



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ



ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΙΔΡΥΜΑ ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ, ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»**

*«α-συνουκλεΐνη και μη κινητικά συμπτώματα στη νόσο Parkinson:
πειραματική προσέγγιση σε ένα νέο ζωικό μοντέλο συνουκλεϊνοπάθειας»*

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΚΟΛΛΙΑ ΒΑΣΙΛΙΚΗ



ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Λεωνίδας (Επιστημονικός Υπεύθυνος)

Δάλλα Χριστίνα (Επικουρη Καθηγήτρια)

Μαρία (Ερευνήτρια Δ')

ΑΘΗΝΑ 2017

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική μελέτη διεξήχθη στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α) στα πλαίσια της ολοκλήρωσης των μεταπτυχιακών σπουδών μου στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Ειδίκευσης «Μοριακής Ιατρικής» της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά το χρονικό διάστημα 2015-2017. Φυσικά η εργασία αυτή δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί χωρίς την βοήθεια και την συμβολή ορισμένων ανθρώπων, τους οποίους και θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά.

Έτσι λοιπόν, πρώτα απ' όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Στεφανή Λεωνίδα, επιστημονικό επιβλέποντα της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε ώστε να με συμπεριλάβει στην ερευνητική του ομάδα. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για την άψογη συνεργασία και την πολύτιμη καθοδήγησή του, με σκοπό την διεκπεραίωση της παρούσας εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την κ. Δάλλα Χριστίνα (Επίκουρη Καθηγήτρια, Ιατρική Σχολή Αθηνών) για την τιμή που μου έκανε να συμμετέχει στην επιστημονική επιτροπή.

Θα ήθελα να πω επίσης ένα ιδιαίτερα μεγάλο ευχαριστώ σε δύο πολύ σημαντικούς για εμένα ανθρώπους. Θα ήθελα να ευχαριστήσω λοιπόν τη Μαρία Ξυλούρη (Ερευνήτρια Δ'), αφενός για την τιμή που μου έκανε να συμμετέχει στην τριμελή μου επιτροπή, αλλά κυρίως για όλη αυτή τη βοήθεια και στήριξη που μου έχει προσφέρει, αυτά τα 2 χρόνια. Ήταν πάντα εκεί για ό,τι και αν χρειαζόμουν είτε σε επίπεδο εργαστηρίου, είτε σε προσωπικό επίπεδο.

Το δεύτερο πρόσωπο δεν θα μπορούσε να είναι άλλο από τη Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια Αλεξία Πολυσίδη, τον άνθρωπο που αποτέλεσε τη βάση αυτής της διπλωματικής εργασίας. Θα ήθελα λοιπόν να την ευχαριστήσω για όλα όσα έκανε για εμένα, για την άριστη καθοδήγηση και για την άψογη εκ μέρους της συνεργασία, της οποίας θέλω να ελπίζω ότι στάθηκα αντάξια. Τη θεωρώ πλέον ένα δικό μου άνθρωπο ήταν ιδιαίτερα μεγάλη μου χαρά που τη γνώρισα και συνεργάστηκα μαζί της.

Δεν θα μπορούσα σε καμία περίπτωση να παραλείψω όλους τους φίλους και συνεργάτες και των δύο εργαστηρίων για το ιδιαίτερα ευχάριστο κλίμα, τις όμορφες στιγμές που περάσαμε καθώς και την αμέριστη βοήθεια όλων την οποία μου παρείχαν όποια στιγμή και αν τη χρειαζόμουν. Ένα ξεχωριστό και μεγάλο ευχαριστώ όμως θα ήθελα να πω στη συμφοιτήτρια και πάνω απ' όλα φίλη Μαρία Κορωναίου για την άψογη σχέση και συνεργασία που είχαμε τόσο σε ερευνητικό επίπεδο για την διεκπεραίωση των διπλωματικών μας εργασιών, όσο και σε προσωπικό επίπεδο μέσα από τη στήριξη και τις συμβουλές που μου προσέφερε.

Επιπροσθέτως, ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή κ. Κωστομητσόπουλο Νικόλαο καθώς και όλους τους εργαζόμενους την Μονάδας Ζωικών Προτύπων – Κέντρου Πειραματικής Χειρουργικής του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών για τη συμβολή τους στην εξοικείωση μου με το χειρισμό πειραματοζώων καθώς και για την πολύτιμη βοήθεια τους όποτε τη χρειάστηκα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τις φίλες και συναδέλφους Μαρία Τσιόκα, Μαρτίνα Καμαράτου και Μαρία Νικάτου..... Ξέρουν εκείνες...!! Και φυσικά την οικογένεια μου καθώς επίσης και τους Βασίλη και Ιωάννα για την αγάπη και τη στήριξη τους όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	8
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1. Νόσος Parkinson.....	10
1.1 Παθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου Parkinson.....	10
1.2 Αιτιολογία της νόσου Parkinson.....	12
2. α-συνουκλεΐνη.....	12
2.1 Ο φυσιολογικός ρόλος της α-συνουκλεΐνης.....	14
2.2 Ο παθολογικός ρόλος της α-συνουκλεΐνης στην εξέλιξη της νόσου.....	14
3. Κλινική εικόνα: Κινητικά vs Μη κινητικά συμπτώματα.....	16
3.1 Κινητικά συμπτώματα.....	16
3.2 Μη κινητικά συμπτώματα.....	17
4. Νευροδιαβίβαση στη νόσο Parkinson.....	18
5. Ζωικά μοντέλα μελέτης της νόσου Parkinson.....	20
5.1 Ζωικά μοντέλα νευροτοξινών.....	20
5.2 Διαγονιδιακά ζωικά μοντέλα.....	21
6. Ζωικά μοντέλα μελέτης μη κινητικών συμπτωμάτων.....	21
6.1 Μοντέλα 6-OHDA.....	22
6.2 MPTP μοντέλα.....	22
6.3 Μοντέλα Ροτενόνης.....	23
6.4 Μοντέλα υπερέκφρασης α-συνουκλεΐνης αγρίου τύπου.....	24
6.5 Μοντέλα υπερέκφρασης μεταλλαγμένων μορφών α-συνουκλεΐνης.....	24
6.6 Μοντέλο υπερέκφρασης α-συνουκλεΐνης BAC.....	25
II. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	27
III. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ.....	28
1. Πειραματικός σχεδιασμός συμπεριφορικής ανάλυσης.....	28
2. Πειραματικός σχεδιασμός νευροχημικής ανάλυσης.....	29
IV. ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ ΚΑΙ ΣΤΕΓΑΣΗ.....	30
V. ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	31
1. Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (open field test).....	31
2. Δοκιμασία υπερυψωμένου λαβυρίνθου (elevated plus maze).....	32
3. Δοκιμασία θαμμένης πελέτας (Buried pellet test).....	33
4. Δοκιμασία προπαλμικής αναστολής (prepulse inhibition).....	34
5. Δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης (forced swim test).....	36

6.	Δοκιμασία προτίμησης σουκρόζης (sucrose preference test).....	37
7.	Δοκιμασία υδάτινου λαβύρινθου κατά Morris (Morris water maze test).....	38
8.	Δοκιμασία δοκού (Challenging beam).....	42
9.	Ανάλυση βαδίσματος (Foot printing)	43
VI.	ΝΕΥΡΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	44
VII.	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	45
VIII.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	47
	Αποτελέσματα συμπεριφορικής ανάλυσης.....	47
1.	Σωματικό βάρος.....	47
2.	Κατανάλωση τροφής.....	48
3.	Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου.....	48
4.	Δοκιμασία υπερυψωμένου λαβυρίνθου.....	56
5.	Δοκιμασία θαμμένης πελέτας.....	59
6.	Δοκιμασία προπαλμικής αναστολής.....	61
7.	Δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης.....	63
8.	Δοκιμασία προτίμησης σουκρόζης.....	64
9.	Δοκιμασία υδάτινου λαβύρινθου κατά Morris.....	65
10.	Δοκιμασία δοκού.....	68
11.	Ανάλυση βαδίσματος.....	68
	Αποτελέσματα νευροχημικής ανάλυσης.....	69
1.	Αμυγδαλή.....	69
2.	Ιππόκαμπος.....	70
3.	Ραβδωτό.....	71
4.	Φλοιός.....	72
IX.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	73
X.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	85

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νόσος Parkinson (Parkinson's disease), αποτελεί μία προοδευτική νευροεκφυλιστική ασθένεια του εγκεφάλου και συγκεκριμένα τη δεύτερη πιο συχνή νευροεκφυλιστική νόσο. Στα βασικά παθολογικά χαρακτηριστικά συγκαταλέγονται η σημαντική απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων στη μέλαινα ουσία και το ραβδωτό σώμα, όπως επίσης και η συσσώρευση ενδοκυτταρικών πρωτεϊνικών εγκλείστων αποτελούμενα κυρίως από α-συνουκλεΐνη και ουβικουτίνη γνωστών ως σωμάτια Lewy (Lewy bodies).

Τα βασικά συμπτώματα της νόσου τα οποία αποτελούν και τα κύρια κλινικά σημεία, είναι η βραδυκίνησία, ο τρόμος (κυρίως σε κατάσταση ηρεμίας), η ακαμψία και η αστάθεια κατά τη στάση και τη βάδιση. Παρ' όλα αυτά όμως, οι συγκεκριμένες κινητικές δυσλειτουργίες συνοδεύονται πολλές φορές και από άλλα μη κινητικά συμπτώματα, όπως είναι οι διαταραχές του ύπνου, προβλήματα στην οσφρητική ικανότητα, νευροψυχιατρικές διαταραχές (κατάθλιψη, αγχώδης διαταραχή) και γενικότερα διάφορες νοητικές διαταραχές (απώλεια προσοχής, ελαττωματική χωροδιάταξη, άνοια).

Η μελέτη των μη κινητικών συμπτωμάτων αποτελεί ένα ιδιαίτερα αναπτυσσόμενο πεδίο και χρήζει ιδιαίτερης προσοχής λόγω της στενής σύνδεσής τους με την ποιότητα ζωής των ασθενών και φυσικά τη διάγνωση της νόσου. Πιο αναλυτικά, γνωσιακά ή νοητικά προβλήματα, διαταραχές του ύπνου καθώς και καταθλιπτικά φαινόμενα φαίνεται να υποβαθμίζουν ιδιαίτερα το «ευ ζην» των ασθενών, μάλιστα πιο πολύ από τα κινητικά συμπτώματα, δημιουργώντας μια ακόμα πιο πολύπλοκη εικόνα γύρω από την εξέλιξη της νόσου. Επιπλέον, έχει γίνει ήδη γνωστό ότι σε πολλές περιπτώσεις τα μη κινητικά συμπτώματα εμφανίζονται πιο νωρίς από τα αντίστοιχα κινητικά. Έτσι λοιπόν γίνεται κατανοητό πως η μελέτη τους θα μπορούσε να συνεισφέρει αποτελεσματικά στην έγκαιρη διάγνωση της νόσου, εφόσον τις περισσότερες φορές η επιβεβαίωση των κινητικών προβλημάτων και κατ' επέκταση η επιβεβαίωση ότι ένας ασθενής πάσχει από τη συγκεκριμένη νόσο, έρχεται όταν η παθογένεια της έχει προχωρήσει αρκετά και ένα μεγάλο μέρος του ντοπαμινεργικού συστήματος έχει ήδη υποστεί σημαντικές απώλειες. Ένας ακόμα λόγος που καθιστά τη μελέτη αυτής της κατηγορίας συμπτωμάτων απόλυτα σημαντική είναι το γεγονός ότι εκτός από το ντοπαμινεργικό, και άλλα συστήματα νευροδιαβίβασης φαίνεται να δυσλειτουργούν στη νόσο Parkinson.

Παρά το γεγονός ότι τα κινητικά συμπτώματα έχουν μελετηθεί εκτενώς με τη βοήθεια των πειραματικών ζωικών μοντέλων, τα μη κινητικά συμπτώματα παρουσιάζουν σημαντικές ελλείψεις τόσο στο κομμάτι της αναγνώρισης, όσο και στο κομμάτι της έρευνας και της θεραπείας τους. Έτσι λοιπόν, σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι η μελέτη των πρώιμων μη κινητικών συμπτωμάτων της νόσου Parkinson σε ένα νέο γενετικά

τροποποιημένο ζωϊκό μοντέλο επίμυ όπου εκφράζεται όλο το γονίδιο της ανθρώπινης α-συνουκλεΐνης, όπως επίσης και η ανάλυση του νευροχημικού προφίλ των συγκεκριμένων πειραματοζώων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, παρατηρήσαμε ότι από συμπεριφορικής άποψης, οι διαγονιδιακοί επίμυες οι οποίοι υπερεκφράζουν την α-συνουκλεΐνη στις περιοχές όπου φυσιολογικά εκφράζεται η πρωτεΐνη αυτή, εμφανίζουν από νεαρή κιόλας ηλικία ένα σύνολο μη κινητικών συμπτωμάτων. Συγκεκριμένα οι διαγονιδιακοί επίμυες εμφανίζουν έναν υπερκινητικό φαινότυπο ο οποίος φαίνεται να συνοδεύεται από μειωμένα αγχώδους συμπεριφοράς. Ο φαινότυπος της ανοσμίας, ένα από τα πρώτα συμπτώματα που παρατηρούνται στους ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο, έγινε φανερός στους συγκεκριμένους επίμυες από τους 3 κιόλας μήνες. Σε μεγαλύτερη ηλικία παρατηρήθηκαν επιπλέον και νευροψυχιατρικά συμπτώματα όπως είναι η καταθλιπτικόμορφη συμπεριφορά και τα γνωσιακά ελλείμματα. Τέλος παρατηρήθηκε και διαταραχή στην αισθητικοκινητική δραστηριότητα. Σε ό, τι αφορά τη νευροχημική ανάλυση, παρατηρήσαμε ότι οι συγκεκριμένοι επίμυες, εμφανίζουν δυσλειτουργία σε συγκεκριμένα συστήματα νευροδιαβίβασης, όπως είναι το γλουταματεργικό και το GABAεργικό, γεγονός που επιβεβαιώνει την εμφάνιση των μη κινητικών συμπτωμάτων, καθώς αυτά τα μη κινητικά συμπτώματα σε μεγάλο βαθμό φαίνεται να αποτελούν την έκφραση της δυσλειτουργίας αυτών των μη ντοπαμινεργικών συστημάτων.

ABSTRACT

Parkinson's disease is a progressive neurodegenerative brain disease and more specifically the second most common one. The main symptoms of the disease which are also the main clinical signs are bradykinesia, resting tremor, stiffness and postural instability. However, these motor impairments are often accompanied by other non-motor symptoms such as sleep disorders, olfactory decline, neuropsychiatric disorders (depression, anxiety) and various cognitive disorders (attention loss, dementia).

The study of these non-motor symptoms is a highly growing field and requires particular attention due to their close association with the quality of life of patients and of course with the diagnosis. More specifically, cognitive decline, sleep disorders and depressive phenotypes, seem to particularly influence the quality of life of patients, to a greater extent than motor features, creating an even more complex picture around the disease. Moreover, it has already been known, that in many cases non-motor symptoms appear earlier than the motor ones. As a result, it is well understood that their study could effectively contribute to the early diagnosis of the disease, since most of the time, the confirmation of motor problems and thus the confirmation that a patient is suffering from this disease, comes when the pathogenesis has progressed quite enough and a large part of the dopaminergic system has already suffered significant losses. Another reason that makes the study of this class of symptoms absolutely important is the fact that apart from the dopaminergic, other neurotransmission systems also seem to malfunction in Parkinson's disease.

Although motor symptoms have been extensively studied through the use of experimental animal models, non-motor symptoms show significant drawbacks in terms of recognition, research and also treatment. Thus, the purpose of this study is the evaluation of the early non-motor symptoms of Parkinson's disease in a new genetically modified animal model (rat model), which over-expresses the whole gene of human wild type α -synuclein, as well as the analysis of the neurochemical profile of these animals.

According to our results and through a behavioral point of view, we observed that these transgenic mice which overexpress α -synuclein in brain areas where the protein is normally expressed, exhibit from an early age of a great number of non-motor symptoms. More specifically, our transgenic animals exhibit a hyperactive phenotype which seems to be accompanied by a decreased anxiety behavior. The phenotype of anosmia, one of the first symptoms observed in patients suffering from the disease, became apparent in these rats even from 3 months of age. In later stages, neuropsychiatric symptoms such as depressive-like behaviors and cognitive deficits were also observed. Lastly, we also observed sensorimotor gating deficits. In regards to the neurochemical analysis, we observed that these rats exhibit dysfunction in specific neurotransmitter systems, such as the glutamatergic and the

GABAergic system, which confirms the presence of these non-motor symptoms, as in general non-motor symptoms seem to represent the expression of the malfunction of these non-dopaminergic systems.

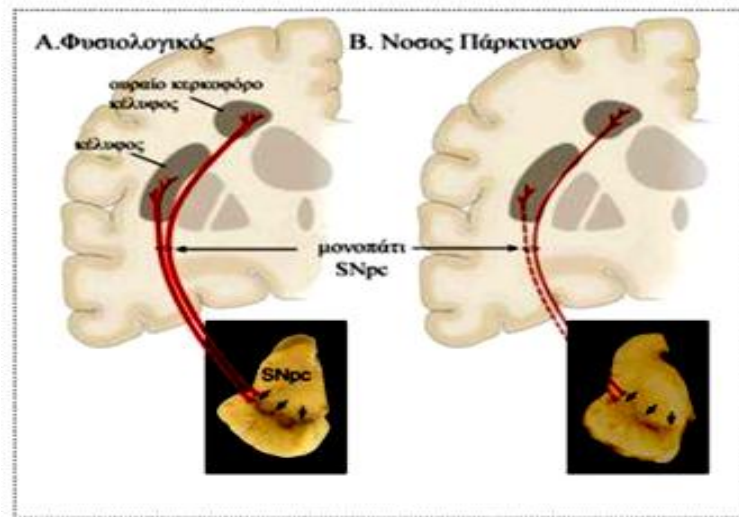
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Νόσος Parkinson

Η νόσος Parkinson (Parkinson's disease), αποτελεί μία χρόνια, προοδευτική νευροεκφυλιστική ασθένεια του εγκεφάλου. Συγκεκριμένα, αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή νευροεκφυλιστική νόσο μετά τη νόσο Alzheimer. Περιγράφηκε για πρώτη φορά ολοκληρωμένα από τον Άγγλο γιατρό James Parkinson στην κλασσική μονογραφία του το 1817, με τίτλο "An essay on Shaking Palsy". Η νόσος Parkinson προσβάλλει το 1-2% του πληθυσμού ηλικίας 65 χρόνων καθώς και το 5%, ηλικίας 85 χρόνων. Εκτιμάται όμως ότι λόγω της αύξησης του μέσου όρου ζωής, η συνολική επιβάρυνση του πληθυσμού με τη νόσο θα αυξηθεί σημαντικά στο άμεσο μέλλον (Cardoso et al., 2005).

1.1. Παθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου Parkinson

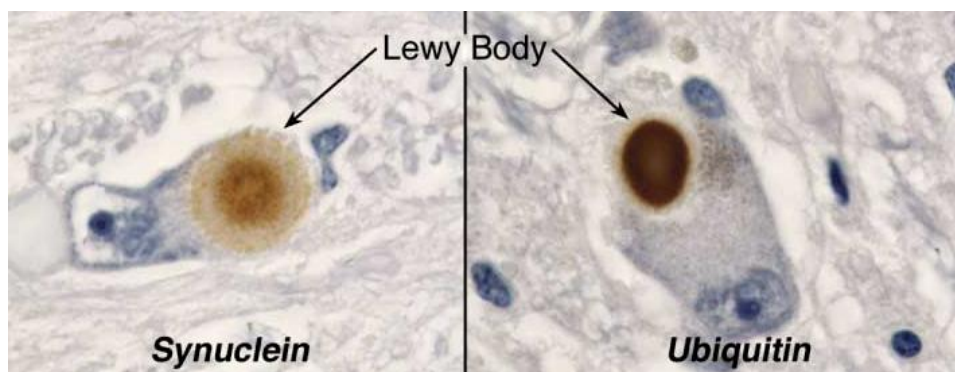
Τα βασικότερα παθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου είναι ο εκτεταμένος θάνατος των ντοπαμινεργικών νευρώνων κυρίως στην περιοχή της συμπαγούς μοίρας της μέλαινας ουσίας (substantia nigra pars-compacta-SNpc) (Forno et al., 1996) καθώς επίσης και η συσσώρευση ενδοκυτταρικών πρωτεϊνικών εγκλείστων αποτελούμενα κυρίως από α-συνουκλεΐνη (ASYN) και ουβικουιτίνη γνωστών ως σωμάτια Lewy (Lewy bodies), τα οποία εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα των εναπομεινάντων νευρώνων (Shults et al., 2006) (Εικόνα. 1). Πιο αναλυτικά, τα κυτταρικά σώματα των ντοπαμινεργικών νευρώνων βρίσκονται στη μέλαινα ουσία, ενώ οι άξονες τους καταλήγουν στο ραβδωτό σώμα (striatum) και συγκεκριμένα στις περιοχές του κελύφους (putamen) και του κερκοφόρου πυρήνα (caudate nucleus). Έτσι λοιπόν το βασικό μονοπάτι στο οποίο παρατηρούνται τα παθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου είναι το μονοπάτι της μελαινοραβδωτής οδού (nigrostriatal pathway) (Εικόνα 1). Η απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων οδηγεί εξελικτικά σε δραματική μείωση των επιπέδων της ντοπαμίνης στο ραβδωτό.



Εικόνα 1: Παθολογία της νόσου Parkinson.

(Α) Σχηματική απεικόνιση της φυσιολογικής μελαιοραβδωτής οδού (κόκκινοι άξονες). Αποτελείται από τα σώματα των νευρώνων που βρίσκονται στην SNpc (μαύρα βέλη), οι οποίοι προβάλλουν (κόκκινες γραμμές) στα βασικά γάγγλια και δημιουργούν συνάψεις στο ραβδωτό σώμα. (Στην εικόνα φαίνεται το φυσιολογικό σκούρο χρώμα της SNpc εξαιτίας της νευρομελανίνης). (Β) Σχηματική απεικόνιση της μελαιοραβδωτής οδού στη νόσο Parkinson. Παρατηρείται απώλεια ντοπαμινεργικών νευρώνων και έτσι απώλεια χρώματος της SNpc (μαύρα βέλη). Επιπλέον παρατηρείται απώλεια των νευρικών απολήξεων στο κέλυφος (διακεκομμένη κόκκινη γραμμή) (προσαρμογή από Dauer and Przedborski et al., 2003).

Σε ότι αφορά τα σωμάτια Lewy (Εικόνα 2), όπως αναφέρθηκε, πρόκειται για πρωτεϊνικά έγκλειστα διαμέτρου 5-25 μm με πυκνό ηωσινόφιλο πυρήνα και ένα αχνό «φωτοστέφανο» ακτινωτών ινιδίων (Shults et al., 2006). Βρίσκονται στους εναπομείναντες νευρώνες της μέλαινας ουσίας και πιο ειδικά στο κυτταρόπλασμα των νευρώνων αυτών, συχνά κοντά στον πυρήνα, ενώ σε δυστροφικούς νευρώνες εμφανίζονται στους άξονες και τους δενδρίτες. Στο εσωτερικό των σωματίων αυτών εμφανίζονται συσσωματώματα πρωτεϊνών, όπως είναι η α -συνουκλεΐνη, η ουβικουτίνη, πρωτεΐνες 14-3-3, η τουμπουλίνη καθώς και άλλες πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού. Ωστόσο, κύρια πρωτεΐνη των σωματίων Lewy είναι η α -συνουκλεΐνη.



Εικόνα 2: Ανοσοϊστοχημεία συσσωμαμάτων Lewy σε ντοπαμινεργικό νευρώνα της SNpc. Χρήση αντισώματος έναντι της α -συνουκλεΐνης αποκαλύπτει έναν έντονα χρωματισμένο πυρήνα και ένα αχνό φωτοστέφανο (αριστερά). Χρήση αντισώματος έναντι της ουβικουτίνης (δεξιά) (προσαρμογή από Dauer and Przedborski et al., 2003).

1.2. Αιτιολογία της νόσου Parkinson

Παρά το γεγονός ότι τα παθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου έχουν μελετηθεί σε εκτεταμένο βαθμό, τα ακριβή αίτια της δεν έχουν πλήρως ξεκαθαριστεί. Δύο είναι οι βασικές προσεγγίσεις, η περιβαλλοντική και η γενετική. Στην περιβαλλοντική προσέγγιση (σποραδική μορφή), η οποία αποτελεί και την πλειονότητα των περιπτώσεων της νόσου (90-95%), συγκαταλέγονται διάφοροι δημογραφικοί παράγοντες όπως το φύλο και η εθνικότητα, τα οποία θεωρούνται ότι επηρεάζουν τον κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου (Tanner and Goldman et al., 1997). Επιπλέον, όπως προκύπτει από επιδημιολογικές μελέτες η έκθεση σε φυτοφάρμακα, η διαμονή στην ύπαιθρο, η γεωργική απασχόληση, η κατανάλωση νερού από πηγάδι έχουν συσχετιστεί με τον κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου. (Semchuk et al., 1991;1992;1993).

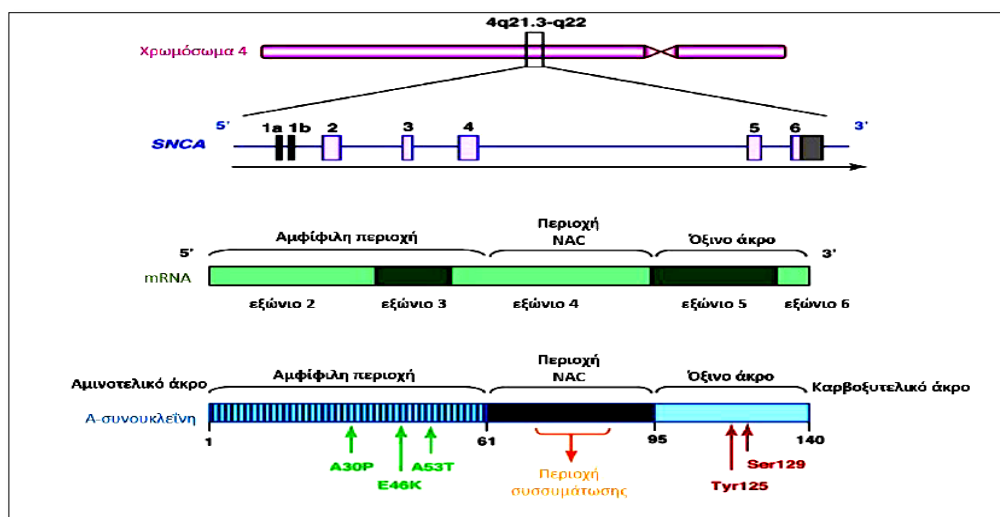
Σε ότι αφορά το γενετικό υπόβαθρο (οικογενής μορφή), παρά το γεγονός ότι ένα μικρό σχετικά ποσοστό των ασθενών έχουν οικογενειακό ιστορικό (~5-10%), είναι σήμερα γενικότερα αποδεκτό ότι οι γενετικές παραλλαγές παίζουν μεγάλο ρόλο στην ανάπτυξη της νόσου. Εκτεταμένες πληθυσμιακές μελέτες κατά τις οποίες έγινε ανάλυση συγκεκριμένων οικογενειών με πολλαπλούς πάσχοντες από τη νόσο, έχει σταθεί δυνατόν όχι μόνον να ανακαλυφθούν οι περιοχές του γενετικού κώδικα όπου εμπεριέχεται το κληρονομήσιμο χαρακτηριστικό που οδηγεί στη νόσο στις συγκεκριμένες οικογένειες, αλλά και να ταυτοποιηθούν συγκεκριμένες μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα γονίδια. Μέχρι σήμερα, μεταλλάξεις σε 5 γονίδια έχουν συσχετιστεί απόλυτα με τη νόσο Parkinson, ενώ υπάρχουν και αρκετά ακόμη γονίδια για τα οποία υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις. Πιο αναλυτικά, το πρώτο γονίδιο το συσχετίστηκε με τη νόσο ήταν αυτό της α -συνουκλεΐνης (ASYN) (Polymeropoulos et al., 1996) ενώ τα άλλα τέσσερα γονίδια που ακολούθησαν είναι τα γονίδια Parkin (Kitada et al., 1998), DJ-1 (Bonifati et al., 2003), PINK-1 (Valente et al., 2004) και LRRK2 (Zimprich et al., 2004).

2. α -συνουκλεΐνη

Η α -συνουκλεΐνη ανήκει στην οικογένεια των συνουκλεϊνών μαζί με τη β - και γ -συνουκλεΐνη, πρωτεΐνες οι οποίες παρουσιάζονται αρκετά συντηρημένες κατά την εξέλιξη. Εμφανίζουν κοινό αμινοτελικό άκρο έχοντας διαφορετικό αριθμό επαναλαμβανόμενων περιοχών, ενώ διαφέρουν στο καρβοξυτελικό άκρο (Tofaris and Spillantini et al., 2005). Η α -συνουκλεΐνη στον άνθρωπο αποτελείται από 140 αμινοξικά κατάλοιπα και εκφράζεται σε μεγάλα ποσοστά στον εγκέφαλο. Το γονίδιό της, SNCA, βρίσκεται στο χρωμόσωμα 4 και συγκεκριμένα στην περιοχή 4q21.3-q22 (Spillantini et al., 1996) ενώ η πρωτεΐνη

χαρακτηρίζεται από τρεις διακριτές περιοχές, το αμινοτελικό άκρο, την κεντρική περιοχή και το καρβοξυτελικό άκρο. (Εικόνα 3).

Το αμινοτελικό άκρο, το οποίο περιέχει 60 αμινοξικά κατάλοιπα, θεωρείται ότι δημιουργεί αμφίφιλες έλικες παρουσία συνθετικών λιπιδίων (Clayton and George et al., 1999; George et al., 2002) και περιέχει τέσσερις επαναλήψεις KTKEGV, οι οποίες φαίνεται να συμβάλλουν στη δημιουργία α-έλικας στο αμινοτελικό άκρο κι ότι είναι απαραίτητες για την πρόσδεση της πρωτεΐνης σε λιπίδια. Επιπλέον, έχει προταθεί ότι η α-συνουκλεΐνη διαθέτει ένα σύνολο βασικών αμινοξικών καταλοίπων στην πολική-απολική επιφάνεια, που περιέχει μεγάλο ποσοστό καταλοίπων λυσίνης έναντι αργινίνης, καθώς και γλουταμικού στην πολική περιοχή (Perrin et al., 2000). Επίσης, το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης φαίνεται να ευθύνεται για την ασθενή σύνδεσή της με λιπιδικά κυστίδια, η παρουσία των οποίων ενδέχεται να επάγει τη δομή της α-έλικας. Τα κατάλοιπα 61-95 σχηματίζουν το υδροφοβικό και κεντρικό τμήμα της πρωτεΐνης, το οποίο είναι γνωστό ως μη αμυλοειδές συστατικό (Non-Amyloid Component, NAC) των πλακών της νόσου Alzheimer (Vekrellis et al., 2004) και περιλαμβάνει δύο ακόμη KTKEGV επαναλήψεις. Στο κεντρικό αυτό τμήμα οφείλεται και η ικανότητα του μορίου να μεταβαίνει από μια διαμόρφωση τυχαίας περιέλιξης σε β-πτυχωτή επιφάνεια και να δημιουργεί πρωτοϊνίδια και ινίδια που ομοιάζουν με αυτά του αμυλοειδούς (Giasson et al., 2001; el-Agnaf and Irvine et al., 2002). Τέλος, το καρβοξυτελικό άκρο αποτελείται από τα αμινοξικά κατάλοιπα 91-140 και είναι πλούσιο σε προλίνη, γλουταμικό και ασπαρτικό οξύ.



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση του γονιδίου, του mRNA και του μορίου της α-συνουκλεΐνης. Το γονίδιο βρίσκεται στην περιοχή 4q21.3-q22 του χρωμοσώματος 4 ενώ το mRNA διακρίνεται σε τρεις περιοχές (αμφίφιλη περιοχή, περιοχή NAC και όξινο άκρο). Στο πρωτεϊνικό μόριο, το αμινοτελικό άκρο περιλαμβάνει την αμφίφιλη περιοχή, στην οποία εντοπίζονται οι μεταλλάξεις A30P, E46K και A53T, το κεντρικό τμήμα που είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό των συσσωματωμάτων και την όξινη περιοχή, όπου φαίνονται και οι δύο θέσεις φωσφορυλίωσης. (προσαρμογή από Venda et al., 2010).

2.1. Ο φυσιολογικός ρόλος της α-συνουκλεΐνης

Στο ώριμο κεντρικό νευρικό σύστημα η α-συνουκλεΐνη εντοπίζεται κυρίως στις νευρωνικές απολήξεις περιοχών του εγκεφάλου, όπως ο φλοιός, ο ιππόκαμπος, το ραβδωτό σώμα καθώς και ο οσφρητικός λοβός. Ωστόσο, σε χαμηλά ποσοστά εμφανίζεται και στα αιμοπετάλια, σε αιμοποιητικά κύτταρα, σε σκελετικούς μύες, στον καρδιακό ιστό και στα ολιγοδενδροκύτταρα. Ανασυνδυασμένη α-συνουκλεΐνη σε υδατικό διάλυμα δεν σχηματίζει δευτεροταγή δομή και γι' αυτό η πρωτεΐνη θεωρείται ότι βρίσκεται φυσικά σε αναδιαταγμένη μορφή (Weinreb et al., 1996). Είναι γνωστό ότι κατά την ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος η έκφραση της α-συνουκλεΐνης έπεται της δημιουργίας των συνάψεων κι έτσι η συμβολή της στο σχηματισμό των συνάψεων δε φαίνεται να είναι τόσο σημαντική.

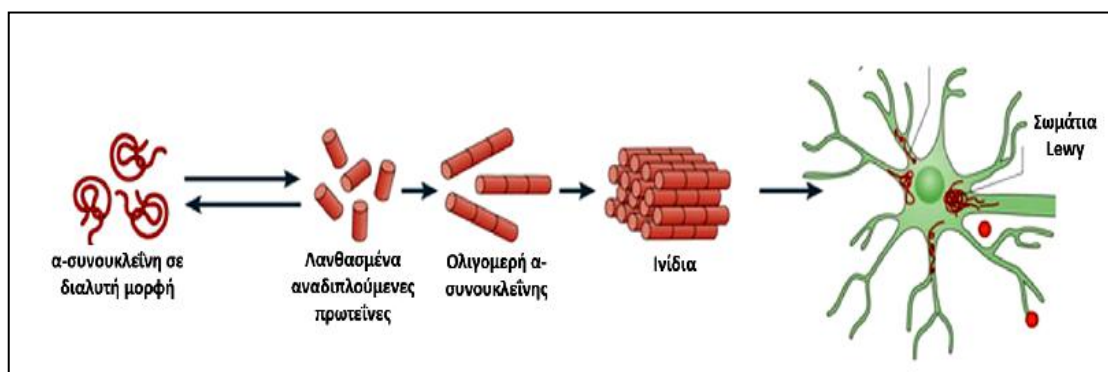
Ωστόσο, η αμινοξική αλληλουχία και η τοπολογία του μορίου σε στενή συσχέτιση με τα συναπτικά κυστίδια υποδηλώνουν ότι ενδέχεται να αλληλεπιδρά με τις λιπιδικές μεμβράνες και τη διακίνηση των συναπτικών κυστιδίων. Ο ρόλος της α-συνουκλεΐνης σε διαδικασίες που σχετίζονται με τις μεμβράνες στο προσυναπτικό άκρο, υποστηρίζεται από διάφορες μελέτες, όπως αυτή όπου μύες στους οποίους είχε εξαλειφθεί γενετικά η α-συνουκλεΐνη (knockout) είχαν αυξημένη απελευθέρωση ντοπαμίνης στις συνάψεις μέλαινας ουσίας-ραβδωτού σαν απόκριση σε ηλεκτρικά ερεθίσματα, υποδεικνύοντας τον ρόλο της α-συνουκλεΐνης σαν αρνητικό ρυθμιστή της νευροδιαβίβασης της ντοπαμίνης (Abeliovich et al., 2000). Επιπλέον, σε ανθρώπινα προγονικά νευρικά κύτταρα η α-συνουκλεΐνη φαίνεται να παίζει ρόλο στη διαφοροποίηση (Schneider et al., 2007). Συμπερασματικά λοιπόν, παρότι υπάρχουν ενδείξεις για πιθανούς φυσιολογικούς ρόλους της α-συνουκλεΐνης στο κύτταρο, ο φυσιολογικός ρόλος του μορίου δεν έχει αποσαφηνιστεί μέχρι σήμερα.

2.2. Ο παθολογικός ρόλος της α-συνουκλεΐνης στην εξέλιξη της νόσου

Η συσχέτιση της α-συνουκλεΐνης με το νευροεκφυλισμό προέκυψε από δυο ουσιώδεις παρατηρήσεις: α) την ταυτοποίηση σημειακών μεταλλαγών καθώς και το διπλασιασμό και τριπλασιασμό του γονιδίου σε ένα μικρό αριθμό οικογενειών με αυτοσωμική επικρατή κληρονομικότητα για τη νόσο του Parkinson πρώιμης έναρξης και β) την ανακάλυψη ότι η α-συνουκλεΐνη είναι το κύριο συστατικό των σωματίων Lewy, που ανευρίσκονται τόσο στην οικογενή όσο και στη σποραδική μορφή της ασθένειας. Η πρώτη σημειακή μετάλλαξη αντικατάστασης Ala53Thr (A53T) ανακαλύφθηκε σε μία ιταλική και δύο ελληνικές οικογένειες, ενώ δύο ακόμη σημειακές μεταλλάξεις, οι Ala30Pro (A30P) και E46K, περιγράφηκαν σε μία γερμανική και μια ισπανική οικογένεια αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, ανακαλύφθηκε σε μια γαλλική οικογένεια και μια νέα σημειακή μετάλλαξη, η

G51D, ενώ πρόσφατα, ταυτοποιήθηκε και καταγράφηκε μια σημειακή μετάλλαξη στο εξώνιο 4 του γονιδίου της α -συνουκλεΐνης που κωδικοποιεί για την αντικατάσταση H50Q (Proukakis et al., 2013). Επιπλέον, εμφάνιση παθολογίας λόγω αυξημένης συγκέντρωσης πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα, έχουμε και στις περιπτώσεις διπλασιασμού ή τριπλασιασμού του φυσιολογικού γονιδίου της α -συνουκλεΐνης.

Οι δομικές ιδιότητες της α -συνουκλεΐνης και η φυσική της τάση για συσσωμάτωση, είναι πιθανόν να εμπλέκονται στην παθολογική μετατροπή της πρωτεΐνης από την μονομερή μορφή σε αυτή των олиγομερών και στη συνέχεια σε αυτών των αδιάλυτων νηματοειδών μορφών που ανευρίσκονται στα σωμάτια Lewy. Τι είναι αυτό που μετατρέπει μια τόσο διαλυτή μορφή της πρωτεΐνης σε τόσο αδιάλυτη, αποτελεί το βασικό ερώτημα πολλών μελετών. Η διαδικασία σχηματισμού των ινιδίων ακολουθεί ένα μηχανισμό πυρήνωσης και φαίνεται να έχει μια αρχική αργή φάση κατά την οποία τα μονομερή της α -συνουκλεΐνης μετατρέπονται σε олиγομερή ενδιάμεσα πρωτοϊνίδια και με την πάροδο του χρόνου αυτά μετατρέπονται γρήγορα σε ώριμα πολυμερή ινίδια (Li et al., 2001) (Εικόνα 4). Το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο, αφού τα αρνητικά φορτισμένα αμινοξικά κατάλοιπα αλληλεπιδρούν κατά το σχηματισμό των ινιδίων.



