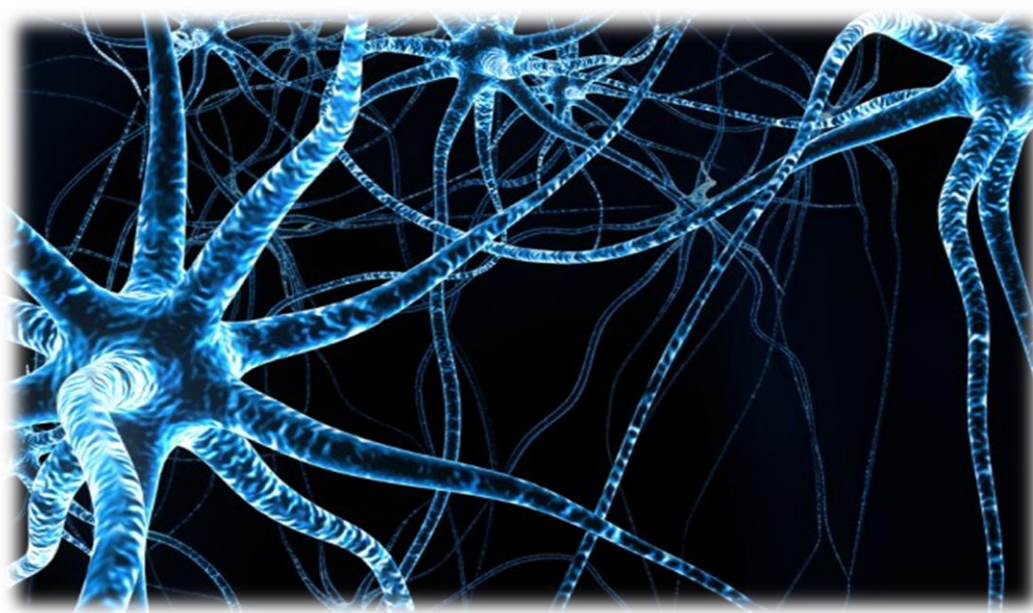


Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών (ΠΜΣ):
«Μοριακή και Εφαρμοσμένη Φυσιολογία»**

Ιατρική Σχολή

*«Η επίδραση μιας πρώιμης εμπειρίας στο
χολινεργικό σύστημα του επίμυ»*



Μπακογιάννης Ιωάννης
Βιολόγος

Σεπτέμβριος 2015

Every man if he wants becomes the sculpture of his own
brain

-Ramón y Cajal

*(Μετάφραση: κάθε άνθρωπος, αν το θέλει, γίνεται το γλυπτό του ίδιου του εγκεφάλου του-
Ραμόν υ Καχάλ, νευροεπιστήμων του 19^{ου} αιώνα.*

*Απέσπασε το βραβείο Νόμπελ Φυσιολογίας- Ιατρικής το 1906 και το μοιράστηκε με τον Camillo
Golgi για την αποκάλυψη της δομής του νευρικού συστήματος)*



Σκίτσο ενός νευρώνα με τις χαρακτηριστικές του απολήξεις

Τριμελής επιβλέπουσα επιτροπή

Κουτσιλιέρης Μιχαήλ (επιβλέπων), Ενδοκρινολόγος, καθηγητής
Φυσιολογίας, Τμήματος Ιατρικής, ΕΚΠΑ.

Σταματάκης Αντώνιος, Βιολόγος, επίκουρος καθηγητής
Συμπεριφορικής Νευροβιολογίας, Τμήματος Νοσηλευτικής, ΕΚΠΑ.

Βαϊόπουλος Γεώργιος, Παθολόγος-Ρευματολόγος, καθηγητής
Φυσιολογίας, Τμήματος Ιατρικής, ΕΚΠΑ

Αφιερωμένο στην πολυαγαπημένη μου
γιαγιά Φωτεινή..

Πίνακας Περιεχομένων

1. ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΝΕΥΡΟΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ	14
1.1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ.....	14
1.2. ΕΓΚΕΦΑΛΟΣ	16
1.3. ΜΕΤΑΙΧΜΙΑΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	17
1.3.1. Διάφραγμα	18
2. ΧΟΛΙΝΕΡΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	19
2.1. ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΗ- ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	19
2.1.1. Αναστολείς της AChE (AChEIs).....	25
2.2. ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΗ- ΝΕΥΡΟΑΝΑΤΟΜΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	27
2.3. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΧΟΛΙΝΕΡΓΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ.....	34
2.3.1. Ακετυλοχολίνη και Γνωσιακές δυσλειτουργίες.....	36
2.3.2. Μεταγραφικοί παράγοντες υψίστης σημασίας για το χολινεργικό σύστημα	36
2.4. ΧΟΛΙΝΕΡΓΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ	37
3. ΠΡΩΙΜΕΣ ΕΜΠΕΙΡΙΕΣ: Η ΣΧΕΣΗ ΜΗΤΕΡΑΣ-ΒΡΕΦΟΥΣ	43
<i>Σύντομη ανασκόπηση περί του άξονα του στρες.</i>	45
3.1. ΜΗΤΡΟΤΗΤΑ & ΜΗΤΡΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ	47
3.2. ΜΗΤΡΙΚΗ ΑΠΟΣΤΕΡΗΣΗ	49
3.3. ΝΕΟΓΝΙΚΟΣ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ	51
3.4. Η ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΝΕΟΓΝΙΚΗΣ ΜΑΘΗΣΗΣ ΣΕ ΛΑΒΥΡΙΝΘΟ ΣΧΗΜΑΤΟΣ T- (T-MAZE NEONATAL LEARNING)	53
4. ΣΚΟΠΟΣ.....	60
5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	63
5.1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ	63
5.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ: Έκθεση υπό συνεχή λήψη ή συνεχόμενη παρεμπόδιση λήψης ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΗΣ ΑΝΤΑΜΟΙΒΗΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΗΤΕΡΑ	64
5.2.1. Εκπαίδευση υπό Συνεχή Λήψη Ανταμοιβής.....	65
5.2.2. Εκπαίδευση υπό Συνεχή Παρεμπόδιση Λήψης Ανταμοιβής.....	66
5.3. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟΦΟΡΩΝ ΠΛΑΚΩΝ ΚΑΙ ΙΣΤΩΝ	67
5.4. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟ ΕΝΖΥΜΟ CHAT.....	68
5.5. ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΣΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	70
5.6. ΙΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΓΙΑ ΤΟ ΕΝΖΥΜΟ AChE.....	70
5.7. ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΣΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	71
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	73
6.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ CHAT ΣΤΗΝ ΕΝΗΛΙΚΟ ΖΩΗ, ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΙΜΗΣ ΕΜΠΕΙΡΙΑΣ ΤΗΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ ΥΠΟ ΣΥΝΕΧΟΜΕΝΗ ΑΝΤΑΜΟΙΒΗ (RER) Η ΜΑΤΑΙΩΣΗ (DER).	73
6.1.1. Μέσο διάφραγμα (Medial Septum- MS)- Κάθετο σκέλος της διαγώνιας ταινίας του Broca (Vertical limb of the Diagonal band of Broca- VDB).	73
6.1.2. Οριζόντιο σκέλος της διαγώνιας ταινίας του Broca (Horizontal limb of the Diagonal band of Broca- HDB).	74
6.1.3. Πυρήνας του Meynert.	75
6.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ AChE ΣΤΗΝ ΕΝΗΛΙΚΟ ΖΩΗ, ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΙΜΗΣ ΕΜΠΕΙΡΙΑΣ ΤΗΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ ΥΠΟ ΣΥΝΕΧΟΜΕΝΗ ΑΝΤΑΜΟΙΒΗ (RER) Η ΜΑΤΑΙΩΣΗ (DER).	76
6.2.1. CA1 περιοχή του υποκάμπου.	76

6.2.2.	CA2/CA3 περιοχή του υποκάμπου.....	77
6.2.3.	Προμετωπιαίος φλοιός.....	77
6.2.4.	Έξω Βασικός πυρήνας της αμυγδαλής.....	78
7.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	80
8.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	86
POSTERS.....		100
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΒΙΒΛΙΑ.....		100

Αντί προλόγου

Οι πρώιμες εμπειρίες είναι οι εμπειρίες που αποκτά ένα άτομο στην νεαρή του ηλικία, δηλαδή σε νεογνικό στάδιο, αρκετά πριν μπει στο στάδιο της εφηβείας. Οι πρώιμες εμπειρίες φαίνεται να είναι καθοριστικές για την μετέπειτα εξέλιξη του οργανισμού, επηρεάζοντας τη συμπεριφορά του, ακόμα και σε επιγενετικό επίπεδο. Έτσι η μελέτη των επιπτώσεών τους χρήζει ενδιαφέροντος, καθώς μπορεί να μας βοηθήσει να κατανοήσουμε πώς το περιβάλλον του εκάστοτε ατόμου επιδρά και καθορίζει, τουλάχιστον εν μέρη, την εξέλιξη του ατόμου.

Η παρούσα διατριβή μεταπτυχιακού διπλώματος εξειδίκευσης σκιαγραφούσε τη μελέτη της επίδρασης μιας πρώιμης εμπειρίας ανταμοιβής ή παρεμπόδισης της λήψης αυτής στο χολινεργικό σύστημα του επίμυ και πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιολογίας και Βιοχημείας του τμήματος Νοσηλευτικής ΕΚΠΑ, το οποίο διευθύνει η καθηγήτρια κα. **Στυλιανοπούλου Φωτεινή**.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Πρόεδρο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών μου «Μοριακή και Εφαρμοσμένη Φυσιολογία» και επιβλέποντα Καθηγητή μου κ. **Κουτσιλιέρη Μιχαήλ**, ο οποίος δέχτηκε με ιδιαίτερη χαρά να με κατευθύνει στον τομέα των Νευροεπιστημών και να αποτελέσει τον επιβλέποντα της παρούσας εργασίας. Μέσα από τις διαλέξεις του συγκεκριμένου μεταπτυχιακού, και ιδιαίτερα των ερευνητών που ήταν προσκεκλημένοι από το εξωτερικό (κ. Λογοθέτη Διομήδη και κ. Μεντή Γεώργιου), κινήθηκε το ενδιαφέρον μου και ο καθηγητής κ. Κουτσιλιέρης ήταν εκεί για να με κατατοπίσει. Τον ευχαριστώ επίσης γιατί ήταν εκεί ακόμα και στις δύσκολες στιγμές για να με υποστηρίξει και να μου δείξει πως ο δρόμος για την επιτυχία είναι γεμάτος εμπόδια. Ευχαριστώ, επίσης, τον κ. **Βαϊόπουλο Γεώργιο** που δέχτηκε πρόθυμα να αποτελέσει μέλος της τριμελούς μου επιτροπής, καθώς και για την αρωγή του στην προσπάθειά μου καθόλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω εκ βάθων καρδιάς τον επίκουρο καθηγητή κ. **Σταματάκη Αντώνιο**, ο οποίος μαζί με την καθηγήτρια κα. Στυλιανοπούλου, με δέχθηκαν με ιδιαίτερη χαρά στο εργαστήριο και άνοιξαν τους ορίζοντές μου στον τομέα των Νευροεπιστημών. Ήταν τιμή μου να γνωρίσω δύο εξαιρετικούς Νευροεπιστήμονες, με αξιοζήλευτους αποκεκτημένους τίτλους και βραβεία. Με τον κ. Σταματάκη, ο οποίος αποτελεί και μέλος της τριμελούς επιτροπής της παρούσας εργασίας, συνεργάστηκα άφρογα, με βοήθησε καθόλη τη διάρκεια των πειραμάτων μου και αποτέλεσε κατευθυντήριο δύναμη για την μετέπειτα πορεία των σπουδών μου. Τους ευχαριστώ και τους δύο γιατί με εμπιστεύθηκαν για την εκπλήρωση της συγκεκριμένης διατριβής στο πιο ενδιαφέρον ερευνητικό αντικείμενο κατ' εμέ και μου έδειξαν πως με τον κατάλληλο τρόπο και με υπομονή όλα είναι εφικτά. Επίσης, καθόλη την παραμονή μου στο εργαστήριο συμμετείχα στην επίβλεψη εξετάσεων προπτυχιακών φοιτητών καθώς και σε άλλες δραστηριότητες, που με ενέπνευσαν για τη μελλοντική μου συνέχεια στην έρευνα. Το ταξίδι μου στον κόσμο του εγκεφάλου δε σταματά εδώ και οφείλω να αναφέρω ότι οι ίδιοι αποτέλεσαν επιπρόσθετο κίνητρο για την απόφασή μου αυτή. Η παρούσα διπλωματική μεταπτυχιακού διπλώματος εξειδίκευσης αποτελεί το πέρας των σπουδών μου στην Ελλάδα και είμαι βέβαιος ότι δεν θα μπορούσε να κλείσει καλύτερα ο κύκλος αυτός.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου Βιολογίας και Βιολογικής Χημείας για τη συνεργασία μας. Πιο συγκεκριμένα, τον υποψήφιο διδάκτορα κ. **Μανάντο**

Βασίλειο, που με εισήγαγε στο εργαστήριο και βοήθησε στην επιτυχή περάτωση των πειραμάτων μου, καθώς και την υποψήφια διδάκτορα κα. **Καλπαχίδου Θεοδώρα**, που εκτός των τεχνικών κομματιών, στα οποία με βοήθησε όποτε τη χρειάστηκα, μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ και με επιπρόσθετα πειράματα της διατριβής της.

Θα ήταν παράλειψή μου να μην ευχαριστήσω την αναπληρώτρια καθηγήτρια, που με έφερε για πρώτη φορά σε επαφή με την ιστολογία και την ανοσοϊστοχημεία σε ανθρώπινο υλικό εγκεφάλου, κα. **Παναγιωτακοπούλου Μαρία**, στο εργαστήριο της οποίας πραγματοποιήσα εθελοντικά πρακτική εξάσκηση τύπου rotation το τρίμηνο Νοεμβρίου 2013-Ιανουαρίου 2014. Επίσης, ευχαριστώ την κάτοχο διδακτορικού διπλώματος του εργαστηρίου **Dr. Παγίδα Μαριάννα** για την άριστη συνεργασία μας και τις συμβουλές της καθόλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών μου.

Επιπροσθέτως, ευχαριστώ την καθηγήτρια και διευθύντρια του εργαστηρίου Πειραματικής Χειρουργικής και Χειρουργικής Ερεύνης Ν.Σ. Χρηστέας της Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ, κα. **Περρέα Ζέσποινα**, με την οποία είχα την ιδιαίτερη χαρά και τιμή να συνεργαστώ.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου, ανάμεσα στους οποίους και τις κα. **Τσίγκα Ελεούσα-Αλεξάνδρα**, κα. **Κοκκίνου Βασιλική**, κα. **Ζαφειροπούλου Ευθαλεία** και κα. **Ιορδανίδη Ελένη**, για την συμπαράστασή τους σε όλη τη διάρκεια των φοιτητικών μου χρόνων και κυρίως την οικογένειά μου, η οποία ακόμη και σε δύσκολες στιγμές, στήριξε και στηρίζει τις επιλογές μου.

Σας ευχαριστώ..

Ιωάννης Μπακογιάννης

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2015

Συντομογραφίες

5-HT= 5-υδροξυ-τρυπτοφάνη, σεροτονίνη
ABN= Θηλασμός με «αψιδωτή» ράχη
ACh= Ακετυλοχολίνη
AChE= Ακετυλοχολινεστεράση
ACTH= Φλοιοτρόπος ορμόνη
BDNF= Νευρικός παράγοντας που προέρχεται από τον εγκέφαλο
BFCs= Βασικό πρόσθιο χολινεργικό σύστημα του εγκεφάλου
BLA= Έξω βασικός αμυγδαλικός πυρήνας
ChAT= Χολινοακετυλοτρανσφεράση
CRH= Εκλυτικός παράγοντας της φλοιοτρόπου ορμόνης
CTR= Μάρτυρες
D1= Ντοπαμινεργικοί υποδοχείς τύπου 1
DA= Ντοπαμίνη
DAG= Διακυλογλυκερόλη
DER= Ζώα που έχουν υποστεί παρεμπόδιση της λήψης ανταμοιβής στην νεογνική ηλικία
FC= Fear Conditioning test
FST= Forced Swimming Test
GRs= Υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών
HDB= Οριζόντιο σκέλος της διαγώνιας ταινίας του Broca
IP₃= Τριφωσφορικής ινοσιτόλης
LG= Μητρικό γλείψιμο/περιποίηση
LHX7= Μεταγραφικός παράγοντας ομοιοακολουθίας LIM
MS= Μέσο διάφραγμα
MWM= Morris Water Maze test
NGF= Νευρικός αυξητικός παράγοντας
NMDA= N-methyl-D-aspartate
NT-3= Νευροτροφίνη-3
PFC= Προμετωπιαίος φλοιός
PLC= Φωσφολιπάση C
PND= Μεταγεννητική ημέρα
RER= Ζώα που έχουν υποστεί λήψη ανταμοιβής στην νεογνική ηλικία
VDB= Κάθετο σκέλος της διαγώνιας ταινίας του Broca
ΚΝΣ= Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
M₁₋₅= Μουσκαρινικοί υποδοχείς 1-5
NA= Νόσος Alzheimer
NBM= Βασικός μεγαλοκυτταρικός πυρήνας (του Meynert)
ΝΣ= Νευρικό Σύστημα
ΠΝΣ= Περιφερικό Νευρικό Σύστημα
ΥΥΕ άξονας= Υποθαλαμο-υποφυσο-επινεφριδιακός άξονας

Περίληψη

Το αναπτυξιακό στάδιο είναι πολύ καθοριστικό για τον κάθε οργανισμό, ιδιαίτερα για την μετέπειτα πορεία του και την επιβίωσή του. Το νευρικό σύστημα είναι εκείνο που περισσότερο από όλα απαιτεί την εμπειρία, αφού χαρακτηρίζεται από έντονη πλαστικότητα ακόμη και κατά την ενήλικη ζωή. Πιο συγκεκριμένα, οι πρώιμες εμπειρίες, δηλαδή οι εμπειρίες κατά τα πρώτα στάδια της μεταγεννητικής ζωής, έχουν μεγάλη αξία για τη διαμόρφωση της συμπεριφοράς του ατόμου, ιδιαίτερα μάλιστα αυτές που προέρχονται από το οικογενειακό περιβάλλον (σχέση γονέων- απογόνου, ειδικά της μητέρας). Πιστεύεται μάλιστα ότι οι εμπειρίες αυτές μπορούν να αποτελέσουν παράγοντα προδιάθεσης για ψυχωτικές ή άλλου τύπου ασθένειες, επιδρώντας στην προσαρμοστικότητα του ατόμου.

Λαμβάνοντας υπόψη τα ανωτέρω, χρήζουν μελέτης οι μηχανισμοί, μέσω των οποίων οι πρώιμες εμπειρίες μπορούν να επηρεάζουν τη συμπεριφορά του ατόμου ειδικά σε λειτουργίες όπως η προσοχή, η μάθηση και η μνήμη. Στις λειτουργίες αυτές παίζουν λειτουργικό ρόλο περιοχές όπως ο προμετωπιαίος φλοιός, ο ιππόκαμπος και η αμυγδαλή. Πιο συγκεκριμένα, το χολινεργικό σύστημα του εγκεφάλου ασκεί τη δράση του μέσω των επιμέρους πυρήνων που το απαρτίζουν, όπως το μέσο διάφραγμα, η διαγώνια ταινία του Broca και ο βασικός μεγαλοκυτταρικός πυρήνας, περιοχές που διασυνδέονται με τον ιππόκαμπο, τον οσφρητικό βολβό, το νεοφλοιό και την αμυγδαλή. Κυρίαρχο ρόλο στις λειτουργίες του χολινεργικού συστήματος παίζουν τα ένζυμα σύνθεσης και καταβολισμού της ακετυλοχολίνης, δηλαδή η χολινοακετυλοτρανσφεράση (ChAT) και η ακετυλοχολινεστεράση (AChE), αντιστοίχως.

Στο εργαστήριο Βιολογίας/Βιοχημείας του ΕΚΠΑ αναπτύχθηκε η δοκιμασία λαβυρίνθου σχήματος «Ταυ» κατά τη νεογνική ζωή, η οποία φαίνεται να επηρεάζει τις γνωστικές λειτουργίες των επίμυων. Συγκεκριμένα, η δοκιμασία αυτή φαίνεται να επιδρά ως ένα γεγονός ήπιας συναισθηματικής φόρτισης και να επηρεάζει διάφορα νευροδιαβιβαστικά συστήματα του εγκεφάλου. Στο πλαίσιο αυτό, για να δούμε αν η δοκιμασία στο λαβύρινθο επηρεάζει και άλλα νευροδιαβιβαστικά συστήματα του εγκεφάλου που συμμετέχουν ενεργά σε γνωστικές λειτουργίες, όπως η προσοχή, η μνήμη και η μάθηση, εξετάσαμε το χολινεργικό σύστημα του βασικού πρόσθιου εγκεφάλου. Έτσι λοιπόν, στόχος της παρούσας διατριβής μεταπτυχιακού διπλώματος εξειδίκευσης ήταν η εξέταση της επίδρασης της δοκιμασίας λαβυρίνθου σχήματος T, μιας πρώιμης εμπειρίας ανταμοιβής (reward-RER ζώα) ή παρεμπόδισης λήψης ανταμοιβής (denial- DER ζώα), στο χολινεργικό σύστημα του επίμου. Για το σκοπό αυτό εξετάστηκε η λειτουργία των ενζύμων σύνθεσης και αποικοδόμησης του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη (χολινοακετυλοτρανσφεράση- ChAT και ακετυλοχολινεστεράση- AChE). Η ChAT εξετάστηκε στις περιοχές του διαφράγματος, της διαγώνιας ταινίας του Broca και

στο βασικό μεγαλοκυτταρικό πυρήνα, ενώ η AChE στις περιοχές του ιπποκάμπου, την αμυγδαλή και στον προμετωπιαίο φλοιό.

Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι στο σύμπλεγμα «Μέσο διάφραγμα (Medial Septum- MS)- Κάθετο σκέλος της διαγώνιας ταινίας του Broca (Vertical limb of the Diagonal band of Broca- VDB)» υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά τόσο μεταξύ της ομάδας DER και των μαρτύρων όσο και μεταξύ της ομάδας DER και της ομάδας RER σε ότι αφορά τον αριθμό των ανοσοθετικών κυττάρων για το ένζυμο ChAT. Συγκεκριμένα, η ομάδα DER εμφάνισε μειωμένο αριθμό κυττάρων σε σχέση με τις ομάδες CTR (μάρτυρες) και RER. Ανάλογα ήταν τα αποτελέσματα και για την περιοχή του οριζώντιου σκέλους της διαγώνιας ταινίας του Broca (HDB), ωστόσο για τον βασικό πυρήνα του Meynert δεν ανιχνεύθηκε ανάλογη διαφορά μεταξύ των τριών ομάδων. Τα ανωτέρω αποτελέσματα υποδεικνύουν μια χαμηλότερη δραστηριότητα του χολινεργικού συστήματος του βασικού πρόσθιου εγκεφάλου στα πειραματόζωα που έχουν υποβληθεί στην DER πρώιμη εμπειρία, σε σύγκριση με την ομάδα RER και την ομάδα των μαρτύρων.

Αναφορικά με την ιστοχημική μέθοδο για τον προσδιορισμό της ενεργότητας του ενζύμου AChE, παρατηρήθηκε ότι στις περιοχές CA1, CA2/CA3 του ιπποκάμπου καθώς και στον προμετωπιαίο φλοιό δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών ομάδων. Σε αντίθεση με τα στατιστικώς μη σημαντικά αποτελέσματα των ανωτέρω εγκεφαλικών περιοχών, ανιχνεύθηκε μείωση της δραστηριότητας του εν λόγω ενζύμου (AChE) στον έξω βασικό αμυγδαλικό πυρήνα (BLA) στην ομάδα DER, σε σύγκριση τόσο με την ομάδα RER όσο και με την ομάδα των μαρτύρων. Η μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου AChE στον BLA πυρήνα της ομάδας DER, και συνεπώς τα αυξημένα επίπεδα ακετυλοχολίνης λόγω παρεμπόδισης του καταβολικού της ενζύμου, μπορεί να εμπλέκεται στους βιοχημικούς μηχανισμούς που τροποποιούν την εκδήλωση άγχους στα ζώα αυτά. Τα ζώα DER έχει παρατηρηθεί ότι παρουσιάζουν ενισχυμένη μνήμη κατά τη δοκιμασία του υδάτινου λαβύρινθου κατά Morris, γεγονός που θα μπορούσε εν μέρει να αποδοθεί στον τροποποιητικό ρόλο που ασκεί η αμυγδαλή πάνω στην αποθήκευση πληροφοριών από τον ιππόκαμπο.

Συνεπώς, τα δεδομένα της παρούσας έρευνας υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η εκπαίδευση κατά την νεογνική ηλικία υπό συνθήκες άρνησης ή λήψης της αναμενόμενης επαφής με τη μητέρα, στον λαβύρινθο T, οδηγεί σε μακροχρόνιες αλλαγές στο μεταιχμιακό σύστημα του εγκεφάλου και πιο συγκεκριμένα στο βασικό πρόσθιο χολινεργικό σύστημα αυτού. Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν περαιτέρω την πρόταση ότι οι πρώιμες εμπειρίες, μπορεί να επιδρούν και να τροποποιούν μόνιμα τον εγκέφαλο του ατόμου, προκαλώντας μεταβολές στην συμπεριφορά ακόμη και κατά την ενήλικη ζωή.

Abstract

Pre- and post-natal development is decisive for each organism, especially for its future and survival. The nervous system is profoundly affected by experience, since it is characterized by intense neuronal plasticity, even in the adult life. Early life experiences, are of vital importance for the deploy of human behavior, especially those which derive from family (interaction between ancestors and descendants, most importantly the mother-infant relationship). Indeed, these experiences may be a crucial factor for the emergence of psychiatric disorders, modifying human behavioral adaptability.

Considering the above statements, the mechanisms through which the early experiences are affecting behavior, including attention, learning and memory, are worth of exploring. Brain regions, including the prefrontal cortex, hippocampus and amygdala, play a key role in such functions. Specifically, the cholinergic system of these areas affects a variety of behaviors. The cholinergic system of the brain is composed of areas such as the medial septum, diagonal band of Broca and nucleus basalis of Meynert. These regions are connected with the hippocampus, olfactory bulb, neocortex and amygdala. The synthesizing and degrading enzymes of acetylcholine, Choline-Acetyl-Transferase (ChAT) and Acetyl-Cholinesterase (AChE), respectively, have a major role in cholinergic functions in the brain.

In the Biology/Biochemistry lab, a novel early life experience model has been developed, that of neonatal T-maze learning. In this model rat pups learn a T-maze during postnatal days 10-13 and either receive the expected reward without maternal contact (RER group) or are denied this reward (DER group). The DER experience is considered of mild adversity and it has been shown to affect adult brain function and behavior. We studied the basal forebrain cholinergic system (BFCS) in adult male rats, in order to test whether the T-maze learning experience affects the cholinergic system, which participates in cognitive functions, including attention, learning and memory. More specifically, we determined immunohistochemically the levels of ChAT in the medial septum (MS), diagonal band of Broca (vertical and horizontal limbs- VDB, HDB respectively) and nucleus basalis of Meynert (NBS). Moreover, we determined histochemically AChE activity in hippocampal areas, the amygdala and the prefrontal cortex.

Our results showed that there was a statistically significant difference between DER and controls and between DER and RER animals for the number of ChAT positive cells, at the complex of MS-VDB and HDB. DER animals appeared to have less ChAT positive cells than the other two groups. The above results suggest a lower activity of the BFCS in DER animals, in comparison to both RER and control adult male rats.

Regarding the AChE activity, we did not detect any statistically significant difference in CA1, CA2/3 of the hippocampus or the prefrontal cortex. On the other hand AChE activity appeared to be reduced at the basolateral nucleus of amygdala (BLA) of the DER group, in comparison to both RER and control groups. This decrease of AChE activity at the BLA nucleus of the DER group, and consequently the presumed increase of acetylcholine levels, due to the reduced activity of its catabolic enzyme, could be involved in the biochemical mechanisms that modulate stress behavior in these animals. DER animals appear to have an enhanced memory, during the Morris water maze test, which may be correlated to the modulatory effect of amygdala on hippocampal information storage.

The findings of the present study support the hypothesis that training in a T-maze task at the neonatal period under denial or receipt of expected reward through maternal contact leads to long-term changes in the mesolimbic circuit of the brain, especially in the BFCS. These findings support the proposal that early experiences may act and modulate permanently the brain, resulting in behavioral changes even in adult life.



Γενικό μέρος

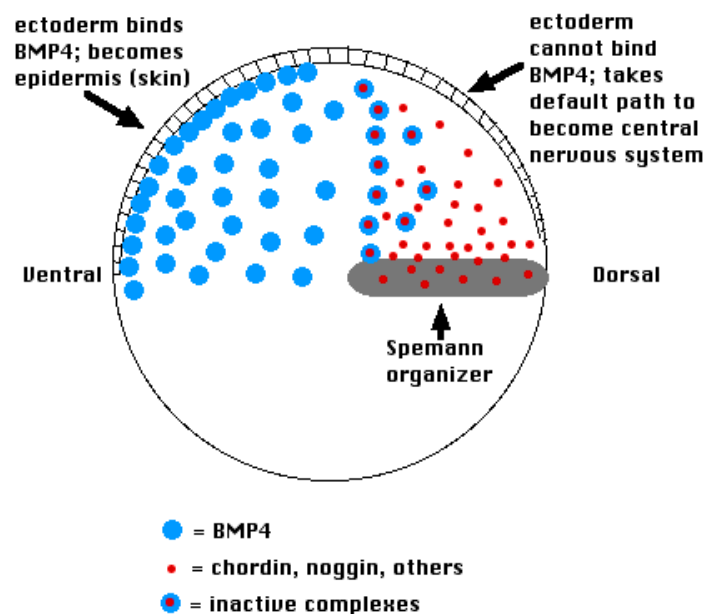
Κεφάλαια 1-3

Εισαγωγή

1. Συνοπτική νευροανατομία και ανάπτυξη του νευρικού συστήματος

1.1. Ανάπτυξη Νευρικού Συστήματος

Κατά τη φυσιολογική ανάπτυξη, στο στάδιο όπου εμφανίζονται οι τρεις βλαστικές στιβάδες (εξώδερμα, μεσόδερμα και ενδόδερμα), σχηματίζεται στη ραχιαία πλευρά του μεσοδέρματος, γύρω από τον ισημερινό του βλαστιδίου, μια περιοχή με κοιλιακά χαρακτηριστικά που ονομάζεται οργανωτής (ή οργανωτής του Spemann). Αυτό το κέντρο παίζει σπουδαίο ρόλο στην ανάπτυξη και δρα μέσω της έκκρισης παραγόντων που καταστέλλουν τη δράση των μορφογενετικών πρωτεϊνών των οστών (BMPs), όπως οι chordin, noggin και follistatin.

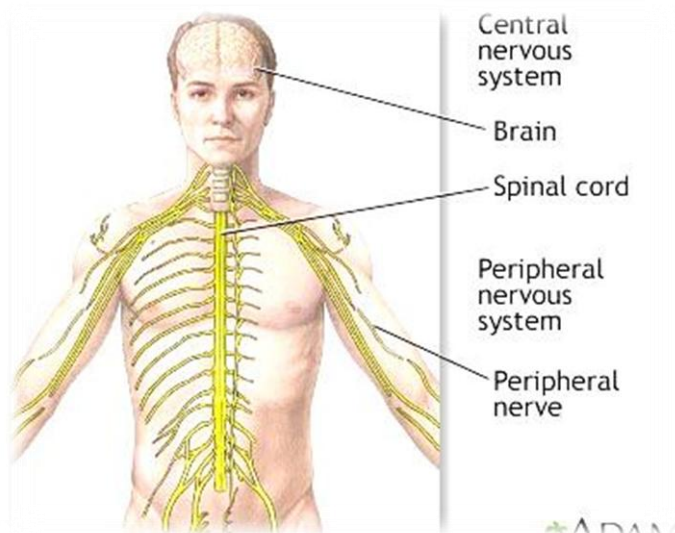


Εικόνα 1: Ο οργανωτής Spemann.

Πηγή: <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/S/Spemann.html>

Κατά τη γαστριδίωση συντελείται η επαγωγή του νευρικού ιστού. Όταν το εξώδερμα του γαστριδίου έρχεται σε επαφή με τον οργανωτή, τότε σχηματίζεται το νευροεπιθήλιο, που χαρακτηρίζεται από την έκφραση διάφορων πρωτεϊνών, όπως ο μεταγραφικός παράγοντας *sox2* και το μόριο κυτταρικής συνάφειας N-CAM. Το νευροεπιθήλιο παρουσιάζει εμπρόσθια εξειδίκευση. Στην ανάπτυξη των πρόσθιων δομών φαίνεται να παίζουν ρόλο μεταγραφικοί παράγοντες όπως το *Otx*, ενώ στον οπίσθιο αναπτυσσόμενο εγκέφαλο δρουν οι FGF παράγοντες, οι Wnt παράγοντες και το ρετινοϊκό οξύ, ενεργοποιώντας μεταγραφικούς *Cdx* παράγοντες, που επάγουν την έκφραση των *Hox* γονιδίων (γονίδια ομοιοπλασίου-ομοιωτικά).

Το Νευρικό Σύστημα διακρίνεται στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ), που περιλαμβάνει το νωτιαίο μυελό και τον εγκέφαλο και το Περιφερικό Νευρικό Σύστημα, που εκτός του Αυτόνομου Νευρικού Συστήματος (ΑΝΣ) περιλαμβάνει και τους ανεξάρτητους νευρώνες της περιφέρειας που οργανώνονται ή όχι σε περιφερικά νεύρα (κρανιακά και νωτιαία νεύρα). Τα κύρια τμήματα του εγκεφάλου αναπτύσσονται κατά την πρώιμη ανάπτυξη από το νευρικό σωλήνα.



Εικόνα 2: Η διάκριση του ΝΣ σε ΚΝΣ και ΠΝΣ.

Πηγή: http://www.healthcentral.com/ency/408/guides/000095_2.html

Το εμπρόσθιο τμήμα του πρόσθιου εγκεφάλου αναπτύσσεται στον τελεγκέφαλο, ο οποίος περιλαμβάνει τα εγκεφαλικά ημισφαίρια. Το ζεύγος των εγκεφαλικών ημισφαιρίων λαμβάνει μεγάλη έκταση στα ανώτερα σπονδυλωτά, όπου εμφανίζονται και οι πιο πολύπλοκες συμπεριφορές συνειρμού και ελέγχου. Στα θηλαστικά ο πολύστιβος αυτός φλοιός ονομάζεται νεοφλοιός.

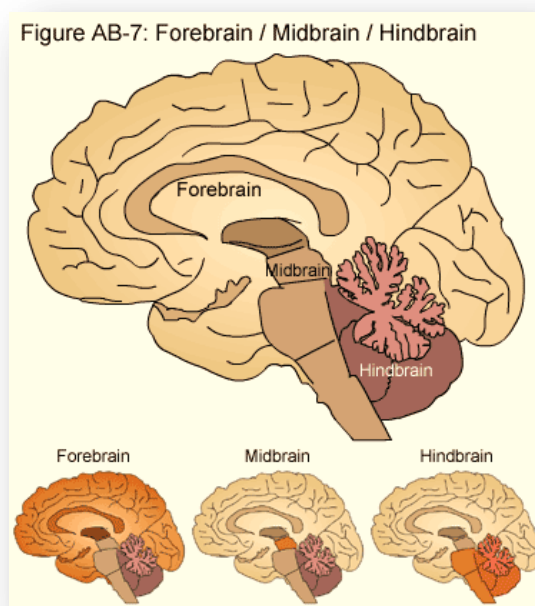
Το οπίσθιο τμήμα του πρόσθιου εγκεφάλου αναπτύσσεται στο διεγκέφαλο, από τον οποίο σχηματίζονται τα οφθαλμικά κυστίδια και στη συνέχεια τα οπτικά κύπελλα. Ο σωλήνας που οδηγεί από τον εγκέφαλο στο οπτικό κύπελλο φέρει το οπτικό νεύρο, του οποίου οι ίνες καταλήγουν στο μεσεγκέφαλο. Ο μεσεγκέφαλος αυξάνεται ραχιαία και σχηματίζει το ζεύγος των οπτικών λοβών, που αποτελούν τα πρώτα κέντρα της αισθητικής οπτικής πληροφορίας, ενώ σχηματίζει και τους ακουστικούς λοβούς. Από το διεγκέφαλο αναπτύσσονται επιπροσθέτως και ο θάλαμος, η επίφυση και η υπόφυση.

Στο εμπρόσθιο ραχιαίο τμήμα του οπίσθιου εγκεφάλου συναντάται η παρεγκεφαλίδα, η οποία έχει καίριο ρόλο στον έλεγχο των κινητικών λειτουργιών, ενώ οπισθίως αυτής βρίσκεται ο προμήκης μυελός, που φέρει πυρήνες των κρανιακών νεύρων. Ο πρώιμος εμβρυϊκός οπίσθιος εγκέφαλος αποτελείται από επτά ρομβομερή, το πρώτο εκ των οποίων θα σχηματίσει την παρεγκεφαλίδα.

Τέλος, οι εγκεφαλικές κοιλίες και ο κεντρικός αυλός του νωτιαίου μυελού προέρχονται από τον αρχικό αυλό του νευρικού σωλήνα (Slack, 2006, Vander et al, 2001).

1.2. Εγκέφαλος

Ο εγκέφαλος, το όργανο του σώματος που ελέγχει όλες τις κινήσεις, τις αισθήσεις αλλά και όλα τα υπόλοιπα όργανα, δύναται να διακριθεί σε: πρόσθιο εγκέφαλο, μέσο εγκέφαλο και οπίσθιο εγκέφαλο (ή ρομβεγκέφαλο), όπως στο παρακάτω σχήμα:



Εικόνα 3: Διάκριση του εγκεφάλου σε πρόσθιο, μέσο κι οπίσθιο εγκέφαλο. Πηγή:

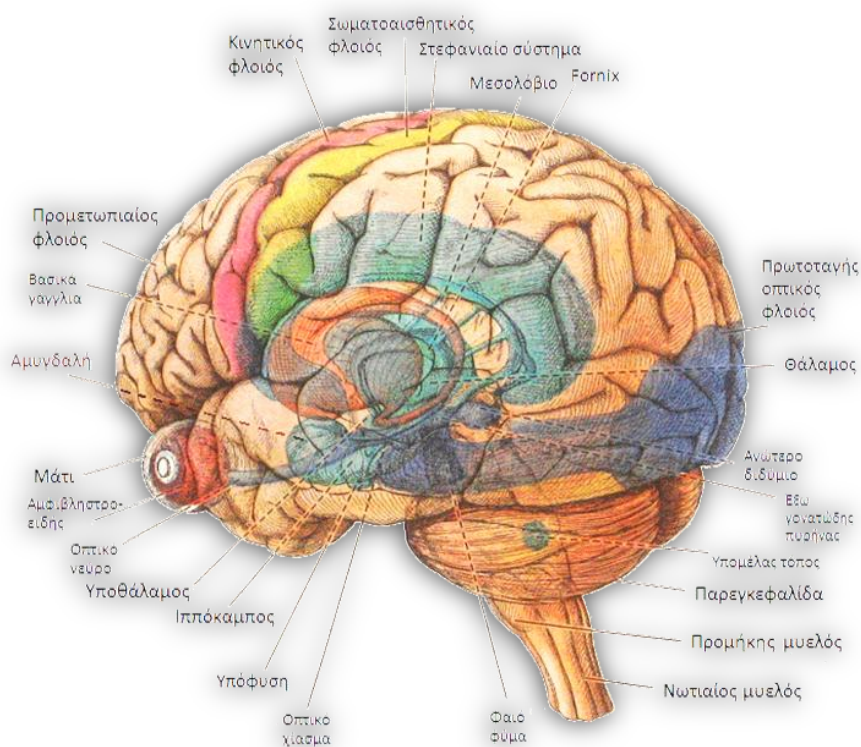
<http://www.stanford.edu/group/hopes/cqi-bin/wordpress/2010/06/the-hopes-brain-tutorial-text-version/>

Ο προμήκης μυελός, η γέφυρα και ο μέσος εγκέφαλος συναποτελούν μια συνεχή δομή, το εγκεφαλικό στέλεχος, που βρίσκεται ρυγχιαίως του νωτιαίου μυελού. Ο μέσος εγκέφαλος είναι το μικρότερο τμήμα του στελέχους και βρίσκεται ραχιαία της γέφυρας. Αρκετές περιοχές του παίζουν ρόλο στον άμεσο έλεγχο των οφθαλμικών κινήσεων, ενώ άλλες συμμετέχουν στον κινητικό έλεγχο των εκούσιων κινήσεων των μυών (σκελετικοί μύες). Σημαντικής σημασίας κρίνεται και η αξιοποίησή του ως σταθμός για την αναμετάδοση ακουστικών και οπτικών σημάτων.

