

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών



**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών - Μοριακής
Ιατρικής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ
Κατεύθυνση: Νευροβιολογία**

**Διαφυλικές διαφορές στην επίδραση της
διαβίωσης σε εμπλουτισμένο περιβάλλον
στο γλουταματεργικό σύστημα**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ελένη Α. Τζουβέκα

Βιολόγος

ΑΘΗΝΑ

2015

Στον άντρα μου και στα μωράκια
που περιμένουμε με αγάπη

Τριμελής εξεταστική
επιτροπή:

1. **Ζ. Παπαδοπούλου**
Νταϊφώτη,
Ομότιμη Καθηγήτρια
Φαρμακολογίας

2. **Χρ. Δάλλα**
Επίκουρη
Καθηγήτρια
Φαρμακολογίας
Επιβλέπουσα

3. **Δ. Σανούδου**
Επίκουρη
Καθηγήτρια
Φαρμακολογίας

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας βρέθηκα τον Νοέμβρη του 2011 μέσω της πρώτης κυκλικής άσκησης του Μεταπτυχιακού Προγράμματος, με υπεύθυνη τότε τη διευθύντρια του εργαστηρίου και νυν Ομότιμη Καθηγήτρια κα Ζ. Παπαδοπούλου – Νταϊφώτη. Το χρονικό διάστημα παραμονής μου στο εργαστήριο, μου έδωσε τη δυνατότητα να ασχοληθώ με ένα νέο προς εμένα αντικείμενο έρευνας, που αφορούσε φαρμακολογικές, συμπεριφορικές, νευροχημικές και νευροβιολογικές μελέτες, που σχετίζονται με το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα και πιο συγκεκριμένα που αναφέρονται στην παθοφυσιολογία της κατάθλιψης και στην απαντητικότητα στην αντικαταθλιπτική αγωγή, με έμφαση στις διαφορές του φύλου. Μέσα από την επαφή με το νέο αυτό αντικείμενο, κατάφερα να αποκτήσω νέες εμπειρίες σε τεχνικές για εμένα άγνωστες μέχρι τότε και να αποκομίσω γνώσεις και ενδιαφέρον για το νέο αυτό αντικείμενο.

Το περιβάλλον του εργαστηρίου ήταν ιδιαίτερα θερμό κι έτσι δεν άργησα να νιώσω οικεία και φιλικά, πιστεύοντας και εκτιμώντας τους συνεργάτες μου. Φτάνοντας λοιπόν και στο τέλος αυτού του μικρού σε χρονικό διάστημα, αλλά μεγάλο σε εμπειρίες, ταξιδιού, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς όλους όσους με στήριξαν, με βοήθησαν και πίστεψαν σε μένα.

Νιώθω ευγνώμον και ευχαριστώ από καρδιάς την **Ομότιμη Καθηγήτρια κα Ζ. Παπαδοπούλου – Νταϊφώτη**, διότι ήταν ο πρώτος άνθρωπος κατά την αξιολόγηση για το συγκεκριμένο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα, που πίστεψε σε εμένα, που με στήριξε και μου έδειξε την αγάπη και το ενδιαφέρον της. Ένα ευχαριστώ σε έναν άνθρωπο με τέτοιο μεγαλείο ψυχής ξέρω ότι δεν αρκεί, αλλά νιώθω τυχερή που είχα τη δυνατότητα να τη γνωρίσω, να την ακούσω και να την θαυμάσω σαν άνθρωπο και σαν επιστήμονα.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω την **Επίκουρη Καθηγήτρια κα Χριστίνα Δάλλα**, για την καθοδήγησή της, το ενδιαφέρον της, τη στήριξη και τη βοήθειά της τόσο σε επίπεδο συνεργασίας όσο και σε επίπεδο προσωπικό και της εύχομαι ολόψυχα καλή συνέχεια στο επιστημονικό της έργο.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα επίσης να πω στον **Δρ. Δημήτρη Μπεσίνη, Ιατρό**, διότι απετέλεσε την αφετηρία έναρξης της παρούσας εργασίας και χάρις στο δικό του έργο, είχα την τύχη να ολοκληρώσω κι εγώ το δικό μου. Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και τη βοήθεια στην επίλυση διαφόρων αποριών που αφορούν στην παρούσα εργασία.

Επίσης, ευχαριστώ τον **Δρ. Γιάννη Σωτηρόπουλο, Βιολόγο**, για τη βοήθειά του στην εκμάθηση της τεχνικής Western Blot, για την καθοδήγησή του στις παρουσιάσεις της συγκεκριμένης εργασίας, που έλαβαν χώρα σε επιστημονικά συνέδρια τα οποία διεξήχθησαν στην Αθήνα, καθώς επίσης και για τη συμβολή και βοήθειά του στη δημοσίευση της συγκεκριμένης εργασίας.

Έπειτα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την **Τεχνικό του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας κα Δέσποινα Παπασάββα**, διότι ήταν η πρώτη που με ξενάγησε στα νέα για εμένα τεχνικά πρωτόκολλα του εργαστηρίου, μου δίδαξε διάφορες τεχνικές, με βοήθησε όσες φορές τη χρειάστηκα αδιαμαρτύρητα και με τη συμπεριφορά και τον χαρακτήρα της με έκανε απλά να τη νιώσω πραγματική φίλη.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου: **Βασίλη Καφετζόπουλο, Νίκο Παστρωμά, Θοδωρή Μαυρίδη, Χρυσούλα Διολή, Μαρία Κορωναίου, Ηλέκτρα Παπακωνσταντίνου και Κατερίνα Δούκα** και να ευχηθώ στον καθένα ξεχωριστά τα καλύτερα για το μέλλον, την καριέρα και την προσωπική τους ζωή.

Ένα μεγάλο ευχαριστήσω για πολλοστή φορά στους **γονείς μου** Λάμπρο και Ευγενία Τζουβέκα, αλλά και στα **αδέρφια μου**, Ηλία, Γιώργο και Πατέρα Κωνσταντίνο, για τις θυσίες που έχουν κάνει για μένα όλα αυτά τα χρόνια σπουδών, για τη συνεχή στήριξη τους σε κάθε στιγμή της ζωής μου, είτε καλή είτε άσχημη, και για την απέραντη αγάπη τους. Νιώθω απλά τυχερή και ευλογημένη που έχω την οικογένεια αυτή.

Επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ στον άνθρωπο που είναι θωρακισμένος με απίστευτη υπομονή, απέραντη αγάπη και ατσάλινα νεύρα για να αντέχει τις όποιες παραξενιές μου, στον άνθρωπο που μου δίνει δύναμη ώστε να μπορώ να στέκομαι στον ύψος των περιστάσεων, στον άνθρωπο που με γεμίζει συναισθήματα και δεν αφήνει ποτέ να αδειάσει η καρδιά μου και που θα αγαπώ πάντα. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στο δικό μου άνθρωπο και σύντροφο της ζωής μου, **Θάνο**.

Τέλος, οφείλω να ευχαριστήσω τον εαυτό μου, για την επιμονή και υπομονή μου και το Θεό που δεν με έχει εγκαταλείψει ποτέ.

Σας ευχαριστώ όλους από τα βάθη της καρδιάς μου.

Ελένη Τζουβέκα

“Science, my lad, is made up of mistakes, but they are mistakes which are useful to make, because they lead little by little to the truth. Jules Verne”

ΣΚΟΠΟΣ

Η έκθεση σε εμπλουτισμένο περιβάλλον αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την ανάπτυξη και την πλαστικότητα του εγκεφάλου. Συγκεκριμένα, το εμπλουτισμένο περιβάλλον έχει ευεργετικές δράσεις στη δομή και λειτουργία του εγκεφάλου, επάγοντας τη συναπτογένεση και τη νευρογένεση. Παρόλο που είναι γνωστό ότι διάφοροι επιβλαβείς παράγοντες, όπως είναι η έκθεση στο στρες, επηρεάζουν διαφορετικά τον αρσενικό και θηλυκό εγκέφαλο, δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα σχετικά με τη διαφορετική απόκριση των δύο φύλων σε ευεργετικές περιβαλλοντικές παραμέτρους, όπως είναι το εμπλουτισμένο περιβάλλον.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης του εμπλουτισμένου περιβάλλοντος σε θηλυκούς και αρσενικούς επίμυες και η ανεύρεση διαφυλικών διαφορών στο γλουταματεργικό σύστημα. Ο σκοπός αυτός προσεγγίστηκε μέσω της μελέτης συμπεριφορικών, νευροχημικών και μοριακών παραμέτρων σε αρσενικούς και θηλυκούς επίμυες μετά από την εφαρμογή του εμπλουτισμένου περιβάλλοντος από τη γέννησή τους μέχρι την ενήλικη ζωή. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν:

- Συμπεριφορικές αποκρίσεις αρσενικών και θηλυκών επίμυων που σχετίζονται με την κινητικότητα.
- Συμπεριφορικές αποκρίσεις αρσενικών και θηλυκών επίμυων που σχετίζονται με τη μνήμη και τη μάθηση.
- Νευροχημικός προσδιορισμός γλουταμικού και ασπαρτικού οξέος στον ιππόκαμπο και στον προμετωπιαίο φλοιό αρσενικών και θηλυκών επίμυων.
- Μοριακός προσδιορισμός κυτταροσκελετικών και άλλων συναπτικών πρωτεϊνών στον ιππόκαμπο και στον προμετωπιαίο φλοιό αρσενικών και θηλυκών επίμυων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	4
ΣΚΟΠΟΣ	6
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	7
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1 Εγκέφαλος	10
1.2 Εγκεφαλικός φλοιός	11
1.3 Ιππόκαμπος	12
1.4 Προμετωπιαίος φλοιός	19
1.5 Νευροδιαβιβαστές	23
1.5.1 Γλουταμικό οξύ και χημικές ιδιότητες	25
1.5.1.1 Γλουταμικό οξύ και ανάπτυξη του νευρικού συστήματος	28
1.5.1.2 Γλουταμικό οξύ και νευροτοξικότητα	31
1.6 Πλαστικότητα του εγκεφάλου, νευρογένεση και συναπτογένεση.....	34
1.7 Εμπλουτισμένο περιβάλλον	43
1.8 Συμπεριφορά.....	53
1.8.1 Μνήμη-μάθηση	54
1.8.2 Εγκεφαλικές περιοχές που συμμετέχουν στη μνήμη	57
1.8.3 Μνήμη και ιππόκαμπος.....	58
1.8.4 Άγχος-Φόβος	59
1.9 Διαφυλικές διαφορές.....	61
2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	65
2.1 Πειραματόζωα	65
2.2 Εμπλουτισμός Περιβάλλοντος	65
2.3 Πειραματικός σχεδιασμός.....	67
2.3.1 Εμπλουτισμός του περιβάλλοντος μέχρι την ενήλικη ζωή	67
2.4 Συμπεριφορικές δοκιμασίες	67
2.4.1 Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (Open Field Test)	67
2.4.2 Δοκιμασία οπτικής αναγνώρισης αντικειμένου (Object Recognition Test).....	69
2.5 Θυσία πειραματοζώων.....	71
2.6 Νευροχημική ανάλυση.....	72
2.6.1 Μέθοδος Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης με Ηλεκτροχημικό Ανιχνευτή (HPLC-ED) για τον προσδιορισμό γλουταμικού και ασπαρτικού οξέος.	72
2.7.1 Τεχνική Western Blot	75
2.8 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ	86
2.8.1 Συμπεριφορά ανοιχτού πεδίου (Open Field Test)	86
2.8.2 Οπτική αναγνώριση αντικειμένου (Object Recognition Test)	86
2.8.3 Νευροχημικοί προσδιορισμοί.....	87
2.8.4 Μοριακοί προσδιορισμοί.....	87

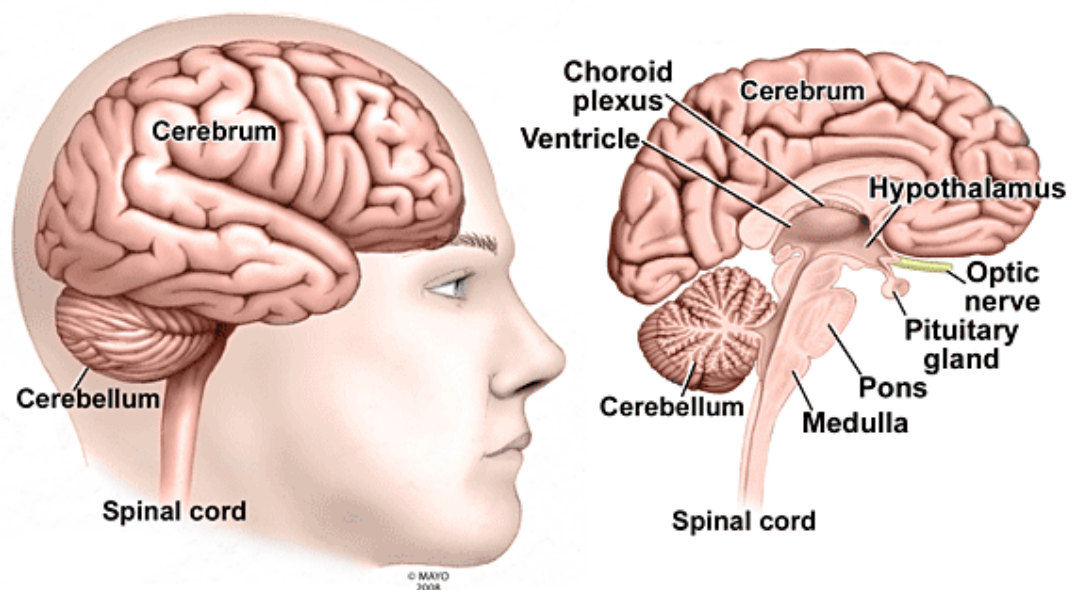
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	88
3.1	Συμπεριφορά ανοιχτού πεδίου (Open Field Test)	88
3.2	Δοκιμασία αναγνώρισης αντικειμένου (Object Recognition Test)	89
3.3	Νευροχημικοί προσδιορισμοί.....	90
3.3.1	Γλουταματεργική δραστηριότητα στον ιππόκαμπο	90
3.3.2	Γλουταματεργική δραστηριότητα στον προμετωπιαίο φλοιό.....	91
3.4	Μοριακοί προσδιορισμοί.....	92
3.4.1	Ιππόκαμπος	92
3.4.1.1	Μοριακός προσδιορισμός κυτταροσκελετικών και συναπτικών πρωτεϊνών.....	92
3.4.1.2	Μοριακός προσδιορισμός συναπτικών κινασών (synaptic kinases): Cdk5 και p35. ..	96
3.4.2	Προμετωπιαίος Φλοιός.....	99
3.4.2.1	Μοριακός προσδιορισμός του συναπτικού υποδοχέα NR2B.....	100
3.4.2.2	Μοριακός προσδιορισμός της μετασυναπτικής πρωτεΐνης PSD95.....	100
3.4.2.3	Μοριακός προσδιορισμός της υπομονάδας 1A του υποδοχέα της σεροτονίνης: 5HT1A.	101
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	103
4.1	Συμπεριφορά ανοιχτού πεδίου (Open Field Test)	103
4.2	Δοκιμασία αναγνώρισης αντικειμένου (Object Recognition Test).....	105
4.3	Νευροχημικός προσδιορισμός γλουταμικού οξέος στον προμετωπιαίο φλοιό και στον ιππόκαμπο.	106
4.4	Επιπτώσεις του εμπλουτισμένου περιβάλλοντος στα επίπεδα των συναπτικών πρωτεϊνών σε ιππόκαμπο και προμετωπιαίο φλοιό.	109
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	115

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Εγκέφαλος

Η ανθρώπινη συμπεριφορά σχετίζεται άμεσα με την ανατομία και τη φυσιολογία του νευρικού συστήματος. Βασικός στόχος της έρευνας για τον εγκέφαλο είναι να εξιχνιάσει το νευροβιολογικό υπόστρωμα της συμπεριφοράς και των νευροψυχιατρικών διαταραχών. Σήμερα, είναι πλέον αποδεκτό ότι οι σύνθετες νοητικές λειτουργίες και ικανότητες που χαρακτηρίζουν τον άνθρωπο πηγάζουν από τη σειριακή και παράλληλη διασύνδεση και επικοινωνία επιμέρους περιοχών του εγκεφάλου.

Το νευρικό σύστημα υποδιαιρείται σε δυο κύρια μέρη: το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) και το περιφερικό νευρικό σύστημα (ΠΝΣ). Το ΚΝΣ αποτελείται από τον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό που αποτελούν τα πιο προστατευμένα μέρη του σώματος. Η προστασία αυτή προσφέρεται με τέσσερις τρόπους (κρανιακή κάψα, μήνιγγες, εγκεφαλονωτιαίο υγρό και αιματοεγκεφαλικός φραγμός). Ο εγκέφαλος του ενηλίκου αποτελείται από τον προμήκη μυελό, τη γέφυρα, την παρεγκεφαλίδα, το μεσεγκέφαλο, το διεγκέφαλο (θάλαμο, υποθάλαμο), και τα κεντρικά ημισφαίρια (εγκεφαλικός φλοιός και πυρήνες) (Εικόνα 1).



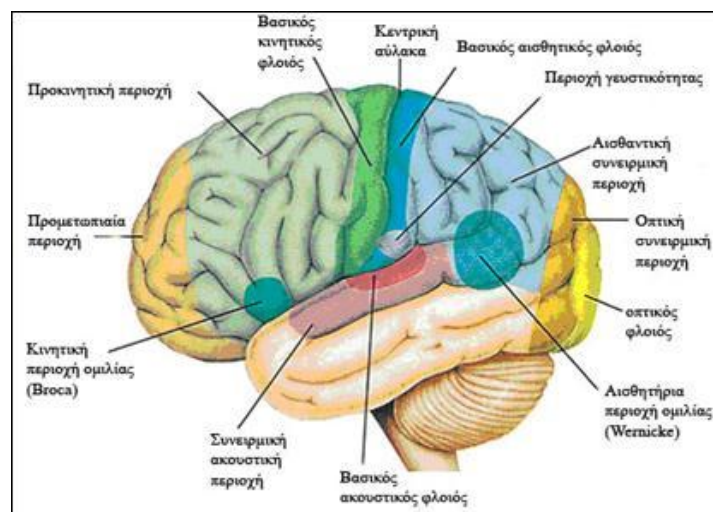
Εικόνα 1: Ανατομική απεικόνιση του εγκεφάλου

1.2 Εγκεφαλικός φλοιός

Η εξωτερική επιφάνεια των εγκεφαλικών ημισφαιρίων έχει πολλαπλές προεξοχές αυλακώσεις ποικίλου βάθους. Οι βαθιές αύλακες ονομάζονται σχισμές, ενώ τα γεφυρώματα και οι περιελίξεις ονομάζονται έλικες κι έχουν σαν αποτέλεσμα την αύξηση της επιφάνειας των εγκεφαλικών ημισφαιρίων. Οι βαθύτερες αύλακες χωρίζουν κάθε ημισφαίριο σε τέσσερις λοβούς: το μετωπιαίο, το βρεγματικό, τον ινιακό και τον κροταφικό.

Ο εγκεφαλικός φλοιός διαιρείται σε τέσσερις λοβούς που έχουν πάρει το όνομά τους από τα οστά του κρανίου κάτω από τα οποία βρίσκονται: *μετωπιαίος, βρεγματικός, κροταφικός* και *ινιακός* (Εικόνα 2). Στο βάθος της πλάγιας σχισμής βρίσκεται μια αρχέγονη περιοχή, η νήσος του Reil, η οποία σύμφωνα με ορισμένους ερευνητές θεωρείται ο πέμπτος λοβός του εγκεφάλου.

Κάθε περιοχή του φλοιού είναι εξειδικευμένη για μία συγκεκριμένη λειτουργία και αποτελεί το κέντρο της λειτουργίας αυτής. Ο μετωπιαίος λοβός είναι υπεύθυνος για το σχεδιασμό και την εκτέλεση των κινήσεων, ενώ ο προμετωπιαίος λοβός είναι σημαντικός για τις πνευματικές λειτουργίες και τον καθορισμό της προσωπικότητας του ατόμου. Στο βρεγματικό λοβό εντοπίζονται τα αισθητικά κέντρα των γενικών αισθήσεων (αφή, πίεση, πόνος και θερμοκρασία) και της γεύσης. Στον κροταφικό λοβό εντοπίζεται το κέντρο ακοής και στον ινιακό το κέντρο όρασης.



Εικόνα 2: Λοβοί και αντίστοιχες λειτουργίες του εγκεφαλικού φλοιού.

Πολλές από τις περιοχές του εγκεφαλικού φλοιού σχετίζονται με την επεξεργασία αισθητικών πληροφοριών ή κινητικών εντολών. Οι περιοχές αυτές είναι γνωστές ως **πρωτοταγείς, δευτεροταγείς και τριτοταγείς**. Οι όροι αυτοί αντανακλούν το επίπεδο επεξεργασίας των πληροφοριών που επεξεργάζεται κάθε περιοχή.

Οι πρωτοταγείς περιοχές του φλοιού δέχονται πληροφορίες κατευθείαν από το νωτιαίο μυελό ή από περιφερικά υποδεκτικά όργανα, με τη μεσολάβηση λίγων διάμεσων πυρήνων επεξεργασίας και αναμετάδοσης των πληροφοριών.

Οι δευτερογενείς και τριτογενείς περιοχές δέχονται μηνύματα από τις πρωτοταγείς και επεξεργάζονται τις σύνθετες πλευρές μιας μόνο αίσθησης ή πληροφορίας που σχετίζεται με κινητική λειτουργία.

Οι αισθητικές περιοχές ανώτερης τάξης ολοκληρώνουν πληροφορίες προερχόμενες από τις πρωτοταγείς αισθητικές περιοχές. Αντίθετα, οι κινητικές περιοχές ανώτερης τάξης στέλνουν στον πρωτοταγή κινητικό φλοιό τις σύνθετες πληροφορίες που απαιτούνται για μια κινητική ενέργεια. Εκτός αυτών, στο φλοιό υπάρχουν και οι τρεις **συνειρμικές περιοχές** οι οποίες περιβάλλουν τις προαναφερθείσες. Στις περιοχές αυτές επιτελείται το ανώτερο επίπεδο απαρτίωσης των αισθητικών και κινητικών πληροφοριών. Σε αυτές τις περιοχές συνδυάζονται τα δεδομένα διαφόρων αισθητικών, κινητικών και μεταιχμιακών περιοχών και σχηματίζεται η ενιαία αντίληψη.

1.3 Ιππόκαμπος

Ιστορικά, η πιο επικρατούσα άποψη υποστήριζε ότι ο ιππόκαμπος σχετιζόταν με την αίσθηση της όσφρησης. Σήμερα θεωρείται ότι αυτό αποτελεί την πρωταρχική του λειτουργία εξελικτικά. Με το πέρασμα των χρόνων έγινε φανερό ότι ο ιππόκαμπος ανήκε στο μεταιχμιακό σύστημα και τρεις κύριες ιδέες που αφορούν τη λειτουργία του έχουν κυριαρχήσει στη βιβλιογραφία: αναστολή, μνήμη και χώρος. Ο ιππόκαμπος είναι μία από τις πιο καλά

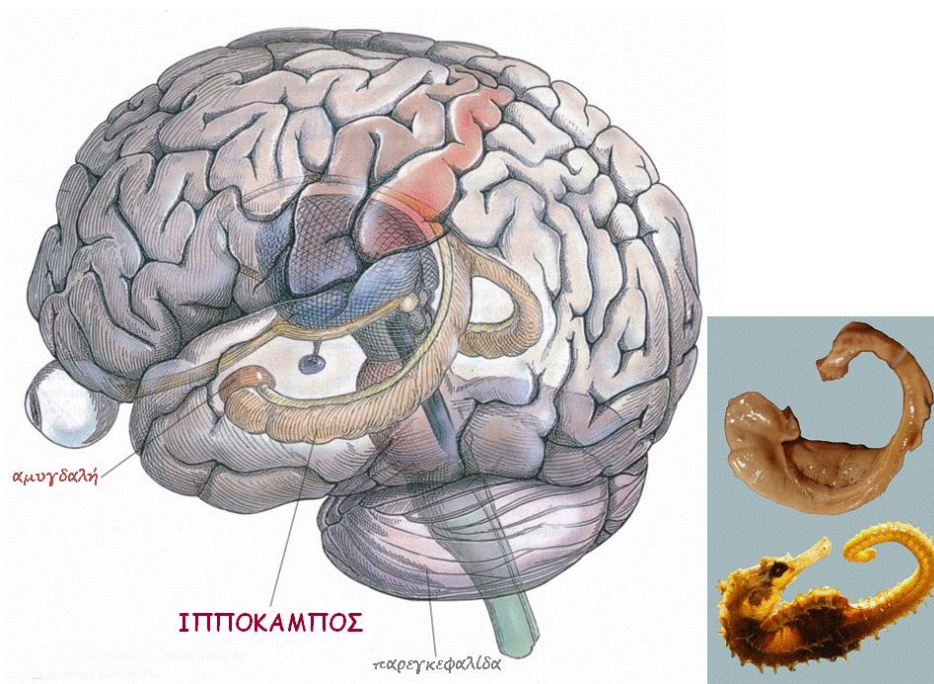
μελετημένες δομές του εγκεφάλου. Οι κύριοι λόγοι για τους οποίους συμβαίνει αυτό είναι τρεις:

1. Ο πρώτος λόγος αναφέρεται στο γεγονός ότι αποτελεί μία δομή ξεχωριστή και αναγνωρίσιμη τόσο σε ανατομικό, όσο και σε ιστολογικό επίπεδο. Το ασυνήθιστο σχήμα του τον κάνει να μοιάζει με το θαλάσσιο ιππόκαμπο, απ' όπου και το όνομά του (Εικόνα 3). Λέγεται επίσης και κέρας του Άμμωνος λόγω της ομοιότητάς του με τον Αιγυπτιακό θεό Άμμωνα που έχει το κεφάλι ενός κριού. Η ιστολογία του ιππόκαμπου είναι όμως αυτή που τον κάνει τόσο ελκυστικό στους νευροεπιστήμονες.

2. Ο δεύτερος λόγος για τον οποίον ο ιππόκαμπος παρουσιάζει ενδιαφέρον είναι ότι νωρίς από την δεκαετία του 1950 μέχρι και σήμερα έχει φανεί πως ο ρόλος του σε ανώτερες εγκεφαλικές διεργασίες, όπως αυτές της μνήμης και της μάθησης είναι καθοριστικός. Νευροφυσιολογικές έρευνες παρατηρούν ότι ο ιππόκαμπος είναι απολύτως απαραίτητος για τη λειτουργία της βραχυπρόθεσμης λειτουργικής μνήμης και για την εδραίωση μακροχρόνιων μνημών στο φλοιό. Κοινό με τα παραπάνω αποτελεί η νόσος του Alzheimer στην οποία υπάρχουν βλάβες στον ιππόκαμπο νωρίτερα από άλλα μέρη του φλοιού (μετωπιαίοι λοβοί). Έτσι, η μνήμη είναι συνήθως η πρώτη λειτουργία η οποία διαταράσσεται στη νόσο.

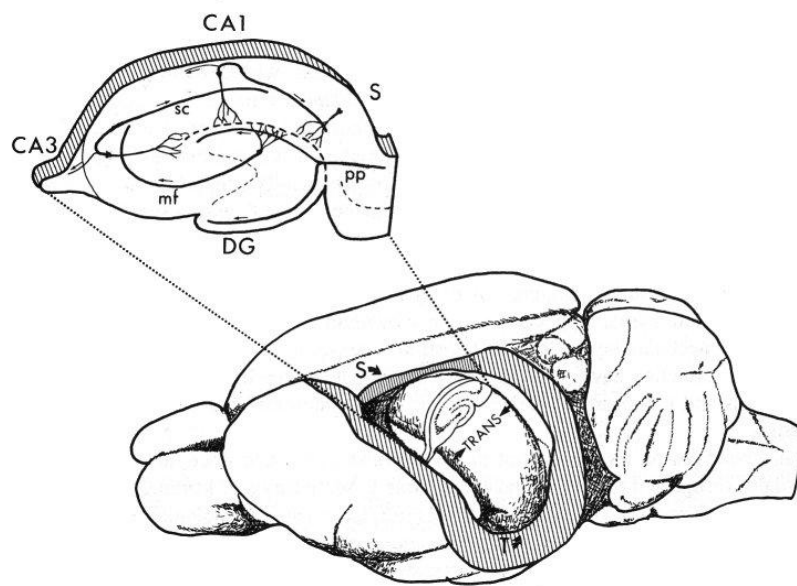
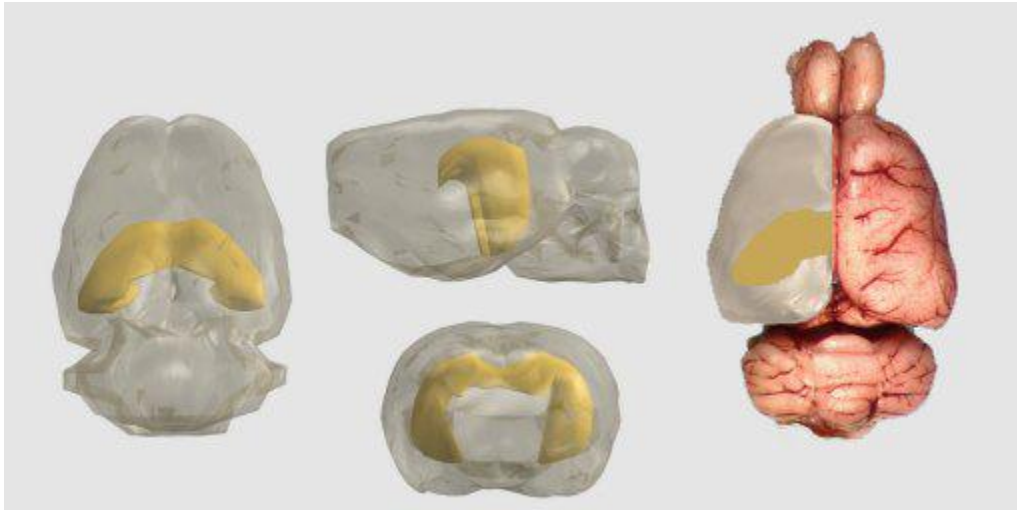
3. Ο τρίτος λόγος για τη σημαντικότητα του ιππόκαμπου είναι ότι περιλαμβάνεται σε σοβαρές διανοητικές ασθένειες. Βλάβες του κοιλιακού ιππόκαμπου σε πειραματόζωα (το ανάλογο του προσθίου τμήματος του ιππόκαμπου στον άνθρωπο) προκαλούν συμπεριφορικές αλλαγές ανάλογες των συμπτωμάτων της σχιζοφρένειας (Daenen, Wolterink et al. 2003), ενώ άλλες εργασίες αναφέρουν πως ο όγκος του πρόσθιου ιππόκαμπου σε ασθενείς με σχιζοφρένεια είναι συχνά ελαττωμένος (Daenen, Wolterink et al. 2003). Ακόμα φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με εγκεφαλική ισχαιμία και ανοξία καθώς και στην επιληπτογένεση, όπου παρουσιάζει τον χαμηλότερο επιληπτικό ουδό από οποιαδήποτε άλλη εγκεφαλική περιοχή.

Τέλος, ενδεικτικό του ενδιαφέροντος της επιστημονικής κοινότητας και όχι μόνο είναι οι μελέτες του πανεπιστημιακού κολλεγίου του Λονδίνου (Maguire, Mummery et al. 2000) που έδειξαν πως μέρος του ιππόκαμπου των οδηγών ταξί είναι μεγαλύτερο από ότι στο ευρύ κοινό. Ερευνητές του πανεπιστημίου της Ιντιάνα σε μελέτη που έγινε σε επίμυες έδειξαν ότι τα αρσενικά βρίσκουν καλύτερα τα ίχνη τους επειδή έχουν μεγαλύτερο ιππόκαμπο από τα θηλυκά.



Εικόνα 3. Θέση του ιππόκαμπου στον ανθρώπινο εγκέφαλο.