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού πυρήνωσης της α -συνουκλεΐνης. Κατά την αρχική αργή φάση δεν πραγματοποιείται σωστή αναδίπλωση της α -συνουκλεΐνης με αποτέλεσμα το σχηματισμό ολιγομερών, τα οποία στη συνέχεια σε μια γρήγορη φάση μετατρέπονται σε ώριμα πολυμερή ινίδια (προσαρμογή από Irwin et al., 2013).

Η in vivo υπερέκφραση είτε της φυσικού τύπου είτε των μεταλλαγμένων μορφών της α -συνουκλεΐνης σε ζωικά μοντέλα, προκαλεί κλινικά και νευροπαθολογικά συμπτώματα που προσομοιάζουν εκείνα της νόσου Parkinson. Η χρήση τέτοιων προσεγγίσεων στοχεύει στην κατανόηση του μηχανισμού μέσω του οποίου δρα η α -συνουκλεΐνη προάγοντας την παθογένεια της νόσου.

3. Κλινική εικόνα: Κινητικά vs Μη κινητικά συμπτώματα

3.1. Κινητικά συμπτώματα

Τα βασικά συμπτώματα της νόσου Parkinson, τα οποία αποτελούν και τα κύρια κλινικά χαρακτηριστικά στα οποία μέχρι στιγμής βασίζεται και η διάγνωση, είναι η βραδυκινησία, ο τρόμος (κυρίως σε κατάσταση ηρεμίας), η ακαμψία και η αστάθεια κατά τη στάση και τη βάδιση. Χαρακτηριστική είναι επίσης και η κυρτή στάση του κορμού, το ανέκφραστο πρόσωπο και η τάση των ασθενών να πραγματοποιούν μικρά βήματα (Εικόνα 5) (Jankovic et al., 2008).



Εικόνα 5: Χαρακτηριστική στάση ασθενούς με τη νόσο Parkinson καθώς και ορισμένα από τα κλινικά συμπτώματα της ασθένειας.

3.2. Μη κινητικά συμπτώματα

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η νόσος Parkinson παραδοσιακά θεωρείται ως μία καθαρά κινητική διαταραχή. Παρ' όλα αυτά όμως, πολύ πριν την πλήρη ανάπτυξη αυτών των κινητικών συμπτωμάτων ή ακόμα και πριν την εμφάνιση τους, οι ασθενείς έρχονται αντιμέτωποι με μία άλλη κατηγορία συμπτωμάτων, τα μη κινητικά συμπτώματα (non motor symptoms, NMS), τα οποία φαίνεται να επηρεάζουν σε εξίσου μεγάλο βαθμό τη ζωή των ασθενών, αν όχι και σε μεγαλύτερο. Συγκεκριμένα, μελέτες έχουν δείξει ότι σχεδόν το 100% των ασθενών που πάσχουν από τη νόσο εμφανίζουν τουλάχιστον ένα μη κινητικό σύμπτωμα (Kim et al., 2013). Τα συμπτώματα αυτά μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις βασικές κατηγορίες, 1) τα νευροψυχιατρικά συμπτώματα, 2) τις διαταραχές του ύπνου, 3) τις διαταραχές του αυτόνομου νευρικού συστήματος και 4) τις διαταραχές της όσφρησης και άλλων αισθητήριων οργάνων (Hou and Lai et al., 2007) (Πίνακας 1).

Νευροψυχιατρικά συμπτώματα	Διαταραχές του ύπνου	Διαταραχές αυτόνομου νευρικού συστήματος	Συμπτώματα αισθητήριων οργάνων
Κατάθλιψη, απάθεια, αγχώδης συμπεριφορά	Rapid eye movement (REM) διαταραχή	Καρδιαγγειακό σύστημα: ορθοστατική υπόταση, βραδυκαρδία, αρρυθμία	Οσφρητική απώλεια
Ψυχαναγκαστική-εμμονική συμπεριφορά	Αϋπνία	Γαστρεντερικό σύστημα: σιελόρροια, δυσφαγία, πνιγμός, εμετός ναυτία, δυσκοιλιότητα, ακράτεια κοπράνων	Πόνος
Ελλειμματική προσοχή	Υπνηλία κατά τη διάρκεια της ημέρας	Ουροποιητικό σύστημα: ακράτεια ούρων, νυκτουρία	Κόπωση
Ψευδαισθήσεις, παραισθήσεις	Περιοδικές κινήσεις άκρων	Αναπαραγωγικό σύστημα: σεξουαλική δυσλειτουργία, στυτική ανικανότητα, υπερ-σεξουαλικότητα	Αλλαγές στο βάρος
Κρίσεις άγχους Κρίσεις πανικού	Εφιάλτες, όνειρα	Θερμορύθμιση: εφίδρωση, ξηροστομία, δυσανεξία στο ζεστό ή κρύο	Παραισθησία
Άνοια	Άπνοια ύπνου		

Πίνακας 1: Το δίκτυο των μη κινητικών συμπτωμάτων της νόσου Parkinson.
(προσαρμογή από Hou and Lai et al., 2007)

Πιο αναλυτικά, μελέτες έχουν δείξει ότι νευροψυχιατρικά συμπτώματα όπως η κατάθλιψη ή η αγχώδης συμπεριφορά εμφανίζονται σε ποσοστά 22% και 25-40% αντίστοιχα. Οι διαταραχές του ύπνου καθώς και η οσφρητική απώλεια αγγίζουν το 90-95%. Ιδιαίτερα συχνές όμως φαίνεται να είναι και οι διαταραχές του αυτόνομου νευρικού συστήματος. Συγκεκριμένα, ασθενείς με Parkinson εμφανίζουν διαταραχές του καρδιαγγειακού συστήματος σε ποσοστό περίπου 60%, ενώ τα προβλήματα του γαστρεντερικού και ουροποιητικού συστήματος κυμαίνονται μεταξύ 25-50% (Pfeiffer et al., 2016).

Η μελέτη των μη κινητικών συμπτωμάτων αποτελεί ένα ιδιαίτερα αναπτυσσόμενο πεδίο και χρήζει ιδιαίτερης προσοχής λόγω της στενής σύνδεσης τους με την ποιότητα ζωής των ασθενών και φυσικά τη διάγνωση της νόσου. Πιο αναλυτικά, γνωσιακά ή νοητικά προβλήματα, διαταραχές του ύπνου καθώς και καταθλιπτικά φαινόμενα φαίνεται να υποβαθμίζουν ιδιαίτερα το «ευ ζην» των ασθενών δημιουργώντας μια ακόμα πιο πολύπλοκη εικόνα γύρω από την εξέλιξη της νόσου. Η έγκαιρη αναγνώριση τους μπορεί να είναι υψίστης σημασίας καθώς τις περισσότερες φορές η διάγνωση της νόσου γίνεται όταν ο ασθενής βρίσκεται πλέον σε προχωρημένο στάδιο νευροεκφύλισης, όταν δηλαδή ένα μεγάλο μέρος του ντοπαμινεργικού και όχι μόνο συστήματος έχει υποστεί σημαντικές απώλειες και φυσικά όταν τα κινητικά συμπτώματα έχουν ήδη κάνει την εμφάνισή τους. Έτσι λοιπόν γίνεται κατανοητό ότι τα μη κινητικά συμπτώματα μπορούν να λειτουργήσουν ως ένα έγκαιρο και έγκυρο διαγνωστικό εργαλείο. Ένας ακόμα λόγος που καθιστά τη μελέτη αυτής της κατηγορίας συμπτωμάτων απόλυτα σημαντική είναι το γεγονός ότι εκτός από το ντοπαμινεργικό, και άλλα συστήματα νευροδιαβίβασης φαίνεται να δυσλειτουργούν στη νόσο Parkinson, όπως θα αναλυθεί σε επόμενη ενότητα. Τα μη κινητικά συμπτώματα σε μεγάλο βαθμό αποτελούν την έκφραση της δυσλειτουργίας αυτών των μη ντοπαμινεργικών συστημάτων.

4. Νευροδιαβίβαση στη νόσο Parkinson

Είναι πλέον ευρέως αποδεκτό ότι οι κινητικές δυσλειτουργίες που παρατηρούνται στη νόσο Parkinson μπορούν να αποδοθούν κυρίως στον εκφυλισμό του ντοπαμινεργικού συστήματος της μελαινораβδωτής οδού και την επακόλουθη αλλαγή στο αντίστοιχο σύστημα νευροδιαβίβασης. Παρ' όλα αυτά όμως, είναι πλέον απόλυτα ξεκάθαρο ότι η συμπτωματολογία της νόσου εκτείνεται πέραν των κινητικών δυσλειτουργιών. Η έντονη και συχνή παρουσία των μη κινητικών συμπτωμάτων στους ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο, φανερώνει ότι η νευροπαθολογία της νόσου Parkinson περιλαμβάνει διαταραχές και σε μη ντοπαμινεργικά συστήματα νευροδιαβίβασης, διαταραχές οι οποίες είναι εξίσου σημαντικό να μελετηθούν καθώς η χορήγηση της λεβοντόπα (πρόδρομο μόριο της ντοπαμίνης) σε

ασθενείς φαίνεται να βελτιώνει μόνο τα κινητικά προβλήματα, αφήνοντας ανέπαφα τα μη κινητικά συμπτώματα (Barone et al., 2010).

Τέτοια συστήματα νευροδιαβίβασης είναι για παράδειγμα το χολινεργικό, το σεροτονεργικό, το νοραδρενεργικό, το γλουταματεργικό καθώς επίσης και το σύστημα νευροδιαβίβασης του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA) (Barone et al., 2010). Όλα τα συστήματα αυτά μαζί, ντοπαμινεργικά και μη φαίνεται να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με αποτέλεσμα να δημιουργείται μια ακόμα πιο πολύπλοκη εικόνα γύρω από την εξέλιξη της νόσου (Πίνακας 2). Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται αυτές οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφορετικών αυτών συστημάτων και η συσχέτιση τους με την εμφάνιση και εξέλιξη των μη κινητικών συμπτωμάτων.

Μη κινητικό σύμπτωμα	Ντοπαμινεργικό σύστημα	Χολινεργικό σύστημα	Σεροτονεργικό σύστημα	Γλουταματεργικό σύστημα	GABAεργικό σύστημα
Άγχος	✓	✓	✓	✓	✓
Άνοια	✓	✓	✓	✓	
Κατάθλιψη	✓		✓	✓	✓
Οσφρητική απώλεια	✓				
Διαταραχές ύπνου	✓	✓		✓	✓
Πόνος	✓			✓	✓
Ελλειμματική Προσοχή	✓	✓			
Διαταραχές αυτόνομου νευρικού	✓	✓	✓		

Πίνακας 2: Συστήματα νευροδιαβίβασης που σχετίζονται με τα μη κινητικά συμπτώματα της νόσου Parkinson (προσαρμογή από Barone et al., 2010)

Ανάλογες είναι και οι πληροφορίες που προκύπτουν από τις διάφορες μελέτες πειραματικών μοντέλων. Πιο αναλυτικά, σε διάφορα μοντέλα υπερέκφρασης α-συνουκλείνης έχουν βρεθεί ότι εκτός από τη λειτουργία του ντοπαμινεργικού συστήματος επηρεάζεται και αυτή του νοραδρενεργικού, σεροτονεργικού και γλουταμικού (Gureviciene et al., 2007; Sotiriou et al., 2010; Deusser et al., 2015).

5. Ζωικά μοντέλα μελέτης της νόσου Parkinson

Παρά το γεγονός ότι έχουν περάσει περίπου δύο αιώνες από την αρχική περιγραφή του James Parkinson, τα ακριβή αίτια της νόσου όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, παραμένουν άγνωστα. Για το λόγο αυτό, ήταν απαραίτητη η χρήση ενός βασικού εργαλείου το οποίο θα μπορούσε να δώσει απαντήσεις σε καίρια ερωτήματα. Τα τελευταία 40 περίπου χρόνια, το εργαλείο αυτό είναι τα ζωικά μοντέλα, τα οποία έχουν βελτιώσει σε μεγάλο βαθμό την κατανόηση της παθογένειας και της παθοφυσιολογίας της νόσου, ενώ παράλληλα έχουν χρησιμοποιηθεί και στα πλαίσια της θεραπευτικής παρέμβασης.

Τα μοντέλα αυτά μπορούν να διαχωριστούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες, 1) τα ζωικά μοντέλα που έχουν βασιστεί στη χρήση νευροτοξινών και έχουν την ικανότητα να αναπαράγουν τα περισσότερα παθολογικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά και 2) τα διαγονιδιακά ζωικά μοντέλα, τα οποία έχουν εμπλουτίσει σε μεγάλο βαθμό το ερευνητικό πεδίο μέσω της δυνατότητας τους να αναπαράγουν τις περισσότερες μεταλλάξεις που έχουν ταυτοποιηθεί για τις μονογονιδιακές μορφές της νόσου (Blandini et al., 2012). Το σημαντικό είναι πως και οι δύο κατηγορίες ζωικών μοντέλων έχουν τις δικές τους ιδιαιτερότητες αλλά και περιορισμούς, γεγονός που θα πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη κατά την επιλογή του μοντέλου που θα χρησιμοποιηθεί.

5.1. Ζωικά μοντέλα νευροτοξινών

Τα τοξικά μοντέλα αποτελούν τα κλασσικά και πιο παλιά πειραματικά μοντέλα τα οποία έχουν ως στόχο να προσομοιάσουν και να αναπαράγουν τις βασικές παθολογικές και συμπεριφορικές αλλαγές που συμβαίνουν στην περίπτωση των ανθρώπων, σε τρωκτικά ή πρωτεύοντα. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της χρήσης φαρμακολογικών παραγόντων (νευροτοξίνες), οι οποίες επάγουν επιλεκτική εκφύλιση των νευρώνων της μελαινοραβδωτής οδού. Οι τοξίνες αυτές ανάλογα με τη φύση τους αλλά και με το ζώο στο οποίο θα χρησιμοποιηθούν, μπορούν να χορηγηθούν είτε συστηματικά ή τοπικά (Blandini et al., 2012). Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα χημικά είναι: 1) MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) (Przedborski et al., 2001), 2) 6-OHDA (6-hydroxydopamine) (Lane et al., 2006), 3) rotenone (Gao et al., 2003), και 4) paraquat (Thiruchelvam et al., 2000).

5.2. Διαγονιδιακά ζωικά μοντέλα

Παρά το γεγονός ότι τα τοξικά μοντέλα αποτελούν ένα σημαντικό εργαλείο το οποίο έχει προσφέρει σημαντικές πληροφορίες, σχετικά με την παθογένεια της νόσου, παρουσιάζει εξίσου σημαντικά μειονεκτήματα όπως για παράδειγμα το γεγονός της αδυναμίας παρατήρησης βασικών χαρακτηριστικών όπως είναι τα σωματίδια Lewy. Τέτοιους περιορισμούς καλούνται να ξεπεράσουν τα γενετικά ζωικά μοντέλα, τα οποία προσφέρουν τη δυνατότητα αναπαραγωγής βασικών μεταλλάξεων που έχουν συσχετιστεί με τη νόσο. Τα σημαντικότερα και πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα διαγονιδιακά ζωικά μοντέλα είναι τα μοντέλα: 1) α-συνουκλεΐνης (Chesselet et al., 2008), (Lam et al., 2011) 2) Leucine-rich repeat serine/threonine kinase 2 (LRRK2) (Li et al., 2010), 3) PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1) (Gautier et al., 2008; Gispert et al., 2009), 4) Parkin (Lu et al., 2009), 5) DJ-1 (Paterna et al., 2007; Zhou et al., 2011).

6. Ζωικά μοντέλα μελέτης μη κινητικών συμπτωμάτων

Είναι πλέον ευρέως γνωστό, ότι τα περισσότερα ζωικά μοντέλα, είτε αυτά ανήκουν στην κατηγορία των νευροτοξινών, είτε στα διαγονιδιακά, εστιάζουν κατά κύριο λόγο στη μελέτη των βασικών κινητικών συμπτωμάτων, ή στην αποτελεσματικότητα των κλασσικών αντι-παρικινσονικών φαρμάκων, αφήνοντας στην άκρη τη μελέτη των μη κινητικών συμπτωμάτων. Στην πραγματικότητα, τα μη κινητικά συμπτώματα παρουσιάζουν σημαντικές ελλείψεις τόσο στο κομμάτι της αναγνώρισης, όσο και στο κομμάτι της έρευνας και της θεραπείας τους. Λίγα είναι τα ζωικά μοντέλα τα οποία έχουν ασχοληθεί με τη μελέτη των μη κινητικών συμπτωμάτων και ακόμη λιγότερα εκείνα τα οποία κατάφεραν με επιτυχία να «αποτυπώσουν», κάποια από τα συμπτώματα αυτά.

Ο λόγος του περιορισμένου αυτού ερευνητικού πεδίου, βασίζεται σε κάποιες σημαντικές παραμέτρους. Αρχικά, πολλά από αυτά τα συμπτώματα δεν εξαρτώνται απόλυτα από τα επίπεδα της ντοπαμίνης, με αποτέλεσμα για παράδειγμα, να είναι δύσκολη ή και αδύνατη κάποιες φορές η ταυτόχρονη αποτύπωση τόσο της παθολογίας της μελαινοραβδωτής οδού όσο και του μαιχμιακού συστήματος το οποίο συνδέεται άμεσα με την εμφάνιση των μη κινητικών συμπτωμάτων. Επιπλέον, η αιτιοπαθογένεια των μη κινητικών συμπτωμάτων δεν είναι πλήρως κατανοητή, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολο να ερμηνευτεί με ακρίβεια στα ήδη υπάρχοντα μοντέλα, ο ρόλος του εκάστοτε διαφοροποιημένου συστήματος νευροδιαβίβασης. Παρακάτω, γίνεται αναφορά στα βασικά πειραματικά ζωικά μοντέλα και στην προσπάθεια τους να αποτυπώσουν κάποια τουλάχιστον από την πλειάδα των μη κινητικών συμπτωμάτων.

6.1. Μοντέλα 6-OHDA

Παρά το γεγονός ότι τα 6-OHDA μοντέλα αποτελούν ένα εξαιρετικό εργαλείο για τη μελέτη των κινητικών συμπτωμάτων, περιορισμένη είναι η συνεισφορά τους σε ότι αφορά τα μη κινητικά συμπτώματα καθώς οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί περιορίζονται σε μερικά μόνο από αυτά. Πιο αναλυτικά, επίμυες στους οποίους χορηγήθηκε στο ραβδωτό σώμα 6-OHDA, εμφάνισαν 2-3 εβδομάδες αργότερα καταθλιπτικόμορφη συμπεριφορά, αυξημένο άγχος καθώς και κάποια γνωσιακά ελλείμματα (Tadaiesky et al., 2008).

Ανάλογα ήταν και τα αποτελέσματα άλλων ομάδων οι οποίες χορήγησαν την τοξίνη στη μέλαινα ουσία των επιμύων (Ferro et al., 2005; Santiago et al., 2010). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα 6-OHDA μοντέλα χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη και άλλων μη κινητικών συμπτωμάτων. Σε ένα από αυτά, ύστερα από χορήγηση της τοξίνης στο ραβδωτό, μελετήθηκε η ανοχή στον πόνο (μέσω χημικής διέγερσης του προσώπου καθώς και μηχανικής και θερμικής διέγερσης των πελμάτων). Τα αποτελέσματα έδειξαν υπεραλγητική απόκριση στα συγκεκριμένα ερεθίσματα (Chudler and Lu et al., 2008). Σε ό, τι αφορά τις διαταραχές του αυτόνομου νευρικού, υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν διαταραχές στον καρδιακό ρυθμό των πειραματοζώων μετά από χορήγηση της τοξίνης (Gravotta et al., 2011), καθώς και καθυστερημένη γαστρική κένωση (Zhu et al., 2011). Με βάση τα παραπάνω στοιχεία φαίνεται ότι τα συγκεκριμένα μοντέλα μπορούν να προσομοιάσουν αρκετά από τα μη κινητικά συμπτώματα της νόσου. Εκείνο όμως που δεν είναι ακόμη πλήρως ξεκάθαρο και γι' αυτό καθιστά τη χρήση τους σχετικά περιορισμένη, είναι το κατά πόσο αυτές οι παρατηρούμενες αλλαγές οφείλονται σε άμεση τοξικότητα (από τη νευροτοξίνη), ή σε έμμεσες συνέπειες της απώλειας ντοπαμίνης.

6.2. MPTP μοντέλα

Η χρήση του MPTP προσφέρει το βασικό πλεονέκτημα της αναπαραγωγής των κλινικών κινητικών συμπτωμάτων κυρίως σε μη ανθρώπινα πρωτεύοντα αλλά και σε τρωκτικά με μεγάλη επιτυχία. Παρ' όλα αυτά όμως λίγες μελέτες έχουν αναλύσει τα μη κινητικά συμπτώματα στα μοντέλα αυτά. Όπως και στην περίπτωση της 6-OHDA, το μη κινητικό σύμπτωμα το οποίο έχει μελετηθεί εκτενώς είναι τα γνωσιακά ελλείμματα. Πιο αναλυτικά, πίθηκοι (*macaca fascicularis*, *macaca mulatta*) οι οποίοι εκτέθηκαν σε χαμηλές δόσεις τοξίνης για περίπου 24 εβδομάδες, παρουσίασαν εκτεταμένα γνωσιακά ελλείμματα, οφθαλμοκινητική δυσλειτουργία καθώς και απώλεια προσοχής (Schneider and Pope-Coleman et al., 1995; Slovin et al., 1999; Decamp and Schneider et al., 2004). Ανάλογα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν και στην περίπτωση επιμύων στους οποίους χορηγήθηκε η τοξίνη στη μέλαινα ουσία (Da Cunha et al., 2001). Παρ' όλα αυτά όμως τα MPTP μοντέλα φαίνεται πως

δεν μπορούν μέχρι στιγμής τουλάχιστον να φανούν χρήσιμα στη μελέτη άλλων μη κινητικών συμπτωμάτων. Για παράδειγμα, πειραματικές μελέτες οι οποίες περιελάμβαναν χρόνια ή και οξεία έκθεση πιθήκων στην τοξίνη δεν κατόρθωσαν να αναπαράγουν τη συμπαθητική απονεύρωση της καρδιάς, όπως παρατηρείται στους ασθενείς (Goldstein et al., 2003).

Επιπρόσθετα, μία διαφορετική μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε πιθήκους, δεν κατάφερε να επάγει γαστρεντερική δυσλειτουργία παρά το γεγονός ότι παρατηρήθηκε σημαντική απώλεια ντοπαμινεργικών νευρώνων στο εντερικό σύστημα (Chaumette et al., 2009). Τέλος, ένα ευρύ φάσμα συμπεριφορικών αναλύσεων για την εκτίμηση των μη κινητικών συμπτωμάτων έχει πραγματοποιηθεί και σε μοντέλα μυών. Οι μελέτες αυτές αρχικά κατάφεραν να αναδείξουν μία πλειάδα μη κινητικών συμπτωμάτων στους μύες όπως είναι τα γνωσιακά ελλείμματα που εμφάνισαν στην εξαρτημένη μάθηση φόβου (Vucković et al., 2008), η υπεραλγησία (Rosland et al., 1992), ο αυξημένος REM ύπνος (Monaca et al., 2004) καθώς και η απώλεια οσφρητικής ικανότητας (Prediger et al., 2010). Το γεγονός όμως ότι η εμφάνιση κάποιων από τα προαναφερθέντα συμπτώματα ήταν παροδική (Laloux et al., 2008), περιορίζει σε μεγάλο βαθμό τη χρήση ενός τόσο σημαντικού εργαλείου, τουλάχιστον για το συγκεκριμένο σκοπό.

6.3. Μοντέλα Ροτενόνης

Παρά το γεγονός ότι τα μοντέλα των περιβαλλοντικών τοξινών έχουν μελετηθεί πιο εκτενώς την τελευταία μόνο δεκαετία, σημαντικές είναι οι προσπάθειες που έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά με τη μελέτη των μη κινητικών συμπτωμάτων στα μοντέλα αυτά. Πιο αναλυτικά, επίμυες στους οποίους χορηγήθηκε υποδόρια ροτενόνη για περισσότερο από 30 ημέρες, παρουσίασαν αφ' ενός μειωμένη κινητικότητα και αφετέρου αυξημένη υπνηλία (Yi et al., 2007). Χορήγηση ροτενόνης έχει επίσης συσχετιστεί με καταθλιπτικόμορφη συμπεριφορά (Santiago RM et al., 2010), γνωσιακά ελλείμματα (Kaur et al., 2011), καθώς και με ένα ευρύ φάσμα γαστρεντερικών διαταραχών (Drolet et al., 2009; Greene et al., 2009). Το μειονέκτημα και σε αυτές τις περιπτώσεις είναι το γεγονός ότι δεν είναι απόλυτα ξεκάθαρο κατά πόσο οι μηχανισμοί των μη κινητικών συμπτωμάτων που παρατηρούνται στο συγκεκριμένο μοντέλο είναι οι ίδιοι με αυτούς που παρατηρούνται στους ασθενείς.

6.4. Μοντέλα υπερέκφρασης α-συνουκλεΐνης αγρίου τύπου

Μύες οι οποίοι υπερεκφράζουν το φυσιολογικό γονίδιο της α-συνουκλεΐνης υπό τον υποκινητή Thy1 (Thy1-aSyn) που στοχεύει κυρίως στην εγκεφαλική έκφραση του γονιδίου, έχουν μελετηθεί εκτενώς για την παρουσία μη κινητικών συμπτωμάτων. Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι ακόμα και από τους 3 μήνες τα συγκεκριμένα μοντέλα εμφανίζουν σημαντική απώλεια οσφρητικής ικανότητας, αλλαγές στον καρδιακό ρυθμό καθώς και αυξημένη μεταβλητότητα καρδιακού ρυθμού, γεγονός που αποτελεί σημάδι αυτόνομης δυσλειτουργίας. Τρεις μήνες αργότερα έκαναν την εμφάνιση τους και τα γνωσιακά ελλείμματα (Fleming et al., 2008; 2009). Ένα ακόμα από τα συμπτώματα το οποίο εμφανίζεται σχετικά νωρίς σε αυτά τα μοντέλα είναι η υπερκινητικότητα, η οποία φαίνεται να συνδυάζεται με μειωμένα επίπεδα αγχώδους συμπεριφοράς (Lam et al., 2011). Σύμφωνα με μία άλλη μελέτη σε ηλικία 11 μηνών οι διαγονιδιακοί αυτοί μύες εμφάνισαν γαστρεντερική δυσλειτουργία η οποία παρουσιάστηκε μέσω μη φυσιολογικής κινητικότητας του εντέρου (Wang et al., 2008)

Εκτός από τα γενετικά μοντέλα τα οποία λειτουργούν υπό τον υποκινητή Thy1, υπάρχουν και τα γενετικά μοντέλα μυνών τα οποία βρίσκονται υπό τη ρύθμιση του υποκινητή PDGF-β (platelet-derived growth factor-beta). Και αυτά με τη σειρά τους έχουν προσφέρει σημαντικά στοιχεία σχετικά με την παρουσία των μη κινητικών συμπτωμάτων. Πιο αναλυτικά, μελέτες αναφέρουν ότι από τους 6 μήνες, οι μύες αυτοί εμφάνισαν εκτεταμένα γνωσιακά ελλείμματα (Masliah et al., 2011). Τέλος οι Nuber et al., 2008 δημιούργησαν ένα γενετικό μοντέλο μυνός το οποίο βασίστηκε στην υπό συνθήκη υπερέκφραση της αγρίου τύπου α-συνουκλεΐνης σύμφωνα με το σύστημα τετρακυκλίνης (tetracycline-regulated tet-off system, tTA) υπό τον υποκινητή CaMKIIα (calcium/calmodulin-dependent protein kinase IIα). Τα ζώα αυτά παρουσίασαν σημαντική κινητική δυσλειτουργία στους 7 μήνες, ενώ στην ηλικία των 12 μηνών παρουσίασαν προβλήματα στη μνήμη. Επιπλέον παρατηρήθηκε συσσώρευση α-συνουκλεΐνης στον ιππόκαμπο και τον οσφρητικό λοβό, ενώ στη μέλαινα ουσία παρατηρήθηκε συσσώρευση της πρωτεΐνης και απώλεια ντοπαμινεργικών νευρώνων.

6.5. Μοντέλα υπερέκφρασης μεταλλαγμένων μορφών α-συνουκλεΐνης

Διάφορα ζωικά μοντέλα μυνών τα οποία εκφράζουν μεταλλαγμένες μορφές της πρωτεΐνης έχουν αναπτυχθεί με σκοπό να επιταχυνθούν οι παθολογικές διαδικασίες και έτσι να δημιουργηθεί ένας πιο ολοκληρωμένος φαινότυπος. Τα μοντέλα αυτά έχουν μελετηθεί για την παρουσία κάποιων μη κινητικών συμπτωμάτων. Όπως και στην πλειονότητα των περιπτώσεων που αναφέρθηκαν μέχρι στιγμής, το πιο εκτενώς μελετημένο μη κινητικό σύμπτωμα είναι τα γνωσιακά ελλείμματα. Πιο αναλυτικά, μελέτες έδειξαν ότι μύες οι οποίοι

εκφράζουν την A30P μετάλλαξη εμφανίζουν σημαντικά προβλήματα στις διαδικασίες της μνήμης και της μάθησης στους 12 μήνες (Freichel et al., 2007), καθώς και μειωμένα επίπεδα άγχους (George et al., 2008). Εκτενώς μελετημένο είναι και το γενετικό μοντέλο μυών, το οποίο εκφράζει την A53T μετάλλαξη. Η χρήση των μοντέλων αυτών στη μελέτη των μη κινητικών συμπτωμάτων έχει αναδείξει σημαντικές πληροφορίες. Διαγονιδιακοί A53T μύες εμφάνισαν από τους 6 κιόλας μήνες σημαντική απώλεια οσφρητικής ικανότητας (Zhang et al., 2013). Επίσης, σύμφωνα με τους Kuo et al., 2010, A53T μύες εμφάνισαν εκτεταμένη γαστρεντερική δυσλειτουργία στους 3 μήνες. Μία επανεξέταση όμως στους 18 μήνες για τυχόν απώλειες οσφρητικής ικανότητας ή δυσλειτουργία του αυτόνομου ή και καρδιαγγειακού συστήματος, έδειξε πως δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους διαγονιδιακούς και τους αγρίου τύπου μύες. Πολλές όμως είναι και οι πειραματικές μελέτες οι οποίες αναφέρουν ότι οι μύες που υπερεκφράζουν τη συγκεκριμένη μετάλλαξη εμφανίζουν από τους 3 μήνες υψηλά επίπεδα κινητικότητας καθώς και αυξημένα επίπεδα αγγώδους συμπεριφοράς, τα οποία φαίνεται να συνεχίζονται μέχρι και τους 12 περίπου μήνες (George et al., 2008; Graham and Sidhu et al., 2010).

6.6. Μοντέλο υπερέκφρασης φυσιολογικής α -συνουκλεΐνης: AS BAC

Όπως μπορούμε να συμπεράνουμε από τα παραπάνω, η ανάγκη για να βρεθεί ένα πειραματικό ζωικό μοντέλο το οποίο θα καταφέρει να προσομοιάσει με τον καλύτερο δυνατό τρόπο τις συνθήκες κάτω από τις οποίες η νόσος αναπτύσσεται και εξελίσσεται στην περίπτωση του ανθρώπου είναι μεγάλη. Για το λόγο αυτό, γίνονται συνεχώς προσπάθειες, τόσο για τη βελτίωση των ήδη υπαρχόντων ζωικών μοντέλων, όσο και για τη δημιουργία νέων τα οποία θα μπορέσουν να ξεπεράσουν τους όποιους περιορισμούς υπήρχαν μέχρι τώρα.

Μία τέτοια προσπάθεια, είναι και η προσπάθεια των Nuber et al., 2013 μέσω της δημιουργίας ενός νέου γενετικά τροποποιημένου ζωικού μοντέλου πρωτεϊνικής υπερέκφρασης, αυτό των BAC διαγονιδιακών επιμύων α -συνουκλεΐνης (Bacterial Artificial Chromosome α -synuclein transgenic rat model). Το συγκεκριμένο μοντέλο παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι των υπολοίπων, γεγονός που το καθιστά ένα εξαιρετικό ερευνητικό εργαλείο. Πιο αναλυτικά, το μοντέλο αυτό φέρει ολόκληρο το γονίδιο της ανθρώπινης αγρίου τύπου α -συνουκλεΐνης, μίας από τις βασικές πρωτεΐνες που φαίνεται να εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου, ενέχοντας όλες τις ρυθμιστικές περιοχές (π.χ. ιντρόνια, εξόνια, ρυθμιστικές αλληλουχίες του υποκινητή και τμήμα της 3' αμετάφραστης περιοχής) με αποτέλεσμα τα ζώα αυτά να εκφράζουν την α -συνουκλεΐνη σε περιοχές του

νευρικού συστήματος όπου φυσιολογικά εκφράζεται η πρωτεΐνη αυτή. Ακόμα δίνεται η δυνατότητα μελέτης επιγενετικών παραγόντων.

Ένα επιπλέον πλεονέκτημα του μοντέλου αυτού -και ιδιαίτερα για τη διεξαγωγή συμπεριφορικής ανάλυσης- είναι το γεγονός ότι πρόκειται για μοντέλο επίμυ, πράγμα που σημαίνει ότι οι συμπεριφορές που μελετώνται είναι πιο πολύπλοκες σε σχέση με αυτές του μυός, ειδικά όσον αφορά την γνωσιακή λειτουργία (Abbott et al., 2004). Για παράδειγμα, τις περισσότερες φορές τα μοντέλα διαγονιδιακών μυών α-συνουκλεΐνης που μοντελοποιούν την παθογένεια της πρωτεΐνης στο μεσομεταιχμιακό σύστημα αποτυγχάνουν να προσομοιάσουν ταυτόχρονα και την παθολογία των ντοπαμινεργικών νευρώνων της μελαινοραβδωτής οδού.

Τα ευρήματα της συγκεκριμένης μελέτης υποστηρίζουν μειωμένη οριζόντια και κάθετη κινητικότητα από τους 16 και 12 μήνες αντίστοιχα στους AS BAC διαγονιδιακούς επίμυες. Επιπλέον, σημάδια αγχώδους συμπεριφοράς εμφανίστηκαν από τους 6 κιόλας μήνες. Ένα ακόμα μη κινητικό σύμπτωμα το οποίο παρουσίασε το συγκεκριμένο μοντέλο πολύ νωρίς και συγκεκριμένα στους 3 μήνες ήταν η απώλεια της οσφρητικής ικανότητας. Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι το συγκεκριμένο μοντέλο εμφάνισε σημαντική μείωση των επιπέδων της ντοπαμίνης στο ραβδωτό σώμα (Nuber et al., 2013).

Όμως δεν είναι η πρώτη φορά που το διαγονιδιακό AS BAC μοντέλο χρησιμοποιήθηκε σε ερευνητικές μελέτες. Ένα χρόνο πριν τη μελέτη αυτή, οι Yamakado et al. 2012, χρησιμοποίησαν την ίδια γονιδιακή κατασκευή σε ένα μοντέλο μυός και πραγματοποίησαν ένα σύνολο πειραματικών δοκιμασιών, τα αποτελέσματα όμως των οποίων ήταν αντίθετα από αυτά των Nuber. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ένας υπερκινητικός φαινότυπος ο οποίος συνοδευόταν από μειωμένα επίπεδα αγχώδους συμπεριφοράς τα οποία διατηρούνταν μέχρι και τους 24 μήνες. Επιπλέον δεν παρατηρήθηκε κανένα σημάδι νευροεκφύλισης.

II. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία με τίτλο «α-συνουκλεΐνη και μη κινητικά συμπτώματα στη νόσο Parkinson: πειραματική προσέγγιση σε ένα ζωικό μοντέλο συνουκλεϊνοπάθειας» έχει ως βασικό στόχο 1) τη μελέτη των πρώιμων μη κινητικών συμπτωμάτων της νόσου Parkinson μέσω συμπεριφορικής ανάλυσης και 2) τη νευροχημική μελέτη των επιπέδων των αμινοξέων-νευροδιαβιβαστών, σε ένα νέο γενετικά τροποποιημένο ζωικό μοντέλο πρωτεϊνικής υπερέκφρασης, αυτό των BAC διαγονιδιακών επιμύων, τα οποία φέρουν ολόκληρο το γονίδιο της ανθρώπινης αγρίου τύπου α-συνουκλεΐνης, μίας από τις βασικές πρωτεΐνες που φαίνεται να εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου. Έμμεσος στόχος της μελέτης αυτής αποτελεί και ο προσδιορισμός των πιθανών διαφυλικών διαφορών, ένα πεδίο που χρήζει ιδιαίτερης προσοχής, καθώς σύμφωνα με μία πληθώρα ερευνητικών μελετών, είναι πλέον ευρέως αποδεκτό ότι τα δύο φύλα παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές σε ό, τι αφορά τόσο τον επιπολασμό μίας νόσου, όσο και την συμπτωματολογία αλλά και την απόκριση στη θεραπευτική αγωγή (Ngun et al., 2011).

Συγκεκριμένα, στο πρώτο μέρος μελετήθηκε ο συμπεριφορικός φαινότυπος των μη κινητικών συμπτωμάτων, αρσενικών και θηλυκών διαγονιδιακών AS BAC επιμύων σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (3, 6, 9, 12 και 18 μήνες). Πιο αναλυτικά, αξιολογήσαμε την κινητική δραστηριότητα με τη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου, την αγχώδη συμπεριφορά με τη δοκιμασία του υπερυψωμένου σταυροειδούς λαβυρίνθου, την καταθλιπτικόμορφη συμπεριφορά με τη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης καθώς και την ανηδονία με τη δοκιμασία προτίμησης σουκρόζης. Επιπλέον, αξιολογήσαμε τη μνημονική και μαθησιακή λειτουργία με τη δοκιμασία του υδάτινου λαβύρινθου κατά Morris, καθώς και την αισθητικοκινητική δραστηριότητα με τη δοκιμασία της προπαλμικής αναστολής.

Και στο δεύτερο μέρος, θελήσαμε να συσχετίσουμε τους συμπεριφορικούς φαινοτύπους των AS BAC επιμύων με συγκεκριμένους νευροχημικούς δείκτες. Για το λόγο αυτό προσδιορίσαμε μέσω της τεχνικής HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) τα επίπεδα μη ντοπαμινεργικών νευροδιαβιβαστών όπως αυτά του γλουταμικού, της γλουταμίνης και του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA) σε εγκεφαλικές περιοχές που σχετίζονται με τα μη κινητικά συμπτώματα και συγκεκριμένα στον υπόκαμπο, την αμυγδαλή, το φλοιό και το ραβδωτό σώμα.

Πλεονέκτημα αυτού του μοντέλου για συμπεριφορικά πειράματα αποτελεί το γεγονός ότι πρόκειται για μοντέλο επίμυ, όπου οι συμπεριφορές που μελετώνται είναι πιο πολύπλοκες σε σχέση με του μύος, ενώ επίσης το ανθρώπινο γονίδιο της α-συνουκλεΐνης στο συγκεκριμένο μοντέλο ενέχει όλες τις ρυθμιστικές περιοχές, γεγονός που καθιστά τους AS BAC επίμυες ένα ιδανικό ζωικό μοντέλο συνουκλεϊνοπάθειας για μετα-μεταφραστικές μελέτες σε νευροβιολογικό και συμπεριφορικό επίπεδο.

III. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

1. Πειραματικός σχεδιασμός συμπεριφορικής ανάλυσης

Η μελέτη των πρώιμων μη κινητικών συμπτωμάτων της νόσου στο συγκεκριμένο μοντέλο στηρίχθηκε στην πραγματοποίηση ενός συνόλου συμπεριφορικών πειραμάτων. Πιο αναλυτικά, η συμπεριφορική ανάλυση περιελάμβανε σε σειρά εκτέλεσης τα παρακάτω πειράματα:

- ❖ Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (open field test), πείραμα το οποίο χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της κινητικότητας/εξερευνητικότητας και της αγχώδους συμπεριφοράς (Hall et al 1934)
- ❖ Δοκιμασία υπερυψωμένου λαβυρίνθου (elevated plus maze), πείραμα το οποίο χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αγχώδους συμπεριφοράς (Pellow et al., 1985; Walf and Frye et al., 2007)
- ❖ Δοκιμασία θαμμένης πελέτας (buried pellet test), πείραμα το οποίο χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της οσφρητικής ικανότητας (Alberts and Galef et al., 1971)
- ❖ Δοκιμασία προπαλμικής αναστολής (prepulse inhibition), πείραμα το οποίο χρησιμοποιείται για τον έλεγχο του αισθητικοκινητικού ηθμού (Kodsi and Swerdlow et al., 1995)
- ❖ Δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης (forced swim test), πείραμα το οποίο χρησιμοποιείται για τον έλεγχο καταθλιπτικόμορφης συμπεριφοράς (Porsolt et al., 1978)
- ❖ Δοκιμασία προτίμησης σουκρόζης (sucrose preference test), πείραμα το οποίο χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της ανηδονίας, μία πτυχή της καταθλιπτικόμορφης συμπεριφοράς (Moreau et al., 1997)
- ❖ Δοκιμασία υδάτινου λαβύρινθου κατά Morris (Morris water maze test), πείραμα το οποίο χρησιμοποιείται για τον έλεγχο διαδικασιών χωρικής μνήμης και μάθησης (Morris et al., 1984; Morris et al., 1982)
- ❖ Μέτρηση βάρους
- ❖ Μέτρηση κατανάλωσης τροφής

Στο σύνολο των πειραματικών διαδικασιών για τη μελέτη των πρώιμων μη κινητικών συμπτωμάτων, προστέθηκαν επίσης δύο ακόμα συμπεριφορικά πειράματα τα οποία είχαν ως στόχο την εκτίμηση της κινητικής λειτουργίας. Τα πειράματα αυτά ήταν:

- ❖ Δοκιμασία δοκού (challenging beam test), πείραμα το οποίο χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της κινητικότητας και του συντονισμού (Drucker-Colin and Garcia-Hernandez et al., 1991)
- ❖ Ανάλυση βαδίσματος (footprinting test), πείραμα το οποίο χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της βάδισης (Carter et al., 1999)

Όλες οι συμπεριφορικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε συγκεκριμένες χρονικές περιόδους και συγκεκριμένα στους 3, 6, 9, 12 και 18 μήνες. Εξαίρεση αποτελούν μόνο οι δοκιμασίες εξαναγκασμένης κολύμβησης και υδάτινου λαβύρινθου κατά Morris, οι οποίες δεν πραγματοποιήθηκαν στους 9 μήνες. Οι συμπεριφορικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν τόσο σε αρσενικούς όσο και θηλυκούς επίμυες. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 4 επιμέρους ομάδες στις οποίες περιλαμβάνονται αρσενικά αγρίου τύπου, θηλυκά αγρίου τύπου, διαγονιδιακά AS BAC αρσενικά και τέλος διαγονιδιακά AS BAC θηλυκά.

2. Πειραματικός σχεδιασμός νευροχημικής ανάλυσης

Ο προσδιορισμός του νευροχημικού προφίλ των AS BAC διαγονιδιακών επιμύων περιλάμβανε τη μέτρηση μέσω HPLC των επιπέδων του γλουταμικού, της γλουταμίνης και του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA). Η συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε περιοχές του εγκεφάλου που σχετίζονται με γνωσιακές και κινητικές ικανότητες, καθώς και με περιοχές που σχετίζονται με τη συναισθηματικότητα. Αυτές οι περιοχές είναι ο ιππόκαμπος, η αμυγδαλή, το ραβδωτό και ο φλοιός.

Όπως και στην περίπτωση των συμπεριφορικών αναλύσεων, έτσι και εδώ, η ανάλυση του νευροχημικού προφίλ πραγματοποιήθηκε σε συγκεκριμένες χρονικές περιόδους και συγκεκριμένα στους 3, 6, 9, 12 και 18 μήνες. Οι συμπεριφορικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν τόσο σε αρσενικούς όσο και θηλυκούς επίμυες.

IV. ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ ΚΑΙ ΣΤΕΓΑΣΗ

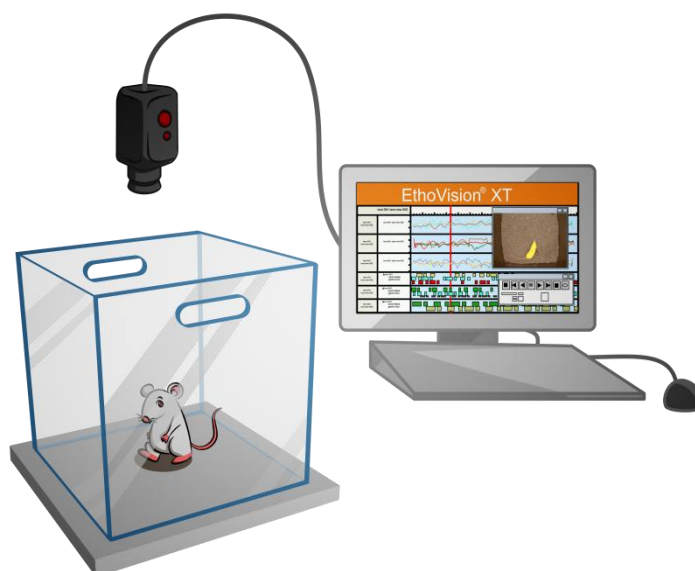
Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της συμπεριφορικής ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε ένας συνολικός αριθμός 43 επιμύων Sprague-Dawley εκ των οποίων οι 11 ήταν αρσενικοί αγρίου τύπου, οι 8 θηλυκοί αγρίου τύπου, οι 13 ήταν αρσενικοί διαγονιδιακοί BAC και οι 11 θηλυκοί διαγονιδιακοί BAC. Επιπλέον για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της νευροχημικής ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε ένας συνολικός αριθμός 190 επιμύων Sprague-Dawley, εκ των οποίων οι 90 ήταν αγρίου τύπου WT, ενώ οι 100 ήταν διαγονιδιακοί AS BAC.

Οι επίμυες προέρχονταν από τη Μονάδα Ζωϊκών Προτύπων του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών όπου και φυλάσσονταν σε κλωβούς πολυσουλφονίου παρουσία στρωμνής. Διαβίωναν σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$), σχετικής υγρασίας ($55\pm 10\%$) και κύκλου φωτισμού (12 ώρες φως και 12 ώρες σκοτάδι με την έναρξη της φωτεινής περιόδου στις 7:00 π.μ.). Όλες οι διαδικασίες φροντίδας και πειραματισμού των ζώων διεξήχθησαν σύμφωνα με τον Οδηγό για τη Φροντίδα και Χρήση Πειραματικών Ζώων (Guide for the Care and Use of Experimental Animals, 8th edition, National Research Council of the National Academies) και μετά από έγκριση της τοπικής επιτροπής ηθικής και δεοντολογίας.

V. ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

1. Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (open field test)

Η δοκιμασία ανοιχτού πεδίου αποτέλεσε το πρώτο πείραμα σε κάθε έναν από τους πέντε κύκλους συμπεριφορικής ανάλυσης (3, 6, 9, 12, 18 μήνες). Διεξήχθη κατά τις ώρες 1000- 1700 h. Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε ως εξής: κάθε επίμυς τοποθετήθηκε στο κέντρο μίας πειραματικής διάταξης που περιελάμβανε έναν διαφανή ακρυλικό κλωβό διαστάσεων 40x40x40 cm (Εικόνα 6) και αφέθηκε να την εξερευνήσει ελεύθερα για 60 λεπτά. Μετά το τέλος κάθε δοκιμασίας, ο κλωβός καθαριζόταν με 70% αιθανόλη.



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διάταξης της δοκιμασίας του ανοιχτού πεδίου.

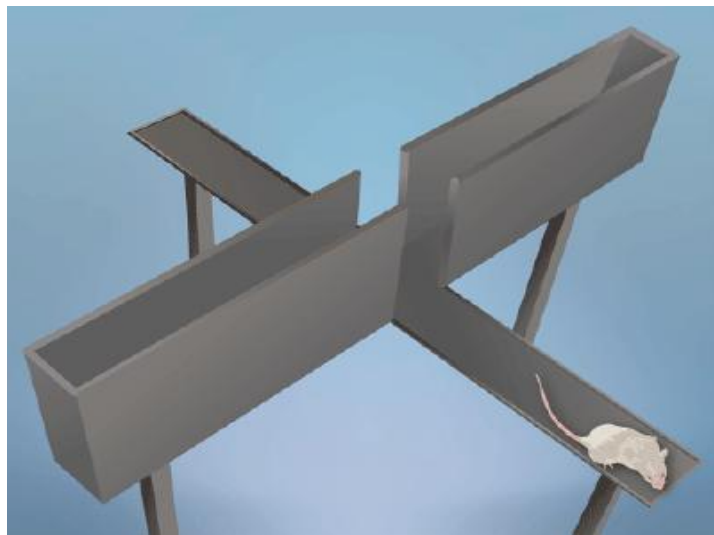
Προκειμένου να εκτιμηθεί η κινητική αλλά και εξερευνητική δραστηριότητα των πειραματοζώων, συγκεκριμένες παράμετροι καταγράφηκαν με τη χρήση κάμερας από πάνω και δίπλα από τη διάταξη και αναλύθηκαν με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού (Noldus Ethovision 8.5 XT specialized video tracking software). Οι παράμετροι οι οποίες αναλύθηκαν περιελάμβαναν:

1. Τη συνολική διανυόμενη απόσταση (cm), ή οριζόντια κινητικότητα ως δείκτη κινητικής δραστηριότητας
2. Την αλλαγή στη διανυόμενη απόσταση (cm) ανά 15 λεπτά, ως δείκτη εξοικείωσης

3. Το συνολικό αριθμό ανορθώσεων των πρόσθιων άκρων και του κορμού με στήριξη στα οπίσθια πόδια, ή κάθετη κινητικότητα ως δείκτη εξερευνητικής δραστηριότητας
4. Τον αριθμό ανορθώσεων των πρόσθιων άκρων και του κορμού με στήριξη στα οπίσθια πόδια ανά 15 λεπτά
5. Το συνολικό χρόνο (s) κατά τη διάρκεια του οποίου, ο επίμυς βρισκόταν στην κεντρική περιοχή του κλωβού, ως δείκτη αγχώδους συμπεριφοράς
6. Το χρόνο παραμονής στην κεντρική περιοχή (s) ανά 30 λεπτά, ως δείκτη εξοικείωσης
7. Η ταχύτητα (cm/s) του ζώου.

2. Υπερυψωμένος λαβύρινθος (elevated plus maze)

Ο υπερυψωμένος λαβύρινθος αποτέλεσε το δεύτερο κατά σειρά πείραμα σε κάθε έναν από τους πέντε κύκλους συμπεριφορικής ανάλυσης (3, 6, 9, 12, 18 μήνες). Διεξήχθη κατά τις ώρες 1100- 1400 h. Για το σκοπό του συγκεκριμένου πειράματος, χρησιμοποιήθηκε μία υπερυψωμένη κατά 51 cm από το έδαφος κατασκευή από PVC, η οποία περιλαμβάνει τέσσερις βραχίονες πλάτους 10cm και μήκους 50cm ο καθένας σε διάταξη σταυρού όπως απεικονίζεται παρακάτω (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διάταξης της δοκιμασίας του υπερυψωμένου λαβυρίνθου. Παρατηρούνται οι δύο κλειστοί βραχίονες (διαθέτουν πλευρικά τοιχώματα) και οι δύο ανοικτοί βραχίονες (χωρίς πλευρικά τοιχώματα).

Οι δύο από τους βραχίονες (αυτοί που βρίσκονται σε ευθεία μεταξύ τους) έχουν πλευρικά τοιχώματα ύψους 50 cm και γι' αυτό χαρακτηρίζονται ως κλειστοί βραχίονες (closed arms), ενώ οι άλλοι δύο δεν διαθέτουν πλευρικά τοιχώματα και γι' αυτό χαρακτηρίζονται ως ανοιχτοί βραχίονες (open arms). Πιο αναλυτικά, κάθε επίμυς τοποθετήθηκε στο κέντρο του λαβυρίνθου με τέτοιο τρόπο ώστε το κεφάλι του να κατευθύνεται προς τον ένα από τους δύο ανοιχτούς βραχίονες και αφέθηκε να εξερευνήσει ελεύθερα τη διάταξη αυτή για 5 λεπτά. Μετά το τέλος κάθε δοκιμασίας ο λαβύρινθος καθαριζόταν με 70% αιθανόλη. Προκειμένου να μελετηθούν τα επίπεδα της αγχώδους συμπεριφοράς, συγκεκριμένες παράμετροι καταγράφηκαν με τη χρήση κάμερας και αναλύθηκαν με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού (Noldus Ethovision 8.5 XT specialized video tracking software). Οι παράμετροι οι οποίες αναλύθηκαν περιελάμβαναν:

1. Ο χρόνος (s) κατά τον οποίο κάθε ζώο παρέμεινε στους ανοιχτούς (open arm time) και στους κλειστούς (closed arm time) βραχίονες
2. Ο αριθμός των εισόδων στους ανοιχτούς (open arm entries) και κλειστούς (closed arm entries) βραχίονες
3. Ο αριθμός των τενωμάτων κεφαλής που πραγματοποίησε το ζώο ως δείκτη της εξερευνητικότητας
4. Η συνολική διανυόμενη απόσταση (cm)

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι είσοδος σε έναν βραχίονα θεωρήθηκε αυτή που γινόταν με την τοποθέτηση και των τεσσάρων άκρων του ζώου στο βραχίονα.

3. Δοκιμασία θαμμένης πελέτας (Buried pellet test)

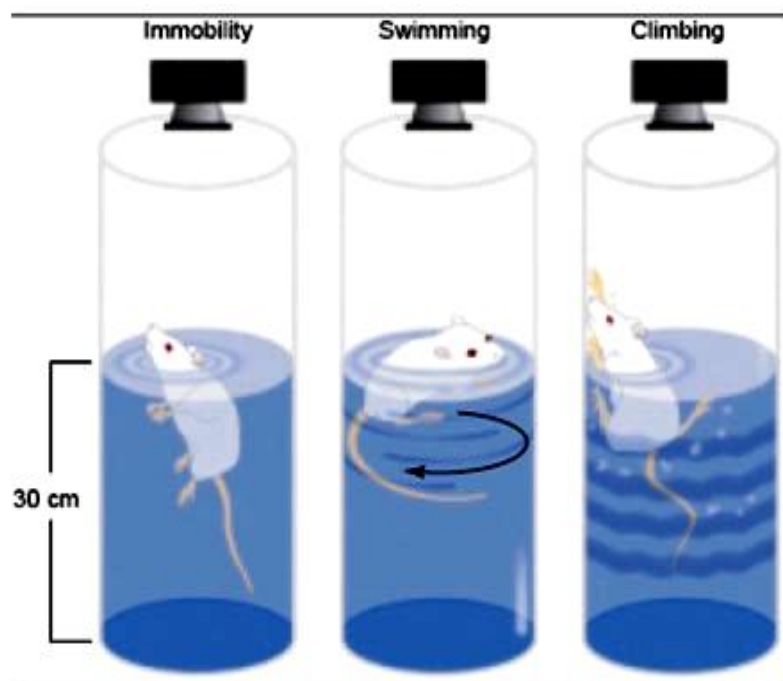
Η δοκιμασία θαμμένης πελέτας ήταν το τρίτο κατά σειρά πείραμα σε κάθε έναν από τους πέντε κύκλους συμπεριφορικής ανάλυσης (3, 6, 9, 12, 18 μήνες). Διεξήχθη κατά τις ώρες 1100- 1400h. Η συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία διήρκεσε 5 ημέρες και μπορεί να διαχωριστεί σε δύο φάσεις, αυτή της προ-δοκιμασίας (διάρκειας 4 ημερών) και αυτή της τελικής δοκιμασίας (διάρκειας 1 ημέρας). Τις 3 πρώτες ημέρες της προ-δοκιμασίας τοποθετήθηκε στους κλωβούς των πειραματοζώων μικρή ποσότητα σοκολατένιων δημητριακών (Chocorops©) ώστε να τα συνηθίσουν και να μην τους δημιουργείται νεοφοβία την ημέρα της δοκιμασίας. Την 4η ημέρα και εφόσον επιβεβαιώθηκε ότι οι επίμυες κατανάλωσαν τα δημητριακά, απομακρύνθηκε από τους κλωβούς τόσο η κανονική του τροφή, όσο και τα εναπομείναντα δημητριακά. Κατά την 5 ημέρα (ημέρα τελικής δοκιμασίας) κάθε επίμυς τοποθετήθηκε σε καινούριο καθαρό κλωβό (χωρίς σιδερένια σχάρα, μόνο με το

καπάκι) με 5 εκατοστά περίπου στρωμή για 5 λεπτά με σκοπό να εξοικειωθεί στο νέο περιβάλλον. Στη συνέχεια το ζώο απομακρύνθηκε από τον κλωβό και παράλληλα τοποθετήθηκε στο κάτω μέρος του κλωβού (θαμμένο 1 εκατοστό κάτω από τη στρωμή) ένα σοκολατένιο δημητριακό. Έπειτα, ο επίμυς τοποθετήθηκε ξανά στον κλωβό και αφέθηκε ελεύθερα για 5 λεπτά να τον εξερευνήσει. Προκειμένου να εκτιμηθεί η οσφρητική ικανότητα του ζώου, μετρήθηκε ο χρόνος που χρειάστηκε έως ότου ο επίμυς μυρίσει, ξεθάψει και ξεκινήσει να τρώει το κομμάτι του σοκολατένιου δημητριακού.

Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι πραγματοποιήθηκε και μία επιπλέον δοκιμασία για κάθε ζώο, η δοκιμασία ελέγχου. Σκοπός της δοκιμασίας αυτής είναι να επιβεβαιωθεί ότι μία τυχόν παρατηρούμενη οσφρητική δυσλειτουργία, οφείλεται όντως σε κάποιο πρόβλημα στα αντίστοιχα δίκτυα του εγκεφάλου και όχι για παράδειγμα στο γεγονός ότι δεν έχει κίνητρο να εκτελέσει τη δοκιμασία ή στο ζώο δεν αρέσει το σοκολατένιο κομμάτι και γι' αυτό δεν επέλεξε να το φάει. Για το σκοπό αυτό, τοποθετήθηκε στην επιφάνεια της στρωμνής στου αντίστοιχου κλωβού (σε ορατό σημείο) ένα σοκολατένιο δημητριακό και το ζώο τοποθετήθηκε ξανά μέσα στον κλωβό. Όπως και προηγουμένως μετρήθηκε ο χρόνος που χρειάστηκε έως ότου το ζώο ξεκινήσει να τρώει το σοκολατένιο κομμάτι. Ο χρόνος αυτός φυσιολογικά πρέπει να είναι παραπλήσιος για όλους τους επίμυες.

4. Δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης (forced swim test)

Η δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης αποτέλεσε το τέταρτο κατά σειρά πείραμα σε κάθε έναν από τους τέσσερις κύκλους συμπεριφορικής ανάλυσης (3, 6, 12, 18 μήνες). Διεξήχθη κατά τις ώρες 1100- 1400h. Το πείραμα αυτό διήρκεσε δύο μέρες, με την πρώτη ημέρα να περιλαμβάνει την εκπαίδευση (training day/pre test) και τη δεύτερη ημέρα να περιλαμβάνει την κάθε αυτή δοκιμασία (test day). Πιο αναλυτικά, η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε ως εξής: την πρώτη ημέρα κάθε επίμυς τοποθετήθηκε σε ακρυλικό κύλινδρο διαμέτρου 19 cm και ύψους 46,5cm γεμισμένο με νερό θερμοκρασίας 23 ± 1 °C μέχρι το ύψος των 30cm (Εικόνα 8) και αφέθηκε να κολυπήσει ελεύθερα για 15 λεπτά. Μετά το πέρας της δοκιμασίας, ο επίμυς σκουπιζόταν με μία πετσέτα και τοποθετούνταν κάτω από λάμπα θέρμανσης για περίπου πέντε λεπτά και στη συνέχεια επιστρεφόταν στον κλωβό του. Η ίδια ακριβώς διαδικασία πραγματοποιήθηκε και τη δεύτερη ημέρα με τη μόνη διαφορά ότι αυτή τη φορά το ζώο αφέθηκε να κολυπήσει ελεύθερο για 5 λεπτά.



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διάταξης της δοκιμασίας της εξαναγκασμένης κολύμβησης. Απεικονίζονται επίσης οι 3 βασικές συμπεριφορές που μελετώνται κατά τη δοκιμασία αυτή.

Προκειμένου να εκτιμηθεί η πιθανή καταθλιπτική συμπεριφορά των ζώων, συγκεκριμένες παράμετροι καταγράφηκαν από παρατηρητή με τη χρήση κάμερας και αναλύθηκαν με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού (Noldus Ethovision 8.5 XT specialized video tracking software). Οι παράμετροι οι οποίες αναλύθηκαν περιελάμβαναν:

1. Το συνολικό χρόνο κολύμβησης (swimming) (s), όταν δηλαδή το ζώο κολυμπά ενεργά σε κύκλους με το σώμα να βρίσκεται σε οριζόντια θέση
2. Το συνολικό χρόνο αναρρίχησης (climbing) (s), όταν δηλαδή το ζώο αναρριχόταν στα τοιχώματα του κυλίνδρου με το σώμα να βρίσκεται σε κάθετη θέση
3. Το συνολικό χρόνο ακινησίας (floating) (s), όταν δηλαδή το ζώο πραγματοποιεί μόνο τις απαραίτητες κινήσεις για να κρατήσει το κεφάλι του πάνω από το νερό
4. Τη συχνότητα του τινάγματος του κεφαλιού (head shakes), όταν δηλαδή το ζώο πραγματοποιεί γρήγορες αντανakλαστικές κινήσεις του κεφαλιού

5. Δοκιμασία προπαλμικής αναστολής (prepulse inhibition)

Η συγκεκριμένη δοκιμασία αποτέλεσε το πέμπτο κατά σειρά πείραμα σε κάθε έναν από τους πέντε κύκλους συμπεριφορικής ανάλυσης (3, 6, 9, 12, 18 μήνες). Το πείραμα είχε διάρκεια 2 ημερών και διεξήχθη κατά τις ώρες 1100- 1600h. Για την διεξαγωγή της συγκεκριμένης δοκιμασίας χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Startle and Fear Interface LE118-8 (Εικόνα 9) σε συνδυασμό με αντίστοιχο λογισμικό πρόγραμμα.



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διάταξης της δοκιμασίας της προπαλμικής αναστολής. Απεικονίζεται η συσκευή Startle and Fear Interface LE118-8 καθώς (αριστερά), καθώς και ο κλωβός πειραματισμού τοποθετημένος σε θάλαμο ηχομόνωσης (δεξιά).

➤ Πρώτη ημέρα (σκοπός η εκτίμηση της ακουστικής ικανότητας των ζώων):

Κάθε επίμυς τοποθετήθηκε σε μία ακρυλική συσκευή συγκράτησης από την οποία δεν μπορεί να διαφύγει. Στη συνέχεια η συσκευή συγκράτησης εγκλείστηκε μέσα στον κλωβό πειραματισμού της συσκευής και ξεκίνησε η δοκιμασία. Η ακριβής πειραματική διαδικασία της πρώτης ημέρας περιελάμβανε αρχικά μία φάση εξοικείωσης διάρκειας 5 λεπτών κατά την οποία ο επίμυς λάμβανε λευκούς ήχους. Μετά το τέλος των πέντε λεπτών, ακολούθησε μία φάση διάρκειας δέκα λεπτών κατά την οποία ο επίμυς λάμβανε σε ψευδοτυχαία σειρά ήχους έντασης 70-120 decibels. Κάθε ήχος διαρκούσε 1 δευτερόλεπτο, ενώ μεσολαβούσε και ένα χρονικό διάστημα 20 δευτερολέπτων από τον έναν ήχο στον επόμενο.

➤ Δεύτερη ημέρα

Όπως και την πρώτη ημέρα, έτσι και τώρα ο επίμυς τοποθετήθηκε ξανά στη συσκευή συγκράτησης η οποία στη συνέχεια εγκλείστηκε στον κλωβό της συσκευής. Η ακριβής πειραματική διαδικασία της δεύτερης ημέρας περιελάμβανε ξανά μία φάση εξοικείωσης διάρκειας 5 λεπτών κατά την οποία ο επίμυς λάμβανε λευκούς ήχους. Μετά το τέλος των πέντε λεπτών, ακολούθησε μία φάση διάρκειας 31 λεπτών αυτή τη φορά, κατά την οποία ο επίμυς λάμβανε μόνο έναν ήχο μέγιστης έντασης (115 decibel) αρχικά μόνο του για 10 φορές και στη συνέχεια σε συνδυασμό με έναν προειδοποιητικό ήχο έντασης 75, 80, 85, ή 90 decibel ο οποίος προηγούνταν κατά 1 δευτερόλεπτο του ήχου μέγιστης έντασης. Συγκεκριμένα, ο επίμυς δέχτηκε δέκα φορές τον κάθε έναν από τους συνδυασμούς 75-115, 80-115, 85-115 και 90-115 σε ψευδοτυχαία σειρά. Από τον ένα συνδυασμό στον άλλον μεσολαβούσε ένα χρονικό διάστημα 20 δευτερολέπτων.

Προκειμένου να εκτιμηθεί η αισθητικοκινητική δραστηριότητα, καταγράφηκε και μετρήθηκε η επί τοις εκατό προπαλμική αναστολή μέσω της παρακάτω εξίσωσης:

$$\frac{\text{αντίδραση στον μέγιστο ήχο} - \text{αντίδραση στον προειδοποιητικό ήχο}}{\text{αντίδραση στο μέγιστο ήχο}} * 100$$

6. Δοκιμασία προτίμησης σουκρόζης (sucrose preference test)

Η δοκιμασία προτίμησης σουκρόζης αποτέλεσε το έκτο κατά σειρά πείραμα σε κάθε έναν από τους πέντε κύκλους συμπεριφορικής ανάλυσης (3, 6, 9, 12, 18 μήνες). Συνολικά διήρκησε 7 ημέρες. Την πρώτη ημέρα κάθε επίμυς τοποθετήθηκε σε καινούριο καθαρό κλωβό (χωρίς καπάκι, μόνο με τη σιδερένια σχάρα) στον οποίο προστέθηκαν η τροφή του ζώου και δύο μπουκάλια με νερό. Το ζώο παρέμεινε σε αυτές τις συνθήκες για 3 συνολικά ημέρες προκειμένου να εξοικειωθεί με αυτές. Την τέταρτη ημέρα το ένα μπουκάλι με το νερό αντικαταστάθηκε με ένα άλλο μπουκάλι το οποίο περιείχε διάλυμα σουκρόζης 1%. Την ίδια ημέρα ζυγίστηκε το μπουκάλι με το νερό, το μπουκάλι με τη σουκρόζη καθώς και η τροφή. Η ίδια διαδικασία ζύγισης πραγματοποιήθηκε και τις επόμενες 3 ημέρες (72 ώρες σύνολο). Την τελευταία ημέρα (και αφού πραγματοποιήθηκε και η τελευταία ζύγιση), οι επίμυες τοποθετήθηκαν ξανά πίσω στους κανονικούς κλωβούς διαβίωσης. Προκειμένου να εκτιμηθεί ένας πιθανός καταθλιπτικός φαινότυπος των ζώων, μετρήθηκε η επί τοις εκατό προτίμηση

των πειραματοζώων για το διάλυμα της σουκρόζης σε σχέση με αυτό του νερού για 72 ώρες. Συγκεκριμένα υπολογίστηκε:

1. Η διαφορά στην προτίμηση της σουκρόζης (ποσότητα διαλύματος σουκρόζης την τελευταία ημέρα – ποσότητα διαλύματος σουκρόζης την πρώτη ημέρα)
2. Η διαφορά στην προτίμηση του νερού (ποσότητα διαλύματος νερού την τελευταία ημέρα – ποσότητα διαλύματος νερού την πρώτη ημέρα)
3. % προτίμηση του διαλύματος της σουκρόζης για 72 ώρες, η οποία δίνεται μέσω της εξίσωσης:

$$\frac{\text{διαφορά στην προτίμηση της σουκρόζης} - \text{διαφορά στην προτίμηση του νερού}}{\text{διαφορά στην προτίμηση της σουκρόζης} + \text{διαφορά στην προτίμηση του νερού}} * 100$$

7. Δοκιμασία υδάτινου λαβύρινθου κατά Morris (Morris water maze test)

Η δοκιμασία υδάτινου λαβύρινθου κατά Morris αποτέλεσε το έβδομο κατά σειρά πείραμα σε κάθε έναν από τους τέσσερις κύκλους συμπεριφορικής ανάλυσης (3, 6, 12, 18 μήνες). Διεξήχθη κατά τις ώρες 1100- 1500h. Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε περιελάμβανε μία κυκλική δεξαμενή ύψους 60 cm και διαμέτρου 150 cm καθώς επίσης και μία ακρυλική κυκλική πλατφόρμα διαμέτρου 11,5 cm. Ο υδάτινος λαβύρινθος ήταν τοποθετημένος σε συγκεκριμένες αποστάσεις από τους τοίχους και περικλειόταν από παραβάν προκειμένου να διαμορφώνεται ένα κλειστό περιβάλλον με ελεγχόμενα εξωτερικά ερεθίσματα (Εικόνα 10). Η δεξαμενή γεμιζόταν με νερό σταθερής θερμοκρασίας $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ του οποίου η στάθμη βρισκόταν 1 cm πάνω από την επιφάνεια της πλατφόρμας.



Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διάταξης της δοκιμασίας του υδάτινου λαβύρινθου κατά Morris. Απεικονίζεται η κυκλική δεξαμενή, η θέση της πλατφόρμας καθώς και τα διαφορετικά εξωτερικά ερεθίσματα.

Στην δεξαμενή προστέθηκαν επίσης 150 ml μαύρης μη τοξικής βαφής (Tempera, Jumbo) έτσι ώστε να υπάρχει αντίθεση ανάμεσα στο χρώμα του νερού και στο χρώμα του επίμυ, ώστε να είναι εφικτή η καταγραφή. Η όλη πειραματική διαδικασία είχε διάρκεια 5 ημερών και περιλαμβάνει 3 φάσεις:

- ❖ Φάση εκπαίδευσης (με κρυμμένη πλατφόρμα): Η πρώτη φάση περιελάμβανε 3 ημέρες εκπαίδευσης κατά τις οποίες η πλατφόρμα ήταν τοποθετημένη στο κέντρο ενός τεταρτημορίου της πισίνας με τέτοιο τρόπο ώστε να μην είναι φανερή (hidden platform) και στον χώρο γύρω από τη δεξαμενή υπήρχαν σταθερά στοιχεία (cues) τα οποία ήταν απαραίτητα για την πλοήγηση και τον προσανατολισμό των ζώων. Αν θεωρήσουμε ότι η δεξαμενή διαθέτει τέσσερα σημεία εκκίνησης, North (N), South (S), West (W), East (E), τότε κάθε επίμυς πραγματοποιούσε 4 δοκιμές (μία από κάθε σημείο εκκίνησης). Πιο αναλυτικά, το ζώο τοποθετούνταν σε μία από τις 4 θέσεις εκκίνησης με τέτοιο τρόπο ώστε το κεφάλι του να είναι προσανατολισμένο προς το τοίχωμα της δεξαμενής και αφηνόταν να κολυμπήσει ελεύθερα έως ότου εντοπίσει την κρυμμένη πλατφόρμα και ανέβει πάνω σε αυτή μέσα σε ένα χρονικό 90 δευτερολέπτων. Στις περιπτώσεις όπου οι επίμυες δεν κατάφερναν να εντοπίσουν την πλατφόρμα εντός του προκαθορισμένου χρόνου, τότε καθοδηγούνταν προς αυτήν με τη βοήθεια του πειραματιστή. Τα ζώα αφήνονταν πάνω στην πλατφόρμα για 15 δευτερόλεπτα προτού ο πειραματιστής τα απομάκρυνε από αυτήν. Μετά το πέρας και των τεσσάρων δοκιμασιών οι επίμυες τοποθετούνταν κάτω από λάμπα θέρμανσης για να στεγνώσουν για πέντε λεπτά και κατόπιν επιστρέφονταν στους κλωβούς τους. Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι

για τις 3 ημέρες το σημείο της πλατφόρμας παρέμενε σταθερό, αλλά άλλαζε ο προσανατολισμός των σημείων εκκίνησης. Επιπλέον, σε κάθε κύκλο συμπεριφορικής ανάλυσης (3, 6, 12, 18 μήνες) τόσο η θέση της πλατφόρμας όσο και ο προσανατολισμός των σημείων εκκίνησης ήταν διαφορετικός (Πίνακας 3).

- ❖ Δοκιμασία μνήμης (χωρίς πλατφόρμα): Την 4 ημέρα πραγματοποιούνταν η δεύτερη φάση, σκοπός της οποίας είναι ο έλεγχος της μνήμης των επιμύων (probe test). Κατά τη διάρκεια της φάσης αυτής η πλατφόρμα είχε αφαιρεθεί από τη δεξαμενή, παρέμειναν όμως τα στοιχεία στον περιβάλλοντα χώρο. Σημείο εκκίνησης αυτή τη φορά θεωρήθηκε ένα σημείο της δεξαμενής το οποίο ήταν σε αντιδιαμετρικό τεταρτημόριο σε σχέση με τη θέση που είχε η πλατφόρμα κατά τις μέρες της εκπαίδευσης. Κάθε επίμυς τοποθετούνταν στη θέση εκκίνησης με τέτοιο τρόπο ώστε το κεφάλι του να είναι προσανατολισμένο προς το τοίχωμα της δεξαμενής και αφηνόταν να κολυμπήσει ελεύθερα για 60 δευτερόλεπτα. Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος οι μύες απομακρύνονταν από τη δεξαμενή και αφού τοποθετούνταν για 5 λεπτά κάτω από λάμπα θέρμανσης για να στεγνώσει, επιστρέφονταν στους κλωβούς τους.
- ❖ Δοκιμασία ελέγχου (με ορατή πλατφόρμα): Την πέμπτη και τελευταία ημέρα πραγματοποιούνταν η τρίτη φάση της δοκιμασίας, εκείνη της εκπαίδευσης με ορατή πλατφόρμα (cued acquisition). Για το σκοπό της δοκιμασίας αυτής, αφαιρέθηκαν όλα τα στοιχεία προσανατολισμού από τον περιβάλλοντα χώρο και πάνω στην πλατφόρμα τοποθετήθηκε σημαία που την καθιστούσε ορατή και υποδείκνυε τη θέση της. Όπως και την πρώτη ημέρα έτσι και τώρα κάθε επίμυς πραγματοποιούσε 4 δοκιμές. Σε κάθε δοκιμή όμως τόσο η θέση της πλατφόρμας, όσο και η θέση εκκίνησης ήταν διαφορετικές σε κάθε δοκιμασία (Πίνακας 4). Πιο αναλυτικά, όπως και προηγουμένως, κάθε επίμυς τοποθετούνταν σε μία από τις 4 θέσεις εκκίνησης με τέτοιο τρόπο ώστε το κεφάλι του να είναι προσανατολισμένο προς το τοίχωμα της δεξαμενής και αφηνόταν να κολυμπήσει ελεύθερα έως ότου εντοπίσει την ορατή πλατφόρμα και ανέβει πάνω σε αυτή μέσα σε ένα χρονικό διάστημα 90 δευτερολέπτων. Στις περιπτώσεις όπου οι επίμυες δεν κατάφερναν να εντοπίσουν την πλατφόρμα εντός του προκαθορισμένου χρόνου, τότε καθοδηγούνταν προς αυτήν με τη βοήθεια του πειραματιστή. Τα ζώα αφήνονταν πάνω στην πλατφόρμα για 15 δευτερόλεπτα προτού ο πειραματιστής τα απομάκρυνε από αυτήν. Μετά το πέρας και των τεσσάρων δοκιμασιών οι επίμυες τοποθετούνταν κάτω από λάμπα θέρμανσης να στεγνώσουν για πέντε λεπτά και κατόπιν επιστρέφονταν στους κλωβούς τους.

ΚΡΥΜΜΕΝΗ ΠΛΑΤΦΟΡΜΑ	3 ΜΗΝΕΣ	6 ΜΗΝΕΣ	12 ΜΗΝΕΣ	18 ΜΗΝΕΣ
	Πλατφόρμα/εκκίνηση	Πλατφόρμα/εκκίνηση	Πλατφόρμα/εκκίνηση	Πλατφόρμα/εκκίνηση
	SW/ N-E-S-W	NE/ S-W-N-E	SE/ W-N-E-S	SW/ N-E-S-W
	SW/ W-S-E-N	NE/ N-S-W-E	SE/ N-S-W-E	SW/ W-S-E-N
	SW/ N-S-W-E	NE/ W-S-E-N	SE/ S-W-N-E	SW/ N-S-W-E

Πίνακας 3: Συνοπτική παρουσίαση των συνθηκών των 3 πρώτων ημερών του πειράματος και για τις 4 χρονικές περιόδους ανάλυσης. Παρουσιάζεται τόσο η θέση της πλατφόρμας, όσο και οι 4 θέσεις εκκίνησης.

ΟΡΑΤΗ ΠΛΑΤΦΟΡΜΑ	3 ΜΗΝΕΣ	6 ΜΗΝΕΣ	12 ΜΗΝΕΣ	18 ΜΗΝΕΣ
	Πλατφόρμα/εκκίνηση	Πλατφόρμα/εκκίνηση	Πλατφόρμα/εκκίνηση	Πλατφόρμα/εκκίνηση
	NW/S (1 ^η δοκιμή)	SE/N (1 ^η δοκιμή)	NW/S (1 ^η δοκιμή)	SE/N (1 ^η δοκιμή)
	SE/N (2 ^η δοκιμή)	SW/E (2 ^η δοκιμή)	SE/N (2 ^η δοκιμή)	SW/E (2 ^η δοκιμή)
	SW/E (3 ^η δοκιμή)	NW/S (3 ^η δοκιμή)	SW/E (3 ^η δοκιμή)	NW/S (3 ^η δοκιμή)
	NE/W (4 ^η δοκιμή)	NE/W (4 ^η δοκιμή)	NE/W (4 ^η δοκιμή)	NE/W (4 ^η δοκιμή)

Πίνακας 4: Συνοπτική παρουσίαση των συνθηκών της 5^{ης} ημέρα του πειράματος και για τις 4 χρονικές περιόδους της ανάλυσης. Παρουσιάζεται για κάθε δοκιμασία η θέση της πλατφόρμας καθώς και η θέση εκκίνησης.