Ο θάλαμος και ο υποθάλαμος σχηματίζουν ομού το διάμεσο εγκέφαλο ή διεγκέφαλο. Ο πρώτος επεξεργάζεται και διανέμει όλες σχεδόν τις αισθητικές

πληροφορίες που οδεύουν προς το φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων. Ο δεύτερος βρίσκεται κοιλιακά του θαλάμου και ρυθμίζει το αυτόνομο νευρικό σύστημα (ΑΝΣ) αλλά και το ενδοκρινικό σύστημα, μέσω προβολών προς την υπόφυση, τον υπεραδένα του σώματος που εκκρίνει διάφορες ορμόνες. Οι δύο αυτές δομές επικοινωνούν και μεταξύ τους.

Τα εγκεφαλικά ημισφαίρια είναι τα μεγαλύτερα σε μέγεθος σε σχέση με το συνολικό μέγεθος του εγκεφάλου και περιλαμβάνουν το φλοιό, την υποκείμενη λευκή ουσία (κυρίως εμμύελους νευράξονες και νευρογλοιακά κύτταρα) και τρεις εν τω βάθει ομάδες νευρώνων, που ονομάζονται πυρήνες. Αυτές είναι τα βασικά γάγγλια (παίζουν ρόλο στην κίνηση), ο υποκάμπειος σχηματισμός (παίζει ρόλο στη μνήμη) και η αμυγδαλή (παίζει ρόλο στις συναισθηματικές καταστάσεις, όπως λ.χ. του φόβου και του άγχους-stress). Παρ' όλο που κάθε ημισφαίριο (δεξιό, αριστερό) είναι υπεύθυνο για διαφορετικές λειτουργίες εν μέρει, και τα δύο μαζί σχετίζονται με αντιληπτικές, γνωστικές και ανώτερες κινητικές λειτουργίες αλλά και με το συναίσθημα και τη μνήμη (Kandel et al., 1999).

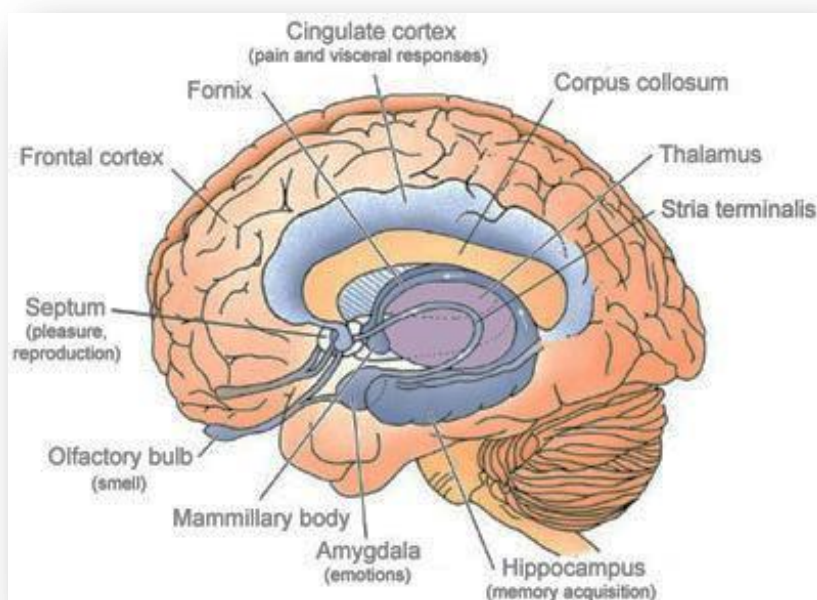


Εικόνα 4: Ο ανθρώπινος εγκέφαλος. Πηγή: http://www.foundalis.com/dep/cog/N4_gr.htm

1.3. Μεταιχμιακό σύστημα

Ο όρος μεταιχμιακό σύστημα ή στεφανιαίο σύστημα αφορά ένα πλήθος δομών που βρίσκονται στο όριο (μεταίχμιο) μεταξύ του εγκεφαλικού φλοιού και του υποθαλάμου. Ο όρος μεταιχμιακό χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον

Broca (1878), που περιέγραψε έναν λοβό, το μεταιχμιακό ή στεφανιαίο ή πέμπτο λοβό, στην έσω επιφάνεια των εγκεφαλικών ημισφαιρίων και ο οποίος περιβάλλει το μεσολόβιο και το ρυγχαίο εγκεφαλικό στέλεχος. Οι μετέπειτα συμβολές των Papez (1937) και MacLean (1955, 1990) υπήρξαν καίριες για την οριοθέτηση του μεταιχμιακού συστήματος. Έτσι, οι δομές που περιλαμβάνονται είναι ο υποκάμποιος σχηματισμός, τα μαστία, η αμυγδαλή, το διάφραγμα, η έλικα του προσαγωγίου, η παραϊποκάμπεια έλικα καθώς και οι πρόσθιοι θαλαμικοί πυρήνες. Οι δομές αυτές συνδέονται με δεσμίδες ινών νευρικών κυττάρων (λευκή ουσία), όπως η τελική ταινία, τα μαστία, η μαστιοθαλαμική δεσμίδα και η έσω τηλεγκεφαλική δεσμίδα (Παναγής, 2010).



Εικόνα 5: Το μεταιχμιακό σύστημα του εγκεφάλου

Πηγή: http://www.daviddarling.info/encyclopedia/L/limbic_system.html

1.3.1. Διάφραγμα

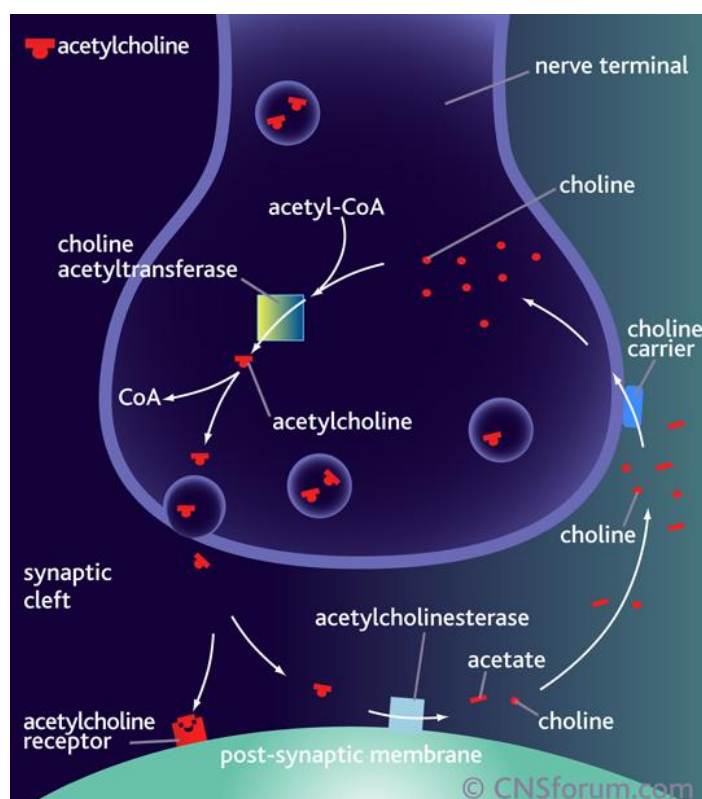
Το διάφραγμα είναι ένα σύμπλεγμα πυρήνων, που διαχωρίζει τις δύο πλάγιες κοιλίες μεταξύ τους (την αριστερή από τη δεξιά). Οι πυρήνες αυτοί βρίσκονται υπό του μεσολοβίου, ακριβώς μπροστά από τον πρόσθιο σύνδεσμο και είναι ο έσω διαφραγματικός πυρήνας, ο έξω διαφραγματικός πυρήνας και ο πυρήνας της διαγώνιας ταινίας του Broca. Στο εξωτερικό τμήμα αυτών των πυρήνων οριοθετείται ο επικληνής πυρήνας του διαφράγματος, ο οποίος θεωρείται τμήμα των βασικών γαγγλίων. Οι πυρήνες του διαφράγματος δέχονται πλούσια χολινεργική εννεύρωση και συμμετέχουν στη μνήμη και την ανταμοιβή. Μάλιστα,

παρατηρείται εκφυλισμός σε αυτούς σε ασθενείς με νόσο Alzheimer (Παναγής, 2010).

2. Χολινεργικό Σύστημα

2.1. Ακετυλοχολίνη- Φαρμακολογικά στοιχεία

Η ακετυλοχολίνη (Acetylcholine- ACh) είναι εκείνο το νευροδιαβιβαστικό μόριο που ανακαλύφθηκε πρώτο, για αυτό και έχει μελετηθεί περισσότερο. Ο Dale (1914) παρατήρησε ότι η δράση της ACh μιμόταν τον ερεθισμό παρασυμπαθητικών νευρώνων, ενώ αργότερα η ίδια πειραματική ομάδα έδειξε ότι η ACh συναντάται στις νευρομυικές συνδέσεις των σκελετικών μυών (Dale 1914, Dale et al., 1936). Συγκατατάσσεται στις αμίνες και μάλιστα στις τεταρτοταγείς, ενώ συντίθενται από χολίνη και ακετυλο-συνένζυμο-A (ακετυλο-CoA) με μια αντίδραση που έχει ως καταλύτη το ένζυμο χολινο-ακετυλο-τρανσφεράση (Choline Acetyl Transferase- ChAT).



Εικόνα 6: Τυπικός προσυναπτικός χολινεργικός νευρώνας. Πηγή:

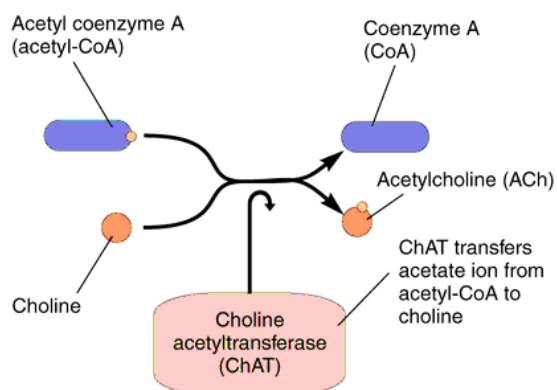
http://www.cnsforum.com/educationalresources/imagebank/dementia_cholinergic/rcpt_sys_ach_acetransf_ad

Η **χολινοακετυλοτρανσφεράση** συντίθεται στο κυτταρικό σώμα και μεταφέρεται στις νευρικές απολήξεις, όπου εντοπίζεται σε δύο μορφές: α) τη διαλυτή μορφή (80-90% της ολικής ενεργότητας) και β) μορφές συνδεδεμένες με τη

μεμβράνη (10-20%) (Pahud, Salem et al. 1998, Oda 1999). Είναι μια σφαιρική πρωτεΐνη μονής αλυσίδας μοριακού βάρους 69 KDa ή 82KDa (Resendes, Dobransky et al. 1999, Gill, Ishak et al. 2007). Η ενεργότητα και η έκφρασή της είναι οι πλέον ειδικοί δείκτες καταγραφής της λειτουργικής κατάστασης των χολινεργικών νευρώνων και μπορούν να τροποποιηθούν από μια ποικιλία εξωκυττάρων σημάτων , όπως αυξητικούς παράγοντες και φαρμακολογικές ουσίες (Berse and Blusztajn 1995, Berse, Lopez-Coviella et al. 1999, Berse, Szczecinska et al. 2005). Σε ποικίλα συστήματα παράγοντες διαφοροποίησης, όπως η δεξαμεθαζόνη και τα ρετινοειδή ή χημικές ουσίες που αυξάνουν τα επίπεδα του κυκλικού AMP (cAMP) έχουν χρησιμοποιηθεί για να αυξήσουν τα επίπεδα της χολινοακετυλοτρανσφεράσης (Wu and Hersh 1994, Dolezal, Castell et al. 2001). Η ChAT φαίνεται να κατέχει σπουδαίο ρόλο και στην ενήλικη νευρογένεση της υποκοιλιακής πειοχής (subventricular zone –SVZ), αφού σύμφωνα με πρόσφατες πειραματικές μελέτες ChAT(+) κύτταρα απαιτούνται για την νευρωνική διαφοροποίηση και την παραγωγή νευροβλαστών (Paez-Gonzalez, Asrican et al. 2014).

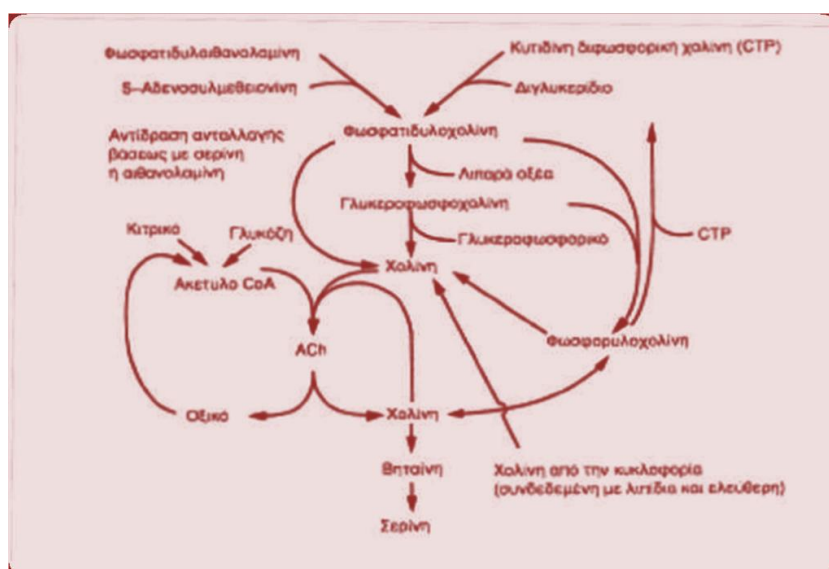
Η **χολίνη** προσλαμβάνεται από την τροφή (λαχανικά, όσπρια, συκώτι, κρόκος του αυγού) και μέσω της κυκλοφορίας του καρδιαγγειακού συστήματος, καταφθάνει στα νευρικά κύτταρα από τα οποία προσλαμβάνεται μέσω υψηλής συγγένειας για χολίνη, Na^+ -εξαρτώμενους μεταφορείς (Okuda, Haga et al. 2000). Είναι δυνατό να συντεθεί κι από τον ίδιο τον οργανισμό, στο ήπαρ. Σημαντικό μέρος της χολίνης που χρησιμοποιείται για την παρασκευή της ακετυλοχολίνης προέρχεται επίσης από τη διάσπαση του μορίου στη συναπτική σχισμή από ένα ένζυμο που καλείται **ακετυλοχολινεστεράση** (AChE). Η ποσότητα της χολίνης που διατίθεται στα νευρικά κύτταρα καθορίζει τη σύνθεση της ACh. Η σύνθεση αυτή πραγματοποιείται στις απολήξεις του νευράξονα ή στο κυτταρικό σώμα του νευρώνα, απ' όπου μεταφέρεται με γρήγορη (ορθόδρομη) νευραξονική μεταφορά στην περιφέρεια του κυττάρου (απόληξη).

► Biosynthesis of Acetylcholine



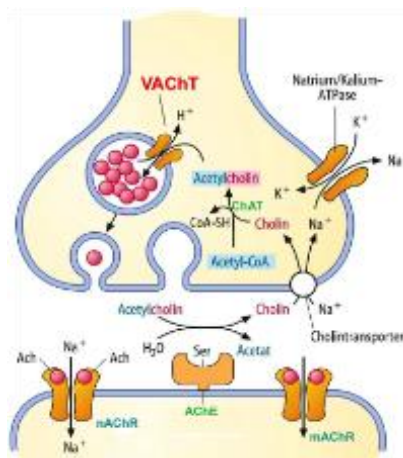
Εικόνα 7: Η αντίδραση σύνθεσης ακετυλοχολίνης από ακετυλο-CoA και χολίνη. Πηγή: <https://sites.google.com/site/psychopharmacology2010/student-wiki-for-quiz-7>

Όσον αφορά την προέλευση του **ακετυλο-CoA**, αυτό παράγεται από γλυκόζη (μέσω γλυκόλυσης), κιτρικό οξύ και οξικό οξύ. Η σύνθεση λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια. Αντίθετα, η σύνθεση της ACh συμβαίνει στο κυτταρόπλασμα. Έτσι, φαίνεται ότι το ακετυλο-CoA μάλλον μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα με κάποιο φορέα, π.χ. το κιτρικό οξύ, που παράγει ακετυλο-CoA με την αντίδραση της κιτρικής λυάσης ή με την ακετυλο-καρνιτίνη.



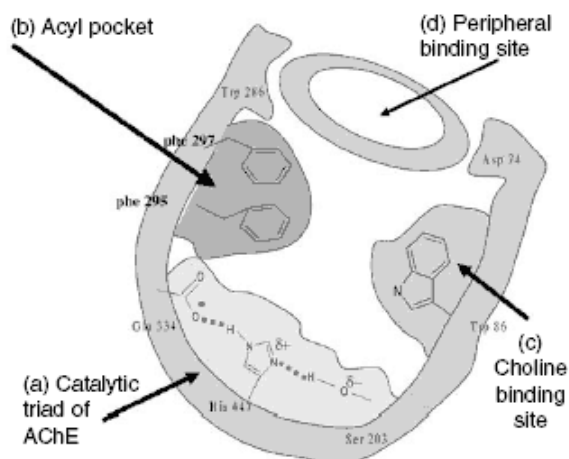
Εικόνα 8: Μεταβολισμός της ακετυλοχολίνης. Πηγή: μετεφρασμένη εικόνα από http://journals.prous.com/journals/servlet/xmlsl/pk_journals.xml_summary_pr?p_JournalId=6&p_Reflid=829&p_IsPs=Y

Μετά τη σύνθεσή της ένας **κυστιδιακός μεταφορέας** φορτώνει περίπου 10.000 μόρια ACh σε κάθε χολινεργικό κυστίδιο. Ο κυστιδιακός αυτός μεταφορέας (vAChT) είναι μια μεμβρανική πρωτεΐνη, που χρησιμοποιεί την ηλεκτροχημική βαθμίδωση που δημιουργείται από μια ATPάση για την ανταλλαγή 2 πρωτονίων με ένα μόριο ακετυλοχολίνης (Nguyen, Cox et al. 1998, Schafer, Eiden et al. 1998). Στη συνέχεια, μετά την έλευση ενός δυναμικού ενεργείας η ακετυλοχολίνη απελευθερώνεται στη συναπτική σχισμή. Τα γονίδια που κωδικοποιούν την ChAT και τον vAChT εντοπίζονται στον επονομαζόμενο «χολινεργικό γενετικό τόπο». Πιο συγκεκριμένα, το γονίδιο που κωδικοποιεί το μεταφορέα της ακετυλοχολίνης εντοπίζεται στο πρώτο ιντρόνιο του γονιδίου που κωδικοποιείται για την χολινοακετυλοτρανσφεράση (Erickson, Varoqui et al. 1994, Eiden 1998).



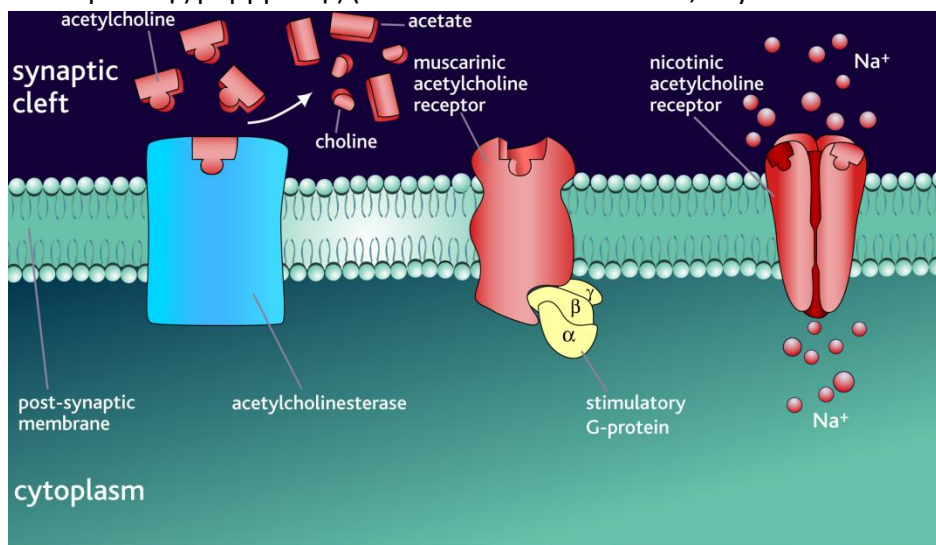
Εικόνα 9: Ο κυστιδιακός μεταφορέας της ACh. Πηγή: <https://www.hzdr.de/db/Cms?pNid=2592>

Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, η **AChE** είναι το ένζυμο που μεταβολίζει την ACh με πολύ μεγάλη καταλυτική ενεργότητα (~5.000 μόρια ACh/μόριο AChE/sec). Συναντάται τόσο στο ΠΝΣ (κυρίως στο αίμα) όσο και στο ΚΝΣ (στις νευρικές συνάψεις) με δύο τύπους μοριακών μορφών (ισομορφών): σφαιρικές (ή συμμετρικές) και ασύμμετρες. Οι πρώτες συναντώνται με τη μορφή μονομερών, διμερών και τετραμερών (G1, G2 και G4 αντίστοιχα) ενώ, αντιθέτως, οι δεύτερες δύναται να περιλαμβάνουν ως και 12 υπομονάδες και να συνδέονται με μια ουρά κολλαγόνου.



Εικόνα 10: Δομή AChE. Διακρίνονται η καταλυτική υπομονάδα (a), το κέντρο ακυλίωσης (b), η θέση πρόσδεσης της χολίνης (c) κι η περιφερική θέση πρόσδεσης (d). Πηγή: <http://www.mindfully.org/Pesticide/2003/Organophosphorus-Neurotoxicity1aug03.htm>

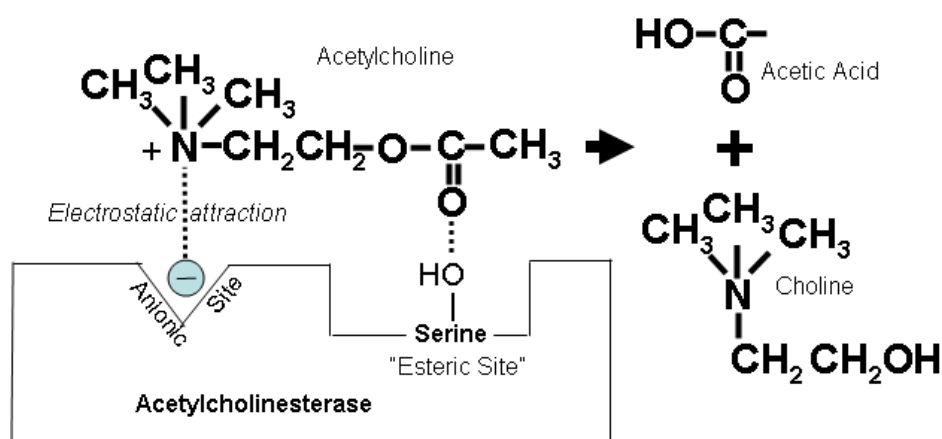
Οι σφαιρικές ισομορφές δεν είναι τυχαία κατανεμημένες στο νευρώνα. Συγκεκριμένα, η G1 ισομορφή είναι κυτταροπλασματική, ενώ η G4, σύμφωνα με τους Heller & Hanahan, 1972 και με τους Taylor & Radic, 1994, βρίσκεται δεσμευμένη με τα γλυκοφωσfolιπίδια ή με αμινοξικές υδρόφοβες αλληλουχίες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (Heller and Hanahan 1972, Taylor and Radic 1994).



Εικόνα 11: Η ACh στη συναπτική σχισμή. Πηγή: <http://possibilistic.org/presentation/alzheimers-cell-phys/>

Μια άλλη σημαντική μελέτη έδειξε ότι τα κλάσματα της AChE που είναι διαλυτά σε απορρυπαντικό (Detergent Soluble fraction-DS) ή σε άλας (Salt Soluble fraction-SS) περιέχουν κυρίως τις ισομορφές G4 και G1 αντίστοιχα (Rieger, Faivre-Bauman et al. 1976). Η G4 απαιτείται για την υδρόλυση της ακετυλοχολίνης και μπορεί να εμπλέκεται και στην απενεργοποίηση των μορίων της ACh στη συναπτική σχισμή (Brimijoin 1983, Fernandez and Hodges-Savola 1992, Fernandez and Hodges-

Savola 1996). Επιπροσθέτως, νέες μελέτες φέρνουν στο φως ότι η G4 ισομορφή της AChE είναι κυρίαρχη σε όλες τις περιοχές του εγκεφάλου (μετωπιαίος φλοιός, φλοιός της παρεγκεφαλίδας, ραβδωτό σώμα, ιππόκαμπος, υποθάλαμος, θάλαμος, προμήκης μυελός, παρεγκεφαλίδα) σε σχέση με την G1 ισομορφή, που επίσης εντοπίζεται στο νευρικό σύστημα (Das, Dikshit et al. 2001). Τέλος, από μελέτες των Rakonczay et al. (2005) στο ΠΝΣ ατόμων που πάσχουν από Alzheimer παρατηρείται μια επιλεκτική απώλεια της μεμβρανο-συνδεόμενης ισομορφής (G4), ενώ, κατά έναν περίεργο λόγο, η G1 μορφή παραμένει σχετικά ανεπηρέαστη. Μολονότι αυτά τα δεδομένα έχουν αποδειχθεί πειραματικά, ελάχιστα είναι γνωστά για τον τρόπο με τον οποίο οι αναστολείς της AChE επηρεάζουν τις διάφορες ισομορφές του ενζύμου.



Εικόνα 12: Υδρόλυση της ACh. Πηγή: <http://www.atsdr.cdc.gov/csem/csem.asp?csem=11&po=23>

Αναφορικά με το χρόνο ενζυμικής δράσης της AChE, υπολογίζεται ότι έχει ρυθμό 150 μsec , αφού περίπου 5000 μόρια AChE ανά μόριο ενζύμου υδρολύονται κι επομένως, χαρακτηρίζεται ως ένα από τα αποτελεσματικότερα γνωστά ένζυμα. Το ενεργό του κέντρο διαχωρίζεται σε δύο κύριες θέσεις: μια ανιονική, που περιέχει τουλάχιστον μια καρβοξυλική ομάδα η οποία έλκει το θετικό φορτίο της ACh και μια θέση εστεράσης που συνδέεται με το άτομο του C (άνθρακα) του καρβονυλίου της ACh. Φαίνεται ότι το ενεργό κέντρο είναι κοινό για όλες τις μοριακές μορφές και προσδίδει ιδιότητες υδροδυναμικές, πολυμερισμού και προσκόλλησης σε μεμβράνες (Soreq and Seidman 2001).

Για την αναλυτική αντίδραση η οποία συμβαίνει, σύμφωνα με τους Cooper et al, δύναται να αξιοποιηθεί η παρακάτω εικόνα :



Εικόνα 13: Αντίδραση AChE με Ach. Πηγή: <http://searchworks.stanford.edu/view/9091246>.

Μελέτες σε μυς με έλλειμμα του ενζύμου AChE (AChE; EC3.1.1.7) δείχνουν ότι επηρεάζεται η γονιδιακή ρύθμιση του λιπιδικού μεταβολισμού, σε σχέση με τους μυς μάρτυρες. Για παράδειγμα, η έκφραση του mRNA των *fabp-7* (brain specific fatty acid protein-7 - ειδική για τον εγκέφαλο πρωτεΐνη-7 λιπαρού οξέος) και *pla2g4* (phospholipase A2 group IV- φωσφολιπάση A2 ομάδας IV) βρέθηκε μειωμένη στους μυς ελλείψης AChE (Lin, Wang et al. 2014). Η ίδια έρευνα προτείνει ότι η AChE μπορεί να παίζει ρόλο στη νευρογένεση και στη νευροεκφύλιση, ρυθμίζοντας το μεταβολισμό των λιπιδίων στον εγκέφαλο. Σε άλλες μελέτες, η έλλειψη AChE φαίνεται να συνοδεύεται από μείωση της απόπτωσης σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες, σε μοντέλο νευροτοξίνης για τη νόσο Parkinson (Zhang, Lu et al. 2013). Ακόμη, έρευνες απαλοιφής του γονιδίου της AChE δείχνουν ότι αυξάνονται τα επίπεδα του μεταφορέα της ACh στο ραβδωτό σώμα κατά 60%, ενώ μειώνονται τα επίπεδα των μουσκαρινικών υποδοχέων M1, M2 και M4 της ACh στο ραβδωτό σώμα αλλά και σε άλλες περιοχές, που εμπλέκονται στη μνήμη (αναλυτικότερη περιγραφή των υποδοχέων της ACh στην παράγραφο 2.3.) (Volpicelli-Daley, Duysen et al. 2003, Volpicelli-Daley, Hrabovska et al. 2003).

Μια άλλη χολινεστεράση είναι η βουτυρυλοχολινεστεράση ή ψευδο-χολινεστεράση (BuChE). Δεν εμφανίζει εξειδίκευση και υδρολύει διάφορους χολικούς εστέρες. Στον άνθρωπο, βρίσκεται κυρίως στο ήπαρ και κωδικοποιείται από το γονίδιο BCHE. Μοιάζει πολύ με την ακετυλοχολινεστεράση του νευρικού συστήματος. Η βουτυρυλοχολίνη είναι μια συνθετική ουσία και δεν συναντάται στον οργανισμό υπό φυσιολογικές καταστάσεις. Χρησιμοποιείται σαν εργαλείο για τη διάκριση των δύο εστερασών (ακετυλο- και βουτυρυλο-).

2.1.1. Αναστολείς της AChE (AChEIs)

Τα τελευταία χρόνια οι έρευνες έχουν στραφεί στην εύρεση αναστολέων της AChE με σκοπό αντιμετώπιση νευροεκφυλιστικών νόσων (π.χ. Νόσος Alzheimer, νόσος Parkinson, κατάθλιψη κλπ) (Hernandez-Rodriguez, Correa-Basurto et al. 2014). Με τον όρο αναστολείς γίνεται αναφορά σε μόρια που μπορούν να μειώσουν ή να εξαλείψουν την ενεργότητα ενός ενζύμου. Οι αναστολείς ακετυλοχολινεστεράσης δρουν στα εγκεφαλικά νευρικά κύτταρα κατά τέτοιο τρόπο ώστε να εμποδίζεται η διάσπαση και άρα να εξοικονομείται ποσότητα μιας νευροχημικής ουσίας, που φυσιολογικά υπάρχει στον εγκέφαλο, της ακετυλοχολίνης. (Παναγής, 2009). Φαίνεται ότι η ακετυλοχολινεστεράση παραμένει ένας εξαιρετικά βιώσιμος στόχος για τη βελτίωση των συμπτωμάτων της Νόσου Alzheimer (χολινεργική υπόθεση της Νόσου Alzheimer). Αυτό το πόρισμα βγήκε έπειτα από διάφορες κλινικές δοκιμές, όπου δείχτηκε ότι:

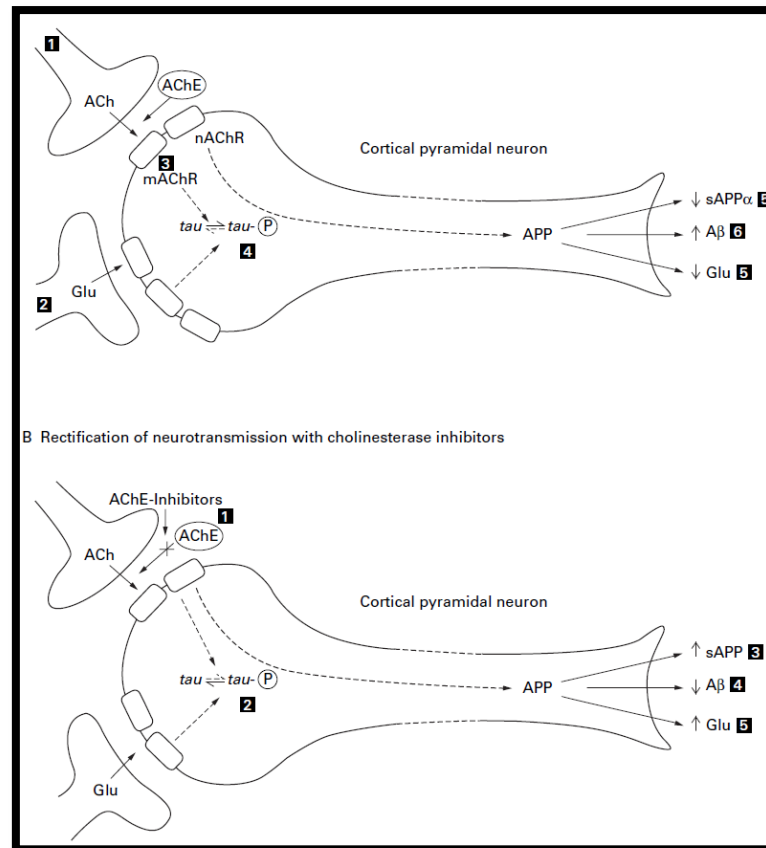
α) ουσίες που είναι αναστολείς της AChE (AChEIs), όπως η ντονεπεζίλη (donepezil), η ριβαστιγμίνη (rivastigmine) κι η γαλανταμίνη (galantamine) αυξάνουν τις γνωστικές, λειτουργικές και συμπεριφορικές διαδικασίες σε άτομα που πάσχουν από Νόσο Alzheimer,

β) τα αποτελέσματα της δράσης τους είναι παρόμοια,

γ) τα αποτελέσματα της δράσης τους είναι δοσοεξαρτώμενα (μέχρι τη δόση όπου επικρατούν οι παρενέργειες- υψηλές δόσεις) και

δ) είναι αρκετά ασφαλής η χορήγησή τους κι είναι ανεκτά καλά από τον οργανισμό.

Η νόσος Alzheimer χαρακτηρίζεται από προοδευτική απώλεια χολινεργικών νευρώνων (Katzman 1986). Επηρεάζονται όμως και άλλα νευροδιαβιβαστικά συστήματα (Perry and Perry 1985). Εφόσον το χολινεργικό σύστημα απαιτείται για διαδικασίες βραχυπρόθεσμης μνήμης, πιστεύεται ότι η δυσλειτουργία των χολινεργικών νευρώνων στη νόσο Alzheimer ευθύνεται για την απώλεια μνήμης των ασθενών που πάσχουν από τη νόσο (Jarvik, Gritz et al. 1972, Galizia 1984, Francis, Palmer et al. 1999). Πλέον είναι γνωστό ότι οι αναστολείς της AChE προσφέρουν μια προσωρινή ανάκτηση λειτουργικότητας σε άτομα που πάσχουν από τη νόσο Alzheimer (McGeer and McGeer 2003). Επίσης, σύμφωνα με τους Samadi et al, ουσίες όπως οι πυριδονεπεζίλες, επειδή αναστέλλουν την AChE, χρησιμοποιούνται ως φάρμακα για τη νόσο (Samadi, Estrada et al. 2012).



Εικόνα 14: Σχηματικό διάγραμμα νευρώνα όπου φαίνονται (Α) οι αλλαγές της νευροδιαβίβασης στη νόσο Alzheimer και (Β) ο υποθετικός τύπος δράσης των αναστολέων της AChE. Πηγή: (Francis, Palmer et al. 1999)

Η απελευθέρωση ακετυλοχολίνης έχει διεγερτική ή ανασταλτική επίδραση, ανάλογα με τον τύπο του ιστού και τη φύση του υποδοχέα με τον οποίο αλληλεπιδρά. Η χολινεργική νευροδιαβίβαση διαμεσολαβείται από δύο τύπους υποδοχέων, νικοτινικούς και μουσκαρινικούς, που αναλύονται στη συνέχεια (παράγραφος 2.4.).

2.2. Ακετυλοχολίνη- Νευροανατομικά στοιχεία

Η ακετυλοχολίνη στο ΠΝΣ βρίσκεται κυρίως στα γάγγλια του ΑΝΣ, στις μεταγαγγλιακές συνάψεις του παρασυμπαθητικού και στη νευρομυϊκή σύναψη.

Όσον αφορά το ΚΝΣ, εντοπίζεται σε νευρώνες τοπικών κυκλωμάτων (π.χ. νευρικά κύτταρα νεοραβδωτού, επικλινούς πυρήνα ή ακόμη και στου φλοιού που σε ορισμένες περιπτώσεις δέχονται και από τη μέλαινα ουσία γλουταμινεργικές ή ντοπامينεργικές ώσεις) ή σε συναρθροίσεις νευρώνων, αποτελώντας το πιο εκτεταμένο νευρικό δίκτυο του ΚΝΣ των θηλαστικών και τη γεφυρα διασύνδεσης μεταξύ διαφόρων περιοχών (Vincent, Satoh et al. 1986). Η τελευταία περίπτωση

περιλαμβάνει το χολινεργικό σύμπλεγμα του βασικού προσθίου εγκεφάλου και το γεφυρο-μεσεγκεφαλο-καλυπτρικό χολινεργικό σύμπλεγμα.

Το χολινεργικό σύστημα μπορεί να διαχωριστεί στις επιμέρους ομάδες που το συναποτελούν: α) του μέσου διαφράγματος (Ch1), β) του κάθετου σκέλους της διαγώνιας ταινίας του Broca (Ch2), του οριζόντιου σκέλους της διαγώνιας ταινίας του Broca (Ch3) και δ) του βασικού πυρήνα του Meynert (Ch4) (Mesulam, Mufson et al. 1983, Mufson and Kordower 1989). Οι ομάδες Ch1-Ch4 μαζί με τους ενδονευρώνες του ραβδωτού αποτελούν τους χολινεργικούς πυρήνες του βασικού πρόσθιου εγκεφάλου (basal forebrain). Επίσης, υπάρχουν και οι ομάδες Ch5 και Ch6, οι οποίες περιλαμβάνουν τους χολινεργικούς νευρώνες του γεφυροσκελιαίου πυρήνα και του έξω ραχιαίου πυρήνα της καλύπτρας, αντίστοιχα. Οι δύο αυτές ομάδες κυττάρων σχηματίζουν το γεφυρομεσεγκεφαλοκαλυπτρικό χολινεργικό σύστημα του εγκεφαλικού στελέχους. Αν και οι πυρήνες αυτοί, Ch1-Ch6, θεωρούνται χολινεργικοί, περιέχουν και άλλους τύπους κυττάρων. Για παράδειγμα, μόνο το 10-20% των κυττάρων της ομάδας Ch3 είναι χολινεργικά, ενώ στην Ch4 το ποσοστό τους ανέρχεται στο 80-90%. Στον επίμυ χολινεργικά κύτταρα εντοπίζονται επίσης στο φλοιό (δεν είναι όμως θετικά για την AChE), την αμυγδαλή, την ωχρά σφαίρα και τον ενδοσκελικό πυρήνα, σε καμία περίπτωση, ωστόσο, δεν μπορούν να θεωρηθούν επιπλέον οργανωμένες ομάδες χολινεργικών νευρώνων. Ο αριθμός των χολινεργικών κυττάρων σε κάθε ημισφαίριο του εγκεφάλου του ενήλικα επίμυ ανέρχεται σε 18.000-20.000 (Mesulam, Mufson et al. 1983).