Ο ιπποκάμπειος σχηματισμός του επίμυος αποτελεί μία επιμήκη δομή σχήματος C συμμετρική ως προς τη μέση γραμμή του εγκεφάλου, που εκτείνεται προσθιοραχιαία από το διαφραγματικό πυρήνα του πρόσθιου εγκεφάλου περνώντας πάνω και πίσω από το διεγκέφαλο μέχρι την αρχή του κροταφικού λοβού οπισθοκοιλιακά. Το τμήμα του ιππόκαμπου πλησιέστερα προς τους πυρήνες του διαφράγματος αποτελεί τον διαφραγματικό (ραχιαίο) ιππόκαμπο στον αρουραίο και αντιστοιχεί στον οπίσθιο του ανθρώπου, ενώ το τμήμα προς τον κροταφικό (κοιλιακό) ιππόκαμπο αντιστοιχεί στον πρόσθιο του ανθρώπου (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Α) Εγκέφαλος αρουραίου και δομή ιππόκαμπου. **Β)** Ιππόκαμπος αρουραίου από πλευρική άποψη. Σημειώνεται ο επιμήκης (ραχιαίο-κοιλιακός ST) και ο εγκάρσιος άξονάς του (trans). Πάνω αριστερά: τομή κατά τον εγκάρσιο άξονα και οι διάφορες περιοχές του ιπποκάμπειου σχηματισμού καθώς και οι εσωτερικές συνδέσεις τους. DG-οδοντωτή έλικα, CA1,CA3-τα πεδία του ιππόκαμπου, S-υπόθεμα, pp-διατιτραίνουσα οδός, Sc-παράπλευρες ίνες του Schaffer, mf-βρυώδεις ίνες (Johnston, Fraser et al. 1998).

Ο ιπποκάμπειος σχηματισμός συγκροτείται από 6 διακριτές περιοχές που περιλαμβάνουν την οδοντωτή έλικα (Dentate Gyrus), τον ιππόκαμπο (Hippocampus) ο οποίος υποδιαιρείται σε 3 κύρια πεδία (CA1, CA2, CA3), το υπόθεμα (Subiculum), το προϋπόθεμα (Presubiculum), το παραϋπόθεμα (Parasubiculum) και τον ενδορινικό φλοιό (Entorhinal Cortex) που έχει δύο ή περισσότερες υποδιαιρέσεις. Το υπόθεμα, το προϋπόθεμα και το παραϋπόθεμα αναφέρονται συνήθως μαζί ως υποθεματικό σύμπλοκο (Amaral and Witter

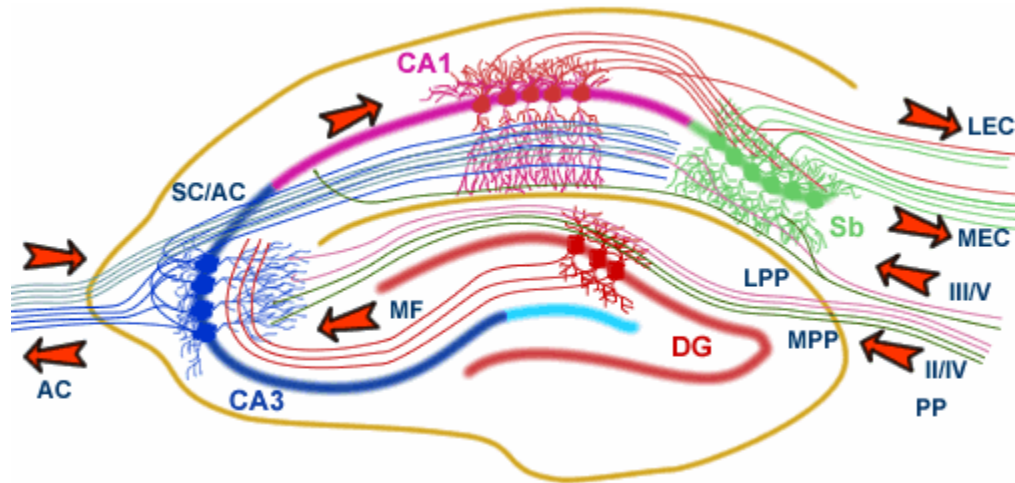
1989). Η κύρια αιτία της ομαδοποίησης αυτών των περιοχών στον παραπάνω όρο είναι η σύνδεσή τους σε σειρά με μονόδρομες προβολές.

Η ροή πληροφοριών μέσω του ιππόκαμπου προχωρά από την οδοντωτή έλικα στη CA3, στη CA1 και στο υπόθεμα, με τις πρόσθετες πληροφορίες εισαγωγής σε κάθε στάδιο και τα παραγόμενα αποτελέσματα σε κάθε ένα από τα δύο τελικά στάδια. Η CA2 περιοχή αντιπροσωπεύει πολύ μικρό τμήμα του ιππόκαμπου και η παρουσία της αγνοείται στους υπολογισμούς της ιπποκάμπειας λειτουργίας, αν και είναι αξιοσημείωτο ότι αυτή η μικρή περιοχή φαίνεται να είναι ανθεκτική στις συνθήκες που προκαλούν κυτταρική βλάβη (επιλεπτογένεση).

Η διατιτραίνουσα πορεία, η οποία μεταφέρει πληροφορίες από τον ενδορινικό φλοιό και τον περιρρινικό φλοιό θεωρείται γενικά η κύρια πηγή εισαγωγής πληροφορίας στον ιππόκαμπο. Η στιβάδα II του ενδορινικού φλοιού φέρνει προσαγωγές ίνες στην οδοντωτή έλικα και στην περιοχή CA3, ενώ η στιβάδα III του ενδορινικού φλοιού στην περιοχή CA1 και στο υπόθεμα. Τα κύρια μονοπάτια εξόδου του ιππόκαμπου είναι η διατιτραίνουσα πορεία, η τοξοειδής δέσμη και η ψαλίδα του εγκεφάλου, που όλες διέρχονται από την περιοχή CA1 και το υπόθεμα.

Η είσοδος της διατιτραίνουσας πορείας από τη στιβάδα II του ενδορινικού φλοιού φέρεται στην οδοντωτή έλικα και συνεχίζει στην περιοχή CA3 (και στα βρυώδη κύτταρα, που είναι τοποθετημένα στην πύλη της οδοντωτής έλικας, τα οποία στέλνουν έπειτα τις πληροφορίες στις απόμακρες περιοχές της οδοντωτής έλικας όπου ο κύκλος επαναλαμβάνεται). Η περιοχή CA3 στέλνει τις συνδέσεις της στην περιοχή CA1 μέσω ενός συνόλου ιών που αποκαλούνται παράπλευρες ίνες του Schaffer. Εκτός από την περιοχή CA3, η περιοχή CA1 λαμβάνει προσαγωγές ίνες καθώς επίσης και από το στρώμα III του ενδορινικού φλοιού και έπειτα προωθεί την πληροφορία στο υπόθεμα καθώς επίσης και στις προαναφερθείσες πορείες εξόδου του ιππόκαμπου. Το υπόθεμα είναι το τελικό στάδιο στο μονοπάτι συνδυάζοντας τις πληροφορίες από τη CA1 και από τη στιβάδα III του ενδορινικού φλοιού. Είναι γενικά αποδεκτό ότι κάθε μια από αυτές τις περιοχές έχει μοναδικό λειτουργικό ρόλο στην επεξεργασία

πληροφοριών του ιππόκαμπου αλλά μέχρι σήμερα η συμβολή κάθε περιοχής είναι ανεπαρκώς κατανοητή (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Το ιππόκαμπειο ενδογενές τρισυναπτικό κύκλωμα (Amaral and Witter 1989)

Ο ιππόκαμπος ανήκει στο μεταιχμιακό σύστημα (limbic system), το οποίο περιλαμβάνει πέρα από τον ιππόκαμπο και τον οσφρητικό φλοιό, τον υπερμεσολόβιο φλοιό και την αμυγδαλή. Ο ιππόκαμπος παίζει σημαντικό ρόλο στη μακροπρόθεσμη μνήμη και στη χωροταξική καθοδήγηση. Η γενική αρχιτεκτονική δομή του ιππόκαμπου διατηρείται σε πολλά είδη θηλαστικών (West 1990). Αυτό όμως που διαφοροποιείται είναι η αναλογία του μεγέθους του ιππόκαμπου σε σχέση με το μέγεθος του σώματος του κάθε είδους. Τα ζώα για παράδειγμα που εμφανίζουν μεγαλύτερη ικανότητα χωροταξικής μνήμης διαθέτουν και μεγαλύτερο σε μέγεθος ιππόκαμπο (Jacobs 2003). Η σύνδεση αυτή επεκτείνεται και στις διαφυλικές διαφορές. Σε είδη στα οποία τα αρσενικά και τα θηλυκά ζώα εμφανίζουν διαφορές στην ικανότητα χωροταξικής μνήμης, εμφανίζουν διαφορά και στο μέγεθος του ιππόκαμπου, με το μέγεθος να αυξάνει όσο αυξάνει η ικανότητα χωροταξικής μνήμης (Jacobs, Gaulin et al. 1990).

Επίσης στον άνθρωπο έχει παρατηρηθεί ότι ο ιππόκαμπος ενεργοποιείται σε καταστάσεις που σχετίζονται με την εικονική πλοήγηση στο περιβάλλον. Έχει δειχθεί ότι όταν ένα άτομο πρέπει να εξερευνησει το περιβάλλον, ενεργοποιείται ο δεξιός ιππόκαμπος και η αριστερή ουρά του κελύφους, πράγμα που

υποδηλώνει την εμπλοκή του ιππόκαμπου στην χωροταξική μνήμη και μάθηση (Bear, Connors et al. 2001).

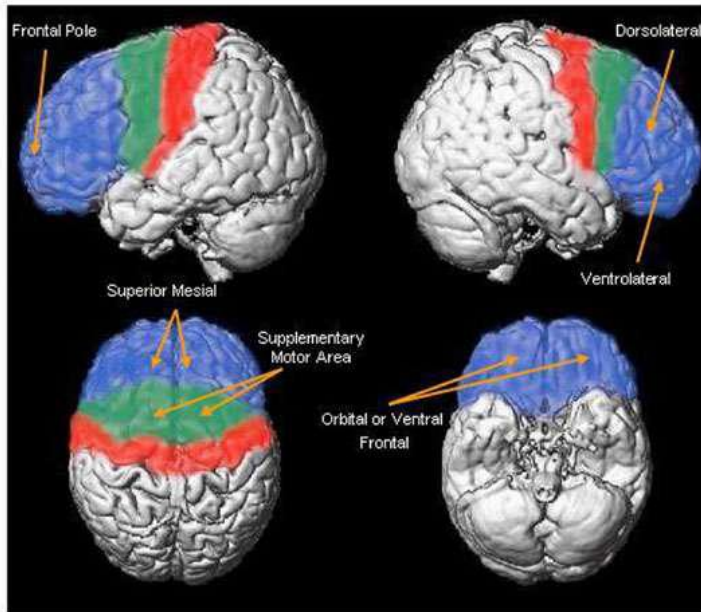
Η συμμετοχή του ιππόκαμπου στις λειτουργίες της μνήμης, που περιλαμβάνουν κωδικοποίηση της μνήμης και ανάκτηση αυτής, φαίνεται και σε πειράματα στα οποία ζώα χρησιμοποιούν την χωροταξική μνήμη για πλοήγηση (Jarrard 1978; Morris, Polkey et al. 1998). Πολλά κύτταρα του ιππόκαμπου των επίμυων αντιδρούν σαν κύτταρα θέσης, πυροδοτώντας δυναμικά ενέργειας όταν ο επίμυς διαβεί ένα συγκεκριμένο τμήμα του περιβάλλοντός του. Αυτά τα κύτταρα έπειτα αλληλεπιδρούν με τα κύτταρα θέσης της κεφαλής τα οποία δρουν ως εσωτερική πυξίδα, με αποτέλεσμα η αλληλεπίδραση αυτή να οδηγεί στο σχηματισμό ενός χωρικού χάρτη. Η ανακάλυψη των κυττάρων θέσης κατά τη δεκαετία του 1970, οδήγησε στη διατύπωση της θεωρίας ότι ο ιππόκαμπος έχει δράση γνωσιακού χάρτη. Αποτελεί δηλαδή μία νευρωνική αναπαράσταση της απεικόνισης του περιβάλλοντος (Nadel and MacDonald 1980). Μελέτες έχουν δείξει ότι ένας υγιής ιππόκαμπος είναι απαραίτητος για την εκτέλεση δοκιμασιών χωροταξικής μνήμης και κυρίως αυτών που αφορούν στην καθοδήγηση ενός πειραματοζώου σε συγκεκριμένο χώρο με σκοπό την ανεύρεση ενός κρυφού στόχου (Morris, Garrud et al. 1982).

Ο ιππόκαμπος συμμετέχει επίσης στη λειτουργία της βραχυπρόθεσμης μνήμης και μάθησης (Nadel and Moscovitch 1997; Jeffery and Hayman 2004), για το λόγο αυτό πολλοί επιστήμονες συμφωνούν στο γεγονός ότι ο ιππόκαμπος αποτελεί βασική δομή για το σχηματισμό της μνήμης που αφορά γεγονότα (επεισοδιακή ή αυτοβιογραφική μνήμη) (Squire, Ojemann et al. 1992). Βλάβη στον ιππόκαμπο έχει ως αποτέλεσμα τη δυσκολία στο σχηματισμό νέας μνήμης, αλλά πολλές φορές επηρεάζει και τα στοιχεία της μνήμης που αποθηκεύτηκαν πριν τη βλάβη. Αξιοσημείωτο είναι δε το γεγονός ότι μετά από βλάβη στον ιππόκαμπο δεν επηρεάζονται άλλοι τύποι μνήμης, όπως η ικανότητα για εκμάθηση κινητικών και γνωσιακών δεξιοτήτων, πράγμα το οποίο σημαίνει ότι αυτού του τύπου οι δεξιότητες αφορούν διαφορετικού τύπου μνήμη που εδράζεται σε διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου.

Λόγω των νευρωνικών του κυκλωμάτων, ο ιππόκαμπος αποτελεί ένα ενδιαφέρον νευροφυσιολογικό μοντέλο. Η μακροπρόθεσμη ενδυνάμωση της σύναψης (Long Term Potentiation-LTP) στον ιππόκαμπο, αποτελεί έναν τύπο πλαστικότητας των νευρωνικών συνάψεων και πολύ συχνά μελετάται σε αυτόν (Bliss and Lomo 1973). Η πλαστικότητα των συνάψεων του ιππόκαμπου διαδραματίζει έναν πολύ σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες της μνήμης και της μάθησης (Bliss and Collingridge 1993) και θεωρείται πλέον ότι ο κύριος μηχανισμός αποθήκευσης της μνήμης στον εγκέφαλο επιτελείται μέσω της μακροπρόθεσμης συναπτικής ενδυνάμωσης (Sacktor 2008).

1.4 Προμετωπιαίος φλοιός

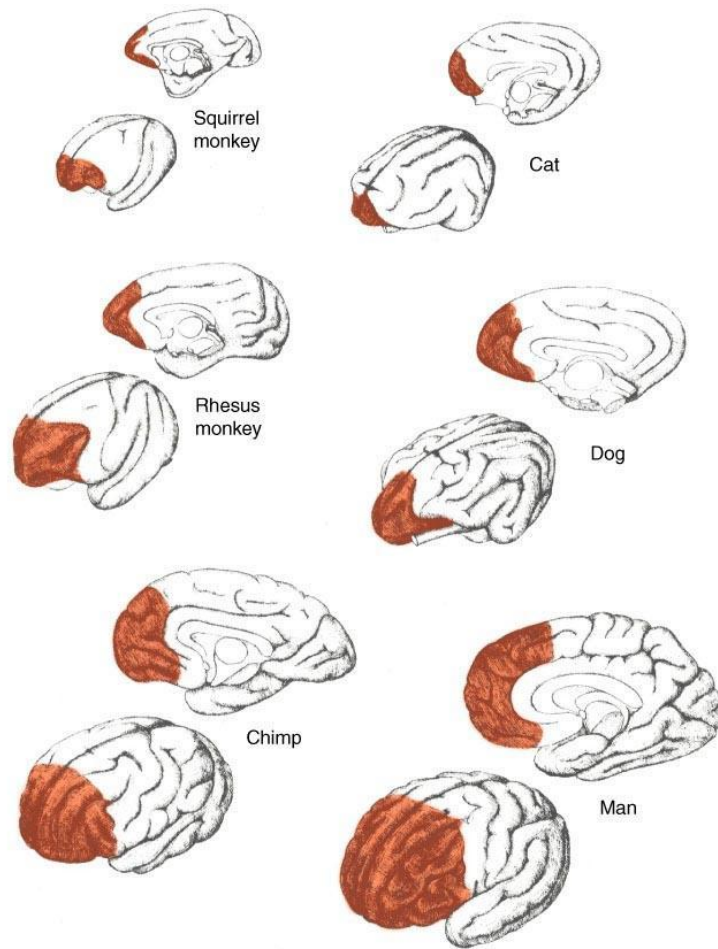
Ο προμετωπιαίος φλοιός είναι το πρόσθιο τμήμα του μετωπιαίου λοβού και βρίσκεται προσθίως των κινητικών και προκινητικών περιοχών (Εικόνα 6). Ο προμετωπιαίος φλοιός διαχωρίζεται σε τρεις βασικές περιοχές: την οφθαλμομετωπιαία (OFC) και μεσοκοιλιακή περιοχή (vm-PFC), τον οπισθοπλάγιο προμετωπιαίο φλοιό (dl-PFC) και τον πρόσθιο και κοιλιακό υπερμεσολόβιο φλοιό (Krawczyk 2002). Άλλες περιοχές που μπορούν να αναγνωριστούν συμπεριλαμβάνουν τον πλάγιο-κοιλιακό φλοιό (vl-PFC), τον μέσο προμετωπιαίο φλοιό (m-PFC) και τον πρόσθιο προμετωπιαίο φλοιό (a-PFC). Η περιοχή αυτή του εγκεφάλου έχει συσχετιστεί με την επιτέλεση πολύπλοκων γνωσιακών λειτουργιών, την προσωπικότητα, τη λήψη αποφάσεων καθώς επίσης και τη ρύθμιση της κοινωνικής συμπεριφοράς (Krawczyk 2002). Ο πιο κοινός όρος που χρησιμοποιείται για το ρόλο του προμετωπιαίου φλοιού είναι αυτός της εκτελεστικής λειτουργίας (executive function).



Εικόνα 6. Προμετωπιαίος φλοιός

- Προμετωπιαίος
- Πρωτογενής κινητικός φλοιός
- Φλοιός προκινητικής χώρας

Ο προμετωπιαίος φλοιός επίσης αποτελεί τη συνειρμική περιοχή του μετωπιαίου λοβού. Απαρτίζει πληροφορίες από τον υπόλοιπο νεοφλοιό, το μεταιχμιακό σύστημα, τον υποθάλαμο, το στέλεχος και μέσω του θαλάμου και από άλλες περιοχές του υπόλοιπου εγκεφάλου. Είναι μια περιοχή που θεωρείται ότι αναπτύχθηκε τελευταία οντογενετικά και φυλογενετικά (Εικόνα 7). Η λειτουργία του εξαρτάται από τα υψηλά επίπεδα ετοιμότητας καθώς επίσης και από τις συναισθηματικές συνδέσεις με βαθύτερες περιοχές του εγκεφάλου που συμμετέχουν στη ρύθμιση της ικανοποίησης, του πόνου, του θυμού, του πανικού, της επιθετικότητας και της σεξουαλικής συμπεριφοράς (Browning and Gaffan 2008).



Εικόνα 7. Φυλογενετική ανάπτυξη του προμετωπιαίου φλοιού.

Επίσης η λειτουργία του προμετωπιαίου φλοιού φαίνεται ξεκάθαρα από την περίπτωση του Phineas Gage. Μετά από ένα ατύχημα που υπέστη το 1848 οι δύο μετωπιαίοι λοβοί του καταστράφηκαν, με αποτέλεσμα η μνήμη να παραμείνει ανέπαφη, όπως επίσης και η ικανότητα του λόγου και των κινητικών λειτουργιών, αλλά άλλαξε δραματικά η προσωπικότητά του. Είχε γίνει ευερέθιστος, χωρίς σεβασμό για τους συνανθρώπους του, έβριζε με χυδαιότητα και ήταν ανυπόμονος, πότε ήταν οργανωτικός και πότε εκκεντρικά ανοργάνωτος, δεν μπορούσε να κάνει σχέδια για το μέλλον, να ακολουθήσει τους κοινωνικούς κανόνες και ή να σχεδιάσει την καλύτερη λύση για ένα πρόβλημα. Για το λόγο αυτό οι φίλοι του άρχισαν να τον αποκαλούν «no longer Gage» δείχνοντας κατά αυτό τον τρόπο τις αλλαγές που είχε υποστεί η προσωπικότητά του (Steggmann 1962; Yorks 2005).



Phineas Gage

Οι Miller και Cohen διαπίστωσαν μετά από μελέτες ότι η λειτουργία του προμετωπιαίου φλοιού έγκειται στο να ελέγχει τις εισαγόμενες πληροφορίες και τις μεταξύ τους συνδέσεις, πράγμα το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τον ενσυνείδητο έλεγχο των πράξεών μας (Polyn, Norman et al. 2009). Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι τα τελευταία χρόνια χάρις στην ανάπτυξη των τεχνικών απεικόνισης του εγκεφάλου, ο προμετωπιαίος φλοιός έχει συσχετιστεί με διάφορες ψυχιατρικές διαταραχές. Μελέτες δείχνουν ότι σε ασθενείς με σχιζοφρένεια, κατάθλιψη, αγχώδεις διαταραχές, και εξάρτηση από ουσίες παρατηρούνται μειωμένος όγκος και μειωμένες διασυνδέσεις του προμετωπιαίου φλοιού με άλλες περιοχές του εγκεφάλου. (Liston, Miller et al. 2006).

Ο προμετωπιαίος φλοιός επίσης αποτελεί την περιοχή που ρυθμίζει τη σκέψη, τόσο σε επίπεδο βραχυπρόθεσμης, όσο και μακροπρόθεσμης λήψης αποφάσεων. Επιτρέπει στους ανθρώπους να προγραμματίζουν για το μέλλον, να δημιουργούν τακτικές καθώς επίσης και να ρυθμίζουν τις δράσεις και τις αντιδράσεις τους. Επιπροσθέτως, βοηθά στην εστίαση των σκέψεων που οδηγούν στην επίτευξη στόχων, τη μνήμη και τη μάθηση, καθώς επίσης συμμετέχει και στην ενεργή μνήμη εργασίας.

Μελέτες σε επίμυες αλλά και σε πιθήκους έχουν καταδείξει ότι ο προμετωπιαίος φλοιός συνεισφέρει στο σύνολο του γνωσιακού ελέγχου των λειτουργιών που

είναι απαραίτητες για τον άριστο προγραμματισμό της συμπεριφοράς, που περιλαμβάνει την ελεγχόμενη προσοχή, την αντίσταση σε εξωγενείς στρεσογόνους παράγοντες, τον προγραμματισμό και τη λήψη αποφάσεων (Soliman 2010). Ο προμετωπιαίος φλοιός αξίζει να σημειωθεί επίσης ότι συνδέεται με την οπτική μνήμη και την οπτική αντίληψη και είναι απαραίτητος για την παρατήρηση ενός αντικειμένου από κάτω προς τα πάνω αλλά και για την ενσυνείδητη οπτική αντίληψη (Katsuki and Constantinidis 2012). Τόσο στην οπτική μνήμη εργασίας όσο και στην οπτική προσοχή, φαίνεται ότι ο κύριος ρυθμιστής είναι ο νευροδιαβιβαστής ντοπαμίνη (Chudasama and Robbins 2004). Η αυξημένη ντοπαμινεργική δραστηριότητα διευκολύνει την οπτική προσοχή και ενισχύει την οπτική μνήμη στους επίμυες. Επιπροσθέτως τα οπτικά σήματα ρυθμίζονται μέσω D1 και D2 υποδοχέων της ντοπαμίνης, η οποία διευκολύνει την επικοινωνία του προμετωπιαίου φλοιού με τον οπτικό φλοιό (Noudoost and Moore 2011).

1.5 Νευροδιαβιβαστές

Από την εποχή της ανακάλυψης της χημικής επικοινωνίας ανάμεσα στους νευρώνες, στόχος της έρευνας στον τομέα της νευροψυχοφαρμακολογίας υπήρξε η αναγνώριση και ταυτοποίηση των χημικών ουσιών που λειτουργούν ως νευροδιαβιβαστές στον εγκέφαλο. Παραδοσιακά, μία χημική ουσία θεωρείται ότι είναι νευροδιαβιβαστής όταν πληροί τα παρακάτω κριτήρια:

1. Συντίθεται στο νευρώνα.
2. Βρίσκεται στην προσυναπτική απόληξη μέσα σε συναπτικά κυστίδια και απελευθερώνεται σε επαρκείς ποσότητες ώστε να ασκήσει μια ορισμένη δράση στο μετασυναπτικό νευρώνα .
3. Όταν χορηγηθεί ενδογενώς ως φάρμακο σε ικανές συγκεντρώσεις μιμείται τη δράση του ενδογενώς απελευθερούμενου νευροδιαβιβαστή.
4. Οι δράσεις της μπορούν να ανασταλούν με τη χορήγηση συναγωνιστικών ανταγωνιστών του νευροδιαβιβαστή κατά δόσο-εξαρτώμενο τρόπο.

5. Υπάρχει συγκεκριμένος μηχανισμός για την απομάκρυνσή της από τη θέση δράσης της.

Αρκετές είναι οι χημικές ουσίες που έχουν βρεθεί στο ΚΝΣ και πληρούν τα κριτήρια αυτά. Παρόλα αυτά έχει βρεθεί ότι υπάρχουν χημικές ουσίες οι οποίες δεν πληρούν όλα τα κριτήρια αλλά επηρεάζουν τη συναπτική διαβίβαση λιγότερο άμεσα και ονομάζονται νευροτροποιητές. Μερικοί νευροδιαβιβαστές έχουν ταχεία και παροδική επίδραση στο μετασυναπτικό κύτταρο. Άλλοι έχουν επίδραση που είναι πολύ βραδύτερη στην αρχή και μπορεί να διαρκέσει λεπτά ακόμη και ώρες. Οι περισσότεροι από τους νευροδιαβιβαστές που έχουν προσδιοριστεί εμπίπτουν σε τρεις χημικές κατηγορίες: τις αμίνες, τα αμινοξέα και τα πεπτίδια. Ανάμεσα στις αμίνες που λειτουργούν ως νευροδιαβιβαστές είναι:

α. η *νορεπινεφρίνη (νοραδρεναλίνη)*, η οποία απελευθερώνεται από πολλούς νευρώνες του δικτυωτού σχηματισμού του εγκεφαλικού στελέχους και του υποθαλάμου,

β. η *επινεφρίνη (αδρεναλίνη)*, η οποία έχει δράση παράλληλη με αυτή της νορεπινεφρίνης,

γ. η *ντοπαμίνη*, η οποία απελευθερώνεται από νευρώνες που προέρχονται από τη μέλαινα ουσία και η επίδρασή της είναι κυρίως ανασταλτική,

δ. η *σεροτονίνη*, η οποία απελευθερώνεται από πυρήνες που προέρχονται από τη μέση ραφή του εγκεφαλικού στελέχους και προβάλλουν κυρίως στα οπίσθια κέρατα του νωτιαίου μυελού και του υποθαλάμου. Ο νευροδιαβιβαστής αυτός δρα ως αναστολέας των οδών του πόνου στο νωτιαίο μυελό αλλά εμπλέκεται στον έλεγχο της διάθεσης και στον ύπνο.

Η ντοπαμίνη, η νορεπινεφρίνη και η επινεφρίνη είναι κατεχολαμίνες με κοινή βιοσυνθετική προέλευση που ξεκινάει από το αμινοξύ τυροσίνη.

Στην κατηγορία των αμινοξέων που δρουν κυρίως ως νευροδιαβιβαστές ανήκει η γλυκίνη που δρα ανασταλτικά και απελευθερώνεται από ορισμένους διάμεσους νωτιαίους νευρώνες, το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA), το οποίο

απελευθερώνεται από νευρικές απολήξεις στο νωτιαίο μυελό, την παρεγκεφαλίδα, τα βασικά γάγγλια και πολλές άλλες περιοχές και προκαλεί σχεδόν πάντα αναστολή. Στην ίδια κατηγορία επίσης ανήκουν το γλουταμικό, το οποίο απελευθερώνεται από τα συναπτικά κομβία πολλών αισθητικών οδών και προκαλεί πάντα διέγερση και το ασπαρτικό οξύ. Τέλος, τα νευροπεπτίδια μπορούν να ενεργούν ως ορμόνες, ως νευροδιαβιβαστές ή ως νευροτροποποιητές.

Το αν μια διαβιβαστική ουσία θα προκαλέσει διέγερση ή αναστολή καθορίζεται όχι μόνο από τη φύση της αλλά και από τη φύση του υποδοχέα της μετασυναπτικής μεμβράνης. Εκτός από το γεγονός ότι οι νευροδιαβιβαστές προκαλούν άλλοτε διέγερση και άλλοτε αναστολή, έχουν κι άλλες διαφορές, από τις οποίες η σπουδαιότερη αφορά στη διάρκεια της διέγερσης. Μια άλλη διαφορά ανάμεσα στους νευροδιαβιβαστές είναι ότι ορισμένοι προκαλούν αύξηση του ρυθμού εκφόρτισης ενώ άλλοι δεν έχουν καμία επίδραση σε αυτόν αλλά μεταβάλλουν την ευαισθησία του νευρώνα σε άλλες νευροδιαβιβαστικές ουσίες (ρυθμιστικός τύπος διαβιβαστή).

1.5.1 Γλουταμικό οξύ και χημικές ιδιότητες

Το γλουταμικό οξύ είναι ένας διεγερτικός νευροδιαβιβαστής και μαζί με το ασπαρτικό οξύ θεωρούνται τα κύρια ενδογενή διεγερτικά αμινοξέα στον εγκέφαλο (φυσικοί αγωνιστές υποδοχέων γλουταμικού οξέος). *Συναγωνιστικοί ανταγωνιστές υποδοχέων του γλουταμικού οξέος*, είναι οι ουσίες που ενώνονται με τους υποδοχείς και εμποδίζουν το γλουταμικό οξύ να εκδηλώσει τη δράση του. *Μη συναγωνιστικοί ανταγωνιστές*, είναι ουσίες με ανασταλτική δράση στους υποδοχείς ή τους διαύλους τους, έτσι ώστε συνδεδεμένοι με αυτούς να εμποδίζουν τη ροή των ιόντων (Rothman and Olney 1986).

Το γλουταμικό οξύ ασκεί τη δράση του στους νευρώνες μέσω ειδικών υποδοχέων, οι οποίοι παίζουν σημαντικό ρόλο στην πλαστικότητα των συνάψεων, τη μνήμη και τη μάθηση, ενώ εμπλέκονται επίσης στη νευροτοξικότητα και στη νευροεκφύλιση. Οι υποδοχείς του γλουταμικού οξέος

διακρίνονται σε 2 μεγάλες ομάδες: τους ιονοτροπικούς υποδοχείς και τους μεταβοτροπικούς υποδοχείς. Οι ιονοτροπικοί υποδοχείς, με βάση τη διαφορετική σύσταση μιας συγγένειας που παρουσιάζουν για ειδικούς αγωνιστές και ανταγωνιστές, διακρίνονται στους NMDA υποδοχείς, στους AMPA υποδοχείς και στους υποδοχείς του καινικού οξέος. Οι μεταβοτροπικοί υποδοχείς, με βάση τις φαρμακολογικές τους ιδιότητες και τους μηχανισμούς μεταγωγής σήματος με τους οποίους συνδέονται, διακρίνονται σε 3 ομάδες: τους mGluRs της ομάδας I, της ομάδας II και της ομάδας III.