Προκειμένου να εκτιμηθεί η ύπαρξη μαθησιακών ή μνημονικών ελλειμμάτων, συγκεκριμένες παράμετροι καταγράφηκαν με τη χρήση υπερυψωμένης κάμερας και αναλύθηκαν με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού (Noldus Ethovision XT specialized video tracking software). Οι παράμετροι οι οποίες αναλύθηκαν περιελάμβαναν:

Για τις 3 πρώτες ημέρες:

1. Ο συνολικός χρόνος που απαιτήθηκε για την εύρεση της κρυμμένης πλατφόρμας (s)
2. Η συνολική διανυόμενη απόσταση (cm)
3. Η ταχύτητα (cm/s)

Για την 4^η ημέρα:

1. Ο συνολικός χρόνος (s) που δαπάνησε ο επίμυς στο τεταρτημόριο όπου βρισκόταν τις προηγούμενες ημέρες η θέση της πλατφόρμας

Για την 5^η ημέρα:

1. Ο συνολικός χρόνος που απαιτήθηκε για την εύρεση της ορατής πλατφόρμας (s)

8. Δοκιμασία δοκού (Challenging beam)

Η δοκιμασία δοκού αποτέλεσε το όγδοο κατά σειρά πείραμα σε κάθε έναν από τους πέντε κύκλους συμπεριφορικής ανάλυσης (3, 6, 9, 12, 18 μήνες). Διεξήχθη κατά τις ώρες 1100- 1300h. Συνολικά διήρκησε 3 ημέρες με τις δύο πρώτες να αποτελούν τη φάση της εκπαίδευσης (training), ενώ η 3η μέρα ήταν εκείνη της καθεαυτής δοκιμασίας. Για το σκοπό του πειράματος αυτού χρησιμοποιήθηκε μία ακρυλική ράβδος με μήκος 200 cm και πλάτος 5 cm η οποία ήταν στερεωμένη σε ύψος 40 cm από την επιφάνεια. Η μία πλευρά της ράβδου (δεξιά) θεωρήθηκε το σημείο έναρξης της δοκιμασίας, ενώ στο τέλος της αντίθετης πλευράς (αριστερά) ενσωματωνόταν κάθε φορά ο κλωβός του επίμυ που πραγματοποιούσε τη δοκιμασία (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διάταξης της δοκιμασίας δοκού.

Σκοπός της φάσης εκπαίδευσης (1-2 ημέρα), ήταν να μάθει ο επίμυ να διασχίζει τη δοκό (αρχικά με τη βοήθεια του πειραματιστή και συνέχεια χωρίς αυτήν) και να φτάνει στο τέλος αυτής όπου βρισκόταν και ο κλωβός του. Έτσι λοιπόν κάθε επίμυ τοποθετούνταν στη θέση έναρξης της δοκού και με τη βοήθεια ή χωρίς του πειραματιστή καθοδηγούνταν προς το τέλος της. Κάθε επίμυ επαναλάμβανε τη δοκιμασία περίπου 7 φορές/ημέρα έως ότου ο πειραματιστής βεβαιωνόταν ότι το ζώο είχε μάθει τη διαδικασία. Να σημειωθεί ότι από ζώο σε ζώο η δοκός καθαριζόταν με 70% αιθανόλη.

Την ημέρα της εκπαίδευσης ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία. Κάθε επίμυ τοποθετήθηκε στη θέση έναρξης και αφέθηκε να διασχίσει τη δοκό έως ότου φτάσει στον κλωβό του χωρίς τη βοήθεια του εκπαιδευτή αυτή τη φορά. Κάθε ζώο πραγματοποίησε 5 δοκιμές. Η κάθε δοκιμασία καταγραφόταν με χρήση κάμερας.

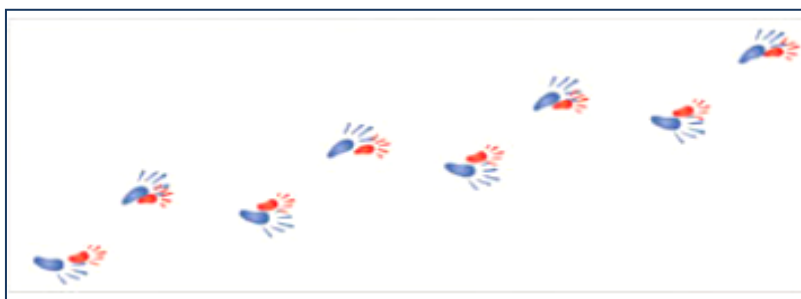
Προκειμένου να εκτιμηθεί η κινητική ικανότητα των επιμύων, συγκεκριμένες παράμετροι αναλύθηκαν. Πιο συγκεκριμένα, μετρήθηκε:

1. Ο συνολικός χρόνος (sec) που χρειάστηκε ο επίμυ να διασχίσει τη δοκό
2. Η βαθμολογία σφαλμάτων

Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι η τελική βαθμολογία προκύπτει από την πρόσθεση των επιμέρους βαθμών που πραγματοποιεί ο επίμυς σε κάθε πλήρη βηματισμό. Αν κατά τη βάδιση απομακρυνθεί από τη δοκό ένα άκρο τότε το σκορ θεωρείται 1. Αν απομακρυνθούν δύο άκρα τότε το σκορ θεωρείται 2. Αν απομακρυνθούν 3 τότε το σκορ είναι 3, ενώ αν κανένα άκρο δεν απομακρυνθεί από τη δοκό τότε το σκορ θεωρείται μηδέν. Η προσθήκη αυτών των βαθμών μας δίνει και την τελική βαθμολογία.

9. Ανάλυση βημάτων (Foot printing)

Η δοκιμασία της ανάλυσης βημάτων αποτέλεσε το τελευταίο κατά σειρά πείραμα σε κάθε έναν από τους πέντε κύκλους συμπεριφορικής ανάλυσης (3, 6, 9, 12, 18 μήνες). Το πρώτο βήμα της δοκιμασίας αυτής ήταν ο χρωματισμός των μπροστινών άκρων του εκάστοτε επίμου με κόκκινη μη τοξική βαφή (Goomby, Πλαίσιο) και των πίσω άκρων με μπλε (Goomby, Πλαίσιο). Στη συνέχεια ο επίμυς τοποθετούνταν σε έναν διάδρομο μήκους 80 cm και πλάτους 12 cm, με υπερυψωμένα πλάγια τοιχώματα ύψους 10 cm και αφηνόταν να διανύσει μια ευθεία πορεία πραγματοποιώντας 4-5 πλήρεις βηματισμούς. Στη βάση της κατασκευής ήταν τοποθετημένο λευκό χαρτί ώστε να είναι εφικτή η αποτύπωση των βημάτων του επίμου όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα: Σχηματική απεικόνιση της δοκιμασίας της ανάλυσης βημάτων.

Οι παράμετροι οι οποίες αναλύθηκαν ήταν οι εξής:

1. Το μήκος του διασκελισμού για τα μπροστινά και πίσω άκρα υπολογισμένο ως η μέση απόσταση της κίνησης μεταξύ κάθε βηματισμού
2. Το πλάτος των μπροστινών και το πλάτος πίσω άκρων, υπολογισμένο ως η μέση απόσταση ανάμεσα στα δεξιά και αριστερά αποτυπώματα
3. Την ομοιόμορφη εναλλαγή βημάτων (επικάλυψη), υπολογισμένη ως η απόσταση ανάμεσα σε μπροστινό και πίσω δεξί άκρο ή ανάμεσα σε μπροστινό και πίσω αριστερό άκρο

VI. ΝΕΥΡΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Προσδιορισμός επιπέδων αμινοξέων-νευροδιαβιβαστών: γλουταμικού, γλουταμίνης και GABA με τη μέθοδο HPLC

Οι αναλυτικές μετρήσεις των επιπέδων των αμινοξέων νευροδιαβιβαστών πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας μία αντλία υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) (YL9112), μαζί με έναν ηλεκτροχημικό ανιχνευτή (BASi LC-EC). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν μία διάταξη χρωματογραφίας με σύζευξη ιόντων (ion-pair chromatography) ανάστροφης φάσης. Η κινητή φάση αποτελούνταν από ένα διάλυμα φωσφορικών 100 mM, σε αραιώση (5:95), pH=4,9 που περιείχε 50μM EDTA (Sigma). Ακόμη, προστέθηκε ως οργανικός διαλύτης ακετονιτρίλιο (Merck) σε συγκέντρωση 6,5%. Ως στατική μη πολική φάση χρησιμοποιήθηκε στήλη Xterra ODS, (250 mm x 4.6 mm, 5 μm) (Waters). Το ηλεκτρόδιο αναφοράς ήταν υαλώδους άνθρακα (glassy carbon). Όλα τα προς ανάλυση δείγματα προέρχονταν από την ομογενοποίηση εγκεφαλικού ιστού. Πιο αναλυτικά, η διαδικασία απομόνωσης και προετοιμασίας των δειγμάτων περιελάμβανε τα παρακάτω:

Μετά από τον αποκεφαλισμό των επιμύων, οι εγκέφαλοι τους αφαιρέθηκαν γρήγορα και απομονώθηκαν οι επιθυμητές εγκεφαλικές περιοχές (ιππόκαμπος, αμυγδαλή, ραβδωτό, φλοιός). Στη συνέχεια, οι ιστοί τοποθετήθηκαν σε προ-ζυγισμένα σωληνάρια και ζυγίστηκαν. Ακολούθως, οι ιστοί διαλύθηκαν σε συγκεκριμένη ποσότητα διαλύματος υπερχλωρικού οξέος 0,1 M (Sigma) που περιείχε διάλυμα TAE (Tris-Acetate EDTA) (Sigma). Έπειτα ομογενοποιήθηκαν με τη χρήση υπερήχων, με αποτέλεσμα την καταστροφή των πρωτεϊνικών αλυσίδων. Το ομογενοποίημα που προέκυψε φυγοκεντρήθηκε στις 13.000 rpm για 20 λεπτά στους 4 °C και το υπερκείμενο αποθηκεύτηκε στους - 80 °C μέχρι την ανάλυση.

Όλα τα δείγματα πριν την εισαγωγή τους στον ηλεκτροχημικό ανιχνευτή υπέστησαν μία διαδικασία παραγοντοποίησης. Πιο αναλυτικά, σε 20μl δείγματος προσθέτονταν 20μl διαλύματος Borax 0,1 M, pH=9,6 (Sigma) και 2μl του αντιδραστηρίου παραγοντοποίησης (ortho-phthalaldehyde) (Sigma). Το προκύπτον διάλυμα αφηνόταν να αντιδράσει σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά και κατόπιν ενιόταν στο σύστημα για ανάλυση. Πρέπει να σημειωθεί ότι για τη σωστή εκτίμηση της ευαισθησίας των μετρήσεων χρησιμοποιούνταν καθημερινά πρότυπα διαλύματα αναφοράς. Οι τιμές εκφράζονται ως γραμμομοριακότητα κατ' όγκο (Molarity, M) και συγκεκριμένα ως μM.

VII. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Συμπεριφορική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων που αφορούν τα πειράματα της συμπεριφοράς πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια των προγραμμάτων GraphPad Prism 5 και PASW Statistics 18 (SPSS 18.0). Πιο αναλυτικά, το πρόγραμμα GraphPad Prism 5 χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις διπαραγοντικής ανάλυσης διακύμανσης επαναλαμβανόμενων μετρήσεων μεικτού σχεδιασμού (repeated measures ANOVA), ενώ το PASW Statistics 18 (SPSS 18.0) για τις αναλύσεις μεταβλητότητας κατά τρεις κατευθύνσεις (three-way analysis of variance).

Με τη χρήση διπαραγοντικής ανάλυσης, με παράγοντες το γονότυπο και το φύλο εκτιμήθηκαν στατιστικά οι εξής παράμετροι:

Για τη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου

- 1) Συνολική διανυόμενη απόσταση
- 2) Συνολικός χρόνος στην κεντρική περιοχή
- 3) Ταχύτητα
- 4) Συνολικός αριθμός των ανορθώσεων

Για τη δοκιμασία του σταυροειδούς υπερυψωμένου λαβυρίνθου

- 1) Συνολικός χρόνος στους ανοιχτούς βραχίονες
- 2) Συνολικός αριθμός εισόδων στους ανοιχτούς βραχίονες
- 3) Συνολικός αριθμός τεντωμάτων κεφαλής
- 4) Συνολική διανυόμενη απόσταση

Για τη δοκιμασία της θαμμένης πελέτας

- 1) Λανθάνων χρόνος μέχρι την εύρεση της θαμμένης πελέτας

Για τη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης

- 1) Συνολικός χρόνος κολύμβησης
- 2) Συνολικός χρόνος αναρρίχησης
- 3) Συνολικός χρόνος ακινησίας
- 4) Συχνότητα τινάγματος κεφαλιού

Για τη δοκιμασία προτίμησης σουκρόζης

- 1) % προτίμηση του διαλύματος της σουκρόζης

Για τη δοκιμασία δοκού

- 1) Συνολικός χρόνος διάσχισης δοκού
- 2) Συνολική βαθμολογία

Για τη δοκιμασία της ανάλυσης βημάτων

1. Μήκος του διασκελισμού
2. Πλάτος των μπροστινών και το πλάτος πίσω άκρων
3. Ομοιόμορφη εναλλαγή βημάτων

Με two-way ANOVA αναλύθηκε επίσης το βάρος και η κατανάλωση τροφής.

Με τη χρήση μεταβλητότητας κατά τρεις κατευθύνσεις εκτιμήθηκαν στατιστικά οι εξής παράμετροι:

Για τη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου

- | | | |
|---|---|---|
| <ol style="list-style-type: none">1) Αλλαγή στη διανυόμενη απόσταση ανά 15 λεπτά2) Αλλαγή στον αριθμό των ανορθώσεων ανά 15 λεπτά3) Χρόνος στην κεντρική περιοχή ανά 30 λεπτά | } | για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις στο χρόνο με παράγοντες το γονότυπο και το φύλο |
|---|---|---|

Για τη δοκιμασία της προπαλμικής αναστολής

- | | | |
|---|---|--|
| <ol style="list-style-type: none">1) Ακουστική ικανότητα2) % προπαλμική αναστολή | } | για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις στην ένταση του παλμού με παράγοντες το γονότυπο και το φύλο |
|---|---|--|

Για τη δοκιμασία του υδάτινου λαβυρίνθου κατά Morris

- | | | |
|---|---|---|
| <ol style="list-style-type: none">1) Συνολικός χρόνος εύρεσης της κρυμμένης πλατφόρμας2) Συνολικός χρόνος εύρεσης της ορατής πλατφόρμας3) Συνολικός χρόνος στο επιθυμητό τεταρτημόριο | } | για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις στο χρόνο με παράγοντες το γονότυπο και το φύλο |
|---|---|---|

Νευροχημική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων που αφορούν την ανάλυση του νευροχημικού προφίλ πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή του κριτηρίου t για ανεξάρτητα δείγματα.

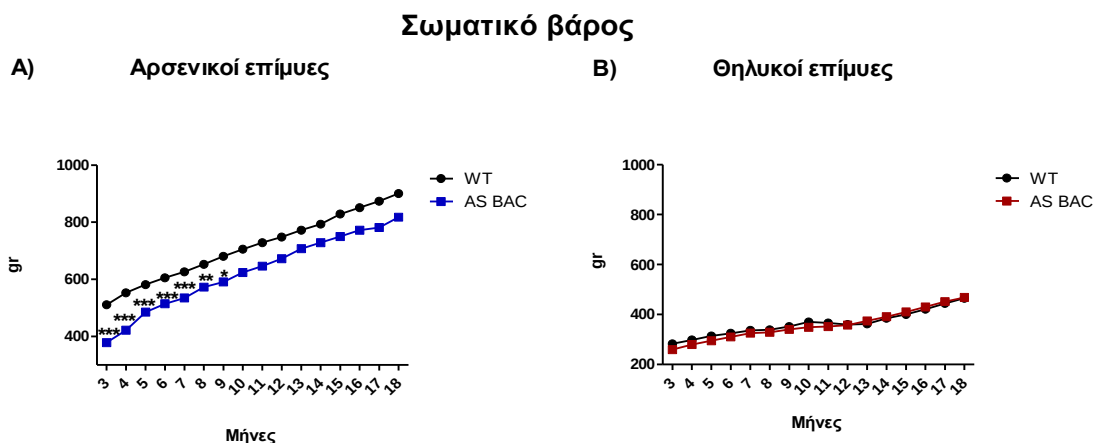
VIII. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αποτελέσματα συμπεριφορικής ανάλυσης

1. Σωματικό βάρος: Οι αρσενικοί AS BAC επίμυες εμφανίζουν μειωμένο σωματικό βάρος

Πραγματοποιήθηκε μηνιαία μέτρηση του σωματικού βάρους των επιμύων από τους 3 έως και τους 18 μήνες. Η επεξεργασία των δεδομένων που αφορούν στη συγκεκριμένη παράμετρο ανέδειξε την κύρια επίδραση του γονοτύπου στις νεαρές ηλικίες από 3 έως 9 μηνών (3 μήνες: $[F_{(1,41)}=29,06, p<0,001]$, 4 μήνες: $[F_{(1,40)}=36,25, p<0,001]$, 5 μήνες: $[F_{(1,40)}=21,80, p<0,001]$, 6 μήνες: $[F_{(1,39)}=13,39, p=0,0007]$, 7 μήνες: $[F_{(1,39)}=9,425, p=0,0039]$, 8 μήνες: $[F_{(1,36)}=4,451, p=0,0419]$, 9 μήνες: $[F_{(1,36)}=4,823, p=0,0343]$), με τους AS BAC διαγονιδιακούς επίμυες να εμφανίζουν γενικά μειωμένο σωματικό βάρος σε σχέση με τους αγρίου τύπου WT επίμυες (**Διάγραμμα 1A, B**).

Πιο αναλυτικά, στις συγκεκριμένες χρονικές περιόδους οι αρσενικοί AS BAC επίμυες εμφάνισαν μειωμένο βάρος σε σχέση με τους αρσενικούς WT (3 μήνες: $p<0,001$, 4 μήνες: $p<0,001$, 5 μήνες: $p<0,001$, 6 μήνες: $p<0,001$, 7 μήνες: $p<0,001$, 8 μήνες: $p<0,01$, 9 μήνες: $p<0,05$) (**Διάγραμμα 1A**). Επιπλέον, η ανάλυση ανέδειξε και την κύρια επίδραση του φύλου με τους αρσενικούς επίμυες να εμφανίζουν γενικά αυξημένο σωματικό βάρος σε σχέση με τους αντίστοιχους θηλυκούς.

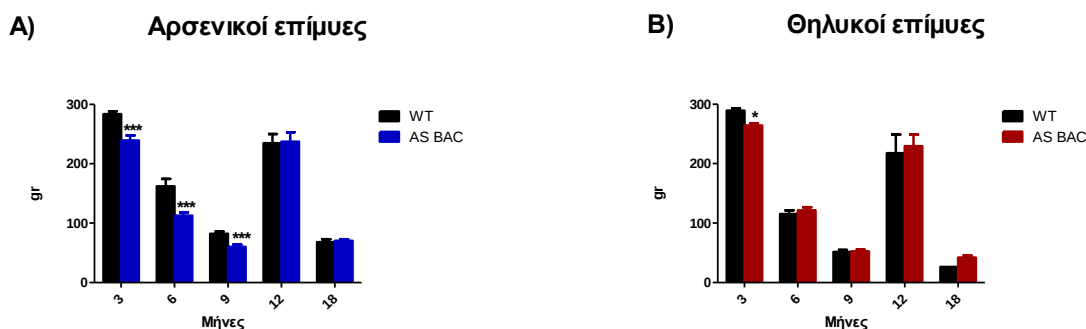


Διάγραμμα 1: Σωματικό βάρος αρσενικών και θηλυκών επιμύων για το χρονικό διάστημα 3-18 μηνών. Παρατηρείται η κύρια επίδραση του φύλου με τους αρσενικούς επίμυες να εμφανίζουν αυξημένο σωματικό βάρος σε σχέση με τον θηλυκούς (A,B). Παρατηρείται επίσης κύρια επίδραση του γονοτύπου με τον διαγονιδιακούς AS BAC επίμυες να εμφανίζουν στατιστικά σημαντικά μειωμένο βάρος σε σχέση με τους αγρίου τύπου WT (A). [Μέση τιμή $\pm$ τυπικό σφάλμα, * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$), *** ($p<0,001$): στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ WT και AS BAC επιμύων].

2. **Κατανάλωση τροφής:** Οι διαγονιδιακοί AS BAC επίμυες εμφανίζουν μειωμένη κατανάλωση τροφής

Κατά τη μέτρησης κατανάλωση τροφής στους 6, 9, 12, και 18 μήνες, η ανάλυση των δεδομένων ανέδειξε την κύρια επίδραση του γονοτύπου στους 3, 6 και 9 μήνες (3 μήνες: $[F_{(1,40)}=30,93, p<0,001]$, 6 μήνες: $[F_{(1,35)}=6,086, p=0,0187]$, 9 μήνες: $[F_{(1,39)}=9,368, p=0,0040]$). Συγκεκριμένα, οι διαγονιδιακοί AS BAC επίμυες κατανάλωσαν στατιστικώς σημαντικά μειωμένη ποσότητα τροφής σε σχέση με τους αντίστοιχους αγρίου τύπου (**Γράφημα 2A,B**). Πιο αναλυτικά, για την περίπτωση των αρσενικών AS BAC επιμύων, η παράμετρος αυτή βρέθηκε στατιστικά μειωμένη κατά τους 3 μήνες ($p<0,001$), 6 μήνες ($p<0,001$) και 9 μήνες ($p<0,001$) (**Γράφημα 2A**), ενώ για τους θηλυκούς μόνο κατά τους 3 μήνες ($p<0,05$) (**Γράφημα 2B**).

Κατανάλωση τροφής



Γράφημα 2: Κατανάλωση τροφής από αρσενικούς και θηλυκούς επίμυες στις 5 χρονικές περιόδους της ανάλυσης. Παρατηρείται ότι τόσο A) οι αρσενικοί AS BAC όσο και B) οι θηλυκοί AS BAC επίμυες καταναλώνουν στατιστικώς σημαντικά μειωμένα επίπεδα τροφής σε σχέση με τους αγρίου τύπου WT επίμυες. [Μέση τιμή $\pm$ τυπικό σφάλμα, * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$), *** ($p<0,001$): στατιστικές σημαντικές διαφορές μεταξύ WT και AS BAC επιμύων].

3. **Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου:** Οι AS BAC επίμυες εμφανίζουν υπερκινητικό φαινότυπο

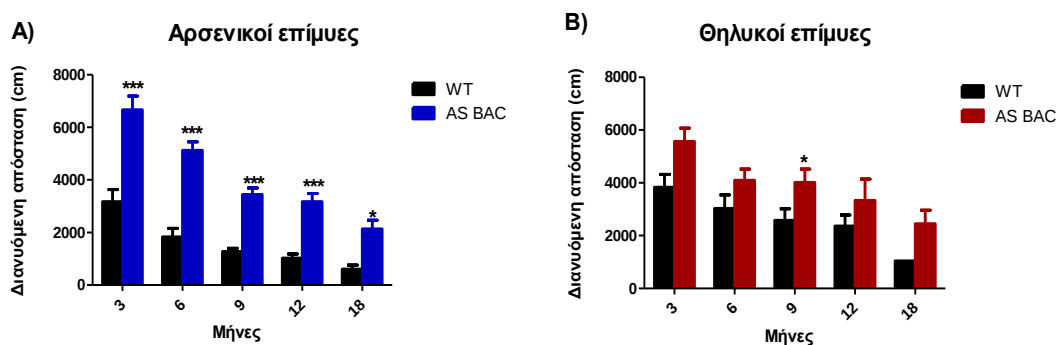
Κατά τη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου εξετάστηκαν σε 5 διαφορετικές χρονικές περιόδους (3, 6, 9, 12, 18 μήνες) οι εξής παράμετροι: η οριζόντια κινητικότητα στην οποία συγκαταλέγονται η συνολική διανυόμενη απόσταση και η διανυόμενη απόσταση ανά 15 λεπτά, η κάθετη κινητικότητα στην οποία συγκαταλέγονται ο συνολικός αριθμός των ανορθώσεων και η αλλαγή του αριθμού των ανορθώσεων ανά 15 λεπτά, η ταχύτητα και τέλος η αγχώδης συμπεριφορά μέσω του συνολικού χρόνου παραμονής στην κεντρική περιοχή του πεδίου καθώς και του χρόνου παραμονής στο κέντρο ανά 30 λεπτά.

Οριζόντια κινητικότητα

Σε ό, τι αφορά την οριζόντια κινητικότητα, η πρώτη παράμετρος που μελετήθηκε ήταν η συνολική διανυόμενη απόσταση για 60 λεπτά. Η επεξεργασία των δεδομένων ανέδειξε τη στατιστικώς σημαντική επίδραση του γονοτύπου στη συνολική διανυόμενη απόσταση και στις πέντε διαφορετικές χρονικές περιόδους της ανάλυσης (3 μήνες: $[F_{(1,41)}=25,15, p<0,001]$, 6 μήνες: $[F_{(1,40)}=30,95, p<0,001]$, 9 μήνες: $[F_{(1,39)}=26,21, p<0,001]$, 12 μήνες: $[F_{(1,34)}=10,06, p=0,0032]$, 18 μήνες: $[F_{(1,13)}=5,289, p=0,0387]$) (**Γράφημα 3A,B**). Πράγματι, οι διαγονιδιακοί AS BAC επίμυες εμφάνισαν γενικά αυξημένη οριζόντια κινητικότητα, σε σύγκριση με τους αντίστοιχους WT.

Πιο αναλυτικά, οι διαγονιδιακοί AS BAC αρσενικοί επίμυες εμφάνισαν αυξημένη οριζόντια κινητικότητα σε σχέση με τους αρσενικούς αγρίου τύπου WT επίμυες σε κάθε χρονική περίοδο ανάλυσης (3 μήνες: $p<0,001$, 6 μήνες: $p<0,001$, 9 μήνες: $p<0,001$, 12 μήνες: $p<0,001$, 18 μήνες: $p<0,05$) (**Γράφημα 3A**). Στην περίπτωση των θηλυκών επιμύων, η ανάλυση ανέδειξε στατιστικώς σημαντικά αυξημένη διανυόμενη απόσταση μόνο στους 9 μήνες ($p<0,05$) (**Γράφημα 3B**). Σε αυτή τη χρονική περίοδο, η ανάλυση ανέδειξε επιπλέον και την στατιστικά σημαντική επίδραση του φύλου στη συνολική διανυόμενη απόσταση $[F_{(1,39)}=7,043, p=0,0115]$.

Συνολική διανυόμενη απόσταση



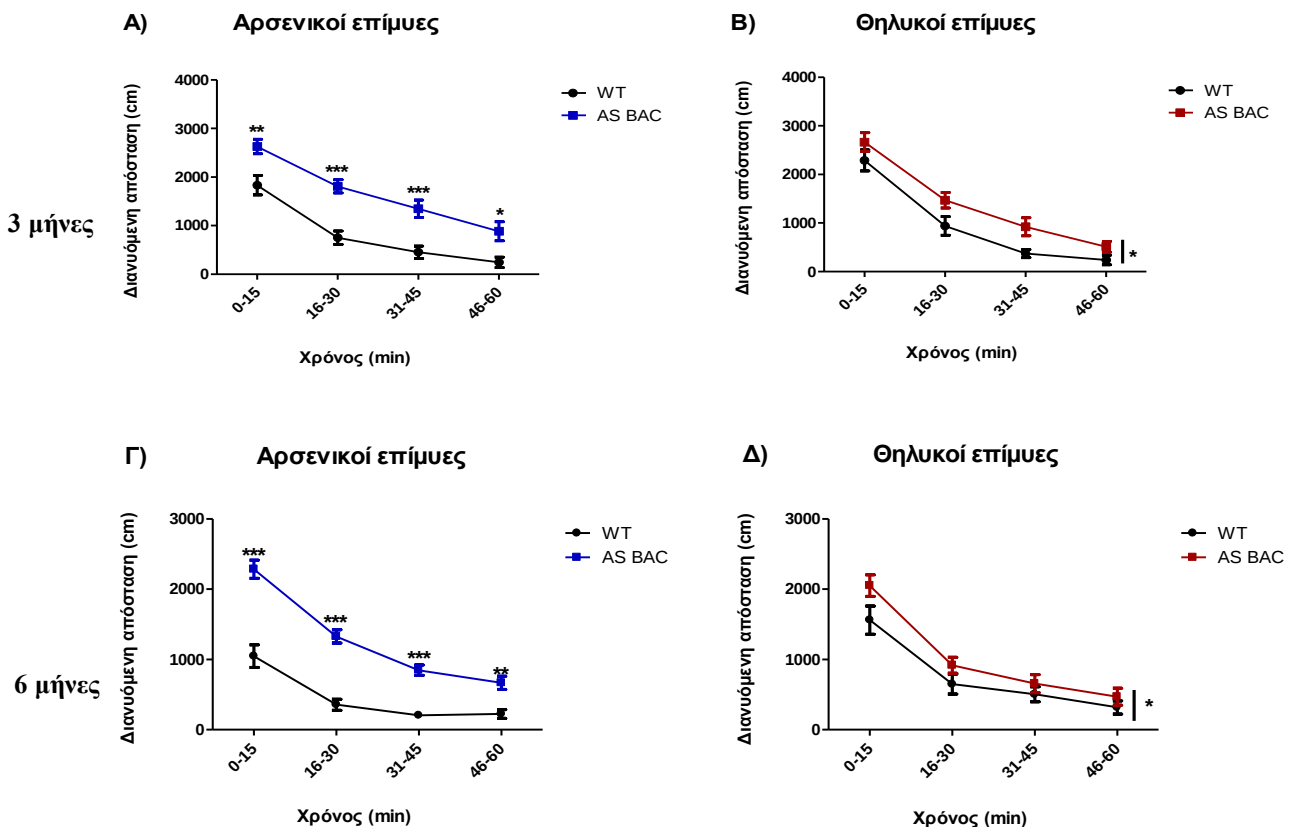
Γράφημα 3: Συνολική απόσταση που διανύθηκε στο χρονικό διάστημα των 60 λεπτών από τους αρσενικούς και θηλυκούς επίμυες στις 5 χρονικές περιόδους της ανάλυσης. Παρατηρείται ότι τόσο A) οι αρσενικοί AS BAC όσο και B) οι θηλυκοί AS BAC επίμυες εμφανίζουν στατιστικώς σημαντικά αυξημένη συνολική διανυόμενη απόσταση σε σχέση με τους αγρίου τύπου WT επίμυες. [Μέση τιμή $\pm$ τυπικό σφάλμα, * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$), *** ($p<0,001$): στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ WT και AS BAC επιμύων].

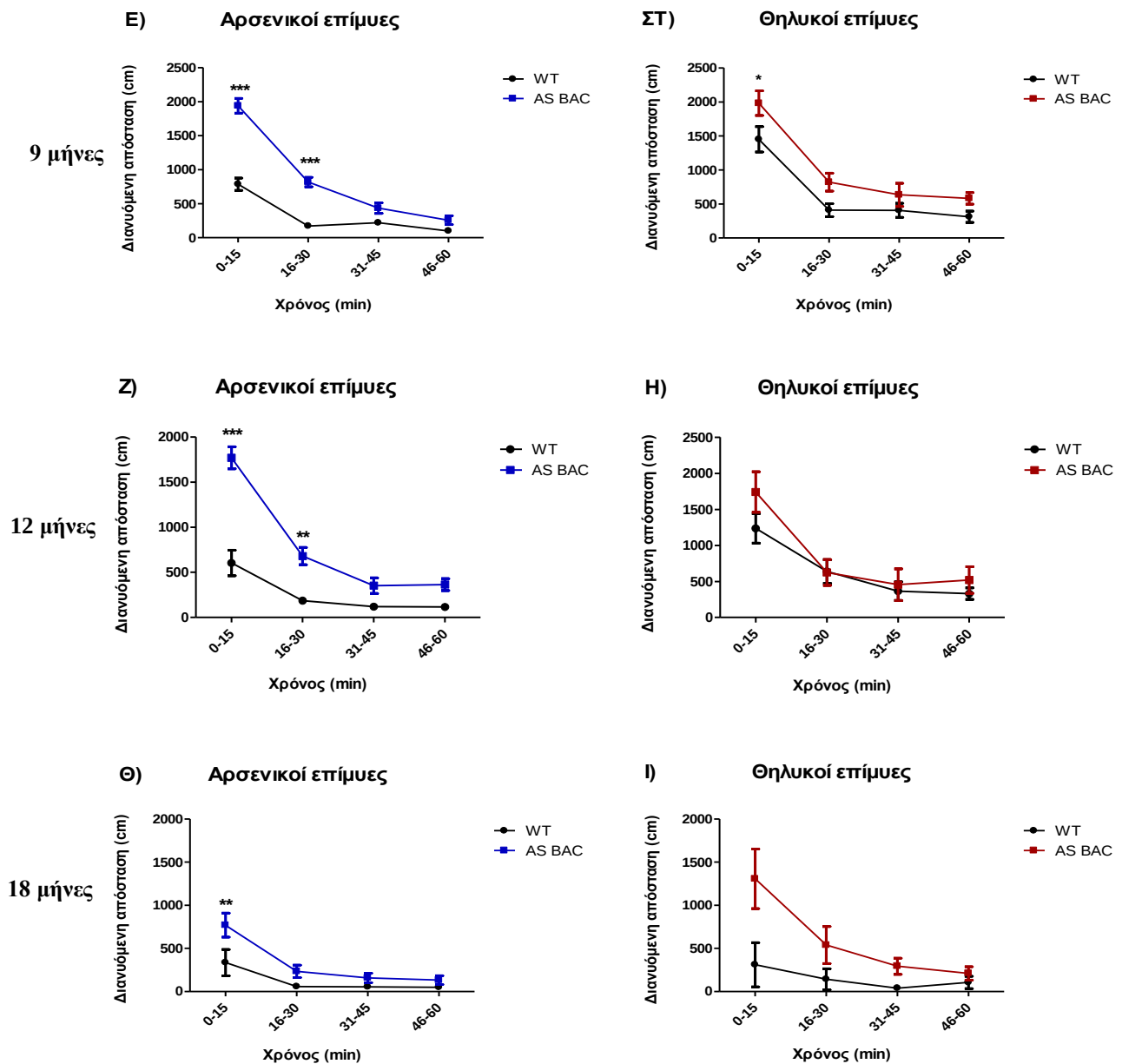
Μία ακόμα παράμετρος που μελετήθηκε για την περίπτωση της οριζόντιας κινητικότητας ήταν η διανυόμενη απόσταση ανά 15 λεπτά. Η στατιστική ανάλυση ανέδειξε την κύρια επίδραση του χρόνου και στις 5 χρονικές περιόδους της ανάλυσης με την διανυόμενη απόσταση να μειώνεται σε όλες τις περιπτώσεις με την πάροδο του χρόνου (3 μήνες:

[$F_{(3,123)}=197,522$, $p<0,001$], 6 μήνες: [$F_{(3,120)}=252,300$, $p<0,001$], 9 μήνες: [$F_{(3,117)}=191,372$, $p<0,001$], 12 μήνες: [$F_{(3,107)}=105,524$, $p<0,001$], 18 μήνες: [$F_{(3,39)}=41,255$, $p<0,001$]). Επιπλέον, η ανάλυση ανέδειξε και τη στατιστικά σημαντική επίδραση του γονοτύπου στις 4 περιόδους της ανάλυσης (3 μήνες: [$F_{(1,41)}=24,992$, $p<0,001$], 6 μήνες: [$F_{(1,40)}=30,977$, $p<0,001$], 9 μήνες: [$F_{(1,39)}=21,109$, $p<0,001$], 12 μήνες: [$F_{(1,34)}=13,883$, $p<0,001$]) με τους διαγονιδιακούς AS BAC επίμυες να εμφανίζουν γενικά αυξημένη διανυόμενη απόσταση ανά 15 λεπτά (**Γραφήματα 4Α-Ι**).

Πιο αναλυτικά, οι διαγονιδιακοί AS BAC αρσενικοί επίμυες εμφάνισαν αυξημένη επίπεδα και στις 5 χρονικές περιόδους της ανάλυσης (3 μήνες: $p<0,0001$, **Γράφημα 4Α**, 6 μήνες: $p<0,0001$, **Γράφημα 4Γ**, 9 μήνες: $p<0,0001$, **Γράφημα 4Ε**, 12 μήνες: $p<0,0001$, **Γράφημα 4Ζ**, 18 μήνες: $p=0,0264$, **Γράφημα 4Θ**). Στην περίπτωση των θηλυκών η παράμετρος ήταν αυξημένη μόνο στους 3, 6, 9 μήνες ($p=0,0251$, $p=0,0081$, $p=0,05$ αντίστοιχα) (3 μήνες: **Γράφημα 4Β**, 6 μήνες: **Γράφημα 4Δ**, 9 μήνες: **Γράφημα 4ΣΤ**).

Απόσταση που διανύθηκε στο χρόνο (ανά 15 λεπτά)





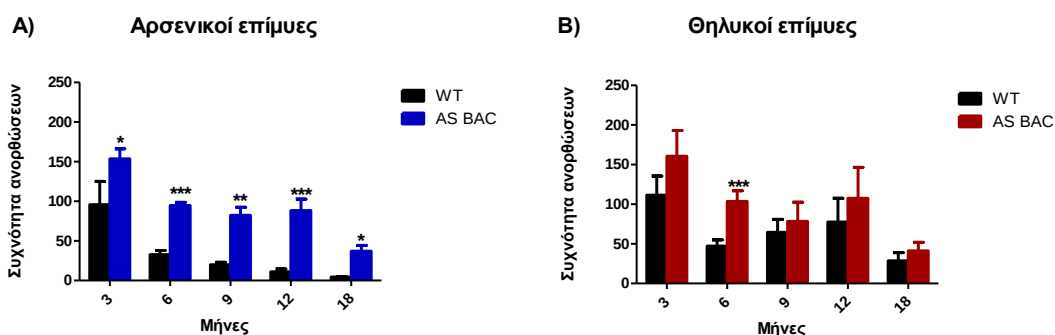
Διάγραμμα 4: Απόσταση που διανύθηκε στο χρόνο (ανά 15 λεπτά) από τους αρσενικούς και θηλυκούς επίμυες στις 5 χρονικές περιόδους της ανάλυσης. Παρατηρείται ότι τόσο οι αρσενικοί AS BAC (Α,Γ,Ε,Ζ,Θ), όσο και οι θηλυκοί AS BAC (Β,Δ,ΣΤ) εμφανίζουν στατιστικώς σημαντικά αυξημένη διανυόμενη απόσταση ανά 15 λεπτά σε σχέση με τους αγρίου τύπου WT επίμυες. Παρατηρείται επίσης και η κύρια επίδραση του χρόνου με την οριζόντια κινητικότητα να μειώνεται με τη πάροδο του χρόνου σε όλες τις περιπτώσεις (Α-Ι). [Μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα, * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$), *** ($p<0,001$): στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ WT και AS BAC επιμύων].

Κάθετη κινητικότητα

Σε ό, τι αφορά την κάθετη κινητικότητα, η πρώτη παράμετρος που μελετήθηκε ήταν ο συνολικός αριθμός των ανορθώσεων για 60 λεπτά. Η επεξεργασία των δεδομένων ανέδειξε τη στατιστικώς σημαντική επίδραση του γονοτύπου στο συνολικό αριθμό των ανορθώσεων και στις πέντε διαφορετικές χρονικές περιόδους της ανάλυσης (3 μήνες: $[F_{(1,40)}=4,480, p=0,0406]$, 6 μήνες: $[F_{(1,39)}=49,83, p<0,001]$, 9 μήνες: $[F_{(1,35)}=8,376, p=0,0065]$, 12 μήνες: $[F_{(1,32)}=5,200, p=0,0294]$, 18 μήνες: $[F_{(1,20)}=4,907, p=0,0385]$). Συγκεκριμένα, οι διαγονιδιακοί BAC επίμυες, εμφάνισαν αυξημένο αριθμό ανορθώσεων σε σχέση με τους αντίστοιχους επίμυες αγρίου τύπου (**Γραφήματα 5A,B**).

Πιο αναλυτικά, οι διαγονιδιακοί AS BAC αρσενικοί επίμυες εμφάνισαν αυξημένη κάθετη κινητικότητα σε σχέση με τους αρσενικούς WT επίμυες σε κάθε χρονική περίοδο ανάλυσης (3 μήνες: $p<0,05$, 6 μήνες: $p<0,001$, 9 μήνες: $p<0,01$, 12 μήνες: $p<0,05$, 18 μήνες: $p<0,05$) (**Γράφημα 5A**). Στην περίπτωση των θηλυκών επιμύων, η ανάλυση ανέδειξε στατιστικώς σημαντικά αυξημένη διανυόμενη απόσταση μόνο στους 3 μήνες ($p<0,05$) και στους 6 μήνες ($p<0,001$) (**Γράφημα 5B**).