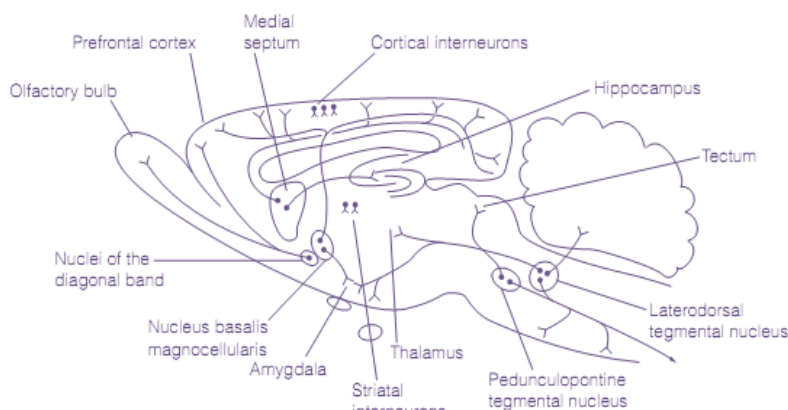
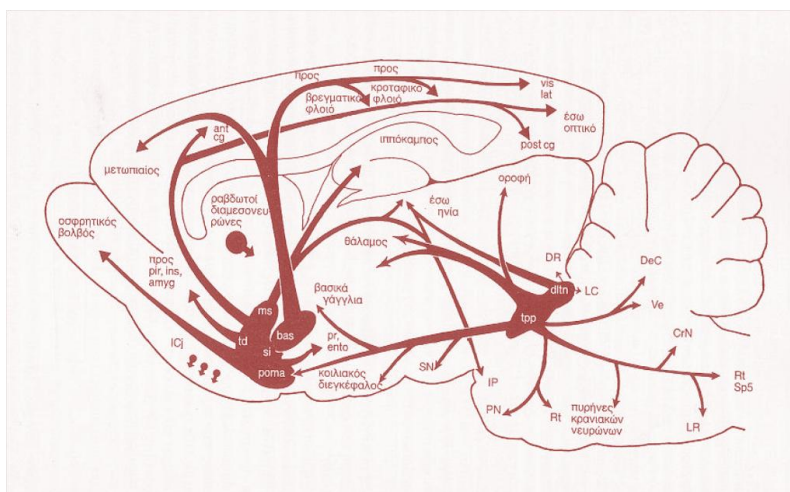
Χολινεργικός τύπος	Εγκεφαλική περιοχή	Περιέχοντες πυρήνες	Περιοχή-Στόχος
Ch1	Βασικός πρόσθιος εγκέφαλος	Μέσο διάφραγμα	Ιππόκαμπος
Ch2	Βασικός πρόσθιος εγκέφαλος	Κάθετο σκέλος της διαγώνιας ταινίας του Broca	Ιππόκαμπος
Ch3	Βασικός πρόσθιος εγκέφαλος	Οριζόντιο σκέλος της διαγώνιας ταινίας του Broca	Οσφρητικός βολβός
Ch4	Βασικός πρόσθιος εγκέφαλος	Βασικός μεγαλοκυτταρικός πυρήνας (ή βασικός πυρήνας του Meynert), ωχρά σφαίρα, νευρώνες πλευρικά του κάθετου σκέλους και νευρώνες του μέσου τμήματος του οριζόντιου σκέλους της διαγώνιας ταινίας του Broca.	Νεοφλοιός, Αμυγδαλή
Ch5	Εγκεφαλικό στέλεχος	Γεφυροσκελιαίος, Σφηνοειδής πυρήνας (cuneiform), παραβράγχια περιοχή	Θάλαμος, βασικά γάγγλια
Ch6	Εγκεφαλικό στέλεχος	Πλάγιος καλυπτρικός πυρήνας	Θάλαμος, βασικά γάγγλια

Πίνακας 1: Οι ομάδες χολινεργικών νευρώνων και οι προβολές τους.

Πηγή: <http://journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fnbeh.2012.00024/full>

Στο παρόν μεταπτυχιακό δίπλωμα εξειδίκευσης το ενδιαφέρον εστιάζεται στο χολινεργικό σύστημα του βασικού πρόσθιου εγκεφάλου και για το λόγο αυτό θα αναλυθεί λεπτομερέστερα. Οι δομές του ραβδωτού σώματος, όπως τα νησίδια του Calleja, το οσφρητικό φύμα, ο επικλινής πυρήνας (στο σύνολό τους απαρτίζουν το πλάγιο ραβδωτό) και το σύμπλοκο του κερκοφόρου πυρήνα και του κελύφους του φακοειδούς πυρήνα (το ραχιαίο ραβδωτό ή νεοραβδωτό) περιέχουν χολινεργικούς ενδονευρώνες. Το πλάγιο ραβδωτό δέχεται προβολές από τον οσφρητικό βολβό, τους πυρήνες της ραχιαίας και έσω ραφής, την αμυγδαλή, τον

ιππόκαμπο, το φλοιό και το θάλαμο. Στο νεοραβδωτό φτάνουν προβολές από το φλοιό (κυρίως από τα πυραμιδικά κύτταρα της στοιβάδας 5), το γεφυρομεσεγκεφαλοκαλυπτρικό σύστημα, κατεχολαμινεργικές ίνες από τη μέλαινα ουσία κ.ά. (Woolf and Butcher 1981).



Εικόνες 15: Σχηματική απεικόνιση του χολινεργικού συστήματος σε επιμήκη τομή εγκεφάλου τρωκτικού. Πηγές:

<http://www.expertsmind.com/topic/acetylcholine/cholinergic-pathways-92924.aspx>

<http://nwoolf.bol.ucla.edu/>

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432810000148>

Ο βασικός πρόσθιος εγκέφαλος περιέχει αρκετές ομάδες χολινεργικών κυττάρων που χαρακτηρίζονται από τις ευρείες προβολές τους στον άλλο- και ισοφλοιό. Πιο συγκεκριμένα, οι денδρίτες των χολινεργικών νευρώνων εκτείνονται σε απόσταση μερικών εκατοντάδων μικρών και συχνά δημιουργούν αλληλοεπικαλυπτόμενα πεδία. Η χρήση, όμως, ενός συστήματος χαρτογράφησης μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή αποκαλύπτει πως οι δευτερογενείς και οι τριτογενείς денδρίτες εμφανίζουν χαρακτηριστικό πρότυπο προβολής, ανάλογα με την προσθιοπίσθια εντόπιση των χολινεργικών νευρώνων στον πρόσθιο εγκέφαλο.

Οι πιο πρόσθιοι πυρήνες, μέσος πυρήνας του διαφράγματος και κάθετο σκέλος της διαγώνιας ταινίας του Broca και οι ενδιάμεσοι, οριζόντιο σκέλος της διαγώνιας ταινίας και μεγαλοκυτταρική προοπτική περιοχή εννευρώνουν κυρίως αλλοφλοιικές περιοχές, ενώ οι οπίσθιοι πυρήνες, βασικός πυρήνας του Meynert, ανώνυμη ουσία και αγκύλη του φακοειδούς πυρήνα (nucleus ansa lenticularis) εννευρώνουν τον ισοφλοιό (Woolf 1991, Zaborszky and Duque 2000).

Το μέσο διάφραγμα (Medial Septum-MS) αποτελεί τμήμα του συμπλόκου του διαφράγματος, το οποίο ορίστηκε ως διακριτή δομή του εγκεφάλου από τον Έλληνα νευροανατόμο Γαλένιο. Η πρώτη λεπτομερής περιγραφή του διαφράγματος από ανατομικής απόψεως ήρθε το 1901 από τον Ramon y Cajal, που ήταν και ο πρώτος που το χαρακτήρισε ως τμήμα των βασικών γαγγλίων. Διαιρείται σε: α) μέσο διάφραγμα (πυρήνας διαγώνιας ταινίας του Broca), β) πλάγιο διάφραγμα και γ) οπίσθιο διάφραγμα. Το μέσο διάφραγμα και ο πυρήνας της διαγώνιας ταινίας του Broca αναφέρονται ως ξεχωριστές ομάδες χολινεργικών νευρώνων (από τον Mesulam, 1983 και άλλους ερευνητές), ωστόσο, στην πραγματικότητα είναι συνεχόμενοι και χωρίς σαφή ανατομικά όρια. Μια περισσότερο λειτουργική κατηγοριοποίηση θα ήταν ο συνδυασμός του MS με το κάθετο σκέλος της διαγώνιας ταινίας του Broca (Vertical part of Diagonal band of Broca- VDB). Οι επιμέρους πυρήνες του διαφράγματος εξυπηρετούν διαφορετικές λειτουργίες και σήμερα συνεχίζουν να θεωρούνται ως ενιαίο σύνολο για τυπικούς λόγους. Επί παραδείγματι, οι MS/VDB μεταδίδουν την ανερχόμενη πληροφορία από το διεγκέφαλο στον τελεγκέφαλο, ενώ το πλάγιο διάφραγμα αναμεταδίδει την κατερχόμενη πληροφορία από τον τελεγκέφαλο στο διεγκέφαλο. Ως σύμπλοκο, το διάφραγμα συμβάλλει στη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ των ενδοκρινικών και συναισθηματικών στοιχείων του ΚΝΣ. Οι διασυνδέσεις μεταξύ των τριών τμημάτων του διαφράγματος είναι πολύ σπάνιες. Τα κύτταρα των MS/VDB προβάλλουν κυρίως στον ιππόκαμπο και λιγότερο στον ενδορρινικό και τον φλοιό του προσαγωγίου (cingulate cortex)(Gaykema, Luiten et al. 1990). Το 90% περίπου των κυττάρων που προβάλλουν στον ιππόκαμπο από την περιοχή αυτή είναι χολινεργικά, ενώ το υπόλοιπο 10-20% είναι GABAεργικά (Linke, Schwegler et al. 1994). Από μια οπτική γωνία, τα χολινεργικά κύτταρα θεωρούνται σημαντικότερα των GABAεργικών, αφού συνιστούν την κύρια πηγή εννεύρωσης του ιπποκάμπου και παίζουν σημαντικό ρόλο στις γνωστικές λειτουργίες στις οποίες συμμετέχει ο ιππόκαμπος (Easton, Douchamps et al. 2012, Teles-Grilo Ruivo and Mellor 2013). Εντούτοις, πρόσφατες μελέτες ενισχύουν και το ρόλο των GABAεργικών νευρώνων (Yousefi, Nasehi et al. 2012, Roland, Stewart et al. 2014, Vega-Flores, Rubio et al. 2014). Η περιοχή του ιπποκάμπου που δέχεται κυρίως, αν όχι αποκλειστικά, χολινεργική εννεύρωση από το μέσο διάφραγμα είναι ο οδοντωτός γύρος, περιοχή που επλέκεται έντονα στην ενήλικη νευρογένεση (Lee, Chrobak et al. 1994, Dalla, Bangasser et al. 2007, Encinas, Sierra et al. 2013). Η απελευθέρωση της ακετυλοχολίνης στον ιππόκαμπο φαίνεται να ευνοείται από τη μελανινοτρόπο

ορμόνη (melanin concentrating hormone -MCH), η οποία συγκεντρώνεται στον οπίσθιο υποθάλαμο. Αυτό πιθανόν να συμβαίνει μέσω του μέσου πυρήνα του διαφράγματος (Lu, Fukuda et al. 2013).

Ο υποκάμπος παρέχει κατερχόμενες συνδέσεις στο διάφραγμα. Η κύρια περιοχή-στόχος των προβολών του είναι το πλάγιο διάφραγμα. Τα πυραμιδικά κύτταρα της CA1 περιοχής του υποκάμπου προβάλλουν στο πλάγιο διάφραγμα, ενώ αυτά της CA3 μόνο στο οπίσθιο τμήμα του διαφράγματος. Οι προβολές στο MS/VDB προέρχονται από νευρώνες του υποκάμπου που απολήγουν τόσο στα χολινεργικά όσο και στα GABAεργικά κύτταρα του μέσου διαφράγματος. Το μέσο διάφραγμα δέχεται επίσης προβολές από τον ενδορρινικό φλοιό, την ηνία, τον υποθάλαμο, τον υπομέλαινα τόπο και την πλάγια καλυπτική περιοχή (Woolf 1991).

Το οριζόντιο σκέλος του πυρήνα της διαγώνιας ταινίας (Horizontal part of Diagonal band of Broca- HDB), η μεγαλοκυτταρική προοπτική περιοχή και τα κύτταρα της κοιλιακής ωχράς σφαίρας απαρτίζουν την ενδιάμεση ομάδα των χολινεργικών νευρώνων του πρόσθιου εγκεφάλου, οι προβολές της οποίας εμφανίζουν τοπογραφική οργάνωση. Η συνάθροιση των προσθιότερων κυττάρων του HDB πυρήνα προβάλλει στον οσφρητικό βολβό. Τα πιο ενδιάμεσα κύτταρα προβάλλουν στον οπισθοσπλήνιο, τον ενδορρινικό, τον παραρρινικό και το φλοιό του προσαγωγίου, ενώ τα πλάγια κύτταρα του HDB πυρήνα εννευρώνουν τον απιοειδή και νησιδοειδή φλοιό. Νευρώνες σε όλη την έκταση της δομής προβάλλουν στην αμυγδαλή. Τέλος, η μεγαλοκυτταρική προοπτική περιοχή παρέχει τη χολινεργική εννεύρωση του μετωπιαίου φλοιού. Η ενδιάμεση ομάδα των χολινεργικών κυττάρων του πρόσθιου εγκεφάλου δέχεται προβολές από τον πρόσθιο οσφρητικό πυρήνα, την αμυγδαλή, τον κογχομετωπιαίο, τον ενδορρινικό, το νησιδοειδή, τον απιοειδή και το φλοιό του προσαγωγίου. Οι προβολές αυτές τερματίζουν και σε μη χολινεργικά κύτταρα της περιοχής αυτής (Woolf and Butcher 1981, Mesulam, Mufson et al. 1983, Gaykema, Luiten et al. 1990, Woolf 1991, Zaborszky, Cullinan et al. 1991).

Ο βασικός μεγαλοκυτταρικός πυρήνας (nucleus basalis magnocellularis- NBM) αναφέρθηκε για 1^η φορά από τον Albert von Kölliker (1986), ο οποίος περιέγραψε μια ομάδα κυττάρων διαμέτρου 20-30μm, και είναι ομόλογος του πυρήνα Meynert των πρωτεύοντων (Wenk 1997, Baldi, Mariottini et al. 2007). Ο πυρήνας εντοπίζεται μέσα στην ανώνυμη ουσία, η οποία δεν έχει σαφή όρια και δεν ορίζεται ως ανατομική μονάδα. Στον επίμου, ο NBM περιέχει μεγάλους χολινεργικούς νευρώνες, οι οποίοι είναι κατανεμημένοι καθόλο το μήκος της ανώνυμης ουσίας και στέλνουν τους άξονες τους σε όλο το φλοιό, το οσφρητικό βολβό και την αμυγδαλή (Rey, Carlier et al. 1994). Οι πρόσθιες περιοχές του φλοιού, όπως ο μετωπιαίος φλοιός εννευρώνονται από χολινεργικά κύτταρα του πρόσθιου τμήματος του βασικού πυρήνα του Meynert, ενώ οι νευρώνες των οπίσθιων τμημάτων του εννευρώνουν το βρεγματικό και τον κροταφικό φλοιό. Η περιοχή του φλοιού που δέχεται την περισσότερη εννεύρωση από το χολινεργικό σύστημα είναι ο απιοειδής

φλοιός. Επιπροσθέτως, στον επίμυ εντοπίζονται και ενδογενείς νευρώνες στο φλοιό, οι οποίοι συνιστούν μια μικρή μόνο πηγή ακετυλοχολίνης. Ο NBM, η ανώνυμη ουσία και ο πυρήνας της φακοειδούς αγκύλης δέχονται προβολές από φλοιικές περιοχές, όπως ο μετωπιαίος, ο βρεγματικός και ο κροταφικός φλοιός αλλά και από πυρήνες που κείνται υπό του φλοιού, όπως η μέλαινα ουσία, ο υποθάλαμος, οι πυρήνες της μέσης ραφής και ο υπομέλαινας τόπος (Woolf and Butcher 1981). Ο NBM παίζει ρόλο σε σημαντικές γνωστικές λειτουργίες, όπως η μνήμη/μάθηση και η προσοχή (Pang, Williams et al. 1993, Puron-Sierra and Miranda 2014). Η μαζική εκφύλιση των χολινεργικών νευρώνων του NBM και η δραματική πτώση των χολινεργικών δεικτών στον εγκεφαλικό φλοιό ασθενών με νόσο Alzheimer (NA) οδήγησε στη διατύπωση της χολινεργικής υπόθεσης της NA (Whitehouse, Price et al. 1981). Η υπόθεση αυτή ενέπνευσε και συνεχίζει να εμπνέει ποικίλες πειραματικές μελέτες, με σκοπό την ανάπτυξη φαρμακολογικών θεραπειών έναντι της νοητικής δυσλειτουργίας που συνοδεύει τη νόσο.

Η ανάπτυξη και η λειτουργία των δομών αυτών του προσθίου χολινεργικού συστήματος του εγκεφάλου εξαρτάται από νευροτροφικούς παράγοντες: ο νευρικός αυξητικός παράγοντας (NGF) απαιτείται για τη διαφοροποίηση και την επιβίωση των βασικών εμπρόσθιων χολινεργικών νευρώνων και είναι ικανός να αποτρέπει ή και να αντιστρέφει τη χολινεργική εκφύλιση σε ενήλικα και γηρασμένα θηλαστικά (Yuen, Howe et al. 1996, Williams, Bimonte-Nelson et al. 2006, Williams, Granholm et al. 2007). Επίσης, η επαναλαμβανόμενη ενδοκοιλιακή χορήγηση NGF έχει ως αποτέλεσμα την επιλεκτική αύξηση του ενζύμου ChAT στο βασικό πρόσθιο εγκέφαλο και στις περιοχές που προβάλλουν οι χολινεργικοί νευρώνες σε μεταγεννητικούς και σε ενήλικους επίμους (Mobley, Rutkowski et al. 1985, Mobley, Rutkowski et al. 1986). Επιπροσθέτως, ο νευροτροφικός παράγοντας που απελευθερώνεται από τον εγκέφαλο (BDNF) εμπλέκεται στην ωρίμανση των εμπρόσθιων περιοχών του χολινεργικού συστήματος του εγκεφάλου, ενώ η νευροτροφίνη 3 (NT3) εμπλέκεται στην προσέλκυση χολινεργικών προβολών στο κύτταρο-στόχο του νεοφλοιού (Ward and Hagg 2000, Robertson, Baratta et al. 2006). Πρόσφατες μελέτες σε επίμους δείχνουν επίσης ότι η χορήγηση νευροτροφικών παραγόντων, όπως NGF και NT-3, μπορεί να «σώσει» τους χολινεργικούς νευρώνες του πρόσθιου εγκεφάλου και να βελτιώσει τις λειτουργίες μνήμης/μάθησης (π.χ. στη δοκιμασία σχήματος T). Η χορήγηση σαπορίνης (saporin), που προκαλεί καταστροφή των κυττάρων, επέφερε μεγάλη μείωση των ChAT θετικών νευρώνων στο διάφραγμα, τη διαγώνια ταινία του Broca και στο βασικό μεγαλοκυτταρικό πυρήνα, ενώ η συγχορήγηση των εν λόγω νευροτροφινών μειώνει τις επιπτώσεις της (Lee, Danandeh et al. 2013).

Επίσης, σημαντικής λειτουργίας αποτελεί και το γεφυρο-μεσεγκεφαλο-καλυπτρικό χολινεργικό σύμπλεγμα, που περιλαμβάνει χολινεργικούς νευρώνες από την περιοχή της γέφυρας και της καλύπτρας του μεσεγκεφάλου, οι οποίοι προβάλλουν σε περιοχές του πρόσθιου και του μέσου εγκεφάλου (θάλαμος, ωχρά

σφαίρα, μεσοσκελιαίος πυρήνας και μέλαινα ουσία) καθώς και στον υπομέλανα τόπο, στους πυρήνες της ραφής, στο δικτυωτό σχηματισμό, στους εν τω βάθει και αιθουσαίους πυρήνες των κρανιακών νεύρων.

Στον επίμυ, πρόσθετη πηγή χολινεργικής εννεύρωσης του φλοιού αποτελούν οι χολινεργικοί νευρώνες του έξω ραχιαίου καλυπτρικού πυρήνα. Η προβολή αυτή περιορίζεται στο μέσο προμετωπιαίο φλοιό και δεν αναφέρεται σε άλλα είδη. Σημαντικό είναι ότι η πυκνότητα των χολινεργικών κυττάρων δεν είναι ομοιόμορφη. Συχνά σχηματίζουν συναθροίσεις 3-15 πυκνά διατεταγμένων κυττάρων. Ο αριθμός αυτός ανά συναθροίση είναι μεγαλύτερος στον πίθηκο από ότι στα τρωκτικά. Δεν είναι γνωστό αν τα μεμονωμένα κύτταρα και αυτά που βρίσκονται ως συναθροίσεις προβάλλουν σε διαφορετικές ή σε παρόμοιες στοιβάδες στο φλοιό. Όμως, η διακριτή προβολή τους θα εξηγούσε εν μέρει πώς το χολινεργικό σύστημα του πρόσθιου εγκεφάλου εμπλέκεται τόσο σε γενικές π.χ. διεγερτικές, όσο και σε πιο ειδικές λειτουργίες, όπως η αισθητική επεξεργασία και η επιλεκτική προσοχή (Zaborszky, Cullinan et al. 1991).

2.3. Λειτουργίες χολινεργικού συστήματος

Αν και η ακετυλοχολίνη είναι το πρώτο μόριο που χαρακτηρίστηκε ως νευροδιαβιβαστής, ο ρόλος των χολινεργικών μονοπατιών του κεντρικού νευρικού συστήματος δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως. Το χολινεργικό σύστημα εμπλέκεται άμεσα ή έμμεσα σε πολλές εγκεφαλικές λειτουργίες, όπως η μνήμη, η μάθηση, η προσοχή, ο ύπνος, η εγρήγορση, η απόκριση στο στρες και η φλοιική τροποποίηση της αισθητικής πληροφορίας (Jasper and Tessier 1971, Woody and Gruen 1987, Hasselmo, Anderson et al. 1992, Metharate, Cox et al. 1992, Miranda and Bermudez-Rattoni 1999, De Rosa and Hasselmo 2000, Newman, Nazian et al. 2001, Lee, Kim et al. 2014, Parikh, Bernard et al. 2014, Yakel 2014). Εμπλέκεται στην ενεργό χωρική μνήμη καθώς και στα πρώτα στάδια μάθησης κατά την πρόσληψη της πληροφορίας. Κατά την απάντηση στο στρες επάγεται απελευθέρωση της ACh στον πρόσθιο εγκέφαλο, επηρεάζοντας τη συναισθηματική ισορροπία μέσω δράσης στον ΥΥΕ άξονα (Υποθάλαμος-Υπόφυση-Επινεφρίδια). Αυξημένη διεγερσιμότητα των μονοπατιών που διαμεσολαβεί η ACh, ωστόσο, έχει συσχετιστεί με παθολογικές καταστάσεις, όπως διαταραχές άγχους και κατάθλιψη (Higley and Picciotto 2014). Σε αισθητικό επίπεδο, στον ακουστικό φλοιό του επίμυ η ACh μπορεί να τροποποιήσει τις φλοιικές αποκρίσεις στη συναπτική διαβίβαση θαλάμου- ακουστικού φλοιού και να παίζει, επομένως, ρόλο στην ανίχνευση και διάκριση ήχων. Στον οπτικό φλοιό τροποποιεί τη νευρική απόκριση στα οπτικά ερεθίσματα, αυξάνοντας το εύρος προσανατολισμού των ερεθισμάτων στα οποία απαντούν τα απλά και σύνθετα κύτταρα. Στις συνειρμικές περιοχές η ACh παίζει σπουδαίο ρόλο στη λειτουργική απόκριση των κυττάρων του φλοιού, συμβάλλοντας στην ενίσχυση επεξεργασίας

σημάτων σχετικών με τη συμπεριφορά (Lucas-Meunier, Fossier et al. 2003). Η ακετυλοχολίνη φαίνεται να είναι ένα μόριο-κλειδί του ΚΝΣ, αφού εκτός των ανωτέρω, φαίνεται να μπορεί να αναδιοργανώνει λειτουργικά τα συναπτικά μικροκυκλώματα στο νεοφλοιό, με τρόπο τέτοιο που να ευνοεί τη λειτουργική ενσωμάτωση των πληροφοριών που φτάνουν μέσω των θαλαμικών προσαγωγών ινών στο τοπικό κύκλωμα του νεοφλοιού (Runfeldt, Sadovsky et al. 2014).

Ο φυσιολογικός ρόλος του χολινεργικού συστήματος του βασικού πρόσθιου εγκεφάλου πιστεύεται πως είναι η τροποποίηση της διεγερσιμότητας των φλοιικών και υποκάμπιων νευρώνων. Νευροανατομικά και νευροφυσιολογικά δεσομένα φαίνεται να υποστηρίζουν την ιδέα ότι το εμπρόσθιο χολινεργικό σύστημα τροποποιεί γνωστικές λειτουργίες, όπως η μνήμη, η μάθηση και η προσοχή. Για παράδειγμα, η χορήγηση ανταγωνιστών των μουσκαρινικών υποδοχέων της ακετυλοχολίνης (βλ. Παράγραφο 2.4), όπως η σκοπολαμίνη, βλάπτει τις νοητικές λειτουργίες, ενώ χολινομιμητικά φάρμακα αναστρέφουν τα ελλείματα αυτά ή ενισχύουν τις νοητικές ικανότητες. Ουσίες που μπορούν να απομονωθούν από το περιβάλλον, όπως η σουλφοραφάνη, επίσης φαίνεται να μπορούν να επιδρούν ευεργετικά σε αμνησιακού- τύπου μοντέλα σε τρωκτικά έπειτα από χορήγηση σκοπολαμίνης, με αύξηση των επιπέδων της ACh, αύξηση του ενζύμου σύνθεσής της (ChAT) και μείωση του ενζύμου αποσύνθεσής της (AChE) σε νευρώνες του φλοιού (Lee, Kim et al. 2014).

Ακόμη, μελέτες με δοκιμασίες που απαιτούν τη διάκριση αισθητικών ερεθισμάτων ή την ανίχνευση σύντομων αισθητικών ερεθισμάτων οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι οι χολινεργικοί νευρώνες του βασικού πρόσθιου πυρήνα του Meynert είναι απαραίτητοι για συγκεκριμένες πτυχές της προσοχής. Να διευκρινιστεί ότι με τον όρο προσοχή εννοείται η επικεντρωμένη ενεργοποίηση ενός νευρικού δικτύου που σχετίζεται με μια συγκεκριμένη γνωστική δοκιμασία και δεν πρέπει να συγχέεται με την εγρήγορση και τη διεγερση, που αναφέρονται σε μια ενδογενή συνεχή (sustained) ενεργοποίηση του φλοιού (Baxter and Chiba 1999). Η περιορισμένη καταστροφή των προβλητικών χολινεργικών κυττάρων του βασικού πυρήνα του Meynert στο βρεγματικό λοβό βλάπτει την ενισχυμένη μάθηση, ενώ η περιορισμένη καταστροφή στον προσθιοβρεγματικό φλοιό επηρεάζει αρνητικά τη συνεχή προσοχή. Αξίζει να αναφερθεί ακόμη ότι η καταστροφή του μέσου προμετωπιαίου φλοιού και του βασικού πυρήνα του Meynert συνοδεύονται από ελλειμματική απόδοση σε δοκιμασία μνήμης εργασίας (του χρόνου εν σειρά αντίδρασης σε πέντε επιλογές- 5-Choice Serial Reaction Time task) (McGaughy, Dalley et al. 2002, Risbrough, Bontempi et al. 2002). Όσον αφορά στην προσοχή, η καταστροφή περιοχών όπως το μέσο διάφραγμα και το κάθετο σκέλος της διαγώνιας ταινίας του Broca επιφέρουν αντίθετα αποτελέσματα από αυτά που παρατηρούνται έπειτα από καταστροφή του βασικού πυρήνα του Meynert. Επίσης, φαίνεται ότι το χολινεργικό σύστημα ίσως παίζει μεγαλύτερο ρόλο στην προσοχή από ότι άλλα συστήματα νευροδιαβίβασης, αφού επί παραδείγματι, η αναστολή

της σύνθεσης του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA) δεν επαρκεί για την πρόκληση ελλειμάτων προσοχής (Asinof and Paine 2013). Τέλος, χαρακτηριστική είναι η συμμετοχή του χολινεργικού συστήματος και σε αντιδράσεις παρορμητικότητας, αξιοποιώντας και πάλι τη δοκιμασία 5-Choice Serial Reaction Time task (Dalley, Mar et al. 2008). Ωστόσο, το νευροδιαβιβαστικό αυτό σύστημα χρήζει ακόμα περισσότερης διερεύνησης προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο ρόλος του στις γνωστικές λειτουργίες του εγκεφάλου.

2.3.1. Ακετυλοχολίνη και Γνωσιακές δυσλειτουργίες

Οι περιοχές του βασικού πρόσθιου εγκεφάλου φαίνεται να εμπλέκονται στις γνωστικές λειτουργίες του ατόμου και είναι ευαίσθητες σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως η νόσος Alzheimer (NA), η νόσος Parkinson, το σύνδρομο Korsakoff ή και σε άλλες μορφές άνοιας, ακόμη και σε αναπτυξιακά σύνδρομα όπως το Down και το Rett (Casanova, Walker et al. 1985, Wenk and Hauss-Wegrzyniak 1999, Lucas-Meunier, Fossier et al. 2003, Garcia-Ayllon, Campanari et al. 2014). Ειδικότερα για τη NA, φαίνεται ότι οι εγκεφαλοι από ασθενείς με NA είχαν μειωμένα επίπεδα τόσο της ACh όσο και της ChAT στον εγκεφαλικό φλοιό, τον ιππόκαμπο και στο βασικό πυρήνα του Meynert, που αποτελεί την κύρια πηγή χολινεργικής εννεύρωσης προς το φλοιό (Whitehouse, Price et al. 1982, Coyle, Price et al. 1983). Επίσης, πληθώρα μελετών δείχνει την εμπλοκή του χολινεργικού συστήματος σε λειτουργίες της επεισοδιακής μνήμης (Richter, Allendorf et al. 2014). Ο γηράσκων εγκεφαλος φαίνεται να είναι ευσταθής στον εκφυλισμό, ειδικά σε πρόσθιες περιοχές του, που είναι υπεύθυνες για τις γνωστικές λειτουργίες, δικαιολογώντας έτσι τον ανοιακού τύπου φαινότυπο των ασθενών με NA (Bartus, Dean et al. 1982, Sarter and Bruno 2004). Βλάβες στο χολινεργικό σύστημα έχουν εντοπισθεί και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις του ανθρώπου, όπως η μυασθένεια gravis και οι διαταραχές ύπνου (Παναγής, 2010).

2.3.2. Μεταγραφικοί παράγοντες υψίστης σημασίας για το χολινεργικό σύστημα

Ο μεταγραφικός παράγοντας ομοιοακολουθίας LIM (LHX7), γνωστός και ως L3 ή Lhx8, φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του βασικού πρόσθιου χολινεργικού συστήματος (Zhao, Marin et al. 2003, Mori, Yuxing et al. 2004, Fragkouli, Hearn et al. 2005). Μελέτες απαλοιφής της έκφρασης του γονιδίου αυτού σε αρσενικούς μυς (knockout male mice for Lhx7) έδειξαν ότι υπήρχε διαταραχή στη χωρική τους πλοήγηση και σε λειτουργίες που την απαιτούσαν (π.χ. δοκιμασία υδάτινου λαβυρίνθου) (Fragkouli, Hearn et al. 2005, Fragkouli, Pachnis et al. 2009).

Η απαλοιφή του Lhx7 παράγοντα επηρεάζει και τους νευροτροφικούς παράγοντες του εγκεφάλου. Για παράδειγμα, τα κύτταρα που εκφράζουν τους BDNF και NT-3 παράγοντες βρέθηκαν αυξημένα στον αισθητικοκινητικό και κινητικό φλοιό αλλά όχι στον οπισθοσπλήνιο ή σε περιοχές του ιπποκάμπου. Αυτό ίσως συμβαίνει για να αναπληρωθούν τουλάχιστον εν μέρη τα χολινεργικά ελλείμματα, αφού, όπως προαναφέρθηκε, οι νευροτροφίνες αυτές εμπλέκονται στην ωρίμανση του βασικού πρόσθιου χολινεργικού συστήματος και στο σχηματισμό χολινεργικών συνδέσεων με το φλοιό, αντιστοίχως (Ward and Hagg 2000, Robertson, Baratta et al. 2006). Άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες που απαιτούνται για την ωρίμανση των περιοχών αυτών του εγκεφάλου είναι η πρωτεΐνη ομοιοακολουθίας NKX2.1 και ο παράγοντας βασικής έλικας-θηλίας-έλικας MASH1 (Sussel, Marin et al. 1999, Marin, Anderson et al. 2000).

2.4. Χολινεργικοί υποδοχείς

Σύμφωνα με τη «Φαρμακολογία», οι υποδοχείς της ακετυλοχολίνης, όπως και οι άλλοι διαμεμβρανικοί υποδοχείς, διαχωρίζονται με βάση τη δομή και τις ιδιότητες ευαισθησίας τους προς ορισμένα μόρια. Οι υποδοχείς της ACh όμως, εκτός από την ίδια, μπορούν να ανταποκριθούν σε άλλα μόρια. Έτσι, τους διαχωρίζουμε σε νικοτινικούς (nicotinic acetylcholine receptors-nAChRs) και μουσκαρινικούς (muscarinic acetylcholine receptors-mAChRs) υποδοχείς.

Οι νικοτινικοί υποδοχείς αποτελούν τους ιοντοτρόπους υποδοχείς για την ACh κι έτσι οι αντιδράσεις στις οποίες εμπλέκονται είναι ταχείες (δεν εμπλέκονται δευτερογενή μόρια). Ενεργοποιούνται από τη δέσμευση του μορίου της ακετυλοχολίνης σε αυτούς και ως αποτέλεσμα ανήγει ο διάυλος ιόντων που σχηματίζουν. Λέγονται νικοτινικοί διότι σ' αυτούς δεσμεύεται και η νικοτίνη. Αποτελούνται από πέντε υπομονάδες, που είναι συμμετρικά και κυκλικά τοποθετημένες, ώστε να σχηματίζουν τον πόρο ιόντων. Παρουσιάζουν ομοιότητες με τους GABA_A υποδοχείς, τους τύπου 3 υποδοχείς της σεροτονίνης, αλλά και με τους υποδοχείς γλυκίνης, που είναι όλοι υποδοχείς με μια θηλιά κυστεΐνης. Είναι διαπερατοί σε ιόντα Na⁺, K⁺ και Ca⁺⁺. Ο λόγος διαπερατότητάς τους σε ιόντα είναι Ca⁺⁺/Na⁺ >1 (Hucho 1986, Lukas 1995).

Στα Σπονδυλωτά οι νικοτινικοί υποδοχείς ταξινομούνται σε δύο υποομάδες: μυϊκού και νευρικού τύπου. Για την πρώτη περίπτωση αναφερόμαστε σε νευρομυϊκές συνάψεις, όπου παίρνουν μέρος οι υπομονάδες α1, β1, δ και γ σε αναλογία 2:1:1:1 στα έμβρυα, ενώ στους ενήλικες αντί για τη γ υπομονάδα υπάρχει η ε, στην ίδια αναλογία. Στη myasthenia gravis ένας υποδοχέας της νικοτίνης γίνεται στόχος για αντισώματα, αποτελώντας έτσι τη μοριακή βάση για την παθοφυσιολογία της ασθένειας. Η δεύτερη υποομάδα περιλαμβάνει μια ποικιλία ομο- και ετερο-διμερών από δώδεκα (12) διαφορετικές υπομονάδες: α2 ως α10 και

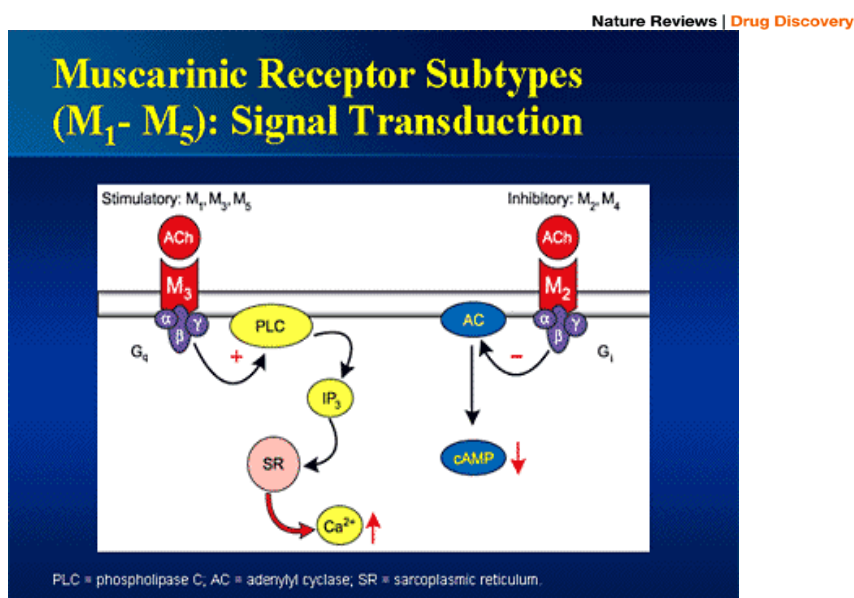
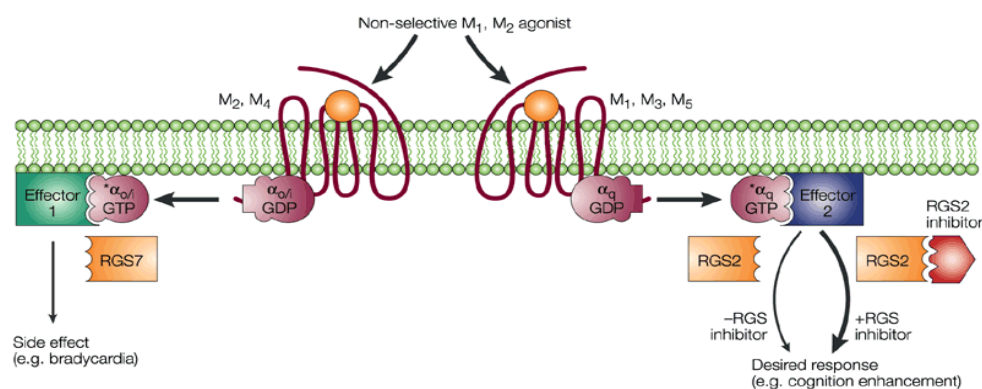
β2 ως β4 (π.χ. [α4]₃[β2]₂ κλπ). Και στα δύο είδη υποομάδων υπάρχουν κοινές αλληλουχίες, ειδικά στις υδρόφοβες περιοχές τους. Προτείνεται ότι εμπλέκονται κυρίως σε λειτουργίες μνήμης/μάθησης και προσοχής, αλλά και σε κινητικές δραστηριότητες, στη μετάδοση του πόνου και στη ρύθμιση της θερμοκρασία του σώματος (Romanelli and Gualtieri 2003, Uzum, Diler et al. 2004, Bloem, Poorthuis et al. 2014, Tirgar, Rezayof et al. 2014).

Στον εγκέφαλο του επίμου οι υπομονάδες κατανέμονται ως εξής: Η α2 υπομονάδα εντοπίζεται στις εν τω βάθει στιβάδες του φλοιού και τον ενδοσκελιαίο πυρήνα, η α3 στο θάλαμο, τον ενδοσκελιαίο πυρήνα και στις στιβάδες 4 και 5 του φλοιού, οι α4 και β2 στην πλειονότητα των δομών του εγκεφάλου και σε όλες τις στιβάδες του φλοιού, η α5 στον υπόκαμπο, τη μέλαινα ουσία, την πλάγια καλυπτρική περιοχή, τον ενδοσκελιαό πυρήνα και τη στιβάδα 6 του γλοιού, οι α6 και β3 στα σωματοαισθητικά γάγγλια (συσχετιζόμενα με κατεχολαμινεργικούς νευρώνες), η α7 στον υπόκαμπο και στον υποθάλαμο, η α8 δεν είναι παρούσα στα θηλαστικά, η α9 στα κύτταρα του έξω κοχλία και η β4 στα ηνία, τον υπόκαμπο, τον ενδοσκελιαίο πυρήνα, την οσφρητική περιοχή, τον υπομέλαινα τόπο, την παρεγκεφαλίδα και τις στιβάδες 1-4 του φλοιού (Romanelli and Gualtieri 2003).