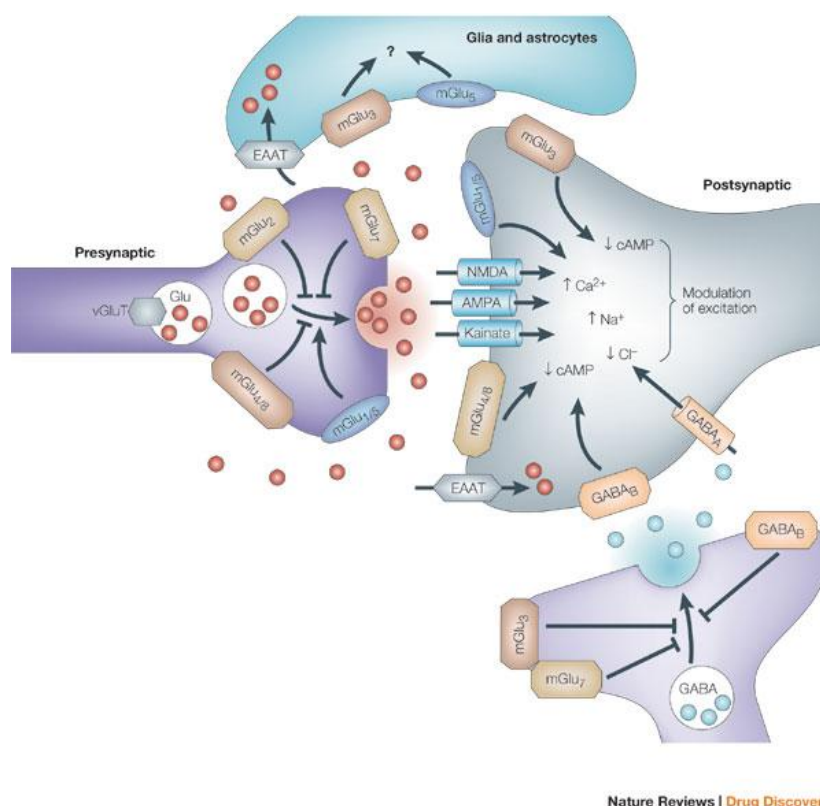
Οι NMDA (N-methyl-D-aspartate) υποδοχείς συγκροτούνται από 8 εναλλακτικά μετάγραφα (a-h) της υπομονάδας NMDAR1 και 4 διαφορετικές υπομονάδες, τις NR2A, NR2B, NR2C, NR2D. Οι NMDA υποδοχείς περιλαμβάνουν μία θέση δέσμευσης του γλουταμικού οξέος, μία θέση συνενεργοποιητή που δεσμεύει τη γλυκίνη και μία θέση δέσμευσης ιόντων μαγνησίου, η δέσμευση του οποίου εξαρτάται από το δυναμικό της μεμβράνης. Σε δυναμικά περισσότερο αρνητικά από -20 ή -30mV , τα ιόντα μαγνησίου δεσμεύονται στον υποδοχέα και μπλοκάρουν την είσοδο ιόντων ασβεστίου μέσω του οποίου επιτελείται η απόκριση του υποδοχέα στο νευροδιαβιβαστή. Κατά συνέπεια, η ενεργοποίηση του υποδοχέα προϋποθέτει τη μερική εκπόλωση της μεμβράνης έτσι ώστε να απομακρυνθούν τα ιόντα μαγνησίου από τη θέση δέσμευσης τους στον υποδοχέα. Η γλουταμίνη ενισχύει σημαντικά τη δράση των αγωνιστών των NMDA υποδοχέων (Palmada and Centelles 1998).

Οι AMPA υποδοχείς αποτελούνται από τις υπομονάδες GluR5-7 και KA1-2. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων αυτών είναι μη-εξαρτώμενη από το δυναμικό της μεμβράνης και οδηγούν στην αύξηση της ροής ιόντων ασβεστίου στο κύτταρο. Οι μη NMDA υποδοχείς αυτοί του γλουταμικού οξέος θεωρούνται υπεύθυνοι για την άμεση γλουταματεργική νευροδιαβίβαση (Smith, Charara et al. 2001).

Οι μεταβοτροπικοί υποδοχείς της ομάδας I αποτελούνται από τις υπομονάδες mGluR1, που περιλαμβάνει 4 εναλλακτικά μετάγραφα και τις mGluR5 που περιλαμβάνει 5 ισομορφές. Εντοπίζονται κυρίως μετασυναπτικά, η απόκρισή τους σχετίζεται με το μονοπάτι της φωσφορικής ινοσιτόλης και οδηγεί σε

ενεργή πόλωση των νευρώνων. Ωστόσο, οι υποδοχείς αυτοί έχει βρεθεί ότι εντοπίζονται και προσυναπτικά (Conn and Pin 1997).

Οι μεταβοτροπικοί υποδοχείς της ομάδας II και III αποτελούνται από τις υπομονάδες mGluR2, mGluR3 και mGluR4, mGluR6, mGluR8 αντίστοιχα και αναστέλλουν την αδενυλική κυκλάση και την παραγωγή του κυκλικού AMP. Εντοπίζονται κυρίως προσυναπτικά και δρουν ως αυτό- και έτερο-υποδοχείς τροποποιώντας την απελευθέρωση του γλουταμικού οξέος ή άλλων νευροδιαβιβαστών (Cartmell and Schoerp 2000).



Εικόνα 8. Σχηματική παράσταση των υποδοχέων του γλουταμικού οξέος.

Τόσο οι ιονοτροπικοί όσο και οι μεταβοτροπικοί υποδοχείς του γλουταμικού οξέος εκφράζονται σε όλους τους πυρήνες των βασικών γαγγλίων (Smith, Charara et al. 2001). Το γλουταμικό οξύ συντίθεται από τη γλουταμίνη στα νευρικά κύτταρα με τη βοήθεια της γλουταμινάσης. Μετά την απελευθέρωσή του στη σύναψη, προκειμένου να τερματιστεί η δράση του, μεταφέρεται στα αστρογλοιακά κύτταρα με μεγαλύτερη συγγένεια από ότι στα νευρικά, όπου με τη βοήθεια της συνθετάσης της γλουταμίνης (glutamine synthase) το

γλουταμικό οξύ μεταβολίζεται σε γλουταμίνη που δεν έχει ενεργότητα νευροδιαβιβαστή και μπορεί να ξαναχρησιμοποιηθεί από τους νευρώνες για την επανασύνθεση του γλουταμικού οξέος.

Περισσότερο από 30 χρόνια απασχόλησαν τους ερευνητές οι ενδείξεις ότι το γλουταμικό οξύ είναι διεγερτικοτοξικό για τους νευρώνες (Lucas and Newhouse 1957). Διάφορες μελέτες επιβεβαίωσαν την τοξικότητα του γλουταμικού οξέος και πλέον θεωρείται από πολλούς ερευνητές ως η κύρια αιτία της υποξαιμικής-ισχαιμικής βλάβης, σε ορισμένους ιδιαίτερα ευαίσθητους νευρώνες (γλουταματεργικοί νευρώνες) (Olney 1993).

1.5.1.1 Γλουταμικό οξύ και ανάπτυξη του νευρικού συστήματος

Το γλουταμικό οξύ παίζει σαφώς σημαντικό ρόλο στη νευρωνική διαφοροποίηση και στη μετανάστευση και στην επιβίωση στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο, το οποίο επιτυγχάνεται μέσω της εισροής ιόντων ασβεστίου (Balazs, Hack et al. 1990). Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι το γλουταμικό οξύ παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, ιδίως όσον αφορά στην επιβίωση των νευρώνων, στην ανάπτυξη και στη διαφοροποίηση, στην ανάπτυξη κυκλωμάτων και στην αρχιτεκτονική των κυττάρων. Για παράδειγμα, είναι γνωστό ότι έλλειψη γλουταμικού οξέος στον εγκέφαλο κατά την διάρκεια της νευρογένεσης μπορεί να οδηγήσει σε διαταραγμένη ανάπτυξη του οπτικού φλοιού και επίσης να παίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της σχιζοφρένειας (Hirsch, Das et al. 1997). Ομοίως, υπερβολικά επίπεδα γλουταμικού οξέος μπορεί να προκαλέσουν νευρικές οδούς που οδηγούν σε λανθασμένες συνδέσεις. Περίσσεια γλουταμικού οξέος κατά την εμβρυογένεση έχει αποδειχθεί ότι μειώνει το μήκος των δενδριτών και καταστέλλει την αξονική έκφυση νευρώνων του ιππόκαμπου. Αξίζει να σημειωθεί ότι το γλουταμικό οξύ μπορεί να προκαλέσει τοξικότητα στον ανώριμο εγκέφαλο ακόμα και πριν την δημιουργία των γλουταματεργικών υποδοχέων. Υψηλά επίπεδα γλουταμικού οξέος μπορεί επίσης να επηρεάσουν και τον πολλαπλασιασμό των

αστρογλοιακών κυττάρων, καθώς και τη νευρωνική διαφοροποίηση. Φαίνεται ότι το γλουταμικό οξύ δρα μέσω του PKC μονοπατιού (phosphoinositide protein kinase C (PKC) pathway).

Έχει αποδειχθεί ότι κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του εγκεφάλου υπάρχει υπερανάπτυξη των νευρωνικών συνδέσεων, ενώ σε αυτό το στάδιο παρατηρείται επίσης κορύφωση των επιπέδων του γλουταμικού οξέος στον εγκέφαλο, ο οποίος καλείται να απομακρύνει την περίσσεια των συνδέσεων αυτών και την υπερέκφραση των νευρικών κυττάρων. Το γεγονός αυτό αναφέρεται ως “pruning” (κλάδεμα). Αξίζει επίσης να σημειωθεί, ότι υψηλά επίπεδα γλουταμικού οξέος κατά τη συναπτογένεση και την ανάπτυξη μπορεί να προκαλέσουν το σχηματισμό ανώμαλων συνδέσεων στον υποθάλαμο που έχουν συνδεθεί με μετέπειτα ενδοκρिनοπάθειες (Gong, Xia et al. 1995).

Γενικότερα, η ανάπτυξη του εγκεφάλου είναι μία πολύ σύνθετη διαδικασία που λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια μιας χωρικής και χρονικής αλληλουχίας γεγονότων, τα οποία ελέγχονται από βιοχημικά, δομικά και νευροφυσιολογικά γεγονότα. Ακόμη και μικρές μεταβολές στις παραμέτρους αυτές, είναι ικανές να οδηγήσουν σε μη αναστρέψιμες μεταβολές στη λειτουργία του εγκεφάλου, οι οποίες μπορεί να σχετίζονται είτε με αλλοιώσεις στη συμπεριφορά και στη μάθηση, ή ακόμα και σε αυτισμό, διαταραχή ελλειμματικής προσοχής και καταστάσεις ανεξέλεγκτης βίας (Brody, DeFeudis et al. 1969). Πειράματα στα οποία νεαρά πειραματόζωα εκτέθηκαν σε γλουταμικό μονονάτριο (monosodium glutamate-MSG) παρουσίασαν σημαντικές συμπεριφορικές διαταραχές. Άλλες μελέτες έδειξαν ότι οι απόγονοι θηλυκών πειραματοζώων που ταΐστηκαν με MSG παρουσίασαν φυσιολογικά επίπεδα μάθησης σε απλές δραστηριότητες, αλλά σημαντικές διαταραχές σε πιο πολύπλοκες διαδικασίες μάθησης (Frieder and Grimm 1987; Klingberg, Brankack et al. 1987; Wong, Neo et al. 1997).

Η εμπειρία και η μάθηση προκαλούν τροποποιήσεις στις συνάψεις, οι οποίες παίζουν κεντρικό ρόλο στην αποθήκευση πληροφοριών στο ΚΝΣ των θηλαστικών. Συγκεκριμένα, έχουν μελετηθεί πιο εκτεταμένα οι γλουταματεργικές συνάψεις (White and Youngentob 2004; Whitlock, Heynen et al. 2006). Οι γλουταματεργικοί υποδοχείς *NMDA*, αποτελούν κλειδί για διάφορες

μορφές συναπτικής πλαστικότητας για τους εξής λόγους: *Πρώτον*, οι NMDA υποδοχείς προκαλούν πλαστικότητα, μέσω του ελέγχου διακίνησης των AMPA υποδοχέων μέσα και έξω από τις μετασυναπτικές θέσεις (Malinow and Malenka 2002; Bredt and Nicoll 2003; Kim, Dunah et al. 2005). *Δεύτερον*, οι NMDA υποδοχείς μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τον κυτταροσκελετό, είναι σημαντικοί για δομικές τροποποιήσεις που επέρχονται κατά τη συναπτική πλαστικότητα, όπως μεταβολές στον αριθμό και στην αρχιτεκτονική των δενδριτικών ακάνθων (Nikonenko, Jourdain et al. 2002). *Τρίτον*, οι NMDA υποδοχείς διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ομοιοστατική συναπτική πλαστικότητα (Perez-Otano and Ehlers 2005).

Αλλαγές των ιδιοτήτων των NMDA υποδοχέων συνοδεύουν διαφορετικούς τύπους συμπεριφορικών εμπειριών. Πολλές μελέτες υποστηρίζουν ότι διάφορες αλλαγές στη σύνθεση και τη λειτουργία των NMDA υποδοχέων μεταβάλλουν τη συμπεριφορά της μνήμης. Για παράδειγμα, γενετική υπερέκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την υπομονάδα NR2B είχε ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της μνήμης και της μάθησης σε τρωκτικά πειραματόζωα (White and Youngentob 2004), ενώ μειωμένα επίπεδα NR2B στον ιππόκαμπο συνδέθηκαν με μειωμένα επίπεδα χωρικής μνήμης (Clayton, Mesches et al. 2002).

Ένας εξίσου σημαντικός λόγος για τον οποίον το γλουταμικό οξύ θεωρείται καθοριστικό στο μηχανισμό μνήμης-μάθησης, είναι ότι η μακροπρόθεσμη ενδυνάμωση της σύναψης (long term potentiation-LTP), που θεωρείται ως ο κορυφαίος παράγοντας των μηχανισμών που διέπουν τη διατήρηση των πληροφοριών, σχετίζεται με αυξημένη διεγερτική δραστηριότητα των γλουταματεργικών υποδοχέων (Brown, Charman et al. 1988). Τόσο οι NMDA όσο και οι AMPA υποδοχείς εμπλέκονται στη μακροπρόθεσμη ενδυνάμωση. Οι NMDA υποδοχείς απαιτούνται για την επαγωγή της μακροπρόθεσμης ενδυνάμωσης, ενώ οι AMPA υποδοχείς φαίνεται ότι είναι αναγκαίοι για τη διατήρησή της (Bekkers and Stevens 1989).

Έχει αποδειχθεί επίσης, ότι το εμπλουτισμένο περιβάλλον έχει ευεργετικές δράσεις και προκαλεί τροποποιήσεις τόσο σε δομικό και συμπεριφορικό όσο και σε βιοχημικό επίπεδο στον εγκέφαλο, οδηγώντας σε συναπτική πλαστικότητα.

Τόσο οι NMDA όσο και οι AMPA υποδοχείς πιστεύεται ότι εμπλέκονται στη συναπτική πλαστικότητα (Song and Huganir 2002). Η λειτουργία και έκφραση των AMPA υποδοχέων ρυθμίζονται από τη σύσταση των υπομονάδων του GluR 1,2,3 και 4 (Hollmann and Heinemann 1994). Το εμπλουτισμένο περιβάλλον έχει δειχθεί ότι μεταβάλλει την έκφραση του *GluR2* και για το λόγο αυτό φαίνεται ότι μπορεί να ρυθμίσει τις λειτουργίες των AMPA υποδοχέων, οι οποίες με τη σειρά τους μπορούν να τροποποιήσουν τη γλουταματεργική επαγωγή του σήματος. Το *GluR2* ρυθμίζει την είσοδο ιόντων ασβεστίου στο νευρικό κύτταρο και πριν μερικά χρόνια βρέθηκε ότι η έκφρασή του στον εγκέφαλο αυξάνεται μετά από φαρμακολογική μείωση της σεροτονίνης (Shutoh, Hamada et al. 2000), υποδηλώνοντας ότι το γλουταματεργικό σύστημα στον εγκέφαλο μπορεί να σχετίζεται στενά με το σεροτονινεργικό σύστημα

Τα δεδομένα αυτά, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι τόσο οι AMPA όσο και οι NMDA υποδοχείς μπορούν να υποστούν διάφορες τροποποιήσεις κατόπιν εμπλουτισμού.

1.5.1.2 Γλουταμικό οξύ και νευροτοξικότητα

Το σύστημα του γλουταμικού οξέος αποτελεί ενδιαφέρον πεδίο έρευνας στις νευροεπιστήμες λόγω της πιθανής συμμετοχής του σε οξείες και χρόνιες νευροεκφυλιστικές διαδικασίες. Είναι γνωστό ότι περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν διάφορες πτυχές του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ). Ερευνητικά δεδομένα έδειξαν, ότι επίμυες που διαβίωναν σε εμπλουτισμένο περιβάλλον εμφάνιζαν αυξημένο βάρος εγκεφάλου, υψηλότερα επίπεδα ακετυλοχολινεστεράσης στο νεοφλοιό και αυξημένο αριθμό δενδριτικών ακάνθων, σε σύγκριση με τα πειραματόζωα που διαβίωναν σε τυπικούς εργαστηριακούς κλωβούς. Αυτά τα ευρήματα συνδέθηκαν θετικά με τους μηχανισμούς μνήμης και μάθησης (Rosenzweig 1984).

Η αρχή ότι περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τη νευροχημεία του εγκεφάλου, έχει χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση της συμμετοχής των διαφόρων νευροδιαβιβαστικών συστημάτων στις

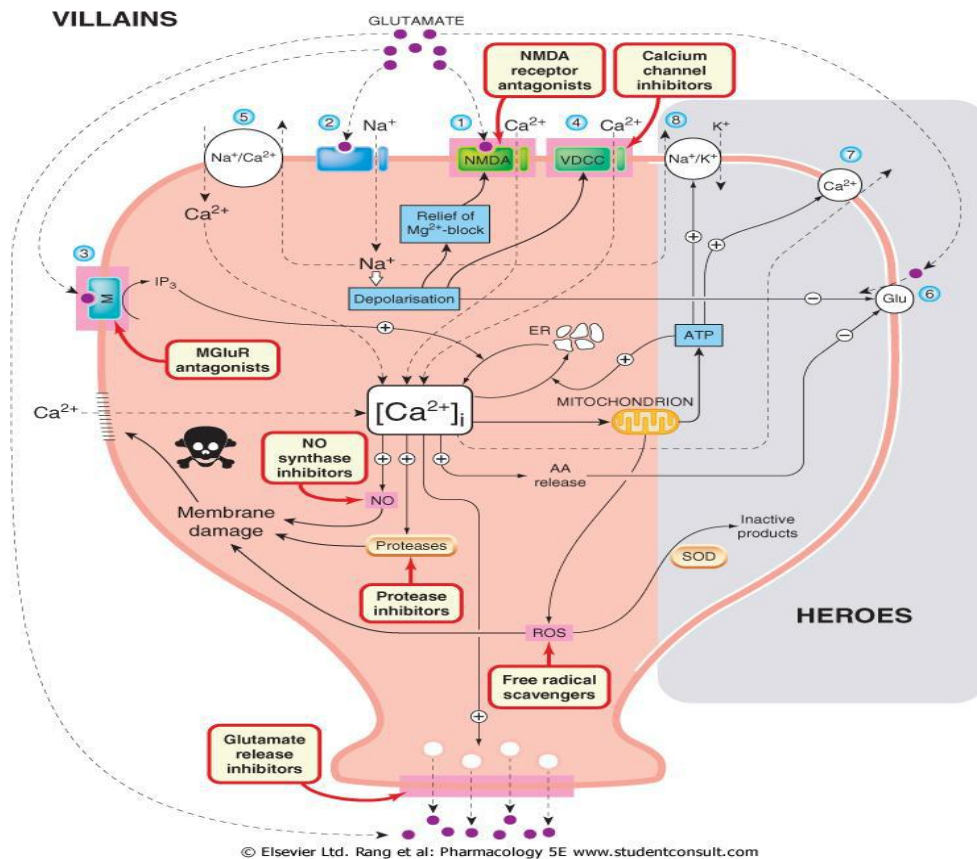
συμπεριφορικές λειτουργίες. Πιθανές μεταβολές της συμπεριφοράς, ως αποτέλεσμα των διαφόρων αναπτυξιακών συνθηκών, μπορεί να σχετίζονται με νευροχημικές μεταβολές. Πέρα από τα χολινεργικά σύστημα που παίζουν σημαντικό ρόλο σε αυτό, εξίσου σημαντικό ρόλο κατέχουν και τα γλουταματεργικά συστήματα (Myhrer, Utsikt et al. 1992).

Πολλοί εξωτερικοί παράγοντες, μπορεί να προκαλέσουν στρεσογόνες καταστάσεις στο φυσιολογικό περιβάλλον τόσο των ζώων, όσο και των ανθρώπων. Στον προμετωπιαίο φλοιό, τα γλουταματεργικά συστήματα φαίνεται ότι ενεργοποιούνται εκτενώς από το στρες. Αυτή η ενεργοποίηση του γλουταμικού οξέος που επάγεται από το στρες μπορεί να αυξήσει περαιτέρω την απελευθέρωση της ντοπαμίνης στον μετωπιαίο φλοιό (Jedema and Moghaddam 1994). Η γλουταματεργική απάντηση στο στρες είναι ιδιαίτερου ενδιαφέροντος, επειδή τα αυξημένα επίπεδα του γλουταμικού μπορεί να αποδώσουν τοξικές επιδράσεις που οδηγούν σε νευρωνικό θάνατο. Ενισχυμένες απαντήσεις του γλουταμικού οξέος μετά από στρες μπορούν πιθανώς να καταστήσουν πιο επιρρεπή τον εγκέφαλο στη γήρανση και στις διάφορες νευρωνικές βλάβες (Stein-Behrens, Elliott et al. 1992).

Η επίδραση του στρες στη διαμεσολαβούμενη από το γλουταμικό οξύ νευροδιαβίβαση φαίνεται ότι παρεμβαίνει αρνητικά στους μηχανισμούς μνήμης και μάθησης. Επίμυες που εκτίθονταν σε περιοριστικό στρες εμφάνιζαν μειωμένα επίπεδα μακροπρόθεσμης ενδυνάμωσης (long-term potentiation-LTP) και αυξημένα επίπεδα μακροπρόθεσμης καταστολής (long-term depression-LTD) στην CA1 περιοχή του ιππόκαμπου. Τέτοιου είδους επιδράσεις απετράπησαν μέσω χορήγησης ανταγωνιστών των NMDA υποδοχέων, υποδεικνύοντας ότι η επίδραση του στρες προκαλείται μέσω της ενεργοποίησης των NMDA υποδοχέων του γλουταμικού (Kim, Foy et al. 1996). Αυτά τα ευρήματα έρχονται σε συμφωνία με τις γνωσιακές δυσλειτουργίες που παρατηρούνται μετά από στρες. Η έκθεση επίμυων σε χρόνιο ψυχοκοινωνικό στρες, οδηγεί σε διαταραχή της χωρικής μνήμης, ενώ τεχνητή αύξηση των επιπέδων της κορτικοστερόνης επηρεάζει σε ηπιότερη μορφή μόνο τις χωρικές επιδόσεις (Krugers, Douma et al. 1997). Επιπλέον, σε σύγκριση με νεαρούς επίμυες, οι ηλικιωμένοι επίμυες παρουσίαζαν υψηλότερα επίπεδα

κορτικοστερόνης στον ιππόκαμπο και οι γνωσιακές ελλείψεις σχετίζονταν με απώλεια νευρώνων στον ιππόκαμπο (Issa, Rowe et al. 1990). Ωστόσο, η περιοχή του ιππόκαμπου δεν είναι η μόνη δομή που επηρεάζεται αρνητικά κατά τη διάρκεια της γήρανσης. Από μία μελέτη βασισμένη σε εγκεφαλικές βλάβες, εξήχθη το αποτέλεσμα ότι οι διαταραχές που οφείλονται στο στρες εμφανίζονταν τόσο στον ιππόκαμπο όσο και στον προμετωπιαίο φλοιό (Zyzak, Otto et al. 1995).

Όπως έχει προαναφερθεί η διαβίωση σε ένα φτωχότερο περιβάλλον μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη δράση τόσο των γλουταματεργικών όσο και των χολινεργικών νευρώνων, ενώ το στρες μπορεί να προκαλέσει αύξηση της δραστηριότητας των γλουταματεργικών συστημάτων. Αυτές οι πειραματικές προσεγγίσεις φαίνεται να έχουν αντίθετα αποτελέσματα στη γλουταματεργική νευροδιαβίβαση, αλλά μπορεί μακροπρόθεσμα να οδηγήσουν σε παρόμοιες διαταραχές των γνωσιακών λειτουργιών. Η απομόνωση νεαρών πειραματοζώων προκαλεί μειωμένη ανάπτυξη συναπτικών επαφών, επειδή λιγότερες νευρικές απολήξεις χρησιμοποιούν το γλουταμικό οξύ ή την ακετυλοχολίνη. Κατ' επέκταση το στρες προκαλεί διεγερτικοτοξικά γλουταματεργικά αποτελέσματα (glutamatergic excitotoxic effects) που οδηγούν σε απώλεια των ήδη καλά παγιωμένων συνάψεων και νευρώνων, καταστάσεις που παρατηρούνται για παράδειγμα στη νόσο Alzheimer. Επίσης, τα γλουταματεργικά συστήματα επηρεάζονται εκτενώς στη νόσο Alzheimer και μπορεί να σχετίζονται με πολλά από τα νευροχημικά και γνωσιακά ελλείμματα που χαρακτηρίζουν την ασθένεια. Η γλουταματεργική νευροδιαβίβαση στις περιοχές του νεοφλοιού και στον ιππόκαμπο διακόπτονται οριστικά (Greenamyre 1986; Palmer and Gershon 1990), ενώ τα μειωμένα επίπεδα γλουταμικού οξέος στους εγκεφάλους ασθενών με νόσο Alzheimer φαίνεται να είναι το αποτέλεσμα διακοπτόμενων συνδέσεων (Greenamyre, Maragos et al. 1988). Γενικότερα, η οξεία ή χρόνια διεγερτικοτοξικότητα που προκαλείται από υπερβολική απελευθέρωση γλουταμικού οξέος έχει βρεθεί ότι αποτελεί την κύρια αιτία και άλλων νευροεκφυλιστικών διαταραχών.



Εικόνα 9. Φυσιολογικές και παθολογικές συνέπειες του γλουταμικού οξέος στον εγκέφαλο των θηλαστικών.

1.6 Πλαστικότητα του εγκεφάλου, νευρογένεση και συναπτογένεση

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο εγκέφαλος είναι το όργανο που μας επιτρέπει να αντιλαμβανόμαστε το εξωτερικό και το εσωτερικό μας περιβάλλον, αλλά και να αντιδρούμε κατάλληλα σε διάφορα ερεθίσματα. Λέγεται ότι «ποτέ δεν χρησιμοποιούμε δύο φορές τον ίδιο εγκέφαλο». Συνεχώς, υπό την επίδραση του περιβάλλοντος, δημιουργούνται νέες συνδέσεις μεταξύ των νευρικών κυττάρων, παλαιές εκλείπουν και άλλες ενδυναμώνονται ή αποδυναμώνονται. Με αυτή την έννοια ο εγκέφαλος αλλάζει, επομένως έχει δυνατότητες αναπροσαρμογής, διαθέτει δηλαδή *πλαστικότητα*, την οποία προσπαθούμε να ενισχύσουμε, έτσι ώστε να επιφέρουμε επιδιορθώσεις στον τραυματισμένο ή ασθενή εγκέφαλο (Hyman 2000).

Ο Ramón y Cajal ήταν ίσως ο πρώτος νευροβιολόγος, ο οποίος δήλωσε ότι η πλαστικότητα των νευρικών κυττάρων εξαφανίζεται σχεδόν ολοκληρωτικά κατά τη διάρκεια της γήρανσης. Ήταν πεπεισμένος ότι η νευρωνική αρχιτεκτονική δεν αποτελούσε απλά μία σταθερή δομή και ότι οι δυναμικές και πλαστικές ιστολογικές μεταβολές στον εγκέφαλο, σχετίζονταν με νοητικές διαδικασίες και δραστηριότητες. Πιο συγκεκριμένα, ο ίδιος είχε προτείνει ότι μέσω της νοητικής άσκησης, οι συνδέσεις μεταξύ των νευρώνων μπορούν να μεταβληθούν, καθώς επίσης και να πολλαπλασιαστούν. Επίσης, ήταν ο πρώτος επιστήμονας που επεσήμανε την επιρροή που έχει το περιβάλλον στην ανάπτυξη και τη λειτουργία του εγκεφάλου μέσω των αλλαγών που παρατηρούνται μεταξύ των νευρικών συνδέσεων. Ωστόσο, διάφορες μελέτες που αφορούν στη γήρανση του εγκεφάλου, κατέληξαν σε διαφορετικά συμπεράσματα, κάνοντάς μας πλέον γνωστό, ότι η πλαστικότητα των νευρικών κυττάρων εξακολουθεί να υφίσταται στον εγκέφαλο και κατά τη διάρκεια αυτής.

Για πολλά χρόνια πιστευόταν ότι ο ενήλικος εγκέφαλος αποτελείτο από ένα σταθερό πληθυσμό νευρικών κυττάρων, τα οποία δεν μπορούσαν να ανανεωθούν πια. Κατά τη δεκαετία του 1960, διάφορες μελέτες είχαν δείξει ότι σε επιλεγμένες περιοχές του ενήλικου εγκεφάλου υπήρχε γένεση νέων νευρικών κυττάρων (Altman 1963; Altman and Das 1965; Altman 1969).

Έχουν αναγνωρισθεί πολλαπλοί παράγοντες που επιδρούν στη νευρογένεση. Από τους παράγοντες αυτούς άλλοι έχουν ευεργετικά αποτελέσματα, ευνοώντας την επιβίωση ή τον πολλαπλασιασμό των πρόδρομων κυττάρων ή και τους δύο μηχανισμούς μαζί και άλλοι έχουν ανασταλτική επίδραση (ρύθμιση) στις προαναφερθείσες λειτουργίες. Από τους παράγοντες αυτούς σημαντικότερο ρόλο παίζουν διάφοροι φυσικοί παράγοντες όπως το περιβάλλον (εμπλουτισμένο ή φτωχό), στο οποίο φιλοξενείται ένας οργανισμός και η προσπάθεια προσαρμογής του σε αυτό, τα διάφορα ερεθίσματα που προσλαμβάνονται από το περιβάλλον, η μάθηση και μνήμη, η φυσική άσκηση όπως το τρέξιμο και η αναζήτηση τροφής (Leuner, Mendolia-Loffredo et al. 2004).

Η έρευνα για τις ευεργετικές δράσεις του εμπλουτισμένου περιβάλλοντος λαμβάνει χώρα κατά κύριο λόγο στα τρωκτικά, αλλά έχει παρατηρηθεί ότι παρόμοιες επιδράσεις επιφέρει και στα πρωτεύοντα και πιθανότατα και στον άνθρωπο (Kozorovitskiy, Gross et al. 2005). Η άμεση έρευνα στις συνάψεις του ανθρώπινου εγκεφάλου είναι περιορισμένη διότι απαιτείται χρήση ανθρώπινων ιστολογικών δειγμάτων. Παρά ταύτα, φαίνεται ότι η επιλογή των νευρωνικών διασυνδέσεων εξαρτάται κυρίως από τη δραστηριότητα με την οποία ασχολείται το άτομο κατά τη διάρκεια του σχηματισμού των συνάψεων. Συνεπώς είναι ιδιαίτερα σημαντικό για ένα άτομο να ζει μέσα σε ένα περιβάλλον πλούσιο σε ερεθίσματα, που του παρέχει όλων των ειδών τα αισθητηριακά ερεθίσματα, δηλαδή αφθονία εμπειριών (Keegan, Ash et al. 1976). Μια ικανότητα ή δεξιότητα μπορεί να μην αναπτυχθεί στην πληρότητά της ή ακόμα να μην αναπτυχθεί καθόλου, γεγονός που οφείλεται είτε στη φύση των εμπειριών είτε στην έλλειψη ερεθισμάτων.