Συνολικός αριθμός ανορθώσεων



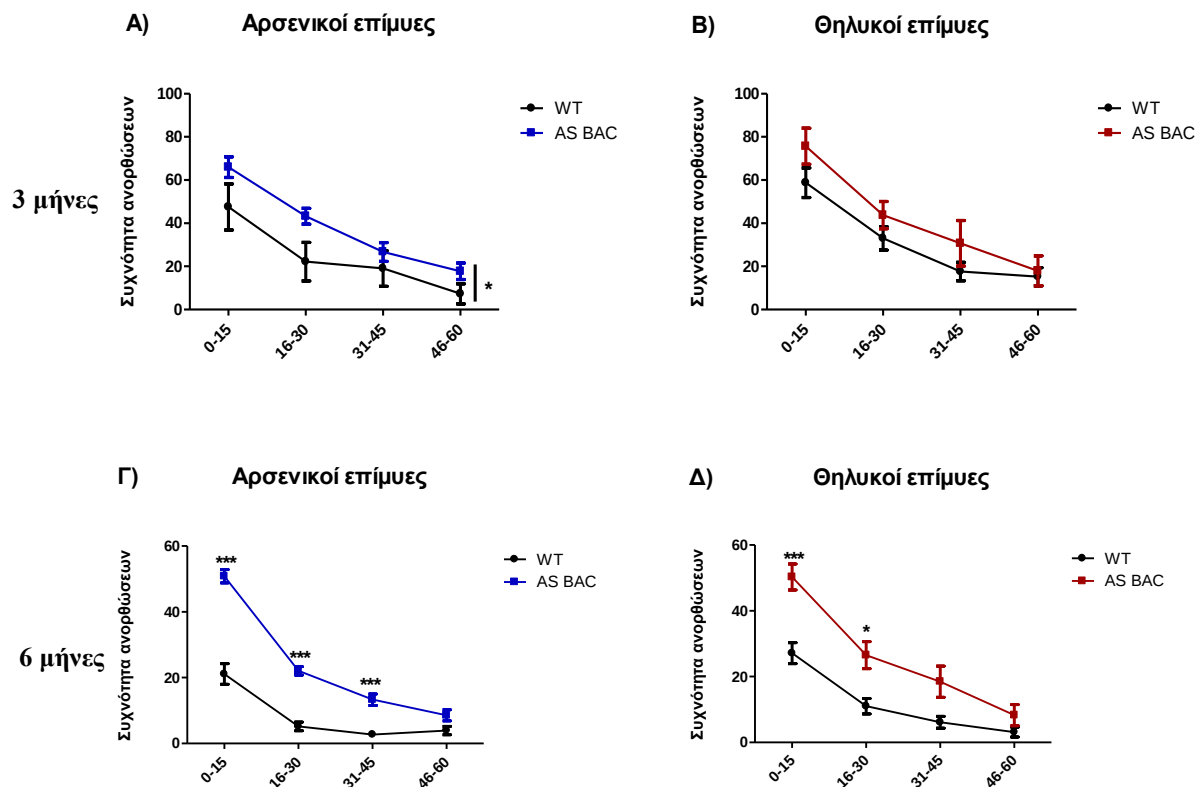
Γράφημα 5: Συνολικός αριθμός ανορθώσεων στο χρονικό διάστημα των 60 λεπτών από τους αρσενικούς και θηλυκούς επίμυες στις 5 χρονικές περιόδους της ανάλυσης. Παρατηρείται ότι τόσο A) οι αρσενικοί AS BAC όσο και B) οι θηλυκοί AS BAC επίμυες εμφανίζουν στατιστικώς σημαντικά αυξημένο αριθμό ανορθώσεων σε σχέση με τους αγρίου τύπου WT επίμυες. [Μέση τιμή $\pm$ τυπικό σφάλμα, * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$), *** ($p<0,001$): στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ WT και AS BAC επιμύων].

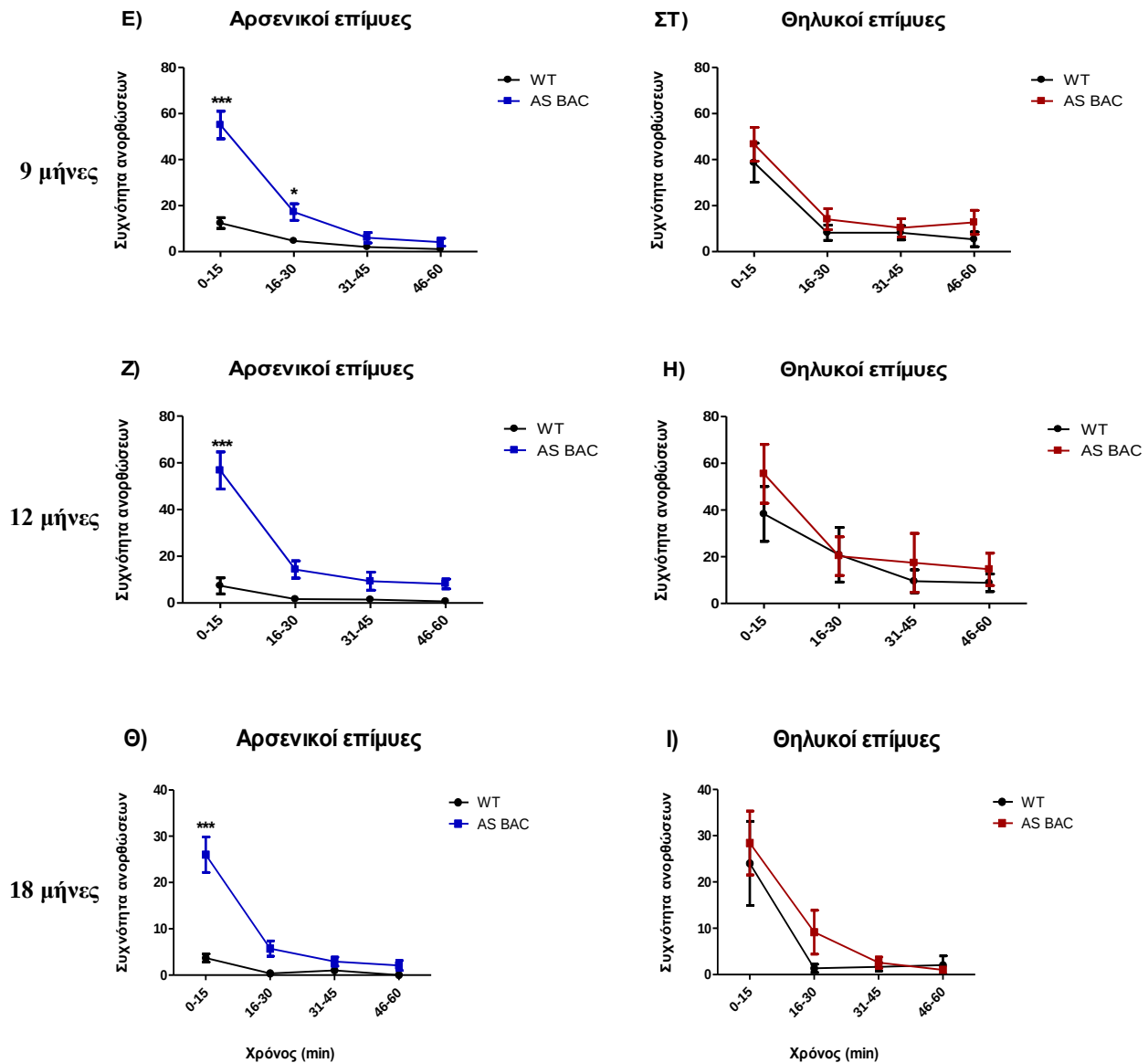
Μία ακόμα παράμετρος που μελετήθηκε για την περίπτωση της κάθετης κινητικότητας ήταν ο αριθμός των ανορθώσεων ανά 15 λεπτά. Η στατιστική ανάλυση ανέδειξε την κύρια επίδραση του χρόνου και στις 5 χρονικές περιόδους της ανάλυσης με τη συχνότητα των ανορθώσεων να μειώνεται σε όλες τις περιπτώσεις με την πάροδο του χρόνου (3 μήνες:

[$F_{(3,120)}=114,190$, $p<0,001$], 6 μήνες: [$F_{(3,117)}=207,422$, $p<0,001$], 9 μήνες: [$F_{(3,105)}=113,796$, $p<0,001$], 12 μήνες: [$F_{(3,96)}=53,718$, $p<0,001$], 18 μήνες: [$F_{(3,45)}=18,978$, $p<0,001$]).

Επιπλέον, η ανάλυση ανέδειξε και τη στατιστικά σημαντική επίδραση του γονοτύπου στις 4 από τις 5 περιόδους της ανάλυσης κατά τις οποίες οι διαγονιδιακοί AS BAC επίμυες εμφάνισαν αυξημένο αριθμό ανορθώσεων σε σχέση με τους αγρίου τύπου (3 μήνες: [$F_{(1,40)}=5,345$, $p<0,001$], 6 μήνες: [$F_{(1,39)}=49,735$, $p<0,001$], 9 μήνες: [$F_{(1,35)}=10,411$, $p=0,003$], 12 μήνες: [$F_{(1,32)}=5,262$, $p=0,029$], 18 μήνες: [$F_{(1,25)}=4,9652$, $p=0,031$]) (**Γραφήματα 6Α-Θ**). Πιο αναλυτικά, οι διαγονιδιακοί AS BAC αρσενικοί επίμυες εμφάνισαν αυξημένο αριθμό ανορθώσεων ανά 15 λεπτά και στις 5 χρονικές περιόδους της ανάλυσης (3 μήνες: $p<0,05$, 6 μήνες: $p<0,001$, 9 μήνες: $p<0,001$, 12 μήνες: $p=0,0003$, 18 μήνες: $p<0,001$) (3 μήνες: **Γράφημα 6Α**, 6 μήνες: **Γράφημα 6Γ**, 9 μήνες: **Γράφημα 6Ε**, 12 μήνες: **Γράφημα 6Ζ**, 18 μήνες: **Γράφημα 6Θ**). Στην περίπτωση των θηλυκών AS BAC, η παράμετρος αυτή ήταν αυξημένη μόνο στους 6 μήνες ($p=0,0045$) (**Γράφημα 6Δ**).

Συνολικός αριθμός ανορθώσεων στο χρόνο



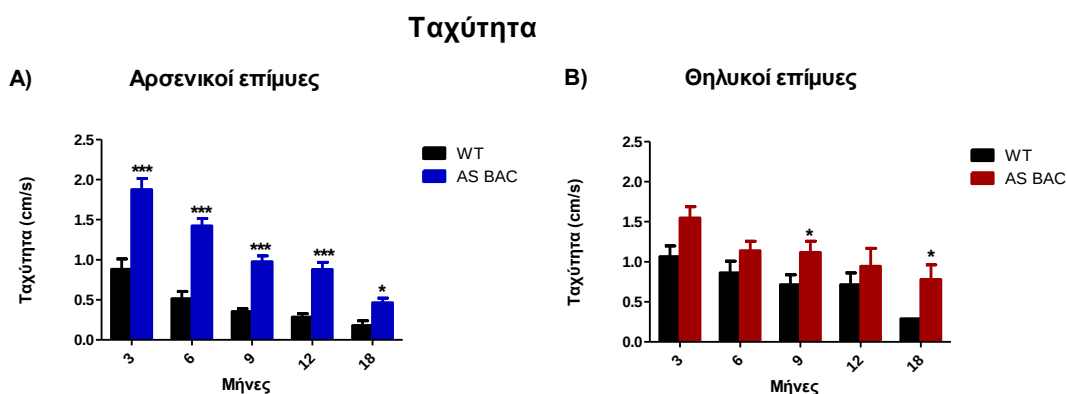


Διάγραμμα 6: Αριθμός ανορθώσεων στο χρόνο (ανά 15 λεπτά) από τους αρσενικούς και θηλυκούς επίμυες στις 5 χρονικές περιόδους της ανάλυσης. Παρατηρείται ότι τόσο (Α,Γ,Ε,Ζ,Θ) οι αρσενικοί AS BAC, όσο και οι θηλυκοί AS BAC (Δ) εμφανίζουν στατιστικά σημαντικά αυξημένο αριθμό ανορθώσεων ανά 15 λεπτά σε σχέση με τους αγρίου τύπου WT επίμυες. Παρατηρείται επίσης και η κύρια επίδραση του χρόνου με την κάθετη κινητικότητα να μειώνεται με τη πάροδο του χρόνου σε όλες τις περιπτώσεις (Α-Θ). [Μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα, * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$): στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ WT και AS BAC επιμύων].

Ταχύτητα

Μία ακόμα παράμετρος που εξετάστηκε κατά τη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου ήταν η ταχύτητα. Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων αποκάλυψε την κύρια επίδραση του γονοτύπου και στις πέντε χρονικές περιόδους της ανάλυσης, με τους διαγονιδιακούς AS BAC επίμυες να εμφανίζουν αυξημένη ταχύτητα σε σχέση με τους αγρίου τύπου WT (3 μήνες: [$F_{(1,42)}=28,37$, $p < 0,001$], 6 μήνες: [$F_{(1,40)}=29,30$, $p < 0,001$], 9 μήνες: [$F_{(1,39)}=26,93$, $p < 0,001$], 12 μήνες: [$F_{(1,34)}=10,49$, $p = 0,0027$], 18 μήνες: [$F_{(1,13)}=5,292$, $p = 0,0386$]) (Γράφημα 7Α,Β).

Πιο αναλυτικά, οι διαγονιδιακοί AS BAC αρσενικοί επίμυες παρουσίασαν αυξημένη ταχύτητα και στις 5 χρονικές περιόδους της ανάλυσης (3 μήνες: $p<0,001$, 6 μήνες: $p<0,001$, 9 μήνες: $p<0,001$, 12 μήνες: $p<0,001$, 18 μήνες: $p<0,05$) (**Γράφημα 7A**). Οι θηλυκοί διαγονιδιακοί επίμυες εμφάνισαν αυξημένη ταχύτητα μόνο στους 9 ($p<0,05$) και 18 μήνες ($p<0,05$) (**Γράφημα 7B**). Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι στους 9 μήνες η επεξεργασία των δεδομένων αποκάλυψε τη στατιστικά σημαντική επίδραση του φύλου, με τους θηλυκούς επίμυες να εμφανίζουν γενικά υψηλότερες τιμές ταχύτητας σε σχέση με τους αρσενικούς [$F_{(1,39)}=6,445$, $p=0,0152$].



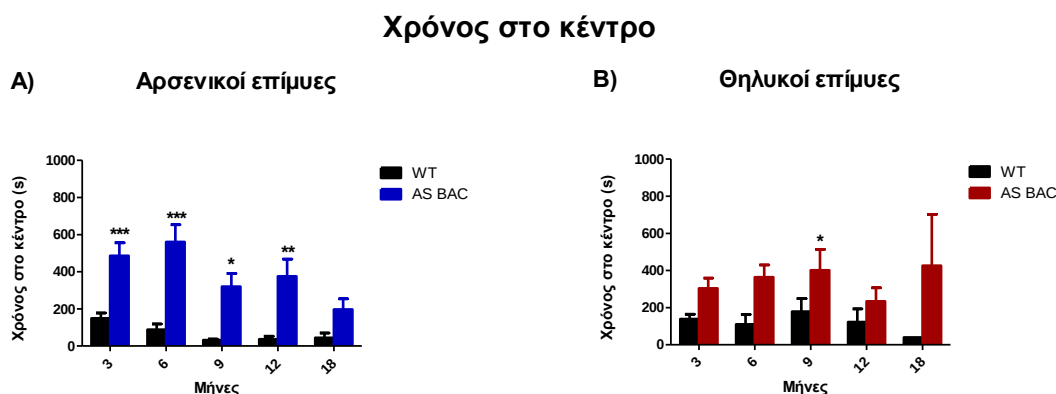
Γράφημα 7: Ταχύτητα στο χρονικό διάστημα των 60 λεπτών από τους αρσενικούς και θηλυκούς επίμυες στις 5 χρονικές περιόδους της ανάλυσης. Παρατηρείται ότι τόσο A) οι αρσενικοί AS BAC όσο και B) οι θηλυκοί AS BAC επίμυες εμφανίζουν στατιστικά σημαντικά αυξημένη ταχύτητα σε σχέση με τους αγρίου τύπου WT επίμυες. [Μέση τιμή $\pm$ τυπικό σφάλμα, * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$), *** ($p<0,001$): στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ WT και AS BAC επιμύων].

Χρόνος στο κέντρο

Η τελευταία παράμετρος που μελετήθηκε κατά τη δοκιμασία του ανοιχτού πεδίου ήταν τόσο ο συνολικός χρόνος που δαπανήθηκε στο κέντρο στη διάρκεια των 60 λεπτών, καθώς και ο χρόνος αυτός ανά 30 λεπτά.

Η ανάλυση των δεδομένων που αφορούν το συνολικό χρόνο παραμονής στο κέντρο ανέδειξε την κύρια επίδραση του γονοτύπου στις 4 από τις 5 χρονικές περιόδους της ανάλυσης με τους διαγονιδιακούς AS BAC επίμυες να εμφανίζουν γενικά αυξημένο χρόνο παραμονής στο κεντρικό πεδίο σε σχέση με τους αγρίου τύπου WT επίμυες (3 μήνες: [$F_{(1,42)}=23,31$, $p<0,001$], 6 μήνες: [$F_{(1,40)}=13,72$, $p=0,0006$, 9 μήνες: [$F_{(1,39)}=10,83$, $p=0,0021$], 12 μήνες: [$F_{(1,34)}=8,30$, $p=0,0068$] (**Γράφημα 8A,B**). Πιο αναλυτικά, οι διαγονιδιακοί AS BAC αρσενικοί επίμυες εμφάνισαν αυξημένο χρόνο παραμονής στην κεντρική περιοχή σε αυτές τις 4 χρονικές περιόδους (3 μήνες: $p<0,001$, 6 μήνες: $p<0,001$, 9 μήνες: $p<0,05$, 12 μήνες: $p<0,01$) (**Γράφημα 8A**). Σε ό, τι αφορά τους θηλυκούς AS BAC επίμυες, η ανάλυση

ανέδειξε την κύρια επίδραση του γονοτύπου μόνο στους 9 μήνες ($p<0,05$) (Γράφημα 8B).



Γράφημα 8: Συνολικός χρόνος που δαπανήθηκε στην κεντρική περιοχή στο χρονικό διάστημα των 60 λεπτών από τους αρσενικούς και θηλυκούς επίμυες στις 5 χρονικές περιόδους της ανάλυσης. Παρατηρείται ότι τόσο A) οι αρσενικοί AS BAC όσο και B) οι θηλυκοί AS BAC επίμυες εμφανίζουν στατιστικώς σημαντικά αυξημένο χρόνο στο κέντρο σε σχέση με τους αγρίου τύπου WT επίμυες. [Μέση τιμή $\pm$ τυπικό σφάλμα, * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$), *** ($p<0,001$): στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ WT και AS BAC επιμύων].

4. Υπερυψωμένος σταυροειδής λαβύρινθος: Οι AS BAC επίμυες εμφανίζουν μειωμένη αγκώδη συμπεριφορά

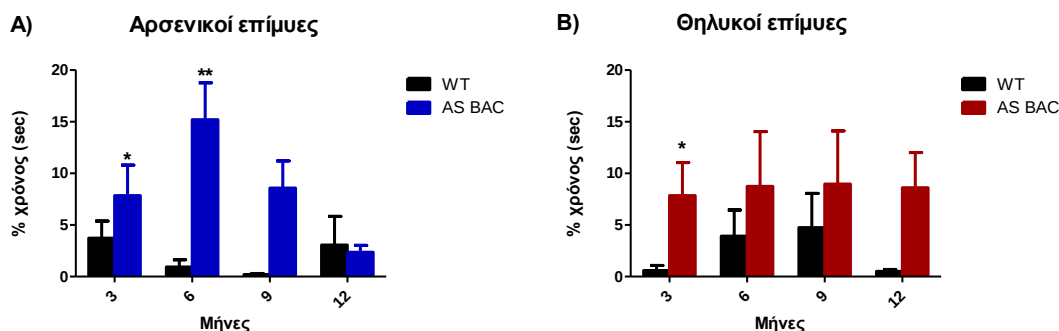
Κατά τη δοκιμασία του υπερυψωμένου λαβυρίνθου, εξετάστηκαν σε 4 διαφορετικές χρονικές περιόδους (3, 6, 9, 12 μήνες) οι εξής παράμετροι: ο συνολικός χρόνος παραμονής στους βραχίονες και το ποσοστό χρόνου στους ανοιχτούς βραχίονες, ο συνολικός αριθμός εισόδων στους βραχίονες καθώς και το ποσοστό εισόδων στους ανοιχτούς βραχίονες, ο αριθμός των τεντωμάτων κεφαλής, καθώς και η συνολική διανυόμενη απόσταση.

Ποσοστό χρόνου παραμονής στους ανοιχτούς βραχίονες

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων που αφορούν το ποσοστό παραμονής στους ανοιχτούς βραχίονες, ανέδειξε την κύρια επίδραση του γονοτύπου σε δύο χρονικές περιόδους της ανάλυσης (3 μήνες: [$F_{(1,40)}= 4,774$, $p=0,0348$], 6 μήνες: [$F_{(1,40)}=7,079$, $p=0,0112$]). Σε αυτούς τους μήνες οι διαγονιδιακοί AS BAC επίμυες εμφάνισαν αυξημένο ποσοστό χρόνου παραμονής στους ανοιχτούς βραχίονες (Γράφημα 9A,B).

Πιο αναλυτικά, οι αρσενικοί AS BAC επίμυες, κατά τους μήνες αυτούς δαπάνησαν στατιστικώς σημαντικά περισσότερο χρόνο στους ανοιχτούς βραχίονες (3 μήνες: $p<0,05$, 6 μήνες: $p<0,01$) (Γράφημα 9A). Όσον αφορά τους θηλυκούς AS BAC επίμυες, το αποτέλεσμα αυτό ήταν στατιστικά σημαντικό μόνο κατά τους 3 μήνες ($p<0,05$) (Γράφημα 9B).

% Χρόνος στους ανοιχτούς βραχίονες

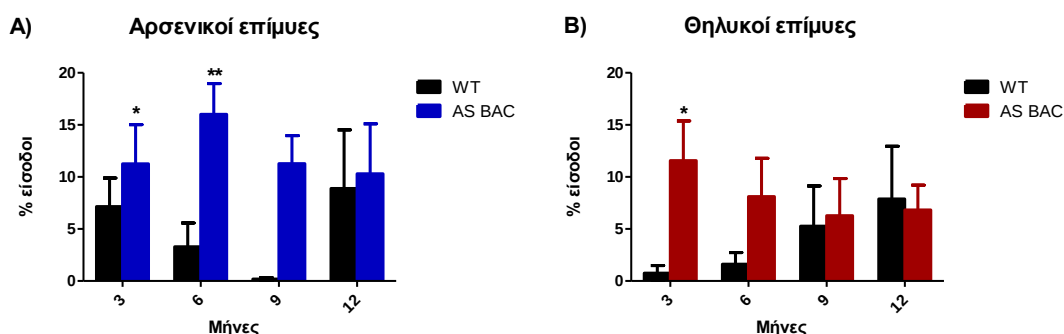


Γράφημα 9: % χρονικό διάστημα που δαπανήθηκε στους ανοιχτούς βραχίονες στο χρονικό διάστημα των 5 λεπτών από τους αρσενικούς και θηλυκούς επίμυες στις 5 χρονικές περιόδους της ανάλυσης. Παρατηρείται ότι τόσο A) οι αρσενικοί AS BAC όσο και B) οι θηλυκοί AS BAC επίμυες εμφανίζουν στατιστικώς σημαντικά αυξημένο χρόνο στους ανοιχτούς βραχίονες σε σχέση με τους αγρίου τύπου WT επίμυες. [Μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα, * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$), *** ($p<0,001$): στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ WT και AS BAC επιμύων].

Ποσοστό αριθμού εισόδων στους ανοιχτούς βραχίονες

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων που αφορούν το ποσοστό αριθμού εισόδων στους ανοιχτούς βραχίονες, ανέδειξε την κύρια επίδραση του γονοτύπου σε δύο χρονικές περιόδους της ανάλυσης (3 μήνες: [$F_{(1,40)}=4,930$, $p=0,0321$], 6 μήνες: [$F_{(1,40)}=10,78$, $p=0,0021$]). Σε αυτούς τους μήνες οι διαγονιδιακοί AS BAC επίμυες εμφάνισαν αυξημένο αριθμό εισόδων στους ανοιχτούς βραχίονες (**Γράφημα 10A,B**). Πιο αναλυτικά, οι αρσενικοί AS BAC επίμυες, κατά τους μήνες αυτούς πραγματοποίησαν στατιστικώς σημαντικά περισσότερες εισόδους στους ανοιχτούς βραχίονες (3 μήνες: $p<0,05$, 6 μήνες: $p<0,01$) (**Γράφημα 10A**). Όσον αφορά τους θηλυκούς AS BAC επίμυες, το αποτέλεσμα αυτό ήταν στατιστικά σημαντικό μόνο κατά τους 3 μήνες ($p<0,05$) (**Γράφημα 10B**).

% Είσοδοι στους ανοιχτούς βραχίονες

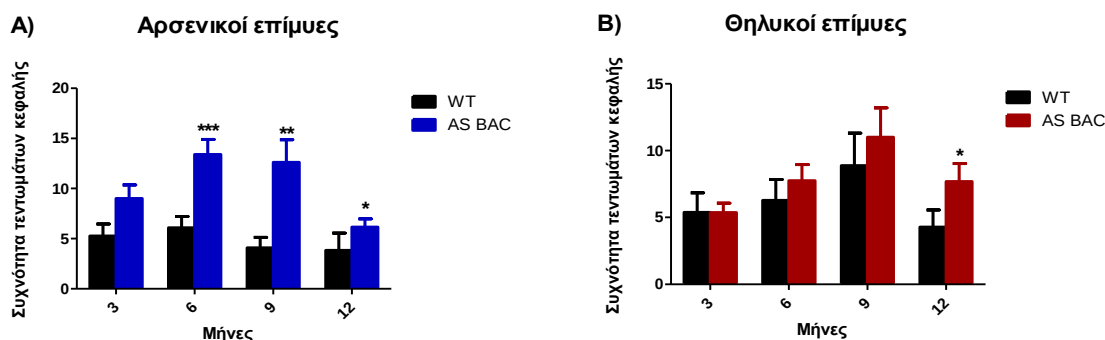


Γράφημα 10: % είσοδοι που πραγματοποιήθηκαν προς τους ανοιχτούς βραχίονες στο χρονικό διάστημα των 5 λεπτών από τους αρσενικούς και θηλυκούς επίμυες στις 5 χρονικές περιόδους της ανάλυσης. Παρατηρείται ότι τόσο A) οι αρσενικοί AS BAC όσο και B) οι θηλυκοί AS BAC επίμυες εμφανίζουν αυξημένες εισόδους στους ανοιχτούς βραχίονες σε σχέση με τους αγρίου τύπου WT επίμυες. [Μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα, * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$), *** ($p<0,001$): στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ WT και AS BAC επιμύων].

Συνολικός αριθμός τεντωμάτων κεφαλής

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων που αφορούν το συνολικό αριθμό τεντωμάτων κεφαλής, ανέδειξε την κύρια επίδραση του γονοτύπου από τους 6 μήνες και μετά (6 μήνες: $[F_{(1,40)}=9,703, p=0,0034]$, 9 μήνες: $[F_{(1,39)}=6,516, p=0,0147]$, 12 μήνες: $[F_{(1,37)}=4,480, p=0,0411]$). Σε αυτούς τους μήνες, οι διαγονιδιακοί AS BAC επίμυες πραγματοποίησαν στατιστικώς σημαντικά αυξημένο αριθμό τεντωμάτων κεφαλής (**Γράφημα 11A,B**). Πιο αναλυτικά, οι διαγονιδιακοί AS BAC αρσενικοί επίμυες εμφάνισαν αυξημένο συνολικό αριθμό σε σχέση με τους αρσενικούς αγρίου τύπου WT επίμυες στους 6 μήνες ($p<0,001$), στους 9 ($p<0,01$) και στους 12 μήνες ($p<0,05$) (**Γράφημα 11A**). Στην περίπτωση των θηλυκών επιμύων, αναδείχθηκε στατιστικά σημαντικό μόνο στους 12 μήνες η αύξηση των αριθμών τεντώματος κεφαλής ($p<0,05$) (**Γράφημα 11B**).

Συχνότητα τεντωμάτων κεφαλής

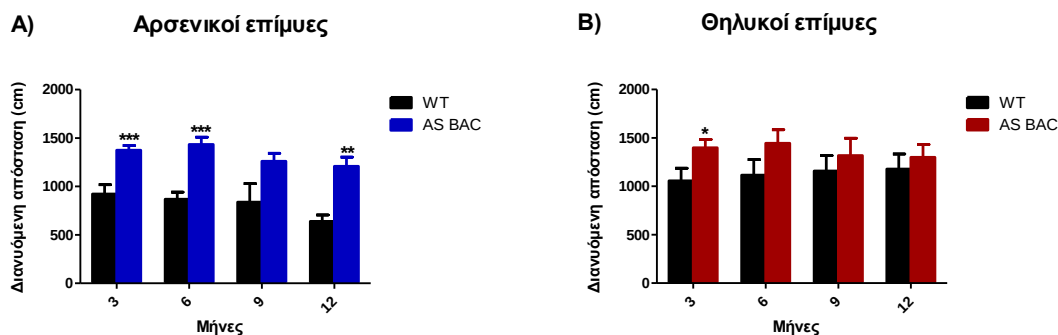


Γράφημα 11: Συνολικός αριθμός τεντωμάτων κεφαλής στο χρονικό διάστημα των 5 λεπτών από τους αρσενικούς και θηλυκούς επίμυες στους 3, 6, 9 και 12 μήνες. Παρατηρείται ότι τόσο A) οι αρσενικοί AS BAC όσο και B) οι θηλυκοί AS BAC επίμυες εμφανίζουν αυξημένη συχνότητα τεντώματος κεφαλής σε σχέση με τους αγρίου τύπου WT επίμυες. [Μέση τιμή $\pm$ τυπικό σφάλμα, * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$), *** ($p<0,001$): στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ WT και AS BAC επιμύων].

Συνολική διανυόμενη απόσταση

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων που αφορούν τη συνολική απόσταση που διανύθηκε στο χρονικό διάστημα των 5 λεπτών, ανέδειξε την κύρια επίδραση του γονοτύπου σε τρεις χρονικές περιόδους της ανάλυσης (3 μήνες: $[F_{(1,40)}=20,53, p<0,001]$, 6 μήνες: $[F_{(1,40)}=16,46, p=0,0002]$, 12 μήνες: $[F_{(127)}=7,432, p=0,0111]$). Σε αυτούς τους μήνες οι διαγονιδιακοί AS BAC επίμυες διήνυσαν μεγαλύτερη απόσταση σε σχέση με τους επίμυες αγρίου τύπου. (**Γράφημα 12A,B**). Πιο αναλυτικά, για τους αρσενικούς AS BAC επίμυες το αποτέλεσμα αυτό βρέθηκε στατιστικά σημαντικό και στις τρεις περιόδους της ανάλυσης (3 μήνες: $p<0,001$, 6 μήνες: $p<0,001$, 12 μήνες: $p<0,01$) (**Γράφημα 12A**), ενώ για τους θηλυκούς μόνο κατά τους 3 μήνες ($p<0,05$) (**Γράφημα 12B**).

Συνολική διανυόμενη απόσταση



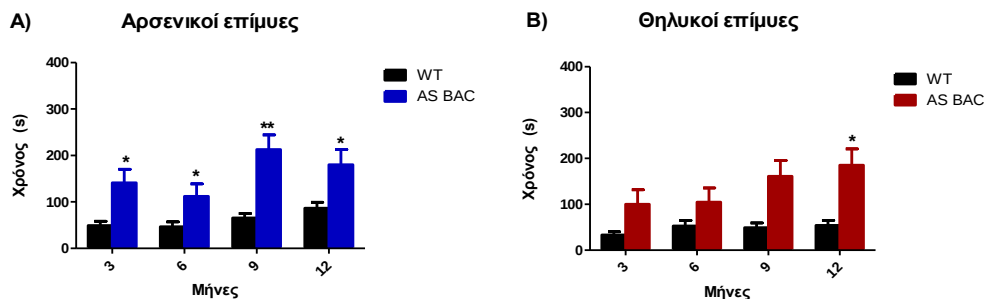
Γράφημα 12: Συνολική διανυόμενη απόσταση στο χρονικό διάστημα των 5 λεπτών από τους αρσενικούς και θηλυκούς επίμυες στους 3, 6, 9 και 12 μήνες. Παρατηρείται ότι τόσο A) οι αρσενικοί AS BAC όσο και B) οι θηλυκοί AS BAC επίμυες εμφανίζουν αυξημένη συχνότητα τεντώματος κεφαλής σε σχέση με τους αγρίου τύπου WT επίμυες. [Μέση τιμή $\pm$ τυπικό σφάλμα, * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$), *** ($p<0,001$): στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ WT και AS BAC επιμόνων].

5. Δοκιμασία θαμμένης πελέτας: Οι AS BAC επίμυες εμφανίζουν μειωμένη οσφρητική ικανότητα

Κατά τη δοκιμασία της θαμμένης πελέτας η παράμετρος η οποία μελετήθηκε σε 4 χρονικές περιόδους ανάλυσης (3, 6, 9, 12 μήνες) ήταν ο λανθάνων χρόνος, δηλαδή ο χρόνος που δαπανήθηκε μέχρι την εύρεση του θαμμένου δημητριακού. Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων που αφορούν τη συγκεκριμένη παράμετρο, ανέδειξε την κύρια επίδραση του γονοτύπου στους 3, 6, 9 και 12 μήνες (3 μήνες: [$F_{(1,38)}=9,684$, $p=0,0035$], 6 μήνες: [$F_{(1,34)}=5,606$, $p=0,0237$], 9 μήνες: [$F_{(1,33)}=16,94$, $p=0,0002$], 12 μήνες: [$F_{(1,39)}=11,45$, $p=0,0021$]).

Πράγματι, οι διαγονιδιακοί AS BAC επίμυες χρειάστηκαν περισσότερο χρόνο να ανακαλύψουν το θαμμένο δημητριακό, σε σχέση με τους αγρίου τύπου WT επίμυες (**Γράφημα 13A,B**). Πιο αναλυτικά, οι αρσενικοί AS BAC επίμυες εμφάνισαν στατιστικώς σημαντικά αυξημένο λανθάνοντα χρόνο σε αυτές τις χρονικές περιόδους (3 μήνες: $p<0,05$, 6 μήνες: $p<0,05$, 9 μήνες: $p<0,01$, 12 μήνες: $p<0,05$) (**Γράφημα 13A**). Για τους θηλυκούς AS BAC επίμυες, αναδείχθηκε στατιστικά σημαντικό μόνο κατά τους 12 μήνες ($p<0,05$) (**Γράφημα 13B**).

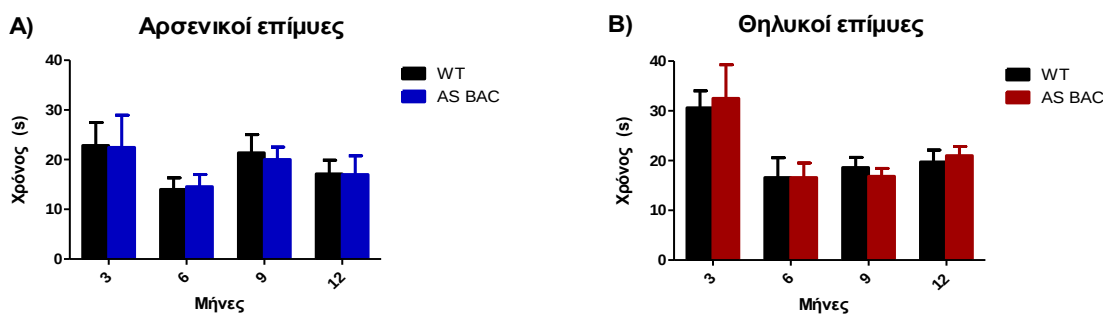
Λανθάνων χρόνος εύρεσης πελέτας



Γράφημα 13: Συνολικός χρόνος εύρεσης θαμμένης πελέτας από τους αρσενικούς και θηλυκούς επίμυες στις 4 χρονικές περιόδους της ανάλυσης. Παρατηρείται ότι τόσο A) οι αρσενικοί AS BAC όσο και B) οι θηλυκοί AS BAC επίμυες εμφανίζουν αυξημένο λανθάνων χρόνο (μέχρι την εύρεση της πελέτας) σε σχέση με τους αγρίου τύπου WT επίμυες. [Μέση τιμή $\pm$ τυπικό σφάλμα, * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$): στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ WT και AS BAC επιμύων].

Για να επιβεβαιώσουμε ότι ο παρατηρούμενος φαινότυπος οφείλεται όντως κάποια δυσλειτουργία στα αντίστοιχα δίκτυα του εγκεφάλου και όχι σε εξωτερικούς παράγοντες όπως είναι για παράδειγμα η έλλειψη κινήτρου, πραγματοποιήσαμε και τη δοκιμασία ελέγχου. Όπως ήταν αναμενόμενο δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά ανάμεσα στους δύο γονοτύπους. Πιο αναλυτικά, η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων που αφορούν τη δοκιμασία ελέγχου, έδειξε ότι τόσο οι διαγονιδιακοί όσο και οι αγρίου τύπου επίμυες χρειάστηκαν τον ίδιο χρόνο για να πάρουν το σοκολατένιο δημητριακό από την επιφάνεια της στρωμνής και να το φάνε (Γράφημα 14A,B).

Λανθάνων χρόνος

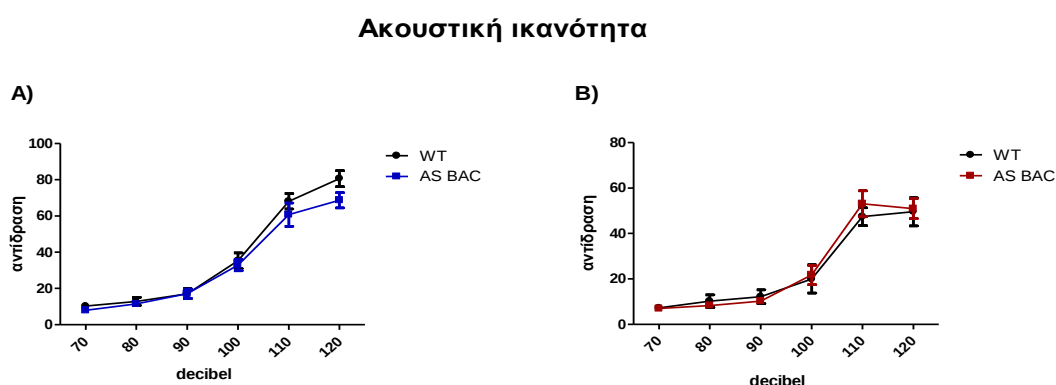


Γράφημα 14: Απαιτούμενος χρόνος μέχρι να πάρουν οι επίμυες (αρσενικοί και θηλυκοί) την ορατή πελέτα από την επιφάνεια της στρωμνής στις 4 χρονικές περιόδους της ανάλυσης. Παρατηρείται ότι τόσο οι διαγονιδιακοί AS BAC όσο και αγρίου τύπου επίμυες εμφανίζουν παραπλήσιο λανθάνοντα χρόνο. [Μέση τιμή $\pm$ τυπικό σφάλμα, * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$): στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ WT και AS BAC επιμύων].