Οι νικοτινικοί υποδοχείς κατέχουν σπουδαίο ρόλο ως προς τη ρύθμιση διάφορων νευροδιαβιβαστικών συστημάτων. Για παράδειγμα, φαίνεται να είναι ο κύριος τροποποιητής του ντοπαμινεργικού συστήματος (Faure, Tolu et al. 2014). Οι α7 υποδοχείς παίζουν σπουδαίο ρόλο στην ανάπτυξη των GABAεργικών νευρώνων του εγκεφαλικού φλοιού, ενώ η δυσλειτουργία τους συνδέεται με ψυχικές νόσους, όπως η σχιζοφρένεια (Lin, Hsu et al. 2014). Επίσης, έχουν βρεθεί να συμμετέχουν σε γνωστικές λειτουργίες τις οποίες επικουρεί το γλουταματεργικό σύστημα (Molas and Dierssen 2014). Δυσλειτουργία των νικοτινικών υποδοχέων φαίνεται να χαρακτηρίζει και την παθοφυσιολογία του συνδρόμου Διαταραχής Ελλειμματικής Προσοχής και Υπερκινητικότητας (ΔΕΠΥ) (Sterley, Howells et al. 2014).

Οι μουσκαρινικοί υποδοχείς της ακετυλοχολίνης είναι συζευγμένοι με G πρωτεΐνες και δρουν μέσω δεύτερων αγγελιοφόρων (μηνυματοφόρων) μορίων, γι' αυτό και καλούνται μεταβολοτρόποι υποδοχείς. Είναι βραδύτεροι στην απόκρισή τους σε σχέση με τους ιοντοτρόπους (150-200msec). Εμπλέκονται κυρίως στη νευρωνική πλαστικότητα αλλά και σε γνωστικές λειτουργίες, όπως είναι η μνήμη, η μάθηση και η προσοχή, αλλά και η συμπεριφορά άγχους (Nitsch, Rossner et al. 1998, von der Kammer, Demiralay et al. 2001, Li, Chen et al. 2014). Διαχωρίζονται σε M1, M2, M3, M4 και M5 μουσκαρινικούς υποδοχείς και είναι ευαίσθητοι στη μουσκαρίνη (αλκαλοειδές) (Buckley, Bonner et al. 1989, Hulme, Birdsall et al. 1990). Αναλυτικότερα, οι M1, M3 και M5 προσδένονται επιλεκτικά σε πρωτεΐνες τύπου Gq/11, οι οποίες ενεργοποιούν τη φωσφολιπάση C (PLC) και οδηγούν σε απελευθέρωση διακυλογλυκερόλης (DAG) και τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP3). Από την άλλη πλευρά, οι M2 και M4 υποδοχείς συνδέονται με Gi/o πρωτεΐνες, που αναστέλλουν την αδενυλική κυκλάση προκαλώντας είτε ελάττωση των επιπέδων

του κυκλικού AMP (cAMP) (Wess 1996, Caulfield and Birdsall 1998, Nakamura, Hamada et al. 2013). Διάφορες ουσίες μπορεί να τους αγωνίζονται ή να τους ανταγωνίζονται, όπως η πιλοκαρπίνη (αγωνιστής), η ατροπίνη, η υοσκιαμίνη και η σκοπολαμίνη (ανταγωνιστές). Οι μουσκαρινικοί υποδοχείς παρουσιάζουν ευρεία κατανομή, τόσο στο ΠΝΣ όσο και στο ΚΝΣ (Levey 1996, Volpicelli and Levey 2004).



Εικόνες 16& 17: Οι διαφορετικοί οδοί σηματοδότησης που διαμεσολαβούνται από τους μουσκαρινικούς υποδοχείς. Πηγές: <http://www.medscape.org/viewarticle/487222>
http://www.nature.com/nrd/journal/v1/n3/fig_tab/nrd747_F5.html

Οι M1 υποδοχείς εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα σε όλες τις κύριες περιοχές του πρόσθιου εγκεφάλου, το φλοιό, τον ιππόκαμπο, το ραβδωτό και αντιστοιχούν στο 40-50% του συνόλου των μουσκαρινικών υποδοχέων της ακετυλοχολίνης. Εντοπίζονται κυρίως μετασυναπτικά και δρουν αυξάνοντας τη χολινεργική νευροδιαβίβαση. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, οι υποδοχείς αυτοί μπορούν να ενεργοποιηθούν άμεσα από GABAεργικούς ενδονευρώνες και να παίξουν ρόλο στις λειτουργίες προσοχής, μνήμης και μάθησης, αλλά και σε συναισθήματα όπως ο φόβος (Bartko, Romberg et al. 2011, Soma, Suematsu et al. 2014, Yi, Ball et al. 2014,

Young and Thomas 2014). Οι M1 υποδοχείς μπορούν να συμβάλλουν στη βελτιστοποίηση των γνωστικών λειτουργιών σε περιπτώσεις βλάβης (π.χ. στη νόσο Alzheimer), μέσω ενεργοποίησης νευρώνων του προμετωπιαίου φλοιού (Shirey, Brady et al. 2009). Επίσης, η έλλειψη των M1 αυξάνει την παθολογία του αμυλοειδούς πεπτιδίου σε μελέτες τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* και για το λόγο αυτό ίσως θα ήταν αποτελεσματικοί ως θεραπευτικός στόχος για τη νόσο Alzheimer (Davis, Fritz et al. 2010, Medeiros, Kitazawa et al. 2011). Μειωμένοι M1 υποδοχείς έχουν συσχετιστεί και με ψυχωτικές νόσους, όπως η Σχιζοφρένεια, ενώ η ενεργοποίησή τους φαίνεται να έχει αντιψυχωτικά αποτελέσματα (Jones, Brady et al. 2008, Scarr, Craig et al. 2013). Αλλοστερικοί αγωνιστές των M1 υποδοχέων ενεργοποιούν διάφορα μονοπάτια σηματοδότησης, αλλά σε σχέση με ορροστερικούς αγωνιστές, είναι λιγότερο αποτελεσματική στη στρατολόγηση της αρρεστίνης 3, μια πρωτεΐνη που παίζει ιδιαίτερο ρόλο στη σηματοδότηση μέσω των υποδοχέων που είναι συζευγμένοι με G πρωτεΐνες (Davis, Heilman et al. 2010). Οι M1 μπορεί να ευνοήσουν την απελευθέρωση ντοπαμίνης από το ραβδωτό, ενώ οι M2 μπορεί να αναστείλλουν την απελευθέρωση του γλουταμινικού στην ίδια περιοχή (De Klippel, Sarre et al. 1993, Smolders, Bogaert et al. 1997).

Οι M2 υποδοχείς παίζουν ρόλο στη χολινεργική ρύθμιση της θερμοκρασίας του σώματος και κυριαρχούν στο εγκεφαλικό στέλεχος αλλά και σε όργανα όπως η καρδιά και σε λείους μυς. Οι M2 πυροδοτούν συμπτώματα παρκινσονισμού (οι ανταγωνιστές τους αναστέλλουν τον τρόπο που προκαλείται έπειτα από χορήγηση οξοτρεμορίνης, ένα παρασυμπαθομιμητικό φάρμακο που δρα σαν μη επιλεκτικός αγωνιστής των μουσκαρινικών υποδοχέων) και εξαιτίας της προσυναπτικής τους εντόπιση διαμεσολαβούν την αυτοαναστολή της απελευθέρωσης της ακετυλοχολίνης στο φλοιό και στον υπόκαμπο (Levey 1996, Volpicelli and Levey 2004).

Οι υποδοχείς M3 της ακετυλοχολίνης εκφράζονται ευρέως στο ΚΝΣ, αν και τα επίπεδά τους είναι πιο χαμηλά από ό,τι των άλλων μουσκαρινικών υποδοχέων. Οι M3 εμπλέκονται έμμεσα στην καταστολή της σηματοδότησης μέσω των ενδοκανναβινοειδών υποδοχέων, όπως λ.χ. οι CB1 υποδοχείς (cannabinoid receptor type 1) (Fukudome, Ohno-Shosaku et al. 2004). Επίσης, ουσίες που δρουν ως ανταγωνιστές για τους M1 και τους M3 υποδοχείς φαίνεται να έχουν νευροπροστατευτικές ιδιότητες έναντι της ισχαιμίας του εγκεφαλικού φλοιού (Ma, Zhou et al. 2013). Άλλοι ανταγωνιστές των M3 φαίνεται να εμπλέκονται στη ρύθμιση των μεταβολικών ορμονών και στην αύξηση του βάρους (Weston-Green, Huang et al. 2012). Η μειωμένη έκφραση των M3 υποδοχέων φαίνεται να συσχετίζεται βλάβες, έπειτα από αναστολή της Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) και αρνητική επίδραση στην ακτίνη του κυτταροσκελετού αλλά και στο μονοπάτι καντερίνης/β-κατενίνης (Jiao, Wu et al. 2014).

Οι υποδοχείς M4 εντοπίζονται προσυναπτικά και μετασυναπτικά και διαμεσολαβούν την αυτοαναστολή απελευθέρωσης ACh στο ραβδωτό σώμα. Στο

ραβδωτό κυριαρχούν, όπου και συνεντοπίζονται με υποτύπους των ντοπαμινεργικών υποδοχέων σε προβλητικούς νευρώνες της εν λόγω ανατομικής δομής, ελαττώνοντας τη διαμεσολαβούμενη από τους υποδοχείς ντοπαμίνης τύπου 1 (D1), διέγερση της κινητικής δραστηριότητας (Jeon, Dencker et al. 2010). Επίσης, αναστέλλουν τη σηματοδότηση μέσω των D1 υποδοχέων στον επικλινή πυρήνα (Onali and Olianas 2002). Μελέτες σε διαγονιδιακούς μυς με απαλοιφή των M4 υποδοχέων δείχνουν ότι αυξάνεται η κινητική διέγερση που διαμεσολαβείται από τους D1 υποδοχείς (Gomez, Zhang et al. 1999). Σε ανάλογα πειράματα βρέθηκε ότι αυξάνεται η αυτο-χορήγηση κοκαΐνης από τους μυς με απαλοιφή των M4 υποδοχέων, γεγονός που δείχνει ότι οι εν λόγω υποδοχείς παίζουν ρόλο και στο σύστημα ανταμοιβής (Schmidt, Thomsen et al. 2011). Τέλος, το χολινεργικό σύστημα του υποκάμπου φαίνεται να υφίσταται βλάβη ως προς την απελευθέρωση της ACh και έτσι να οδηγεί σε γνωστικές βλάβες, όπως δείχνουν μελέτες απαλοιφής των M2, M4 και M2/M4 σε μυς (Tzavara, Bymaster et al. 2003).

Οι M5 μουσκαρινικοί υποδοχείς κλωνοποιήθηκαν τελευταίοι και εντοπίζονται σε ποικίλες εγκεφαλικές περιοχές, όπως ο μεσεγκέφαλος, η μέλαινα ουσία και η πλάγια καλυπτρική περιοχή (Bonner, Young et al. 1988). Αποτελούν, ωστόσο, μόνο το 2% του συνόλου των μουσκαρινικών υποδοχέων. Διαμεσολαβούν την αγγειοδιασταλτική δράση της ACh, ενώ έρευνες στο ραβδωτό δείχνουν ότι η ενεργοποίησή τους αναστέλλει την απελευθέρωση ντοπαμίνης (Foster, Gentry et al. 2014). Οι εν λόγω υποδοχείς επηρεάζουν τους μεσομεταιχμιακούς ντοπαμινεργικούς νευρώνες της κοιλιακής καλυπτρικής περιοχής, συμμετέχοντας στο σύστημα ανταμοιβής (Matsui, Yamada et al. 2004, Steidl, Miller et al. 2011, Garzon and Pickel 2013).

Τύπος υποδοχέα	Περιοχή	Κυτταρική λειτουργία	Συστημική λειτουργία
M1	Ραβδωτό, φλοιός, ιππόκαμπος.	Gq: μετασυναπτικά, τροποποίηση γρήγορης νευροδιαβίβασης και μεταβολικής λειτουργίας.	Μνήμη/Μάθηση, πιθανός ρόλος σε μορφές επιληψίας, διάσπαση αμυλοειδούς πρωτεΐνης, παραγωγή ιντελευκίνης-2.
M2	Βασικός πρόσθιος εγκέφαλος, θάλαμος, εγκεφαλικό στέλεχος, νωτιαίος μυελός, καρδιά, εξωκρινείς αδένες.	Gi: προσυναπτικά, ανασταλτικοί αυτο- και ετερο- υποδοχείς.	Ακινησία, αναλγησία, αύξηση του νευράξονα, βραδυκαρδία, συσταλτικότητα λείων μυών, βρογχόσπασμος, τρέμουλο, υποθερμία, σχηματισμός σάλιου.
M3	Εγκέφαλος (ευρεία κατανομή) υποθάλαμος, εξωκρινείς αδένες, περιφερικές αρτηρίες.	Όπως οι M1.	Όρεξη, Αγγειοχάλαση, απελευθέρωση NO, συσταλτικότητα λείων μυών, σχηματισμός σάλιου.
M4	Ραβδωτό, φλοιός, ιππόκαμπος, νωτιαίος μυελός.	Όπως οι M2 αλλά και με μετασυναπτική ανασταλτική λειτουργία.	Ρύθμιση της απελευθέρωσης ντοπαμίνης από το ραβδωτό, αναλγησία, μετανάστευση κερατινοκυττάρων.
M5	Ντοπαμινεργικοί νευρώνες, βασικά γάγγλια, εγκεφαλικά αγγεία.	Όπως οι M1.	Αγγειοχάλαση αρτηριών αιμάτωσης του εγκεφάλου.

Πίνακας 2: Οι M1-M5 υποδοχείς. Πηγή:

<http://www.cnsspectrums.com/aspx/articleDetail.aspx?articleid=1875>

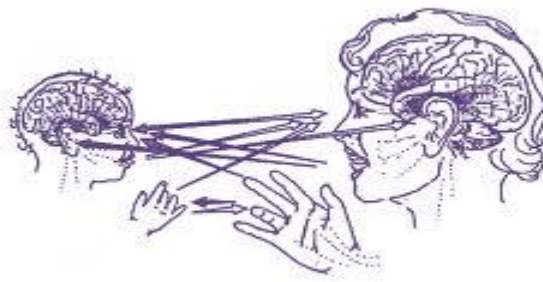
3. Πρώιμες εμπειρίες: η σχέση μητέρας-βρέφους

Όλοι οι έμβιοι οργανισμοί περνούν από το στάδιο της ανάπτυξης. Το στάδιο αυτό είναι καθοριστικό για την επιβίωση των ειδών και ιδιαίτερα για τα θηλαστικά. Το αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα (ΝΣ) απαιτεί την εμπειρία περισσότερο από τα υπόλοιπα συστήματα των οργανισμών, αφού χαρακτηρίζεται από έντονη πλαστικότητα ακόμη και στην ενήλικη ζωή. Έτσι, οι πρώιμες εμπειρίες είναι ζωτικής σημασίας για τη διαμόρφωση της προσωπικότητας και της συμπεριφοράς του ανθρώπου, όπως έχει υποδειχθεί από μελέτες συναισθηματικής στέρησης του Spitz, 1946. Για το λόγο αυτό, η σχέση μεταξύ γονέων (και ιδιαίτερα της μητέρας) και του απογόνου είναι καθοριστική.

Το ΝΣ είναι το κύριο δίκτυο επικοινωνίας μεταξύ των οργανισμών και του περιβάλλοντος. Αντίστοιχα, το βρέφος μέσω του αναπτυσσόμενου του νευρικού συστήματος εκλαμβάνει συναισθήματα, όπως η χαρά, με την επαφή του με τη μητέρα. Αυτή η σχέση είναι πολύ σημαντική, διότι η μητέρα δεν αποτελεί μόνο την πηγή για τη θρέψη του εμβρύου, αλλά και τον «ανιχνευτή» του εξωτερικού κόσμου, όπως υποστηρίζει η Melanie Klein (1975). Σύμφωνα με τον Freud (1905), οι εμπειρίες αυτές, που αφορούν τη σχέση του βρέφους με τη μητέρα του, είναι υψίστης σημασίας για την επερχόμενη ανάπτυξη και ωρίμανση του παιδιού, ιδιαίτερα σε ψυχικό επίπεδο.

Το νεογνό για να κατανοήσει ότι δεν μπορεί από μόνο του να εξασφαλίσει τα απαραίτητα θρεπτικά συστικά για να επιβιώσει στη βρεφική ηλικία χρειάζεται να περάσει από διάφορα στάδια, μέσα από τα οποία θα «νιώσει» τη μητρική φροντίδα. Αυτό αποτελεί και το πρώτο βήμα αντίληψης του περιβάλλοντος από το έμβρυο (Mahler, Pine, and Bergman, *The Psychological Birth of the Human Infant: Symbiosis and Individuation*, 1975).

Σε βρεφικό επίπεδο, οι κοινωνικές, γνωστικές, γλωσσικές ή συναισθηματικές εμπειρίες προέρχονται σχεδόν αποκλειστικά από την αλληλεπίδραση με τους γονείς (Bornstein, 2003: *Parenting and child development: Intracultural and intercultural perspectives*. In C. Poderico, P. Venuti, & R. Marcone, *Diverse culture: Bambini diversi? Rome, Italy: Unicopli*). Φαίνεται ακόμη ότι η ζεστασιά του μητρικού σώματος επηρεάζει το ενδοκρινολογικό σύστημα του βρέφους και το μητρικό χάδι επηρεάζει την παραγωγή αυξητικής ορμόνης και επιδρά στη λειτουργία και δομή του εγκεφάλου του βρέφους. Οι πρώτες αλληλεπιδράσεις δεν αποτελούν τη βάση μόνο για να μάθει το βρέφος τις βασικές δεξιότητες επικοινωνίας, αλλά προσαρμόζοντας η μητέρα τη συμπεριφορά της στο βρέφος, το βοηθάει να ελαχιστοποιήσει το στρες και να ρυθμίσει τη συναισθηματική του κατάσταση (Dennis 2006). Η σχέση μητέρας- παιδιού ωστόσο, είναι αμφίδρομη, αφού το έμβρυο δύναται να τροποποιεί και τον εγκέφαλο του γονέα (Swain 2008).



Εικόνα 18: Επικοινωνία μητέρας- παιδιού.

Πηγή: <https://www.continuingcourses.net/active/courses/course063.php>

Το πρώιμο στρες μπορεί να επιφέρει αλλαγές σε διάφορα όργανα. Για παράδειγμα, πειραματικές μελέτες αρουραίων δείχνουν ότι το πρώιμο στρες επηρεάζει τον εγκέφαλο, αλλαγές που έχουν συσχετιστεί με ψυχιατρικές ασθένειες όπως η κατάθλιψη (O'Mahony, Marchesi et al. 2009). Άξια ενδιαφέροντος είναι τα ευρήματα που προκύπτουν από μελέτες παιδιών που έζησαν σε συνθήκες παραμέλησης ή που κακοποιήθηκαν, από τη μελέτη της επίδρασης της επαρκούς μητρικής συμπεριφοράς, καθώς και του προγεννητικού stress στο έμβρυο, σε επίπεδο συναισθηματικής διαμόρφωσης. Τα κακοποιημένα παιδιά εμφάνιζαν λιγότερο έντονα θετικά συναισθήματα, όπως η χαρά και η ελπίδα, ενώ τα αρνητικά συναισθήματα δεν παρουσίαζαν αλλαγές μεταξύ των κακοποιημένων ή μη παιδιών. Τα καταθληπτικά συμπτώματα στη μητέρα, από την άλλη πλευρά, μπορεί να επηρεάσουν και τον απόγονο, όπως υποδεικνύουν πρόσφατες έρευνες (Koizumi and Takagishi 2014, Ohoka, Koide et al. 2014). Φαίνεται ακόμα ότι και η περίπτωση περιγεννητικής υποξίας μπορεί να επιδρά αρνητικά σε νευροβιολογικό επίπεδο στον απόγονο (Pagida, Konstantinidou et al. 2013).

Η επίδραση του πρώιμου περιβάλλοντος στη λειτουργία του εγκεφάλου έχει μελετηθεί εκτενώς σε τρωκτικά (ποντίκια και αρουραίους) και λιγότερο σε πιθήκους, μέσα από πειραματικά μοντέλα. Τα πειραματικά μοντέλα που έχουν χρησιμοποιηθεί στα τρωκτικά είναι:

α) ανατροφή από «επιλεγμένες» μητέρες που δείχνουν ιδιαίτερα καλή μητρική συμπεριφορά,

β) μητρική αποστέρηση: απομάκρυνση των νεογνών από τη μητέρα. Η διάρκεια της απομάκρυνσης δύναται να διαφέρει, ανάλογα με το εργαστήριο στο οποίο εφαρμόζεται (έχουν αναφερθεί περίοδοι απομάκρυνσης από μία ως 24 ώρες κατά τη διάρκεια των δύο πρώτων εβδομάδων μετά τη γέννηση),

γ) νεογνικός χειρισμός: απομάκρυνση των νεογνών από τη μητέρα για μικρό χρονικό διάστημα (συνήθως δεκαπέντε λεπτά ημερησίως) κατά τη διάρκεια της γαλουχίας,

δ) ανάπτυξη σε εμπλουτισμένο περιβάλλον: τα πειραματόζωα ζουν μετά τον απογαλακτισμό σε κλουβιά που περιέχουν «δραστηριότητες» (κυλιόμενες ρόδες, σκάλες, τούνελ κλπ), οι οποίες ανανεώνονται τακτικά και

ε) προγεννητικό stress: έκθεση της εγκυμονούσας μητέρας σε stress και μελέτη, στη συνέχεια, των απογόνων.

Σύντομη ανασκόπηση περί του άξονα του στρες.

Ο άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (Hypothalamic–Pituitary–Adrenal axis-HPA), όπως πρωτοπεριγράφηκε από το Selye, παρουσιάζει έντονη απόκριση στο στρες (Selye and Fortier 1949, Selye 1950, Selye 1973, Selye 1985). Ο τελικός στόχος, έπειτα από την ενεργοποίηση των επινεφριδίων, είναι η παραγωγή ορμονών του στρες, όπως λέγονται, προκειμένου να απαντήσει ο οργανισμός στο στρεσογόνο ερέθισμα που δέχτηκε. Κατά τη διάρκεια του στρες προκαλείται έκκριση εκλυτικών παραγόντων από τον παρακοιλιακό πυρήνα (Paraventricular Nucleus- PVN) του υποθαλάμου, όπως ο εκλυτικός παράγοντας (ορμόνη) της φλοιοτρόπου ορμόνης (Corticotropine Releasing Factor/Hormone- CRF/CRH) και η βασοπρεσίνη (ή αντιδιουρητική ορμόνη- AVP), καθώς και οι συνεκρινόμενες ωκυτοκίνη (ή οξυτοκίνη- oxytocin) και αγγειοτενσίνη II, στο πυλαίο σύστημα της πρόσθιας υπόφυσης. Η CRH προκαλεί αύξηση στην απελευθέρωση της φλοιοτρόπου ορμόνης (Adrenocorticotrophic hormone- ACTH) στην κυκλοφορία (Rivier, Brownstein et al. 1982, Rivier and Vale 1983, Gibbs, De Vaus et al. 1986, Rivier and Plotsky 1986). Τα αυξημένα επίπεδα ACTH οδηγούν σε αύξηση της έκκρισης γλυκοκορτικοειδών από τα επινεφρίδια (κορτικοστερόνη-CORT στους επίμυες, κορτιζόλη στον άνθρωπο). Τα έντονα καταβολικά γλυκοκορτικοειδή προκαλούν λιπόλυση, αυξάνοντας τα επίπεδα των ελεύθερων λιπαρών οξέων, γλυκογονόλυση, αυξάνοντας τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα και καταβολισμό των πρωτεϊνών, που αυξάνει τη διαθεσιμότητα των αμινοξέων ως υποστρώματα γλυκονεογένεσης, αυξάνοντας περαιτέρω τα επίπεδα γλυκόζης. Όλες αυτές οι δράσεις μαζί βοηθούν τον οργανισμό υπό συνθήκες στρες, αυξάνοντας τη διαθεσιμότητα ενεργειακών υποστρωμάτων (Munck, Guyre et al. 1984, Baxter and Tyrrell 1994).

Ωστόσο, η συνεχιζόμενη έκθεση σε αυξημένα επίπεδα γλυκοκορτικοειδών μπορεί να αποτελέσει σοβαρό κίνδυνο για τον οργανισμό, οδηγώντας σε καταστολή διεργασιών (σύνθεση) του αναβολισμού, μυϊκή ατροφία, μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη, υπέρταση, υπερλιπιδαιμία, υπερχοληστερολαιμία, αγγειακή νόσο, αμνηρόρια, ανικανότητα και παρεμπόδιση της ανάπτυξης και επούλωσης των ιστών, καθώς και σε ανοσοκαταστολή (Baxter and Tyrrell 1994). Οπότε προφανώς, πρέπει να υπάρχει ένας μηχανισμός ελέγχου, που θα σταματά την κινητοποίηση του οργανισμού μετά το πέρας του στρεσογόνου ερεθίσματος. Ο σκοπός αυτός επιτελείται μέσω αναστολής της έκκρισης ορμονών, όπως η ACTH, από τον ίδιο τον

αμυγδαλή και ίσως και ο υπομεταιχμιακός φλοιός (IL) ενισχύουν την έκκριση γλυκοκορτικοειδών (Herman, Ostrander et al. 2005).

Το μεταιχμιακό σύστημα φαίνεται να έχει συγκεκριμένο ρόλο τόσο ανά εγκεφαλική περιοχή όσο και ανά τον τύπο του ερεθίσματος. Οι άμεσες προβολές του όμως, προς τους απαγωγούς νευρώνες του PVN, που κατευθύνονται προς τον ΥΥΕ άξονα φαίνεται να είναι λίγες (Herman, Ostrander et al. 2005). Αν δούμε πιο ολιστικά την επίδραση του μεταιχμιακού συστήματος στον άξονα HPA, φαίνεται να είναι το τελικό αποτέλεσμα όλων των αποκρίσεων σε δεδομένα ερεθίσματα και γλυκοκορτικοειδή, με το μέγεθος της εκκριτικής απόκρισης να καθορίζεται σε σχέση με την εκάστοτε συνεισφορά των διαφόρων δομών (Herman, Ostrander et al. 2005).

Στους επίμυς, ο αναπτυσσόμενος ΥΥΕ άξονας διαφέρει από αυτόν των ενηλίκων. Τα επίπεδα κορτικοστερόνης (CORT) στο πλάσμα του αίματος από την 4η ως τη 14η ημέρα μετά τη γέννηση είναι χαμηλά και τα επινεφρίδια δεν είναι ευαίσθητα στη φλοιοτρόπο ορμόνη (ACTH). Η περίοδος αυτή είναι γνωστή ως περίοδος μειωμένης αποκριτικότητας στο στρες (stress-hyporesponsive period-SHRP). Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, η έκκριση φλοιοτρόπου ορμόνης (ACTH) παρατηρείται μετά τον άμεσο ερεθισμό της υπόφυσης με εκλυτική ορμόνη της φλοιοτρόπου ορμόνης (CRH). Ωστόσο, οι αποκρίσεις αυτές δεν είναι τόσο ισχυρές σε σύγκριση με αυτές των ενήλικων επίμυων (Suchecki, Rosenfeld et al. 1993). Σημαντικό είναι ακόμη ότι ο ΥΥΕ άξονας των απογόνων φαίνεται να επηρεάζεται από τη λειτουργία του μητρικού ΥΥΕ, έπειτα από πειραματικές μελέτες σε επίμυς (Dinches, Romeo et al. 2014). Τέλος, ο αναπτυσσόμενος εγκέφαλος μπορεί να επηρεαστεί και από άλλους παράγοντες του μικροπεριβάλλοντος, όπως ο TNF-α (Tumor necrosis factor-alpha, μια κυτοκίνη που εκκρίνεται κυρίως από μακροφάγα στη συστηματική φλεγμονή) και να επιφέρει αλλαγές συμπεριφοράς που σχετίζονται με το άγχος και την κατάθλιψη, και μάλιστα με φυλοεξαρτώμενο τρόπο (αύξηση του στρες στα αρσενικά και μείωση στα θηλυκά) (Babri, Doosti et al. 2014).

3.1. Μητρότητα & Μητρική συμπεριφορά

Ο τομέας ερευνών της Ψυχονευροβιολογίας και της Βιολογικής Ψυχολογίας της Ανάπτυξης έχει διερευνηθεί κατά κόρον τα τελευταία χρόνια. Σημαντική είναι η προσπάθεια των ερευνών αυτών να αποδείξουν θεωρίες σαν αυτή του Freud, που αφορά τη σημαντικότητα της σχέσης μητέρας-απογόνου κατά τα πρώιμα στάδια ζωής για την μετέπειτα ανάπτυξη του νεογνού. Η σταθερή και καλή σχέση μεταξύ της μητέρας και του απογόνου, μαζί με την αποκαλούμενη μητρική φροντίδα, είναι αναπόσπαστα στοιχεία της φυσιολογικής ανάπτυξης και ενηλικίωσής του, ενώ αντίθετα, η κακομεταχείριση και η αδιαφορία της μητέρας, και των γονέων γενικότερα, προς το παιδί μπορεί να οδηγήσει σε ψυχοπαθολογικές καταστάσεις (Heim and Nemeroff 2001, McEwen 2003, Nemeroff 2004).

Για το νεογνό επίμυ, η μητέρα του αποτελεί την πιο βασική και ουσιαστική πηγή αισθητικών πληροφοριών στο μεταγεννητικό περιβάλλον και η αλληλεπίδραση μητέρας-νεογνού επηρεάζει την ανάπτυξη και λειτουργία των συνάψεων του υποκάμπου, καθώς και την επιβίωση νευρώνων (Liu, Diorio et al. 1997, Liu, Diorio et al. 2000, Bredy, Grant et al. 2003). Η μητρική συμπεριφορά των επίμυων συμβαίνει σε «δόσεις», οι οποίες μετά τη γέννηση διαρκούν περίπου μία ώρα η μία και χωρίζονται από ολιγόλεπτα διαστήματα κατά τα οποία η μητέρα βρίσκεται μακριά από τα νεογνά της. Από τη γέννηση μέχρι τον απογαλακτισμό αυξάνονται τα μεσοδιαστήματα μεταξύ των «δόσεων» και μειώνεται η διάρκεια κάθε «δόσης», με τον αριθμό τους να μένει ίδιος, μέχρι που στον απογαλακτισμό σταματούν τελείως. Η κάθε «δόση» καταμετρείται από την 1^η ενεργητική μητρική συμπεριφορά μετά από οπτικά, ακουστικά και οσφρητικά ερεθίσματα από τα νεογνά της. Αρχικά, η μητέρα περισυλλέγει τα νεογνά κοντά της και τα γλείφει, ενώ «αιωρείται» από πάνω τους, μέχρι αρκετά νεογνά να έχουν από μια θηλή και να θηλάσουν. Στη συνέχεια, λαμβάνει μια άκαμπτη στάση με τη ράχη της σε μορφή αψίδας προς τα πάνω, αποκαλούμενη κύφωση, για αρκετή ώρα, η οποία δίνει χώρο στα νεογνά όσο θηλάζουν. Όταν η ένταση του θηλαστικού ερεθίσματος είναι μεγάλη, λαμβάνει θέση «υψηλής αψίδας», ενώ σε αντίθετη περίπτωση «χαμηλής αψίδας» (Pryce, Bettschen et al. 2001).

Ο απτικός ερεθισμός που προέρχεται από το μητρικό γλείψιμο/περιποίηση (LG) και το θηλασμό με «αψιδωτή» ράχη (ABN) φαίνεται να είναι κρίσιμος για την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος. Οι απόγονοι μητέρων που επιδεικνύουν αυξημένο LG και ABN (high LG-ABN μητέρες) εκφράζουν αυξημένα επίπεδα υποδοχέων NMDA, νευροτροφικών παραγόντων όπως ο BDNF, καθώς και ενισχυμένη χωρική μάθηση και μνήμη (Liu, Diorio et al. 2000). Αυτά τα αποτελέσματα της μητρικής φροντίδας αναστρέφονται με διασταυρούμενη ανατροφή, έτσι ώστε, ως ενήλικες, οι βιολογικοί απόγονοι μητέρων που επιδεικνύουν μειωμένο LG και ABN (low LG-ABN μητέρες) που ανατρέφονται από μητέρες high LG-ABN να μη διαφέρουν από βιολογικούς απόγονους μητέρων high LG-ABN όσον αφορά την ανάπτυξη του υποκάμπου ή τη χωρική μάθηση και μνήμη (Liu, Diorio et al. 2000). Φαίνεται μάλιστα, ότι οι απόγονοι μητέρων high LG-ABN έχουν ενισχυμένη μάθηση σε συνθήκες χαμηλού στρες, ενώ αντίθετα οι απόγονοι μητέρων low LG-ABN έχουν ενισχυμένη μάθηση σε συνθήκες υψηλού στρες (Champagne, Bagot et al. 2008). Επίσης, οι απόγονοι των «καλών» μητέρων εμφανίζουν αυξημένη έκφραση των NMDA υποδοχέων και του mRNA του νευροτροφικού παράγοντα BDNF, αυξημένη χολινεργική εννεύρωση του υποκάμπου και αυξημένη επιβίωση των υποκάμπιων νευρώνων, αλλά και ενισχυμένη λειτουργία χωρικής μάθησης/μνήμης (Liu, Diorio et al. 2000, Bredy, Grant et al. 2003).

Όπως προαναφέρθηκε υπάρχουν διάφορα ζωικά μοντέλα για να παρατηρηθούν οι επιπτώσεις της καλής και κακής μητρικής συμπεριφοράς στους

απογόνους σε επίπεδο νευροβιολογίας, όπως η μητρική αποστέρηση και ο νεογνικός χειρισμός, που αναλύονται στις παραγράφους 3.2 και 3.3.

3.2. Μητρική αποστέρηση

Η μητρική αποστέρηση (ΜΑ), καθώς επίσης και η κακομεταχείριση παιδιών σεξουαλικά ή μη, έχει συσχετιστεί με συμπεριφορικές διαταραχές κατά την ενηλικίωση (Higley, Suomi et al. 1996, Bremne and Vermetten 2001, Heim and Nemeroff 2001, Heim, Newport et al. 2001, Gartside, Johnson et al. 2003, Daniels, Pietersen et al. 2004). Οι διαταραχές αυτές περιλαμβάνουν επεισόδια κατάθλιψης, άγχους ή και συμπεριφορές ουσιοεξάρτησης και προβλήματα στη μάθηση (Zaharia, Kulczycki et al. 1996, Arborelius, Owens et al. 1999, Sadowski, Ugarte et al. 1999, Anand and Scalzo 2000, Huot, Plotsky et al. 2002). Η μητρική αποστέρηση αφορά την απομάκρυνση των νεογνών από τη μητέρα μέχρι τον απογαλακτισμό για μεγάλο χρονικό διάστημα (τουλάχιστον για 2 ώρες ημερησίως).

Ένα αποτέλεσμα της επαναλαμβανόμενης μητρικής αποστέρησης είναι η τροποποίηση του ΥΥΕ (Υποθαλαμο-υποφύσο-επινεφριδιακό) άξονα και η περαιτέρω επίδρασή της στις συναισθηματικές καταστάσεις. Φαίνεται ότι οι αλλαγές αυτές, παρόλο που ο μοριακός μηχανισμός τους δεν έχει ανιχνευθεί ακόμη, έχουν επίδραση στα επίπεδα κορτικοστερόνης (τελικό προϊόν της ενεργοποίησης του ΥΥΕ άξονα στα τρωκτικά, αντίστοιχο της κορτιζόλης στον άνθρωπο) και στην έκφραση του πρωτο-ογκογονιδίου *c-fos*, που εμπλέκεται σε διάφορες βασικές κυτταρικές λειτουργίες όπως η κυτταρική διαφοροποίηση και επιβίωση, με ιστοειδικό τρόπο (Nishi, Horii-Hayashi et al. 2013).

Στις αλλαγές που συμβαίνουν στον ενήλικο εγκέφαλο λόγω του πρώιμου στρες φαίνεται να εμπλέκονται διάφοροι νευροδιαβιβαστές (Heim, Newport et al. 2001). Στην περίπτωση της σεροτονίνης (5-HT), η μητρική αποστέρηση προκαλεί αλλαγή στην πυκνότητα του μεταφορέα της και του υποδοχέα της 5-HT_{1A} (Vicentic, Francis et al. 2006). Αλλαγές πραγματοποιούνται όμως και στο χολινεργικό σύστημα, αφού το ένζυμο AChE (ακετυλοχολινεστεράση), που διασπά την ακετυλοχολίνη σε οξικό οξύ και χολίνη, μειώνεται στο φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων σε αρουραίους που έχουν υποστεί μητρική αποστέρηση, όπως και η πυκνότητα των χολινεργικών ινών στον οπισθοσπλήνιο φλοιό (arkovic, Radonjic et al. 2014). Αντίθετα, σύμφωνα με την ίδια μελέτη, στον υπόκαμπο παρατηρείται αύξησή της AChE με αντίστοιχη αύξηση της πυκνότητας των χολινεργικών ινών. Έτσι φαίνεται ότι το στρες που επάγεται από τη μητρική αποστέρηση μπορεί να προκαλέσει ιστοειδικές αλλαγές στη δομή των χολινεργικών νευρώνων του εγκεφάλου.

Συνεχίζοντας σχετικά με το χολινεργικό σύστημα, πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι το πρώιμο στρες, που επάγεται έπειτα από μητρική αποστέρηση αλλά

και από η χορήγηση μιας ανοσοτοξίνης (immunotoxin 192 IgG-saporin), επηρεάζει την ευαλωτότητα των χολινεργικών νευρώνων καθώς και τις γνωστικές λειτουργίες του ελέγχου (Aisa, Gil-Bea et al. 2009, Rastogi, Unni et al. 2014). Πιο συγκεκριμένα, τα ένζυμα AChE και ChAT (Choline Acetyl Transferase, το ένζυμο σύνθεσης του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη) βρέθηκαν περισσότερο μειωμένα στους αρουραίους που είχαν υποστεί μητρική αποστέρηση και κάκωση των χολινεργικών τους κυττάρων έπειτα από τη δράση της τοξίνης, σε σχέση με ζώα ελέγχου που έχουν υποστεί μόνο χολινεργική κάκωση. Αξιοποιώντας τη δοκιμασία χωρικής μάθησης και μνήμης Morris Water Maze (MWM), βρέθηκε ακόμη ότι τα ζώα αυτά είχαν βλάβη στις λειτουργίες μάθησης και μνήμης, αλλά και επακόλουθα άλλα ελλείμματα κατά την ενήλική τους ζωή, όπως σημαντική μείωση στους υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών, η οποία μάλιστα συνοδευόταν από αύξηση των επιπέδων mRNA της CRH (Corticotropine Releasing Hormone). Τέλος, στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκαν επίσης, μειωμένα επίπεδα του νευροτροφικού παράγοντα NGF (Nerve Growth Factor) και αυξημένα επίπεδα του υποδοχέα του NGF-p75NTR, στα πειραματόζωα που είχαν υποστεί τη μητρική αποστέρηση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου που είχε υποστεί βλάβη με την IgG σαπορίνη, όπως και η ομάδα της μητρικής αποστέρησης (Aisa, Gil-Bea et al. 2009). Επιπρόσθετες μελέτες των επιδράσεων του πρώιμου στρες στο χολινεργικό σύστημα του εγκεφάλου πειραματοζώων δείχνουν ότι το στρες αλλοιώνει τη φυσιολογική λειτουργία του προμετωπιαίου λοβού, μέσω απελευθέρωσης ιόντων Ca^{++} και μείωση της ενεργοποίησης των μουςκαρινικών χολινεργικών υποδοχέων. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι το πρώιμο στρες παραβιάζει τις λειτουργίες που εποπτεύονται από χολινεργικούς νευρώνες στα εγκεφαλικά ημισφαίρια και αυξάνει την πιθανότητα να διακοπεί η ωρίμανση των επιτελικών λειτουργιών (Proulx, Suri et al. 2013). Επιπλέον, οι επιπτώσεις της μητρικής αποστέρησης στο χολινεργικό σύστημα παρατηρήθηκαν και από άλλες ερευνητικές ομάδες, όπου σημειώθηκε αύξηση της AChE στον υπόκαμπο και στον περιρινικό φλοιό. Αυτή η άνοδος στη δραστηριότητα του ενζύμου δύναται να ανασταλλεί ως ένα βαθμό, χορηγώντας αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης, όπως η γαλανθαμίνη και η δονεπεζίλη σε δοσολογία 1 mg/kg σωματικού βάρους (Benetti, Mello et al. 2009). Το ένζυμο AChE εμφανίστηκε σε αυξημένα επίπεδα και στη μελέτη των Zugno et al, σε περιοχές όπως ο υπόκαμπος, ο εγκεφαλικός φλοιός και το ραβδωτό σώμα. Όλα αυτά τα ευρήματα συγκλίνουν προς ένα νευροχημικό προφίλ του χολινεργικού συστήματος που έχει υποστεί σαφείς αλλοιώσεις (Zugno, de Miranda et al. 2013).