Συμπεριφορικές, κυτταρικές και μοριακές μελέτες έχουν αποκαλύψει σημαντικές επιπτώσεις του *εμπλουτισμένου περιβάλλοντος* στα τρωκτικά, καθώς επίσης και σε άλλα είδη, προσφέροντας κατά αυτό τον τρόπο νέες γνώσεις που σχετίζονται με την ενήλικη νευρογένεση και τη συναπτογένεση. Το εμπλουτισμένο περιβάλλον είτε στη φύση είτε σχεδιασμένο στο εργαστήριο όπου φιλοξενείται ένα πειραματόζωο, ενισχύει την επιβίωση των νεογεννηθέντων κυττάρων στον ιππόκαμπο (Barnea and Nottebohm 1994; Kempermann, Kuhn et al. 1997). Αυτό σημαίνει ότι πειραματόζωα που ζουν σε σταθερές συνθήκες εργαστηρίου χάνουν πολύ περισσότερα νέα κύτταρα από εκείνα τα ζώα που ζουν σε εμπλουτισμένο και σύνθετο εργαστηριακό περιβάλλον.

Γενικά θεωρείται ότι ο εγκέφαλος που έχει λάβει ερεθίσματα από πλουσιότερο περιβάλλον έχει αυξημένο αριθμό συνάψεων αλλά και πιο πολύπλοκες δενδριτικές ακάνθους στις οποίες στηρίζονται οι συνάψεις. Ο μεγάλος αριθμός συνάψεων σημαίνει μεγαλύτερη συναπτική δραστηριότητα και αυξημένο μέγεθος και αριθμό γλοιακών κυττάρων. Αξιοσημείωτη είναι επίσης η επίδραση του εμπλουτισμένου περιβάλλοντος στην πολυπλοκότητα και το μήκος των δενδριτικών απολήξεων πάνω στις οποίες σχηματίζονται οι συνάψεις (Wallace,

Kilman et al. 1992), οι οποίες τείνουν να είναι μεγαλύτερες (Sirevaag and Greenough 1985). Το εμπλουτισμένο περιβάλλον πέρα από το γεγονός ότι προκαλεί αύξηση του αριθμού των συνάψεων, συντελεί και στην αύξηση της ενεργοποίησης αυτών (Sirevaag and Greenough 1987). Επίσης το εμπλουτισμένο περιβάλλον προκαλεί πολλές κυτταρικές αλλαγές, οι οποίες συμβαδίζουν με μεταβολές της έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, οι οποίες με τη σειρά τους συμβάλλουν στη λειτουργία των συνάψεων και της κυτταρικής πλαστικότητας (Rampon, Jiang et al. 2000).

Οι ευεργετικές επιπτώσεις ενός εμπλουτισμένου περιβάλλοντος μπορούν να μετρηθούν εξετάζοντας το μέγεθος των διαφόρων περιοχών του εγκεφάλου, τον αριθμό και την πυκνότητα των συνάψεων των νευρώνων (Diamond, Rosenzweig et al. 1972). Επίσης οι αλλαγές που επιφέρει το εμπλουτισμένο περιβάλλον στη συναπτογένεση, προϋποθέτουν σειρά κυτταροσκελετικών αλλαγών, οι οποίες αποτελούν το κλειδί για τη σωστή νευρική λειτουργία και επιτυγχάνονται μέσω της βοήθειας μιας σειράς πρωτεϊνών, μερικές από τις οποίες παραθέτονται παρακάτω.

Συναπτικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη δομή και στη λειτουργία των συνάψεων.

Μία από τις βασικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον καθορισμό των κυτταροσκελετικών αλλαγών είναι και η **πρωτεΐνη Tau**. Στον ανθρώπινο εγκέφαλο, οι πρωτεΐνες Tau ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνών που είναι συνδεδεμένες με τους μικροσωληνίσκους (MAPs, microtubule-associated proteins) (Binder, Frankfurter et al. 1985). Στον άνθρωπο, οι πρωτεΐνες Tau συναντώνται κυρίως στα νευρικά κύτταρα (Delacourte and Buee 2000), ενώ μικρά ποσά τους υπάρχουν στα ολιγοδενδροκύτταρα και αστροκύτταρα του ΚΝΣ. Στον ανθρώπινο εγκέφαλο, οι πρωτεΐνες Tau συγκροτούν μια οικογένεια 6 ισομορφών (κυμαίνονται από 352 έως 441 αμινοξέα) που παράγονται από

εναλλακτικό μάτισμα ενός μόνο γονιδίου και τροποποιούνται περαιτέρω μέσω μετα-μεταφραστικών διαδικασιών (Goedert, Crowther et al. 1991).

Οι διάφορες Tau ισομορφές διαφέρουν μεταξύ τους, στην παρουσία τριών ή τεσσάρων επαναλαμβανόμενων περιοχών στο καρβοξυ-τελικό άκρο (C-terminal) του μορίου και στην απουσία ή παρουσία μιας ή δύο προσθηκών (inserts) (29 ή 58 αμινοξέα) στο αμινο-τελικό άκρο (N-terminal) του μορίου. Η κάθε ισομορφή έχει ιδιαίτερους φυσιολογικούς ρόλους, διότι εκφράζεται διαφορετικά κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Επιπλέον, οι 6 ισομορφές της Tau δεν εκφράζονται το ίδιο στους νευρώνες και για το λόγο αυτό είναι διαφορετικά κατανομημένες στους νευρωνικούς υποπληθυσμούς (Goedert, Spillantini et al. 1989).

Η πλέον αναγνωρισμένη λειτουργία της πρωτεΐνης Tau είναι η πρόσδεσή της στους μικροσωληνίσκους (Cleveland, Hwo et al. 1977; Brandt and Lee 1993) και ταυτόχρονα η διατήρηση της οργάνωσης και της σταθερότητάς τους. Η Tau, στον εμβρυϊκό εγκέφαλο προάγει τη συγκρότηση των μικροσωληνίσκων λιγότερο αποτελεσματικά σε σύγκριση με τον ενήλικο εγκέφαλο (Yoshida and Ihara 1993) ενώ υψηλά επίπεδα φωσφορυλιωμένης Tau συνδέονται με τη δυναμική παρουσία των μικροσωληνίσκων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του εγκεφάλου, που αποτελεί περίοδο υψηλής πλαστικότητας (Brion, Octave et al. 1994). Η πρωτεΐνη Tau, είναι απαραίτητη τόσο για την έναρξη όσο και τον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων, αυξάνοντας το ρυθμό πολυμερισμού των μικροσωληνίσκων και μειώνοντας το ρυθμό αποπολυμερισμού αυτών (Drechsel, Hyman et al. 1992). Επομένως, οι μικροσωληνίσκοι ως βασικό συστατικό του κυτταροσκελετού και άρα έμμεσα η πρωτεΐνη Tau, συμμετέχουν στη διατήρηση της μορφολογίας και της δομής του νευρικού κυττάρου, καθώς επίσης και στις διαδικασίες της αξονικής μεταφοράς και μετάδοσης νευρωνικών σημάτων.

Στον ανθρώπινο ενήλικο εγκέφαλο η πιο μεγάλη μορφή της πρωτεΐνης Tau αποτελείται από 80 κατάλοιπα (residues) σερίνης (Ser) ή θρεονίνης (Thr) και 5 κατάλοιπα θυροξίνης (Tyr). Ως εκ τούτου, τουλάχιστον το 20% των μορίων έχει τη δυνατότητα να φωσφορυλιωθεί (Goedert, Spillantini et al. 1989). Στην πρωτεΐνη Tau έχουν περιγραφεί διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που ελέγχουν τη λειτουργία της, όπως η φωσφορυλίωση. Η φωσφορυλίωση της

πρωτεΐνης Tau σε ειδικές θέσεις, υπό κανονικές συνθήκες, είναι μία φυσιολογική και αρκετά δυναμική διαδικασία που λαμβάνει χώρα διαρκώς στο κύτταρο και ρυθμίζει την ικανότητα δέσμευσης της πρωτεΐνης Tau στους μικροσωληνίσκους, στην πλασματική μεμβράνη (Pooler, Usardi et al. 2012), ενώ πρόσφατα έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά στις συνάψεις μέσω ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών διαδικασιών με τις μετασυναπτικές πρωτεΐνες PSD95 και Fyn (Ittner, Ke et al. 2010; Mondragon-Rodriguez, Trillaud-Doppia et al. 2012) Κατά συνέπεια, η σύνδεση της πρωτεΐνης Tau με άλλες συναπτικές πρωτεΐνες αυξάνει τις δυνατότητές της στο να εξασκεί φυσιολογικούς ρόλους στη σύναψη, ενώ οποιαδήποτε αλλοίωση της λειτουργίας της, μπορεί να οδηγήσει σε συναπτική δυσλειτουργία με αποτέλεσμα την απώλεια των συνάψεων και την εμφάνιση νευροεκφυλιστικών διαταραχών.

Παρά τον αρχικό μετασυναπτικό εντοπισμό της πρωτεΐνης Tau (Hoover, Reed et al. 2010), διάφορες μελέτες έδειξαν επίσης την εμπλοκή της σε φυσιολογικές συναπτικές λειτουργίες. Παρατηρήθηκε ότι η ενεργοποίηση του NMDA υποδοχέα μπορεί να οδηγήσει σε φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Tau, οδηγώντας με αυτό τον τρόπο σε αύξηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ της Tau και της πρωτεΐνης Fyn και μείωση της αλληλεπίδρασης μεταξύ της Tau και της πρωτεΐνης PSD95. Φαίνεται λοιπόν ότι υπάρχει ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο που αποτελείται από την πρωτεΐνη PSD95, από NMDA υποδοχείς (Sheng and Hoogenraad 2007) και από τις πρωτεΐνες Tau και Fyn (Lee, Newman et al. 1998), το οποίο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση και στην πλαστικότητα των συνάψεων.

Οι κινάσες που φωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη Tau υποδιαιρούνται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τις κινάσες PDPK (proline-directed kinases) όπως η Cdk5 και τις κινάσες μη-PDPK (non proline-directed kinases) όπως η PKA (Gendron and Petrucelli 2009). Έχει βρεθεί ότι η φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη Tau έχει μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης, αναστέλλει τη συνάθροιση των μικροσωληνίσκων και τον σωστό προσανατολισμό τους και προάγει τον αποπολυμερισμό τους (Lindwall and Cole 1984). Επιπλέον, η υπερφωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη Tau συναθροίζεται και δημιουργεί συσσωματώματα όπως τα **PHFs** (paired helical filaments).

Η **PSD95** (Post Synaptic Density protein) είναι πρωτότυπη “scaffold” πρωτεΐνη, η οποία είναι παρούσα σε διεγερτικές συνάψεις και είναι μέλος της οικογένειας των MAGUK (membrane-associated guanylate kinase) πρωτεϊνών (Elias and Nicoll 2007). Η PSD95 είναι μία από τις πιο άφθονες μετασυναπτικές πρωτεΐνες, αφού αποτελεί σχεδόν το 2% της συνολικής μάζας των μετασυναπτικών πρωτεϊνών (Chen, Vinade et al. 2005). Ο μεγάλος αριθμός PSD95 πρωτεϊνών εξασφαλίζει άφθονες θέσεις δέσμησης διαφόρων εταίρων, όπως για παράδειγμα με NMDA και AMPA υποδοχείς, νευρολιγίνη και κανάλια καλίου στη μετασυναπτική μεμβράνη των νευρώνων.

Οι NMDA υποδοχείς χαρακτηρίστηκαν ως αντιπροσωπευτικές πρωτεΐνες που συνδέονταν με την PSD95 (Niethammer, Kim et al. 1996), ενώ οι AMPA υποδοχείς δεν συνδέονται άμεσα με την PSD95. Αντισώματα για την πρωτεΐνη αυτή έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη διαφόρων ασθενειών (Toro and Deakin 2005). Ο σημαντικότερος ρόλος της PSD95 πρωτεΐνης έγκειται στην εδραίωση και οργάνωση του NMDA υποδοχέα και άλλων συναπτικών πρωτεϊνών στη μετασυναπτική μεμβράνη (Kim and Sheng 2004). Αλληλεπιδράσεις μεταξύ της PSD95 πρωτεΐνης και του NMDA υποδοχέα στη μετασυναπτική μεμβράνη έχουν δείξει σημαντικές για τη συναπτική πλαστικότητα (Hata and Takai 1999).

Έχει επίσης βρεθεί ότι υπερέκφραση της PSD95 σε νευρώνες του ιππόκαμπου μπορεί να οδηγήσει σε ωρίμανση των γλουταματεργικών συνάψεων, ενώ παράλληλα η έκφραση της PSD95 αυξάνει τον αριθμό και το μέγεθος των δενδριτικών ακάνθων. Αυτά τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι η PSD95 αποτελεί σημαντικό παράγοντα για τη σταθεροποίηση των συνάψεων και την πλαστικότητά τους.

Η **συναπτοφυσίνη**, ένας γλυκοπρωτεϊνικός συντελεστής της μεμβράνης των συναπτικών κυστιδίων (Wiedenmann and Franke 1985), φαίνεται να αποτελεί έναν από τους ιδανικούς μάρτυρες αλλαγών και πλαστικότητας των συνάψεων, λόγω της διανομής της στις προσυναπτικές νευρικές απολήξεις. Η λειτουργία αυτής της πρωτεΐνης δεν είναι πλήρως γνωστή, αλλά παλαιότερες μελέτες που σχετίζονται με τη νόσο Alzheimer και με τη νόσο Huntington, έχουν δείξει ότι

χαμηλά επίπεδα συναπτοφυσίνης συνδέονται στενά με απώλεια συνάψεων (Goto and Hirano 1990; Masliah, Terry et al. 1991). Άλλες πειραματικές μελέτες έχουν παράλληλα καταδείξει ότι εμπλέκεται στη δέσμευση ιόντων ασβεστίου (Rehm, Wiedenmann et al. 1986), στο σχηματισμό καναλιών (Thomas, Hartung et al. 1988), στις εξωκυτταρικές διαδικασίες νευροδιαβίβασης (Alder, Xie et al. 1992) και στην ανακύκλωση συναπτικών κυστιδίων μέσω ενδοκυττάρωσης (Evans and Cousin 2005).

Μία άλλη οικογένεια πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση της απελευθέρωσης των νευροδιαβιβαστών στις συνάψεις είναι οι **συναψίνες** (Evergren, Benfenati et al. 2007). Οι πρωτεΐνες αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία, στη διατήρηση και στη λειτουργία των συνάψεων (Greengard, Valtorta et al. 1993; Fornasiero, Bonanomi et al. 2010). Οι συναψίνες 1 και 2, εκφράζονται αποκλειστικά στις νευρικές απολήξεις των ώριμων νευρώνων (De Camilli, Cameron et al. 1983) όπου συνδέονται με την κυτταροπλασματική επιφάνεια μικρών συναπτικών κυστιδίων (De Camilli, Harris et al. 1983). Αντιθέτως, η έκφραση της συναψίνης 3 ρυθμίζεται με μείωση (downregulation) στους ώριμους νευρώνες και η πρωτεΐνη δεν περιορίζεται αυστηρά στις συναπτικές απολήξεις (Ferreira, Kao et al. 2000; Kao, Li et al. 2008).

Οι συναψίνες φωσφορυλιώνονται από διάφορες κινάσες, όπως π.χ. MAPK-Erk 1/2 (mitogen-activated protein kinase), Cdk5 (cyclin-dependent kinase 5), CaMK (Calcium/calmodulin-dependent protein kinases), το οποίο οδηγεί εξελικτικά σε επιμήκυνση των νευριτών, συναπτογένεση και ωρίμανση των συνάψεων (Fornasiero, Bonanomi et al. 2010; Valtorta, Pozzi et al. 2011).

Επίσης, διάφορες μελέτες που αφορούν στο ρόλο των συναψινών στη νευροδιαβίβαση, έχουν δείξει ότι η συναψίνη 1 είναι κατά κύριο λόγο υπεύθυνη για τη διατήρηση των GABAεργικών κυστιδίων (Baldelli, Fassio et al. 2007), ενώ η συναψίνη 2a είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση των γλουταματεργικών συναπτικών κυστιδίων (Gitler, Cheng et al. 2008).

Πολλές μελέτες έχουν καταδείξει επίσης ότι η πρωτεΐνη **Cdk5** μέσω πληθώρας φωσφορυλιώσεων προ- και μετασυναπτικών πρωτεϊνών, λειτουργεί ως ουσιαστικός διαμορφωτής της συναπτικής διαβίβασης. Πρόσφατες εξελίξεις

στον τομέα της έρευνας που αφορούν στην πρωτεΐνη Cdk5, έχουν παγιώσει την *in vivo* - σημασία της - στη νευροδιαβίβαση, και δείχνουν επίσης τον καίριο ρόλο της στη ρύθμιση ανώτερων γνωσιακών λειτουργιών και διαφόρων νευροεκφυλιστικών διαταραχών (Cheung, Fu et al. 2006). Ως μία κατά κύριο λόγο νευρο-ειδική κινάση, η πρωτεΐνη Cdk5 εμπλέκεται σε μια εκπληκτική ποικιλία νευρωνικών λειτουργιών που συμπεριλαμβάνουν την επιβίωση και μετανάστευση των νευρώνων, τη συναπτική δραστηριότητα και τον κυτταρικό θάνατο μεταμιτωτικών νευρώνων (Cheung, Fu et al. 2006; Hisanaga and Endo 2010). Μεταξύ των διαφόρων βιολογικών λειτουργιών της Cdk5 πρωτεΐνης, ο ρόλος της ως ρυθμιστή της νευροδιαβίβασης και της συναπτικής πλαστικότητας έχει προσελκύσει την προσοχή πολλών επιστημόνων (Cheng and Ip 2003). Ωστόσο, οι μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους η Cdk5 ρυθμίζει αυτές τις δραστηριότητες δεν είναι πλήρως γνωστοί.

Η ενεργοποίηση της κινάσης αυτής απαιτεί την παρουσία ενός ρυθμιστικού ενεργοποιητή, που καλείται *p35*. Σε αντίθεση με άλλες Cdks, η Cdk5 αφθονεί στο νευρικό σύστημα (Tsai, Takahashi et al. 1993). Η *p35* χαρακτηρίστηκε ως η πρώτη ρυθμιστική υπομονάδα της Cdk5 μέσω της φυσικής της αλληλεπίδρασης με αυτή και μέσω της ικανότητάς της να ενεργοποιεί την Cdk5 κατόπιν άμεσης σύνδεσης με αυτή (Ishiguro, Kobayashi et al. 1994; Tsai, Delalle et al. 1994).

Η **p35** είναι πολύ ασταθής πρωτεΐνη (Patrick, Zhou et al. 1998) της οποίας η έκφραση περιορίζεται σε μεταμιτωτικούς νευρώνες του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) (Delalle, Bhide et al. 1997). Κατά την ανάπτυξη των νευρώνων, τόσο η Cdk5 όσο και η *p35* εμπλουτίζουν τους νευρίτες (Nikolic, Dudek et al. 1996). Έχει δειχθεί ότι η *p35* και η Cdk5 κινάσες παίζουν σημαντικό ρόλο στη μορφολογική ωρίμανση των νευρώνων. Η θέση της *p35* στις άκρες των αυξητικών κώνων και η σύνδεσή της με ελασματικές και φιλοποδιακές δομές (Nikolic, Chou et al. 1998) δείχνουν ότι οι κινάσες *p35* και Cdk5 μπορούν να ρυθμίσουν τη δυναμικότητα της ακτίνης του κυτταροσκελετού. Επιπλέον, η φωσφορυλίωση κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών όπως της Tau, υποδηλώνει ότι η *p35* και η Cdk5 παίζουν ευρύτερο ρόλο στη νευρωνική οργάνωση του κυτταροσκελετού (Baumann, Mandelkow et al. 1993; Paudel, Lew et al. 1993).

Αξίζει επίσης να σημειωθεί, ότι σημαντικό ρόλο στη δομή και στη λειτουργία των συνάψεων διαδραματίζουν επίσης και οι συναπτικοί υποδοχείς, όπως είναι για παράδειγμα οι υποδοχείς του γλουταμικού οξέος, για τους οποίους έχει γίνει λεπτομερής αναφορά παραπάνω (Βλ. Σελ. 28).

1.7 Εμπλουτισμένο περιβάλλον

Η ανάπτυξη του εγκεφάλου στα θηλαστικά χαρακτηρίζεται από πλήθος γενετικών και επιγενετικών μηχανισμών που οδηγούν στη σωστή κυτταρική και δομική λειτουργία του κατά τη γέννηση. Παρόλα αυτά, αισθητηριακά, γνωσιακά και κινητικά ερεθίσματα που προέρχονται από την αλληλεπίδραση με το περιβάλλον από τη γέννηση μέχρι την τρίτη ηλικία παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναδιοργάνωση των νευρωνικών κυκλωμάτων που απαιτούνται για τη σωστή λειτουργία του εγκεφάλου. Όπως έχει προαναφερθεί, αρκετές μελέτες έχουν καταδείξει την ευεργετική επίδραση του εμπλουτισμένου περιβάλλοντος στην εγκεφαλική δομή και λειτουργία.

Ο όρος εμπλουτισμένο περιβάλλον αφορά στο πώς ο εγκέφαλος επηρεάζεται από τα ερεθίσματα που προέρχονται από το περιβάλλον και συμπεριλαμβάνει την ευκαιρία για κοινωνική συναναστροφή. Γενικότερα, θεωρείται ότι ο εγκέφαλος που λαμβάνει ερεθίσματα από το περιβάλλον παρουσιάζει μεγαλύτερο αριθμό συνάψεων και πιο πολύπλοκες δενδριτικές ακάνθους στις οποίες στηρίζονται οι συνάψεις. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται κυρίως κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος αλλά και κατά την ενήλικη ζωή σε μικρότερο βαθμό. Μεγάλος αριθμός συνάψεων σημαίνει παράλληλα μεγαλύτερη συναπτική δραστηριότητα και αυξημένο μέγεθος και αριθμός γλοιακών κυττάρων. Παρατηρείται επίσης αύξηση της τριχοειδικής κυκλοφορίας ώστε να παρέχεται περισσότερη ενέργεια στους νευρώνες και τα γλοιακά κύτταρα, ενώ ο εγκεφαλικός φλοιός γίνεται παχύτερος.

Η έννοια του εμπλουτισμένου περιβάλλοντος στα πειραματόζωα δεν περιλαμβάνει ένα σαφή ορισμό και πολλές φορές χρησιμοποιείται εσφαλμένα, υποδηλώνοντας απλώς την τοποθέτηση ενός ή περισσότερων αντικειμένων

στον κλωβό των πειραματοζώων (Nithianantharajah and Hannan 2006). Μέσω του εμπλουτισμένου περιβάλλοντος βελτιώνεται η βιολογική λειτουργία του πειραματοζώου, ενισχύεται η φυσιολογική του συμπεριφορά και αυξάνεται η ικανότητά του όσον αφορά στην προσαρμογή σε συμπεριφορικές και φυσιολογικές αλλαγές. Το 1991 ο Bloomsmith κατηγοριοποίησε τον εμπλουτισμό του περιβάλλοντος στα παρακάτω:

Κοινωνικός εμπλουτισμός, που περιλαμβάνει έμμεση ή άμεση συναναστροφή με άλλα ζώα του ίδιου είδους ή τον άνθρωπο.

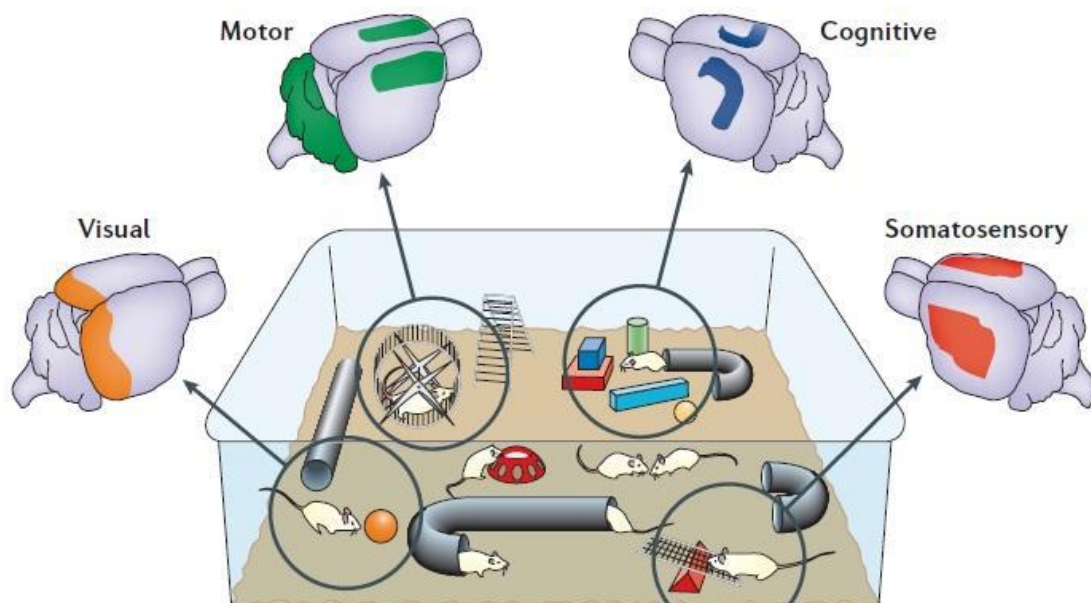
Εμπλουτισμός με άσκηση, που περιλαμβάνει τόσο τον ψυχολογικό εμπλουτισμό όσο και τον εμπλουτισμό που προϋποθέτει σωματική άσκηση.

Φυσικός εμπλουτισμός, που αναφέρεται στην αλλαγή του μεγέθους ή της πολυπλοκότητας του κλωβού.

Αισθητηριακός εμπλουτισμός, που σχετίζεται με ερεθίσματα που μπορεί να είναι οπτικά, οσφρητικά, ακουστικά ή οποιασδήποτε άλλης φύσεως και

Τροφικός εμπλουτισμός, που μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με την αύξηση της ποικιλίας της τροφής, ή με την αλλαγή μεθόδου χορήγησής της.

Επιδημιολογικές μελέτες νευροβιολογικών και ψυχιατρικών διαταραχών, συμπεριλαμβανομένων μελετών σε μονοζυγωτικούς διδύμους, παρέχουν πληθώρα στοιχείων για τη σχέση των γενετικών με τους περιβαλλοντικούς παράγοντες (Mayeux 2003). Εντούτοις, εξαιτίας της ποικιλομορφίας των περιβαλλοντικών ερεθισμάτων στον άνθρωπο, μέχρι στιγμής δεν έχει υπάρξει μία ξεκάθαρη συσχέτιση ενός περιβαλλοντικού ερεθίσματος και μίας νευρολογικής διαταραχής. Τα πειραματικά πρότυπα είναι αυτά που έχουν φανεί χρήσιμα για τη διερεύνηση μοριακών, κυτταρικών και περιβαλλοντικών ρυθμιστών της παθογένειας μιας διαταραχής. Όμως τα περισσότερα πρότυπα νευροβιολογικών διαταραχών, αφορούν στη διαβίωση των πειραματοζώων σε τυπικούς εργαστηριακούς κλωβούς. Όταν σε τέτοια πρότυπα χρησιμοποιήθηκε ο εμπλουτισμός του περιβάλλοντος για την αύξηση αισθητηριακών, γνωσιακών και κινητικών ερεθισμάτων, τα αποτελέσματα ήταν θεαματικά (Nithianantharajah and Hannan 2006) (Εικ.10).



Εικόνα 10. Το σύνολο των ερεθισμάτων και τα συστήματα του εγκεφάλου, που επηρεάζονται από το εμπλουτισμένο περιβάλλον ((Nithianantharajah and Hannan 2006). Το εμπλουτισμένο περιβάλλον μπορεί να προκαλέσει νευρωνική ενεργοποίηση, σηματοδότηση και πλαστικότητα σε διάφορες εγκεφαλικές περιοχές. Η ενισχυμένη αισθητηριακή διέγερση, ενεργοποιεί τον σωματοαισθητηριακό (κόκκινο) και τον οπτικό (πορτοκαλί) φλοιό. Η αυξημένη μαθησιακή διέγερση - για παράδειγμα η κωδικοποίηση μιας πληροφορίας που σχετίζεται με χωρικούς χάρτες, αναγνώριση αντικειμένου, τροποποίηση της προσοχής - ενεργοποιεί τον ιππόκαμπο και άλλες εγκεφαλικές περιοχές (μπλε). Επιπροσθέτως, ενισχυμένη κινητική δραστηριότητα, όπως φυσικές εξερευνητικές κινήσεις διεγείρει περιοχές όπως ο κινητικός φλοιός και η παρεγκεφαλίδα (πράσινο).

Πειραματικά το εμπλουτισμένο περιβάλλον περιγράφηκε αρχικά από το νευροεπιστήμονα Donald O. Hebb το 1947, ο οποίος σύγκρινε επίμυες που διαβίωναν ως κατοικίδια ελεύθερα στο σπίτι του με εκείνους που διαβίωναν σε πειραματικούς εργαστηριακούς κλωβούς. Αν και η μελέτη του Hebb δεν περιελάμβανε το πρότυπο του εμπλουτισμένου περιβάλλοντος, ήταν η πρώτη εργασία η οποία επεσήμανε το ρόλο των περιβαλλοντικών ερεθισμάτων στην ανάπτυξη των γνωσιακών λειτουργιών (Hebb 1955).

Το 1960 αντιθέτως έγινε η πρώτη μελέτη που περιελάμβανε το πειραματικό πρότυπο του εμπλουτισμένου περιβάλλοντος, κατά το οποίο συγκρίθηκαν επίμυες που διαβίωναν σε τυπικούς εργαστηριακούς κλωβούς με επίμυες που διαβίωναν σε κλωβούς που διέθεταν διάφορα παιχνίδια, σκάλες, σήραγγες και

τροχούς για άσκηση. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι το εμπλουτισμένο περιβάλλον επιδρά στο ένζυμο χολινεστεράση, αυξάνοντας τη δραστηριότητά του (Krech, Rosenzweig et al. 1960). Τα αποτελέσματα έδειξαν επίσης ότι το εμπλουτισμένο περιβάλλον αυξάνει τον όγκο του εγκεφαλικού φλοιού (Rosenzweig, Krech et al. 1962). Το 1964 προτάθηκε ότι η αύξηση αυτή στον όγκο ήταν αποτέλεσμα αύξησης του πάχους του εγκεφαλικού φλοιού καθώς και αύξησης των συνάψεων και του αριθμού των γλοιακών κυττάρων (Altman and Das 1964; Diamond, Krech et al. 1964).

Παράλληλα το 1964 ο Harry Harlow μελέτησε τα αποτελέσματα της μητρικής και κοινωνικής αποστέρησης (που είναι μια μορφή αποστέρησης των περιβαλλοντικών ερεθισμάτων) νεογνών μαϊμούδων Rhesus. Η έρευνα αυτή υπέδειξε το πόσο σημαντικά είναι τα κοινωνικά ερεθίσματα στη φυσιολογική γνωσιακή και συναισθηματική ανάπτυξη (Harlow, Rowland et al. 1964). Έκτοτε πολλές είναι οι μελέτες που έχουν δείξει την επίδραση που έχει το εμπλουτισμένο περιβάλλον στην ανάπτυξη του εγκεφάλου.



Εικόνα 11. Κλωβός εμπλουτισμένου περιβάλλοντος και αντιπαραβολή τυπικού εργαστηριακού κλωβού .