6. Δοκιμασία προπαλμικής αναστολής: Οι AS BAC επίμνες εμφανίζουν μειωμένη αισθητικοκινητική δραστηριότητα

Κατά τη δοκιμασία της προπαλμικής αναστολής, η παράμετρος η οποία αναλύθηκε σε 4 διαφορετικές χρονικές περιόδους (3, 6, 9, 12 μήνες) ήταν η ακουστική ικανότητα καθώς και η επί τις εκατό προπαλμική αναστολή.

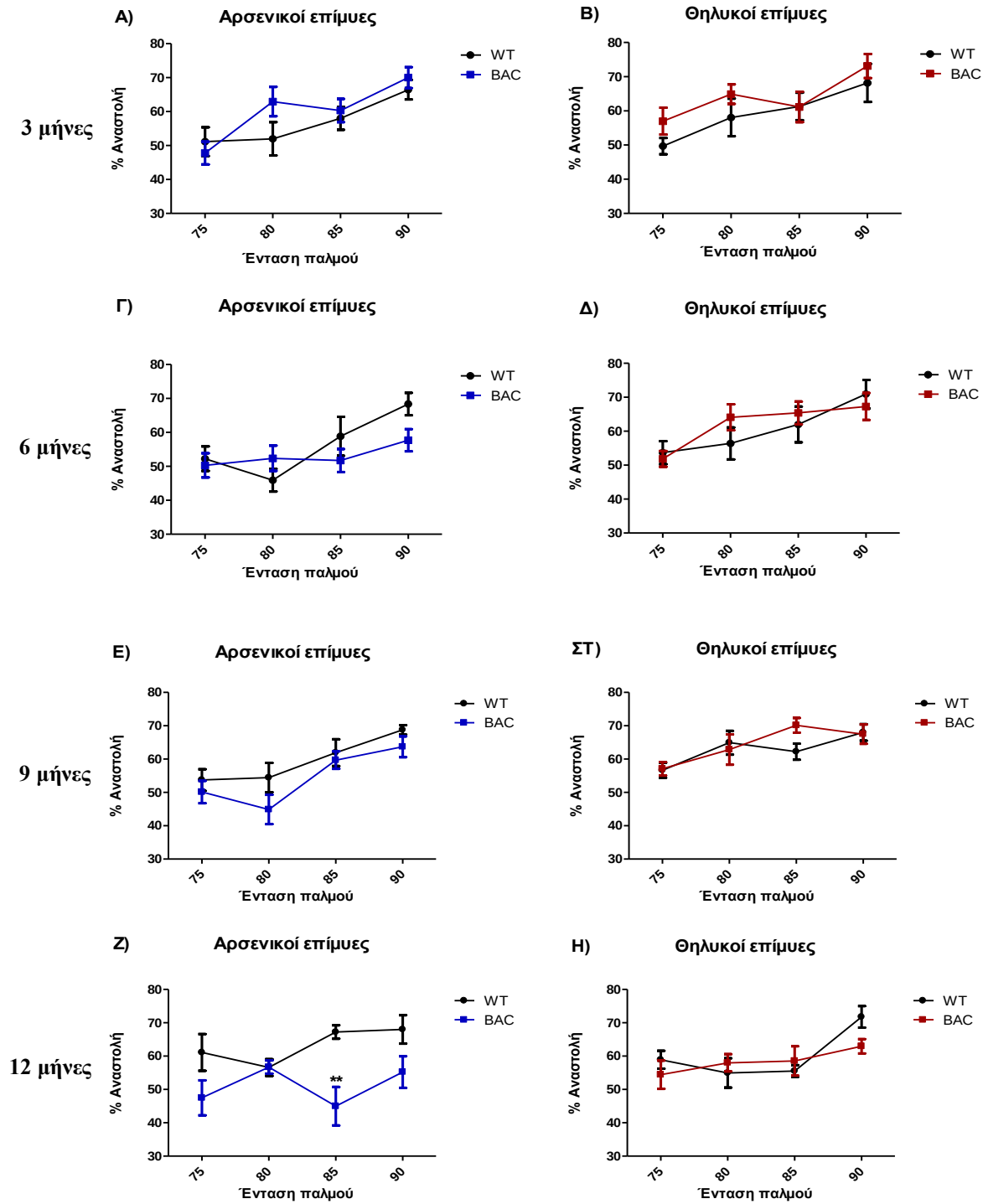
Σε ό, τι αφορά την ακουστική ικανότητα, η επεξεργασία των δεδομένων δεν ανέδειξε καμία διαφορά μεταξύ των δύο γονοτύπων. Πιο αναλυτικά, τόσο οι διαγονιδιακοί, όσο και οι αγρίου τύπου επίμνες παρουσίασαν παρόμοια επίπεδα ακουστικής ικανότητας σε όλες τις χρονικές περιόδους. Ενδεικτικά, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ακουστικής ικανότητας κατά τους 3 μήνες (**Γράφημα 15A,B**).



Γράφημα 15: Ακουστική ικανότητα για τους αρσενικούς και θηλυκούς επίμνες. Παρατηρείται ότι τόσο οι διαγονιδιακοί AS BAC όσο και οι αγρίου τύπου επίμνες εμφανίζουν παρόμοια ακουστική ικανότητα. [Μέση τιμή $\pm$ τυπικό σφάλμα, * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$), *** ($p<0,001$): στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ WT και AS BAC επιμύων].

Σε ό, τι αφορά την % προπαλμική αναστολή, ανάλυση μεταβλητότητας με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις στον παράγοντα της έντασης του παλμού και ανεξάρτητες μεταβλητές το γονότυπο και το φύλο, έδειξε κύρια επίδραση της έντασης του παλμού στη συγκεκριμένη παράμετρο σε όλες τις χρονικές περιόδους της ανάλυσης (3 μήνες: [$F_{(3,117)}=19,221$, $p<0,001$], 6 [$F_{(3,114)}=12,599$, $p<0,001$], 9 μήνες: [$F_{(3,102)}=14,438$, $p<0,001$], 12 μήνες: [$F_{(3,81)}=4,670$, $p<0,005$]) (**Γράφημα 16 A-H**). Επιπλέον, βρέθηκε κύρια επίδραση του γονοτύπου στους 12 μήνες [$F_{(1,27)}=9,270$, $p<0,005$]. Συγκεκριμένα, σε αυτή τη χρονική περίοδο, οι αρσενικοί AS BAC επίμνες εμφάνισαν μειωμένη % προπαλμική αναστολή στα 85 decibel ($p<0,01$) σε σχέση με τους αγρίου τύπου επίμνες (**Γράφημα 16Z**). Τέλος, η ανάλυση ανέδειξε την κύρια επίδραση του φύλου, με τους θηλυκούς επίμνες να εμφανίζουν γενικά υψηλότερα επίπεδα προπαλμικής αναστολής σε σχέση με τους αρσενικούς επίμνες (6 μήνες: [$F_{(1,38)}=7,249$, $p<0,01$], 9 μήνες: [$F_{(1,34)}=11,435$, $p=0,002$]).

% Προπαλμική αναστολή

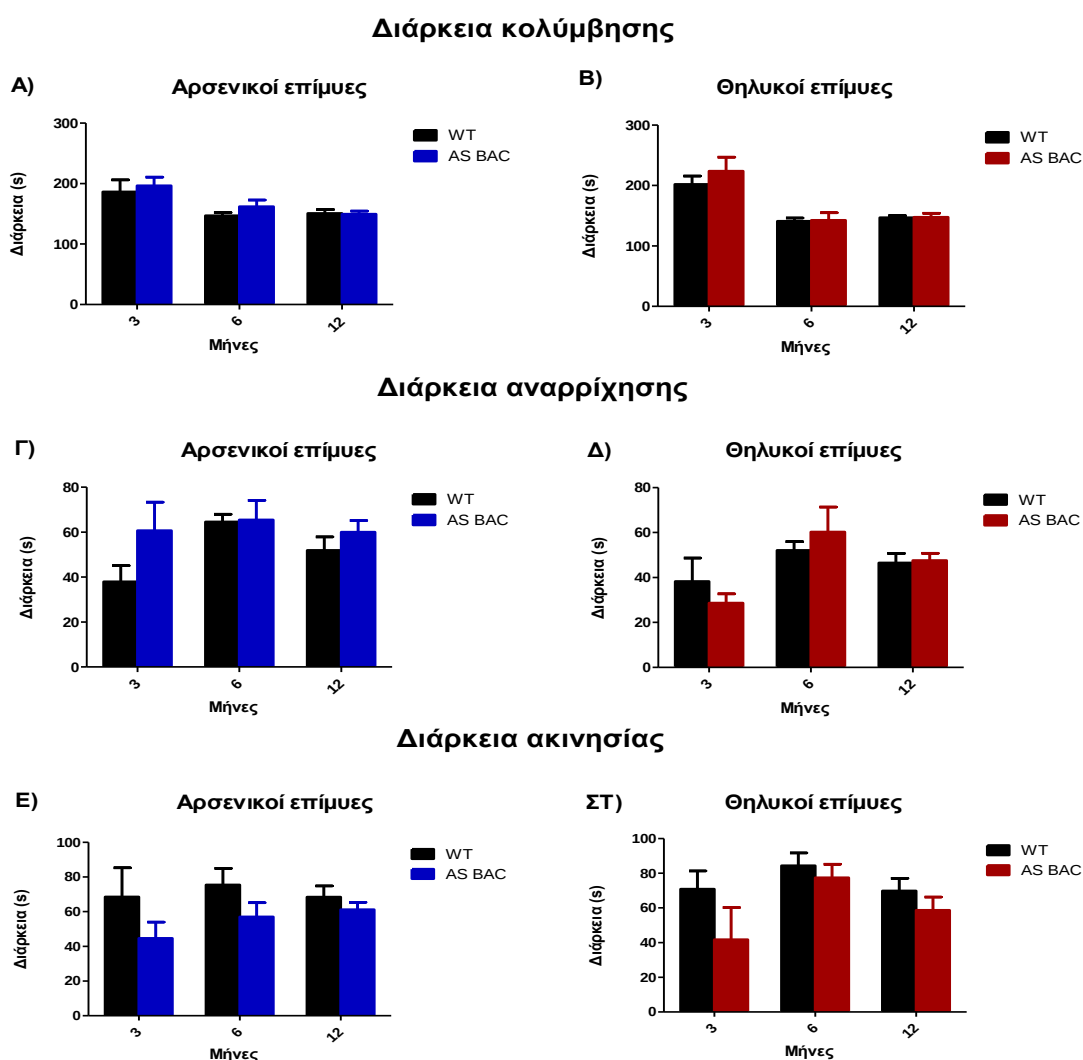


Γράφημα 16: % προπαλμική αναστολή για τους αρσενικούς και θηλυκούς επίμυες στους 3, 6, 9 και 12 μήνες. Παρατηρείται η κύρια επίδραση της έντασης του παλμού με την αναστολή να μεταβάλλεται σε όλες τις περιπτώσεις με την αύξηση του παλμού (Α-Ι). Παρατηρείται επίσης ότι οι αρσενικοί AS BAC επίμυες (Ζ) εμφανίζουν στατιστικώς σημαντικά μειωμένη % αναστολή σε σχέση με τους αγρίου τύπου WT επίμυες. [Μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα, * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$): στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ WT και AS BAC επιμύων].

7. Δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης: Οι AS BAC επίμυες εμφανίζουν καταθλιπτικόμορφο φαινότυπο

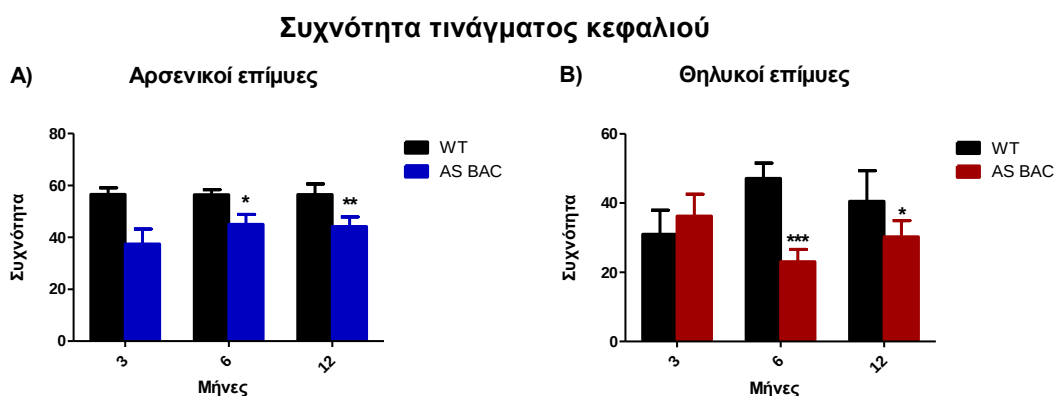
Κατά τη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης, εξετάστηκαν σε 4 διαφορετικές χρονικές περιόδους (3, 6, 12, 18 μήνες) οι εξής παράμετροι: ο συνολικός χρόνος κολύμβησης, ο συνολικός χρόνος αναρρίχησης, ο συνολικός χρόνος ακινησίας καθώς και η συχνότητα του τινάγματος του κεφαλιού.

Η στατιστική επεξεργασία των 3 πρώτων παραμέτρων δεν αποκάλυψε καμία στατιστικώς σημαντική επίδραση του γονοτύπου ούτε στην περίπτωση των αρσενικών, ούτε των θηλυκών επιμύων σε καμία από τις 4 χρονικές περιόδους της ανάλυσης. Ενδεικτικά, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα όπως προέκυψαν από την ανάλυση των 3 μηνών (Γράφημα 17). Και στις υπόλοιπες χρονικές περιόδους ακολουθήθηκε το ίδιο προφίλ.



Γράφημα 17: Συνολική διάρκεια κολύμβησης, αναρρίχησης και ακινησίας στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης σε αρσενικούς και θηλυκούς επίμυες. Παρατηρείται ότι τόσο οι διαγονιδιακοί AS BAC όσο και οι επίμυες αγρίου τύπου εμφανίζουν παραπλήσια επίπεδα και για τις τρεις συμπεριφορές. [Μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα, * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$): στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ WT και AS BAC επιμύων].

Αντίθετα, η στατιστική επεξεργασία της παραμέτρου του τινάγματος του κεφαλιού ανέδειξε την κύρια επίδραση του γονοτύπου στους 6 και 12 μήνες (6 μήνες: $[F_{(1,38)}=24,36, p=0,0001]$, 12 μήνες: $[F_{(1,34)}=16,38, p=0,0002]$, με τους διαγονιδιακούς AS BAC επίμυες, να πραγματοποιούν λιγότερες φορές τη συγκεκριμένη συμπεριφορά σε σχέση με τους αγρίου τύπου WT επίμυες (**Γράφημα 18A,B**). Πιο αναλυτικά, τόσο οι αρσενικοί (6 μήνες: $p<0,05$, 12 μήνες: $p<0,01$) (**Γράφημα 18A**) όσο και οι θηλυκοί AS BAC επίμυες (6 μήνες: $p<0,001$, 12 μήνες: $p<0,05$) (**Γράφημα 18B**), εμφάνισαν στατιστικώς σημαντικά μειωμένη συχνότητα τινάγματος του κεφαλιού σε αυτές τις χρονικές περιόδους.

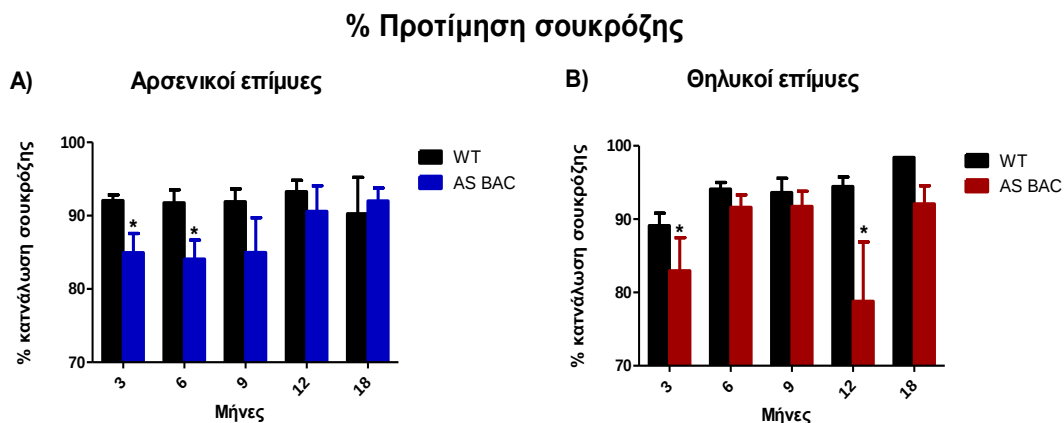


Γράφημα 18: Συχνότητα τινάγματος του κεφαλιού στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης σε αρσενικούς και θηλυκούς επίμυες. Παρατηρείται ότι τόσο A) οι αρσενικοί AS BAC όσο και B) οι θηλυκοί AS BAC επίμυες εμφανίζουν μειωμένο αριθμό της συγκεκριμένης συμπεριφοράς σε σχέση με τους αγρίου τύπου WT επίμυες. [Μέση τιμή $\pm$ τυπικό σφάλμα, * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$), *** ($p<0,001$): στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ WT και AS BAC επιμύων].

8. Δοκιμασία προτίμησης σουκρόζης: Οι AS BAC επίμυες εμφανίζουν καταθλιπτικόμορφο φαινότυπο

Κατά τη δοκιμασία προτίμησης σουκρόζης, η παράμετρος η οποία εξετάστηκε σε 5 διαφορετικές χρονικές περιόδους (3, 6, 9, 12, 18 μήνες) ήταν η επί τις εκατό προτίμηση του διαλύματος της σουκρόζης έναντι του διαλύματος του νερού. Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων που αφορούν τη συγκεκριμένη παράμετρο, ανέδειξαν την κύρια επίδραση του γονοτύπου σε στους 3, 6 και 12 μήνες ότι οι διαγονιδιακοί AS BAC επίμυες εμφανίζουν στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερη κατανάλωση διαλύματος σουκρόζης σε σχέση με τους αγρίου τύπου επίμυες (3 μήνες: $[F_{(1,36)}=4,276, p=0,0459]$, 6 μήνες: $[F_{(1,36)}=5,448, p=0,0253]$, 12 μήνες: $[F_{(1,34)}=4,132, p=0,0412]$) (**Γράφημα 19A,B**). Πιο αναλυτικά, οι αρσενικοί AS BAC επίμυες εμφάνισαν μειωμένα επίπεδα της συγκεκριμένης παραμέτρου στους 3 και 6

μήνες ($p<0,05$, $p<0,05$) (Γράφημα 19A), ενώ οι θηλυκοί στους 3 και 12 μήνες ($p<0,05$, $p<0,05$) (Γράφημα 19B).



Γράφημα 19: % προτίμηση του διαλύματος της σουκρόζης στο χρονικό διάστημα των 72 ωρών από τους αρσενικούς και θηλυκούς επίμυες στους 3, 6, 9, 12 και 18 μήνες. Παρατηρείται ότι τόσο A) οι αρσενικοί AS BAC όσο και B) οι θηλυκοί AS BAC επίμυες εμφανίζουν στατιστικώς σημαντικά μειωμένη κατανάλωση του διαλύματος της σουκρόζης σε σχέση με τους αγρίου τύπου WT επίμυες. [Μέση τιμή ± 1 τυπικό σφάλμα, * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$), *** ($p<0,001$): στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ WT και AS BAC επιμύων].

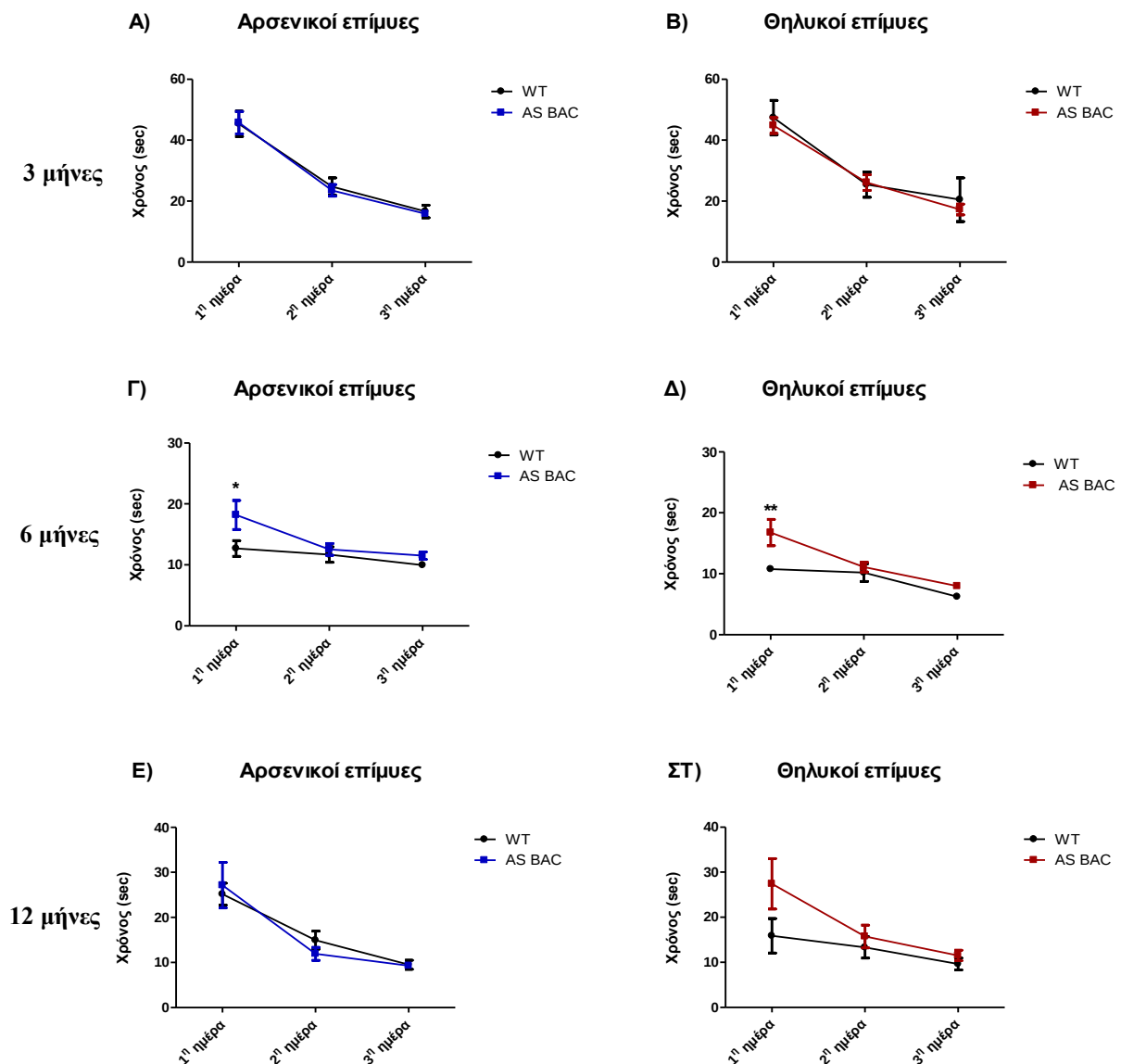
9. Δοκιμασία υδάτινου λαβυρίνθου κατά Morris: Οι AS BAC διαγονιδιακοί επίμυες εμφανίζουν γνωσιακό έλλειμμα στην χωρική μάθηση

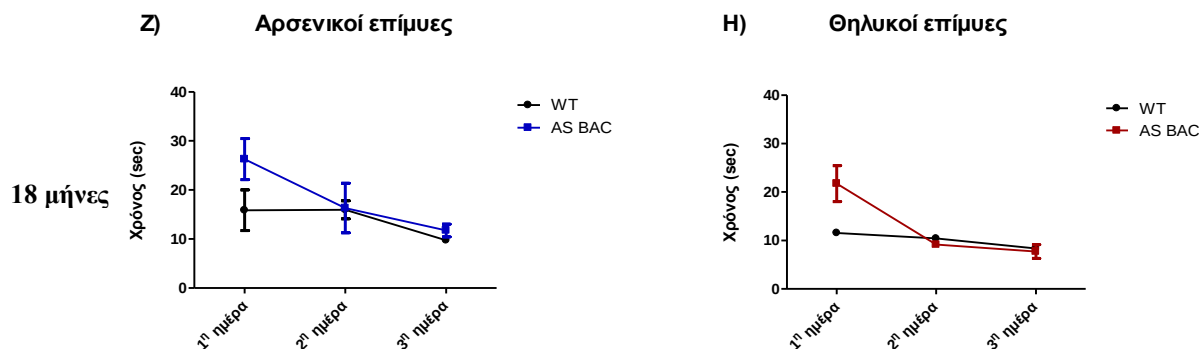
Κατά τη δοκιμασία του υδάτινου λαβυρίνθου κατά Morris εξετάστηκαν σε 4 χρονικές περιόδους (3, 6, 12, 18 μήνες) οι παρακάτω παράμετροι: 1) ο συνολικός χρόνος που απαιτήθηκε για την εύρεση της κρυμμένης πλατφόρμας στη φάση εκπαίδευσης, 2) η ταχύτητα και 3) η συνολική διανυόμενη απόσταση κατά της φάση της εκπαίδευσης με κρυμμένη πλατφόρμα. Επιπλέον μελετήθηκε 4) ο συνολικός χρόνος που δαπανήθηκε στο τεταρτημόριο όπου βρισκόταν τις προηγούμενες ημέρες η θέση της πλατφόρμας στην δοκιμασία μνήμης καθώς και 5) ο συνολικός χρόνος που απαιτήθηκε για την εύρεση της ορατής πλατφόρμας στην τελευταία φάση εκπαίδευσης με ορατή πλατφόρμα ως δοκιμασία ελέγχου όρασης και κινήτρου.

Σε ό, τι αφορά το λανθάνοντα χρόνο, η ανάλυση μεταβλητότητας με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις στον παράγοντα του χρόνου και ανεξάρτητες μεταβλητές το γονότυπο και το φύλο, έδειξε κύρια επίδραση του χρόνου στη συγκεκριμένη παράμετρο σε όλες τις χρονικές περιόδους (3 μήνες: $F_{(2,80)}=86,246$, $p<0,001$, 6 μήνες: $F_{(2,74)}=18,934$, $p<0,001$, 12 μήνες: $F_{(2,66)}=21,486$, $p<0,001$, 18 μήνες: $F_{(2,20)}=3,794$, $p=0,04$). Όπως προκύπτει, ο χρόνος που δαπανήθηκε για την εύρεση της κρυμμένης πλατφόρμας μειώνεται

με την πάροδο των ημερών (**Διαγράμματα 20Α-Η**). Επιπλέον, η ανάλυση ανέδειξε την κύρια επίδραση του γονοτύπου στους 6 μήνες με τους AS BAC διαγονιδιακούς επίμυες να παρουσιάζουν γενικά αυξημένο λανθάνοντα χρόνο [$F_{(1,37)}=9,428$, $p=0,004$]. Πιο αναλυτικά, τόσο οι αρσενικοί (**Διάγραμμα 20Γ**), όσο και οι θηλυκοί AS BAC (**Διάγραμμα 20Δ**) επίμυες χρειάστηκαν περισσότερο χρόνο για να βρουν την κρυμμένη πλατφόρμα την πρώτη μέρα της εκπαίδευσης ($p=0,0446$, $p=0,0377$).

Λανθάνων χρόνος εύρεσης κρυμμένης πλατφόρμας

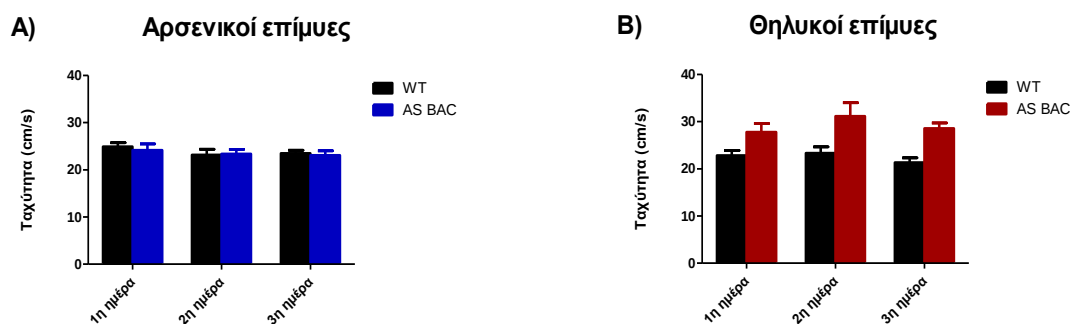




Γράφημα 20: Λανθάνων χρόνος εύρεσης της κρυμμένης πλατφόρμας για τους αρσενικούς και θηλυκούς επίμνες στις 4 χρονικές περιόδους της ανάλυσης. Παρατηρείται η κύρια επίδραση του χρόνου, με τον απαιτούμενο χρόνο να μειώνεται σταδιακά σε όλες τις περιπτώσεις με την πάροδο των ημερών (Α-Η). Παρατηρείται επίσης και η επίδραση του γονοτύπου τόσο για τους αρσενικούς AS BAC επίμνες (Γ), όσο και για τους θηλυκούς AS BAC επίμνες (Δ) καθώς απαιτείται στατιστικά σημαντικά περισσότερος χρόνος για την εύρεση της πλατφόρμας σε σχέση με τους αγρίου τύπου WT επίμνες. [Μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα, * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$): στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ WT και AS BAC επιμύων].

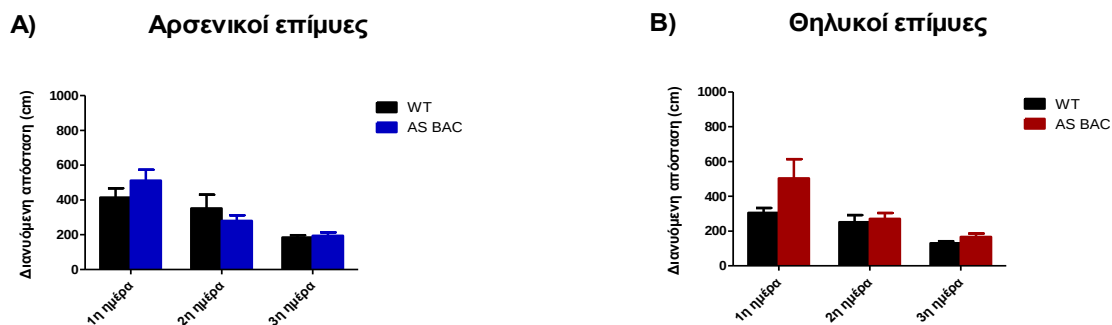
Σε ό, τι αφορά τα αποτελέσματα της ταχύτητας και της συνολικής διανυόμενης απόστασης, η ανάλυση των δεδομένων δεν ανέδειξε κάποια σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο γονοτύπων σε καμία από τις χρονικές περιόδους της ανάλυσης. Παρακάτω, παρουσιάζονται κάποια ενδεικτικά αποτελέσματα.

Ταχύτητα



Γράφημα 21: Ταχύτητα από τους αρσενικούς και θηλυκούς επίμνες για τις 3 ημέρες της εκπαίδευσης με κρυμμένη πλατφόρμα. Παρατηρείται ότι τόσο διαγονιδιακοί AS BAC όσο και οι αγρίου τύπου επίμνες εμφανίζουν παρόμοια επίπεδα ταχύτητας. [Μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα, * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$): στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ WT και AS BAC επιμύων].

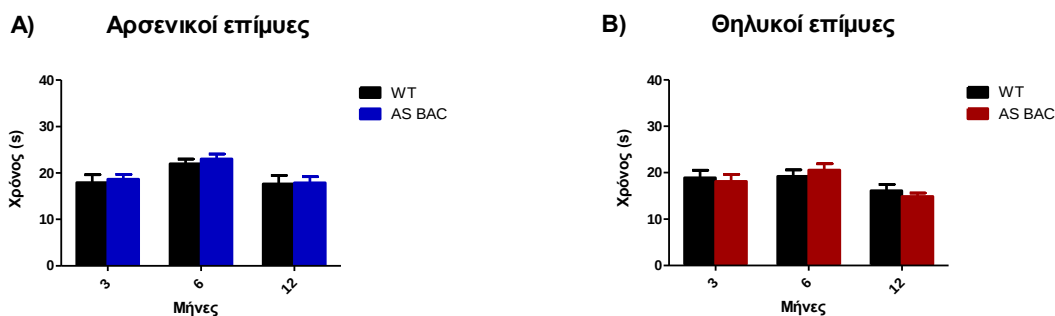
Διανυόμενη απόσταση



Γράφημα 22: Συνολική διανυόμενη απόσταση από τους αρσενικούς και θηλυκούς επίμυες για τις 3 ημέρες της εκπαίδευσης με κρυμμένη πλατφόρμα. Παρατηρείται ότι τόσο διαγονιδιακοί AS BAC όσο και οι αγρίου τύπου επίμυες εμφανίζουν παρόμοια επίπεδα ταχύτητας. [Μέση τιμή $\pm$ τυπικό σφάλμα, * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$): στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ WT και AS BAC επιμύων].

Η δοκιμασία μνήμης 24 ώρες μετά την εκπαίδευση (probe test) δεν ανέδειξε διαφορά μεταξύ AS BAC διαγονιδιακούς επίμυες και επίμυες αγρίου τύπου (**Γράφημα 23A,B**). Η τελευταία δοκιμασία με την ορατή πλατφόρμα έδειξε ότι οι AS BAC διαγονιδιακούς επίμυες και επίμυες αγρίου τύπου έχουν παρόμοια απόδοση οπότε δεν είχαν διαφορά στην όραση ή στο κίνητρο να μάθουν στην συγκεκριμένη δοκιμασία.

Δαπανούμενος χρόνος στην περιοχή της πλατφόρμας



Γράφημα 23: Δαπανούμενος χρόνος στην περιοχή της πλατφόρμας από τους αρσενικούς και θηλυκούς επίμυες για τις 3 χρονικές περιόδους της ανάλυσης. Παρατηρείται ότι τόσο διαγονιδιακοί AS BAC όσο και οι αγρίου τύπου επίμυες δαπανούν παραπλήσιο χρόνο στο τεταρτημόριο της πλατφόρμας. [Μέση τιμή $\pm$ τυπικό σφάλμα, * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$): στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ WT και AS BAC επιμύων].

Σε ό, τι αφορά τις δοκιμασίες δοκού και ανάλυσης βημάτων, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο γονοτύπων σε καμία χρονική περίοδο ανάλυσης.

Αποτελέσματα νευροχημικής ανάλυσης

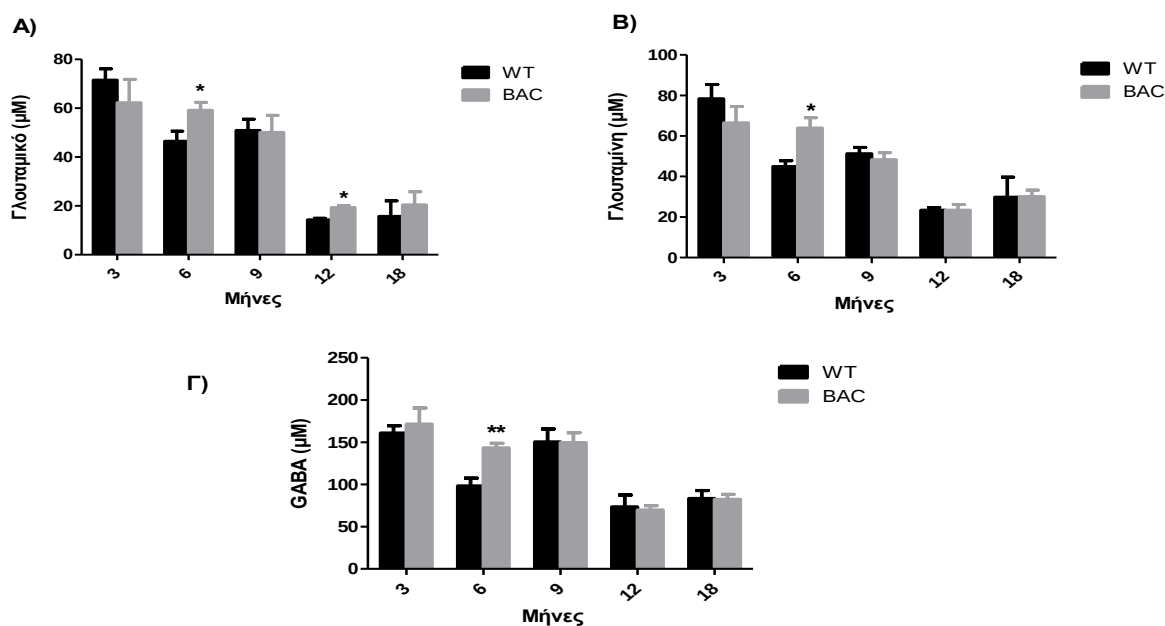
Η νευροχημική ανάλυση περιλάμβανε τη μέτρηση των επιπέδων του γλουταμικού, της γλουταμίνης και του γ-αμινοβουτυρικού οξέος στις εγκεφαλικές περιοχές της αμυγδαλής, του ιππόκαμπου, του ραβδωτού και τέλος του φλοιού στις 5 χρονικές περιόδους της ανάλυσης (3, 6, 9, 12, 18 μήνες). Σε αντίθεση όμως με τη συμπεριφορική μελέτη, εδώ δεν πραγματοποιήθηκε ανάλυση κατά φύλο.

1. Αμυγδαλή

Εφαρμογή του κριτηρίου t για ανεξάρτητα δείγματα μεταξύ της ομάδας των επιμύων αγρίου τύπου και της ομάδας των διαγονιδιακών AS BAC επιμύων σε όλες τις χρονικές στιγμές της ανάλυσης ανέδειξε τα εξής στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα:

- Επίπεδα γλουταμικού: η ανάλυση ανέδειξε τη στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ WT και AS BAC επιμύων στους 6 και 12 μήνες. Πιο αναλυτικά στις συγκεκριμένες ηλικίες, τα επίπεδα γλουταμικού των AS BAC επιμύων ήταν αυξημένα σε σχέση με αυτά των WT (6 μήνες: $[t_{(10)}=2.383, p<0,0487]$, 12 μήνες: $[t_{(6)}=5.326, p=0,0129]$) **(Διάγραμμα 24Α)**.
- Επίπεδα γλουταμίνης: η ανάλυση ανέδειξε τη στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ WT και AS BAC επιμύων στους 6 μήνες. Πιο αναλυτικά, σε αυτή την ηλικία, τα επίπεδα γλουταμικού των AS BAC επιμύων ήταν αυξημένα σε σχέση με αυτά των WT $[t_{(10)}=3.256, p=0,0173]$ **(Διάγραμμα 24Β)**.
- Επίπεδα γ-αμινοβουτυρικού οξέος: η ανάλυση ανέδειξε τη στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ WT και AS BAC επιμύων στους 6 μήνες. Πιο αναλυτικά, σε αυτή την ηλικία, τα επίπεδα γ-αμινοβουτυρικού οξέος των AS BAC επιμύων ήταν αυξημένα σε σχέση με αυτά των WT $[t_{(10)}=4.211, p=0,0056]$ **(Διάγραμμα 24Γ)**.