Τέλος, η μητρική αποστέρηση σε πρώιμη ηλικία φαίνεται να επιδρά και στους νευροτροφικούς παράγοντες που επηρεάζουν το χολινεργικό σύστημα. Συγκεκριμένα, στον αναπτυσσόμενο υπόκαμπο των επίμυων βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του NGF (Nerve Growth Factor) νευροτροφικού παράγοντα, ο οποίος εμπλέκεται στην ανάπτυξη των χολινεργικών νευρώνων του ΚΝΣ, στη νευρωνική πλαστικότητα, στην απόπτωση και σε διαδικασίες μνήμης/μάθησης

(Auburger, Heumann et al. 1987, Rabizadeh, Oh et al. 1993, Calamandrei and Alleva 1995, Cirulli, Micera et al. 1998).

3.3. Νεογνικός χειρισμός

Ο νεογνικός ή πρώιμος χειρισμός είναι ένα ζωικό μοντέλο πρώιμων εμπειριών που αναπτύχθηκε για πρώτη φορά από τον Levine και έκτοτε χρησιμοποιήθηκε ευρέως σε μελέτες αρουραίων (Levine 1957). Αυτό που εφαρμάστηκε κυρίως ως νεογνικός χειρισμός ήταν η καθημερινή απομάκρυνση των νεογνών από τη μητέρα τους για 15 λεπτά.

Ο νεογνικός χειρισμός, αν τον δούμε πιο σφαιρικά, είναι μια αντανάκλαση της συμπεριφοράς των τρωκτικών στη φύση, αφού οι γονείς εγκαταλείπουν για λίγη ώρα τα παιδιά τους με σκοπό την αναζήτηση τροφής. Αυτό το πρότυπο της μητρικής απομάκρυνσης από τη φωλιά αναπτύχθηκε και εργαστηριακά (15 λεπτά αποχωρισμού από τη μητέρα και τη φωλιά μέχρι τον απογαλακτισμό- 22^η ημέρα). Κατά το χρονικό διάστημα απομάκρυνσής τους από τη μητέρα τα νεογνά της ίδιας γέννας τοποθετούνται όλα μαζί σε ξεχωριστό κλουβί. Εξασφαλίζεται ότι η θερμοκρασία και οι άλλοι περιβαλλοντικοί παράμετροι παραμένουν σταθερές. Λόγω του ελάχιστου χρόνου απομάκρυνσης από τη μητέρα, ο παράγοντας ανεπαρκούς θηλασμού θεωρείται αμελητέος. Επομένως, στο μοντέλο αυτό εστιάζουμε στην απομάκρυνση των νεογνών από τη μητέρα και στην επακόλουθη διαφοροποίηση των προσλαμβανόμενων οσφρητικών και απτικών ερεθισμάτων (Meaney, Aitken et al. 1991). Η σχέση μητέρας-νεογνού διαμεσολαβείται και από υπέρηχες φωνήσεις που εκπέμπουν τα νεογνά με την επιστροφή τους στο μητρικό κλουβί (Bell, Nitschke et al. 1971, Bell, Nitschke et al. 1974).

Στο πειραματικό αυτό μοντέλο παρατηρήθηκε ότι οι μητέρες αρουραίοι παρείχαν αυξημένη μητρική φροντίδα σε αυτούς, ανάλογη των φυσικών μητέρων υψηλής περιποίησης (γλείφουν τον απόγονο για καθαριότητα και φροντίδα- High LG μητέρες) (Smotherman 1983, Pryce, Bettschen et al. 2001, Fenoglio, Chen et al. 2006). Μάλιστα, έχει προταθεί ότι πιθανότατα τα αποτελέσματά του νεογνικού χειρισμού διαμεσολαβούνται (έστων εν μέρει) από την αυξημένη μητρική φροντίδα τύπου «αψιδωτής» ράχης που επιδεικνύουν οι μητέρες στα νεογνά μετά το χειρισμό (Pryce, Bettschen et al. 2001). Οι απόγονοι αυτών των μητέρων φαίνεται να είναι πιο ευπροσάρμοστοι και να αντιμετωπίζουν καλύτερα τα διάφορα στρεσογόνα ερεθίσματα του περιβάλλοντος, ως αποτέλεσμα της καλύτερης λειτουργίας του ΥΥΕ (Υποθάλαμος-Υπόφυση-Επινεφρίδια) άξονα και έχουν πιο ανεπτυγμένες τις γνωστικές τους λειτουργίες (Levine 1957, Escorihuela, Tobena et al. 1994, Meerlo, Horvath et al. 1999, Liu, Diorio et al. 2000, Fenoglio, Brunson et al. 2005, Fenoglio, Chen et al. 2006, Stamatakis, Pondiki et al. 2008). Αντιθέτως, όπως αναφέρθηκε ήδη, διάφορα πρωτόκολλα μητρικής αποστέρησης, όπως και φυσικές

χαμηλής περιποίησης μητέρες (Low LG μητέρες), δείχνουν τις δραματικές επιπτώσεις στους απογόνους και συγκεκριμένα στη λειτουργία του ΥΥΕ άξονα, το άγχος, την προσαρμοστικότητα και στις γνωστικές λειτουργίες αυτών (Liu, Diorio et al. 2000, Levine 2001, Sanchez, Ladd et al. 2001).

Από τις πρώτες μελέτες εφαρμογής του νεογνικού χειρισμού γνωρίζουμε ότι η ανάπτυξη της στοιχειώδους αντίδρασης προσαρμογής σε ένα στρεσογόνο ερέθισμα αλλά και η διαμόρφωση συγκεκριμένων νευροχημικών συστημάτων μπορεί να τροποποιηθεί από περιβαλλοντικά ερεθίσματα κατά τη νεογνική περίοδο του οργανισμού (Meaney, Aitken et al. 1991, Meaney, Mitchell et al. 1991, Meaney, Viau et al. 1991). Σε επίπεδο συμπεριφοράς, φαίνεται ότι τα πειραματόζωα που έχουν υποστεί το πειραματικό αυτό μοντέλο αντιμετωπίζουν ευκολότερα νέα ερεθίσματα στην ενήλική τους ζωή και επιδεικνύουν μεγαλύτερη άνεση σε νέα περιβάλλοντα. Τα πειραματόζωα που έχουν υποστεί το νεογνικό χειρισμό παρουσιάζουν επίσης μειωμένη έκκριση φλοιοεπινεφριδιακών ορμονών ύστερα από έκθεση σε ποικίλα στρεσογόνα ερεθίσματα (Levine 1967).

Ο πρώιμος ή νεογνικός χειρισμός δύναται να επηρεάσει διάφορα συστήματα νευροδιαβίβασης. Για παράδειγμα, σε προηγούμενες πειραματικές μελέτες του εργαστηρίου Βιολογίας/Βιοχημείας, ο νεογνικός χειρισμός επηρέασε το χολινεργικό σύστημα του εγκεφάλου (Pondiki, Stamatakis et al. 2006). Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αυξημένη πυκνότητα ανοσοθετικών κυττάρων για το ένζυμο ChAT στην περιοχή του μέσου διαφράγματος/διαγώνιας ταινίας του Broca, ενώ όχι σε περιοχές άλλες όπως ο μεγαλοκυτταρικός προοπτικός πυρήνας ή ο πυρήνας του Meynert. Επίσης, βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα θέσεων πρόσδεσης M1 και M2 μουσκαρινικών υποδοχέων στο φλοιό του προσαγωγείου και στον απιοειδή φλοιό, αλλά και στις CA3, CA4 περιοχές του υποκάμπου. Παράλληλα παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων της AChE στον υποκάμπο μόνο των θηλυκών επίμυων. Φαίνεται λοιπόν ότι ο νεογνικός χειρισμός μπορεί να επιφέρει σεξουαλικά διμορφικά αποτελέσματα, ενώ επιδρά μάλλον θετικά στο χολινεργικό σύστημα του εμπρόσθιου εγκεφάλου. Η τελευταία μάλιστα παρατήρηση μπορεί να δικαιολογήσει και τις καλύτερες γνωστικές ικανότητες αλλά και την καλύτερη λειτουργία του ΥΥΕ άξονα, υποβοηθώντας την προσαρμοστικότητα και την απάντηση στο στρες των πειραματοζώων που υφίστανται πρώιμο χειρισμό (Pondiki, Stamatakis et al. 2006). Σχετικά με τη σύνδεση του χολινεργικού συστήματος και του άξονα ΥΥΕ έχουν διατυπωθεί διάφορες υποθέσεις, μια εκ των οποίων είναι η πιθανή ευθύνη του πρώτου σε συμπεριφορές «αναισθησίας» στις συναισθηματικές διαταραχές (Vakalopoulos 2013).

Ο νεογνικός χειρισμός αυξάνει επίσης την ευαισθησία στην οξεία νευροεκφύλιση σε ενήλικους επίμυς, έπειτα από χορήγηση γλουταμικού νευροτοξικού αναλόγου του υποδοχέα N-methyl-D-aspartate (NMDA) στο βασικό μεγαλοκυτταρικό πυρήνα (nucleus basalis magnocellularis –NBM). Συγκεκριμένα, βρέθηκε μικρότερος αριθμός ανοσοθετικών κυττάρων για το ένζυμο ChAT καθώς

και ινών θετικών για το ένζυμο AChE, στο σωματοαισθητικό φλοιό του βεβλημένου ημισφαιρίου, ενώ στο άλλο ημισφαίριο δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές μεταξύ των μαρτύρων και αυτών που υποβλήθηκαν σε νεογνικό χειρισμό (Horvath, Harkany et al. 2004).

Ακόμη, ο πρώιμος χειρισμός δύναται να επηρεάσει και τους διάφορους νευροτροφικούς παράγοντες του εγκεφάλου. Επί παραδείγματι, η νευροτροφίνη-3 (NT-3), η οποία παίζει σπουδαίο ρόλο κατά την ανάπτυξη του εγκεφάλου, βρέθηκε αυξημένη στον εγκέφαλο αρουραίων, έπειτα από υποβολή τους σε δοκιμασία νεογνικού χειρισμού (Garoflos, Stamatakis et al. 2007). Επίσης, μια άλλη νευροτροφίνη που βρέθηκε σε αυξημένα επίπεδα στον υπόκαμπο αρουραίων σε νεογνικού χειρισμού είναι η BDNF (Garoflos, Stamatakis et al. 2005). Τέλος, τα επίπεδα του παράγοντα αύξησης των νευρικών κυττάρων (nerve growth factor-NGF) επηρεάζονται από το νεογνικό χειρισμό και μάλιστα, η νευροπροστασία που προέρχεται από το νεογνικό χειρισμό φαίνεται να πηγάζει από την ύπαρξη αυξημένων επιπέδων NGF στον υπόκαμπο (Pham, Soderstrom et al. 1997).

3.4. Η συμπεριφορική δοκιμασία νεογνικής μάθησης σε λαβύρινθο σχήματος T- (T-maze neonatal learning)

Κατά τη νεογνική περίοδο, τα ζώα που ακόμα έχουν άμεσα την ανάγκη της μητέρας για την επιβίωσή τους σχηματίζουν ένα δεσμό επαφής με τη μητέρα τους και η μητρική αυτή επαφή αποτελεί ένα σημαντικό συστατικό των περιβαλλοντικών ερεθισμάτων των νεογνών. Η σίτιση των νεογνών από τη μητέρα, ο θηλασμός, καθώς και η μητρική φροντίδα, η περιποίηση και το γλείψιμο (licking και grooming) αποτελούν ένα θετικό και ενθαρρυντικό ερέθισμα, ενώ αντίθετα η άρνηση της μητρικής επαφής επιδρά ως αρνητικό και ματαιωτικό ερέθισμα. Πριν τα νεογνά ανοίξουν τα μάτια τους, κάτι που συμβαίνει μεταξύ της 13ης και 14ης μέρας, αλληλεπιδρούν με τα υπόλοιπα νεογνά της φωλιάς και κυρίως με τη μητέρα τους μέσω απτικών, οσφρητικών και ακουστικών ερεθισμάτων. Αυτά τα ερεθίσματα αποτελούν τις πρώτες εμπειρίες μάθησης, που εστιάζουν κυρίως στο σχηματισμό και τη διατήρηση του δεσμού με τη μητέρα και χαράζουν τα πρώτα μνημονικά ίχνη. Το να ψάχνει το νεογνό για τη μητέρα του και να έρθει σε επαφή μαζί της είναι ένα πολύ ισχυρό ένστικτο, με μεγάλη σημασία για την επιβίωση του ζώου (Pham, Soderstrom et al. 1997).

Η νεογνική εκπαίδευση σε λαβύρινθο σχήματος T είναι ένα μοντέλο νεογνικής εμπειρίας που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο Βιολογίας/Βιοχημείας με σκοπό τον έλεγχο των επιπτώσεων (στους ενήλικους επίμους) μιας πρώιμης εμπειρίας που συνοδεύεται από επιβράβευση ή άρνηση της παρεχόμενης ανταμοιβής στον εγκέφαλο (Panagiotaropoulos, Diamantopoulou et al. 2009,

Stamatakis, Diamantopoulou et al. 2013). Οι νεογνικοί επίμυες χωρίζονται τυχαία σε τρεις ομάδες: στην ομάδα των μαρτύρων (που δεν εκτίθεται στη δοκιμασία), την ομάδα που θα λάβει ανταμοιβή μέσω επαφής με τη μητέρα (Receiving the Expected Reward- RER) και την ομάδα που θα λάβει ματαίωση- άρνηση ανταμοιβής (Denied the Expected Reward- DER), κατά την περίοδο των νεογνικών ημερών 10-13 (Postnatal day 13- PND13). Η δοκιμασία περιλαμβάνει την εκπαίδευση των νεογνών 10 φορές ανά ημέρα και ξεχωριστά μεταξύ τους (ατομικά). Ο ένας βραχίονας του λαβυρίνθου καταλήγει στον κλωβό που βρίσκεται η μητέρα τους, ενώ ο άλλος καταλήγει σε κλωβό με ένα θηλυκό που δεν είναι μητέρα. Όταν το νεογνό RER φτάσει στον κλωβό της μητέρας του, αφήνεται να εισέλθει εντός του κλωβού, μέσω μιας συρώμενης πόρτας και λαμβάνει την αναμενόμενη ανταμοιβή της μητρικής επαφής. Αντίθετα, δεν επιτρέπεται η επαφή με τη μητέρα στην ομάδα DER, αφού η πόρτα παραμένει κλειστή για τα νεογνά της εν λόγω ομάδας. Να αναφερθεί εδώ ότι τα μέλη και των δύο ομάδων αφήνονται στο τέλος του πειράματος να επιστρέψουν στον κλωβό με την μητέρα τους. Έτσι, τα νεογνά της ομάδας DER αφήνονται να εισέλθουν στον κλωβό αλλά με καθυστέρηση περίπου 10 λεπτών. Και οι δύο ομάδες, RER και DER, μαθαίνουν να βρίσκουν τη μητέρα μέσα στο λαβύρινθο, αν και η ομάδα RER μαθαίνει πιο αποτελεσματικά τη δοκιμασία. Η δοκιμασία αυτή, επηρεάζει άμεσα τον άξονα ΥΥΕ, ιδιαίτερα στην ομάδα DER.

Η δοκιμασία του λαβυρίνθου σχήματος T στηρίζεται στο ότι το ενθαρρυντικό ερέθισμα επιβράβευσης (η επαφή με τη μητέρα) μπορεί να εξυπηρετήσει τη μάθηση του μονοπατιού σε έναν λαβύρινθο σχήματος T. Δηλαδή το νεογνό μαθαίνει να στρίβει δεξιά από το σημείο έναρξης στο λαβύρινθο, για να οδηγηθεί προς τη μητέρα του. Όντως μέσα από επαναλαμβανόμενες δοκιμασίες, τα νεογνά αναμένεται ότι θα αναπτύξουν διαδικαστικού τύπου μνήμης, ανεξάρτητα από την παρουσία του ερεθίσματος. Από την άλλη μεριά, η άρνηση της αναμενόμενης ανταμοιβής μέσω της μη επαφής με τη μάνα δεν ευνοεί στο να μάθει το νεογνό να κάνει τη σωστή επιλογή μονοπατιού στο λαβύρινθο. Είναι ενδιαφέρον ότι και τα ζώα που εκπαιδεύονται υπό συνθήκες άρνησης/παρεμπόδισης λήψης της αναμενόμενης ανταμοιβής μέσω της επαφής με τη μητέρα, μαθαίνουν τη σωστή επιλογή στο λαβύρινθο και βελτιώνουν την επίδοσή τους με την επανάληψη της διαδικασίας. Όμως, η επιλογή τους βασίζεται στην παρουσία της μητέρας και οδηγεί σε ενεργοποίηση του ιππόκαμπου και του προμετωπιαίου φλοιού. Σηματικό είναι να αναφερθεί ότι η βελτίωση στην επίδοση στη δοκιμασία T δεν είναι αποτέλεσμα αναπτυξιακής επίδρασης και ολοκλήρωσης της οντογένεσης του εγκεφάλου, καθώς η επίδοση αυτών που εκτίθενται την ημέρα 13 απευθείας έπειτα από έκθεση κατά την ημέρα 10 στη δοκιμασία ήταν χειρότερη από ό,τι αυτή των πειραματοζώων που εκτέθηκαν στη δοκιμασία T για 4 συνεχόμενες ημέρες (Panagiotaropoulos, Diamantopoulou et al. 2009). (Για περισσότερες λεπτομέρειες δείτε στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι».)



Εικόνα 20: Σχηματική αναπαράσταση της δοκιμασίας σε λαβύρινθο σχήματος T (T maze-test) κατά τη διάρκεια των ημερών 10-13 για τα νεογνά αρουραίων, χρησιμοποιώντας τη μητρική επαφή ως ανταμοιβή ή την παρεμπόδιση επαφής ως ματαιωτικό γεγονός. Πηγή: (Panagiotaropoulos, Diamantopoulou et al. 2009).

Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας έδειξαν ότι η επιβράβευση ή η άρνησή της κατά τη νεογνική περίοδο επηρεάζει τη χωρική μνήμη και τα επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα pCREB (cAMP responsive element-binding protein-μόριο νευρωνικής πλαστικότητας) στον ιππόκαμπο ενήλικων και νεογνών αρουραίων (Diamantopoulou, Stamatakis et al. 2011). Συγκεκριμένα κατά την ενήλικη ζωή τα ζώα υποβλήθηκαν στη δοκιμασία του υδάτινου λαβυρίνθου κατά Morris (Morris Water Maze -MWM) και τα DER ζώα εμφάνισαν καλύτερη χωρική μνήμη σε σχέση με τα RER και την ομάδα των μαρτύρων. Επίσης, όσον αφορά την ίδια ομάδα πειραματοζώων, εμφανίστηκε αυξημένο ποσοστό ανοσοθετικών κυττάρων για τον παράγοντα pCREB στην CA3 περιοχή, ακόμη και 24 ώρες έπειτα από την τελευταία δοκιμασία μάθησης του MWM. Φαίνεται λοιπόν ότι μια πρώιμη εμπειρία μπορεί να τροποποιεί τον εγκέφαλο κατά την πρώιμη ζωή, σε τέτοιο βαθμό ώστε να επηρεάζει τη λειτουργία του ακόμη και κατά την ενήλικη ζωή. Μόρια που εμπλέκονται στην πλαστικότητα του εγκεφάλου, όπως το pCREB, φαίνεται να μπορούν να εμπλέκονται και στη λειτουργία της μάθησης/μνήμης που εξαρτάται από τον ιππόκαμπο, όχι μόνο στην πρώιμη ηλικία αλλά και κατά τα μετέπειτα στάδια ζωής (Diamantopoulou, Stamatakis et al. 2011).

Ωστόσο, τα ζώα DER είχαν μειωμένη ενεργοποίηση του σεροτονινεργικού συστήματος (5-HT), όπως προκύπτει από τα χαμηλά επίπεδα της σεροτονίνης στον προμετωπιαίο φλοιό και την αμυγδαλή, του υποδοχέα 5-HT_{1A} στον ιππόκαμπο και τα αυξημένα επίπεδα του μεταφορέα της σεροτονίνης στην αμυγδαλή. Επίσης, κατά την εφηβεία εμφανίζουν επιθετική συμπεριφορά κατά το παιχνίδι και όταν είναι ενήλικα έχουν συμπεριφορά που προσομοιάζει με την κατάθλιψη και είναι πιο επιθετικά και δεν επιδεικνύουν την αναμενόμενη υποχωρητική στάση όταν

εισέρχονται στο κλουβί ενός άλλου, πολύ επιθετικού αρσενικού. Ακόμη, φαίνεται να υπάρχει μια σαφώς εντονότερη απάντηση στο στρες στα DER ζώα, που χαρακτηρίζονται και από αυξημένη ορμονική απάντηση έπειτα από στρες αλλά και αυξημένο ανασταλτικό έλεγχο μέσω των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών (GRs υποδοχέων) (Diamantopoulou, Raftogianni et al. 2013). Οι αρσενικοί DER επίμυες εμφάνισαν, επίσης, αυξημένη ενεργοποίηση της αμυγδαλής, έπειτα από υποβολή στη δοκιμασία ανάμνησης φόβου (fear conditioning- FC) αλλά και κατά την 10^η ημέρα, έπειτα από έκθεση στην DER εμπειρία. Αναφορικά με την DER εμπειρία, αυτή οδηγεί σε ενεργοποίηση του υποκάμπου, του προμετωπιαίου φλοιού και της αμυγδαλής στη νεογνική ηλικία, ενώ οι τροποποιήσεις που διαμεσολαβούνται μέσω της DER εμπειρίας μπορεί να βρίσκονται υπό τη ρύθμιση επιγενετικών τροποποιήσεων των ιστονών, που οδηγούν σε άνοιγμα της χρωματίνης (Diamantopoulou, Raftogianni et al. 2013, Stamatakis, Diamantopoulou et al. 2013).

Από την άλλη πλευρά, τα ζώα τα οποία είχαν λάβει την αναμενόμενη ανταμοιβή μέσω επαφής με την μητέρα εμφανίζουν αυξημένο πάγωμα κατά τη συνειρμική ανάκληση του φόβου μετά από εξαρτημένη μάθηση φόβου (Diamantopoulou, Raftogianni et al. 2013). Επίσης, φαίνεται ότι οι RER επίμυες αξιοποιούν καλύτερα τις λειτουργίες μνήμης και μάθησης, με ενεργοποίηση του ραχιαίου ραβδωτού. Για αναλυτικότερες πληροφορίες ανατρέξτε στον πίνακα 3 που παρατίθεται παρακάτω:

DER	RER
Νεογνική ηλικία (PND10-13)	
✓ Ενεργοποίηση υποκάμπου, προμετωπιαίου φλοιού και αμυγδαλής.	✓ Ενεργοποίηση βασικών γαγγλίων.
✓ Αυξημένη επαγρύπνιση και αξιολόγηση περιβαλλοντικών ερεθισμάτων.	✓ Διαδικαστικός τύπος μάθησης της δοκιμασίας σε λαβύρινθο σχήματος T.
✓ Αυξημένη κορτικοστερόνη στο πλάσμα την ημέρα PND10.	
✓ Λαμβάνουν αυξημένη μητρική φροντίδα.	✓ Λαμβάνουν αυξημένη μητρική φροντίδα.
Εφηβική ηλικία	
✓ Συμπεριφορά θετική ως προς το παιχνίδι αλλά με έντονα χαρακτηριστικά επιθετικότητας.	
Ενήλικη ζωή	
✓ Καμία επίδραση στα βασικά επίπεδα κορτικοστερόνης του πλάσματος.	✓ Καμία επίδραση στα βασικά επίπεδα κορτικοστερόνης του πλάσματος.
✓ Υψηλότερα επίπεδα κορτικοστερόνης, αλλά	

προσωρινά περιορισμένα έπειτα από υποβολή σε δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης (Forced Swimming Test- FST).

- ✓ Μικρότερη αύξηση των επιπέδων της κορτικοστερόνης έπειτα από ηλεκτρικό ερέθισμα στα άκρα.
- ✓ Υψηλότερα επίπεδα υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών (GRs) στον ιππόκαμπο.
- ✓ Χαμηλότερα επίπεδα CRH-R1 υποδοχέων στον ιππόκαμπο και στην αμυγδαλή.
- ✓ Έπειτα από τη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης, αυξημένα επίπεδα της CRH στον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου (PVN) και στην αμυγδαλή.
- ✓ Καλύτερες μνημονικές ικανότητες στη δοκιμασία υδάτινου λαβυρίνθου κατά Morris (Morris Water Maze- MWM).
- ✓ Αυξημένα επίπεδα του παράγοντα pCREB στον ιππόκαμπο, έπειτα από υποβολή στη δοκιμασία MWM.
- ✓ Χαμηλότερα επίπεδα σεροτονίνης στον προμετωπιαίο φλοιό και στην αμυγδαλή.
- ✓ Χαμηλότερα επίπεδα των υποδοχέων 5-HT1A στον ιππόκαμπο.
- ✓ Αυξημένα επίπεδα του μεταφορέα της σεροτονίνης στην αμυγδαλή.
- ✓ Αυξημένος χρόνος ακινησίας στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης.
- ✓ Περισσότερο επιθετική συμπεριφορά στη δοκιμασία εισβολέα-κατοίκου.

- ✓ Μικρότερη αύξηση των επιπέδων της κορτικοστερόνης έπειτα από ηλεκτρικό ερέθισμα στα άκρα.

- ✓ Αυξημένη μνήμη φόβου (ερεθίσματος που προκαλεί φόβο).

Πίνακας 3: Οι επιδράσεις των εμπειριών DER και RER στους αρσενικούς επίμυς (σε σύγκριση με τους επίμυς-μάρτυρες). Πηγή: (Stamatakis, Diamantopoulou et al. 2013).

Επιπρόσθετες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριό μας έδειξαν ότι προκαλούνται αλλαγές και στο ντοπαμινεργικό σύστημα του εγκεφάλου (Raftogianni, Stamatakis et al. 2014). Συγκεκριμένα, την 13^η ημέρα (PND13), 2 ώρες έπειτα από το πέρας της δοκιμασίας στο λαβύρινθο T, τα RER ζώα εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα ντοπαμίνης (DA) και των μεταβολιτών της, αλλά και του D1 υποδοχέα της ντοπαμίνης στον πυρήνα nAc (nucleus accumbens). Αντίθετα, τα DER ζώα εμφάνισαν μειωμένα επίπεδα DA και των μεταβολιτών της στον προμετωπιαίο φλοιό (prefrontal cortex- PFC). Επίσης, και σε ενήλικους θηλυκούς επίμυς παρατηρήθηκε ενεργοποίηση του ντοπαμινεργικού συστήματος του nAc. Αντίθετα, στους ενήλικους αρσενικούς επίμυς τα επίπεδα ντοπαμίνης βρέθηκαν μειωμένα στον προμετωπιαίο φλοιό (παρομοίως με τα πειραματόζωα PND13). Βλέπουμε, λοιπόν, ότι οι πρώιμες εμπειρίες δύναται να επηρεάσουν και το ντοπαμινεργικό σύστημα, το οποίο είναι αλλοιωμένο σε ποικίλες ψυχιατρικές νόσους (Raftogianni, Stamatakis et al. 2014).



Κεφάλαιο 4

Σκοπός

4. Σκοπός

Οι πρώιμες εμπειρίες μελετώνται εδώ και χρόνια, τόσο σε κλινικό όσο και σε πειραματικό επίπεδο. Φαίνεται πως μπορούν να επηρεάζουν την νευροανάπτυξη και συνεπώς την συμπεριφορά του ατόμου, τροποποιώντας τα νευρωνικά κυκλώματα του εγκεφάλου. Οι εμπειρίες του ατόμου κατά τα τελευταία στάδια της κύησης καθώς και μετά από αυτήν (προγεννητική και νεογνική περίοδος) κρίνονται καθοριστικής σημασίας για την απάντηση σε στρεσογόνα ερεθίσματα αλλά και για τις συναισθηματικές αποκρίσεις του οργανισμού στην ενήλικη ζωή. Έτσι λοιπόν, έχει ταυτοποιηθεί σήμερα ότι η προσαρμοστικότητα του ατόμου στις απαιτήσεις του περιβάλλοντος επηρεάζεται από τις πρώιμες εμπειρίες, οι οποίες μπορούν να αποτελέσουν παράγοντα προδιάθεσης για ψυχωτικές ή άλλου τύπου ασθένειες, τόσο της ψυχιατρικής όσο και άλλων σωματικών ασθενειών.

Λαμβάνοντας υπόψη τα ανωτέρω, αποτελεί επιτακτική ανάγκη η εύρεση μοριακών, βιοχημικών και κυτταρικών μηχανισμών μέσω των οποίων οι πρώιμες εμπειρίες ασκούν τη δράση τους και μπορούν να επηρεάζουν τη συμπεριφορά του ατόμου σε γνωστικό και συναισθηματικό επίπεδο ακόμα και μακροπρόθεσμα. Με τον τρόπο αυτό θα επιτραπεί η κατανόηση του τρόπου δράσης τους στον εγκέφαλο των νεαρών ατόμων καθώς και η διαλεύκανση της συσχέτισής τους με νευροψυχικές νόσους. Στις διεργασίες αυτές και ειδικά σε λειτουργίες του εγκεφάλου που αφορούν την προσοχή, τη μνήμη και τη μάθηση παίζουν λειτουργικό ρόλο περιοχές όπως ο προμετωπιαίος φλοιός, ο ιππόκαμπος και η αμυγδαλή. Πιο συγκεκριμένα, το χολινεργικό σύστημα ασκεί τη δράση του μέσω των επιμέρους πυρήνων που το απαρτίζουν, όπως το μέσο διάφραγμα, η διαγώνια ταινία του Broca και ο βασικός μεγαλοκυτταρικός πυρήνας, περιοχές που διασυνδέονται με τον ιππόκαμπο, τον οσφρητικό βολβό, το νεοφλοιό και την αμυγδαλή. Κυρίαρχο ρόλο στις λειτουργίες του χολινεργικού συστήματος παίζουν φυσικά τα ένζυμα σύνθεσης και αποδόμησης της ακετυλοχολίνης, δηλαδή η χολινοακετυλοτρανσφεράση (ChAT) και η ακετυλοχολινεστεράση (AChE).

Όπως αναφέρθηκε, στο εργαστήριο Βιολογίας και Βιοχημείας αναπτύχθηκε πρόσφατα η δοκιμασία λαβυρίνθου σχήματος T, η οποία φαίνεται να επηρεάζει τις γνωστικές λειτουργίες των επίμυων. Συγκεκριμένα, η δοκιμασία αυτή φαίνεται να επιδρά ως ένα γεγονός ήπιας συναισθηματικής αντιξοότητας και να επηρεάζει διάφορα νευροδιαβιβαστικά συστήματα του εγκεφάλου, όπως το ντοπαμινεργικό και το σεροτονινεργικό σύστημα (Raftogianni, Diamantopoulou et al. 2012, Raftogianni, Stamatakis et al. 2014, Stamatakis, Diamantopoulou et al. 2014). Στο πλαίσιο αυτό, για να δούμε αν η δοκιμασία στο λαβύρινθο επηρεάζει και άλλα νευροδιαβιβαστικά συστήματα του εγκεφάλου που συμμετέχουν ενεργά σε γνωστικές λειτουργίες, όπως η προσοχή, η μνήμη και η μάθηση, εξετάσαμε το χολινεργικό σύστημα του βασικού πρόσθιου εγκεφάλου. Έτσι λοιπόν, στόχος της παρούσας διατριβής μεταπτυχιακού διπλώματος εξειδίκευσης ήταν η εξέταση της επίδρασης της δοκιμασίας λαβυρίνθου σχήματος T, μιας πρώιμης εμπειρίας

ανταμοιβής (reward) ή ματαίωσής της (denial), στο χολινεργικό σύστημα του επίμυ. Για το σκοπό αυτό εξετάστηκε η λειτουργία των ενζύμων σύνθεσης και αποικοδόμησης του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη (χολινοακετυλοτρανσφεράση- ChAT και ακετυλοχολινεστεράση- AChE). Η ChAT εξετάστηκε στις περιοχές του διαφράγματος, της διαγώνιας ταινίας του Broca και στο βασικό μεγαλοκυτταρικό πυρήνα, ενώ η AChE στις περιοχές του υποκάμπου, την αμυγδαλή και στον προμετωπιαίο φλοιό.



Ειδικό μέρος

Κεφάλαιο 5

**Υλικά &
Μέθοδοι**

5. Υλικά και Μέθοδοι

5.1. Πειραματόζωα

Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα πειράματα της παρούσας μελέτης ήταν επίμυες του στελέχους Wistar. Οι γεννήτορες τους προέρχονται από εσωτερική αναπαραγωγή του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ και ανατράφηκαν στην αποικία πειραματόζωων του εργαστηρίου Βιολογίας-Βιοχημείας του τμήματος Νοσηλευτικής. Οι επίμυες του στελέχους Wistar αποτελούν ένα ετερόμικτο στέλεχος αλφικών επιμύων, που ανήκουν στο είδος *Rattus norvegicus*. Το εν λόγω στέλεχος αναπτύχθηκε στο Ίδρυμα Wistar με σκοπό να χρησιμοποιηθεί για βιοϊατρικού περιεχομένου ερευνητικές διεργασίες. Αποτελεί το πρώτο στέλεχος που αναπτύχθηκε για να υπηρετήσει το σκοπό αυτό, ενώ όλα τα εργαστήρια εκείνη την εποχή χρησιμοποιούσαν μυς του είδους *Mus musculus* ως πειραματόζωα. Το στέλεχος αυτό χαρακτηρίζεται από φαρδύ κεφάλι, μακριά αυτιά και από ουρά, το μήκος της οποίας δεν υπερβαίνει το μήκος του σώματος. Τα στελέχη Sprague Dawley και Long-Evans αναπτύχθηκαν από το στέλεχος Wistar.



Εικόνα 21: Ο επίμυς στελέχους Wistar. Πηγή: <http://www.janvier-labs.com/rodent-research-models-services/research-models/per-species/outbred-rats/product/wistar.html>

Για την απόκτηση των νεογνών, θηλυκοί και αρσενικοί επίμυες (θηλυκοί: αρσενικοί= 1:1) τοποθετήθηκαν σε κοινά κλουβιά για περίπου 10 ημέρες. Κατόπιν, οι αρσενικοί επίμυες απομακρύνθηκαν, ενώ η εκάστοτε υποψήφια μητέρα τοποθετήθηκε σε ξεχωριστό κλουβί, όπου και παρέμεινε μόνη της για το υπόλοιπο της κύησης (κύηση 22 ημερών). Η ημέρα του τοκετού θεωρήθηκε ως ημέρα 0 μετά τη γέννηση (PND0). Από την PND0 μέχρι την PND10 (10η μεταγεννητική ημέρα) η οποιαδήποτε επαφή με τα ζώα μειώθηκε στο ελάχιστο για αποφυγή επίδρασης

στρεσογόνων συνθηκών, που θα επηρέαζαν την πειραματική διαδικασία. Η πειραματική διαδικασία νεογνικής έκθεσης σε λήψη ή αποστέρηση αναμενόμενης ανταμοιβής πραγματοποιήθηκε με πειραματόζωα ηλικίας 10 έως 13 ημερών. Τα ζώα αυτά παρέμεναν με τη μητέρα τους μέχρι τον απογαλακτισμό, ο οποίος λάμβανε χώρα κατά την 22η μεταγεννητική ημέρα και περιλάμβανε την απομάκρυνση της μητέρας καθώς και το «μαρκάρισμα» των ζώων για ταυτοποίηση (τρύπημα αυτιών). Έπειτα, τα ζώα τοποθετήθηκαν σε κλουβιά ανάλογα με το φύλο και την εκπαίδευση τους και κρατήθηκαν εκεί μέχρι να ενηλικιωθούν. Οι επίμυς θεωρούνται ενήλικοι γύρω στην ηλικία των τριών μηνών. Οι συνθήκες διαβίωσης των πειραματόζωων ήταν σταθερές και ελεγχόμενες, με σταθερή θερμοκρασία 24 °C και σταθερό κύκλο φωτισμού (8:00-20:00 φως και 20:00- 8:00 σκοτάδι). Τα πειραματόζωα είχαν *ad libitum* πρόσβαση σε τροφή και νερό.

5.2. Πειραματική Διαδικασία Εκπαίδευσης: Έκθεση υπό συνεχή λήψη ή συνεχόμενη παρεμπόδιση λήψης αναμενόμενης ανταμοιβής μέσω της επαφής με τη μητέρα

Η εκπαίδευση υπό συνεχόμενη λήψη ή συνεχόμενη αποστέρηση αναμενόμενης ανταμοιβής πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας έναν λαβυρίνθο σχήματος T (T-maze) προσαρμοσμένο στο μέγεθος των νεογνών επίμυων. Το κουτί έναρξης (start box) του λαβυρίνθου είχε διαστάσεις 8 x 6 εκατοστά και οδηγούσε άμεσα, χωρίς την παρεμβολή κάποιου διαχωριστικού, σε δύο βραχίονες οι οποίοι οδηγούσαν σε δύο ξεχωριστά κλουβιά. Συγκεκριμένα, ο δεξιός βραχίονας του λαβυρίνθου οδηγούσε σε ένα κλουβί με διαστάσεις 30 x 22 εκατοστά, στρωμένο με ροκανίδι, μέσα στο οποίο βρισκόταν η μητέρα και τα νεογνά. Ο αριστερός βραχίονας του λαβυρίνθου οδηγούσε σε ένα δεύτερο κλουβί, ίδιων διαστάσεων με το πρώτο, στρωμένο επίσης με ροκανίδι, μέσα στο οποίο βρισκόταν ένα άλλο θηλυκό ζώο. Το πλάτος των δύο βραχιόνων ήταν 7 εκατοστά ενώ το μήκος τους ήταν συνολικά 70 εκατοστά, το οποίο αντιστοιχούσε σε 30 εκατοστά για κάθε βραχίονα και 10 εκατοστά για την περιοχή που αποτελούσε την άμεση προέκταση του κουτιού έναρξης. Στο τέλος του δεξιού βραχίονα μια μικρή ανασυρόμενη θυρίδα με διαστάσεις 9 x 11 εκατοστά οδηγούσε στο εσωτερικό του κλουβιού της μητέρας.



Εικόνα 22: Σχηματική κάτοψη της πειραματικής διάταξης εκπαίδευσης νεογνών επίμυων κατά τη 10-13 μετά την γέννηση ημέρα, υπο συνθήκες λήψης ανταμοιβής μέσω της επαφής με την μητέρα, ή παρεμπόδισης λήψης ανταμοιβής. Πηγή: (Panagiotaropoulos, Diamantopoulou et al. 2009).

Για την εκπαίδευση χρησιμοποιήθηκαν πειραματόζωα ηλικίας 10-13 ημερών. Πριν από τη γέννησή τους, όλα τα πειραματόζωα κάθε γέννας, κατατάσσονταν τυχαία σε μία από τις τρεις κατηγορίες (λήψη ή παρεμπόδιση ανταμοιβής ή ομάδα ελέγχου).