(Πηγή εικόνων: <https://www.google.gr/search?q=enriched+environment&espv>)

Διάφορες μελέτες μέχρι στιγμής δείχνουν ότι το εμπλουτισμένο περιβάλλον παίζει κάποιο ρόλο στην καθυστέρηση της ανάπτυξης νευροψυχιατρικών διαταραχών όπως η νόσος Alzheimer. Στη νόσο του Huntington, το εμπλουτισμένο περιβάλλον καθυστερεί την εμφάνιση κινητικών δυσλειτουργιών, μειώνει την απώλεια των νευρώνων και αυξάνει την έκκριση των νευροτροφικών παραγόντων (Hockly, Cordery et al. 2002; Schilling, Savonenko et al. 2004; Spires, Grote et al. 2004; Lazic, Grote et al. 2006). Στη νόσο Alzheimer ενισχύεται η μνήμη και η μάθηση και αυξάνεται η έκφραση της συναπτοφυσίνης και των νευροτροφικών παραγόντων (Jankowsky, Xu et al. 2003; Arendash, Garcia et al. 2004). Στη νόσο του Parkinson υπάρχει μείωση της έντασης των κινητικών συμπτωμάτων καθώς και αυξημένη επιβίωση των ντοπαμινεργικών νευρώνων (Bezard, Dovero et al. 2003; Faherty, Raviie Shepherd et al. 2005; Jadvani, Kolb et al. 2006). Παράλληλα στην επιληψία το εμπλουτισμένο περιβάλλον προστατεύει από τη συχνή εμφάνιση των κρίσεων, ενώ στα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια και στους τραυματισμούς, η διαβίωση σε περιβάλλον πλούσιο σε ερεθίσματα επάγει την ανάρρωση και προσδίδει νευροπροστασία (Ohlsson and Johansson 1995; Young, Lawlor et al. 1999; Auvergne, Lere et al. 2002).

Παρόλο που η έρευνα για το εμπλουτισμένο περιβάλλον έχει πραγματοποιηθεί κυρίως σε τρωκτικά πειραματόζωα, έχει παρατηρηθεί ότι παρόμοια φαινόμενα συμβαίνουν σε πρωτεύοντα και ίσως και στον ίδιο τον άνθρωπο (Kozorovitskiy, Gross et al. 2005). Όμως, η άμεση έρευνα στις συνάψεις του ανθρώπινου εγκεφάλου είναι περιορισμένη διότι απαιτούνται ανθρώπινα ιστολογικά δείγματα. Έχει δειχθεί ότι στον άνθρωπο η έλλειψη διαφόρων ερεθισμάτων καθυστερεί την ανάπτυξη γνωσιακών λειτουργιών. Αντιθέτως, όπως φαίνεται από μεταθανάτια δείγματα, μπορεί να υπάρχει ένας κρίκος που συνδέει το μορφωτικό επίπεδο με την πολυπλοκότητα των συνάψεων, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι υψηλά επίπεδα εκπαίδευσης ενισχύουν τη γνωσιακή ανάπτυξη (Jacobs, Schall et al. 1993; Jacobs and Scheibel 1993).

Ένα σημαντικό μειονέκτημα των μελετών που χρησιμοποιούν το συμπεριφορικό πρότυπο του εμπλουτισμένου περιβάλλοντος έγκειται στο γεγονός ότι δεν αναφέρεται η ακριβής ηλικία των πειραματοζώων καθώς επίσης και ο χρόνος

παραμονής του πειραματοζώου στον κλωβό εμπλουτισμένου περιβάλλοντος (Nithianantharajah and Hannan 2006). Επιπροσθέτως, οι μελέτες που αφορούν σε νευροψυχιατρικές νόσους, αφήνουν τα πειραματόζωα να διαβιώνουν σε τυπικούς εργαστηριακούς κλωβούς, όπου παρέχονται ελάχιστα ερεθίσματα. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο ερώτημα, του εάν οι περισσότερες εργαστηριακές συνθήκες διαβίωσης των πειραματοζώων αντικατοπτρίζουν το φυσικό τους περιβάλλον και δεν αποτελούν ένα περιβάλλον που στην ουσία στερείται ερεθισμάτων και συνεπώς δεν είναι κατάλληλο για ιατρική έρευνα.

Το εμπλουτισμένο περιβάλλον εξ ορισμού ποικίλει σύμφωνα με τα πρωτόκολλα διαφόρων εργαστηρίων. Ως κλασικό περιβάλλον, ορίζονται οι τυπικοί εργαστηριακοί κλωβοί και ως εμπλουτισμένο περιβάλλον, οι μεγαλύτεροι εργαστηριακοί κλωβοί με το πλήθος ερεθισμάτων και την ευκαιρία για κοινωνική συναναστροφή. Τα αντικείμενα που χρησιμοποιούνται για να ενισχύσουν το εμπλουτισμένο περιβάλλον διαφέρουν ως προς τη σύνθεση, το σχήμα, το χρώμα ή ακόμα και τη μυρωδιά (Nithianantharajah and Hannan 2006), οπότε δεν μπορούμε να αναφερθούμε σε έναν τυποποιημένο κλωβό εμπλουτισμένου περιβάλλοντος, ο οποίος να θεωρείται κατάλληλος ώστε να αντικατοπτρίσει τις ευεργετικές επιδράσεις σε επίπεδο εγκεφάλου και συμπεριφοράς. Μελέτες που αναφέρονται στις επιδράσεις του εμπλουτισμένου περιβάλλοντος σε διάφορες εγκεφαλικές διαταραχές, έχουν χρησιμοποιήσει πληθώρα μεθοδολογικών συνθηκών. Σημαντική παράμετρος που αφορά στην περιβαλλοντική πολυπλοκότητα, φαίνεται να είναι η χρήση διαφορετικών αντικειμένων, δίνοντας τη δυνατότητα οπτικών, σωματοκινητικών και οσφρητικών ερεθισμάτων. Άλλη εξίσου σημαντική παράμετρος του εμπλουτισμένου περιβάλλοντος, αποτελεί και η αντικατάσταση των αντικειμένων με καινούργια, καθώς επίσης και η αλλαγή της θέσης τους, πράγμα το οποίο οδηγεί σε περαιτέρω γνωσιακή διέγερση, μέσω του σχηματισμού χωρικών χαρτών. Όλες αυτές οι παράμετροι συντελούν σε υψηλά επίπεδα διέγερσης λόγω πληθώρας ερεθισμάτων, σε αυξημένη φυσική άσκηση, και είναι βαθέως εξαρτώμενες από το πώς αντιδρούν τα διάφορα ζωικά μοντέλα στο εμπλουτισμένο περιβάλλον.



Εικόνα 12. Η σωματική άσκηση στο μοντέλο του εμπλουτισμένου περιβάλλοντος διεξάγεται μέσω της χρήσης τροχών άσκησης (Hutchinson, McLaughlin et al. 2012).

Αυξάνοντας το μέγεθος και την πολυπλοκότητα του περιβάλλοντος, παρέχεται η ευκαιρία στα πειραματόζωα να αναπτύξουν ή να αυξήσουν διάφορες γνωσιακές συμπεριφορές και νευρικές λειτουργίες (Hutchinson, Avery et al. 2005). Αναφερόμαστε συνεπώς στη μελέτη της επίδρασης της αύξησης της πολυπλοκότητας που μειώνοντας τις μη φυσιολογικές συμπεριφορές, αυξάνει συμπεριφορές συγκεκριμένες για κάθε είδος οδηγώντας στην ευημερία των πειραματοζώων. Η έρευνα με το πειραματικό πρότυπο του εμπλουτισμένου περιβάλλοντος έχει οδηγήσει σε μεγάλη πρόοδο όσον αφορά στις συμπεριφορικές, μοριακές και κυτταρικές επιδράσεις του περιβάλλοντος. Διεξάγονται αυστηροί πειραματικοί σχεδιασμοί των μελετών, με κύριο σκοπό την αποσαφήνιση των θετικών επιδράσεων που έχει το περιβάλλον, δίνοντας κατά αυτό τον τρόπο νέες προοπτικές στους μηχανισμούς πλαστικότητας του εγκεφάλου που περιλαμβάνουν τη νευρογένεση, την αύξηση της συναπτικής πλαστικότητας και τη σημασία της στη γήρανση και στις νευροεκφυλιστικές

νόσους (van Praag, Kempermann et al. 2000; Mattson and Magnus 2006; Nithianantharajah and Hannan 2006).



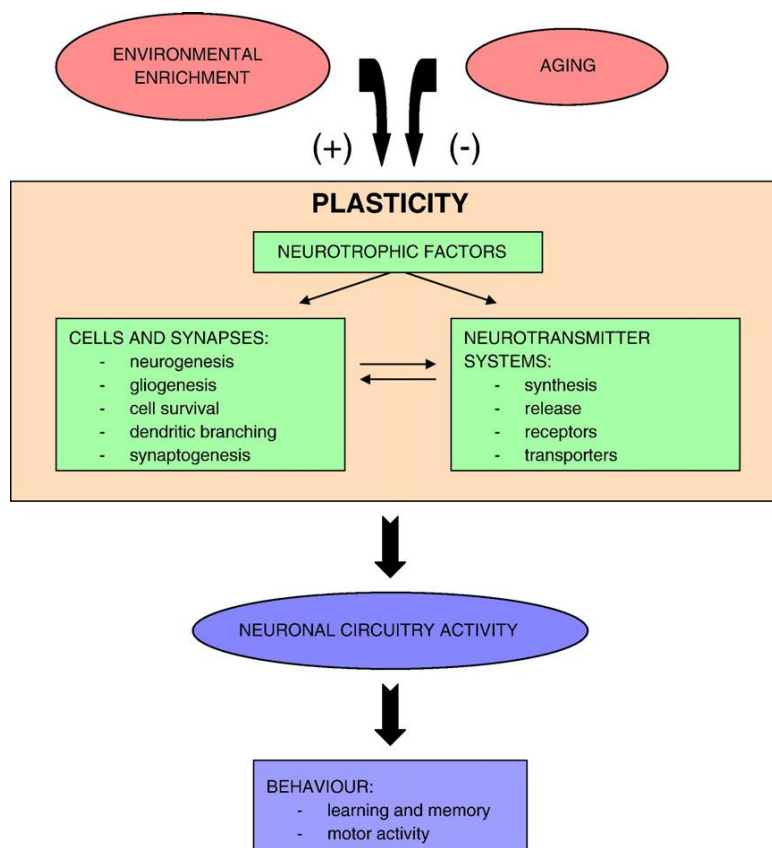
Εικόνα 13. Διαφορετικός κλωβός εμπλουτισμένου περιβάλλοντος, με διαφορετική διάταξη των σηράγγων και των τροχών άσκησης (Rosenzweig and Bennett 1996; van Praag, Kempermann et al. 2000; Mohammed, Zhu et al. 2002).

Στα νεαρά ζώα, ως συνέπεια της διαβίωσής τους στο εμπλουτισμένο περιβάλλον, παρατηρούνται αλλαγές σε διάφορα συστήματα νευροδιαβιβαστών, όπως για παράδειγμα στο χολινεργικό (van Praag 2000; Del Arco, Segovia et al. 2007), στο σεροτονινεργικό (Rasmuson, Olsson et al. 1998), στο ντοπαμινεργικό (Bezard, Dovero et al. 2003; Faherty, Raviie Shepherd et al. 2005; Wagner, Chen et al. 2005) και στο γλουταματεργικό (Bredy, Zhang et al. 2004; Mlynarik, Johansson et al. 2004; Wood, Buse et al. 2005). Οι παραπάνω μελέτες δεν καταδεικνύουν άμεση επίδραση του εμπλουτισμένου περιβάλλοντος στην απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου σε in vivo συμπεριφορικά μοντέλα ζώων. Μελέτες που έγιναν πριν λίγα χρόνια έδειξαν, ότι η απελευθέρωση της ντοπαμίνης και της ακετυλοχολίνης στον προμετωπιαίο φλοιό, οι οποίες αυξάνονται σε συνθήκες

στρες, μεταβάλλονταν διαφορετικά σε πειραματόζωα που διαβίωναν σε εμπλουτισμένο περιβάλλον για 12 μήνες. Πιο συγκεκριμένα, η αντίδραση στο στρες του χολινεργικού, αλλά όχι του ντοπαμινεργικού συστήματος, μειωνόταν σε επίμυες που διαβίωναν σε εμπλουτισμένο περιβάλλον σε σύγκριση με εκείνους που διαβίωναν σε τυπικούς εργαστηριακούς κλωβούς (Del Arco, Segovia et al. 2007). Η αύξηση της ακετυλοχολίνης στον προμετωπιαίο φλοιό, που παραγόταν από την διέγερση των ντοπαμινεργικών υποδοχέων, ήταν χαμηλότερη στα ζώα που διαβίωναν στο εμπλουτισμένο περιβάλλον σε σύγκριση με τα ζώα μάρτυρες (Del Arco, Segovia et al. 2007). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι το εμπλουτισμένο περιβάλλον παράγει σημαντικές αλλαγές στη λειτουργία των διαφόρων νευροδιαβιβαστικών συστημάτων σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου νεαρών ζώων. Επίσης, έχουν γίνει και μελέτες που έχουν ως σκοπό να εξηγήσουν τις επιδράσεις του εμπλουτισμένου περιβάλλοντος στη λειτουργία των διαφόρων νευροδιαβιβαστικών συστημάτων και σε διάφορες συμπεριφορικές και κυτταρικές παραμέτρους κατά την διάρκεια της γήρανσης (Segovia, Del Arco et al. 2008).

Όπως έχει προαναφερθεί το εμπλουτισμένο περιβάλλον προωθεί την προστασία των νευρώνων μέσω μιας σειράς διαδικασιών, όπως είναι η αύξηση των επιπέδων των νευροτροφινών, η ενίσχυση της κυτταρικής επιβίωσης, η αύξηση της νευρογένεσης, η αύξηση των δενδριτικών διακλαδώσεων και η συναπτογένεση (Mohammed, Zhu et al. 2002; Mattson and Magnus 2006), ενώ παράλληλα παράγει αλλαγές στα διάφορα νευροδιαβιβαστικά συστήματα (Del Arco, Segovia et al. 2007; Del Arco, Segovia et al. 2007). Η γήρανση αντιθέτως, αποτελεί μια διαδικασία η οποία αλλοιώνει τις πλαστικές μεταβολές του εγκεφάλου, επειδή μειώνει την πυκνότητα των δενδριτικών ακάνθων (spines), μειώνει τη νευρογένεση στον ιππόκαμπο (Burke and Barnes 2006; Segovia, Yague et al. 2006) και μεταβάλλει διάφορα νευροδιαβιβαστικά συστήματα (Del Arco and Mora 2001; Segovia and Mora 2005) ευνοώντας τη γενική νευρωνική δυσλειτουργία. Αυτές οι αρνητικές διεργασίες πλαστικότητας του εγκεφάλου, μπορούν να συμβάλλουν στη λειτουργική του ύφεση που παρατηρείται κατά τη γήρανση (Mattson and Magnus 2006). Ωστόσο, η αλληλεπίδραση μεταξύ των αρνητικών επιπτώσεων της γήρανσης και των θετικών διεργασιών

πλαστικότητα του εγκεφάλου που συνδέονται με το εμπλουτισμένο περιβάλλον, μπορούν να προσφέρουν ένα αντίβαρο, μέσω του οποίου θα μπορούσε να αποκατασταθεί το κύκλωμα κωδικοποίησης της νευρωνικής δραστηριότητας για συγκεκριμένες γνωσιακές και κινητικές συμπεριφορές (Εικόνα 14), το οποίο θα μπορούσε να αφορά στα νευρωνικά κυκλώματα του φλοιού και του ιππόκαμπου, τα οποία παρουσιάζουν πολύπλοκες λειτουργίες και έχει δειχθεί ότι είναι ευάλωτα κατά τη γήρανση (Hof and Morrison 2004).



Εικόνα 14. Διάγραμμα της σχέσης μεταξύ εμπλουτισμένου περιβάλλοντος και γήρανσης. Το μοντέλο αυτό υπογραμμίζει τη σημασία της αλληλεπίδρασης μεταξύ του τρόπου ζωής (εμπλουτισμένο περιβάλλον) και της διαδικασίας της γήρανσης στην πλαστικότητα του εγκεφάλου, σε επίπεδο έκφρασης νευροτροφικών παραγόντων, κυτταρικών/συναπτικών διαδικασιών και νευροδιαβιβαστικών συστημάτων. Ο εμπλουτισμός του περιβάλλοντος προάγει τη νευρογένεση, την κυτταρική επιβίωση, τη δενδριτική διακλάδωση και τη συναπτογένεση. Οι διαδικασίες αυτές οδηγούν σε νευροπροστασία. Το εμπλουτισμένο περιβάλλον μεταβάλλει επίσης το δυναμικό διαφόρων νευροδιαβιβαστικών συστημάτων, όπως για παράδειγμα τους γλουταματεργικούς υποδοχείς, τους υποδοχείς και μεταφορείς της ντοπαμίνης και την απελευθέρωση ακετυλοχολίνης και ντοπαμίνης σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου. Η γήρανση αντιθέτως, ευνοεί τη νευρωνική δυσλειτουργία και μειώνει τη νευρογένεση και την πυκνότητα των δενδριτικών ακάνθων, καθώς επίσης μεταβάλλει το δυναμικό

διαφόρων νευροδιαβιβαστικών συστημάτων. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των θετικών μεταβολών, που προκαλούνται από τον εμπλουτισμό του περιβάλλοντος και των αρνητικών επιδράσεων της γήρανσης, θα μπορούσαν να εκφραστούν τροποποιώντας τη δραστηριότητα των διαφόρων νευρωνικών κυκλωμάτων, που σχετίζονται με γνωσιακές και κινητικές συμπεριφορές (Mora, Segovia et al. 2007).

1.8 Συμπεριφορά

Ο εγκέφαλος του ανθρώπου δέχεται ερεθίσματα από το περιβάλλον και προκαλεί απαντήσεις, με τη μορφή των διαφόρων συμπεριφορών. Η παραγωγή των απαντήσεων δεν είναι μια παθητική διαδικασία αλλά επηρεάζεται τόσο από την εμπειρία, με τη μορφή της μάθησης και της μνήμης, αλλά και από συναισθηματικές καταστάσεις, όπως το άγχος και ο φόβος.

Στόχος των ερευνητών που μελετούν τη συμπεριφορά σε ανθρώπους ή ζώα είναι η παρατήρηση και η ανάλυση σε ποσοτικά μεγέθη της συμπεριφοράς και η συσχέτιση αυτής με ειδικούς μηχανισμούς και λειτουργίες του ΚΝΣ. Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιούνται ηλεκτρικοί ή χημικοί μηχανισμοί, φάρμακα ή προκαλούνται βλάβες σε περιοχές του ΚΝΣ. Αποκλίσεις από τη φυσιολογική συμπεριφορά παρατηρούνται σε περιπτώσεις ασθενειών ή τραυματισμών. Σήμερα έχουν αναπτυχθεί εκατοντάδες τεχνικές για τη μελέτη των διαφόρων μοντέλων συμπεριφοράς. Παρακάτω αναφέρονται μερικά από αυτά τα μοντέλα.

Μοντέλα συμπεριφοράς για τη μελέτη του άγχους

- Κοινωνικής αλληλεπίδρασης (Social Interaction)
- Υπερυψωμένου λαβυρίνθου (Elevated plus-maze)
- Προτίμησης φωτός/σκοταδιού (Light/Dark preference)
- Μητρικής αποστέρησης (Maternal separation)

Μοντέλα συμπεριφοράς για τη μελέτη κινητικών λειτουργιών και εξερεύνησης

- Ανοιχτού πεδίου (Open field)
- Νέου περιβάλλοντος (Novelty seeking)

- Περιστρεφόμενου κυλίνδρου (Rota rod)

Μοντέλα συμπεριφοράς για τη μελέτη γνωσιακών λειτουργιών (μάθηση/μνήμη)

- Ακτινωτού λαβυρίνθου (Radial arm maze)
- Υδάτινου λαβυρίνθου (Morris water maze)
- Δοκιμασία παθητικής αποφυγής (Passive avoidance)
- Δοκιμασία ενεργητικής αποφυγής (Active avoidance)

1.8.1 Μνήμη-μάθηση

Η μάθηση είναι η διαδικασία με την οποία ο άνθρωπος και τα ζώα αποκτούν γνώσεις για τον κόσμο. Είναι η διαδικασία απόκτησης νέων πληροφοριών από το ανθρώπινο νευρικό σύστημα μέσω της συνδυασμένης λειτουργίας των αισθητηρίων οργάνων. Μνήμη είναι η συγκράτηση, η αποθήκευση και η ανάκληση αυτών των γνώσεων.

Από τα μέσα του περασμένου αιώνα ήταν γνωστό ότι η γλώσσα, η κατ' εξοχήν ανθρώπινη νοητική ικανότητα, εντοπίζεται σε συγκεκριμένο σημείο του ανθρώπινου εγκεφάλου. Ο γάλλος γιατρός Paul Broca, μελετώντας ασθενείς με αφασία, βρήκε ότι όλοι είχαν μια τυπική περιορισμένη βλάβη στον αριστερό μετωπιαίο λοβό του εγκεφάλου, σε μια περιοχή που έκτοτε αποκαλείται «περιοχή του Broca». Μέχρι τα μέσα του 20ού αιώνα, ωστόσο, ελάχιστοι ήταν εκείνοι που υποστήριζαν έναν παρόμοιο εντοπισμό και για άλλες νοητικές λειτουργίες, περιλαμβανομένης της μνήμης και της μάθησης.

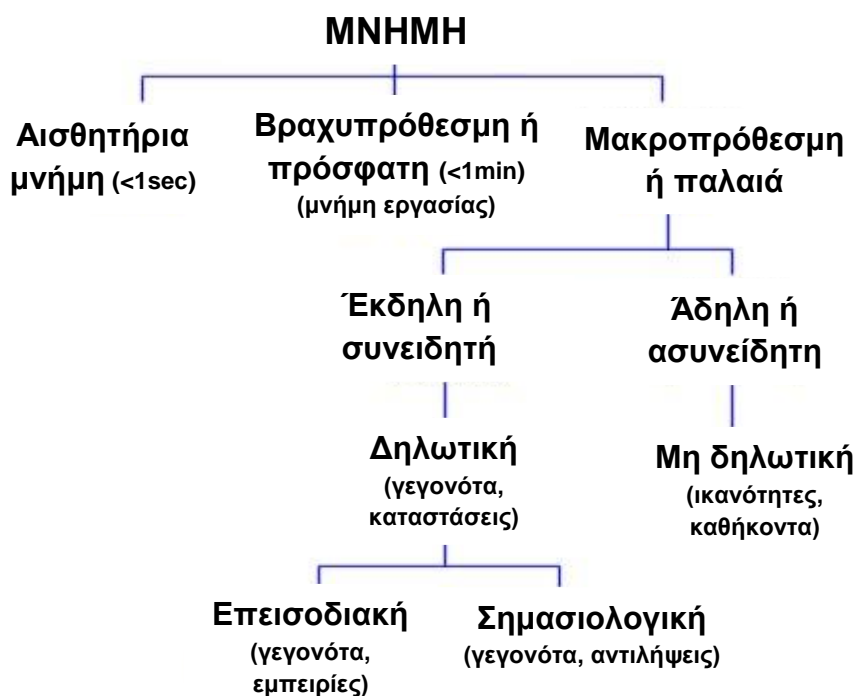
Η μνήμη είναι μια βασική νοητική διαδικασία που έχει μελετηθεί από νευροεπιστήμονες για πολλά χρόνια και σε μεγάλο βαθμό (Kandel and Squire 2000). Αποτέλεσμα αυτών των μελετών είναι ο συστηματικός διαχωρισμός της μνήμης σε διάφορες κατηγορίες (Leritz, Grande et al. 2006). Αρχικά, η μνήμη είναι δυνατό να χαρακτηριστεί ως **δηλωτική (declarative) μνήμη** που μπορεί να εκφραστεί με λέξεις, και κωδικοποιεί πληροφορίες για αυτοβιογραφικά συμβάντα σε αντίθεση με τη **μη δηλωτική (non-declarative) μνήμη**, που

εκδηλώνεται π.χ. ως αυξημένη ικανότητα εκτέλεσης κάποιου έργου, έχει αυτόματο ή αντανακλαστικό χαρακτήρα, ενώ ο σχηματισμός και η ανάκλησή της δεν εξαρτώνται απολύτως από την επίγνωση ή από τις γνωσιακές διεργασίες.

Επίσης, με βάση τον τρόπο αποθήκευσης και ανάκλησης πληροφοριών, η μνήμη είναι δυνατόν να διακριθεί σε **έκδηλη (explicit) μνήμη**, που είναι αποτέλεσμα εκούσιας προσπάθειας απομνημόνευσης και **άδηλη (implicit) μνήμη**, που δημιουργείται ακούσια και οδηγεί π.χ. σε αναγνώριση ερεθισμάτων που έχουν ξαναπαρουσιαστεί στο παρελθόν, δηλαδή αποκτώντας κινητικές και αντιληπτικές ικανότητες που είναι απρόσιτες στη συνείδηση. Η άδηλη μνήμη μπορεί να είναι μη συνειρμική (non-associational), δηλαδή μνήμη ενός μόνο είδους ερεθίσματος ανεξάρτητα από κάποιο άλλο, ή συνειρμική (associational), όταν δυο είδη ερεθισμάτων σχετίζονται μεταξύ τους στη μνήμη, έτσι ώστε το ένα να οδηγεί σε ανάκληση του άλλου (π.χ. η κλασική εξαρτημένη μάθηση του Pavlov)

Τέλος, συχνά γίνεται αναφορά στη **μνήμη περιεχομένου (content)**, όταν ένα ερέθισμα απομνημονεύεται ανεξάρτητα από τις συνθήκες στις οποίες παρατηρήθηκε και στη **μνήμη πλαισίου (context)**, όταν μια πληροφορία απομνημονεύεται στο πλαίσιο ορισμένων εξωτερικών ή εσωτερικών συνθηκών.

Αν και κάθε ζεύγος κατηγοριών είναι αμοιβαία αποκλειστικό, τα διάφορα ζεύγη μεταξύ τους είναι επικαλυπτόμενα, έτσι ώστε μια δηλωτική μνήμη μπορεί να είναι για παράδειγμα άδηλη, συνειρμική και πλαισίου.



Εικόνα 15. Σχέσεις μεταξύ ορισμένων κατηγοριών μνήμης.

Επίσης άλλη μια διάκριση η οποία μπορεί να γίνει είναι:

α. Από ψυχολογικής πλευράς, σε: ακούσια (μνήμη δεξιοτήτων) / εκούσια (μνήμη γεγονότων, ιστορικών και προσωπικών)

β. Ανάλογα με το ερέθισμα - είδος της πληροφορίας, σε: κιναισθητική / ακουστική / οπτική / λεκτική / οσφρητική / απτική

γ. Ως προς τη διάρκεια, σε: αισθητήρια / βραχυπρόθεσμη (πρόσφατη) / μακροπρόθεσμη (παλαιά)

Η πρώτη εξ' αυτών είναι η **αισθητήρια μνήμη** η οποία ορίζεται ως η δυνατότητα διατήρησης μιας τρέχουσας εμπειρίας στον εγκέφαλο, για μερικά μόνο δευτερόλεπτα. Η ικανότητα αυτού του είδους καταχώρησης είναι πολύ μεγάλη, περιλαμβάνει όλες τις μορφές και παρέχει την αίσθηση του παρόντος.

Μελέτες της διατήρησης και της διαταραχής της μνήμης συνηγορούν υπέρ ενός ευρέως χρησιμοποιούμενου μοντέλου αποθήκευσης της μνήμης κατά στάδια. Βάση αυτών των σταδίων γίνεται και η διάκριση της μνήμης σε βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη. Οι πληροφορίες που φτάνουν στον εγκέφαλο υφίστανται επεξεργασία σε μια αποθήκη **βραχύχρονης μνήμης (STM)**. Η αποθήκη αυτή

έχει πολύ περιορισμένη χωρητικότητα και όταν δεν γίνονται επαναλήψεις η μνήμη διατηρείται μόνο μερικά λεπτά. Συνίσταται από πληροφορίες που είναι ενεργές στο νου εκείνη τη στιγμή, ένα συνδυασμό εισερχόμενων πληροφοριών τις οποίες προσέχουμε, και πληροφοριών που ανακτώνται από τη μακρόχρονη μνήμη και χρησιμοποιούνται για να ερμηνεύσουμε και να επεξεργαστούμε τις εισερχόμενες πληροφορίες Ένας τύπος βραχυπρόθεσμης μνήμης είναι η **μνήμη εργασίας (working memory)**, η οποία αναφέρεται στην ταυτόχρονη δυνατότητα διατήρησης των πληροφοριών στον εγκέφαλο για αρκετά μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Η **μακροπρόθεσμη μνήμη (LTM)**, αποτελεί μια μεγαλύτερης διάρκειας μακρόχρονη αποθήκη όπου οι πληροφορίες υφίστανται μετασχηματισμό. Οι μνήμες αυτές διατηρούνται σε μη συνειδητή κατάσταση και πρέπει το άτομο να τις ανασύρει από τη μνήμη όταν τις χρειάζεται. Ο τύπος αυτός μνήμης διακρίνεται περαιτέρω σε **επεισοδιακή μνήμη**, η οποία αφορά τις αναμνήσεις που συνδέονται με προσωπικές μας εμπειρίες, **σημασιολογική μνήμη**, η οποία αφορά περιπτώσεις στις οποίες μαθαίνουμε, το τι είναι κάτι, ανεξάρτητα από το πού, πότε ή το πώς μαθαίνουμε και **διαδικαστική μνήμη**, η οποία αφορά το πώς γίνονται τα πράγματα και όχι το τι είναι (Εικόνα 15).

1.8.2 Εγκεφαλικές περιοχές που συμμετέχουν στη μνήμη

Οι πληροφορίες που ανακτήθηκαν και που αποτελούν τμήμα της μακρόχρονης μνήμης συνδέονται με τον ιππόκαμπο, όπου και αποθηκεύονται για 2-3 χρόνια, έως ότου μεταβιβαστούν σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου και πιθανότατα στον φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων για μόνιμη αποθήκευση. Εναλλακτικά, ο ιππόκαμπος μπορεί να μην αποθηκεύει καθόλου μακροχρόνιες πληροφορίες αλλά να χρησιμεύει ως το μέσον που βοηθά στην αποθήκευση των πληροφοριών που υπέστησαν αρχικά επεξεργασία από τον κάτω κροταφικό φλοιό. Επομένως ο ιππόκαμπος μπορεί να είναι είτε σταθμός για την μακρόχρονη μνήμη, είτε σύστημα διευκόλυνσης το οποίο είναι σημαντικό για την αποθήκευση της μνήμης κάπου αλλού στον εγκέφαλο.

Σε γενικές γραμμές οι φυσιολογικοί μηχανισμοί της μνήμης δεν είναι επαρκώς κατανοητοί. Πιστεύεται ότι στους ανωτέρω τύπους μνήμης εμπλέκονται διάφορες εγκεφαλικές περιοχές, όπως ο ιππόκαμπος, η αμυγδαλή το ραβδωτό ή τα μαστία. Σύμφωνα με τους (Izquierdo, Quillfeldt et al. 1997) ο ιππόκαμπος θεωρείται ότι εμπλέκεται στην τοπολογική και στη δηλωτική μάθηση, η αμυγδαλή στη συναισθηματική μνήμη και στην επεξεργασία των απωθητικών πληροφοριών, ενώ ο ενδορινικός φλοιός επεξεργάζεται διάφορα είδη μνήμης.

Από τα παραπάνω κατανοούμε ότι οποιαδήποτε προσπάθεια περιγραφής των διαδικασιών μνήμης-μάθησης, αποκλειστικά και μόνο ως εξαρτώμενα γεγονότα από συγκεκριμένες εγκεφαλικές περιοχές, δεν είναι επαρκής.