Αμυγδαλή



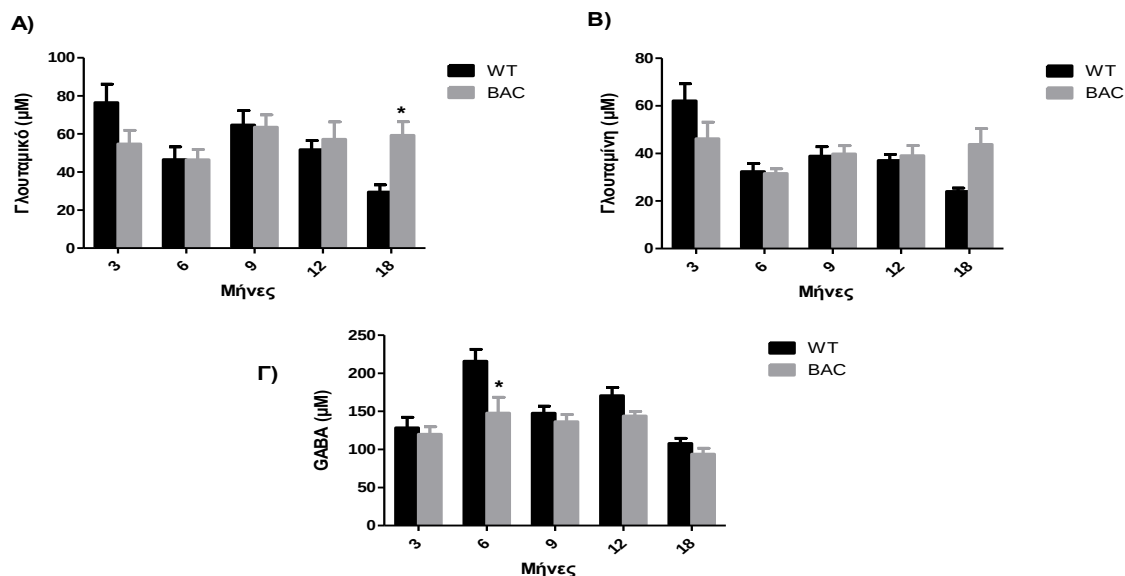
Γράφημα 24: Αποτελέσματα νευροχημικής ανάλυσης στην αμυγδαλή. Παρατηρείται ότι οι AS BAC επίμνες εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα γλουταμικού, γλουταμίνης και γ-αμινοβοουτυρικού οξέος (GABA) σε σχέση με τους αγρίου τύπου επίμνες. [Μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα, * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$): στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ WT και AS BAC επιμύων].

2. Ιππόκαμπος

Εφαρμογή του κριτηρίου t για ανεξάρτητα δείγματα μεταξύ της ομάδας των επιμύων αγρίου τύπου και της ομάδας των διαγονιδιακών AS BAC επιμύων σε όλες τις χρονικές στιγμές της ανάλυσης, ανέδειξε τα εξής στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα:

- Επίπεδα γλουταμικού: η ανάλυση ανέδειξε τη στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ WT και AS BAC επιμύων στον 18^ο μήνα της ανάλυσης. Πιο αναλυτικά, σε αυτή την ηλικία, τα επίπεδα γλουταμικού των AS BAC επιμύων ήταν αυξημένα σε σχέση με αυτά των WT [$t_{(7)}=3,669$, $p=0,0487$], (**Διάγραμμα 25Α**).
- Επίπεδα γ-αμινοβοουτυρικού οξέος: η ανάλυση ανέδειξε τη στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ WT και AS BAC επιμύων στον 6^ο μήνα της ανάλυσης. Πιο αναλυτικά, σε αυτή τη χρονική περίοδο, τα επίπεδα GABA των AS BAC επιμύων ήταν μειωμένα σε σχέση με αυτά των WT [$t_{(7)}=2,631$, $p=0,0273$], (**Διάγραμμα 25Γ**).

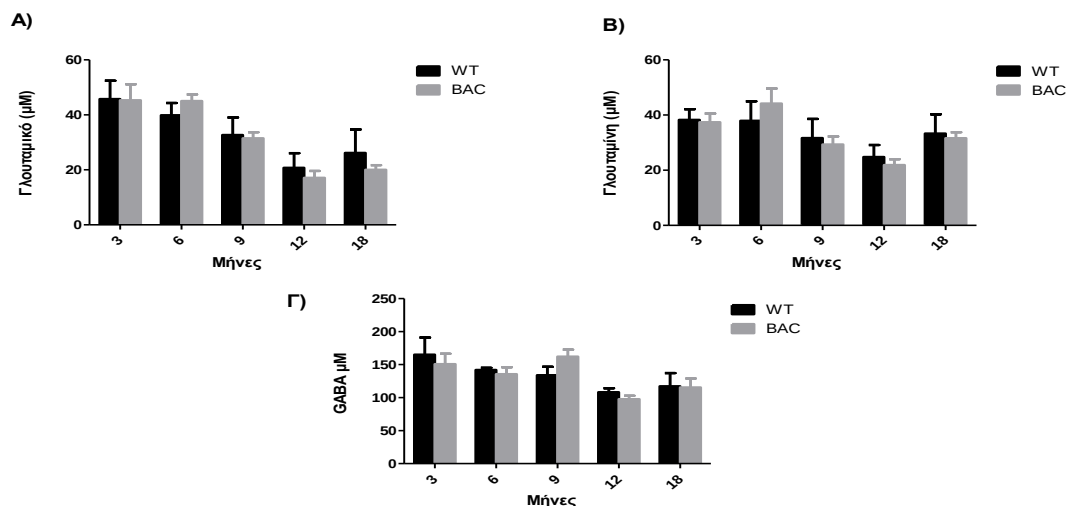
Ιππόκαμπος



Γράφημα 25: Αποτελέσματα νευροχημικής ανάλυσης στον ιππόκαμπο. Παρατηρείται ότι οι AS BAC επίμνες εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα γλουταμικού στους 18 μήνες, και μειωμένα επίπεδα γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA) στους 6 μήνες σε σχέση με τους αγρίον τύπου επίμνες. [Μέση τιμή $\pm$ 1 τυπικό σφάλμα, * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$): στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ WT και AS BAC επιμύων].

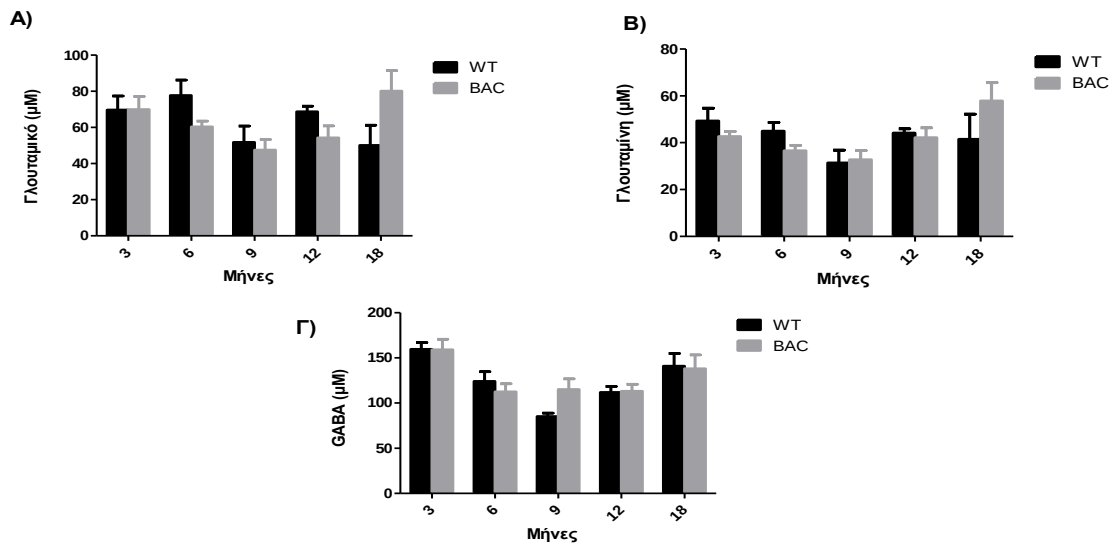
Η ανάλυση των δεδομένων που αφορούν τις υπόλοιπες εγκεφαλικές περιοχές (ραβδωτό, φλοιός), δεν ανέδειξε κανένα στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα σχετικά με τα επίπεδα του γλουταμικού, της γλουταμίνης και του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (Γράφημα 26, Γράφημα 27).

Ραβδωτό



Γράφημα 26: Αποτελέσματα νευροχημικής ανάλυσης στο ραβδωτό. Η ανάλυση δεν ανέδειξε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο γονοτύπων [Μέση τιμή $\pm$ 1 τυπικό σφάλμα, * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$): στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ WT και AS BAC επιμύων].

Φλοιός



Γράφημα 27: Αποτελέσματα νευροχημικής ανάλυσης στο φλοιό. Η ανάλυση δεν ανέδειξε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο γονοτύπων [Μέση τιμή $\pm$ 1 τυπικό σφάλμα, * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$): στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ WT και AS BAC επιμύων].

IX. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όταν αναφερόμαστε στη νόσο Parkinson, γίνεται ταυτόχρονα μία αυθόρμητη σύνδεση με την κλινική εικόνα της νόσου και συγκεκριμένα με τα σοβαρά κινητικά προβλήματα που τη συνοδεύουν. Παρ' όλα αυτά όμως, είναι πλέον ευρέως αποδεκτό ότι εξίσου σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της νόσου διαδραματίζει και μία άλλη κατηγορία συμπτωμάτων, τα λεγόμενα μη κινητικά συμπτώματα. Η κατηγορία αυτή όμως παρουσιάζει σημαντικά μειονεκτήματα, με βασικότερο το γεγονός της περιορισμένης τους μελέτης. Λίγες είναι οι ερευνητικές μελέτες οι οποίες έχουν ασχοληθεί με τη μελέτη των μη κινητικών συμπτωμάτων και ακόμα λιγότερες εκείνες που κατάφεραν να αποτυπώσουν με επιτυχία κάποια από αυτά. Τα πειραματικά ζωικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται μέχρι στιγμής για το σκοπό αυτό παρουσιάζουν σημαντικούς περιορισμούς. Έτσι λοιπόν, θεωρείται αναγκαία η εύρεση ενός νέου ερευνητικού εργαλείου που θα μπορέσει να ξεπεράσει τα υπάρχοντα εμπόδια.

Μία τέτοια προσέγγιση αποτελεί και η προσπάθεια των Nuber et al., 2013 μέσω της δημιουργίας ενός νέου γενετικά τροποποιημένου ζωικού μοντέλου πρωτεϊνικής υπερέκφρασης. Πιο ειδικά, το μοντέλο αυτό υπερεκφράζει το αγρίου τύπου γονίδιο της ανθρώπινης α-συνουκλεΐνης σε όλες εκείνες τις περιοχές που εκφράζεται φυσιολογικά η πρωτεΐνη αυτή. Το γεγονός επίσης ότι πρόκειται για ένα μοντέλο επίμυ, ισχυροποιεί ακόμα περισσότερο τη χρήση του, καθώς καθιστά πιο εύκολη την αποτύπωση της παθολογίας του μεταιχμιακού συστήματος και κατ' επέκταση την πραγματοποίηση συμπεριφορικών μελετών. Στο μοντέλο αυτό, στηρίχθηκε και η συγκεκριμένη εργασία, βασικός στόχος της οποίας ήταν η μελέτη των πρώιμων μη κινητικών συμπτωμάτων της νόσου Parkinson, καθώς και ο έλεγχος για πιθανές μεταβολές του νευροχημικού υποστρώματος.

Οι AS BAC διαγονιδιακοί επίμυες εμφανίζουν μειωμένο σωματικό βάρος

Στο σύνολο των συμπεριφορικών μελετών που πραγματοποιήσαμε, συμπεριελήφθηκε και η μηνιαία μέτρηση του σωματικού βάρους των επιμύων. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι αρσενικοί και όχι οι θηλυκοί AS BAC επίμυες εμφανίζουν μειωμένο σωματικό βάρος σε σχέση του αντίστοιχους επίμυες αγρίου τύπου, σε όλες της χρονικές περιόδους της ανάλυσης, με το αποτέλεσμα να είναι πιο ισχυρό στους πρώτους κυρίως μήνες. Κάτι τέτοιο έρχεται σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία, καθώς αρκετές είναι οι κλινικές μελέτες στις οποίες αναφέρεται ότι οι ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο, εμφανίζονται λιποβαρείς σε σχέση με την αντίστοιχη ομάδα ελέγχου (Beyer et al., 1995; Chen et al., 2003). Αντίστοιχα είναι και τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τα ζωικά μοντέλα. Συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι μύες με την μετάλλαξη A53T έχουν μειωμένο βάρος σε σχέση με τους αντίστοιχους αγρίου τύπου

(Paumier et al., 2013). Βιβλιογραφικές αναφορές παρουσιάζουν διάφορους λόγους για τους οποίους μπορεί να συμβαίνει κάτι τέτοιο, μεταξύ των οποίων είναι και η μειωμένη οσφρητική ικανότητα, η μειωμένη κατανάλωση τροφής καθώς και η κατάθλιψη. Όλοι αυτοί οι λόγοι αποτελούν και ευρήματα της δικής μας μελέτης, γεγονός που επιβεβαιώνει το αποτέλεσμα του παρατηρούμενου φαινοτύπου.

Οι AS BAC διαγονιδιακοί επίμυες εμφανίζουν υπερκινητικότητα

Μέσω της δοκιμασίας του ανοιχτού πεδίου μελετήθηκε η κινητική δραστηριότητα των AS BAC διαγονιδιακών επιμύων. Η μελέτη της συμπεριφοράς αυτή πραγματοποιήθηκε μέσω της εκτίμησης συγκεκριμένων παραμέτρων όπως είναι η διανυόμενη απόσταση, ο αριθμός των ανορθώσεων και η ταχύτητα των ζώων. Όπως έγινε φανερό από τα αποτελέσματα, οι διαγονιδιακοί επίμυες οι οποίοι υπερεκφράζουν το γονίδιο της φυσιολογικής ανθρώπινης α-συνουκλεΐνης διανύουν μεγαλύτερη απόσταση μέσα στο χρονικό διάστημα των 60 λεπτών της δοκιμασίας σε σχέση με τους επίμυες αγρίου τύπου σε όλες τις χρονικές περιόδους της ανάλυσης. Το αποτέλεσμα αυτό φαίνεται να είναι ιδιαίτερα ισχυρό για την περίπτωση των αρσενικών AS BAC επιμύων, καθώς διατηρούν τη στατιστικά σημαντική διαφορά με τους αντίστοιχους WT επίμυες σε όλες τις χρονικές περιόδους της ανάλυσης, ενώ για την περίπτωση των θηλυκών θα μπορούσαμε να αναφέρουμε ότι εμφανίζουν σημαντική τάση. Συνδυαστικά, όμως, η παρατηρούμενη κύρια επίδραση του γονοτύπου, δείχνει ότι υπάρχει σαφής υπερκινητικότητα των AS BAC διαγονιδιακών επιμύων όσον αφορά την οριζόντια κινητικότητα στο ανοιχτό πεδίο.

Ανάλογα είναι και τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη μελέτη της κάθετης κινητικότητας. Ο αριθμός των ανορθώσεων που αντιπροσωπεύει την εσωτερική διεγερσιμότητα του ζώου είναι μεγαλύτερος στους AS BAC επίμυες σε σχέση με τους WT σε όλες τις χρονικές περιόδους της ανάλυσης. Συνεπώς, και στην κάθετη κινητικότητα εμφανίζεται ο υπερκινητικός φαινότυπος. Το αποτέλεσμα αυτό ενισχύεται ακόμα περισσότερο και από τα ευρήματα που αφορούν τα επίπεδα της ταχύτητας τα οποία είναι ιδιαίτερα αυξημένα για τους διαγονιδιακούς επίμυες.

Παρά το γεγονός ότι τα αποτελέσματα της πειραματικής μελέτης η οποία πραγματοποιήθηκε από τους Nuber et al., 2013, οι οποίοι χρησιμοποίησαν το ίδιο διαγονιδιακό μοντέλο με το δικό μας, αναφέρουν την εμφάνιση υποκινητικού φαινοτύπου, δεν είναι η πρώτη φορά που η υπερκινητικότητα αναφέρεται στη βιβλιογραφία που αφορά τα ζωικά μοντέλα της νόσου Parkinson. Ένα χρόνο πριν τη μελέτη των Nuber et al., οι Yamakado et al. 2012, χρησιμοποιώντας την ίδια γονιδιακή κατασκευή σε μύες αναφέρουν αυξημένη οριζόντια κινητικότητα των διαγονιδιακών μυών σε σχέση με τους αντίστοιχους WT σε ηλικία ακόμα και 24 μηνών. Και άλλες όμως μελέτες που έχουν χρησιμοποιήσει

ζωϊκά μοντέλα υπερέκφρασης είτε της φυσιολογικής είτε της μεταλλαγμένης α-συνουκλεΐνης κάνουν λόγο για ένα υπερκινητικό φαινότυπο στα πλαίσια τόσο της οριζόντιας, όσο και της κάθετης κινητικότητας. Μάλιστα, αναφέρεται ότι πολλές φορές ο φαινότυπος αυτός εμφανίζεται από νεαρή κιόλας ηλικία (Lam et al., 2011; Graham and Sidhu et al., 2010; George et al., 2008; Unger et al., 2006). Αντίθετα, φαίνεται ότι στην πλειονότητα τους, τα αποτελέσματα που σχετίζονται με έναν υποκινητικό φαινότυπο ανήκουν σε μία ευρύτερη κατηγορία πειραματικών μελετών που χρησιμοποιούν κυρίως ζωϊκά μοντέλα νευροτοξινών και όχι γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν μειωμένα επίπεδα κινητικότητας, τόσο οριζόντιας, όσο και κάθετης (Fredriksson et al., 1994; Li et al., 2005).

Παρά το γεγονός ότι η ακριβής αιτιολογία της παρατηρούμενης υπερκινητικότητας δεν έχει απόλυτα εξακριβωθεί, διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί, σύμφωνα με τους οποίους επιβεβαιώνεται έως έναν βαθμό ο συγκεκριμένος φαινότυπος. Πιο αναλυτικά, έχει προταθεί ότι σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες αυτές φαίνεται να διαδραματίζουν ο υποδοχέας της ντοπαμίνης (D1), καθώς και ο μεταφορέας της ντοπαμίνης (DAT). Μελέτες αναφέρουν ότι ο φαινότυπος της υπερκινητικότητας που παρατηρήθηκε σε A53T διαγονιδιακούς μύες, αντιστράφηκε ύστερα από χορήγηση ανταγωνιστή του D1 υποδοχέα, ενώ αντίθετα διέγερση του υποδοχέα μέσω χορήγησης αγωνιστή αύξησε ακόμα περισσότερο τον υπερκινητικό φαινότυπο. Η υπερκινητικότητα στους συγκεκριμένους μύες, συσχετίστηκε επιπλέον και με αυξημένα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα την μέλαινα ουσία, καθώς και με μειωμένα επίπεδα έκφρασης του μεταφορέα της ντοπαμίνης στον επικλινή πυρήνα και το ραβδωτό. Τέλος, παρατηρήθηκε και μειωμένη επαναπρόσληψη ντοπαμίνης στο ραβδωτό (Unger et al., 2006). Σε ότι αφορά τα δικά μας ευρήματα, η πρώτη προσπάθεια επιβεβαίωσης του υπερκινητικού φαινοτύπου πραγματοποιήθηκε μέσω εκτίμησης των επιπέδων της ντοπαμίνης στο ραβδωτό, όπως αυτά μετρήθηκαν μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης από το εργαστήριό μας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι διαγονιδιακοί AS BAC επίμυες εμφανίζουν αυξημένη ντοπαμίνη στο ραβδωτό σε σχέση με τους αντίστοιχους επίμυες αγρίου τύπου, επιβεβαιώνοντας την διέγερση του ντοπαμινεργικού συστήματος σε περιοχή του εγκεφάλου υπεύθυνη για την κινητικότητα (Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία της φοιτήτριας Μαρίας Κορωναίου). Συμπερασματικά, οι διαγονιδιακοί AS BAC επίμυες, φαίνεται να αναπτύσσουν κινητικές ανωμαλίες με την πάροδο του χρόνου. Όμως αυτός ο φαινότυπος δεν υποδεικνύει μία σταδιακή ή προοδευτική δυσλειτουργία στην κινητική ικανότητα, όπως συμβαίνει στην ανθρώπινη κατάσταση. Αντίθετα, είναι πιο πιθανό ότι αντιπροσωπεύει μία απότομη μεταβολή, ή αλλαγή η οποία σχετίζεται με τα αυξημένα επίπεδα της α-συνουκλεΐνης ή ακόμα και με τις συσσωματωμένες μορφές της πρωτεΐνης αυτής, όπως προτείνεται και από τους Paulmier et al., 2013, οι οποίοι χρησιμοποιώντας το μοντέλο των A53T μυών, παρατήρησαν τα ίδια αποτελέσματα με τα δικά μας.

Σε ό, τι αφορά τη μελέτη του νευροβιολογικού υποστρώματος αυτών των παρατηρήσεων, ίσως θα άξιζε να μελετήσουμε πιθανές αντισταθμιστικές αλλαγές οι οποίες σχετίζονται με τη β και γ συνουκλεΐνη, για τις οποίες έχειδειχθεί ότι συμμετέχουν στη σηματοδότηση της ντοπαμίνης και συγκεκριμένα στον εντοπισμό και τη ρυθμιστική λειτουργία του μεταφορέα της ντοπαμίνης (Oaks et al., 2013)

Οι AS BAC διαγονιδιακοί επίμυες εμφανίζουν μειωμένη αγχώδη συμπεριφορά

Επόμενος στόχος της μελέτης αυτής ήταν η μελέτη της αγχώδους συμπεριφοράς των AS BAC διαγονιδιακών επιμύων. Για τη μελέτη της συγκεκριμένης παραμέτρου πραγματοποιήθηκαν δυο συμπεριφορικά πειράματα, αυτό της δοκιμασίας ανοιχτού πεδίου και του υπερυψωμένου σταυροειδούς λαβυρίνθου. Από τη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου υπολογίστηκε ο συνολικός χρόνος που δαπανήθηκε στην κεντρική περιοχή του πεδίου. Η σύνδεση της συγκεκριμένης παραμέτρου με την αγχώδη συμπεριφορά, βασίζεται στη φυσική προτίμηση που δείχνουν οι επίμυες προς την περιφέρεια του πεδίου σε σχέση με το κέντρο, καθώς εκεί νιώθουν περισσότερη ασφάλεια και λιγότερο φόβο (thigmotaxis). Έτσι λοιπόν προκύπτει ότι όσος περισσότερος χρόνος δαπανάται στην κεντρική περιοχή του πεδίου, τόσο μειώνονται τα επίπεδα της αγχώδους συμπεριφοράς, γεγονός που αντικατοπτρίζει έναν αγχολυτικό φαινότυπο.

Σύγκριση των δύο γονοτύπων ανέδειξε ότι οι AS BAC διαγονιδιακοί επίμυες δαπανούν περισσότερο χρόνο στην κεντρική περιοχή του πεδίου σε σχέση με τους επίμυες αγρίου τύπου σε όλες τις χρονικές περιόδους της ανάλυσης, με τους αρσενικούς διαγονιδιακούς επίμυες να εμφανίζουν γενικά πιο ισχυρό φαινότυπο σε σχέση με τους θηλυκούς. Συνδυαστικά όμως, η κύρια επίδραση του γονοτύπου στη συγκεκριμένη παράμετρο δείχνει ότι υπάρχει σαφής μειωμένη αγχώδης συμπεριφορά των AS BAC διαγονιδιακών επιμύων.

Το δεύτερο συμπεριφορικό πείραμα μέσω του οποίου μελετήθηκαν τα επίπεδα άγχους ήταν η δοκιμασία του υπερυψωμένου σταυροειδούς λαβυρίνθου. Οι παράμετροι που μελετήθηκαν ήταν ο συνολικός χρόνος που δαπανήθηκε στους ανοιχτούς βραχίονες της διάταξης, ο αριθμός των εισόδων στους ανοιχτούς βραχίονες καθώς και η συχνότητα τεντώματος της κεφαλής. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, υψηλές τιμές και για αυτές τις παραμέτρους υποδηλώνουν μειωμένα επίπεδα άγχους, γεγονός που όπως και προηγουμένως, βασίζεται στην φυσική αποστροφή των επιμύων για ανοιχτούς και φωτεινούς χώρους. Αυτά ακριβώς είναι και αποτελέσματα που προκύπτουν και από τη δική μας μελέτη, με τους διαγονιδιακούς AS BAC επίμυες να εμφανίζουν αυξημένο χρόνο και αριθμό εισόδων στους ανοιχτούς βραχίονες καθώς και αυξημένο αριθμό τεντωμάτων κεφαλής. Συνδυαστικά, τόσο από τα αποτελέσματα της δοκιμασίας του ανοιχτού πεδίου όσο και του υπερυψωμένου

λαβυρίνθου, προκύπτει ότι οι AS BAC επίμυες εμφανίζουν σαφή μειωμένη αγχώδη συμπεριφορά.

Μπορεί αυτός ο παρατηρούμενος αγχολυτικός φαινότυπος να έρχεται σε αντίθεση με τα ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα άγχους που αναφέρονται σε περιπτώσεις ασθενών που πάσχουν από τη νόσο και αγγίζουν ένα ποσοστό της τάξεως του 40-50%, όμως δεν είναι η πρώτη φορά που κάτι τέτοιο αναφέρεται στη βιβλιογραφία. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η μελέτη των Yamakado et al. 2012, οι οποίοι χρησιμοποιώντας την ίδια γονιδιακή κατασκευή με τη δική μας σε μύες παρατήρησαν τόσο αυξημένο χρόνο στο κέντρο, όσο και αυξημένο αριθμό εισόδων στους ανοιχτούς βραχίονες. Επιπλέον, και σε μελέτες που έχουν χρησιμοποιήσει ζωικά μοντέλα υπερέκφρασης είτε της φυσιολογικής (Lam et al., 2011) είτε της μεταλλαγμένης α-συνουκλεΐνης (George et., 2008) έχουν βρεθεί ανάλογα αποτελέσματα.

Παρά το γεγονός ότι δεν είναι απόλυτα ξεκάθαρος ο μηχανισμός μέσω του οποίου παρατηρείται ένας τέτοιος διαφοροποιημένος φαινότυπος, κάποιες μελέτες αναφέρουν ότι σε αυτή τη διαδικασία είναι πιθανό να εμπλέκονται τα υψηλά επίπεδα του μεταφορέα της σεροτονίνης (SERT). Συγκεκριμένα, οι Yamakado et al., αναφέρουν ότι οι AS BAC διαγονιδιακοί μύες παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα SERT. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να επιβεβαιωθεί από τη βιβλιογραφία, καθώς σύμφωνα με διάφορες μελέτες, διαγονιδιακοί μύες οι οποίοι υπερεκφράζουν το συγκεκριμένο γονίδιο, εμφανίζουν μειωμένη αγχώδη συμπεριφορά (Jennings et al., 2006), ενώ μύες knockout για το γονίδιο εμφανίζουν τα ακριβώς αντίθετα αποτελέσματα (Kalueff et al., 2007, 2010).

Συμπερασματικά, οι διαγονιδιακοί AS BAC επίμυες κατέδειξαν μία σταθερή έλλειψη αγχώδους συμπεριφοράς, αποτυγχάνοντας να εκδηλώσουν βασικές στερεοτυπικές συμπεριφορές, όπως είναι για παράδειγμα η αποφυγή της έκθεσης. Έτσι λοιπόν, φαίνεται ότι υπάρχουν δυσπροσαρμοστικές συμπεριφορικές αλλαγές ως απόκριση στην υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης. Όπως είναι γνωστό η παθολογία η οποία οφείλεται στη συγκεκριμένη πρωτεΐνη είναι ένας μόνο από τους πολλαπλούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στη νόσο. Ως εκ τούτου, τα αποτελέσματα μας, δεν αποκλείουν τη συμμετοχή και άλλων μονοπατιών, τα οποία μπορεί να συνεισφέρουν στην συννοσηρότητα της αγχώδους διαταραχής που βιώνουν οι ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο. Ωστόσο, αυτές οι έντονες αλλαγές στην αγχώδη συμπεριφορά, όπως αναδείχθηκαν από το μοντέλο αυτό, υποδηλώνουν ότι μπορεί να αποβεί ιδιαίτερα χρήσιμο για τη διερεύνηση που πώς η αλλαγή στην έκφραση της πρωτεΐνης, μπορεί να επηρεάσει το μεταιχμιακό σύστημα και να μεταβάλλει τη φυσιολογική λειτουργία ανεξάρτητα από την απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων.

Οι AS BAC διαγονιδιακοί επίμυες εμφανίζουν απώλεια οσφρητικής ικανότητας

Το επόμενο πείραμα που πραγματοποιήθηκε ήταν η δοκιμασία της θαμμένης πελέτας, μέσω της οποίας εκτιμήθηκε η οσφρητική ικανότητα των επιμύων. Η εκτίμηση της παραμέτρου αυτής στηρίχθηκε στον υπολογισμό του συνολικού χρόνου που χρειάζονται οι επίμυες για να ανακαλύψουν την κρυμμένη πελέτα. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, όσο αυξάνεται ο συγκεκριμένος χρόνος, τόσο μειώνονται τα επίπεδα της οσφρητικής ικανότητας. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας έδειξαν την κύρια επίδραση τους γονοτύπου, με τους AS BAC επίμυες να δαπανούν περισσότερο χρόνο σε όλες τις χρονικές περιόδους της ανάλυσης. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα συμφωνεί με τα αποτελέσματα της πλειονότητας των ερευνών που μελέτησαν την οσφρητική ικανότητα σε ζώϊκά μοντέλα Parkinson υπερέκφρασης α-συνουκλεΐνης (φυσιολογικής ή μεταλλαγμένης) (Fleming et al., 2009; Zhang et al., 2013), χρησιμοποιώντας είτε πείραμα αντίστοιχο με το δικό μας είτε άλλα πειράματα, όπως είναι για παράδειγμα η περίπτωση των Nuber et al., 2013 οι οποίοι αναφέρουν ότι οι AS BAC επίμυες εμφανίζουν μειωμένη ικανότητα διάκρισης οσμών σε σχέση με τους αντίστοιχους WT επίμυες. Από νευροχημικής άποψης, και για να αποκτήσουμε μία πιο ολοκληρωμένη εικόνα, θα μπορούσαμε να ελέγξουμε τα επίπεδα της ντοπαμίνης στον οσφρητικό βολβό, βασιζόμενοι πάντα στη θεωρία του νευροανασταλτικού ρόλου της ντοπαμίνης στη νευροδιαβίβαση της συγκεκριμένης περιοχής (Ross et al., 2008).

Η ανάδειξη αυτού του παρατηρούμενου φαινοτύπου, αποτελεί ένα ιδιαίτερα σημαντικό εύρημα, καθώς η οσφρητική απώλεια φαίνεται να αποτελεί και ένα από τα πρώτα, αν όχι και το πρώτο μη κινητικό σύμπτωμα με το οποίο έρχεται αντιμέτωπος ένας ασθενής που πάσχει από τη νόσο Parkinson, υποδεικνύοντας με αυτόν τον τρόπο ότι το συγκεκριμένο μοντέλο, έχει την ικανότητα να αποτυπώνει σε αρκετά ικανοποιητικό βαθμό τη συμπτωματολογία αυτής της κατηγορίας συμπτωμάτων, ακόμη και αν αυτά εμφανίζονται σε πολύ πρώιμο στάδιο.

Οι AS BAC διαγονιδιακοί επίμυες εμφανίζουν δυσλειτουργία στις διαδικασίες αισθητικοκινητικής δραστηριότητας

Πραγματοποιώντας τη διαδικασία της προπαλμικής αναστολής εκτιμήθηκε η αισθητικοκινητική δραστηριότητα των επιμύων. Η παράμετρος αυτή σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, έχει συνδεθεί πλέον με φαινόμενα δυσλειτουργίας στο στέλεχος και τα βασικά γάγγλια, ενώ γενικότερα η δοκιμασία της προπαλμικής αναστολής χρησιμοποιείται ευρέως για την εκτίμηση ενός ψυχωσικού φαινοτύπου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι AS BAC διαγονιδιακοί επίμυες εμφανίζουν στους 12 μήνες μειωμένα επίπεδα προπαλμικής αναστολής σε σχέση με τους αντίστοιχους WT επίμυες υποδεικνύοντας κάποια δυσλειτουργία στην αισθητικοκινητική δραστηριότητα.

Σε ό, τι αφορά τη βιβλιογραφία, η μελέτη της συγκεκριμένης παραμέτρου για τα ζωικά πειραματικά μοντέλα έχει περιοριστεί κυρίως σε μοντέλα νευροτοξινών με κυριότερο αυτό της 6-OHDA. Τα ευρήματα μας συμφωνούν με τις μελέτες των Issy AC et al., 2015 και Paumier et al., 2013, οι οποίοι αναφέρουν μειωμένη % αναστολή σε επίμυες μετά από χορήγηση της τοξίνης. Η δοκιμασία της προπαλμικής αναστολής όμως έχει μελετηθεί εκτενώς και σε κλινικό επίπεδο με αρκετές μελέτες να αναδεικνύουν μειωμένα επίπεδα αναστολής σε ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο (Abbruzzese and Berardelli et al., 2003; Valls-Solé J et al., 2004). Σε ό, τι αφορά το νευροβιολογικό ή νευροχημικό υπόστρωμα, φαίνεται ότι σημαντικό ρόλο διαδραματίζει το αδρενεργικό σύστημα νευροδιαβίβασης, καθώς υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι η χορήγηση ενός αδρενεργικού ανταγωνιστή, αντιστρέφει τα ελλείμματα που παρατηρούνται στην αισθητικοκινητική δραστηριότητα επιμύων (Bakshi et al., 1997). Στη δική μας περίπτωση, ο φαινότυπος αυτός φαίνεται να υποστηρίζεται από τα υψηλά επίπεδα νοραδρεναλίνης στο ραβδωτό, όπως βρέθηκαν από παράλληλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο (Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία της φοιτήτριας Μαρίας Κορωναίου).

Οι AS BAC διαγονιδιακοί επίμυες εμφανίζουν καταθλιπτικόμορφη συμπεριφορά

Ένας ακόμα στόχος της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η εκτίμηση της καταθλιπτικόμορφης συμπεριφοράς των AS BAC επιμύων. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν δύο συμπεριφορικές δοκιμασίες, αυτή της εξαναγκασμένης κολύμβησης και αυτή της προτίμησης σουκρόζης. Κατά τη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης, μελετήθηκαν συγκεκριμένες παράμετροι οι οποίες έχειδειχθεί πως είναι ευαίσθητες στην αντικαταθλιπτική αγωγή. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν ο συνολικός χρόνος κολύμβησης, αναρρίχησης και ακινησίας καθώς και η συχνότητα της συμπεριφοράς του τινάγματος του κεφαλιού. Μειωμένα επίπεδα των δύο πρώτων παραμέτρων καθώς και αυξημένα επίπεδα των δύο τελευταίων έχουν συνδεθεί σύμφωνα με τη βιβλιογραφία με έναν καταθλιπτικόμορφο φαινότυπο. Το δεύτερο συμπεριφορικό πείραμα, η δοκιμασία προτίμησης σουκρόζης πραγματοποιήθηκε με σκοπό την εκτίμηση της ανηδονίας, η οποία αποτελεί έναν ενδοφαινότυπο της κατάθλιψης. Η εκτίμηση της συγκεκριμένης παραμέτρου βασίζεται στη φυσική προτίμηση των τρωκτικών για γλυκά διαλύματα όπως είναι και αυτό της σουκρόζης. Επομένως, μειωμένη κατανάλωση και κατ' επέκταση προτίμηση έχει συνδεθεί με καταθλιπτικόμορφες συμπεριφορές. Τα αποτελέσματα της δική μας μελέτης υποδηλώνουν έναν τέτοιο καταθλιπτικόμορφο φαινότυπο καθώς οι AS BAC επίμυες εμφάνισαν τόσο μειωμένη συχνότητα της συμπεριφοράς του τινάγματος του κεφαλιού, όσο και μειωμένη κατανάλωση διαλύματος σουκρόζης.

Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα έρχεται σε συμφωνία με τα δεδομένα που αφορούν τους ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο Parkinson και αναφέρουν πως ο φαινότυπος της κατάθλιψης εμφανίζεται σε ένα ποσοστό περίπου 25%. Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι από την ανάλυση των δεδομένων που αφορούν τους χρόνους κολύμβησης, αναρρίχησης και ακινησίας δεν προέκυψε κάποια σημαντική παρατήρηση, γεγονός που είναι πιθανό να οφείλεται στην υπερκινητικότητα των συγκεκριμένων επιμύων.

Οι AS BAC διαγονιδιακοί επίμυες εμφανίζουν δυσλειτουργία σε μαθησιακές διαδικασίες

Στο σύνολο των συμπεριφορικών μελετών που πραγματοποιήσαμε δεν θα μπορούσε να λείπει η μελέτη της μνημονικής και μαθησιακής ικανότητας. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήσαμε τη δοκιμασία του υδάτινου λαβύρινθου κατά Morris. Τα αποτελέσματα αν και δεν ανέδειξαν κάποια σημαντική διαφορά σε σχέση με τη μνημονική ικανότητα των AS BAC επιμύων, έφεραν στην επιφάνεια μία δυσλειτουργία σε σχέση με τις διαδικασίες της μάθησης. Πιο αναλυτικά, σε αντίθεση με τους WT επίμυες, οι διαγονιδιακοί χρειάστηκαν περισσότερο χρόνο για να ολοκληρώσουν την αντίστοιχη δοκιμασία, στόχος της οποίας ήταν να καταφέρουν να μάθουν να βρίσκουν μία κρυμμένη πλατφόρμα χρησιμοποιώντας συγκεκριμένα εξωτερικά στοιχεία προσανατολισμού.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της πλειονότητας αντίστοιχων μελετών. Τα γνωσιακά ελλείμματα αποτελούν το πιο εκτενώς μελετημένο μη κινητικό σύμπτωμα το οποίο φαίνεται να είναι παρόν σχεδόν σε όλα τα πειραματικά ζωϊκά μοντέλα της νόσου Parkinson, είτε αυτά είναι μοντέλα πρωτεϊνικής υπερέκφρασης (Fleming et al., 2009; Masliah et al., 2011; Nuber et al., 2008; Freichel et al., 2007), ή ακόμα και μοντέλα νευροτοξινών (Tadaiesky et al. 2008; Schneider and Pope-Coleman; Kaur et al., 2011). Ο φαινότυπος ο οποίος παρατηρήσαμε, φαίνεται επιπλέον να επιβεβαιώνεται και από τα ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα α-συνουκλείνης που παρατηρήθηκαν στον υπόκαμπο των συγκεκριμένων επιμύων, όπως αναδείχθηκε από παράλληλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο μας (Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία της φοιτήτριας Μαρίας Κορωναίου).

Οι AS BAC διαγονιδιακοί επίμυες δεν εμφανίζουν κινητικά συμπτώματα

Εκτός από την αποτύπωση της συμπτωματολογίας των πρώιμων μη κινητικών συμπτωμάτων της νόσου Parkinson, θέλαμε να μελετήσουμε και την εμφάνιση πιθανών κινητικών συμπτωμάτων, τα οποία και αποτελούν ένα ιδιαίτερα σημαντικό κομμάτι της κλινικής εικόνας της νόσου και αντικατοπτρίζουν τα βασικά παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά, όπως είναι ο εκφυλισμός της μελαινораβδωτής οδού. Εξετάσαμε επομένως την κινητική λειτουργία, καθώς και το συντονισμό των κινήσεων κατά τη βάδιση στο συγκεκριμένο μοντέλο, πραγματοποιώντας τις δοκιμασίες δοκού και ανάλυσης βημάτων. Η επεξεργασία των δεδομένων που σχετίζονται με τις συγκεκριμένες δοκιμασίες δεν ανέδειξαν καμία σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο γονοτύπων σε καμία χρονική περίοδο ανάλυσης.

Τα ευρήματα αυτά, τουλάχιστον στη δική μας περίπτωση, πιθανότατα οφείλονται στο γεγονός ότι στο συγκεκριμένο μοντέλο δεν παρουσιάστηκαν σημάδια εκφυλισμού της μελαινораβδωτής οδού, όπως έδειξαν τα αποτελέσματα από αντίστοιχη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριό μας (Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία της φοιτήτριας Μαρίας Κορωναίου).