5.2.1. Εκπαίδευση υπό Συνεχή Λήψη Ανταμοιβής

Τα πειραματόζωα που εκτέθηκαν στη συνεχόμενη λήψη ανταμοιβής, υποβλήθηκαν σε δέκα δοκιμασίες καθημερινά (σύνολο 40 δοκιμασίες για τις τέσσερις ημέρες εκπαίδευσης). Αρχικά, η μητέρα των πειραματόζωων απομακρυνόταν από το κλουβί μέσα στο οποίο διαβίωνε με τα νεογνά και τοποθετούνταν στο δεξιό κλουβί της πειραματικής διάταξης του λαβυρίνθου σε σχήμα Τ. Στη συνέχεια, όλα τα ζώα της γέννας τοποθετούνταν επίσης στο δεξιό κλουβί της πειραματικής διάταξης. Έπειτα, με τη σειρά, κάθε νεογνό τοποθετούνταν στο κουτί έναρξης του λαβυρίνθου και παρέμενε σε αυτόν για 60 δευτερόλεπτα. Όταν το πειραματόζωο έβρισκε το κλουβί της μητέρας, η θυρίδα του κλουβιού άνοιγε και το πειραματόζωο έμπαινε μέσα στο κλουβί. Τη χρονική στιγμή εύρεσης του κλουβιού της μητέρας η καταγραφή των συμπεριφορικών δεδομένων σταματούσε. Σε κάθε άλλη περίπτωση μη- εύρεσης του κλουβιού, η καταγραφή των συμπεριφορικών δεδομένων σταματούσε αμέσως μετά την ολοκλήρωση των 60 δευτερολέπτων και ο πειραματιστής οδηγούσε με απαλές κινήσεις το πειραματόζωο στην είσοδο του κλουβιού της μητέρας. Εκεί η θυρίδα άνοιγε και το ζώο έμπαινε μέσα στο κλουβί. Στη συνέχεια, ο πειραματιστής έπαιρνε το επόμενο πειραματόζωο από το κλουβί της διάταξης και το τοποθετούσε στο κουτί έναρξης. Μετά το τέλος κάθε δοκιμασίας, ο λαβύρινθος καθαριζόταν με διάλυμα αιθανόλης προκειμένου να απομακρυνθούν οι οσμές, ώστε να αποφευχθεί ο προσανατολισμός που θα οφειλόταν στον παράγοντα αυτό. Όταν όλα τα πειραματόζωα είχαν εκτεθεί στην πρώτη διαδικασία και με τον ίδιο τρόπο εκτίθονταν και στη δεύτερη κ.ο.κ. Στο τέλος των δέκα δοκιμασιών, η μητέρα των πειραματόζωων και αμέσως μετά τα πειραματόζωα, επέστρεφαν στο κλουβί διαβίωσής τους στο δωμάτιο των πειραματόζωων.

5.2.2. Εκπαίδευση υπό Συνεχή Παρεμπόδιση Λήψης Ανταμοιβής

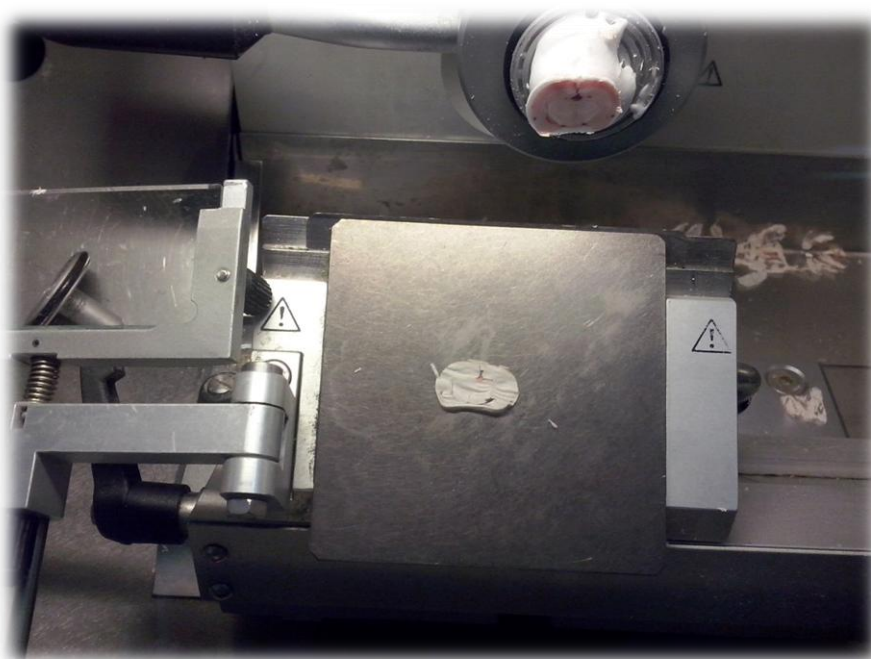
Τα πειραματόζωα που εκτέθηκαν στη συνεχόμενη παρεμπόδιση λήψης ανταμοιβής υποβάλλονταν σε 10 δοκιμασίες καθημερινά (σύνολο 40 δοκιμασίες για τις 4 ημέρες εκπαίδευσης). Όπως και στη συνθήκη της λήψης ανταμοιβής, αρχικά η μητέρα των πειραματόζωων και στη συνέχεια τα νεογνά τοποθετούνταν στο κλουβί της πειραματικής διάταξης. Στη συνέχεια, κάθε πειραματόζωο τοποθετούνταν στο κουτί έναρξης του λαβυρίνθου και υποβαλλόταν σε δέκα συνεχόμενες δοκιμασίες. Όταν το πειραματόζωο έβρισκε το κλουβί της μητέρας, η θυρίδα που οδηγούσε στο κλουβί παρέμενε κλειστή και το νεογνό παρέμενε σε αυτό το σημείο για 20 δευτερόλεπτα. Αμέσως μετά, ο πειραματιστής επέστρεφε το πειραματόζωο στο κουτί έναρξης του λαβυρίνθου όπου υποβαλλόταν στην επόμενη δοκιμασία. Όπως και στη συνθήκη της συνεχόμενης ενίσχυσης, η διάρκεια της δοκιμασίας ήταν 60 δευτερόλεπτα. Όταν το πειραματόζωο έβρισκε το κλουβί, η καταγραφή των συμπεριφορικών δεδομένων σταματούσε και άρχιζε η περίοδος των 20 δευτερολέπτων. Σε κάθε περίπτωση, αν το πειραματόζωο δεν κατάφερνε να βρει το στόχο (κλουβί της μητέρας) μέσα στο διαθέσιμο χρόνο των 60 δευτερολέπτων, οδηγούνταν μέχρι εκεί από τον πειραματιστή. Στο τέλος των δέκα συνεχόμενων δοκιμασιών ο πειραματιστής απομάκρυνε το ζώο από το λαβύρινθο και το επέστρεφε στο κλουβί της μητέρας μέσα στην πειραματική διάταξη. Μετά την ολοκλήρωση της εκπαίδευσης όλων των πειραματόζωων, η μητέρα και στη συνέχεια τα νεογνά της επέστρεφαν στο κλουβί διαβίωσής τους.

Σημειώνεται ότι στη συνθήκη της παρεμπόδισης λήψης ανταμοιβής, η θυρίδα παρέμενε κλειστή, ενώ παράλληλα υπήρχε η προσθήκη ενός δεύτερου συρμάτινου πλέγματος, μπροστά από αυτή. Η τροποποίηση αυτή έγινε προκειμένου να αυξηθεί η απόσταση μεταξύ κλουβιού και πειραματόζωου στην άκρη του βραχίονα (2 εκατοστά), με σκοπό την απουσία απτικών ερεθισμάτων και ο τραυματισμός από τη μητέρα προς το νεογνό. Γίνεται αντιληπτό ότι το πειραματόζωο κατά τη διάρκεια της έκθεσής του στο λαβύρινθο δεν είχε οπτικά ή απτικά ερεθίσματα από τη μητέρα που να το οδηγούν προς το κλουβί. Τα οπτικά ερεθίσματα απουσίαζαν καθώς οι επίμυς στελέχους Wistar έχουν τα μάτια τους κλειστά έως και τη 13η μεταγεννητική ημέρα (ανοίγουν τα μάτια τους κατά την 14η μεταγεννητική ημέρα). Αν και δεν υπήρχε δυνατότητα ελέγχου της συμβολής των εξωτερικών ερεθισμάτων στη συμπεριφορά του πειραματόζωου, φαίνεται ότι ο προσανατολισμός γινόταν βάσει ιδιοδεκτικών ερεθισμάτων, πιθανόν από τα τοιχώματα του λαβυρίνθου καθώς και μέσω οσφρητικών και ακουστικών ερεθισμάτων από τη μητέρα.

5.3. Προετοιμασία αντικειμενοφόρων πλακών και ιστών

Τα πειραματόζωα εκτέθηκαν σε αιθέρα, ώστε να είναι σε βαθιά αναισθησία και απομονώθηκαν αμέσως οι εγκεφαλοί τους. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε ισοπεντάνιο, σε θερμοκρασία -40°C για 10 λεπτά, προκειμένου να καταψυχθούν χωρίς να αλλοιωθεί η δομή των κυττάρων. Ακολούθως, φυλάχθηκαν σε θερμοκρασία -80°C μέχρι να κοπούν σε ψυχόμενο κρυστόμο στους -20°C . Η προετοιμασία του ιστού ήταν η ίδια και για τις δύο μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια (ανοσοϊστοχημεία, ιστοχημεία). Οι τομές κόπηκαν σε εγκάρσιο επίπεδο και σε πάχος $20\mu\text{m}$. Συλλέχθηκαν πάνω σε αντικειμενοφόρους που ελιχαν επεξεργαστεί με σιλάνιο (3-αμινοπροπυλ-τριαιθοξυ-σιλάνιο, Sigma) και φυλάχθηκαν στους -80°C έως ότου χρησιμοποιηθούν.

Για να καταστεί εφικτή η σιλανιοποίηση των πλακών απαιτούνται: επώαση των πλακών σε διάλυμα υδροχλωρίου συγκέντρωσης $0,2\text{M}$ για 30 δευτερόλεπτα, εμβάπτιση σε απεσταγμένο ύδωρ ddH_2O , επώαση σε διάλυμα σιλανίου σε ακετόνη 2% για 30 δευτερόλεπτα, εμβάπτιση σε δύο ξεχωριστά διαλύματα ακετόνης και επώαση για τουλάχιστον 2 λεπτά σε ddH_2O . Έπειτα οι αντικειμενοφόροι αφέθηκαν για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να στεγνώσουν και τοποθετήθηκαν σε θήκες, χωρίς να εκτίθενται σε υψηλές θερμοκρασίες ή φωτεινότητα.



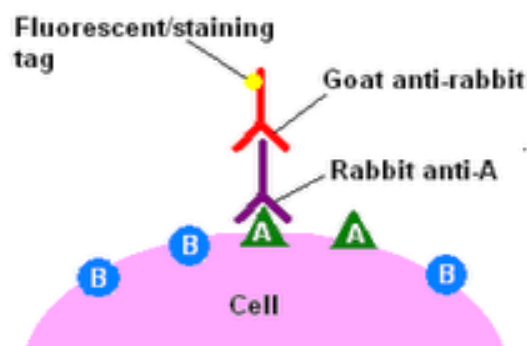
Εικόνα 23: Χρήση ψυχόμενης κρυστόμου, τομή πάχους $20\mu\text{m}$. Ερασιτεχνική φωτογραφία από το εργαστήριο.

Τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν ενήλικοι αρσενικοί επίμυες των τριών πειραματικών κατηγοριών που είχαν εκτεθεί στην

εκπαίδευση υπό συνθήκες λήψης ή παρεμπόδισης λήψης αναμενόμενης ανταμοιβής ή ήταν ζώα ελέγχου (CTR, DER, RER).

5.4. Ανοσοϊστοχημεία για το ένζυμο ChAT

Ανοσοϊστοχημεία καλείται η εργαστηριακή τεχνική η οποία συνδυάζει την ιστοπαθολογία με την ανοσολογία και τη χημεία. Ένα αντίσωμα κατευθύνεται προς ένα -και μοναδικό- ειδικό αντιγόνο-στόχο και μια χημική αντίδραση λαμβάνει χώρα για να καταστήσει ορατό το σύμπλεγμα αντιγόνου αντισώματος, εφόσον αυτό είναι παρόν. Υπάρχουν δύο τρόποι ανίχνευσης του αντιγόνου: ο πρώτος και πιο διαδεδομένος είναι ο έμμεσος τρόπος (εικ. 24) με τη χρήση ενός δεύτερου αντισώματος σεσημασμένου με βιοτίνη ή μια φθορίζουσα ουσία το οποίο κατευθύνεται ενάντια στο πρώτο αντίσωμα, σε αυτή τη μέθοδο το δεύτερο αντίσωμα πρέπει να έχει αναπτυχθεί κατά των IgG του είδους στο οποίο αναπτύχθηκε το πρώτο αντίσωμα. Ο δεύτερος τρόπος αφορά στην άμεση σήμανση του πρώτου αντισώματος, αν και ο δεύτερος τρόπος είναι πιο γρήγορος και ειδικός έχει το μειονέκτημα να δίνει ελαττωμένο σήμα. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο πρώτος τρόπος ανοσοεντοπισμού.

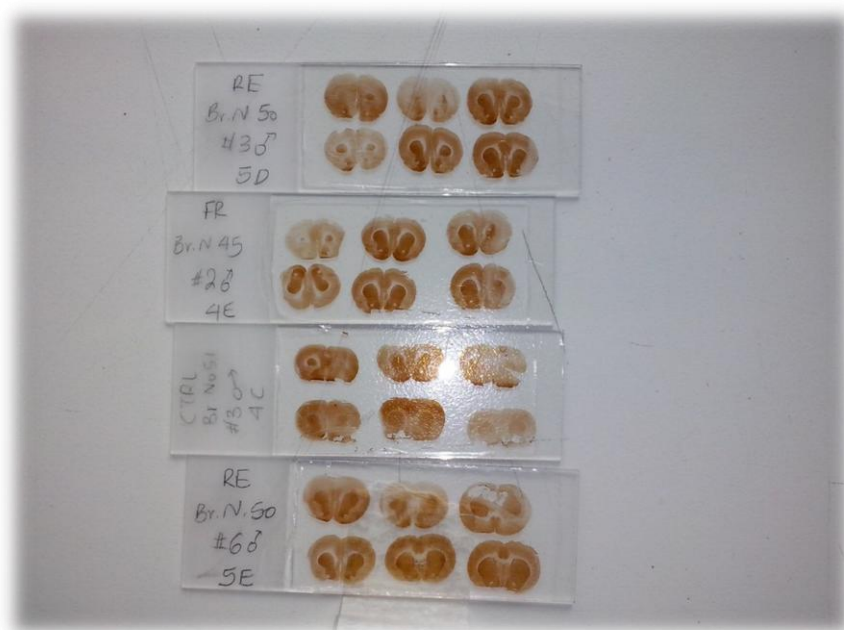


Εικόνα 24: Η έμμεση ανοσοϊστοχημική μέθοδος.

Πηγή: <http://en.wikipedia.org/wiki/Immunohistochemistry>

Πριν την έναρξη του ανοσοϊστοχημικού εντοπισμού έγινε εξισορρόπηση της θερμοκρασίας των τομών μέχρις ότου έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C) και ακολούθησε η μονιμοποίηση των τομών με μονοποιητικό διάλυμα παραφορμαλδεΐδης 4% (PFA) σε PBS διάλυμα για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Οι τομές στη συνέχεια ξεπλύθηκαν με TBS (3 x 5 λεπτά) και επώαστηκαν για 25 λεπτά σε διάλυμα 1% Triton X-100/TBS. Ακολούθησε πλύσιμο των τομών με TBS (3 x 10 λεπτά) και περιχαράκωση των τομών με υδρόφοβο μαρκαδόρο. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα με 10% NDS (Normal Donkey Serum) και 0,4% Triton X-100/TBS για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου για την κάλυψη των μη

ειδικών θέσεων δέσμευσης του αντισώματος. Στο επόμενο βήμα, οι τομές επωάστηκαν με το πρωτογενές αντίσωμα έναντι της χολινοακετυλοτρανσφεράσης (Goat anti-ChAT, Chemicon) σε αραιώση 1:200 σε 4% NDS και 0,4% Triton X-100/TBS για 18-22 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Την επόμενη ημέρα, οι τομές πλύθηκαν με TBS (3 x 10 λεπτά) και επωάστηκαν για 1,5 ώρα με το δευτερογενές αντίσωμα συνδεδεμένο με βιοτίνη (Donkey anti-goat, chemicon) σε αραιώση 1:200 διαλύματος 2% NDS/TBS σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα από πλύσιμο των τομών με TBS (3 x 10 λεπτά), ακολούθησε επώαση με διάλυμα αβιδίνης-υπεροξειδάσης συνδεδεμένης με βιοτίνη (Dako Cytomation) σε αραιώση 1:100 σε TBS για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια πλύσιμο των τομών και πάλι με TBS (3 x 10 λεπτά). Τέλος, πραγματοποιήθηκε η χρωματική αντίδραση με DAB (7mg DAB- Diaminobenzidine- Sigma, 10ml TBS, 10μl H₂O₂) για 5 λεπτά. Μετά την ανάπτυξη της χρώσης, οι τομές αφυδατώθηκαν (4-5 πλυσίματα με ddH₂O, επωάσεις σε αλκοόλες 50%, 70%, 95% και 2x 100% για 5 λεπτά στην καθεμία, και επωάσεις σε ξυλόλη 3 x 2 λεπτά), καλύφθηκαν με Derex και φυλάχθηκαν μέχρι παρατήρησής τους. Η αναγνώριση των εγκεφαλικών περιοχών έγινε με βάση τον ανατομικό άτλαντα (Paxinos and Watson 2nd edition).



Εικόνα 25: Τυπική ανοσοιστοχημεία για το ένζυμο ChAT. Ερασιτεχνική φωτογραφία από το εργαστήριο.

5.5. Φωτογράφιση και ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων

Η παρατήρηση των τομών μετά την ανοσοϊστοχημεία έγινε με οπτικό μικροσκόπιο (Eclipse E400, Nikon). Η ψηφιακή φωτογράφιση των τομών πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ψηφιακής κάμερας (Infinity 1) που ήταν συνδεδεμένη με ηλεκτρονικό υπολογιστή και τη χρήση του λογισμικού Infinity Capture. Για καθένα από τα ζώα μετρήθηκε ο συνολικός αριθμός των κυττάρων που ήταν ανοσοθετικά για την ChAT ανά περιοχή με το πρόγραμμα ImageJ, σε τουλάχιστον τρεις διαδοχικές τομές και υπολογίστηκε ο μέσος όρος. Χρησιμοποιήθηκαν 5 μάρτυρες, 5 DER και 5 RER για την περιοχή του συμπλέγματος του μέσου διαφράγματος- κάθετου σκέλους της διαγώνιας ταινίας του Broca (MS-VDB), 5 μάρτυρες, 9 DER και 8 RER ζώα για την περιοχή HDB και για τον πυρήνα του Meynert 4 μάρτυρες, 5 DER και 6 RER.

5.6. Ιστοχημική μέθοδος για το ένζυμο AChE

Αρχικά, έγινε εξισορρόπηση της θερμοκρασίας των τομών μέχρις ότου να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε μονιμοποίηση με διάλυμα 4% παραφορμαλδεΐδης (PFA) σε PBS για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, πλύσιμο (3 x 5 λεπτά) σε PBS και επώαση (5 x 5 λεπτά) σε διάλυμα 1μM iso-OMPA/0,1M CH₃COONa (pH= 5,6) για να αδρενοποιηθεί η δράση των ψευδοχολινεστερασών. Στη συνέχεια, οι τομές επώαστηκαν με το υπόστρωμα acetylthiocholine iodine (Sigma) σε τελική συγκέντρωση 1,73mM στο διάλυμα αντίδρασης [4mM C₆H₅Na₃O₇, 3mM CUSO₄, 0,1mM K₃Fe(CN)₆, 1μM iso-OMPA (ή αλλιώς tetraisopropyl pyrophosphoramidate, Sigma) και 65mM CH₃COONa, pH=5,6] για δύο ώρες στους 37 °C και υπό συνεχή ανάδευση. Μετά την αντίδραση με το υπόστρωμα ακολούθησε πλύσιμο (5 x 5 λεπτά) με διάλυμα 0,1M CH₃COONa (pH= 5,6) και στη συνέχεια ανάπτυξη της χρώσης. Συγκεκριμένα, οι τομές υπέστησαν κατεργασία για 1 λεπτό με 1% Na₂S (pH= 7,4), εμβάπτιση σε 0,1M NaNO₃ και επώαση για 1 λεπτό σε 0,1% AgNO₃. Έπειτα από την ανάπτυξη της χρώσης, οι τομές ξεπλύθηκαν επισταμένως με 0,1 M CH₃COONa (2 x 10 λεπτά, pH= 5,6), καλύφθηκαν με Glycergel (γλυκερόλη σε PBS σε αναλογία 1/10) και φυλάχθηκαν μέχρι την παρατήρησή τους στους 4 °C. Η αναγνώριση των εγκεφαλικών περιοχών έγινε με βάση τον ανατομικό άτλαντα (Paxinos and Watson 2nd edition).



Εικόνα 26: Αντικειμενοφόροι πλάκες με τομές εγκεφάλου υπό επεξεργασία ιστοχημικής χρώσης για το ένζυμο AChE. Ερασιτεχνική φωτογραφία από το εργαστήριο.

5.7. Φωτογράφιση και ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων

Η παρατήρηση των τομών μετά την ιστοχημεία έγινε με οπτικό μικροσκόπιο (Eclipse E400, Nikon). Η ψηφιακή φωτογράφιση των τομών πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ψηφιακής κάμερας (Infinity 1) που ήταν συνδεδεμένη με ηλεκτρονικό υπολογιστή και τη χρήση του λογισμικού Infinity Capture. Για καθένα από τα ζώα μετρήθηκε η ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος (ένταση της χρώσης), που δείχνει τη δραστικότητα του ενζύμου της AChE. Στις περιοχές που μελετήθηκαν (CA1, CA2 και CA3 περιοχές του υποκάμπου, αμυγδαλή και προμετωπιαίος φλοιός) μετρήθηκε η ένταση της χρώσης με το πρόγραμμα ImageJ και αφαιρέθηκε η μη ειδική χρώση με τον εξής τρόπο: για τις περιοχές του υποκάμπου και της αμυγδαλής, τα επίπεδα της AChE προσδιορίστηκαν με βάση την ένταση της χρώσης στον πυρήνα του θαλάμου VPM, ενώ για τον προμετωπιαίο φλοιό από την ένταση της χρώσης της παρακείμενης λευκής ουσίας, που υπήρχε στις ίδιες τομές με τον προμετωπιαίο φλοιό. Αυτές οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τουλάχιστον τρεις διαδοχικές τομές και υπολογίστηκε ο μέσος όρος. Χρησιμοποιήθηκαν 6 μάρτυρες, 5 DER και 5 RER ζώα για κάθε εγκεφαλική περιοχή.

RESULTS



Κεφάλαιο 6

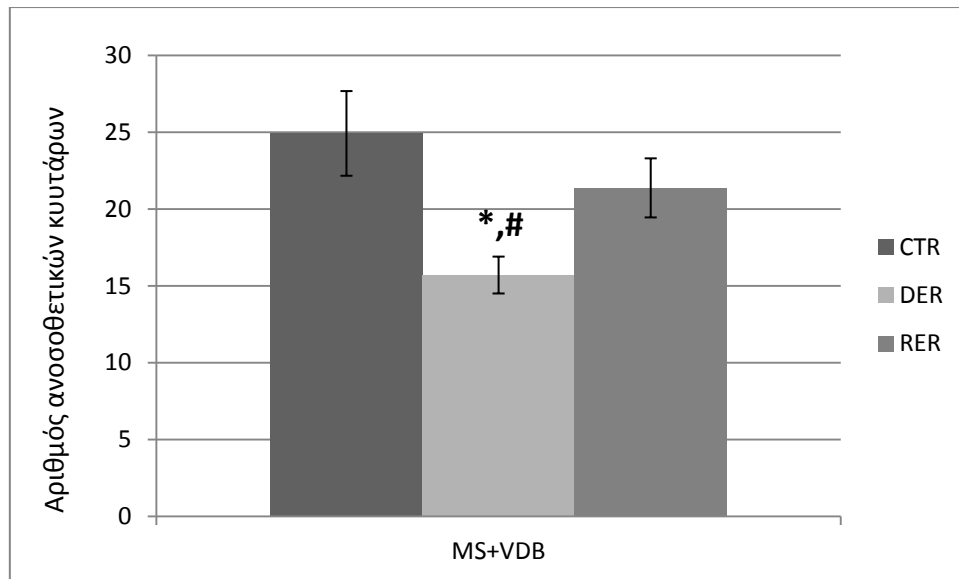
Αποτελέσματα

6. Αποτελέσματα

6.1. Προσδιορισμός των επιπέδων του ενζύμου ChAT στην ενήλικο ζωή, έπειτα από επίδραση της πρώιμης εμπειρίας της εκπαίδευσης υπό συνεχόμενη ανταμοιβή (RER) ή ματαίωση (DER).

6.1.1. Μέσο διάφραγμα (Medial Septum- MS)- Κάθετο σκέλος της διαγώνιας ταινίας του Broca (Vertical limb of the Diagonal band of Broca- VDB).

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων που αφορούν τον αριθμό ανοσοθετικών κυττάρων για την ChAT (χολινοακετυλοτρανσφεράση) στο σύμπλεγμα του μέσου διαφράγματος- κάθετου σκέλους της διαγώνιας ταινίας του Broca (MS-VDB) έδειξε ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική επίδραση της ομάδας ζώων [ανάλυση διακύμανσης μονής κατεύθυνσης (one way ANOVA) με ανεξάρτητη μεταβλητή την ομάδα ζώων (CTR, DER, RER), $F_{2,14} = 6,372$, $p = 0,013$, **Γράφημα 1**]. Περαιτέρω ανάλυση (post hoc δοκιμασία LSD- Least Squared Differences) έδειξε ότι ως ενήλικοι τα ζώα (αρσενικοί επίμυες) που είχαν υποστεί την εκπαίδευση υπό συνεχή παρεμπόδιση λήψης ανταμοιβής ως νεογνά (DER), εμφάνισαν χαμηλότερα επίπεδα του ενζύμου ChAT σε σχέση τόσο με την ομάδα ελέγχου (CTR), όσο και με την ομάδα που είχε υποστεί εκπαίδευση υπό συνεχή λήψη ανταμοιβής (RER) στη νεογνική ηλικία (post hoc $p = 0,004$ και $p = 0,05$ για τις συγκρίσεις *, DER vs CTR και #, DER vs RER, αντίστοιχα).



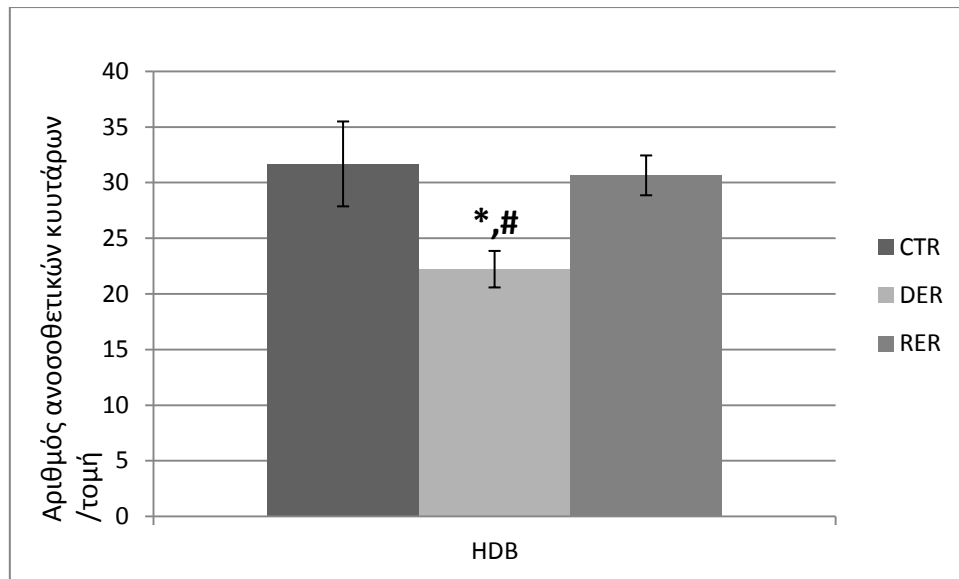
Γράφημα 1. Ο αριθμός των ανοσοθετικών ChAT+ κυττάρων στο σύμπλεγμα MS-VDB. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι $\pm$ τυπικό σφάλμα.

*: στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων DER και CTR.

#: στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων DER και RER.

6.1.2. Οριζόντιο σκέλος της διαγώνιας ταινίας του Broca (Horizontal limb of the Diagonal band of Broca- HDB).

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων που αφορούν τον αριθμό ανοσοθετικών κυττάρων για την ChAT στην περιοχή του οριζόντιου σκέλους της διαγώνιας ταινίας του Broca (HDB) έδειξε ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική επίδραση της ομάδας ζώων ($F_{2,21} = 7,059$, $p = 0,005$, **Γράφημα 2**). Περαιτέρω ανάλυση (post hoc δοκιμασία LSD) έδειξε ότι ως ενήλικοι, οι αρσενικοί επίμυες, που είχαν υποστεί την εκπαίδευση υπό συνεχή παρεμπόδιση λήψης ανταμοιβής (DER) ως νεογνά, εμφάνισαν χαμηλότερα επίπεδα του ενζύμου ChAT σε σχέση τόσο με την ομάδα ελέγχου (CTR), όσο και με την ομάδα που είχε υποστεί εκπαίδευση υπό συνεχή λήψη ανταμοιβής (RER) στη νεογνική ηλικία (post hoc $p = 0,006$ και $p = 0,005$ για τις συγκρίσεις *, DER vs CTR και #, DER vs RER, αντίστοιχα).



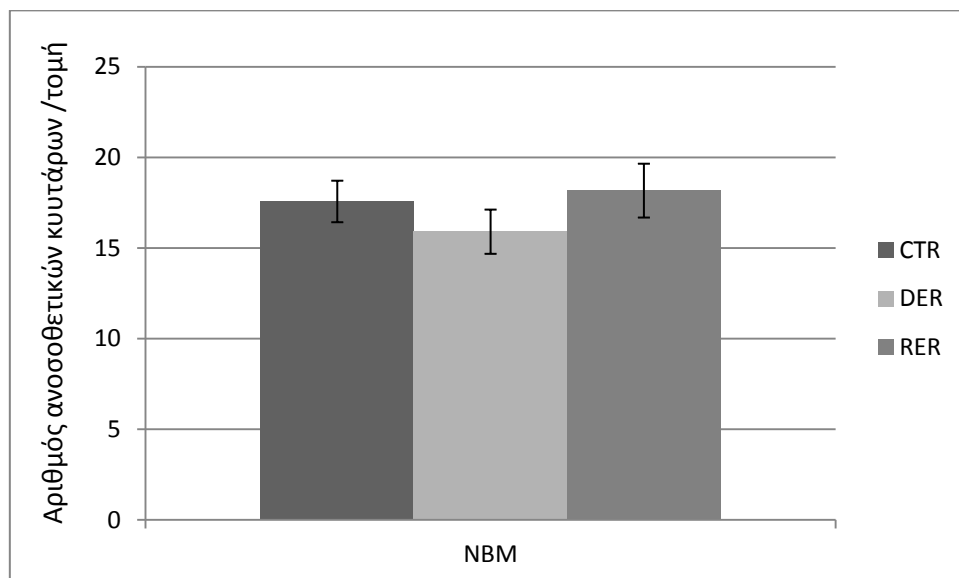
Γράφημα 2. Ο αριθμός των ανοσοθετικών ChAT+ κυττάρων στην περιοχή HDB. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι $\pm$ τυπικό σφάλμα.

*: στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων DER και CTR.

#: στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων DER και RER.

6.1.3. Πυρήνας του Meynert.

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων που αφορούν τον αριθμό ανοσοθετικών κυττάρων για την ChAT στην περιοχή του βασικού πυρήνα του Meynert (NBM) έδειξε ότι δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική επίδραση της ομάδας ζώων ($F_{2,13} = 1,059$, $p = 0,379$, **Γράφημα 3**).

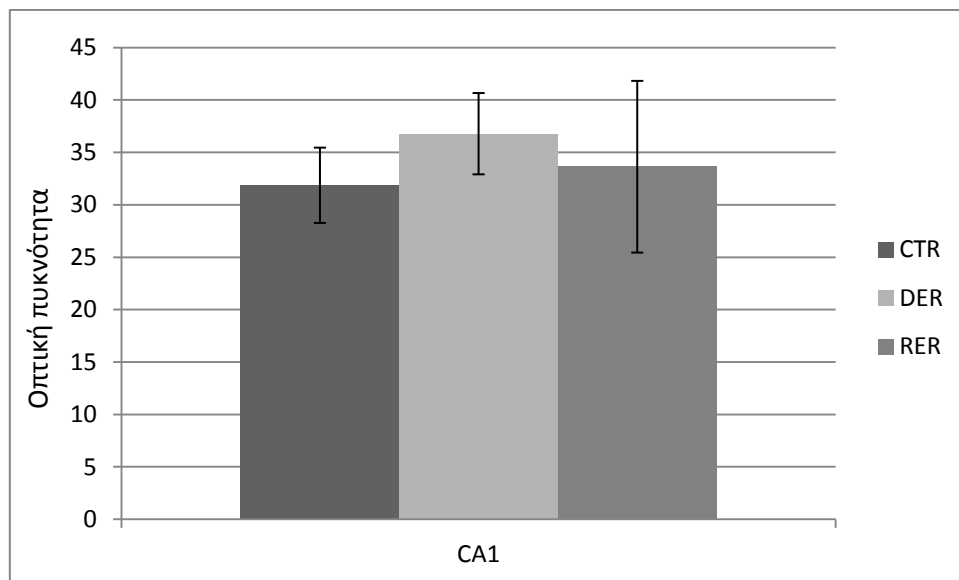


Γράφημα 3. Ο αριθμός των ανοσοθετικών ChAT+ κυττάρων στην περιοχή του βασικού πυρήνα του Meynert (NBM). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι $\pm$ τυπικό σφάλμα.

6.2. Προσδιορισμός των επιπέδων του ενζύμου AChE στην ενήλικο ζωή, έπειτα από επίδραση της πρώιμης εμπειρίας της εκπαίδευσης υπό συνεχόμενη ανταμοιβή (RER) ή ματαίωση (DER).

6.2.1. CA1 περιοχή του ιπποκάμπου.

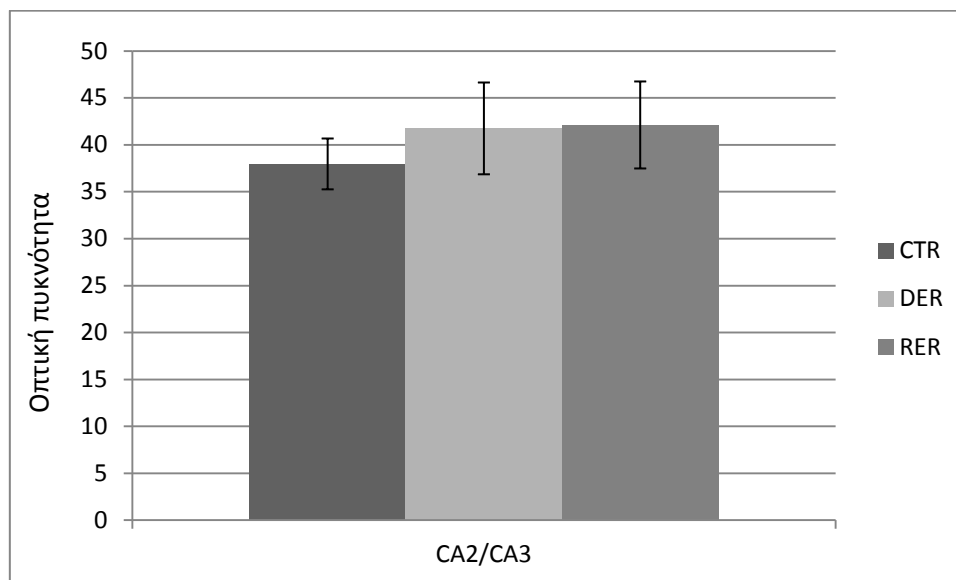
Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων που αφορούν τη δραστικότητα του ενζύμου AChE (ακετυλοχολινεστεράση) στην περιοχή CA1 του ιπποκάμπου έδειξε ότι δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική επίδραση της ομάδας ζώων [ανάλυση διακύμανσης μονής κατεύθυνσης (one way ANOVA) με ανεξάρτητη μεταβλητή την ομάδα ζώων (CTR, DER, RER), $F_{2,15} = 0,285$, $p = 0,771$, **Γράφημα 4**].



Γράφημα 4. Η ενεργότητα του ενζύμου AChE στην περιοχή CA1 του ιπποκάμπου. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι $\pm$ τυπικό σφάλμα.

6.2.2. CA2/CA3 περιοχή του ιπποκάμπου.

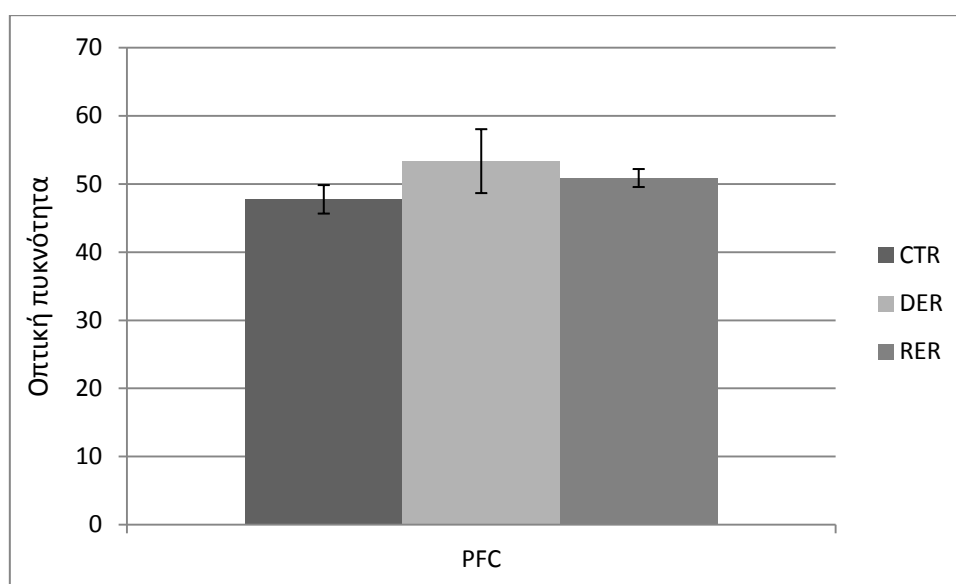
Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων που αφορούν τη δραστικότητα του ενζύμου AChE στις περιοχές CA2/CA3 του ιπποκάμπου έδειξε ότι δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική επίδραση της ομάδας ζώων ($F_{2,14} = 0,411$, $p = 0,672$, **Γράφημα 5**).



Γράφημα 5. Η ενεργότητα του ενζύμου AChE στις περιοχές CA2/CA3 του ιπποκάμπου. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι $\pm$ τυπικό σφάλμα.

6.2.3. Προμετωπιαίος φλοιός.

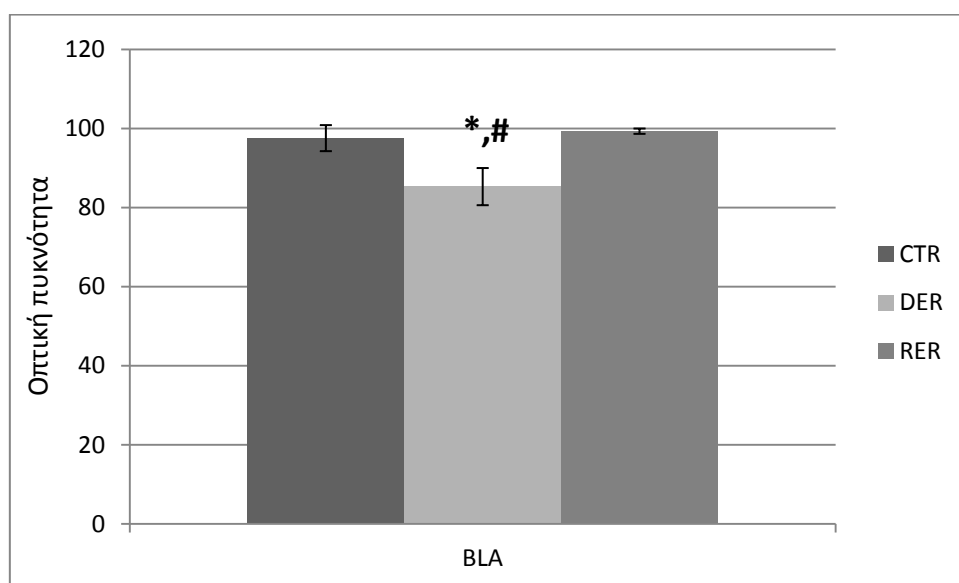
Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων που αφορούν τη δραστικότητα του ενζύμου AChE στην περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού έδειξε ότι δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική επίδραση της ομάδας ζώων ($F_{2,13} = 1,659$, $p = 0,235$, **Γράφημα 6**).



Γράφημα 6. Η ενεργότητα του ενζύμου AChE στην περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι $\pm$ τυπικό σφάλμα.