1.8.3 Μνήμη και ιππόκαμπος

Η συμβολή του ιππόκαμπου στη μνήμη έγινε αρχικά αντιληπτή από τα κλασικά πειράματα του *Penfield (1950)* στα οποία ασθενείς ανακαλούσαν μνήμες όταν διεγείρονταν ηλεκτρικά ο ιππόκαμπος. Η διατήρηση της ικανότητας αυτών των ασθενών να μαθαίνουν νέες κινητικές ικανότητες και να θυμούνται καλύτερα/ευκολότερα αντικείμενα που είχαν ξαναδεί οδήγησαν στον αρχικό διαχωρισμό έκδηλης/άδηλης μνήμης και στη διαπίστωση πως μόνο η έκδηλη μνήμη βασίζεται στον ιππόκαμπο. Νεότερες μελέτες έχουν επιβεβαιώσει το ρόλο του ιππόκαμπου στην έκδηλη μνήμη (Brewer, Zhao et al. 1998). Επιπλέον, έχουν δείξει πως κάποιες τουλάχιστον μορφές άδηλης μνήμης εξαρτώνται από τον ιππόκαμπο: η συνειρμική μνήμη (Holdstock, Mayes et al. 2005), η μνήμη πλαισίου (Spencer, Sunm et al. 2006) και η ανίχνευση νέων ερεθισμάτων. Μελέτες σε ανθρώπους έχουν δείξει πως η συνειρμική μνήμη φαίνεται να εξαρτάται από το πρόσθιο (κοιλιακό) τμήμα του ιππόκαμπου (Giovanello, Schnyer et al. 2004). Άλλες μελέτες συνδέουν το πρόσθιο τμήμα του ιππόκαμπου με την παρουσίαση νέων ερεθισμάτων (και άρα ίσως την κωδικοποίηση της μνήμης) και το οπίσθιο τμήμα με την παρουσίαση οικείων ερεθισμάτων (και άρα την ανάκληση μνήμης). Παλαιότερες μελέτες σε ζώα έδειχναν πως η εξαρτημένη εκμάθηση φόβου βασιζόταν κυρίως στον ραχιαίο ιππόκαμπο (Phillips and

LeDoux 1994; Anagnostaras, Maren et al. 1999) νεότερες όμως μελέτες δείχνουν πως και ο κοιλιακός ιππόκαμπος παίζει σημαντικό ρόλο σε αυτό το είδος μνήμης (Hobin, Ji et al. 2006).

Εξαρτημένη μάθηση στο πλαίσιο διαφορετικής εσωτερικής κατάστασης του ζώου (πείνα) επίσης φαίνεται να εξαρτάται και από τις 2 περιοχές του ιππόκαμπου (Hock and Bunsey 1998). Η δεύτερη σημαντικότερη ανακάλυψη για το ρόλο του ιππόκαμπου στη μνήμη έγινε όταν ανακαλύφθηκε μια κατηγορία πυραμιδικών νευρώνων στον ιππόκαμπο που ενεργοποιούνται επιλεκτικά για κάποιες θέσεις στο χώρο (O'Keefe and Dostrovsky 1971). Αν και η πλειοψηφία αυτών των κυττάρων φαίνεται να βρίσκονται στο ραχιαίο ιππόκαμπο, νεότερες μελέτες τα έχουν εντοπίσει και στον κοιλιακό. Ο ρόλος του ιππόκαμπου στη μνήμη χώρου επιβεβαιώθηκε και από πειράματα απεικόνισης σε ανθρώπους (Maguire, Frith et al. 1998).

Στο συναπτικό επίπεδο, ηλεκτροφυσιολογικά πειράματα στον ιππόκαμπο έχουν δείξει πως διαδικασίες πλαστικότητας όπως η μακροπρόθεσμη ενδυνάμωση (Bliss and Collingridge 1993) σχετίζονται με το φαινόμενο της μνήμης. Σημειώνεται πως ο ραχιαίος ιππόκαμπος εμφανίζει μεγαλύτερη συναπτική διευκόλυνση και ενδυνάμωση σε σχέση με τον κοιλιακό (Paratheodoropoulos and Kostopoulos 2000).

1.8.4 Άγχος-Φόβος

Το άγχος αποτελεί μια διάχυτη, δυσάρεστη και ακαθόριστη αίσθηση ανησυχίας, που συνήθως συνοδεύεται από σωματικά συμπτώματα: εφίδρωση, ζάλη, ταχυκαρδία, αίσθημα πνιγμού, αστάθεια, βάρος στο στήθος, μυς που τρέμουν κλπ.

Το άγχος λειτουργεί ως σήμα που προειδοποιεί τον οργανισμό για έναν επερχόμενο κίνδυνο και τον προετοιμάζει να ανασυνταχθεί, να κινητοποιήσει τις άμυνες του για να αντιμετωπίσει την απειλή, να διαφύγει ή να μειώσει τις επιπτώσεις της.

Το άγχος, δηλαδή, είναι μια συναισθηματική αντίδραση, που κινητοποιεί το άτομο για να αντιμετωπίσει τους κινδύνους, να αποτρέψει μία πραγματική ή συμβολική βλάβη και ζημία, εξασφαλίζοντας την ομοιόσταση, τη χαρακτηριστική του σύσταση και την ισορροπία του με το περιβάλλον. Το φυσιολογικό άγχος, που καλείται και «δημιουργικό», αποτελεί έναν προσαρμοστικό μηχανισμό.

Όταν όμως, το άγχος γίνεται πολύ έντονο και παρατεταμένο, όταν κυριαρχεί στις εκδηλώσεις του ατόμου, όταν κινητοποιείται από ερεθίσματα που δεν είναι σημαντικά για την επιβίωση και οδηγεί σε λανθασμένες προβλέψεις και εκτιμήσεις, τότε παύει να αποτελεί προσαρμοστικό μηχανισμό και καλείται παθολογικό άγχος. Αυτό το παθολογικό άγχος, το οποίο εμφανίζει ποσοτικές μόνο διαφορές με το φυσιολογικό, μπορεί να διαταράσσει την ικανότητα του ατόμου να ανταποκρίνεται στις καθημερινές δραστηριότητες. Παρ' όλα αυτά, δεν αποδιοργανώνει την προσωπικότητά του ατόμου και δεν καταργεί τον έλεγχο της πραγματικότητας. Στις ειδικές εκείνες περιπτώσεις όπου το άτομο εμφανίζει μια ψυχωσική διαταραχή (όπως η σχιζοφρένεια) το άγχος είναι υπερβολικό και καταλύει τον έλεγχο της πραγματικότητας, οπότε μιλάμε για "ψυχωσικό" άγχος. Ο φόβος είναι και αυτός ένα προειδοποιητικό σήμα. Διαφοροποιείται, ωστόσο, από το άγχος, διότι, ενώ ο φόβος συνιστά αντίδραση σε μια άμεση, γνωστή και συγκεκριμένη εξωτερική απειλή, το άγχος αποτελεί τη συναισθηματική απάντηση στην αναμονή ενός κινδύνου, άγνωστου, αόριστου, συγκεχυμένου και ασαφούς. Ο κίνδυνος αυτός, όπως τον αντιλαμβάνεται το άτομο, δεν απειλεί μόνο την βιολογική του ύπαρξη (τη ζωή του) αλλά και άλλες σημαντικές παραμέτρους που σχετίζονται με αυτήν (κοινωνικός ρόλος, αυτοεκτίμηση).

Η πρόβλεψη και η προετοιμασία για μελλοντικές βλάβες είναι τα κύρια χαρακτηριστικά του φόβου (fear) και της ανησυχίας (anxiety) (Grillon 2008). Αυτές οι αμυντικές αποκρίσεις οδηγούν σε συμπεριφορές που σχετίζονται με την απειλή και βάζουν σε κίνδυνο την ακεραιότητα του οργανισμού. Στα ζώα οι αμυντικές αυτές αποκρίσεις ποικίλουν ανάλογα με τη φύση του κινδύνου. Εξαρτώνται από το αν η απειλή είναι παρούσα και απαιτεί άμεση δράση ή αν είναι προσωρινά αβέβαιη και οδηγεί σε συνεχή επαγρύπνηση (Blanchard, Yudko

et al. 1993). Οι αποκρίσεις αυτές στην απειλή είναι καλά διατηρημένες στα είδη και είναι εξελικτικοί προάγγελοι του ανθρώπινου φόβου και ανησυχίας.

Η διάκριση μεταξύ φόβου και άγχους είναι δύσκολη και αμφιλεγόμενη (McReynolds 1976). Η ένταξη του άγχους στο φόβο απαιτεί καλύτερη κατανόηση του φυσιολογικού και παθολογικού άγχους. Στοιχεία από διαφορετικά επίπεδα αναλύσεων υποστηρίζουν ότι οι καταστάσεις του άγχους και του φόβου αποτελούν διαφορετικά φαινόμενα (Grillon 2008).

Πρώτον, οι κλινικοί γενικά δέχονται τη διάκριση μεταξύ του φόβου, μιας απόκρισης στον κίνδυνο, και του άγχους, ένα στάδιο χρόνιας κατανόησης μιας μελλοντικής βλάβης. Ο φόβος αποτελεί μια αντίδραση της στιγμής που καταλήγει σε αντανακλαστική αντίδραση, μάχης ή φυγής, ή έχει ως στόχο να μειώσει τον αντίκτυπο της απειλής, για παράδειγμα μέσω μείωσης της ευαισθησίας στον πόνο (Carlsson, Andersson et al. 2006) όταν η πράξη διακόπτεται. Αντίθετα, το άγχος χαρακτηρίζεται από μη προβλεψιμότητα και από ανύπαρκτες συμβολικές απειλές. Συμπεριφορικά το άγχος σχετίζεται με την αποφυγή. Ο φόβος εξασθενεί την προσοχή και αναστέλλει ανταγωνιστικές αποκρίσεις, ενώ η ανησυχία αυξάνει την συναισθηματική ευαισθησία. *Δεύτερον*, η διάκριση μεταξύ φόβου και άγχους υποστηρίζεται από φυσιολογικές αναλύσεις της αγχώδους συμπτωματολογίας που διακρίνουν τα συμπτώματα του γενικού στρες και της αγχώδους κατανόησης (anxiety) από αυτά της μάχης ή της φυγής (fear) (Brown, Chorrita et al. 1998). *Τρίτον*, ηθολογικές μελέτες έχουν συνδέσει το φόβο με συμπεριφορές που σχετίζονται με άμεσο κίνδυνο (παρουσία ενός εχθρού) και το άγχος με ακραίες ή ισχυρές απειλές.

1.9 Διαφυλικές διαφορές

Πολλές μελέτες που έχουν γίνει στο παρελθόν έχουν καταδείξει ότι στην εκδήλωση των ψυχικών διαταραχών, υπάρχουν μεγάλες διαφορές μεταξύ των δύο φύλων όσον αφορά στον τρόπο έναρξης και εκδήλωσης της νόσου, την ηλικία και τα συμπτώματα που εμφανίζουν. Πιο συγκεκριμένα, οι γυναίκες φαίνεται ότι είναι πιο επιρρεπείς σε σύγκριση με τους άντρες στο να

εμφανίσουν άνοια, διαταραχές πανικού, διαταραχές μετατραυματικού στρες (post-traumatic stress disorder-PTSD) και κατάθλιψη (Wittchen, Jacobi et al. 2011). Επίσης, φαίνεται ότι οι περισσότερες αγχώδεις διαταραχές που περιλαμβάνουν για παράδειγμα διαταραχές πανικού, αγοραφοβία, διαταραχές γενικευμένου άγχους και φοβίες γενικότερα, είναι δύο φορές πιο συχνές στις γυναίκες παρά στους άντρες (Wittchen, Jacobi et al. 2011). Διάφορα πειραματικά μοντέλα τρωκτικών έχουν αναπτυχθεί με σκοπό τη μελέτη του νευροβιολογικού υποστρώματος του άγχους και του φόβου, καθώς επίσης και της δράσης των αγχολυτικών φαρμάκων στα δύο φύλα (Cryan and Sweeney 2011).

Είναι καλά πλέον τεκμηριωμένο ότι οι άντρες και οι γυναίκες έχουν διαφορετική απόδοση σε ορισμένους τύπους εργασιών μάθησης, αλλά οι λόγοι αυτών των διαφορών δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Για παράδειγμα, οι γυναίκες έχουν την τάση να είναι πιο αποδοτικές από τους άντρες σε δοκιμασίες που εμπλέκουν λεκτικούς ή σημασιολογικούς κανόνες, και μνήμες που σχετίζονται με προσωπικές εμπειρίες, ενώ οι άντρες παρουσιάζουν καλύτερη απόδοση σε εργασίες που απαιτούν τον χειρισμό πολύπλοκων χωρικών πληροφοριών (Collins and Kimura 1997; Astur, Ortiz et al. 1998). Οι διαφορές αυτές προκύπτουν από γενετικούς, ορμονικούς και κοινωνικούς παράγοντες, καθώς επίσης και από τον μεταξύ τους συνδυασμό (Kessler 2003; Hamann 2005). Για το λόγο αυτό οι διαφορές του φύλου στις γνωσιακές λειτουργίες, είναι δύσκολο να παρατηρηθούν, και όταν παρατηρούνται είναι ακόμα δυσκολότερο να ερμηνευτούν. Παρά όμως τις δυσκολίες και τις ενστάσεις που προκύπτουν, το θέμα αυτό παραμένει εξαιρετικού ενδιαφέροντος (Hyde, Lindberg et al. 2008).

Την ύπαρξη διαφορών του φύλου δείχνει και μια άλλη έρευνα, που διαπίστωσε ότι τα γονίδια εκφράζονται με διαφορετικό τρόπο στον ανδρικό εγκέφαλο από ότι στον γυναικείο. Είναι πλέον γνωστό ότι οι γυναίκες και οι άνδρες διαφέρουν σε περισσότερα επίπεδα από αυτά που καθορίζει το αναπαραγωγικό, ορμονικό και σκελετικό τους σύστημα. Οι ραγδαίες εξελίξεις στον τομέα της Μοριακής Βιολογίας έδειξαν ότι πολλές από τις διαφορές στο επίπεδο της υγείας και της ασθένειας μεταξύ των δύο φύλων μπορεί να συνδέονται με τον φυλετικό γονότυπο (Brower 2002; Federman 2006).

Από την άλλη πλευρά, έρευνες του τομέα των Νευροεπιστημών, έχουν καταγράψει σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο φύλων, ανάμεσα στις οποίες συγκαταλέγονται η διαφορετική λειτουργία των νευροδιαβιβαστών στον εγκέφαλο, η διαφορετική λειτουργία εγκεφαλικών δομών, η διαφορετική απάντηση στο στρες και στις περιβαλλοντικές επιδράσεις αλλά και πολλές ορμονικές διαφορές (Laakso, Vilkmann et al. 2002; Dalla, Antoniou et al. 2005). Η κατάθλιψη, αποτελεί ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα διαφυλικής διαφοράς και αφορά σε μία συναισθηματική διαταραχή η οποία συνδέεται με διαταραχές στη σεροτονινεργική και νοραδρενεργική δραστηριότητα. Στις γυναίκες η συχνότητα εμφάνισης της κατάθλιψης είναι διπλάσια σε σχέση με τους άνδρες και η απάντησή τους στην αντικαταθλιπτική θεραπεία διαφέρει (Kokras, Antoniou et al. 2009).

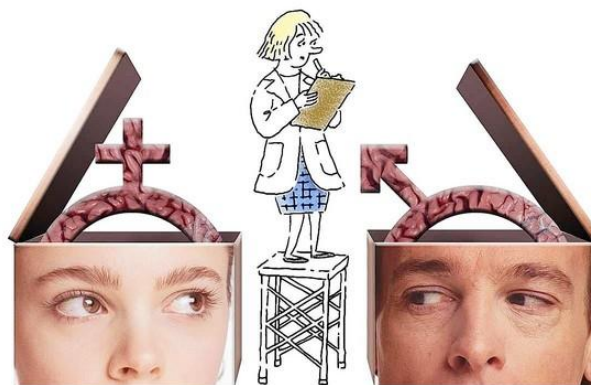
Πρόσφατες εξελίξεις στον τομέα της Φαρμακολογίας έδειξαν ότι το φύλο επηρεάζει την απάντηση του οργανισμού στη φαρμακοθεραπεία. Μέχρι και το 1993 οι διεθνείς οργανισμοί ελέγχου των φαρμάκων απαγόρευαν τη συμμετοχή των γυναικών σε κλινικές μελέτες δράσης των νέων φαρμάκων, λόγω πιθανών κινδύνων σε περιπτώσεις τυχαίας εγκυμοσύνης. Αργότερα, όταν επεβλήθη η συμμετοχή των γυναικών στις κλινικές μελέτες, κάτω από ειδικές συνθήκες παρακολούθησης, έγιναν αντιληπτές μερικές σοβαρές διαφορές ως προς τη δράση και τις ανεπιθύμητες ενέργειες των φαρμάκων (Ruiz Cantero and Angeles Pardo 2006).

Ένα νέο πεδίο έρευνας της Φαρμακολογίας αποτελεί και ο τομέας της φαρμακοθεραπείας σε σχέση με τον παράγοντα φύλο (Blair 2007). Οι γυναίκες έχουν μικρότερο σωματικό βάρος, μικρότερο μέγεθος οργάνων και μικρότερο ρυθμό νεφρικής σπειραματικής διήθησης. Επίσης, οι γυναίκες έχουν μεγαλύτερο ποσοστό λίπους και διαφορετική κινητικότητα του γαστρεντερικού συστήματος λόγω των επιδράσεων των ορμονών του φύλου. Το αυξημένο ποσοστό λίπους μπορεί να έχει ως συνέπεια τη μεγαλύτερη δέσμευση των λιπόφιλων φαρμάκων και επομένως διαφορετική κατανομή του φαρμάκου στον οργανισμό (Khan, Schwartz et al. 2007). Αυτό δείχνει ότι τα φάρμακα μπορεί να έχουν διαφορετικές φαρμακοκινητικές ιδιότητες στις γυναίκες και στους άνδρες, γεγονός που επιβάλλει την αλλαγή της δοσολογίας του φαρμάκου, αλλά και τη

σωστή επιλογή φαρμάκου (Franconi, Brunelleschi et al. 2007). Επίσης η εγκυμοσύνη μεταβάλλει τον όγκο των υγρών του σώματος, το ποσό των ούρων, τον ηπατικό μεταβολισμό και επομένως και την απάντηση στα φάρμακα (Mattison and Zajicek 2006).

Εκτός όμως από τη διαφορά των δύο φύλων στις συναισθηματικές και ψυχικές διαταραχές, οι άνδρες και οι γυναίκες διαφέρουν και σε άλλα χαρακτηριστικά όπως για παράδειγμα στην απεικόνιση του ορατού κόσμου. Οι γυναίκες είναι σε θέση να αναγνωρίσουν με μεγαλύτερη λεπτομέρεια αντικείμενα που βρίσκονται στην περιφέρεια των οπτικών τους πεδίων. Αντίθετα οι άνδρες εμφανίζουν καλύτερη κεντρική όραση και διακριτική ικανότητα (Efron, Yund et al. 1987). Παράλληλα, οι άνδρες εμφανίζουν καλύτερη οπτική αντίληψη σε κινούμενα αντικείμενα και σε λεπτομέρειες του οπτικού πεδίου, ενώ οι γυναίκες αντιλαμβάνονται πιο εύκολα τις μεταβολές των χρωμάτων (Murray, Parry et al. 2012).

Διαφυλικές διαφορές έχουν παρατηρηθεί επίσης στην επεξεργασία της οπτικής πληροφορίας. Οι γυναίκες αποδίδουν καλύτερα σε δοκιμασίες οπτικής μνήμης (McGivern, Huston et al. 1997). Τέλος πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι η λειτουργικότητα των κυττάρων του οπτικού φλοιού επηρεάζεται πιο γρήγορα από την ηλικία στους αρσενικούς επίμυες σε σύγκριση με τους θηλυκούς. Η νευροβιολογική βάση αυτών των διαφυλικών διαφορών παραμένει μέχρι σήμερα άγνωστη.



Εικόνα 16. Ο εγκέφαλος έχει φύλο.

2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1 Πειραματόζωα

Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν επίμυες Wistar προερχόμενοι από το Ινστιτούτο Παστέρ. Τα πειραματόζωα ηλικίας 2,5 μηνών παρέμεναν για εγκλιματισμό τουλάχιστον 2 εβδομάδες στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας. Ο χειρισμός των πειραματοζώων στο συγκεκριμένο πείραμα έγινε βάσει του κώδικα δεοντολογίας του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας των ΗΠΑ και τις Ευρωπαϊκές οδηγίες για τη φροντίδα και τη χρήση των πειραματοζώων (EEC Council 86/609, 27/01/1992, No 116) σύμφωνα με την άδεια EL 25 BIO 010 της Ελληνικής Κτηνιατρικής Υπηρεσίας του Υπουργείου Αγροτικής ανάπτυξης και Τροφίμων. Προσπάθειες κατεβλήθησαν με στόχο να μειωθεί στο μέτρο του δυνατού, αφενός ο αριθμός των πειραματοζώων που θυσιάστηκαν και αφετέρου το σωματικό άλγος που υπέστησαν.

Οι θηλυκοί και αρσενικοί επίμυες διαβίωναν σε ειδικά δωμάτια με σταθερές συνθήκες θερμοκρασίες ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) και σταθερό κυκλικό φωτισμό (12h φως και 12h σκοτάδι) για πέντε ημέρες.

2.2 Εμπλουτισμός Περιβάλλοντος

Ως κλωβός εμπλουτισμένου περιβάλλοντος χρησιμοποιήθηκε ο κλωβός Cricetti 16 για τρωκτικά, της εταιρείας IMAC (Εικόνα 17). Ο κλωβός αυτός είχε μέγεθος 80x49x38 εκ. και αποτελείτο από δύο ορόφους, δύο τροχούς εξάσκησης, σήραγγες και ένα καταφύγιο. Στον κλωβό τοποθετούνταν επίσης δύο ταΐστρες και δύο μπιμπερό. Κάθε δύο ημέρες η διαρρύθμιση του κλωβού μεταβαλλόταν έτσι ώστε όλα τα αντικείμενα του κλωβού να τοποθετούνται σε νέα θέση. Κάθε εβδομάδα όλα τα αντικείμενα που αποτελούσαν το εμπλουτισμένο περιβάλλον αντικαθίσταντο με καινούργια (Sale, Putignano et al. 2004; Ciucci, Putignano et al. 2007; Bessinis, Dalla et al. 2013).



Εικόνα 17. Κλωβός IMAC Cricetti 16 (Bessinis, Dalla et al. 2013).

Ως κλωβοί ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν οι τυπικοί εργαστηριακοί κλωβοί μεγέθους 39x26x18 εκ. που διέθεταν μία ταΐστρα και ένα μπιμπερό (Εικόνα 18). Σε όλους τους κλωβούς διαβίωναν 8-10 επίμυες μέχρι την ημέρα της θυσίας. Όλα τα πειραματόζωα διαβίωναν σε ειδικά δωμάτια με σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) και σταθερό κυκλικό φωτισμό (12h φως και 12h σκοτάδι) και είχαν πάντα ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή του εμπορίου και νερό.



Εικόνα 18. Τυπικός εργαστηριακός κλωβός για επίμυες μάρτυρες.

2.3 Πειραματικός σχεδιασμός

2.3.1 Εμπλουτισμός του περιβάλλοντος μέχρι την ενήλικη ζωή

Αρσενικοί και θηλυκοί επίμυες που διαβίωναν είτε σε τυπικούς εργαστηριακούς κλωβούς είτε σε κλωβούς εμπλουτισμένου περιβάλλοντος θυσιάστηκαν κατά την ενήλικη ζωή και πιο συγκεκριμένα κατά την ενενηκοστή ημέρα της ζωής τους (P90).

Στις πειραματικές διαδικασίες που περιελάμβαναν αναπαραγωγή, την τρίτη ημέρα μετά τη γέννηση (P3) γινόταν διαχωρισμός των νεογέννητων επίμυων , έτσι ώστε σε κάθε κλωβό να διαμένουν δέκα επίμυες με την μητέρα τους. Την 26^η ημέρα της ζωής τους (P26) γινόταν ο απογαλακτισμός των επίμυων, αφαιρείτο δηλαδή η μητέρα από τον κλωβό και τα πειραματόζωα διαχωρίζονταν κατά φύλο και περιβάλλον διαβίωσης.

2.4 Συμπεριφορικές δοκιμασίες

2.4.1 Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (Open Field Test)

Το open-field είναι μια δοκιμασία που «χρησιμοποιεί» την τάση των αρουραίων να εξερευνούν νέα περιβάλλοντα (Walsh and Cummins 1976). Τυπικά, τα πειραματόζωα είναι πιο δραστήρια και παραμένουν στην περιφέρεια περισσότερο χρόνο σε σχέση με την κεντρική περιοχή, μια προτίμηση η οποία εξηγείται όπως έχει καθοριστεί από την έννοια του θιγμοτακτισμού (Valle 1970). Ο όρος thigmotaxis αναφέρεται στην τάση του πειραματόζωου να παραμένει κοντά στις κάθετες επιφάνειες. Η συμπεριφορά αυτή εξετάζεται σε μια συσκευή που ονομάζεται συσκευή ανοιχτού πεδίου (open field) (Εικόνα 19) και αποτελεί το μέσο για να διερευνηθεί η εξερευνητική συμπεριφορά του ζώου. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές παραλλαγές αυτού του τεστ, οι περισσότερες από τις οποίες προσφέρονται και για μελέτες άγχους (anxiety).



Εικόνα 19. Πειραματική διάταξη συμπεριφορικής δοκιμασίας ανοιχτού πεδίου

Στην παρούσα εργασία, η δοκιμασία ανοιχτού πεδίου διενεργήθηκε τέσσερις ημέρες πριν από τη θυσία των πειραματοζώων. Σε προηγούμενες έρευνες εμπλουτισμένου περιβάλλοντος μελετήθηκε η συμπεριφορά ανοιχτού πεδίου σε διάφορα χρονικά σημεία (Fukushiro, Calzavara et al. 2007). Στην συγκεκριμένη μελέτη επιλέχθηκε η μέτρηση της αυθόρμητης κινητικότητας για χρονικό διάστημα 5 λεπτών.

Πιο συγκεκριμένα, τα πειραματόζωα μεταφέρθηκαν με τους κλωβούς τους στο δωμάτιο συμπεριφοράς του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας μία ώρα πριν την έναρξη της δοκιμασίας για λόγους εξοικείωσης με τον περιβάλλοντα χώρο. Στη συνέχεια, κάθε πειραματόζωο τοποθετούνταν χωριστά σε ένα διαφανή κλωβό από Plexiglas (40x40x40 εκ.). Ένα αισθητηριακό πλέγμα από υπέρυθρες ακτίνες, τοποθετημένο 2.5 cm πάνω από το εδαφιαίο επίπεδο και ανά 2.5 cm κατά μήκος της περιμέτρου (16 υπέρυθροι σένσορες κατά μήκος κάθε πλευράς) ανίχνευαν την οριζόντια κίνηση. Αντίστοιχα, 16 σένσορες τοποθετημένοι σε απόσταση 16 cm από το εδαφιαίο επίπεδο ανίχνευαν τις κατακόρυφες κινήσεις του πειραματοζώου. Η όλη πειραματική διάταξη ήταν συνδεδεμένη με Η/Υ όπου ειδικό πρόγραμμα (Activity monitor version 5, Med Associates) προέβαινε στην ανάλυση της κινητικότητας του πειραματοζώου. Ο κλωβός μετά το τέλος της δοκιμασίας για κάθε πειραματόζωο καθαριζόταν με διάλυμα αιθανόλης 70%.

Κατά τη διάρκεια της πεντάλεπτης δοκιμασίας ο Η/Υ κατέγραφε τις εξής συμπεριφορές του πειραματοζώου:

- **Κίνηση (moving):** Το πειραματόζωο περπατάει ή τρέχει.
- **Ανόρθωση (rearing):** Το πειραματόζωο ανασηκώνεται κάθετα με τα δύο πίσω πόδια του στο πάτωμα του κλωβού και με τα δύο του μπροστινά στο τοίχωμα του κλωβού ή χωρίς να αγγίζει κανένα σημείο του κλωβού και οσμίζεται τον αέρα.
- **Απόσταση που διένυσε το πειραματόζωο.**
- **Χρόνος που το πειραματόζωο παρέμενε στο κέντρο του κλωβού.**

Στο τέλος κάθε δοκιμασίας ο Η/Υ εμφάνιζε τα αποτελέσματα για την οριζόντια κίνηση (horizontal counts), την ανόρθωση (vertical counts) καθώς και το συνολικό μήκος της απόστασης που διένυε το πειραματόζωο σε cm (distance travelled). Η παραπάνω μέθοδος βασίζεται στη μελέτη των (Spruijt and Gispen 1984) με ειδικές προσαρμογές και αποτελεί μια αυτοματοποιημένη μέθοδο για την προσέγγιση της κινητικής δραστηριότητας (Antonίου, Kafetzopoulos et al. 1998)

2.4.2 Δοκιμασία οπτικής αναγνώρισης αντικειμένου (Object Recognition Test)

Δύο ημέρες πριν από τη θυσία των ενήλικων πειραματοζώων διενεργήθηκε η δοκιμασία οπτικής αναγνώρισης αντικειμένου. Η δοκιμασία αυτή βασίζεται στην φυσική τάση των επίμυων να εξερευνούν νέα αντικείμενα και εκτός από την εμπλοκή μηχανισμών μνήμης και μάθησης εμπεριέχει και την ενεργοποίηση των συστημάτων οπτικής επεξεργασίας μέσω των οποίων αναγνωρίζονται τα επιμέρους χαρακτηριστικά ενός αντικειμένου (σχήμα, μέγεθος και χρώμα). Η οπτική επεξεργασία πιθανότατα διαδραματίζει σημαντικότερο ρόλο από την απτική επεξεργασία σε αυτή τη δοκιμασία (Kassuba, Klinge et al. 2013).

Στην παρούσα εργασία, τα πειραματόζωα είχαν εγκλιματιστεί στον κλωβό τις δύο προηγούμενες ημέρες πριν τη διεξαγωγή του πειράματος. Πιο συγκεκριμένα,

είχαν μεταφερθεί με τους κλωβούς τους στο δωμάτιο συμπεριφοράς του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας μία ώρα πριν την έναρξη της δοκιμασίας για λόγους εξοικείωσης με το περιβάλλον. Στη συνέχεια κάθε πειραματόζωο τοποθετούνταν χωριστά σε ένα διαφανή κλωβό από Plexiglas (40x40x40 εκ.). Μέσα στον κλωβό και κατά μήκος της μίας πλευράς, κοντά στις γωνίες υπήρχαν δύο ίδια αντικείμενα τα οποία απείχαν ίδια απόσταση από τα τοιχώματα του κλωβού. Τα πειραματόζωα παρέμεναν στον κλωβό για 10 λεπτά και καλούνταν να εξερευνήσουν τα δύο αντικείμενα για όλη τη διάρκεια της δοκιμασίας (sample trial). Μετά το πέρας της δοκιμασίας επέστρεφαν στους κλωβούς διαβίωσής τους για μία ώρα (intertribal interval). Στη συνέχεια επανατοποθετούνταν στους κλωβούς δοκιμασίας. Στο δεύτερο αυτό τμήμα της δοκιμασίας (choice trial), το ένα αντικείμενο είχε αντικατασταθεί με ένα καινούργιο, διαφορετικού χρώματος, σχήματος και υφής από το προηγούμενο (Εικόνα 20) και συνεπώς οι επίμυες καλούνταν να εξερευνήσουν δύο διαφορετικά αντικείμενα: το ήδη γνωστό (familiar) και το νέο (new) αντικείμενο. Αν ο επίμυς κατά τη δεύτερη δοκιμασία (choice trial) εξερευνήσει για περισσότερο χρόνο το νέο από το ήδη γνωστό αντικείμενο, αυτό αποτελεί ένδειξη καλής μνήμης. Όλοι οι συνδυασμοί των αντικειμένων και της θέσης τους επιλέγονται με τυχαίο τρόπο, ώστε να αποφευχθεί πιθανή προτίμηση σχήματος, υφής ή τοποθεσίας. Για να αποφευχθεί επίσης η παρουσία οσφρητικών υπολειμμάτων, που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τις επιλογές των πειραματοζώων, η διάταξη και τα αντικείμενα καθαρίζονταν προσεκτικά με διάλυμα αιθανόλης 70% μετά από κάθε δοκιμή.

Οι δύο συνεδρίες καταγράφονταν σε βίντεο και η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος “Kinoscope” που αναπτύχθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας. Από αυτή την καταγραφή εξάγεται μία σειρά μεταβλητών:

- **Ολικός χρόνος εξερεύνησης των αντικειμένων κατά την πρώτη συνεδρία:** εκτιμήθηκε ο χρόνος που διένυσαν τα πειραματόζωα εμπλεκόμενα ενεργά με τα δύο αντικείμενα συγκρινόμενα με το συνολικό χρόνο της δοκιμασίας $((A+B)/600)$

- **Χρόνος προτίμησης κατά τη δεύτερη συνεδρία:** εκτιμήθηκε ο χρόνος που τα πειραματόζωα ασχολήθηκαν ενεργά με το νέο αντικείμενο, συγκρινόμενος με το χρόνο που ασχολήθηκαν με τα δύο αντικείμενα συνολικά ($B/(A+B)$), όπου B είναι το νέο αντικείμενο).