Οι AS BAC διαγονιδιακοί επίμυες εμφανίζουν δυσλειτουργία στο GABAεργικό και το γλουταματεργικό σύστημα νευροδιαβίβασης

Σε μία προσπάθεια συσχέτισης των συμπεριφορικών φαινοτύπων των AS BAC διαγονιδιακών επιμύων με συγκεκριμένους νευροχημικούς δείκτες, προσδιορίσαμε μέσω ανάλυσης HPLC, τα επίπεδα μη ντοπαμινεργικών νευροδιαβιβαστών και συγκεκριμένα του γλουταμικού, της γλουταμίνης και του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA) στις εγκεφαλικές περιοχές του ιππόκαμπου, της αμυγδαλής, του φλοιού και του ραβδωτού σώματος, δηλαδή σε περιοχές που σχετίζονται με τη συναισθηματικότητα, τη μνήμη και την κινητική ικανότητα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι διαγονιδιακοί AS BAC επίμυες εμφανίζουν δυσλειτουργία στο γλουταματεργικό και GABAεργικό σύστημα σε δύο από τις περιοχές που μελετήσαμε, στην αμυγδαλή και τον ιππόκαμπο.

Πιο αναλυτικά, για την περίπτωση της αμυγδαλής παρατηρήθηκε ότι το συγκεκριμένο μοντέλο εμφανίζει υψηλά επίπεδα και στα 3 αμινοξέα που μελετήθηκαν σε σχέση με τους επίμυες αγρίου τύπου. Ουσιαστικά, μελετώντας την περιοχή της αμυγδαλής, μελετάμε νευροχημική δραστηριότητα που συσχετίζεται με την αγχώδη συμπεριφορά. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ένας από τους βασικότερους νευροδιαβιβαστές που εμπλέκονται στα μονοπάτια και τη ρύθμιση της αγχώδους συμπεριφοράς (στην αμυγδαλή) είναι το GABA. Πιο αναλυτικά, μέσω πειραματικών μελετών στις οποίες έγινε χρήση συγκεκριμένων αγωνιστών, αναφέρεται ότι η προκαλούμενη αύξηση των επιπέδων GABA, οδηγεί στην εμφάνιση ενός αγχολυτικού φαινοτύπου (Sanders et al., 1995; Barbalho et al.,

2009), γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τη δράση των βενζοδιαζεπινών. Το γεγονός αυτό έρχεται σε απόλυτη συμφωνία με τα δικά μας ευρήματα, τόσο από τη νευροχημική όσο και από τη συμπεριφορική σκοπιά.

Ιδιαίτερα σημαντική όμως φαίνεται να είναι και η σημασία του γλουταματεργικού συστήματος στη ρύθμιση της αγχώδους συμπεριφοράς και γι' αυτό ολοένα και περισσότερες μελέτες ασχολούνται με αυτό το πεδίο αν και τα αποτελέσματα είναι μέχρι στιγμής αντικρουόμενα σχετικά με τον ακριβή ρόλο του γλουταμικού στις διαδικασίες αυτές. Τα αποτελέσματα μας, δηλαδή τα υψηλά επίπεδα γλουταμικού στην αμυγδαλή των AS BAC επιμύων σε συνδυασμό με τη μειωμένη αγχώδη συμπεριφορά που παρατηρήθηκε από τη συμπεριφορική μελέτη, έρχονται σε συμφωνία με ένα σύνολο μελετών που έχει πραγματοποιηθεί σε ζωικά μοντέλα, που δείχνουν ότι η χρήση αγωνιστών ή ανταγωνιστών για τους γλουταματεργικούς υποδοχείς έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση ή αύξηση αντίστοιχα της αγχώδους συμπεριφοράς (Ledgerwood et al., 2003; Fendt et al., 2000). Επειδή όμως υπάρχουν και κάποιες μελέτες που υποστηρίζουν το αντίθετο (Ho et al., 2005), για να μπορέσουμε να έχουμε μία καλύτερη εικόνα της εξωκυττάριας απελευθέρωσης του γλουταμικού, θα μπορούσαμε να αξιοποιήσουμε τεχνικές όπως είναι αυτή της *in vivo* μικροδιαπίδυσης σε μελλοντικές μελέτες.

Ανάλογα είναι και τα δεδομένα που αφορούν τη συσχέτιση των συγκεκριμένων συστημάτων νευροδιαβίβασης με την εγκεφαλική περιοχή του ιππόκαμπου και κατ' επέκταση με τις διαδικασίες της μνήμης και της μάθησης. Συγκεκριμένα, τόσο το γλουταματεργικό, όσο και το GABAεργικό σύστημα φαίνεται να συμμετέχουν ενεργά σε αυτά τα μονοπάτια, με αποτέλεσμα οποιαδήποτε δυσλειτουργία τους να σχετίζεται με την εμφάνιση γνωσιακών ελλειμμάτων. Τα αποτελέσματα της δικής μας μελέτης ανέδειξαν μία αύξηση στα επίπεδα του γλουταμικού, καθώς και μείωση στα επίπεδα του GABA για την περίπτωση των AS BAC επιμύων. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται να συνδυάζονται με την εμφάνιση χωρικού μαθησιακού ελλείματος που παρατηρήσαμε στον υδάτινο λαβύρινθο κατά Morris στο συγκεκριμένο μοντέλο, γεγονός που στηρίζεται σε συγκεκριμένες μελέτες της βιβλιογραφίας.

Πιο αναλυτικά, υψηλά επίπεδα γλουταμικού, καθώς και μειωμένη επαναπρόσληψη αυτού απαντώνται σε πειραματικά μοντέλα της νόσου Alzheimer. Επιπρόσθετα, αναφέρεται ότι η χορήγηση συγκεκριμένου ανταγωνιστή των NMDA υποδοχέων αντέστρεψε ένα μεγάλο μέρος της παθολογίας που οφείλεται στα Αβ πεπτίδια (Danysz and Parsons et al., 2012).

Τέλος, σε ό, τι αφορά τη σύνδεση του GABA με τις μνημονικές και μαθησιακές ικανότητες, παρά το γεγονός ότι δεν είναι πολλές μελέτες που να υποστηρίζουν τη συμμετοχή του στις διαδικασίες αυτές, υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν ότι η μείωση των επιπέδων του συγκεκριμένου νευροδιαβιβαστή οδηγεί στην εμφάνιση γνωσιακών ελλειμμάτων (Porges et al., 2017).

Τελικά συμπεράσματα

Συμπερασματικά λοιπόν, και έχοντας πραγματοποιήσει ένα σύνολο πειραματικών δοκιμασιών, τόσο σε επίπεδο συμπεριφοράς, όσο και σε νευροχημικό επίπεδο, μπορούμε να καταλήξουμε σε κάποια βασικά συμπεράσματα σε σχέση με το διαγονιδιακό μοντέλο των AS BAC επιμών. Πιο συγκεκριμένα, μέσω της συμπεριφορικής ανάλυσης, διαπιστώσαμε ότι το μοντέλο αυτό μπορεί να αποτυπώσει με ακρίβεια ένα μεγάλο μέρος της συμπτωματολογίας που αφορούν τα μη κινητικά συμπτώματα της νόσου Parkinson, καταφέροντας να αναδείξει μάλιστα τα περισσότερα από αυτά από ένα πρώιμο κιόλας στάδιο.

Επιπλέον, η δυνατότητα που μας παρέχεται μέσω του συγκεκριμένου μοντέλου, να παρατηρήσουμε μεταβολές που σχετίζονται με το νευροχημικό υπόστρωμα, δημιουργεί μία ακόμα πιο ολοκληρωμένη εικόνα γύρω από τη νόσο, στόχος της οποίας είναι να πλησιάσει όσο το δυνατόν περισσότερο τα χαρακτηριστικά της παθολογίας που συναντώνται στις ανθρώπινες συνθήκες. Ένα ακόμη σημαντικό στοιχείο το οποίο προέκυψε από τη μελέτη αυτή, αποτελεί το γεγονός ότι μέσω του συγκεκριμένου μοντέλου καταφέραμε να αναδείξουμε σημαντικές διαφυλικές διαφορές.

Ειδικότερα, από την ανάλυση των δεδομένων που συλλέξαμε, παρατηρήσαμε ότι σχεδόν στο σύνολό τους οι φαινότυποι που αναδείχθηκαν, εμφανίστηκαν πιο ισχυροί στην περίπτωση των αρσενικών επιμών σε σχέση με τους θηλυκούς. Κάτι τέτοιο, έρχεται σε απόλυτη συμφωνία με τη βιβλιογραφία, μέσω της οποίας υποστηρίζεται ότι περισσότεροι άνδρες παρά γυναίκες διαγιγνώσκονται με τη νόσο Parkinson κάθε χρόνο σε μία αναλογία περίπου 2:1 (Van Den Eeden et al., 2003). Το γιατί τέτοιες διαφορές παρατηρούνται μεταξύ των δύο φύλων, δεν έχει ξεκαθαριστεί πλήρως, αν και ένα μεγάλο μέρος ερευνητικών μελετών, υποστηρίζουν ότι ιδιαίτερα σημαντική φαίνεται να είναι η συνεισφορά των οιστρογόνων, παρέχοντας έναν ισχυρό νευροπροστατευτικό ρόλο. Πιο αναλυτικά, μία μελέτη η οποία δημοσιεύτηκε το 2007 αναφέρει ότι οι γυναίκες που βιώνουν όψιμη εμμηνόπαυση, ή γεννούν περισσότερες φορές, είναι πιο πιθανό να εμφανίσουν συμπτώματα της νόσου σε πολύ μεγαλύτερη ηλικία σε σχέση με τις υπόλοιπες. Και τα δύο αυτά γεγονότα, σχετίζονται απόλυτα με τα επίπεδα των οιστρογόνων (Haaxma et al., 2007). Επίσης, μία πρόσφατη μελέτη σε μύες με την μετάλλαξη A53T εξέτασε την επίδραση του χρόνιου στρες στην νευροεκφύλιση και έδειξε ότι το χρόνιο στρες επιδεινώνει την νευροεκφύλιση μόνο στους αρσενικούς μύες (Wu et al., 2016).

Το γεγονός ότι μέσω του συγκεκριμένου μοντέλου δεν καταφέραμε τελικά να αποτυπώσουμε το σύνολο της κινητικής συμπτωματολογίας, ή των βασικών παθολογοανατομικών χαρακτηριστικών που συναντάμε στη νόσο Parkinson, δεν πρέπει σε καμία περίπτωση να μειώσει την ισχύ των υπόλοιπων φαινοτυπικών χαρακτηριστικών που αναδείχθηκαν. Αντίθετα, θα πρέπει να αντιμετωπιστεί ως μία ευκαιρία για περαιτέρω ερευνητική μελέτη. Το μοντέλο των διαγονιδιακών AS BAC επιμών αποτελεί ένα καινούριο

πειραματικό εργαλείο πολλά υποσχόμενο και υπάρχουν πολλές ακόμα διαφορετικές πτυχές που πρέπει να μελετηθούν, με σκοπό να απαντηθούν καίρια ερωτήματα. Το κομμάτι των φαινοτυπικών ελλειμμάτων και το πώς αυτά σχετίζονται με την ηλικία, δεν έχει χαρακτηριστεί με λεπτομέρεια στην περίπτωση των διαγονιδιακών AS BAC επιμύων. Αυτός ο τύπος χαρακτηρισμού αποτελεί ένα ιδιαίτερα σημαντικό πεδίο μελέτης, το οποίο μπορεί να συνεισφέρει αποτελεσματικά στον προσδιορισμό ευαίσθητων αλλά και αξιόπιστων μέτρων έκβασης, με σκοπό να διευκολυνθεί η ανάπτυξη φαρμακολογικών θεραπειών σχετικών με τη νόσο Parkinson.

Το γιατί τώρα παρατηρήθηκαν διαφωνίες σε συγκεκριμένες φαινοτυπικές συμπεριφορές, σίγουρα χρειάζεται περαιτέρω μελέτη. Αρχικά, βασιζόμενοι τόσο στη δική μας μελέτη, όσο και σε προηγούμενες, οι οποίες αν και χρησιμοποίησαν το ίδιο μοντέλο με το δικό μας, ανέδειξαν διαφορετικά αποτελέσματα, σε ό, τι αφορά το φαινότυπο της κινητικότητας, της αγγώδους συμπεριφοράς καθώς και της νευροεκφύλισης (με κυριότερη τη μελέτη των Nuber et al., 2013), θα μπορούσαμε ίσως να αναφέρουμε ότι τέτοιες αναντιστοιχίες, θα μπορούσαν να αποδοθούν στις συνθήκες διαβίωσης στο εκάστοτε περιβάλλον. Κάτι τέτοιο μπορεί να στηριχθεί στο γεγονός ότι ναι μεν η παθολογία η οποία σχετίζεται με την α-συνουκλεΐνη μπορεί από μόνη της να οδηγήσει στη νόσο, αλλά και άλλοι παράγοντες όπως είναι για παράδειγμα το στρες, μπορούν επίσης να διαδραματίσουν έναν ιδιαίτερα κρίσιμο ρόλο στη διαδικασία της νευροεκφύλισης (Wu et al., 2016). Επιπλέον, θα μπορούσαμε να θεωρήσουμε ότι οι διαφορετικοί συμπεριφορικοί φαινότυποι στα δικά μας πειράματα αποτελούν μία προσπάθεια του οργανισμού να αντισταθμίσει και να εξισορροπήσει τα ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα της α-συνουκλεΐνης, δημιουργώντας ουσιαστικά έναν μηχανισμό αναπροσαρμογής.

Συμπερασματικά λοιπόν, αυτή η μελέτη καθώς και άλλα αποτελέσματα από το εργαστήριο μας, απεικονίζουν τη χρονική εξέλιξη των ελλειμμάτων στο συγκεκριμένο μοντέλο, συνοψίζοντας πολλά από τα βασικά χαρακτηριστικά της νόσου, συμπεριλαμβανομένων της οφειλούμενης στην α-συνουκλεΐνη νευροπαθολογίας, γνωσιακών και συναισθηματικών ελλειμμάτων καθώς επίσης και νευροχημικών αλλαγών. Παρά το γεγονός ότι το συγκεκριμένο μοντέλο δεν φαίνεται να αναπτύσσει έναν προοδευτικό κινητικό φαινότυπο ή εμφανή σημάδια νευροεκφύλισης, όπως αυτά απαντώνται στη νόσο Parkinson, παραμένει ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο με απτά βιοχημικά και συμπεριφορικά καταληκτικά σημεία- συμπεράσματα, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη δοκιμή θεραπευτικών προσεγγίσεων. Επιπλέον, η ανάδειξη των πρόδρομων συμπτωμάτων, τα οποία φαίνεται να συμβαίνουν ανεξάρτητα από τη νευροεκφύλιση, προσφέρει την δυνατότητα πρώιμης και έγκαιρης παρέμβασης με καινοτόμες θεραπευτικές μεθόδους, που μελλοντικά μπορεί να εφαρμοστούν στο προκλινικό στάδιο της νόσου Parkinson.

XI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Cardoso SM, Moreira PI, Agostinho P, Pereira C and Oliveira CR. Neurodegenerative pathways in Parkinson's disease: therapeutic strategies. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 4:405-419, 2005.
2. Forno, LS. Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 55: 259-722, 1996.
3. Shults CV. Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103:1661-1668, 2006.
4. Dauer W and Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron.* 39:889-909, 2003.
5. Tanner CM and Goldman SM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurol Clin.* 14:317-335, 1997.
6. Semchuk KM, Love EJ and Lee RG. Parkinson's disease and exposure to rural environmental factors: a population based case-control study. *Can J Neurol Sci.* 18:279-286, 1991.
7. Semchuk KM, Love EJ and Lee RG. Parkinson's disease and exposure to agricultural work and pesticide chemicals. *Neurology.* 42:1328-1335, 1992.
8. Semchuk KM, Love EJ and Lee RG. Parkinson's disease: a test of the multifactorial etiologic hypothesis. *Neurology.* 43:1173-1180, 1993.
9. Polymeropoulos MH, Higgins JJ, Golbe LI, Johnson WG, Ide SE, Di Iorio G, Sanges G, Stenroos ES, Pho LT, Schaffer AA, Lazzarini AM, Nussbaum RL and Duvoisin RC. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science.* 274:1197-1199, 1996.
10. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y and Shimizu N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature.* 392:605-608, 1998.
11. Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squitieri F, Ibanez P, Joosse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meco G, van Duijn CM, Oostra BA and Heutink P. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science.* 299:256-259, 2003.
12. Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, González-Maldonado R, Deller T, Salvi S, Cortelli P, Gilks WP, Latchman DS, Harvey RJ,

- Dallapiccola B, Auburger G and Wood NW. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 304:1158-1160, 2004.
13. Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, Kachergus J, Hulihan M, Uitti RJ, Calne DB, Stoessl AJ, Pfeiffer RF, Patenge N, Carbajal IC, Vieregge P, Asmus F, Müller-Myhsok B, Dickson DW, Meitinger T, Strom TM, Wszolek ZK and Gasser T. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron*. 44:601-607, 2004.
 14. Tofaris, GK and MG Spillantini, Alpha-synuclein dysfunction in Lewy body diseases. *Mov Disord*. 12:37-44, 2005.
 15. Spillantini, MG, Divane A and Goedert M. Assignment of human alpha-synuclein (SNCA) and beta-synuclein (SNCB) genes to chromosomes 4q21 and 5q35. *Genomics* 27:379-381, 1995.
 16. Clayton, DF and George JM. Synucleins in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. *J Neurosci Res*. 58:120-129, 1999.
 17. George, JM. The synucleins. *Genome Biol*. 3:Reviews3002, 2002.
 18. Perrin RJ, Woods WS, Clayton DF and George JM. Interaction of human alpha-Synuclein and Parkinson's disease variants with phospholipids. Structural analysis using site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*. 275:34393-34398, 2000.
 19. Vekrellis, K., Rideout HJ, and Stefanis L. Neurobiology of alpha-synuclein. *Mol Neurobiol*. 30:1-21, 2004.
 20. Giasson BI, Duda JE, Forman MS, Lee VM and Trojanowski JQ. Prominent perikaryal expression of alpha- and beta-synuclein in neurons of dorsal root ganglion and in medullary neurons. *Exp Neurol*. 172:354-362, 2001.
 21. el-Agnaf, OM and Irvine GB. Aggregation and neurotoxicity of alpha-synuclein and related peptides. *Biochem Soc Trans*. 30:559-565, 2002.
 22. Venda LL, Cragg SJ, Buchman VL and Wade-Martins R. α -Synuclein and dopamine at the crossroads of Parkinson's disease. *Trends Neurosci*. 33:559-568, 2010.
 23. Weinreb PH, Zhen W, Poon AW, Conway KA and Lansbury PT Jr. NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry*. 35:13709-13715, 1996.
 24. Abeliovich A, Schmitz Y, Fariñas I, Choi-Lundberg D, Ho WH, Castillo PE, Shinsky N, Verdugo JM, Armanini M, Ryan A, Hynes M, Phillips H, Sulzer D and Rosenthal

- A. Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron*. 25:239-252, 2000.
25. Schneider BL, Seehus CR, Capowski EE, Aebischer P, Zhang SC and Svendsen CN. Over-expression of alpha-synuclein in human neural progenitors leads to specific changes in fate and differentiation. *Hum Mol Genet*. 16:651-666, 2007.
26. Proukakis C, Dudzik CG, Brier T, MacKay DS, Cooper JM, Millhauser GL, Houlden H and Schapira AH. A novel alpha-synuclein missense mutation in Parkinson disease. *Neurology* 80:1062-1064, 2013.
27. Li, J., V.N. Uversky, and A.L. Fink. Effect of familial Parkinson's disease point mutations A30P and A53T on the structural properties, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. *Biochemistry* 40:11604-11613, 2001.
28. Irwin DJ, Lee VM, Trojanowski JQ. Parkinson's disease dementia: convergence of α -synuclein, tau and amyloid- β pathologies. *Nat Rev Neurosci*. 14:626-636, 2013.
29. Jankovic, J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 79:368-376, 2008.
30. Kim HS, Cheon SM, Seo JW, Ryu HJ, Park KW and Kim JW. Nonmotor symptoms more closely related to Parkinson's disease: comparison with normal elderly. *J. Neurol. Sci*. 324:70-73, 2013.
31. Hou JG and Lai EC. Non-motor Symptoms of Parkinson's Disease. *International Journal of Gerontology* 1: 53–64, 2007.
32. Pfeiffer RF. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 1:119-22, 2016.
33. Barone P. Neurotransmission in Parkinson's disease: beyond dopamine. *Eur J Neurol*. 17:364-376, 2010.
34. Gureviciene I, Gurevicius K and Tanila H. Role of alpha-synuclein in synaptic glutamate release. *Neurobiol Dis*. 28:83-89, 2007.
35. Sotiriou E, Vassilatis DK, Vila M and Stefanis L. Selective noradrenergic vulnerability in α -synuclein transgenic mice. *Neurobiol Aging* 31:2103-2114, 2010.
36. Deusser J, Schmidt S, Ertle B, Plötz S, Huber S, Müller CP, Masliah E, Winkler J and Kohl Z. Serotonergic dysfunction in the A53T alpha-synuclein mouse model of Parkinson's disease. *J Neurochem*. 135:589-597, 2015.

37. Blandini F and Armentero MT. Animal models of Parkinson's disease. *FEBS J.* 279: 1156–1166, 2012.
38. Przedborski S, Jackson-Lewis V, Naini AB, Jakowec M, Petzinger G and Miller R. The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety. *J Neurochem.* 76: 1265–1274, 2001.
39. Lane EL, Cheetham SC and Jenner P. Does contraversive circling in the 6-OHDA-lesioned rat indicate an ability to induce motor complications as well as therapeutic effects in Parkinson's disease? *Exp Neurol.* 197: 284–290, 2006.
40. Gao HM, Liu B and Hong JS. Critical role for microglial NADPH oxidase in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. *J Neurosci.* 23: 6181–6187, 2003.
41. Thiruchelvam M, Richfield EK, Baggs RB, Tank AW and Cory-Slechta DA. The nigrostriatal dopaminergic system as a preferential target of repeated exposures to combined paraquat and maneb: implications for Parkinson's disease. *J Neurosci.* 20: 9207–9214, 2000.
42. Chesselet MF. In vivo alpha-synuclein overexpression in rodents: a useful model of Parkinson's disease? *Exp. Neurol.* 209: 22–27, 2008.
43. Lam HA, Wu N, Cely I, Kelly RL, Hean S, Richter F, Magen I, Cepeda C, Ackerson LC, Walwyn W, Masliah E, Chesselet MF, Levine MS and Maidment NT. Elevated tonic extracellular dopamine concentration and altered dopamine modulation of synaptic activity precede dopamine loss in the striatum of mice overexpressing human α -synuclein. *J Neurosci Res.* 89:1091-1102, 2011.
44. Li X, Patel JC, Wang J, Avshalumov MV, Nicholson C, Buxbaum JD, Elder GA, Rice ME and Yue Z. Enhanced striatal dopamine transmission and motor performance with LRRK2 overexpression in mice is eliminated by familial Parkinson's disease mutation G2019S. *J. Neurosci.* 30:1788–1797, 2010.
45. Gautier CA, Kitada T and Shen J. Loss of PINK1 causes mitochondrial functional defects and increased sensitivity to oxidative stress. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 105: 11364–11369, 2008.
46. Gispert S, Ricciardi F, Kurz A, Azizov M, Hoepken HH, Becker D, Voos W, Leuner K, Muller WE and Kudin AP. Parkinson phenotype in aged PINK1- deficient mice is accompanied by progressive mitochondrial dysfunction in absence of neurodegeneration. *PLoS One* 4: e5777, 2009.
47. Lu XH, Fleming SM, Meurers B, Ackerson LC, Mortazavi F, Lo V, Hernandez D, Sulzer D, Jackson GR and Maidment NT. Bacterial artificial chromosome transgenic

- mice expressing a truncated mutant parkin exhibit age-dependent hypokinetic motor deficits, dopaminergic neuron degeneration, and accumulation of proteinase K-resistant alpha-synuclein. *J Neurosci.* 29: 1962–1976, 2009.
48. Paterna JC, Leng A, Weber E, Feldon J and Bueler H. DJ-1 and Parkin modulate dopamine-dependent behavior and inhibit MPTP-induced nigral dopamine neuron loss in mice. *Mol Ther.* 15: 698–704. 2007.
 49. Zhou W, Bercury K, Cumiskey J, Luong N, Lebin J and Freed CR. Phenylbutyrate up-regulates the DJ-1 protein and protects neurons in cell culture and in animal models of Parkinson disease. *J. Biol. Chem.* 286:14941–14951, 2011.
 50. Tadaiesky MT, Dombrowski PA, Figueiredo CP, Cargnin-Ferreira E, Da Cunha C and Takahashi RN. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 156:830-840, 2008.
 51. Ferro MM, Bellissimo MI, Anselmo-Franci JA, Angellucci ME, Canteras NS and Da Cunha C. Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: histological, neurochemical, motor and memory alterations. *J Neurosci Methods.* 148:78-87. 2005.
 52. Santiago RM, Barbiero J, Lima MM, Dombrowski PA, Andreatini R and Vital MA. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34:1104-1114, 2010.
 53. Chudler EH and Lu Y. Nociceptive behavioral responses to chemical, thermal and mechanical stimulation after unilateral, intrastriatal administration of 6-hydroxydopamine. *Brain Res.* 1213:41-47, 2008.
 54. Gravotta L, Gavrilá AM, Hood S and Amir S. Global depletion of dopamine using intracerebroventricular 6-hydroxydopamine injection disrupts normal circadian wheel-running patterns and PERIOD2 expression in the rat forebrain. *J Mol Neurosci.* 45:162-171, 2011.
 55. Zhu HC, Zhao J, Luo CY and Li QQ. Gastrointestinal dysfunction in a Parkinson's disease rat model and the changes of dopaminergic, nitric oxidergic, and cholinergic neurotransmitters in myenteric plexus. *J Mol Neurosci.* 47:15-25, 2012.
 56. Schneider JS and Pope-Coleman A. Cognitive deficits precede motor deficits in a slowly progressing model of parkinsonism in the monkey. *Neurodegeneration* 4:245-255, 1995.

57. Slovin H, Abeles M, Vaadia E, Haalman I, Prut Y and Bergman H. Frontal cognitive impairments and saccadic deficits in low-dose MPTP-treated monkeys. *J Neurophysiol.* 81:858-874, 1999.
58. Decamp E and Schneider JS. Attention and executive function deficits in chronic low-dose MPTP-treated non-human primates. *Eur J Neurosci.* 20:1371-1378, 2004.
59. Da Cunha C, Gevaerd MS, Vital MA, Miyoshi E, Andreatini R, Silveira R, Takahashi RN and Canteras NS. Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia. *Behav Brain Res.* 124:9-18, 2001.
60. Goldstein DS, Li ST, Holmes C and Bankiewicz K. Sympathetic innervation in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine primate model of Parkinson's disease. *J Pharmacol Exp Ther.* 306:855-860, 2003.
61. Chaumette T, Lebouvier T, Aubert P, Lardeux B, Qin C, Li Q, Accary D, Bézard E, Bruley des Varannes S, Derkinderen P and Neunlist M. Neurochemical plasticity in the enteric nervous system of a primate animal model of experimental Parkinsonism. *Neurogastroenterol Motil.* 21:215-222, 2009.
62. Vucković MG, Wood RI, Holschneider DP, Abernathy A, Togasaki DM, Smith A, Petzinger GM and Jakowec MW. Memory, mood, dopamine, and serotonin in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse model of basal ganglia injury. *Neurobiol Dis.* 32:319-327, 2008.
63. Rosland JH, Hunskaar S, Broch OJ and Hole K. Acute and long term effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in tests of nociception in mice. *Pharmacol Toxicol.* 70:31-37, 1992.
64. Monaca C, Laloux C, Jacquesson JM, Gelé P, Maréchal X, Bordet R, Destée A and Derambure P. Vigilance states in a parkinsonian model, the MPTP mouse. *Eur J Neurosci.* 20:2474-2478, 2004.
65. Prediger RD, Batista LC, Medeiros R, Pandolfo P, Florio JC and Takahashi RN. The risk is in the air: Intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 202:391-403, 2002.
66. Laloux C, Derambure P, Kreisler A, Houdayer E, Bruezière S, Bordet R, Destée A and Monaca C. MPTP-treated mice: long-lasting loss of nigral TH-ir neurons but not paradoxical sleep alterations. *Exp Brain Res.* 186:635-642, 2008.
67. Yi PL, Tsai CH, Lu MK, Liu HJ, Chen YC and Chang FC. Interleukin-1 β mediates sleep alteration in rats with rotenone-induced parkinsonism. *Sleep.* 30:413-425, 2007.

68. Kaur H, Chauhan S and Sandhir R. Protective effect of lycopene on oxidative stress and cognitive decline in rotenone induced model of Parkinson's disease. *Neurochem Res.* 36:1435-1443, 2011.
69. Drolet RE, Cannon JR, Montero L and Greenamyre JT. Chronic rotenone exposure reproduces Parkinson's disease gastrointestinal neuropathology. *Neurobiol Dis.* 36:96-102, 2009.
70. Greene JG, Noorian AR and Srinivasan S. Delayed gastric emptying and enteric nervous system dysfunction in the rotenone model of Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 218:154-161, 2009.
71. Fleming SM, Tetreault NA, Mulligan CK, Hutson CB, Masliah E and Chesselet MF. Olfactory deficits in mice overexpressing human wildtype alpha-synuclein. *Eur J Neurosci.* 28:247-256, 2008.
72. Fleming SM. Impaired reversal learning in transgenic mice overexpressing human wildtype alpha-synuclein. *Soc Neurosci Abstr.* 341.1:N3, 2008a.
73. Fleming SM. Alterations in heart rate variability in transgenic mice overexpressing human wildtype alpha synuclein. *Soc Neurosci Abstr.* 531.9:K8, 2009.
74. Wang L, Fleming SM, Chesselet MF and Taché Y. Abnormal colonic motility in mice overexpressing human wild-type alpha-synuclein. *Neuroreport.* 19:873-876, 2008.
75. Masliah E, Rockenstein E, Mante M, Crews L, Spencer B, Adame A, Patrick C, Trejo M, Ubhi K, Rohn TT, Mueller-Steiner S, Seubert P, Barbour R, McConlogue L, Buttini M, Games D and Schenk D. Passive immunization reduces behavioral and neuropathological deficits in an alpha-synuclein transgenic model of Lewy body disease. *PLoS One* 6:e19338, 2011.
76. Nuber S, Petrasch-Parwez E, Winner B, Winkler J, von Hörsten S, Schmidt T, Boy J, Kuhn M, Nguyen HP, Teismann P, Schulz JB, Neumann M, Pichler BJ, Reischl G, Holzmann C, Schmitt I, Bornemann A, Kuhn W, Zimmermann F, Servadio A and Riess O. Neurodegeneration and motor dysfunction in a conditional model of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 28:2471-2484, 2008.
77. Freichel C, Neumann M, Ballard T, Müller V, Woolley M, Ozmen L, Borroni E, Kretschmar HA, Haass C, Spooren W and Kahle PJ. Age-dependent cognitive decline and amygdala pathology in alpha-synuclein transgenic mice. *Neurobiol Aging* 28:1421-1435, 2007.

78. George S, van den Buuse M, San Mok S, Masters CL, Li QX and Culvenor JG. Alpha-synuclein transgenic mice exhibit reduced anxiety-like behaviour. *Exp Neurol*. 210:788-792, 2008.
79. Zhang S, Xiao Q and Le W. Olfactory dysfunction and neurotransmitter disturbance in olfactory bulb of transgenic mice expressing human A53T mutant α -synuclein. *PLoS One* 10:e0119928, 2013.
80. Kuo YM, Li Z, Jiao Y, Gaborit N, Pani AK, Orrison BM, Bruneau BG, Giasson BI, Smeyne RJ, Gershon MD and Nussbaum RL. Extensive enteric nervous system abnormalities in mice transgenic for artificial chromosomes containing Parkinson disease-associated alpha-synuclein gene mutations precede central nervous system changes. *Hum Mol Genet*. 19:1633-1650, 2010.
81. Graham DR and Sidhu A. Mice expressing the A53T mutant form of human alpha-synuclein exhibit hyperactivity and reduced anxiety-like behavior. *J Neurosci Res*. 88:1777-1783, 2010.
82. Nuber S, Harmuth F, Kohl Z, Adame A, Trejo M, Schöning K, Zimmermann F, Bauer C, Casadei N, Giel C, Calaminus C, Pichler BJ, Jensen PH, Müller CP, Amato D, Kornhuber J, Teismann P, Yamakado H, Takahashi R, Winkler J, Masliah E and Riess O. A progressive dopaminergic phenotype associated with neurotoxic conversion of α -synuclein in BAC-transgenic rats. *Brain*. 136:412-432, 2013.
83. Abbott A. Laboratory animals: the Renaissance rat. *Nature*. 428:464-466, 2004.
84. Yamakado H, Moriwaki Y, Yamasaki N, Miyakawa T, Kurisu J, Uemura K, Inoue H, Takahashi M and Takahashi R. α -Synuclein BAC transgenic mice as a model for Parkinson's disease manifested decreased anxiety-like behavior and hyperlocomotion. *Neurosci Res*. 73:173-177, 2012.
85. Ngun TC, Ghahramani N, Sánchez FJ, Bocklandt S and Vilain E. The genetics of sex differences in brain and behavior. *Front Neuroendocrinol*. 32:227-246, 2011.
86. Hall CS. Emotional behavior in rat. *Journal of Comparative Psychology*. 18:385-403, 1934.
87. Walf AA and Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc*. 2:322-328, 2007.
88. Pellow S, Chopin P, File SE and Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*. 14:149-167, 1985.
89. Alberts JR and Galef BG Jr. Acute anosmia in the rat: a behavioral test of a peripherally-induced olfactory deficit. *Physiol Behav*. 6:619-216, 1971.

90. Kodosi MH and Swerdlow NR. Prepulse inhibition in the rat is regulated by ventral and caudodorsal striato-pallidal circuitry. *Behav Neurosci.* 109:912-928, 1995.
91. Morris RG, Garrud P, Rawlins JN and O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature.* 229:681-683, 1982.
92. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods.* 11:47-60, 1984.
93. Porsolt RD, Bertin A and Jalfre M. Behavioural despair" in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine. *Eur J Pharmacol.* 51:291-294, 1978.
94. Moreau JL. Validation of an animal model of anhedonia, a major symptom of depression. *Encephale.* 23:280-289, 1997.
95. Drucker-Colin R and Garcia-Hernandez. A new motor test sensitive to aging and dopaminergic function. *J Neurosci Methods.* 39: 153-161, 1999.
96. Carter RJ, Lione LA, Humby T, Mangiarini L, Mahal A, Bates GP, Dunnett SB and Morton AJ. Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. *J Neurosci.* 19:3248-3257, 1999.
97. Beyer PL, Palarino MY, Michalek D, Busenbark K and Koller WC. Weight change and body composition in patients with Parkinson's disease. *J Am Diet Assoc.* 95:979-983, 1995.
98. Chen H, Zhang SM, Hernán MA, Willett WC and Ascherio A. Weight loss in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 53:676-679, 2003.
99. Paumier KL, Sukoff Rizzo SJ, Berger Z, Chen Y, Gonzales C, Kaftan E, Li L, Lotarski S, Monaghan M, Shen W, Stolyar P, Vasilyev D, Zaleska M, D Hirst W and Dunlop J. Behavioral characterization of A53T mice reveals early and late stage deficits related to Parkinson's disease. *PLoS One.* 8:e70274, 2013.
100. Fredriksson A and Archer T. MPTP-induced behavioural and biochemical deficits: a parametric analysis. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect.* 7:123–132, 1994.
101. Oaks AW, Frankfurt M, Finkelstein DI and Sidhu A. Age-dependent effects of A53T alpha-synuclein on behavior and dopaminergic function. *PLoS One.* 8:e60378, 2013.
102. Jennings KA, Loder MK, Sheward WJ, Pei Q, Deacon RM, Benson MA, Olverman HJ, Hastie ND, Harmar AJ, Shen S and Sharp T. Increased expression of the 5-HT transporter confers a low-anxiety phenotype linked to decreased 5-HT transmission. *J Neurosci.* 26:8955-8964, 2006.

103. Kalueff AV, Fox MA, Gallagher PS and Murphy DL. Hypolocomotion, anxiety and serotonin syndrome-like behavior contribute to the complex phenotype of serotonin transporter knockout mice. *Genes Brain Behav.* 6:389-400, 2007.
104. Kalueff AV, Olivier JD, Nonkes LJ and Homberg JR. Conserved role for the serotonin transporter gene in rat and mouse neurobehavioral endophenotypes. *Neurosci Biobehav Rev.* 34:373-86, 2010.
105. Ross GW, Petrovitch H, Abbott RD, Tanner CM, Popper J, Masaki K, Launer L and White LR. Association of olfactory dysfunction with risk for future Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 63:167-173, 2008.
106. Issy AC, Padovan-Neto FE, Lazzarini M, Bortolanza M and Del-Bel E. Disturbance of sensorimotor filtering in the 6-OHDA rodent model of Parkinson's disease. *Life Sci.* 125:71-78, 2015.
107. Abbruzzese G and Berardelli A. Sensorimotor integration in movement disorders. *Mov Disord.* 18:231-240, 2003.
108. Valls-Solé J, Muñoz JE and Valldeoriola F. Abnormalities of prepulse inhibition do not depend on blink reflex excitability: a study in Parkinson's disease and Huntington's disease. *Clin Neurophysiol.* 115:1527-1536, 2004.
109. Bakshi VP and Geyer MA. Phencyclidine-induced deficits in prepulse inhibition of startle are blocked by prazosin, an alpha-1 noradrenergic antagonist. *J Pharmacol Exp Ther.* 283:666-674, 1997.
110. Sanders SK and Shekhar A. Regulation of anxiety by GABAA receptors in the rat amygdala. *Pharmacol Biochem Behav.* 52:701–706, 1995.
111. Barbalho CA, Nunes-de-Souza RL and Canto-de-Souza A. Similar anxiolytic-like effects following intra-amygdala infusions of benzodiazepine receptor agonist and antagonist: evidence for the release of an endogenous benzodiazepine inverse agonist in mice exposed to elevated plus-maze test. *Brain Res.* 1267:65–76, 2009.
112. Ledgerwood L, Richardson R and Cranney J. Effects of D-cycloserine on extinction of conditioned freezing. *Behav Neurosci.* 117:341-349, 2003.
113. Fendt M. Expression and conditioned inhibition of fear-potentiated startle after stimulation and blockade of AMPA/Kainate and GABA(A) receptors in the dorsal periaqueductal gray. *Brain Res.* 880:1-10, 2000.

114. Ho YJ, Hsu LS, Wang CF, Hsu et al. Behavioral effects of d-cycloserine in rats: The role of anxiety level. *Brain Res.* 2005;1043:179-185.

Danysz W and Parsons CG. Alzheimer's disease, β -amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine--searching for the connections. *Br J Pharmacol.* 167:324-352, 2012.

116. Van Den Eeden SK, Tanner CM, Bernstein AL, Fross RD, Leimpeter, A, Bloch DA and Nelson LM. Incidence of Parkinson's disease: Variation by age, gender and race/ethnicity. *American Journal of Epidemiology*, 157:1015-1022, 2003.

117. Haaxma CA, Bloem BR, Borm GF, Oyen WJ, Leenders KL, Eshuis S, Booij J, Dluzen DE and Horstink MW. Gender differences in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 78:819-824, 2007.

118. Wu Q, Yang X, Zhang Y, Zhang L, Feng L. Chronic mild stress accelerates the progression of Parkinson's disease in A53T α -synuclein transgenic mice. *Exp Neurol.* 285:61-71, 2016.