6.2.4. Έξω Βασικός πυρήνας της αμυγδαλής

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων που αφορούν τη δραστικότητα του ενζύμου AChE στον έξω βασικό αμυγδαλικό πυρήνα (πυρήνας BLA) έδειξε ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική επίδραση της ομάδας ζώων ($F_{2,14}= 5,423$, $p=0,021$, **Γράφημα 7**). Περαιτέρω ανάλυση (post hoc δοκιμασία LSD) έδειξε ότι στην ενήλικη ζωή, οι αρσενικοί επίμυες, που είχαν υποστεί την εκπαίδευση υπό συνεχή παρεμπόδιση λήψης ανταμοιβής (DER) ως νεογνά, εμφάνισαν χαμηλότερα επίπεδα του ενζύμου AChE σε σχέση τόσο με την ομάδα ελέγχου (CTR), όσο και με την ομάδα που είχε υποστεί εκπαίδευση υπό συνεχή λήψη ανταμοιβής (RER) στη νεογνική ηλικία (post hoc $p=0,016$ και $p=0,014$ για τις συγκρίσεις *, DER vs CTR και #, DER vs RER, αντίστοιχα).



Γράφημα 7. Η ενεργότητα του ενζύμου AChE στον έξω βασικό αμυγδαλικό πυρήνα (BLA). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα.

*: στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων DER και CTR.

#: στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων DER και RER.



Κεφάλαιο 7

Συμπεράσματα

7. Συζήτηση

Η έρευνα περί της σχέσης εγκεφάλου και στρες έχει δείξει ότι το πρώιμο στρες (προγεννητικά ή μεταγεννητικά) μπορεί να επηρεάζει τον ενήλικο εγκέφαλο και τις λειτουργίες που αυτός ελέγχει (Glover 1997, Babri, Doosti et al. 2014, Colman, Laureano et al. 2014, Rana, Pugh et al. 2015). Ωστόσο, ακόμα παραμένουν αδιευκρίνιστοι οι κυτταρικοί, βιοχημικοί και μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους μπορούν αυτοί οι «πρώιμοι τροποποιητές» να επηρεάζουν τον εγκέφαλο. Για την πειραματική μελέτη στο εν λόγω πεδίο έρευνας της Βιοψυχολογίας και της Νευροβιολογίας αξιοποιείται ένας αριθμός ζωικών μοντέλων, που αφορά κυρίως τα τρωκτικά και τροποποιούν τις αλληλεπιδράσεις μητέρας-νεογνού (Levine 1957, Levine 1967, Levine 2001). Όπως έχει φανεί από αρκετές μελέτες σε επίμυες, ένα σύστημα το οποίο υφίσταται αλλαγές οι οποίες εκδηλώνονται κατά την ενήλικη ζωή είναι ο άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων αλλά και γενικότερα το μεταιχμιακό σύστημα, σε επίπεδο νευροδιαβιβαστών (συμπεριλαμβανομένου και του χολινεργικού συστήματος) αλλά και νευροτροφινών (Garoflos, Panagiotaropoulos et al. 2005, Craft, Zhang et al. 2006, Anju and Paulose 2014, Hill, Kiss Von Soly et al. 2014, Juliano, Sosunov et al. 2014, Pinheiro, de Lima et al. 2014).

Στην παρούσα διατριβή Μεταπτυχιακού Διπλώματος Εξειδίκευσης μελετήθηκε η επίδραση μιας πρώιμης εμπειρίας, που συνοδευόταν από επιβράβευση ή παρεμπόδιση αυτής στο χολινεργικό σύστημα του επίμου. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία του λαβυρίνθου σχήματος T, κατά την οποία ο επίμυς λαμβάνει ανταμοιβή (επαφή με τη μητέρα) ή στερείται ανταμοιβής για ένα χρονικό διάστημα ~15 λεπτών στις ηλικίες PND10-13, ενώ κατά την ενήλική τους ζωή αφαιρέθηκαν οι εγκέφαλοί τους και μελετήθηκαν ιστολογικά. Στην ενήλικη ζωή προσδιορίστηκαν τα επίπεδα του βιοσυνθετικού ενζύμου της ακετυλοχολίνης (ChAT) με ανοσοϊστοχημική μέθοδο, καθώς και τα επίπεδα του καταβολικού της ενζύμου (AChE) σε επιμέρους περιοχές του εγκεφάλου.

Η εμπειρία που εφαρμόστηκε στην πρώιμη ηλικία των επίμυων, δηλαδή η εμπειρία στο λαβύρινθο σχήματος T, έχει δείχθει ότι επηρεάζει διάφορα συστήματα του εγκεφάλου (Panagiotaropoulos, Diamantopoulou et al. 2009, Stamatakis, Diamantopoulou et al. 2013). Αναλυτικότερα, από μελέτες του εργαστηρίου Βιολογίας/Βιοχημείας έχει προταθεί ότι επιδρά στην απάντηση στο στρες κατά την ενήλικη ζωή αλλά και στα διάφορα νευροδιαβιβαστικά συστήματα του εγκεφάλου, όπως το σεροτονινεργικό και το ντοπαμινεργικό (Diamantopoulou, Raftogianni et al. 2012, Raftogianni, Diamantopoulou et al. 2012, Diamantopoulou, Raftogianni et al. 2013, Raftogianni, Stamatakis et al. 2014). Η εκπαίδευση στον λαβύρινθο T, αν και αρχικά αναπτύχθηκε για τη μελέτη της ικανότητας χωρικής μάθησης των επίμυων, θα μπορούσε να θεωρηθεί ως μια ήπια στρεσογόνος εμπειρία κατά τη νεογνική ηλικία σε ό,τι αφορά την παρούσα εργασία. Από αυτή τη σκοπιά, η ομάδα που εκπαιδεύτηκε υπό συνεχόμενη αμοιβή (RER) μπορεί να θεωρηθεί ότι εκτέθηκε σε ήπιο στρες λόγω της απομάκρυνσης από τη μητέρα και τη φωλιά αλλά έλαβε

αμέσως την αναμενόμενη μητρική επαφή, η οποία έδρασε επανορθωτικά. Αντιθέτως, η δεύτερη πειραματική ομάδα που εκπαιδεύτηκε υπό συνεχόμενη παρεμπόδιση λήψης ανταμοιβής (DER), εκτέθηκε στο ίδιο στρες αποχωρισμού από τη μητέρα και τη φωλιά αλλά δεν έλαβε την αναμενόμενη μητρική επαφή, γεγονός το οποίο μπορεί να θεωρηθεί ως επιπρόσθετο στρες (Diamantopoulou, Raftogianni et al. 2013).

Αξίζει να σημειωθεί ότι η επαφή με τη μητέρα κατά τη νεογνική ηλικία είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση και τη μετέπειτα ανάπτυξη του οργανισμού, κατατάσσεται δε σε μια κατηγορία ερεθισμάτων ανταμοιβής που καλλούνται πρωτογενείς ενισχυτές (Butler et al, 1978). Η γαλουχία και η μητρική φροντίδα έχουν θετικό αντίκτυπο στο νεογνό και θεωρούνται ενισχυτικά ερεθίσματα ενώ αντίθετα η άρνηση της μητρικής επαφής επιδρά ως αρνητικό ερέθισμα (Stamatakis, Diamantopoulou et al. 2014).

Από τα αποτελέσματα που περιγράφηκαν στην ενότητα 5, φαίνεται ότι στο σύμπλεγμα «Μέσο διάφραγμα (Medial Septum- MS)- Κάθετο σκέλος της διαγώνιας ταινίας του Broca (Vertical limb of the Diagonal band of Broca- VDB)» υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά τόσο μεταξύ της ομάδας DER και των μαρτύρων όσο και μεταξύ της ομάδας DER και της ομάδας RER σε ότι αφορά τον αριθμό των ανοσοθετικών κυττάρων για το ένζυμο ChAT. Συγκεκριμένα, η ομάδα DER εμφάνισε μειωμένο αριθμό κυττάρων σε σχέση με τις ομάδες CTR (μάρτυρες) και RER. Ανάλογα ήταν τα αποτελέσματα και για την περιοχή του οριζόντιου σκέλους της διαγώνιας ταινίας του Broca (HDB), ενώ για τον βασικό πυρήνα του Meynert δεν ανιχνεύθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών ομάδων. Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα των Pondiki et al. (2006), οι οποίοι χρησιμοποίησαν ένα άλλο μοντέλο νεογνικής εμπειρίας, το νεογνικό χειρισμό. Πιο συγκεκριμένα, και στην έρευνα αυτή η πρώιμη εμπειρία επηρέασε τα επίπεδα των ανοσοθετικών κυττάρων για το ένζυμο ChAT στην ομάδα που είχε υποστεί πρώιμο χειρισμό στις περιοχές του μέσου διαφράγματος-διαγώνιας ταινίας του Broca, αλλά όχι του βασικού πυρήνα του Meynert (Pondiki, Stamatakis et al. 2006). Αντίθετα, μελέτες των Horvath et al., 2004, και των Liu et al., 2000, αναφέρουν ότι ο πρώιμος χειρισμός επηρεάζει την ευαισθησία των χολινεργικών κυττάρων του βασικού μεγαλοκυτταρικού πυρήνα NBM στην οξεία υπερδιεγερτική βλάβη κατά την ενήλικη ζωή. Ακόμη, οι επίμυες που είχαν υποστεί μητρική αποστέρηση και τους χορηγήθηκε η ανοσοτοξίνη 192 IgG-σαπορίνη εμφάνισαν μειωμένη ενεργότητα του ενζύμου ChAT, σε ομογενοποιημένα του υποκάμπου και του μετωπιαίου φλοιού, σε σχέση με εκείνους που δεν υποβλήθηκαν σε μητρική αποστέρηση (Aisa, Gil-Bea et al. 2009). Ωστόσο, παρατηρήθηκε αύξηση των ανοσοθετικών κυττάρων στην CA1 περιοχή του υποκάμπου των επίμυων που είχαν υποστεί μητρική αποστέρηση (Markovic, Radonjic et al. 2014). Επίσης, η μελέτη των Stepanichev et al (2014) έδειξε επίσης ότι η χορήγηση β-αμυλοειδούς (25-35) [Aβ(25-35)] προκάλεσε μέτριο βαθμού έκπτωση στην επίδοση κατά τη δοκιμασία εξαρτημένου φόβου

βάση πλαισίου (contextual fear conditioning), η οποία συνοδεύτηκε από μείωση στην έκφραση του βιοσυνθετικού ενζύμου της ακετυλοχολίνης (ChAT) στην περιοχή του μέσου διαφράγματος, χωρίς όμως να συμβεί κυτταρικός θάνατος στην εν λόγω περιοχή (Stepanichev, Lazareva et al. 2014).

Τα ανωτέρω αποτελέσματα υποδεικνύουν μια χαμηλότερη δραστηριότητα του χολινεργικού συστήματος του βασικού πρόσθιου εγκεφάλου στα πειραματόζωα που έχουν υποβληθεί στην DER πρώιμη εμπειρία, σε σύγκριση με την ομάδα RER και την ομάδα των μαρτύρων. Το τμήμα αυτό του χολινεργικού συστήματος προβάλλει σε διάφορες περιοχές του φλοιού (π.χ. το σύμπλεγμα μέσο διάφραγμα-κάθετο σκέλος της διαγώνιας ταινίας του Broca προβάλλει σε περιοχές του αλλοφλοιού, συμπεριλαμβανομένου και περιοχών όπως ο οπισθοσπλήνιος φλοιός και ο ιππόκαμπος) στα πειραματόζωα που έχουν υποβληθεί στην DER πρώιμη εμπειρία, σε σύγκριση με την ομάδα RER και την ομάδα των μαρτύρων (Gonzalo-Ruiz and Morte 2000). Η ανάπτυξη αλλά και η λειτουργικότητα του βασικού πρόσθιου χολινεργικού συστήματος του εγκεφάλου στηρίζεται σε ένα μεγάλο βαθμό στους νευροτροφικούς παράγοντες, ιδιαίτερα στον NGF (για την διαφοροποίηση των νευρώνων του βασικού πρόσθιου χολινεργικού συστήματος και για την παρεμπόδιση του εκφυλισμού αυτών στον ενήλικο ή στον γηράσκων εγκέφαλο των θηλαστικών), αλλά και στον BDNF (για την ωρίμανση των εν λόγω νευρώνων) και τον NT-3 (για προσέλκυση των χολινεργικών προβολών στα κύτταρα στόχους του νεοφλοιού) (Yuen, Howe et al. 1996, Ward and Hagg 2000, Robertson, Baratta et al. 2006, Williams, Eriksdotter-Jonhagen et al. 2006). Θα μπορούσαμε, λοιπόν, να υποθέσουμε ότι πιθανώς η στρεσογόνος DER εμπειρία τροποποίησε τα επίπεδα αυτών των νευροτροφικών παραγόντων, οδηγώντας σε μακροπρόθεσμες αλλαγές στο χολινεργικό σύστημα του εγκεφάλου, μια υπόθεση που θα πρέπει όμως να επιβεβαιωθεί πειραματικά.

Το βασικό πρόσθιο χολινεργικό σύστημα του εγκεφάλου εμπλέκεται σε γνωστικές λειτουργίες, για αυτό και η λειτουργικότητά του είναι κρίσιμη για τον οργανισμό (Baxter and Chiba 1999, Fragkouli, Pachnis et al. 2009). Οι βλάβες στο πρόσθιο χολινεργικό σύστημα έχουν συσχετιστεί με γνωσιακά ελλείμματα, για το λόγο αυτό γίνεται ακόμη μεγαλύτερη προσπάθεια στην εύρεση ουσιών που θα έχουν ως στόχο δράσης το σύστημα αυτό και οι οποίες θα χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία καταστάσεων όπως η άνοια (Fragkouli, Hearn et al. 2005). Σε ασθένειες όπως η νόσος Alzheimer και το σύνδρομο Rett είναι χαρακτηριστική η εκφύλιση των νευρώνων του πρόσθιου χολινεργικού συστήματος (Whitehouse, Price et al. 1981, Wenk and Hauss-Wegrzyniak 1999). Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι, εκτός των δομών που περιγράφηκαν ότι εννervώνονται από το βασικό πρόσθιο χολινεργικό σύστημα του εγκεφάλου, υπάρχει μια πυκνή προβολή προς τον έξω βασικό πυρήνα της αμυγδαλής (BLA) και φαίνεται ότι η ακετυλοχολίνη ενισχύει τη διάκριση του καθαρού σήματος σε σχέση με το σήμα που οφείλεται σε «θόρυβο» (signal-to-noise ratio) σε νευρώνες του πυρήνα BLA (Unal, Pare et al. 2015).

Αναφορικά με την ιστοχημική μέθοδο για τον προσδιορισμό της ενεργότητας του ενζύμου AChE, παρατηρήθηκε ότι στις περιοχές CA1, CA2/CA3 του ιπποκάμπου καθώς και στον προμετωπιαίο φλοιό δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών ομάδων. Έτσι, φαίνεται ότι η εκπαίδευση στο λαβύρινθο σχήματος T κατά την πρώιμη ηλικία δεν προκαλεί τόσο σημαντικές αλλαγές στις ιπποκάμπιες περιοχές και στον προμετωπιαίο φλοιό, ώστε να ανιχνευθούν ως στατιστικώς σημαντικές, τουλάχιστον όσον αφορά τη χολινεργική νευροδιαβίβαση. Όσον αφορά τις περιοχές CA2/CA3, προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου Βιολογίας/Βιοχημείας έδειξαν ότι ούτε στο νεογνικό χειρισμό, ένα άλλο είδος πρώιμης εμπειρίας, δεν προκαλούνται στατιστικώς σημαντικές αλλαγές στη δράση του ενζύμου AChE σε αρσενικούς επίμυς (Pondiki, Stamatakis et al. 2006). Ωστόσο, μειωμένη βρέθηκε η δραστηριότητα του ενζύμου AChE σε μελέτες των Aisa et al, 2009, στον ιππόκαμπο και στο μετωπιαίο φλοιό επίμυων που είχαν υποστεί μητρική αποστέρηση και τους είχε χορηγηθεί η ανοσοτοξίνη 192 IgG-σαπορίνη, σε σχέση με τους επίμυς που τους είχε χορηγηθεί η ίδια ουσία αλλά δεν είχαν υποβληθεί σε μητρική αποστέρηση, σύμφωνα με βιοχημική μέτρηση του ενζύμου (χρωματομετρία).

Σε αντίθεση με τα στατιστικώς μη σημαντικά αποτελέσματα των ανωτέρω εγκεφαλικών περιοχών, ανιχνεύθηκε μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου (AChE) στον έξω βασικό αμυγδαλικό πυρήνα στην ομάδα DER, σε σύγκριση τόσο με την ομάδα RER όσο και με την ομάδα των μαρτύρων.

Η μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου AChE στον BLA πυρήνα της ομάδας DER, και συνεπώς τα αυξημένα επίπεδα ακετυλοχολίνης λόγω παρεμπόδισης του καταβολικού της ενζύμου, μπορεί να εμπλέκεται στους βιοχημικούς μηχανισμούς που τροποποιούν την εκδήλωση άγχους στα ζώα αυτά. Τα αυξημένα επίπεδα ακετυλοχολίνης στην αμυγδαλή, στον προμετωπιαίο φλοιό και στον ιππόκαμπο υπερίληκτων επίμυων, που προκαλούνται λόγω χορήγησης της σενκτίδης (senktide), ενός αγωνιστή των υποδοχέων νευροκινίνης-3, έχουν συσχετιστεί με αγχολυτικές και αντικαταθλιπτικές δράσεις, χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου και εξαναγκασμένης κολύμβησης, αντιστοίχως (Schable, Topic et al. 2011).

Πρόσφατα δεδομένα από το εργαστήριο Βιολογίας/Βιοχημείας αναλύουν ότι στα DER ζώα υπάρχουν αυξημένα επίπεδα του νευροπεπτιδίου Υ (NPY) στην περιοχή της αμυγδαλής και πιθανόν σε συνέργεια με το πιο δραστήριο σύστημα οπιοειδών στην ίδια περιοχή, ευθύνονται για την «καλύτερα προετοιμασμένη» συμπεριφορά τους για την αντιμετώπιση καταστάσεων που προκαλούν στρες και φόβο (Ψωρομύτης, Μεταπτυχικό Δίπλωμα Εξειδίκευσης, 2014). Μάλιστα, σύμφωνα με περαιτέρω πειράματα της ίδιας ερευνητικής ομάδας, τα DER ζώα φαίνεται να περνούν περισσότερο χρόνο στο κέντρο της διάταξης ανοιχτού πεδίου σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, συμπεριφορά που συνδέεται με μειωμένα επίπεδα άγχους (Manatos et al., 2013). Αν αναλογιστούμε τη μειωμένη ενεργότητα του ενζύμου

AChE, που παρατηρήθηκε στην παρούσα εργασία, φαίνεται πως η μείωση της διάσπασης της ακετυλοχολίνης είναι μάλλον ευνοϊκή για τα πειραματόζωα της ομάδας DER (αφού είναι μειωμένο το ένζυμο διάσπασής της).

Από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας έχει προκύψει ότι τα ζώα DER παρουσιάζουν ενισχυμένη μνήμη στη δοκιμασία του υδάτινου λαβύρινθου κατά Morris. Η ενίσχυση αυτή θα μπορούσε εν μέρει να αποδοθεί στον τροποποιητικό ρόλο που ασκεί η αμυγδαλή πάνω στην αποθήκευση πληροφοριών από τον υπόκαμπο. Πιο συγκεκριμένα, έρευνες των Korz et al (2005) δείχνουν ότι η διατήρηση της μακροχρόνιας ενδυνάμωσης (long-term potentiation- LTP), η οποία αποτελεί ένα κυτταρικό μοντέλο μάθησης και μνήμης, στην οδοντωτή έλικα του υποκάμπου μπορεί να επηρεάζεται από τον έξω βασικό πυρήνα της αμυγδαλής. Ο πυρήνας BLA φαίνεται να επηρεάζει γνωστικές λειτουργίες όπως η διατήρηση της μνήμης, ειδικά όταν αυτή εντάσσεται ως μια συναισθηματική εμπειρία μέσω νευροτροποποιητικών συστημάτων όπως το χολινεργικό (ενεργοποίηση μουσκαρινικών υποδοχέων όπως οι M1 και M2) και το νοραδρενεργικό σύστημα (Power, McIntyre et al. 2003, McGaugh 2004).

Περαιτέρω έρευνα περί της πρόσδεσης στους μουσκαρινικούς υποδοχείς, πιθανόν στους M1 και M2, θα έδινε ακόμη περισσότερες πληροφορίες για την επίδραση της πρώιμης εμπειρίας στη δοκιμασία του λαβυρίνθου σχήματος T στο χολινεργικό σύστημα του πρόσθιου εγκεφάλου. Ακόμη, θα ήταν σημαντικός ο έλεγχος της συμπεριφοράς των πειραματόζωων, αναφορικά με τις λειτουργίες προσοχής ή και μάθησης/μνήμης, π.χ. με τη δοκιμασία του 5-Choice Serial Reaction Time Task, δοκιμασίες που είναι γνωστό ότι ελέγχονται από το χολινεργικό σύστημα του εγκεφάλου (Humby, Laird et al. 1999, McGaughy, Dalley et al. 2002).

Τα δεδομένα, λοιπόν, της παρούσας έρευνας υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η εκπαίδευση κατά την νεογνική ηλικία υπό συνθήκες άρνησης ή λήψης της αναμενόμενης επαφής με τη μητέρα, στον λαβύρινθο T, οδηγεί σε μακροχρόνιες αλλαγές στο μεταιχμιακό σύστημα και πιο συγκεκριμένα στο βασικό πρόσθιο χολινεργικό σύστημα του εγκεφάλου. Τα ευρήματα αυτά ενισχύουν την πρόταση ότι οι πρώιμες εμπειρίες, δηλαδή οι εμπειρίες κατά τα πρώτα στάδια της μεταγεννητικής ζωής, μπορεί να τροποποιήσουν μόνιμα τον εγκέφαλο, οδηγώντας έτσι σε μεταβολές της συμπεριφοράς ακόμη και κατά την ενήλικη ζωή.



Κεφάλαιο 8

Βιβλιογραφία

8. Βιβλιογραφία

- Aisa, B., F. J. Gil-Bea, B. Marcos, R. Tordera, B. Lasheras, J. Del Rio and M. J. Ramirez (2009). "Neonatal stress affects vulnerability of cholinergic neurons and cognition in the rat: involvement of the HPA axis." *Psychoneuroendocrinology* **34**(10): 1495-1505.
- Anand, K. J. and F. M. Scalzo (2000). "Can adverse neonatal experiences alter brain development and subsequent behavior?" *Biol Neonate* **77**(2): 69-82.
- Anju, T. R. and C. S. Paulose (2014). "Cortical cholinergic dysregulation as a long-term consequence of neonatal hypoglycemia." *Biochem Cell Biol*: 1-7.
- Arborelius, L., M. J. Owens, P. M. Plotsky and C. B. Nemeroff (1999). "The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders." *J Endocrinol* **160**(1): 1-12.
- arkovic, B., N. V. Radonjic, M. Aksic, B. Filipovic and N. Petronijevic (2014). "Long-term effects of maternal deprivation on cholinergic system in rat brain." *Biomed Res Int* **2014**: 636574.
- Asinof, S. K. and T. A. Paine (2013). "Inhibition of GABA synthesis in the prefrontal cortex increases locomotor activity but does not affect attention in the 5-choice serial reaction time task." *Neuropharmacology* **65**: 39-47.
- Auburger, G., R. Heumann, R. Hellweg, S. Korsching and H. Thoenen (1987). "Developmental changes of nerve growth factor and its mRNA in the rat hippocampus: comparison with choline acetyltransferase." *Dev Biol* **120**(2): 322-328.
- Babri, S., M. H. Doosti and A. A. Salari (2014). "Tumor necrosis factor-alpha during neonatal brain development affects anxiety- and depression-related behaviors in adult male and female mice." *Behav Brain Res* **261**: 305-314.
- Baldi, E., C. Mariottini and C. Bucherelli (2007). "The role of the nucleus basalis magnocellularis in fear conditioning consolidation in the rat." *Learn Mem* **14**(12): 855-860.
- Bartko, S. J., C. Romberg, B. White, J. Wess, T. J. Bussey and L. M. Saksida (2011). "Intact attentional processing but abnormal responding in M1 muscarinic receptor-deficient mice using an automated touchscreen method." *Neuropharmacology* **61**(8): 1366-1378.
- Bartus, R. T., R. L. Dean, 3rd, B. Beer and A. S. Lippa (1982). "The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction." *Science* **217**(4558): 408-414.
- Baxter, J. D. and J. B. Tyrrell (1994). "Evaluation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: importance in steroid therapy, AIDS, and other stress syndromes." *Adv Intern Med* **39**: 667-696.
- Baxter, M. G. and A. A. Chiba (1999). "Cognitive functions of the basal forebrain." *Curr Opin Neurobiol* **9**(2): 178-183.
- Bell, R. W., W. Nitschke, N. J. Bell and T. A. Zachman (1974). "Early experience, ultrasonic vocalizations, and maternal responsiveness in rats." *Dev Psychobiol* **7**(3): 235-242.
- Bell, R. W., W. Nitschke, T. H. Gorry and T. A. Zachman (1971). "Infantile stimulation and ultrasonic signaling: a possible mediator of early handling phenomena." *Dev Psychobiol* **4**(2): 181-191.
- Benetti, F., P. B. Mello, J. S. Bonini, S. Monteiro, M. Cammarota and I. Izquierdo (2009). "Early postnatal maternal deprivation in rats induces memory deficits in adult life that can be reversed by donepezil and galantamine." *Int J Dev Neurosci* **27**(1): 59-64.
- Berse, B. and J. K. Blusztajn (1995). "Coordinated up-regulation of choline acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter gene expression by the retinoic acid receptor alpha, cAMP, and leukemia inhibitory factor/ciliary neurotrophic factor signaling pathways in a murine septal cell line." *J Biol Chem* **270**(38): 22101-22104.
- Berse, B., I. Lopez-Coviella and J. K. Blusztajn (1999). "Activation of TrkA by nerve growth factor upregulates expression of the cholinergic gene locus but attenuates the response to ciliary neurotrophic growth factor." *Biochem J* **342** (Pt 2): 301-308.

Berse, B., W. Szczecinska, I. Lopez-Coviella, B. Madziar, V. Zemelko, R. Kaminski, K. Kozar, K. S. Lips, U. Pfeil and J. K. Blusztajn (2005). "Expression of high affinity choline transporter during mouse development in vivo and its upregulation by NGF and BMP-4 in vitro." Brain Res Dev Brain Res **157**(2): 132-140.

Bloem, B., R. B. Poorthuis and H. D. Mansvelder (2014). "Cholinergic modulation of the medial prefrontal cortex: the role of nicotinic receptors in attention and regulation of neuronal activity." Front Neural Circuits **8**: 17.

Bonner, T. I., A. C. Young, M. R. Brann and N. J. Buckley (1988). "Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes." Neuron **1**(5): 403-410.

Bredy, T. W., R. J. Grant, D. L. Champagne and M. J. Meaney (2003). "Maternal care influences neuronal survival in the hippocampus of the rat." Eur J Neurosci **18**(10): 2903-2909.

Bremne, J. D. and E. Vermetten (2001). "Stress and development: behavioral and biological consequences." Dev Psychopathol **13**(3): 473-489.

Brimijoin, S. (1983). "Molecular forms of acetylcholinesterase in brain, nerve and muscle: nature, localization and dynamics." Prog Neurobiol **21**(4): 291-322.

Buckley, N. J., T. I. Bonner, C. M. Buckley and M. R. Brann (1989). "Antagonist binding properties of five cloned muscarinic receptors expressed in CHO-K1 cells." Mol Pharmacol **35**(4): 469-476.

Calamandrei, G. and E. Alleva (1995). "Neuronal growth factors, neurotrophins and memory deficiency." Behav Brain Res **66**(1-2): 129-132.

Casanova, M. F., L. C. Walker, P. J. Whitehouse and D. L. Price (1985). "Abnormalities of the nucleus basalis in Down's syndrome." Ann Neurol **18**(3): 310-313.

Caulfield, M. P. and N. J. Birdsall (1998). "International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors." Pharmacol Rev **50**(2): 279-290.

Champagne, D. L., R. C. Bagot, F. van Hasselt, G. Ramakers, M. J. Meaney, E. R. de Kloet, M. Joels and H. Krugers (2008). "Maternal care and hippocampal plasticity: evidence for experience-dependent structural plasticity, altered synaptic functioning, and differential responsiveness to glucocorticoids and stress." J Neurosci **28**(23): 6037-6045.

Cirulli, F., A. Micera, E. Alleva and L. Aloe (1998). "Early maternal separation increases NGF expression in the developing rat hippocampus." Pharmacol Biochem Behav **59**(4): 853-858.

Colman, J. B., D. P. Laureano, T. M. Reis, R. Krolow, C. Dalmaz, C. D. Benetti and P. P. Silveira (2014). "Variations in the neonatal environment modulate adult behavioral and brain responses to palatable food withdrawal in adult female rats." Int J Dev Neurosci **40C**: 70-75.

Coyle, J. T., D. L. Price and M. R. DeLong (1983). "Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation." Science **219**(4589): 1184-1190.

Craft, T. K., N. Zhang, E. R. Glasper, P. D. Hurn and A. C. Devries (2006). "Neonatal factors influence adult stroke outcome." Psychoneuroendocrinology **31**(5): 601-613.

Cullinan, W. E., D. L. Helmreich and S. J. Watson (1996). "Fos expression in forebrain afferents to the hypothalamic paraventricular nucleus following swim stress." J Comp Neurol **368**(1): 88-99.

Cullinan, W. E., J. P. Herman and S. J. Watson (1993). "Ventral subicular interaction with the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence for a relay in the bed nucleus of the stria terminalis." J Comp Neurol **332**(1): 1-20.

Dalla, C., D. A. Bangasser, C. Edgecomb and T. J. Shors (2007). "Neurogenesis and learning: acquisition and asymptotic performance predict how many new cells survive in the hippocampus." Neurobiol Learn Mem **88**(1): 143-148.

Dalley, J. W., A. C. Mar, D. Economidou and T. W. Robbins (2008). "Neurobehavioral mechanisms of impulsivity: fronto-striatal systems and functional neurochemistry." Pharmacol Biochem Behav **90**(2): 250-260.

Dallman, M. F., S. F. Akana, C. S. Cascio, D. N. Darlington, L. Jacobson and N. Levin (1987). "Regulation of ACTH secretion: variations on a theme of B." Recent Prog Horm Res **43**: 113-173.

Daniels, W. M., C. Y. Pietersen, M. E. Carstens and D. J. Stein (2004). "Maternal separation in rats leads to anxiety-like behavior and a blunted ACTH response and altered neurotransmitter levels in response to a subsequent stressor." Metab Brain Dis **19**(1-2): 3-14.

Das, A., M. Dikshit and C. Nath (2001). "Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age." Life Sci **68**(13): 1545-1555.

Davis, A. A., J. J. Fritz, J. Wess, J. J. Lah and A. I. Levey (2010). "Deletion of M1 muscarinic acetylcholine receptors increases amyloid pathology in vitro and in vivo." J Neurosci **30**(12): 4190-4196.

Davis, A. A., C. J. Heilman, A. E. Brady, N. R. Miller, M. Fuerstenau-Sharp, B. J. Hanson, C. W. Lindsley, P. J. Conn, J. J. Lah and A. I. Levey (2010). "Differential effects of allosteric M(1) muscarinic acetylcholine receptor agonists on receptor activation, arrestin 3 recruitment, and receptor downregulation." ACS Chem Neurosci **1**(8): 542-551.

De Klippel, N., S. Sarre, G. Ebinger and Y. Michotte (1993). "Effect of M1- and M2-muscarinic drugs on striatal dopamine release and metabolism: an in vivo microdialysis study comparing normal and 6-hydroxydopamine-lesioned rats." Brain Res **630**(1-2): 57-64.

De Rosa, E. and M. E. Hasselmo (2000). "Muscarinic cholinergic neuromodulation reduces proactive interference between stored odor memories during associative learning in rats." Behav Neurosci **114**(1): 32-41.

Dennis, T. (2006). "Emotional self-regulation in preschoolers: The interplay of child approach reactivity, parenting, and control capacities." Dev Psychol **42**(1): 84-97.

Diamantopoulou, A., A. Raftogianni, A. Stamatakis, F. Alikaridis, M. S. Oitzl and F. Stylianopoulou (2012). "Denial of reward in the neonate shapes sociability and serotonergic activity in the adult rat." PLoS One **7**(3): e33793.

Diamantopoulou, A., A. Raftogianni, A. Stamatakis, M. S. Oitzl and F. Stylianopoulou (2013). "Effects of denial of reward through maternal contact in the neonatal period on adult hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in the rat." Psychoneuroendocrinology **38**(6): 830-841.

Diamantopoulou, A., A. Raftogianni, A. Stamatakis, S. Tzanoulinou, M. S. Oitzl and F. Stylianopoulou (2013). "Denial or receipt of expected reward through maternal contact during the neonatal period differentially affect the development of the rat amygdala and program its function in adulthood in a sex-dimorphic way." Psychoneuroendocrinology **38**(9): 1757-1771.

Diamantopoulou, A., A. Stamatakis, T. Panagiotaropoulos and F. Stylianopoulou (2011). "Reward or its denial during the neonatal period affects adult spatial memory and hippocampal phosphorylated cAMP response element-binding protein levels of both the neonatal and adult rat." Neuroscience **181**: 89-99.

Dinces, S. M., R. D. Romeo, B. S. McEwen and A. C. Tang (2014). "Enhancing offspring hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) regulation via systematic novelty exposure: the influence of maternal HPA function." Front Behav Neurosci **8**: 204.

Dolezal, V., X. Castell, M. Tomasi and M. F. Diebler (2001). "Stimuli that induce a cholinergic neuronal phenotype of NG108-15 cells upregulate ChAT and VACHT mRNAs but fail to increase VACHT protein." Brain Res Bull **54**(4): 363-373.

Easton, A., V. Douchamps, M. Eacott and C. Lever (2012). "A specific role for septohippocampal acetylcholine in memory?" Neuropsychologia **50**(13): 3156-3168.

Eiden, L. E. (1998). "The cholinergic gene locus." J Neurochem **70**(6): 2227-2240.

Encinas, J. M., A. Sierra, R. Valcarcel-Martin and S. Martin-Suarez (2013). "A developmental perspective on adult hippocampal neurogenesis." Int J Dev Neurosci **31**(7): 640-645.

Erickson, J. D., H. Varoqui, M. K. Schafer, W. Modi, M. F. Diebler, E. Weihe, J. Rand, L. E. Eiden, T. I. Bonner and T. B. Usdin (1994). "Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a "cholinergic" gene locus." J Biol Chem **269**(35): 21929-21932.

Escorihuela, R. M., A. Tobena and A. Fernandez-Teruel (1994). "Environmental enrichment reverses the detrimental action of early inconsistent stimulation and increases the beneficial effects of postnatal handling on shuttlebox learning in adult rats." Behav Brain Res **61**(2): 169-173.

Faure, P., S. Tolu, S. Valverde and J. Naude (2014). "Role of nicotinic acetylcholine receptors in regulating dopamine neuron activity." Neuroscience.

Fenoglio, K. A., K. L. Brunson, S. Avishai-Eliner, B. A. Stone, B. J. Kapadia and T. Z. Baram (2005). "Enduring, handling-evoked enhancement of hippocampal memory function and glucocorticoid receptor expression involves activation of the corticotropin-releasing factor type 1 receptor." Endocrinology **146**(9): 4090-4096.

Fenoglio, K. A., Y. Chen and T. Z. Baram (2006). "Neuroplasticity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis early in life requires recurrent recruitment of stress-regulating brain regions." J Neurosci **26**(9): 2434-2442.

Fernandez, H. L. and C. A. Hodges-Savola (1992). "Trophic regulation of acetylcholinesterase isoenzymes in adult mammalian skeletal muscles." Neurochem Res **17**(1): 115-124.

Fernandez, H. L. and C. A. Hodges-Savola (1996). "Physiological regulation of G4 AChE in fast-twitch muscle: effects of exercise and CGRP." J Appl Physiol (1985) **80**(1): 357-362.

Foster, D. J., P. R. Gentry, J. E. Lizardi-Ortiz, T. M. Bridges, M. R. Wood, C. M. Niswender, D. Sulzer, C. W. Lindsley, Z. Xiang and P. J. Conn (2014). "M5 receptor activation produces opposing physiological outcomes in dopamine neurons depending on the receptor's location." J Neurosci **34**(9): 3253-3262.

Fragkouli, A., C. Hearn, M. Errington, S. Cooke, M. Grigoriou, T. Bliss, F. Stylianopoulou and V. Pachnis (2005). "Loss of forebrain cholinergic neurons and impairment in spatial learning and memory in LHX7-deficient mice." Eur J Neurosci **21**(11): 2923-2938.

Fragkouli, A., V. Pachnis and F. Stylianopoulou (2009). "Sex differences in water maze performance and cortical neurotrophin levels of LHX7 null mutant mice." Neuroscience **158**(4): 1224-1233.

Francis, P. T., A. M. Palmer, M. Snape and G. K. Wilcock (1999). "The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress." J Neurol Neurosurg Psychiatry **66**(2): 137-147.

Fukudome, Y., T. Ohno-Shosaku, M. Matsui, Y. Omori, M. Fukaya, H. Tsubokawa, M. M. Taketo, M. Watanabe, T. Manabe and M. Kano (2004). "Two distinct classes of muscarinic action on hippocampal inhibitory synapses: M2-mediated direct suppression and M1/M3-mediated indirect suppression through endocannabinoid signalling." Eur J Neurosci **19**(10): 2682-2692.

Galizia, V. J. (1984). "Pharmacotherapy of memory loss in the geriatric patient." Drug Intell Clin Pharm **18**(10): 784-791.

Garcia-Ayllon, M. S., M. L. Campanari, M. F. Montenegro, I. Cuchillo-Ibanez, O. Belbin, A. Lleo, K. Tsim, C. J. Vidal and J. Saez-Valero (2014). "Presenilin-1 influences processing of the acetylcholinesterase membrane anchor PRiMA." Neurobiol Aging **35**(7): 1526-1536.

Garoflos, E., T. Panagiotaropoulos, S. Pondiki, A. Stamatakis, E. Philippidis and F. Stylianopoulou (2005). "Cellular mechanisms underlying the effects of an early experience on cognitive abilities and affective states." Ann Gen Psychiatry **4**(1): 8.

Garoflos, E., A. Stamatakis, A. Mantelas, H. Philippidis and F. Stylianopoulou (2005). "Cellular mechanisms underlying an effect of "early handling" on pCREB and BDNF in the neonatal rat hippocampus." Brain Res **1052**(2): 187-195.

Garoflos, E., A. Stamatakis, S. Pondiki, A. Apostolou, H. Philippidis and F. Stylianopoulou (2007). "Cellular mechanisms underlying the effect of a single exposure to neonatal handling on neurotrophin-3 in the brain of 1-day-old rats." Neuroscience **148**(2): 349-358.

Gartside, S. E., D. A. Johnson, M. M. Leitch, C. Troakes and C. D. Ingram (2003). "Early life adversity programs changes in central 5-HT neuronal function in adulthood." Eur J Neurosci **17**(11): 2401-2408.

Garzon, M. and V. M. Pickel (2013). "Somatodendritic targeting of M5 muscarinic receptor in the rat ventral tegmental area: implications for mesolimbic dopamine transmission." J Comp Neurol **521**(13): 2927-2946.

Gaykema, R. P., P. G. Luiten, C. Nyakas and J. Traber (1990). "Cortical projection patterns of the medial septum-diagonal band complex." J Comp Neurol **293**(1): 103-124.

Gibbs, M. E., J. De Vaus and K. T. Ng (1986). "Effect of stress-related hormones on short term memory." Behav Brain Res **19**(1): 1-6.

Gill, S. K., M. Ishak, T. Dobransky, V. Haroutunian, K. L. Davis and R. J. Rylett (2007). "82-kDa choline acetyltransferase is in nuclei of cholinergic neurons in human CNS and altered in aging and Alzheimer disease." Neurobiol Aging **28**(7): 1028-1040.

Glover, V. (1997). "Maternal stress or anxiety in pregnancy and emotional development of the child." Br J Psychiatry **171**: 105-106.