Εικόνα 20. Πειραματική διάταξη αναγνώρισης αντικειμένων - Εργαστήριο Φαρμακολογίας. Στην πρώτη συνεδρία (αριστερά) τα δύο αντικείμενα είναι ίδια, ενώ στη δεύτερη συνεδρία (δεξιά) το ένα αντικείμενο αντικαθίσταται με νέο.

2.5 Θυσία πειραματοζώων

Όλα τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν την 90η ημέρα της ζωής τους. Επίμυες που γεννήθηκαν και διαβίωναν σε εμπλουτισμένο περιβάλλον (αρσενικοί N=10, θηλυκοί N=7) και επίμυες που γεννήθηκαν και διαβίωναν σε τυπικούς εργαστηριακούς κλωβούς (αρσενικοί N=8 και θηλυκοί N=9) θυσιάστηκαν με αποκεφαλισμό κατά την ενήλικη περίοδο. Πριν από τη θυσία καταγράφηκε το σωματικό βάρος όλων των πειραματοζώων. Κατά τη διάρκεια της θυσίας έγινε συλλογή αίματος από τον τράχηλο και απομονώθηκαν ο ιππόκαμπος και ο προμετωπιαίος φλοιός με τυποποιημένες μικροχειρουργικές τεχνικές. Ο δεξιός ιππόκαμπος και προμετωπιαίος φλοιός χρησιμοποιήθηκαν για το νευροχημικό προσδιορισμό γλουταμικού οξέος μέσω της χρήσης Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης με Ηλεκτροχημικό Ανιχνευτή (HPLC-ED), ενώ ο αριστερός ιππόκαμπος και προμετωπιαίος φλοιός χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό κυτταροσκελετικών και άλλων συναπτικών scaffold πρωτεϊνών μέσω της τεχνικής ανοσοαποτύπωσης - Western Blot.

2.6 Νευροχημική ανάλυση

Ο ιππόκαμπος και ο προμετωπιαίος φλοιός απομονώθηκαν σε πάγο, ζυγίστηκαν και ομογενοποιήθηκαν σε 200 μl (ή 500 μl για τον ιππόκαμπο) HClO₄ 0.2N, το οποίο περιείχε 7.9mM Na₂S₂O₅ και 1.3 mM Na₂EDTA. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε 1400 rpm για 30 min στους 4°C και το υπερκείμενο υγρό συλλέχθηκε και φυλάχτηκε στους -80°C μέχρι την ανάλυσή του. Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης με Ηλεκτροχημικό Ανιχνευτή (HPLC-ED) συνδεδεμένο με ειδικό πρόγραμμα στον Η/Υ. Σε όλα τα δείγματα προσδιορίστηκαν τα επίπεδα γλουταμικού και ασπαρτικού οξέος.

2.6.1 Μέθοδος Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης με Ηλεκτροχημικό Ανιχνευτή (HPLC-ED) για τον προσδιορισμό γλουταμικού και ασπαρτικού οξέος.

Ο χρωματογραφικός προσδιορισμός του γλουταμικού και ασπαρτικού οξέος επιτυγχάνεται με υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης ζεύγους ιόντων υπό ισοκρατικές συνθήκες. Ως μη πολική, στατική φάση, χρησιμοποιούνται χημικά προσδεμένα σε αλκύλια σε πηκτική διοξειδίου του πυριτίου (alkyl-bonded silica) και συγκεκριμένα η στήλη Thermo ODS Hypersil, 250X 4.6mm 5μ (Thermo Electron, Cheshire, UK). Ως πολική, κινητή φάση χρησιμοποιείται μείγμα οργανικού διαλύτη και ρυθμιστικού διαλύματος με pH 4.9-5.1. Η παρασκευή της κινητής φάσης γίνεται καθημερινά και ακολουθεί απαέρωση και διήθησή της με τη χρήση αντλίας κενού. Ο οργανικός διαλύτης της κινητής φάσης είναι ακετονιτρίλιο (Merck, KGaA, Darmstadt, Γερμανία) και το ποσοστό του κυμαίνεται μεταξύ 6 και 8%, ανάλογα τα δείγματα, έτσι ώστε να γίνεται πλήρης διαχωρισμός των ουσιών με την εξής σειρά: ASP, GLU . Το ρυθμιστικό διάλυμα της κινητής φάσης περιέχει φωσφορικά: 17.8g/l Na₂HPO₄ · 2 H₂O και 18.9mg/L Na₂EDTA (Riedel-de Haën AG, Seelze-Γερμανία).

Οι αναλύσεις των δειγμάτων για τον προσδιορισμό του γλουταμικού και ασπαρτικού οξέος λαμβάνουν χώρα σε ένα σύστημα HPLC με αντλία GBC-

LC1150 και αμπερομετρικό ανιχνευτή BAS-LC4C (Εικόνα 21). Οι αμπερομετρικοί ανιχνευτές σταθερού δυναμικού βρίσκουν εφαρμογή σε ουσίες που οξειδώνονται ή ανάγονται εύκολα στο ηλεκτρόδιο εργασίας, στην τιμή του δυναμικού που επιλέγεται. Όταν το εφαρμοζόμενο δυναμικό έχει κατάλληλη τιμή, τότε είναι δυνατό να λάβει χώρα μεταφορά ηλεκτρονίων από ή προς τα σωματίδια του διαλύματος, οπότε προκύπτει ηλεκτρικό ρεύμα. Πραγματοποιείται μέτρηση του επαγόμενου ρεύματος, το οποίο είναι ανάλογο προς τη συγκέντρωση της προς ανάλυση ουσίας.

Η ροή της αντλίας είναι ρυθμισμένη στο 1ml/min και η κλίμακα ευαισθησίας (range) ρυθμίζεται στα 50-100nA ανάλογα με τις συγκεντρώσεις των ουσιών στα υπό ανάλυση δείγματα. Το σύστημα του HPLC είναι συνδεδεμένο με Η/Υ, ο οποίος φέρει ειδικό πρόγραμμα (Clarity) για την καταχώρηση των χρωματογραφήματων και την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων. Για τον καθημερινό έλεγχο της ευαισθησίας της ανάλυσης του *γλουταμικού* και *ασπαρτικού οξέος* και για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων χρησιμοποιούνται εξωτερικά πρότυπα διαλύματα (external standards). Τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάζονται καθημερινά με διαδοχικές αραιώσεις ενός πυκνού διαλύματος 1ml, το οποίο περιέχει 100μl ασπαρτικού (ASP), 10μl γλουταμικού (GLU) σε H₂O δις απεσταγμένο. Τα 100μl ασπαρτικού και τα 10μl γλουταμικού προέρχονται από πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης που φυλάσσονται στους -80°C. Για την ανίχνευση των αμινοξέων σε κάθε δείγμα προηγείται παραγοντοποίηση. Αρχικά αναμειγνύονται 40μl από το δείγμα με 40μl BORAX (sodium borate). Στη συνέχεια, προστίθενται 2μl OPA (orthophthalaldehyde- O-παλμαδεΰδη) και το δείγμα αφήνεται για 10 λεπτά πριν την έγχυση στη βαλβίδα.

Καθημερινά ενίονται στη βαλβίδα εισαγωγής του συστήματος τουλάχιστον 4 πρότυπα διαλύματα (2 από δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις, 60μl από το καθένα), τα οποία δίνουν 4 αντίστοιχα χρωματογραφήματα. Κάθε ουσία η οποία περιέχεται στο πρότυπο διάλυμα δίνει μία κορυφή, το εμβαδόν της οποίας χρησιμοποιείται για τη δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης. Η πρότυπη καμπύλη προκύπτει από τη σχέση εμβαδού κορυφής και συγκέντρωσης της κάθε ουσίας στο πρότυπο διάλυμα. Στη συνέχεια ενίονται στη βαλβίδα

εισαγωγής διαδοχικά 60μl από κάθε δείγμα (μετά την παραγοντοποίηση), λαμβάνονται τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα και υπολογίζεται η ποσότητα της κάθε ουσίας στο δείγμα με βάση το εμβαδόν της.

Η ποσότητα της κάθε ουσίας στο δείγμα, η οποία προκύπτει από την ποσοτικοποίηση του χρωματογραφήματος, εκφράζεται σε ng/20μl, όπου 20μl είναι ο όγκος του δείγματος που τελικά εισέρχεται στο βρόγχο του συστήματος, όπου γίνεται η ένεση. Τελικά, υπολογίζεται η ποσότητα της κάθε ουσίας σε μg/g ιστού, από τον οποίο προήλθε το δείγμα. Το όριο της ανάλυσης για την κάθε ουσία στο δείγμα είναι 1pg/20μl.



Εικόνα 21. Λεπτομέρεια της αντλίας GBC-LC1150 (Εργαστήριο Φαρμακολογίας).

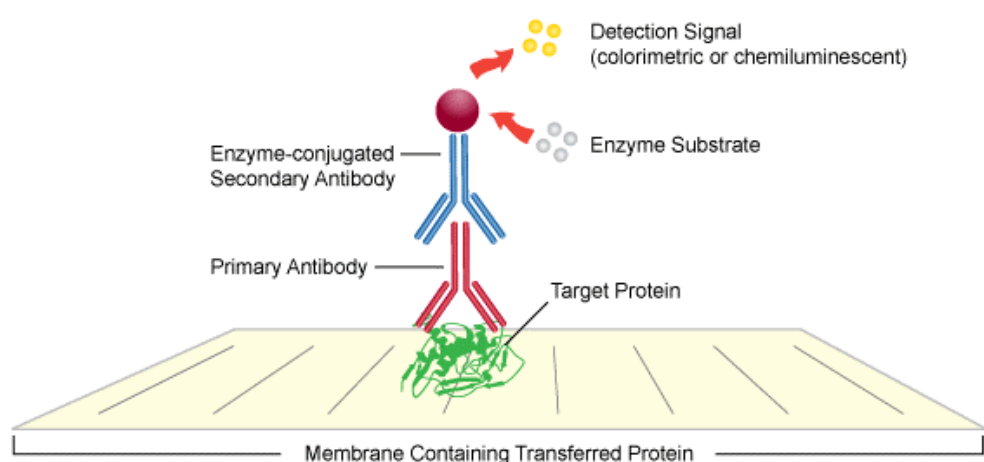
2.7 Μοριακή ανάλυση

2.7.1 Τεχνική Western Blot

Η ανοσοαποτύπωση Western είναι μία από τις καλύτερες μεθόδους ανίχνευσης συγκεκριμένων πρωτεϊνών ενός σύνθετου μείγματος, που συνδυάζει την υψηλή αναλυτική ικανότητα της ηλεκτροφόρησης σε γέλη, την ειδικότητα των αντισωμάτων και την ευαισθησία των ενζυματικών μεθόδων (Renner 1988). Η ανοσοαποτύπωση έχει πολλές κλινικές εφαρμογές καθώς καθιστά δυνατή την ανίχνευση ποικίλων αντισωμάτων έναντι διαφόρων πρωτεϊνικών αντιγόνων βακτηρίων και ιών.

Αρχή της μεθόδου

Η τεχνική Western είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική που στηρίζεται στο διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος και στην ποσοτική ανίχνευσή τους με βάση την ικανότητά τους να συνδέονται με ειδικά αντισώματα. Πιο συγκεκριμένα, η μεταφερόμενη πρωτεΐνη σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή σε μεμβράνη PVDF, ανιχνεύεται με τη χρήση ειδικών πρωτογενών και δευτερογενών αντισωμάτων, τα οποία με τη σειρά τους δεσμεύονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες αμινοξέων, που ονομάζονται επίτοπα. Στη συνέχεια μέσω μιας ειδικής αντίδρασης χημειοφωταύγειας οι πρωτεΐνες ενδιαφέροντος που εμπεριέχονται στα δείγματα εμφανίζονται σε φιλμ και ποσοτικοποιούνται με ειδικό πρόγραμμα σε Η/Υ.



Εικόνα 22. Σχηματική απεικόνιση ανίχνευσης πρωτεϊνών κατά την τεχνική Western blot.

Η μέθοδος περιλαμβάνει λεπτομερώς τα ακόλουθα στάδια:

A. Παρασκευή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από ιστούς:

Αρχικά οι ιστοί ομογενοποιήθηκαν προκειμένου να απελευθερώσουν τις διάφορες πρωτεΐνες που θα αναλυθούν αργότερα. Πιο συγκεκριμένα, αριστεροί ιππόκαμποι και προμετωπιαίοι φλοιοί ομογενοποιήθηκαν με χρήση διαλύματος ομογενοποίησης (100mM Tris-Cl, 1mM EDTA, 250mM NaCl, 5mM MgCl₂, 10% Glycerol, και 1% NP-40) (Πίνακας 1, όλες οι ουσίες προέρχονται από την εταιρεία Applichem). Προς αποφυγή οποιασδήποτε πρωτεϊνικής (μετα-μεταγραφικής) αλλαγής, π.χ. πρωτεόλυση, αποφωσφορυλίωση, προστίθενται κατάλληλοι αναστολείς (Proteinase Inhibitor Cocktail ανά Phosphatase Inhibitor Cocktail) στο διάλυμα ομογενοποίησης (Homogenization buffer) ενώ η όλη διαδικασία και τα δείγματα παραμένουν σε πάγο (4°C).

Πίνακας 1. Διάλυμα Ομογενοποίησης

Χημικές ουσίες διαλύματος ομογενοποίησης	Τελική συγκέντρωση	Απαιτούμενη ποσότητα για 10 ml
Tris-Cl pH 8	100mM	1ml of (1M)
EDTA	1mM	20μl of 0.5M
NaCl	250mM	500μl of 5M
MgCl₂	5mM	50μl of 1M
Glycerol	10%	1,16ml of 86%
NP-40 (Nonidet, Pierce)	1%	1ml of 10%

Ο όγκος του διαλύματος ομογενοποίησης που προστίθεται σε κάθε δείγμα, καθορίζεται σε σχέση με το βάρος του ιστού.-500μL ρυθμιστικό διάλυμα / 50mg ιστού. Τα δείγματα έπειτα ομογενοποιήθηκαν με τη χρήση συσκευής ομογενοποίησης Dounce. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 min σε 14000 rpm και θερμοκρασία 4°C με τη χρήση μικροφυγοκέντρου. Μετά την ομογενοποίηση ο,τιδήποτε δεν είχε ομογενοποιηθεί παρέμενε στο κατώτερο μέρος του erpendorf μαζί με βαριές κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, μεγάλα οργανίδια και τον πυρήνα, ενώ στο ανώτερο μέρος του erpendorf παρουσιάζονταν όλες οι διαλυτές πρωτεΐνες. Στη συνέχεια, αναρροφήθηκε το υπερκείμενο, το οποίο

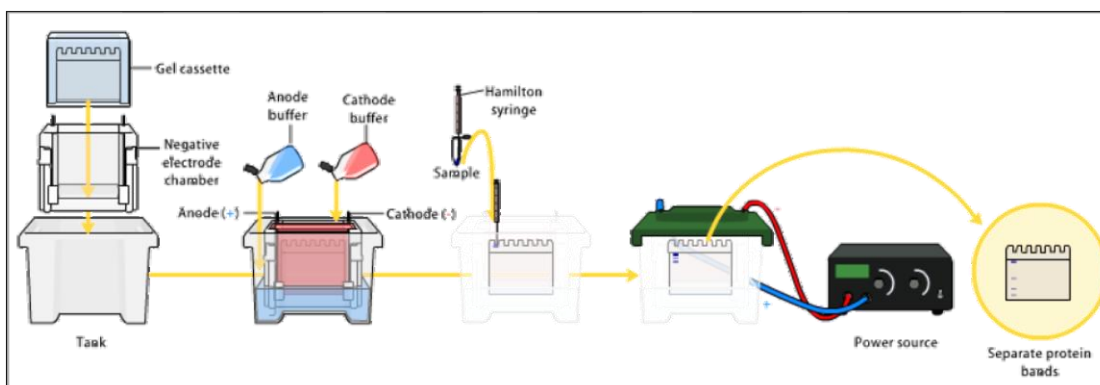
μεταφέρθηκε σε καθαρά eppendorfs, τα οποία διατηρούνταν και αυτά σε πάγο. Τα δείγματα μπορούν φυλάσσονται σε θερμοκρασία από -20 έως -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Στη συνέχεια, ετοιμάζουμε το μείγμα για την ηλεκτροφόρηση αναμειγνύοντας 1:1 Laemmli buffer (2x, BIORAD) με πρωτεϊνικό δείγμα, ενώ ακολουθεί βρασμός των δειγμάτων (κατά τον οποίον επιτυγχάνεται και η αποδιάταξη των πρωτεϊνών) για 10 min σε 100°C και έπειτα μικρή-γρήγορη φυγοκέντρηση (3-4 sec).

B. Ηλεκτροφόρηση με αποδιατακτικούς παράγοντες (SDS-PAGE: Polyacrylamide Gel Electrophoresis): Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης γίνεται για το διαχωρισμό των διαφόρων πρωτεϊνών με βάση το μοριακό μέγεθος της κάθε πρωτεΐνης.

Οι περισσότερες πρωτεΐνες συνδέουν ένα σταθερό ποσό SDS στο κάθε αμινοξύ με αποτέλεσμα να ελαχιστοποιούνται οι διαφορές ως προς το ηλεκτρικό φορτίο της κάθε πρωτεΐνης και να παραμένουν διαφορές μόνο ως προς το μέγεθός τους. Έτσι το μοριακό μέγεθος είναι ο κύριος συντελεστής διαχωρισμού του μείγματος των πρωτεϊνών στην SDS-PAGE.

Στην παρούσα εργασία για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροδίων (running buffer) χρησιμοποιήθηκαν: 0.25M Tris Base, 1.92M Glycine και 1% SDS (της εταιρείας Applichem). Το διάλυμα εργασίας προκύπτει με αραιώση 1/10 του πυκνού αρχικού διαλύματος με δις απεσταγμένο νερό.



Εικόνα 23. Σχηματική παράσταση της μεθοδολογίας SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis.

Παρασκευή πηκτώματος (gel): Η ηλεκτροφόρηση επιτελείται σε δύο διαφορετικά πηκτώματα: ένα πήκτωμα συμπίεσεως 5% (Stacking gel 5%) στο οποίο τοποθετούνται τα δείγματα και ένα πήκτωμα διαχωρισμού 10% (Separating gel 10%) το οποίο ακολουθεί ακριβώς κάτω από το πήκτωμα συμπίεσεως. Το πήκτωμα συμπίεσεως (stacking gel), δε διαχωρίζει τις πρωτεΐνες, αλλά τις «συμπυκνώνει» σε μία μικρή ζώνη, γεγονός που εξασφαλίζει ότι οι πρωτεΐνες κάθε δείγματος θα φτάσουν ταυτόχρονα στο κυρίως πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel). Η επιλογή της περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδη γίνεται με βάση το μέγεθος των υπό μελέτη πρωτεϊνών. Στη μελέτη μας χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα ακρυλαμίδης 10%, ενώ η παρασκευή των πηκτωμάτων έγινε σύμφωνα με τον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Όγκος ουσιών για την παρασκευή πηκτώματος (gel)

Χημικές ουσίες διαλύματος για την παρασκευή πηκτώματος (gel)	Πήκτωμα διαχωρισμού 10% (απαιτούμενη ποσότητα για 10 ml)	Πήκτωμα συμπίεσεως 5% (απαιτούμενη ποσότητα για 10 ml)
H ₂ O	4.0 ml	6.8 ml
Acrylamide mix	3.3 ml	1.7 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	2.5 ml	1.25 ml
10% SDS	0.1 ml	0.1 ml
10% Ammonium persulfate	0.1 ml	0.1 ml
TEMED	0.004 ml	0.01 ml

*Το μείγμα αναδεύεται με ήπιες κυκλικές κινήσεις.

Χρησιμοποιήθηκε συσκευή κατακόρυφης ηλεκτροφόρησης σε πλάκες διαστάσεων 10x10 της εταιρείας BIORAD και τροφοδοτικό σταθερής ηλεκτρικής τάσης (Volt) της ίδιας εταιρείας (Εικόνα 24).



A.



B.

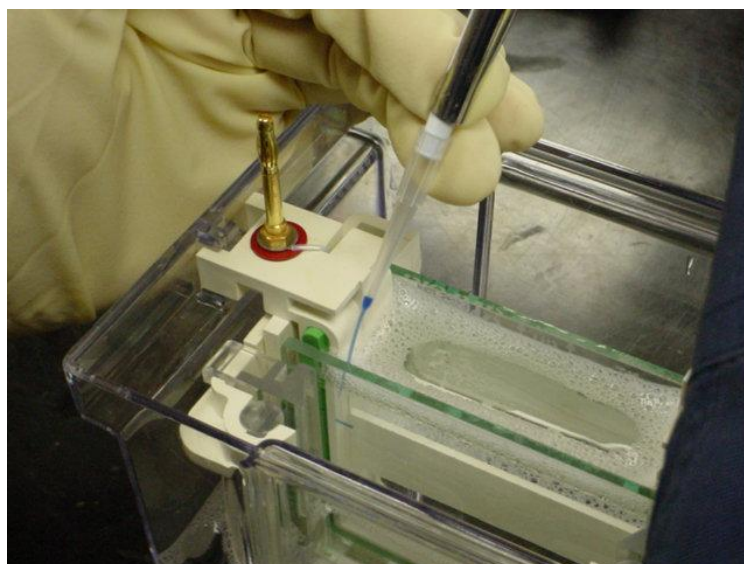
Εικόνα 24. A) BIO-RAD Mini-Protean Tetra Cell Electrophoresis Electrode Tank.
B) Τροφοδοτικό Biorad PowerPac Basic

Η συσκευή και όλα τα εξαρτήματα που πρόκειται να έρθουν σε επαφή με το πήκτωμα πλένονται με απεσταγμένο νερό και στη συνέχεια καθαρίζονται με 70% αιθανόλη. Κατασκευάζεται γυάλινη μήτρα με τις πλάκες για την τοποθέτηση των πηκτωμάτων. Η μία πλάκα τοποθετείται πάνω στην άλλη με την βοήθεια πλαστικών ελασμάτων και έτσι δημιουργείται η μήτρα στην οποία τοποθετείται το διάλυμα ακρυλαμιδίου (Εικόνα 25). Στη συνέχεια παρασκευάζεται το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) και τοποθετείται προσεκτικά στη γυάλινη μήτρα. Το πήκτωμα πολυμερίζεται για 20-30 λεπτά περίπου σε θερμοκρασία δωματίου.



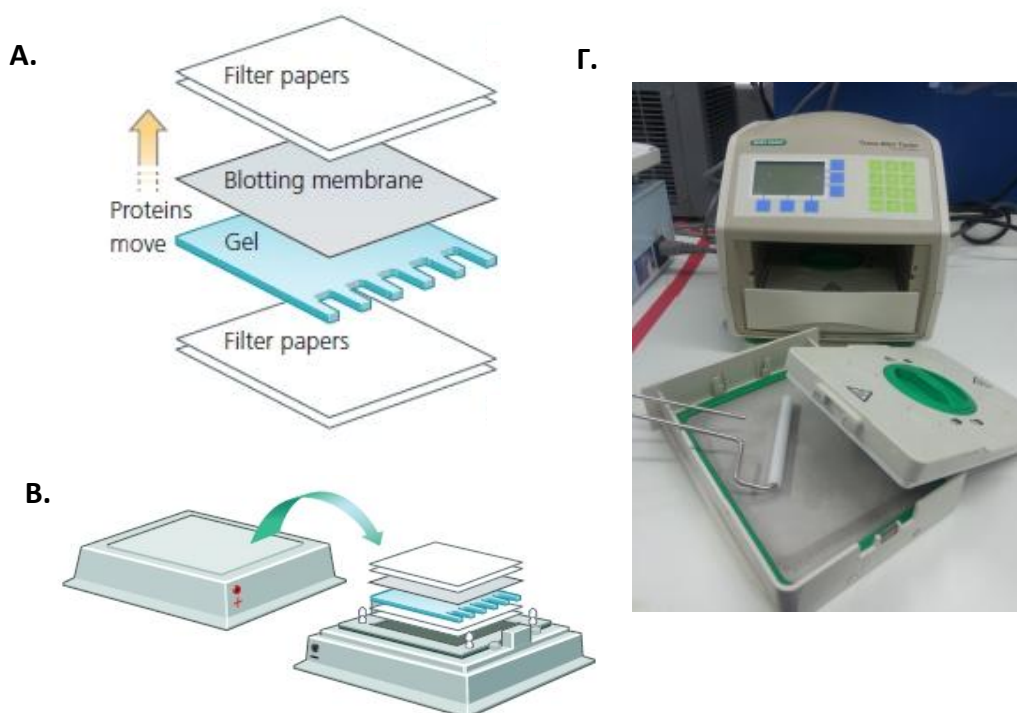
Εικόνα 25. Γυάλινη μήτρα για την τοποθέτηση ακρυλαμιδίου

Κατόπιν παρασκευάζεται το πήκτωμα συμπίεσης (stacking gel) το οποίο προστίθεται πάνω στο πήκτωμα διαχωρισμού και έχει ύψος περίπου 2cm. Αμέσως μετά τοποθετείται ειδική οδοντωτή κτένα με εσοχές (Εικόνα 25) που θα σχηματίσουν τις θέσεις για την τοποθέτηση των δειγμάτων. Μετά το πολυμερισμό του πηκτώματος συμπίεσης, προσαρμόζονται οι γυάλινες πλάκες με το πήκτωμα στην κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθενται 1l διαλύματος ηλεκτροδίων (running buffer). Αφαιρείται με προσοχή η οδοντωτή κτένα και με τη βοήθεια σύριγγας πλένονται τα φρεάτια εναπόθεσης των δειγμάτων (wells) με το ίδιο διάλυμα (διάλυμα ηλεκτροφόρησης). Κατόπιν τα δείγματα τοποθετούνται στα φρεάτια του πηκτώματος (Εικόνα 26). Στην ακριανή θέση του πηκτώματος τοποθετούμε πρότυπο διάλυμα δεικτών μοριακού βάρους (Precision plus protein western-C standards). Η συσκευή συνδέεται με πηγή συνεχούς ρεύματος σταθερής τάσης 75-80 Volt μέχρι τα δείγματα να εισέλθουν στο πήκτωμα διαχωρισμού οπότε και αυξάνουμε την τάση στα 120 Volt. Τα δείγματα διατρέχουν κατακόρυφα το πήκτωμα και η ηλεκτροφόρηση τερματίζεται όταν η μπλε χρωστική των δειγμάτων φτάσει στο κάτω άκρο του πηκτώματος διαχωρισμού.



Εικόνα 26. Τοποθέτηση δειγμάτων στα φρεάτια του πηκτώματος.

Γ. Μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα ακρυλαμίδης (gel) στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Μετά το διαχωρισμό σε πήκτωμα ακρυλαμίδιου των πρωτεϊνών, πρέπει να γίνει η μεταφορά των πρωτεϊνών από τη γέλη σε μία μεμβράνη. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιούμε διηθητικά χαρτιά και μεμβράνες νιτροκυτταρίνης από το Transfer-BLOT Turbo RTA Transfer KIT της BIORAD και δημιουργούμε το “sandwich” μεταφοράς με την ακόλουθη σειρά: Διηθητικό χαρτί διαβρεγμένο με διάλυμα μεταφοράς - Μembrάνη νιτροκυτταρίνης - Πήκτωμα ακρυλαμίδιου - Διηθητικό χαρτί διαβρεγμένο με διάλυμα μεταφοράς (Εικόνα 27 Α). Αφού αφαιρέσουμε τυχόν φυσαλίδες και την περίσσεια διαλύματος μεταφοράς, κλείνουμε την κασέτα μεταφοράς και την τοποθετούμε μέσα στην ειδική συσκευή όπου θα πραγματοποιηθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η συσκευή BIORAD Trans Blot Turbo (Εικόνα 27 Γ) και η μεταφορά των πρωτεϊνών επιτεύχθηκε σε μόλις 7 λεπτά .

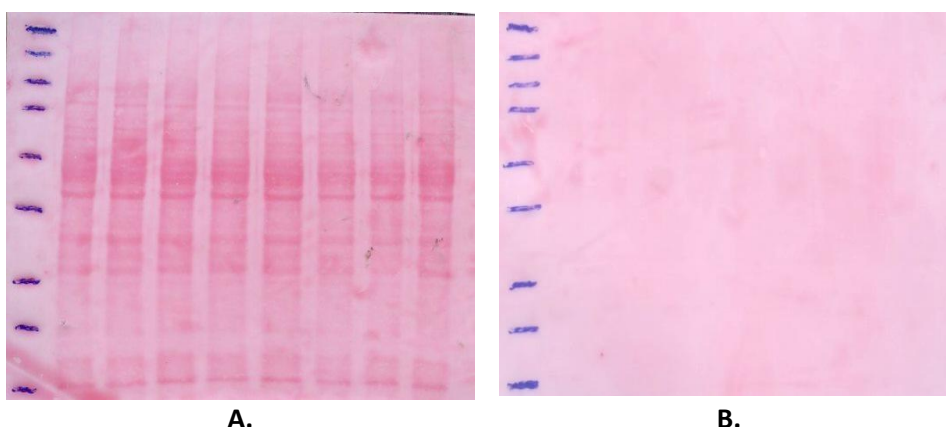


Εικόνα 27. Μέθοδος μεταφοράς πρωτεϊνών κατά την τεχνική Western blot. **Α.** “Sandwich” μεταφοράς. **Β.** Εφαρμογή sandwich στην κασέτα μεταφοράς. **Γ.** Συσκευή BIORAD Trans Blot Turbo (Semi-dry transfer).

Δ. Έλεγχος μεταφοράς πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με

χρώση Ponceau: Μετά τη μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη, γίνεται έλεγχος επιτυχούς μεταφοράς μέσω της ανίχνευση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με χρώση 0.1% διαλύματος Ponceau-S Dye (Roth). Σε δοχείο τοποθετείται ποσότητα διαλύματος Ponceau-S επαρκής για να καλύψει την μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, η οποία βυθίζεται σε αυτό και ακολουθεί ήπια ανακίνηση μέχρι να εμφανιστούν οι πρωτεϊνικές ζώνες – επάρματα. Κατόπιν ξεπλένουμε την μεμβράνη με TBS-T 1x (*παραπομπή:* παρασκευή διαλύματος TBS-T 10x) και έπειτα την περνάμε από τρεχούμενο νερό βρύσης μέχρι τον πλήρη αποχρωματισμό της. Η ένταση της χρώσης των πρωτεϊνών είναι ενδεικτικά ανάλογη με το ποσό της πρωτεΐνης που έχει αποτυπωθεί στην μεμβράνη (Εικόνα 28). Οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης μετά τον αποχρωματισμό τους, τυλίχτηκαν σε σελοφάν εμπορίου και φυλάχτηκαν στους -20°C .

****Παραπομπή:** Για την παρασκευή 1lt διαλύματος **TBS-T 10x** ακολουθούνται τα ακόλουθα βήματα: **1)** Αρχικά γίνεται παρασκευή Tris-HCl stock (1M, pH 7.5-8.0) με τον εξής τρόπο: Διαλύονται 800 gr Tris base σε 800 ml δις-απεσταγμένο νερό, ακολουθεί ρύθμιση του pH του διαλύματος σε 7.5-8.0 με τη χρήση συμπυκνωμένου HCl και στο τέλος συμπληρώνεται δις-απεσταγμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο του ενός λίτρου. **2)** Έπειτα ακολουθεί η παρασκευή TBS-T 10x: Για 1lt διαλύματος διαλύονται 88 gr NaCl σε 500 ml Tris-HCl stock, 1M, έπειτα προστίθενται 10ml Tween-20 και στο τέλος συμπληρώνεται δις-απεσταγμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο του ενός λίτρου.