Gomez, J., L. Zhang, E. Kostenis, C. Felder, F. Bymaster, J. Brodtkin, H. Shannon, B. Xia, C. Deng and J. Wess (1999). "Enhancement of D1 dopamine receptor-mediated locomotor stimulation in M(4) muscarinic acetylcholine receptor knockout mice." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(18): 10483-10488.

Gonzalo-Ruiz, A. and L. Morte (2000). "Localization of amino acids, neuropeptides and cholinergic markers in neurons of the septum-diagonal band complex projecting to the retrosplenial granular cortex of the rat." Brain Res Bull **52**(6): 499-510.

Hasselmo, M. E., B. P. Anderson and J. M. Bower (1992). "Cholinergic modulation of cortical associative memory function." J Neurophysiol **67**(5): 1230-1246.

Heim, C. and C. B. Nemeroff (2001). "The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies." Biol Psychiatry **49**(12): 1023-1039.

Heim, C., D. J. Newport, R. Bonsall, A. H. Miller and C. B. Nemeroff (2001). "Altered pituitary-adrenal axis responses to provocative challenge tests in adult survivors of childhood abuse." Am J Psychiatry **158**(4): 575-581.

Heller, M. and D. J. Hanahan (1972). "Human erythrocyte membrane bound enzyme acetylcholinesterase." Biochim Biophys Acta **255**(1): 251-272.

Herman, J. P., M. M. Ostrander, N. K. Mueller and H. Figueiredo (2005). "Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **29**(8): 1201-1213.

Hernandez-Rodriguez, M., J. Correa-Basurto, F. Martinez-Ramos, M. Padilla, II, C. G. Benitez-Cardoza, E. Mera-Jimenez and M. C. Rosales-Hernandez (2014). "Design of Multi-Target Compounds as AChE, BACE1, and Amyloid-beta1-42 Oligomerization Inhibitors: In Silico and In Vitro Studies." J Alzheimers Dis **41**(4): 1073-1085.

Higley, J. D., S. J. Suomi and M. Linnoila (1996). "A nonhuman primate model of type II alcoholism? Part 2. Diminished social competence and excessive aggression correlates with low cerebrospinal fluid 5-hydroxyindoleacetic acid concentrations." Alcohol Clin Exp Res **20**(4): 643-650.

Higley, M. J. and M. R. Picciotto (2014). "Neuromodulation by acetylcholine: examples from schizophrenia and depression." Curr Opin Neurobiol **29C**: 88-95.

Hill, R. A., S. Kiss Von Soly, U. Ratnayake, M. Klug, M. D. Binder, A. J. Hannan and M. van den Buuse (2014). "Long-term effects of combined neonatal and adolescent stress on brain-

derived neurotrophic factor and dopamine receptor expression in the rat forebrain." *Biochim Biophys Acta* **1842**(11): 2126-2135.

Horvath, K. M., T. Harkany, J. Mulder, J. M. Koolhaas, P. G. Luiten and P. Meerlo (2004). "Neonatal handling increases sensitivity to acute neurodegeneration in adult rats." *J Neurobiol* **60**(4): 463-472.

Hucho, F. (1986). "The nicotinic acetylcholine receptor and its ion channel." *Eur J Biochem* **158**(2): 211-226.

Hulme, E. C., N. J. Birdsall and N. J. Buckley (1990). "Muscarinic receptor subtypes." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **30**: 633-673.

Humby, T., F. M. Laird, W. Davies and L. S. Wilkinson (1999). "Visuospatial attentional functioning in mice: interactions between cholinergic manipulations and genotype." *Eur J Neurosci* **11**(8): 2813-2823.

Huot, R. L., P. M. Plotsky, R. H. Lenox and R. K. McNamara (2002). "Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats." *Brain Res* **950**(1-2): 52-63.

Jarvik, M. E., E. R. Gritz and N. G. Schneider (1972). "Drugs and memory disorders in human aging." *Behav Biol* **7**(5): 643-668.

Jasper, H. H. and J. Tessier (1971). "Acetylcholine liberation from cerebral cortex during paradoxical (REM) sleep." *Science* **172**(3983): 601-602.

Jeon, J., D. Dencker, G. Wortwein, D. P. Woldbye, Y. Cui, A. A. Davis, A. I. Levey, G. Schutz, T. N. Sager, A. Mork, C. Li, C. X. Deng, A. Fink-Jensen and J. Wess (2010). "A subpopulation of neuronal M4 muscarinic acetylcholine receptors plays a critical role in modulating dopamine-dependent behaviors." *J Neurosci* **30**(6): 2396-2405.

Jiao, Z. Y., J. Wu, B. Wen, W. Z. Zhao and X. L. Du (2014). "M3 muscarinic acetylcholine receptor dysfunction inhibits Rac1 activity and disrupts VE-cadherin/beta-catenin and actin cytoskeleton interaction." *Biochem Cell Biol* **92**(2): 137-144.

Jones, C. K., A. E. Brady, A. A. Davis, Z. Xiang, M. Bubser, M. N. Tantawy, A. S. Kane, T. M. Bridges, J. P. Kennedy, S. R. Bradley, T. E. Peterson, M. S. Ansari, R. M. Baldwin, R. M. Kessler, A. Y. Deutch, J. J. Lah, A. I. Levey, C. W. Lindsley and P. J. Conn (2008). "Novel selective allosteric activator of the M1 muscarinic acetylcholine receptor regulates amyloid processing and produces antipsychotic-like activity in rats." *J Neurosci* **28**(41): 10422-10433.

Juliano, C., S. Sosunov, Z. Niatetskaya, J. A. Isler, I. Utkina-Sosunova, I. Jang, V. Ratner and V. Ten (2014). "Mild intermittent hypoxemia in neonatal mice causes permanent neurofunctional deficit and white matter hypomyelination." *Exp Neurol* **264C**: 33-42.

Katzman, R. (1986). "Alzheimer's disease." *N Engl J Med* **314**(15): 964-973.

Koizumi, M. and H. Takagishi (2014). "The relationship between child maltreatment and emotion recognition." *PLoS One* **9**(1): e86093.

Lee, M. G., J. J. Chrobak, A. Sik, R. G. Wiley and G. Buzsaki (1994). "Hippocampal theta activity following selective lesion of the septal cholinergic system." *Neuroscience* **62**(4): 1033-1047.

Lee, S., J. Kim, S. G. Seo, B. R. Choi, J. S. Han, K. W. Lee and J. Kim (2014). "Sulforaphane alleviates scopolamine-induced memory impairment in mice." *Pharmacol Res* **85**: 23-32.

Lee, Y. S., A. Danandeh, J. Baratta, C. Y. Lin, J. Yu and R. T. Robertson (2013). "Neurotrophic factors rescue basal forebrain cholinergic neurons and improve performance on a spatial learning test." *Exp Neurol* **249**: 178-186.

Levey, A. I. (1996). "Muscarinic acetylcholine receptor expression in memory circuits: implications for treatment of Alzheimer disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(24): 13541-13546.

Levine, S. (1957). "Infantile experience and resistance to physiological stress." *Science* **126**(3270): 405.

Levine, S. (1967). "Maternal and environmental influences on the adrenocortical response to stress in weanling rats." *Science* **156**(3772): 258-260.

Levine, S. (2001). "Primary social relationships influence the development of the hypothalamic--pituitary--adrenal axis in the rat." *Physiol Behav* **73**(3): 255-260.

Li, H., L. Chen, P. Li, X. Wang and H. Zhai (2014). "Insular muscarinic signaling regulates anxiety-like behaviors in rats on the elevated plus-maze." *Behav Brain Res* **270**: 256-260.

Lin, H., F. C. Hsu, B. H. Baumann, D. A. Coulter, S. A. Anderson and D. R. Lynch (2014). "Cortical parvalbumin GABAergic deficits with alpha7 nicotinic acetylcholine receptor deletion: implications for schizophrenia." *Mol Cell Neurosci* **61C**: 163-175.

Lin, H. Q., Y. Wang, K. L. Chan, T. M. Ip and C. C. Wan (2014). "Differential regulation of lipid metabolism genes in the brain of acetylcholinesterase knockout mice." *J Mol Neurosci* **53**(3): 397-408.

Linke, R., H. Schwegler and M. Boldyreva (1994). "Cholinergic and GABAergic septo-hippocampal projection neurons in mice: a retrograde tracing study combined with double immunocytochemistry for choline acetyltransferase and parvalbumin." *Brain Res* **653**(1-2): 73-80.

Liu, D., J. Diorio, J. C. Day, D. D. Francis and M. J. Meaney (2000). "Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats." *Nat Neurosci* **3**(8): 799-806.

Liu, D., J. Diorio, B. Tannenbaum, C. Caldji, D. Francis, A. Freedman, S. Sharma, D. Pearson, P. M. Plotsky and M. J. Meaney (1997). "Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress." *Science* **277**(5332): 1659-1662.

Lu, Z. H., S. Fukuda, Y. Minakawa, A. Yasuda, H. Sakamoto, S. Sawamura, H. Takahashi and N. Ishii (2013). "Melanin concentrating hormone induces hippocampal acetylcholine release via the medial septum in rats." *Peptides* **44**: 32-39.

Lucas-Meunier, E., P. Fossier, G. Baux and M. Amar (2003). "Cholinergic modulation of the cortical neuronal network." *Pflugers Arch* **446**(1): 17-29.

Lukas, R. J. (1995). "Diversity and patterns of regulation of nicotinic receptor subtypes." *Ann N Y Acad Sci* **757**: 153-168.

Ma, T. F., L. Zhou, Y. Wang, S. J. Qin, Y. Zhang, B. Hu, J. Z. Yan, X. Ma, C. H. Zhou and S. L. Gu (2013). "A selective M1 and M3 receptor antagonist, penehyclidine hydrochloride, prevents postischemic LTP: involvement of NMDA receptors." *Synapse* **67**(12): 865-874.

Marin, O., S. A. Anderson and J. L. Rubenstein (2000). "Origin and molecular specification of striatal interneurons." *J Neurosci* **20**(16): 6063-6076.

Markovic, B., N. V. Radonjic, M. Aksic, B. Filipovic and N. Petronijevic (2014). "Long-term effects of maternal deprivation on cholinergic system in rat brain." *Biomed Res Int* **2014**: 636574.

Matsui, M., S. Yamada, T. Oki, T. Manabe, M. M. Taketo and F. J. Ehler (2004). "Functional analysis of muscarinic acetylcholine receptors using knockout mice." *Life Sci* **75**(25): 2971-2981.

McEwen, B. S. (2003). "Early life influences on life-long patterns of behavior and health." *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* **9**(3): 149-154.

McGaugh, J. L. (2004). "The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences." *Annu Rev Neurosci* **27**: 1-28.

McGaughy, J., J. W. Dalley, C. H. Morrison, B. J. Everitt and T. W. Robbins (2002). "Selective behavioral and neurochemical effects of cholinergic lesions produced by intrabasalis infusions of 192 IgG-saporin on attentional performance in a five-choice serial reaction time task." *J Neurosci* **22**(5): 1905-1913.

McGeer, E. G. and P. L. McGeer (2003). "Clinically tested drugs for Alzheimer's disease." *Expert Opin Investig Drugs* **12**(7): 1143-1151.

Meaney, M. J., D. H. Aitken, S. Bhatnagar and R. M. Sapolsky (1991). "Postnatal handling attenuates certain neuroendocrine, anatomical, and cognitive dysfunctions associated with aging in female rats." Neurobiol Aging **12**(1): 31-38.

Meaney, M. J., J. B. Mitchell, D. H. Aitken, S. Bhatnagar, S. R. Bodnoff, L. J. Iny and A. Sarrieau (1991). "The effects of neonatal handling on the development of the adrenocortical response to stress: implications for neuropathology and cognitive deficits in later life." Psychoneuroendocrinology **16**(1-3): 85-103.

Meaney, M. J., V. Viau, S. Bhatnagar, K. Betito, L. J. Iny, D. O'Donnell and J. B. Mitchell (1991). "Cellular mechanisms underlying the development and expression of individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response." J Steroid Biochem Mol Biol **39**(2): 265-274.

Medeiros, R., M. Kitazawa, A. Caccamo, D. Baglietto-Vargas, T. Estrada-Hernandez, D. H. Cribbs, A. Fisher and F. M. LaFerla (2011). "Loss of muscarinic M1 receptor exacerbates Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline." Am J Pathol **179**(2): 980-991.

Meerlo, P., K. M. Horvath, G. M. Nagy, B. Bohus and J. M. Koolhaas (1999). "The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity." J Neuroendocrinol **11**(12): 925-933.

Mesulam, M. M., E. J. Mufson, B. H. Wainer and A. I. Levey (1983). "Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6)." Neuroscience **10**(4): 1185-1201.

Metherate, R., C. L. Cox and J. H. Ashe (1992). "Cellular bases of neocortical activation: modulation of neural oscillations by the nucleus basalis and endogenous acetylcholine." J Neurosci **12**(12): 4701-4711.

Miranda, M. I. and F. Bermudez-Rattoni (1999). "Reversible inactivation of the nucleus basalis magnocellularis induces disruption of cortical acetylcholine release and acquisition, but not retrieval, of aversive memories." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(11): 6478-6482.

Mobley, W. C., J. L. Rutkowski, G. I. Tennekoon, K. Buchanan and M. V. Johnston (1985). "Choline acetyltransferase activity in striatum of neonatal rats increased by nerve growth factor." Science **229**(4710): 284-287.

Mobley, W. C., J. L. Rutkowski, G. I. Tennekoon, J. Gemski, K. Buchanan and M. V. Johnston (1986). "Nerve growth factor increases choline acetyltransferase activity in developing basal forebrain neurons." Brain Res **387**(1): 53-62.

Molas, S. and M. Dierssen (2014). "The role of nicotinic receptors in shaping and functioning of the glutamatergic system: A window into cognitive pathology." Neurosci Biobehav Rev.

Mori, T., Z. Yuxing, H. Takaki, M. Takeuchi, K. Iseki, S. Hagino, J. Kitanaka, M. Takemura, H. Misawa, M. Ikawa, M. Okabe and A. Wanaka (2004). "The LIM homeobox gene, L3/Lhx8, is necessary for proper development of basal forebrain cholinergic neurons." Eur J Neurosci **19**(12): 3129-3141.

Mufson, E. J. and J. H. Kordower (1989). "Nerve growth factor receptor expressing human basal forebrain neurons: pathologic alterations in Alzheimer's and Parkinson's disease." Prog Clin Biol Res **317**: 401-414.

Munck, A., P. M. Guyre and N. J. Holbrook (1984). "Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions." Endocr Rev **5**(1): 25-44.

Nakamura, K., K. Hamada, A. Terauchi, M. Matsui, T. Nakamura, T. Okada and K. Mikoshiba (2013). "Distinct roles of M1 and M3 muscarinic acetylcholine receptors controlling oscillatory and non-oscillatory [Ca²⁺]_i increase." Cell Calcium **54**(2): 111-119.

Nemeroff, C. B. (2004). "Neurobiological consequences of childhood trauma." J Clin Psychiatry **65 Suppl 1**: 18-28.

Newman, M. B., S. J. Nazian, P. R. Sanberg, D. M. Diamond and R. D. Shytle (2001). "Corticosterone-attenuating and anxiolytic properties of mecamylamine in the rat." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **25**(3): 609-620.

Nguyen, M. L., G. D. Cox and S. M. Parsons (1998). "Kinetic parameters for the vesicular acetylcholine transporter: two protons are exchanged for one acetylcholine." Biochemistry **37**(38): 13400-13410.

Nishi, M., N. Horii-Hayashi, T. Sasagawa and W. Matsunaga (2013). "Effects of early life stress on brain activity: implications from maternal separation model in rodents." Gen Comp Endocrinol **181**: 306-309.

Nitsch, R. M., S. Rossner, C. Albrecht, M. Mayhaus, J. Enderich, R. Schliebs, M. Wegner, T. Arendt and H. von der Kammer (1998). "Muscarinic acetylcholine receptors activate the acetylcholinesterase gene promoter." J Physiol Paris **92**(3-4): 257-264.

O'Mahony, S. M., J. R. Marchesi, P. Scully, C. Codling, A. M. Ceolho, E. M. Quigley, J. F. Cryan and T. G. Dinan (2009). "Early life stress alters behavior, immunity, and microbiota in rats: implications for irritable bowel syndrome and psychiatric illnesses." Biol Psychiatry **65**(3): 263-267.

Oda, Y. (1999). "Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system." Pathol Int **49**(11): 921-937.

Ohoka, H., T. Koide, S. Goto, S. Murase, A. Kanai, T. Masuda, B. Aleksic, N. Ishikawa, K. Furumura and N. Ozaki (2014). "Effects of maternal depressive symptomatology during pregnancy and the postpartum period on infant-mother attachment." Psychiatry Clin Neurosci **68**(8): 631-639.

Okuda, T., T. Haga, Y. Kanai, H. Endou, T. Ishihara and I. Katsura (2000). "Identification and characterization of the high-affinity choline transporter." Nat Neurosci **3**(2): 120-125.

Onali, P. and M. C. Olanas (2002). "Muscarinic M4 receptor inhibition of dopamine D1-like receptor signalling in rat nucleus accumbens." Eur J Pharmacol **448**(2-3): 105-111.

Paez-Gonzalez, P., B. Asrican, E. Rodriguez and C. T. Kuo (2014). "Identification of distinct ChAT(+) neurons and activity-dependent control of postnatal SVZ neurogenesis." Nat Neurosci **17**(7): 934-942.

Pagida, M. A., A. E. Konstantinidou, E. Tsekoura, D. Mangoura, E. Patsouris and M. T. Panayotacopoulou (2013). "Vulnerability of the mesencephalic dopaminergic neurons of the human neonate to prolonged perinatal hypoxia: an immunohistochemical study of tyrosine hydroxylase expression in autopsy material." J Neuropathol Exp Neurol **72**(4): 337-350.

Pahud, G., N. Salem, J. van de Goor, J. Medilanski, N. Pellegrinelli and L. Eder-Colli (1998). "Study of subcellular localization of membrane-bound choline acetyltransferase in Drosophila central nervous system and its association with membranes." Eur J Neurosci **10**(5): 1644-1653.

Panagiotaropoulos, T., A. Diamantopoulou, A. Stamatakis, M. Dimitropoulou and F. Stylianopoulou (2009). "Learning of a T-maze by rat pups when contact with the mother is either permitted or denied." Neurobiol Learn Mem **91**(1): 2-12.

Pang, K., M. J. Williams, H. Egeth and D. S. Olton (1993). "Nucleus basalis magnocellularis and attention: effects of muscimol infusions." Behav Neurosci **107**(6): 1031-1038.

Parikh, V., C. S. Bernard, S. X. Naughton and B. Yegla (2014). "Interactions between Abeta oligomers and presynaptic cholinergic signaling: Age-dependent effects on attentional capacities." Behav Brain Res.

Perry, E. K. and R. H. Perry (1985). "A review of neuropathological and neurochemical correlates of Alzheimer's disease." Dan Med Bull **32 Suppl 1**: 27-34.

Pham, T. M., S. Soderstrom, B. G. Henriksson and A. H. Mohammed (1997). "Effects of neonatal stimulation on later cognitive function and hippocampal nerve growth factor." Behav Brain Res **86**(1): 113-120.

Pinheiro, R. M., M. N. de Lima, B. C. Portal, S. B. Busato, L. Falavigna, R. D. Ferreira, A. C. Paz, B. W. de Aguiar, F. Kapczinski and N. Schroder (2014). "Long-lasting recognition memory impairment and alterations in brain levels of cytokines and BDNF induced by maternal deprivation: effects of valproic acid and topiramate." J Neural Transm.

Pondiki, S., A. Stamatakis, A. Fragkouli, H. Philippidis and F. Stylianopoulou (2006). "Effects of neonatal handling on the basal forebrain cholinergic system of adult male and female rats." Neuroscience **142**(2): 305-314.

Power, A. E., C. K. McIntyre, A. Litmanovich and J. L. McGaugh (2003). "Cholinergic modulation of memory in the basolateral amygdala involves activation of both m1 and m2 receptors." Behav Pharmacol **14**(3): 207-213.

Proulx, E., D. Suri, S. P. Heximer, V. A. Vaidya and E. K. Lambe (2013). "Early Stress Prevents the Potentiation of Muscarinic Excitation by Calcium Release in Adult Prefrontal Cortex." Biol Psychiatry.

Pryce, C. R., D. Bettschen and J. Feldon (2001). "Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat." Dev Psychobiol **38**(4): 239-251.

Puron-Sierra, L. and M. I. Miranda (2014). "Histaminergic modulation of cholinergic release from the nucleus basalis magnocellularis into insular cortex during taste aversive memory formation." PLoS One **9**(3): e91120.

Rabizadeh, S., J. Oh, L. T. Zhong, J. Yang, C. M. Bitler, L. L. Butcher and D. E. Bredesen (1993). "Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor." Science **261**(5119): 345-348.

Raftogianni, A., A. Diamantopoulou, F. Alikaridis, A. Stamatakis and F. Stylianopoulou (2012). "Effects of interaction of an early experience of reward through maternal contact or its denial with social stress during adolescence on the serotonergic system and the stress responsiveness of adult female rats." Neuroscience **209**: 84-96.

Raftogianni, A., A. Stamatakis, A. Diamantopoulou, A. M. Kolia and F. Stylianopoulou (2014). "Effects of an early experience of reward through maternal contact or its denial on the dopaminergic system of the rat brain." Neuroscience **269**: 11-20.

Rana, S., P. C. Pugh, N. Jackson, S. M. Clinton and I. A. Kerman (2015). "Inborn stress reactivity shapes adult behavioral consequences of early-life maternal separation stress." Neurosci Lett **584**: 146-150.

Rastogi, S., S. Unni, S. Sharma, T. R. Laxmi and B. M. Kutty (2014). "Cholinergic immunotoxin 192 IgG-SAPORIN alters subicular theta-gamma activity and impairs spatial learning in rats." Neurobiol Learn Mem **114**: 117-126.

Resendes, M. C., T. Dobransky, S. S. Ferguson and R. J. Rylett (1999). "Nuclear localization of the 82-kDa form of human choline acetyltransferase." J Biol Chem **274**(27): 19417-19421.

Rey, M., E. Carlier, M. Talmi and B. Soumireu-Mourat (1994). "Corticosterone effects on long-term potentiation in mouse hippocampal slices." Neuroendocrinology **60**(1): 36-41.

Richter, N., I. Allendorf, O. A. Onur, L. Kracht, M. Dietlein, M. Tittgemeyer, B. Neumaier, G. R. Fink and J. Kukulja (2014). "The integrity of the cholinergic system determines memory performance in healthy elderly." Neuroimage.

Rieger, F., A. Faivre-Bauman, P. Benda and M. Vigny (1976). "Molecular forms of acetylcholinesterase: their de novo synthesis in mouse neuroblastoma cells." J Neurochem **27**(5): 1059-1063.

Risbrough, V., B. Bontempi and F. Menzaghi (2002). "Selective immunolesioning of the basal forebrain cholinergic neurons in rats: effect on attention using the 5-choice serial reaction time task." Psychopharmacology (Berl) **164**(1): 71-81.

Rivier, C., M. Brownstein, J. Spiess, J. Rivier and W. Vale (1982). "In vivo corticotropin-releasing factor-induced secretion of adrenocorticotropin, beta-endorphin, and corticosterone." Endocrinology **110**(1): 272-278.

Rivier, C. and W. Vale (1983). "Effect of angiotensin II on ACTH release in vivo: role of corticotropin-releasing factor." Regul Pept **7**(3): 253-258.

Rivier, C. L. and P. M. Plotsky (1986). "Mediation by corticotropin releasing factor (CRF) of adenohipophysial hormone secretion." Annu Rev Physiol **48**: 475-494.

Robertson, R. T., J. Baratta, J. Yu and K. M. Guthrie (2006). "A role for neurotrophin-3 in targeting developing cholinergic axon projections to cerebral cortex." Neuroscience **143**(2): 523-539.

Roland, B. L. and P. E. Sawchenko (1993). "Local origins of some GABAergic projections to the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in the rat." J Comp Neurol **332**(1): 123-143.

Roland, J. J., A. L. Stewart, K. L. Janke, M. R. Gielow, J. A. Kostek, L. M. Savage, R. J. Servatius and K. C. Pang (2014). "Medial septum-diagonal band of Broca (MSDB) GABAergic regulation of hippocampal acetylcholine efflux is dependent on cognitive demands." J Neurosci **34**(2): 506-514.

Romanelli, M. N. and F. Gualtieri (2003). "Cholinergic nicotinic receptors: competitive ligands, allosteric modulators, and their potential applications." Med Res Rev **23**(4): 393-426.

Runfeldt, M. J., A. J. Sadovsky and J. N. MacLean (2014). "Acetylcholine Functionally Reorganizes Neocortical Microcircuits." J Neurophysiol.

Sadowski, H., B. Ugarte, I. Kolvin, C. Kaplan and J. Barnes (1999). "Early life family disadvantages and major depression in adulthood." Br J Psychiatry **174**: 112-120.

Samadi, A., M. Estrada, C. Perez, M. I. Rodriguez-Franco, I. Iriepa, I. Moraleda, M. Chioua and J. Marco-Contelles (2012). "Pyridonepezils, new dual AChE inhibitors as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease: synthesis, biological assessment, and molecular modeling." Eur J Med Chem **57**: 296-301.

Sanchez, M. M., C. O. Ladd and P. M. Plotsky (2001). "Early adverse experience as a developmental risk factor for later psychopathology: evidence from rodent and primate models." Dev Psychopathol **13**(3): 419-449.

Sarter, M. and J. P. Bruno (2004). "Developmental origins of the age-related decline in cortical cholinergic function and associated cognitive abilities." Neurobiol Aging **25**(9): 1127-1139.

Scarr, E., J. M. Craig, M. J. Cairns, M. S. Seo, J. C. Galati, N. J. Beveridge, A. Gibbons, S. Juzva, B. Weinrich, M. Parkinson-Bates, A. P. Carroll, R. Saffery and B. Dean (2013). "Decreased cortical muscarinic M1 receptors in schizophrenia are associated with changes in gene promoter methylation, mRNA and gene targeting microRNA." Transl Psychiatry **3**: e230.

Schable, S., B. Topic, T. Buddenberg, D. Petri, J. P. Huston and M. A. de Souza Silva (2011). "Neurokinin3-R agonism in aged rats has anxiolytic-, antidepressant-, and promnestic-like effects and stimulates ACh release in frontal cortex, amygdala and hippocampus." Eur Neuropsychopharmacol **21**(6): 484-494.

Schafer, M. K., L. E. Eiden and E. Weihe (1998). "Cholinergic neurons and terminal fields revealed by immunohistochemistry for the vesicular acetylcholine transporter. I. Central nervous system." Neuroscience **84**(2): 331-359.

Schmidt, L. S., M. Thomsen, P. Weikop, D. Dencker, J. Wess, D. P. Woldbye, G. Wortwein and A. Fink-Jensen (2011). "Increased cocaine self-administration in M4 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice." Psychopharmacology (Berl) **216**(3): 367-378.

Selye, H. (1950). "Stress and the general adaptation syndrome." Br Med J **1**(4667): 1383-1392.

Selye, H. (1973). "The evolution of the stress concept." Am Sci **61**(6): 692-699.

Selye, H. (1985). "The nature of stress." Basal Facts **7**(1): 3-11.

Selye, H. and C. Fortier (1949). "Adaptive reactions to stress." Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis **29**: 3-18.

Shirey, J. K., A. E. Brady, P. J. Jones, A. A. Davis, T. M. Bridges, J. P. Kennedy, S. B. Jadhav, U. N. Menon, Z. Xiang, M. L. Watson, E. P. Christian, J. J. Doherty, M. C. Quirk, D. H. Snyder, J. J. Lah, A. I. Levey, M. M. Nicolle, C. W. Lindsley and P. J. Conn (2009). "A selective allosteric potentiator of the M1 muscarinic acetylcholine receptor increases activity of medial

prefrontal cortical neurons and restores impairments in reversal learning." *J Neurosci* **29**(45): 14271-14286.

Smolders, I., L. Bogaert, G. Ebinger and Y. Michotte (1997). "Muscarinic modulation of striatal dopamine, glutamate, and GABA release, as measured with in vivo microdialysis." *J Neurochem* **68**(5): 1942-1948.

Smotherman, W. P. (1983). "Mother-infant interaction and the modulation of pituitary-adrenal activity in rat pups after early stimulation." *Dev Psychobiol* **16**(3): 169-176.

Soma, S., N. Suematsu and S. Shimegi (2014). "Blockade of muscarinic receptors impairs the retrieval of well-trained memory." *Front Aging Neurosci* **6**: 63.

Soreq, H. and S. Seidman (2001). "Acetylcholinesterase--new roles for an old actor." *Nat Rev Neurosci* **2**(4): 294-302.

Stamatakis, A., A. Diamantopoulou, T. Panagiotaropoulos, A. Raftogianni and F. Stylianopoulou (2013). "Effects of an Early Experience Involving Training in a T-Maze Under either Denial or Receipt of Expected Reward through Maternal Contact." *Front Endocrinol (Lausanne)* **4**: 178.

Stamatakis, A., A. Diamantopoulou, T. Panagiotaropoulos, A. Raftogianni and F. Stylianopoulou (2014). "A novel model of early experiences involving neonatal learning of a T-maze using maternal contact as a reward or its denial as an event of mild emotional adversity." *Dev Psychobiol*.

Stamatakis, A., S. Pondiki, E. Kitraki, A. Diamantopoulou, T. Panagiotaropoulos, A. Raftogianni and F. Stylianopoulou (2008). "Effect of neonatal handling on adult rat spatial learning and memory following acute stress." *Stress* **11**(2): 148-159.

Steidl, S., A. D. Miller, C. D. Blaha and J. S. Yeomans (2011). "M(5) muscarinic receptors mediate striatal dopamine activation by ventral tegmental morphine and pedunculopontine stimulation in mice." *PLoS One* **6**(11): e27538.

Stepanichev, M., N. Lazareva, G. Tukhbatova, S. Salozhin and N. Gulyaeva (2014). "Transient disturbances in contextual fear memory induced by Abeta(25-35) in rats are accompanied by cholinergic dysfunction." *Behav Brain Res* **259**: 152-157.

Sterley, T. L., F. M. Howells and V. A. Russell (2014). "Nicotine-stimulated release of [(3)H]norepinephrine is reduced in the hippocampus of an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder, the spontaneously hypertensive rat." *Brain Res* **1572**: 1-10.

Suchecki, D., P. Rosenfeld and S. Levine (1993). "Maternal regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat: the roles of feeding and stroking." *Brain Res Dev Brain Res* **75**(2): 185-192.

Sussel, L., O. Marin, S. Kimura and J. L. Rubenstein (1999). "Loss of Nkx2.1 homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum." *Development* **126**(15): 3359-3370.

Swain, J. E. (2008). "Baby stimuli and the parent brain: functional neuroimaging of the neural substrates of parent-infant attachment." *Psychiatry (Edgmont)* **5**(8): 28-36.

Taylor, P. and Z. Radic (1994). "The cholinesterases: from genes to proteins." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **34**: 281-320.

Teles-Grilo Ruivo, L. M. and J. R. Mellor (2013). "Cholinergic modulation of hippocampal network function." *Front Synaptic Neurosci* **5**: 2.

Tirgar, F., A. Rezayof and M. R. Zarrindast (2014). "Central amygdala nicotinic and 5-HT1A receptors mediate the reversal effect of nicotine and MDMA on morphine-induced amnesia." *Neuroscience*.

Tzavara, E. T., F. P. Bymaster, C. C. Felder, M. Wade, J. Gomeza, J. Wess, D. L. McKinzie and G. G. Nomikos (2003). "Dysregulated hippocampal acetylcholine neurotransmission and impaired cognition in M2, M4 and M2/M4 muscarinic receptor knockout mice." *Mol Psychiatry* **8**(7): 673-679.

Unal, C. T., D. Pare and L. Zaborszky (2015). "Impact of Basal forebrain cholinergic inputs on basolateral amygdala neurons." J Neurosci **35**(2): 853-863.

Uzum, G., A. S. Diler, N. Bahcekapili, M. Tasyurekli and Y. Z. Ziyilan (2004). "Nicotine improves learning and memory in rats: morphological evidence for acetylcholine involvement." Int J Neurosci **114**(9): 1163-1179.

Vakalopoulos, C. (2013). "A cholinergic hypothesis of the unconscious in affective disorders." Front Neurosci **7**: 220.

Vega-Flores, G., S. E. Rubio, M. T. Jurado-Parras, M. A. Gomez-Climent, C. S. Hampe, M. Manto, E. Soriano, M. Pascual, A. Gruart and J. M. Delgado-Garcia (2014). "The GABAergic septohippocampal pathway is directly involved in internal processes related to operant reward learning." Cereb Cortex **24**(8): 2093-2107.

Vicentic, A., D. Francis, M. Moffett, A. Lakatos, G. Rogge, G. W. Hubert, J. Harley and M. J. Kuhar (2006). "Maternal separation alters serotonergic transporter densities and serotonergic 1A receptors in rat brain." Neuroscience **140**(1): 355-365.

Vincent, S. R., K. Satoh and H. C. Fibiger (1986). "The localization of central cholinergic neurons." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **10**(3-5): 637-656.

Volpicelli-Daley, L. A., E. G. Duysen, O. Lockridge and A. I. Levey (2003). "Altered hippocampal muscarinic receptors in acetylcholinesterase-deficient mice." Ann Neurol **53**(6): 788-796.

Volpicelli-Daley, L. A., A. Hrabovska, E. G. Duysen, S. M. Ferguson, R. D. Blakely, O. Lockridge and A. I. Levey (2003). "Altered striatal function and muscarinic cholinergic receptors in acetylcholinesterase knockout mice." Mol Pharmacol **64**(6): 1309-1316.

Volpicelli, L. A. and A. I. Levey (2004). "Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in cerebral cortex and hippocampus." Prog Brain Res **145**: 59-66.

von der Kammer, H., C. Demiralay, B. Andresen, C. Albrecht, M. Mayhaus and R. M. Nitsch (2001). "Regulation of gene expression by muscarinic acetylcholine receptors." Biochem Soc Symp(67): 131-140.

Ward, N. L. and T. Hagg (2000). "BDNF is needed for postnatal maturation of basal forebrain and neostriatum cholinergic neurons in vivo." Exp Neurol **162**(2): 297-310.

Wenk, G. L. (1997). "The nucleus basalis magnocellularis cholinergic system: one hundred years of progress." Neurobiol Learn Mem **67**(2): 85-95.

Wenk, G. L. and B. Hauss-Wegrzyniak (1999). "Altered cholinergic function in the basal forebrain of girls with Rett syndrome." Neuropediatrics **30**(3): 125-129.

Wess, J. (1996). "Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors." Crit Rev Neurobiol **10**(1): 69-99.

Weston-Green, K., X. F. Huang, J. Lian and C. Deng (2012). "Effects of olanzapine on muscarinic M3 receptor binding density in the brain relates to weight gain, plasma insulin and metabolic hormone levels." Eur Neuropsychopharmacol **22**(5): 364-373.

Whitehouse, P. J., D. L. Price, A. W. Clark, J. T. Coyle and M. R. DeLong (1981). "Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis." Ann Neurol **10**(2): 122-126.

Whitehouse, P. J., D. L. Price, R. G. Struble, A. W. Clark, J. T. Coyle and M. R. DeLong (1982). "Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain." Science **215**(4537): 1237-1239.

Williams, B., A. C. Granholm and K. Sambamurti (2007). "Age-dependent loss of NGF signaling in the rat basal forebrain is due to disrupted MAPK activation." Neurosci Lett **413**(2): 110-114.

Williams, B. J., H. A. Bimonte-Nelson and A. C. Granholm-Bentley (2006). "ERK-mediated NGF signaling in the rat septo-hippocampal pathway diminishes with age." Psychopharmacology (Berl) **188**(4): 605-618.

Williams, B. J., M. Eriksdotter-Jonhagen and A. C. Granholm (2006). "Nerve growth factor in treatment and pathogenesis of Alzheimer's disease." Prog Neurobiol **80**(3): 114-128.

Woody, C. D. and E. Gruen (1987). "Acetylcholine reduces net outward currents measured in vivo with single electrode voltage clamp techniques in neurons of the motor cortex of cats." Brain Res **424**(1): 193-198.

Woolf, N. J. (1991). "Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord." Prog Neurobiol **37**(6): 475-524.

Woolf, N. J. and L. L. Butcher (1981). "Cholinergic neurons in the caudate-putamen complex proper are intrinsically organized: a combined Evans blue and acetylcholinesterase analysis." Brain Res Bull **7**(5): 487-507.

Wu, D. and L. B. Hersh (1994). "Choline acetyltransferase: celebrating its fiftieth year." J Neurochem **62**(5): 1653-1663.

Yakel, J. L. (2014). "Nicotinic ACh receptors in the hippocampal circuit; functional expression and role in synaptic plasticity." J Physiol.

Yi, F., J. Ball, K. E. Stoll, V. C. Satpute, S. M. Mitchell, J. L. Pauli, B. B. Holloway, A. D. Johnston, N. M. Nathanson, K. Deisseroth, D. J. Gerber, S. Tonegawa and J. J. Lawrence (2014). "Direct excitation of parvalbumin-positive interneurons by M1 muscarinic acetylcholine receptors: roles in cellular excitability, inhibitory transmission and cognition." J Physiol.

Young, M. B. and S. A. Thomas (2014). "M1-muscarinic receptors promote fear memory consolidation via phospholipase C and the M-current." J Neurosci **34**(5): 1570-1578.

Yousefi, B., M. Nasehi, F. Khakpai and M. R. Zarrindast (2012). "Possible interaction of cholinergic and GABAergic systems between MS and CA1 upon memory acquisition in rats." Behav Brain Res **235**(2): 231-243.

Yuen, E. C., C. L. Howe, Y. Li, D. M. Holtzman and W. C. Mobley (1996). "Nerve growth factor and the neurotrophic factor hypothesis." Brain Dev **18**(5): 362-368.

Zaborszky, L., W. E. Cullinan and A. Braun (1991). "Afferents to basal forebrain cholinergic projection neurons: an update." Adv Exp Med Biol **295**: 43-100.

Zaborszky, L. and A. Duque (2000). "Local synaptic connections of basal forebrain neurons." Behav Brain Res **115**(2): 143-158.

Zaharia, M. D., J. Kulczycki, N. Shanks, M. J. Meaney and H. Anisman (1996). "The effects of early postnatal stimulation on Morris water-maze acquisition in adult mice: genetic and maternal factors." Psychopharmacology (Berl) **128**(3): 227-239.

Zhang, X., L. Lu, S. Liu, W. Ye, J. Wu and X. Zhang (2013). "Acetylcholinesterase deficiency decreases apoptosis in dopaminergic neurons in the neurotoxin model of Parkinson's disease." Int J Biochem Cell Biol **45**(2): 265-272.

Zhao, Y., O. Marin, E. Hermesz, A. Powell, N. Flames, M. Palkovits, J. L. Rubenstein and H. Westphal (2003). "The LIM-homeobox gene Lhx8 is required for the development of many cholinergic neurons in the mouse forebrain." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(15): 9005-9010.

Zugno, A. I., I. M. de Miranda, J. Budni, A. M. Volpato, R. D. Luca, P. F. Deroza, M. B. de Oliveira, A. S. Heylmann, F. da Rosa Silveira, P. Wessler, G. Antunes Mastella, A. L. Cipriano and J. Quevedo (2013). "Effect of maternal deprivation on acetylcholinesterase activity and behavioral changes on the ketamine-induced animal model of schizophrenia." Neuroscience **248C**: 252-260.

Posters

Manatos V, Stamatakis A, Stylianopoulou F (2013)

Interaction of an early experience involving reward or denial through maternal contact, with exposure to a novel environment on NMDA receptor subunits in the adult rat brain.

Επιστημονικά Βιβλία

- Butler R. J., Rosenthal, G. (1978). 'Behaviour and Rehabilitation, Behavioural treatment of long-stay patients'. Bristol: John Wright and Sons Limited.
- Kandel E.R., Schwartz J.H. and Jessell T.M. (1999): Essentials of Neural Science and Behavior, Appleton and Lange, μετάφραση από τις Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- Slack Jonathan (2006). Essential Developmental biology, 2nd edition. Μετάφραση από τις Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπασδρά και ΣΙΑ Ο.Ε.
- Vander, Sherman, Luciano, M. Τσακόπουλος (2001): Φυσιολογία του Ανθρώπου Ι. 8η έκδοση, μετάφραση από Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- Παναγής Γεώργιος (2010). Νευροεπιστήμη της συμπεριφοράς, Β' Ανατύπωση, Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης ΕΠΕ.