Εικόνα 28. Μembrάνες νιτροκυτταρίνης με χρώση Ponceau-S Dye. Στη μεμβράνη αριστερά (A) παρατηρείται κανονική μεταφορά πρωτεϊνών με εμφανείς τις χαρακτηριστικές πρωτεϊνικές ζώνες, ενώ στη μεμβράνη δεξιά (B) παρατηρείται ανεπιτυχής μεταφορά των πρωτεϊνών με εμφανή την έλλειψη των πρωτεϊνικών ζωνών.

E. Ανίχνευση πρωτεϊνών με αντισώματα (Immunodetection): Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει το στάδιο της ανοσοανίχνευσης με ειδικά αντισώματα. Αρχικά, καλύπτουμε τις μη ειδικές θέσεις δέσμησης του αντισώματος επωάζοντας με διάλυμα 5% αποβουτυρωμένου γάλατος (non fat dried milk της εταιρείας Appllichem) σε TBS για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, πριν την επώαση με τα ειδικά αντισώματα. Στη συνέχεια αφαιρούμε το γάλα και επωάζουμε με ειδικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης στόχο στην επιθυμητή συγκέντρωση για 1-2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με ήπια ανάδευση σε συγκεκριμένη συσκευή (roller) – ο χρόνος επώασης εξαρτάται από το αντίσωμα. Για ορισμένα αντισώματα η επώαση έλαβε χώρα όλη τη νύχτα (overnight incubation). Στη συνέχεια, απομακρύνουμε την περίσσεια αντισώματος που δεν συνδέθηκε με την πρωτεΐνη στόχο πλένοντας τη μεμβράνη με TBS-T 1x για 5 φορές, επί 5 λεπτά την κάθε φορά. Επωάζουμε με 2^ο αντίσωμα ειδικό έναντι του 1^{ου} για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Η επιλογή του 2^{ου} αντισώματος γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας προέλευσης του αντισώματος (Πίνακας 3). Επαναλαμβάνουμε το στάδιο πλύσης της μεμβράνης με TBS-T 1x και ετοιμάζουμε τα αντιδραστήρια χημιοφωταύγειας που θα μας βοηθήσουν να ανιχνεύσουμε την προς μελέτη πρωτεΐνη. Χρησιμοποιώντας το εμπορικά διαθέσιμο kit Clarity western ECL substrate της BIORAD και ακολουθώντας τις οδηγίες της εταιρείας δουλεύουμε ακολούθως: Τοποθετούμε τη νιτροκυτταρίνη σε μία πλαστική διαφάνεια, προσθέτουμε ποσότητα επαρκή εμφανιστικού διαλύματος, την καλύπτουμε με την υπόλοιπη μισή διαφάνεια και την επωάζουμε για 1-2 λεπτά χωρίς ανάδευση, ενώ έπειτα στεγνώνουμε την περίσσεια των διαλυμάτων χρησιμοποιώντας απορροφητικό χαρτί. Εκθέτουμε τη μεμβράνη σε φιλμ αυτοραδιογραφίας για διάφορα χρονικά διαστήματα μέχρι να εμφανιστεί καθαρά η υπό μελέτη πρωτεΐνη (ζώνη-έπαρμα). Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε σκοτεινό θάλαμο παρουσία κόκκινου φωτός.

Τα στυπώματα (blots) μετέπειτα ποσοτικοποιήθηκαν με τη χρήση του προγράμματος TINA 3.0 bioimaging software (Raytest). Όλες οι τιμές του σήματος οπτικής πυκνότητας (optical density) που αντιστοιχούσαν στις πρωτεΐνες ενδιαφέροντος, κανονικοποιήθηκαν με βάση τα επίπεδα GAPDH

(housekeeping protein) και εκφράστηκαν ως επί τοις εκατό (%) του ποσοστού των αρσενικών μαρτύρων πειραματοζώων (control males).

Πίνακας 3. Χαρακτηριστικά πρωτογενών και δευτερογενών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

<u>Πρωτογενές Ab</u>	<u>Εταιρεία</u>	<u>Cat.No</u>	<u>Δευτερογενές Ab</u>	<u>Εταιρεία</u>	<u>Cat.No</u>
Τau5 (1:2000) (2h επώαση σε θερμοκρασία δωματίου)	Abcam	ab80579	Anti-mouse IgG (1:5000) (1h επώαση σε θερμοκρασία δωματίου)	Santa Cruz Biotechnology	sc-2005
PHF1 (1:200) (p-Ser396/404-Tau) (1h επώαση σε θερμοκρασία δωματίου)	Dr. Peter Davies (Albert Einstein College of Medicine, New York, NY)		Anti-rabbit IgG (1:5000) (1/2 h επώαση σε θερμοκρασία δωματίου)	Cell Signaling	7074
NR2B (1:1000) (2h επώαση σε θερμοκρασία δωματίου)	Abcam	ab65783	Anti-rabbit IgG (1:5000) (1h επώαση σε θερμοκρασία δωματίου)	Cell Signaling	7074
GluR2B (1:500) (2h επώαση σε θερμοκρασία δωματίου)	Abcam	ab52176	Anti-rabbit IgG (1:5000) (1h επώαση σε θερμοκρασία δωματίου)	Cell Signaling	7074
PSD95 (1:5000) (2h επώαση σε θερμοκρασία δωματίου)	NeuroMab	75028	Anti-mouse IgG (1:5000) (1h επώαση σε θερμοκρασία δωματίου)	Santa Cruz Biotechnology	sc-2005
Synaptophysin (1:5000) (2h επώαση σε θερμοκρασία δωματίου)	Synaptic Systems	101 011	Anti-rabbit IgG (1:5000) (1h επώαση σε θερμοκρασία δωματίου)	Cell Signaling	7074

Synapsin (1:5000) (2h επώαση σε θερμοκρασία δωματίου)	Synaptic Systems	106 001	Anti-rabbit IgG (1:5000) (1h επώαση σε θερμοκρασία δωματίου)	Cell Signaling	7074
Cdk5(DC-17) (1:2000) (2h επώαση σε θερμοκρασία δωματίου)	Millipore	#05-364	Anti-mouse IgG (1:5000) (1h επώαση σε θερμοκρασία δωματίου)	Santa Cruz Biotechnology	sc-2005
p35 (1:1000) (επώαση όλη νύχτα στους 4°C)	Cell Signaling	#2680	Anti-rabbit IgG (1:5000) (1h επώαση σε θερμοκρασία δωματίου)	Cell Signaling	7074
5HT1A (1:2500) (επώαση όλη νύχτα στους 4°C)	Abcam	ab85615	Anti-rabbit IgG (1:5000) (1.5h επώαση σε θερμοκρασία δωματίου)	Cell Signaling	7074
BDNF (1:200) (επώαση όλη νύχτα στους 4°C)	Santa Cruz Biotechnology	sc-33904	Anti-goat IgG (1:5000) (1h επώαση σε θερμοκρασία δωματίου)	Santa Cruz Biotechnology	sc-2020
GAPDH (1:1000) (2h επώαση σε θερμοκρασία δωματίου)	Santa Cruz Biotechnology	sc-166574	Anti-mouse IgG (1:5000) (1h επώαση σε θερμοκρασία δωματίου)	Santa Cruz Biotechnology	sc-2005

2.8 Στατιστική επεξεργασία

2.8.1 Συμπεριφορά ανοιχτού πεδίου (Open Field Test)

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας ανοιχτού πεδίου περιλαμβάνει τις παραμέτρους: *κίνηση, ανόρθωση, απόσταση που διένυσε το πειραματόζωο, χρόνος που το πειραματόζωο παρέμεινε στο κέντρο του κλωβού και αριθμός εισόδων στο κέντρο του κλωβού* – έγινε με ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις (two-way ANOVA) με παράγοντες το φύλο και το περιβάλλον διαβίωσης. Επίσης, έγιναν ξεχωριστές αναλύσεις μεταβλητότητας κατά μία διεύθυνση (one-way ANOVA), για την διευκρίνιση διαφορών μεταξύ των ομάδων, οι οποίες διέφεραν ως προς ένα παράγοντα αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως Mean \pm SEM. Στατιστικά σημαντικά θεωρήθηκαν τα αποτελέσματα με $P < 0,05$.

2.8.2 Οπτική αναγνώριση αντικειμένου (Object Recognition Test)

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων από τη δοκιμασία οπτικής αναγνώρισης αντικειμένου έγινε με ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις (two-way ANOVA) με παράγοντες το φύλο και το περιβάλλον διαβίωσης. Μελετήθηκαν ο ολικός χρόνος εξερεύνησης κατά την πρώτη συνεδρία ($(A+B)/600$) και ο δείκτης προτίμησης του νέου αντικειμένου κατά τη δεύτερη συνεδρία ($B/(A+B)$), όπου B είναι το νέο αντικείμενο). Επίσης, έγιναν ξεχωριστές αναλύσεις μεταβλητότητας κατά μία διεύθυνση (one-way ANOVA), για την διευκρίνιση διαφορών μεταξύ των ομάδων, οι οποίες διέφεραν ως προς έναν παράγοντα αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως Mean \pm SEM. Στατιστικά σημαντικά θεωρήθηκαν τα αποτελέσματα με $P < 0,05$.

2.8.3 Νευροχημικοί προσδιορισμοί

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων από την Υγρή χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC) έγινε με ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις (two-way ANOVA) με παράγοντες το φύλο και το περιβάλλον διαβίωσης για κάθε περιοχή ξεχωριστά, ακολουθούμενη από το τεστ πολλαπλής σύγκρισης κατά ζεύγη του Tukey (Tukey's all-pairwise multiple comparison test). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως συγκέντρωση του νευροδιαβιβαστή σε ng/mg ιστού και παρουσιάζονται ως Mean \pm SEM. Στατιστικά σημαντικά θεωρήθηκαν τα αποτελέσματα με $P < 0,05$.

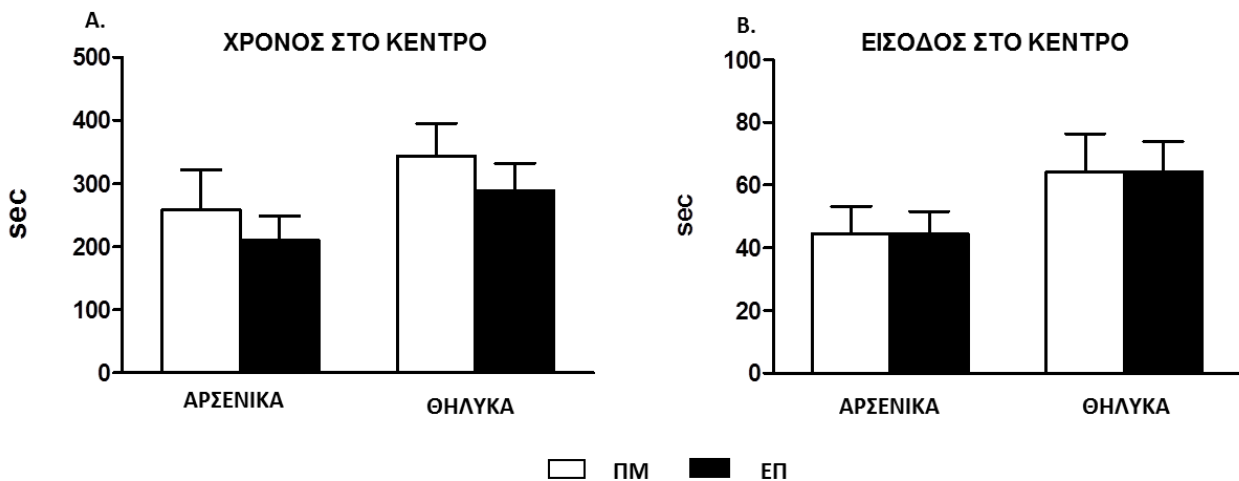
2.8.4 Μοριακοί προσδιορισμοί

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων από την τεχνική ανοσοαποτύπωσης Western έγινε με ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις (two-way ANOVA) με παράγοντες το φύλο και το περιβάλλον διαβίωσης για κάθε περιοχή, ακολουθούμενη από το τεστ πολλαπλής σύγκρισης κατά ζεύγη του Tukey (Tukey's all-pairwise multiple comparison test). Η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών (ζώνες-επάρματα) έγινε με τη χρήση του προγράμματος TINA1 bioimaging software. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως σχετική οπτική πυκνότητα (% αρσενικών πειραματοζώων μαρτύρων) και παρουσιάζονται ως Mean \pm SEM. Στατιστικά σημαντικά θεωρήθηκαν τα αποτελέσματα με $P < 0,05$.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Συμπεριφορά ανοιχτού πεδίου (Open Field Test)

Η διαβίωση των πειραματοζώων σε εμπλουτισμένο περιβάλλον μέχρι την ενήλικη ζωή, έδειξε ότι το περιβάλλον δεν είχε καμία επίδραση στις παραμέτρους που μελετήθηκαν. Η ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις (φύλο και περιβάλλον) δεν έδειξε καμία επίδραση του περιβάλλοντος, του φύλου ή αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων στις παραμέτρους που εξετάστηκαν (οριζόντιες μετρήσεις, κάθετες μετρήσεις, διανυόμενη απόσταση), ενώ ο χρόνος παραμονής στο κέντρο του κλωβού ή ο αριθμός εισόδων στο κέντρο του κλωβού χρησιμοποιήθηκαν σαν δείκτες άγχους.



Γράφημα 1: Α) Χρόνος κατά τον οποίο αρσενικοί και θηλυκοί επίμυες παρέμειναν στο κέντρο του κλωβού. Β) Αριθμός εισόδων αρσενικών και θηλυκών επίμυων στο κέντρο του κλωβού. ΠΜ: Πειραματόζωα Μάρτυρες, ΕΠ: Πειραματόζωα που διαβίωναν σε Εμπλουτισμένο Περιβάλλον

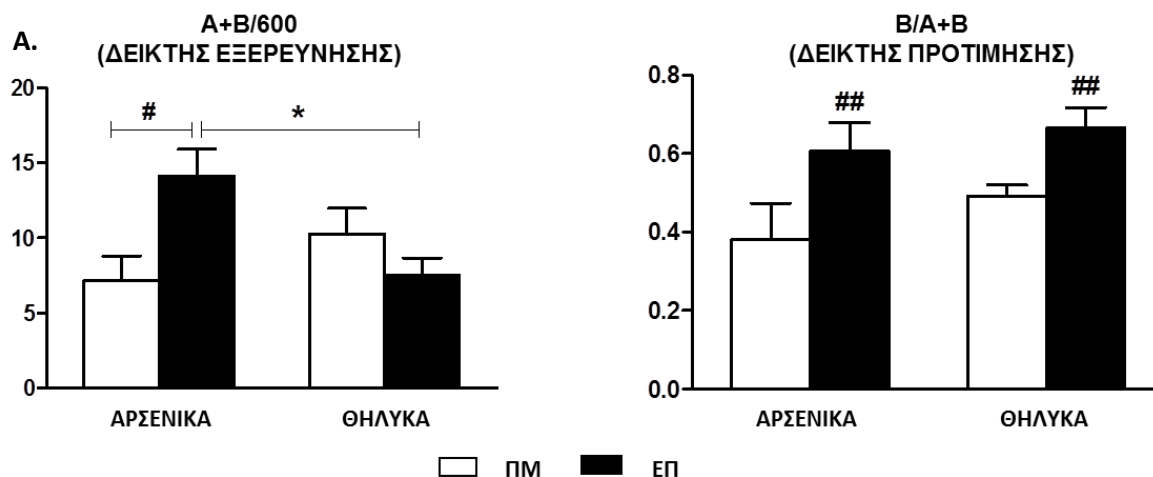
Ομάδες Πειραματοζώων	Διανυόμενη απόσταση (cm)	Οριζόντιες μετρήσεις	Κάθετες μετρήσεις
Αρσενικά μάρτυρες	1171,41 ± 171,5	489,5 ± 84,96	43,62 ± 6,32
Αρσενικά σε εμπλουτισμένο περιβάλλον	1365,93 ± 142,4	569,6 ± 75,48	45,1 ± 4,79
Θηλυκά μάρτυρες	1308,72 ± 159,9	559,22 ± 79,33	48,77 ± 7,42
Θηλυκά σε εμπλουτισμένο περιβάλλον	1458,16 ± 182,29	678,43 ± 96,12	51,57 ± 6,59

Πίνακας 4: Η διανυόμενη απόσταση, οι οριζόντιες και κάθετες μετρήσεις των επίμυων που θυσιάστηκαν κατά την 90^η ημέρα της ζωής.

3.2 Δοκιμασία αναγνώρισης αντικειμένου (Object Recognition Test)

Η ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις (φύλο και περιβάλλον) έδειξε αλληλεπίδραση του φύλου και του περιβάλλοντος στο συνολικό χρόνο εξερεύνησης των αντικειμένων κατά την πρώτη συνεδρία της δοκιμασίας (training phase) [$F(1,24) = 9.467, p = 0.0052$]. Περαιτέρω ανάλυση κατά μία διεύθυνση (φύλο και περιβάλλον ξεχωριστά) έδειξε ότι τα αρσενικά πειραματόζωα που διαβίωναν σε εμπλουτισμένο περιβάλλον, ασχολήθηκαν περισσότερο χρόνο ενεργά με τα δύο αντικείμενα του κλωβού σε σύγκριση με τα αρσενικά πειραματόζωα μάρτυρες και σε σύγκριση επίσης με τα θηλυκά που διαβίωναν σε συνθήκες εμπλουτισμένου περιβάλλοντος (Γράφημα 2^A).

Η ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις (φύλο και περιβάλλον) έδειξε επίδραση του περιβάλλοντος στη δεύτερη συνεδρία της δοκιμασίας αναγνώρισης νέου αντικειμένου (testing phase). Οι αρσενικοί και θηλυκοί επίμυες που διαβίωναν σε εμπλουτισμένο περιβάλλον από τη γέννησή τους ασχολήθηκαν περισσότερο χρόνο ενεργά με το νέο αντικείμενο, σε σύγκριση με τα πειραματόζωα μάρτυρες [$F(1,24) = 9.110, p = 0.0059$]. Η ενασχόληση αυτή ήταν ανεξάρτητη του φύλου, όπως αυτή εκφράζεται από την ανάλυση του δείκτη προτίμησης (Γράφημα 2^B).



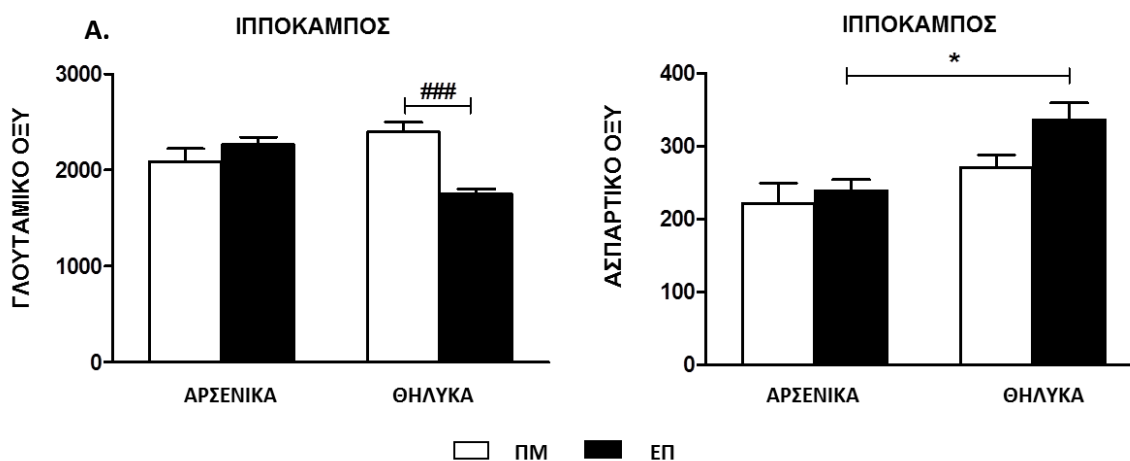
Γράφημα 2: Α) Συνολικός χρόνος εξερεύνησης των αντικειμένων κατά την πρώτη συνεδρία της δοκιμασίας οπτικής αναγνώρισης αντικειμένου και Β) Δείκτης προτίμησης κατά τη δεύτερη συνεδρία της δοκιμασίας οπτικής αναγνώρισης αντικειμένου σε αρσενικούς και θηλυκούς επίμυες Α: Παλιό αντικείμενο, Β: Νέο αντικείμενο. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει τη διαφορά μεταξύ των δύο φύλων στα αντίστοιχα επίπεδα ενδιαφέροντος, ενώ η δίεση (#) υποδηλώνει τη διαφορά μεταξύ των συνθηκών διαβίωσης των πειραματοζώων στα αντίστοιχα επίπεδα ενδιαφέροντος (# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, * $p < 0.05$, σε two-way ANOVA).

3.3 Νευροχημικοί προσδιορισμοί

3.3.1 Γλουταματεργική δραστηριότητα στον ιππόκαμπο

Η ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις (φύλο και περιβάλλον) έδειξε αλληλεπίδραση φύλου και περιβάλλοντος στα βασικά επίπεδα γλουταμικού οξέος στον ιππόκαμπο [$F(1,23) = 17.00, p = 0.0004$]. Περαιτέρω ανάλυση κατά μία διεύθυνση (φύλο και περιβάλλον ξεχωριστά) έδειξε επίδραση του περιβάλλοντος στα επίπεδα γλουταμικού στον ιππόκαμπο. Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα του γλουταμικού ήταν υψηλότερα στον ιππόκαμπο των θηλυκών πειραματοζώων που διαβίωναν σε τυπικούς εργαστηριακούς κλωβούς, σε σύγκριση με εκείνα των θηλυκών πειραματοζώων που διαβίωναν σε εμπλουτισμένο περιβάλλον (Γράφημα 3^A).

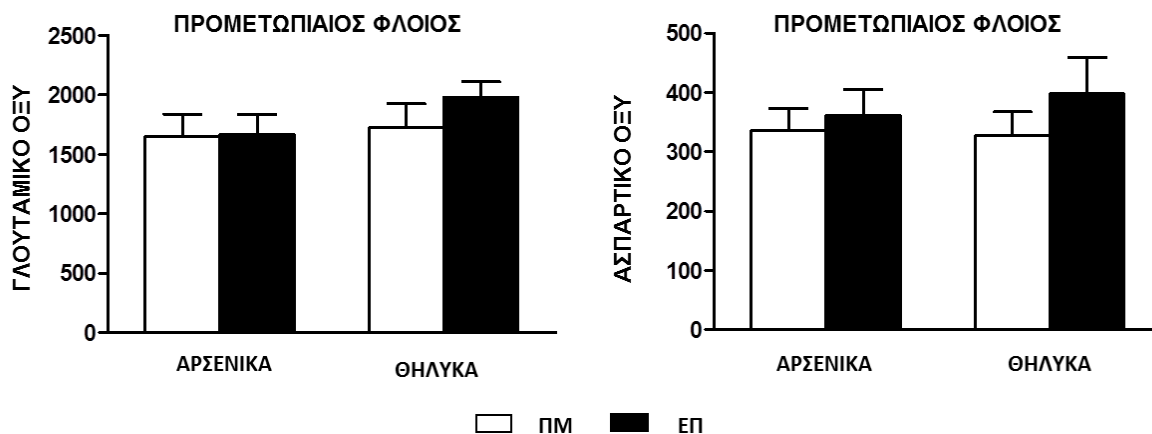
Η ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις (φύλο και περιβάλλον) έδειξε επίδραση του φύλου στα επίπεδα ασπαρτικού οξέος στον ιππόκαμπο [$F(1,23) = 11.05, p = 0.0030$] των πειραματοζώων που θυσιάστηκαν την 90^η ημέρα της ζωής. Τα επίπεδα του ασπαρτικού ήταν αυξημένα στα θηλυκά πειραματόζωα που διαβίωναν σε εμπλουτισμένο περιβάλλον σε σύγκριση με τα αρσενικά που διαβίωναν στο ίδιο περιβάλλον (Γράφημα 3^B).



Γράφημα 3: Α) Τα επίπεδα του Γλουταμικού οξέος και Β) τα επίπεδα του Ασπαρτικού οξέος στον ιππόκαμπο αρσενικών και θηλυκών επίμυων. ΠΜ: Πειραματόζωα Μάρτυρες, ΕΠ: Πειραματόζωα που διαβίωναν σε Εμπλουτισμένο Περιβάλλον. ### $p < 0.001$ σε two-way ANOVA, επίδραση του περιβάλλοντος, * $p < 0.05$ σε two-way ANOVA, επίδραση του φύλου.

3.3.2 Γλουταματεργική δραστηριότητα στον προμετωπιαίο φλοιό

Η ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις (φύλο και περιβάλλον) δεν έδειξε επίδραση του περιβάλλοντος, του φύλου ή αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων στα επίπεδα του γλουταμικού και ασπαρτικού οξέος στον προμετωπιαίο φλοιό των πειραματοζώων (Γράφημα 4^A, 4^B).



Γράφημα 4: Α) Τα επίπεδα του Γλουταμικού οξέος και Β) τα επίπεδα του Ασπαρτικού οξέος στον προμετωπιαίο φλοιό αρσενικών και θηλυκών επίμυων. ΠΜ: Πειραματόζωα Μάρτυρες, ΕΠ: Πειραματόζωα που διαβίωναν σε Εμπλουτισμένο Περιβάλλον.

3.4 Μοριακοί προσδιορισμοί

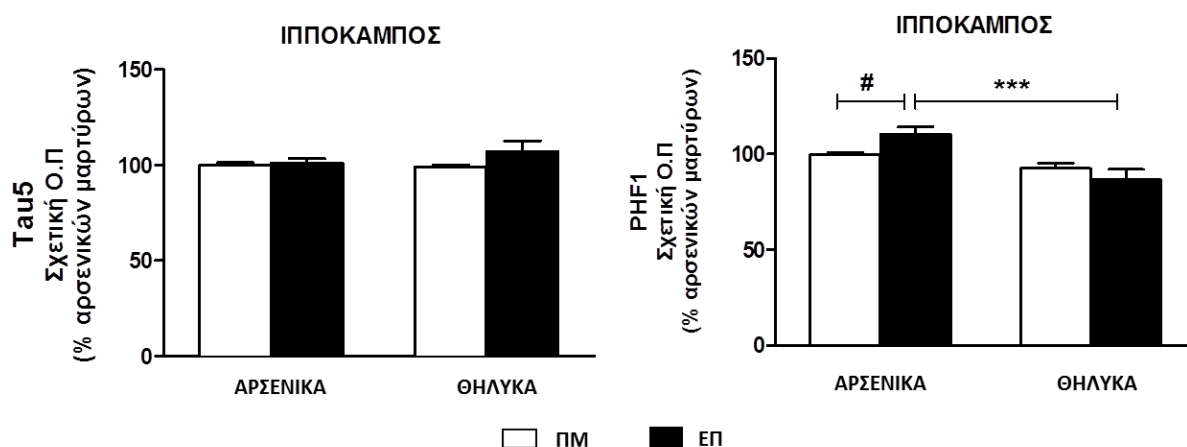
3.4.1 Ιππόκαμπος

3.4.1.1 Μοριακός προσδιορισμός κυτταροσκελετικών και συναπτικών πρωτεϊνών.

Με δεδομένο ότι η λειτουργία της πρωτεΐνης Tau είναι σημαντική για τις κυτταροσκελετικές μεταβολές αλλά και τη δομή των συνάψεων, η μοριακή ανάλυση ξεκίνησε με την *πρωτεΐνη Tau*. Η ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις (φύλο και περιβάλλον) δεν έδειξε επίδραση του περιβάλλοντος, του φύλου ή αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων στα συνολικά επίπεδα της Tau πρωτεΐνης (αναγνωρισμένα από το αντίσωμα Tau5) στον ιππόκαμπο των πειραματοζώων που θυσιάστηκαν κατά την ενήλικη ζωή (Γράφημα 5^A).

Στη συνέχεια, μελετήσαμε τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης μορφής της Tau στο επίτοπο 396/404 (μορφή που αναγνωρίζεται από το αντίσωμα PHF1). Η ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις (φύλο και περιβάλλον) έδειξε αλληλεπίδραση φύλου και περιβάλλοντος στα επίπεδα της *φωσφορυλιωμένης Tau πρωτεΐνης (PHF1)* [$F(1,23) = 5.039, p = 0.0347$] στον ιππόκαμπο των πειραματοζώων που θυσιάστηκαν κατά την ενήλικη ζωή. Η ανάλυση

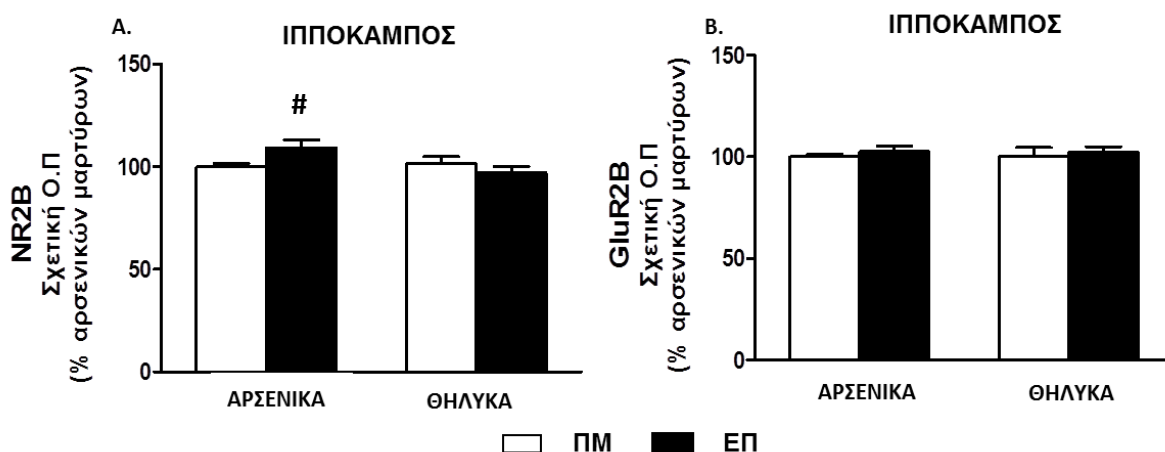
μεταβλητότητας κατά μία διεύθυνση (φύλο και περιβάλλον ξεχωριστά) έδειξε επίδραση του φύλου στα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης Ταυ πρωτεΐνης (PHF1) στον ιππόκαμπο των πειραματοζώων που θυσιάστηκαν κατά την ενήλικη ζωή. Τα επίπεδα της PHF1 εμφανίζονταν αυξημένα στα αρσενικά πειραματόζωα που διαβίωναν σε εμπλουτισμένο περιβάλλον σε σύγκριση με τα θηλυκά πειραματόζωα του ίδιου περιβάλλοντος (Γράφημα 5^B).



Γράφημα 5: Α) Τα επίπεδα της Tau5 και Β) της PHF1 στον ιππόκαμπο αρσενικών και θηλυκών επίμυων. ΠΜ: Πειραματόζωα Μάρτυρες, ΕΠ: Πειραματόζωα που διαβίωναν σε Εμπλουτισμένο Περιβάλλον, Ο.Π: Οπτική Πυκνότητα. *** $p < 0.001$, # $p < 0.05$ σε two-way ANOVA, αλληλεπίδραση φύλου-περιβάλλοντος.

Στη συνέχεια ελέγξαμε τα επίπεδα των *συναπτικών υποδοχέων* ξεκινώντας από την ανάλυση της υπομονάδας 2B του υποδοχέα NMDA (*NR2B*). Η ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις (φύλο και περιβάλλον) έδειξε αλληλεπίδραση φύλου και περιβάλλοντος στα επίπεδα του NR2B [$F(1,24) = 4.675$, $p = 0.0408$] στον ιππόκαμπο αρσενικών και θηλυκών επίμυων που θυσιάστηκαν κατά την 90^η ημέρα της ζωής, καθώς τα αρσενικά πειραματόζωα επηρεάζονταν περισσότερο από το εμπλουτισμένο περιβάλλον (Γράφημα 6^A).

Η ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις (φύλο και περιβάλλον) δεν έδειξε επίδραση του περιβάλλοντος, του φύλου ή αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων στα επίπεδα του GluR2B στον ιππόκαμπο των πειραματοζώων που θυσιάστηκαν κατά την ενήλικη ζωή (Γράφημα 6^B).



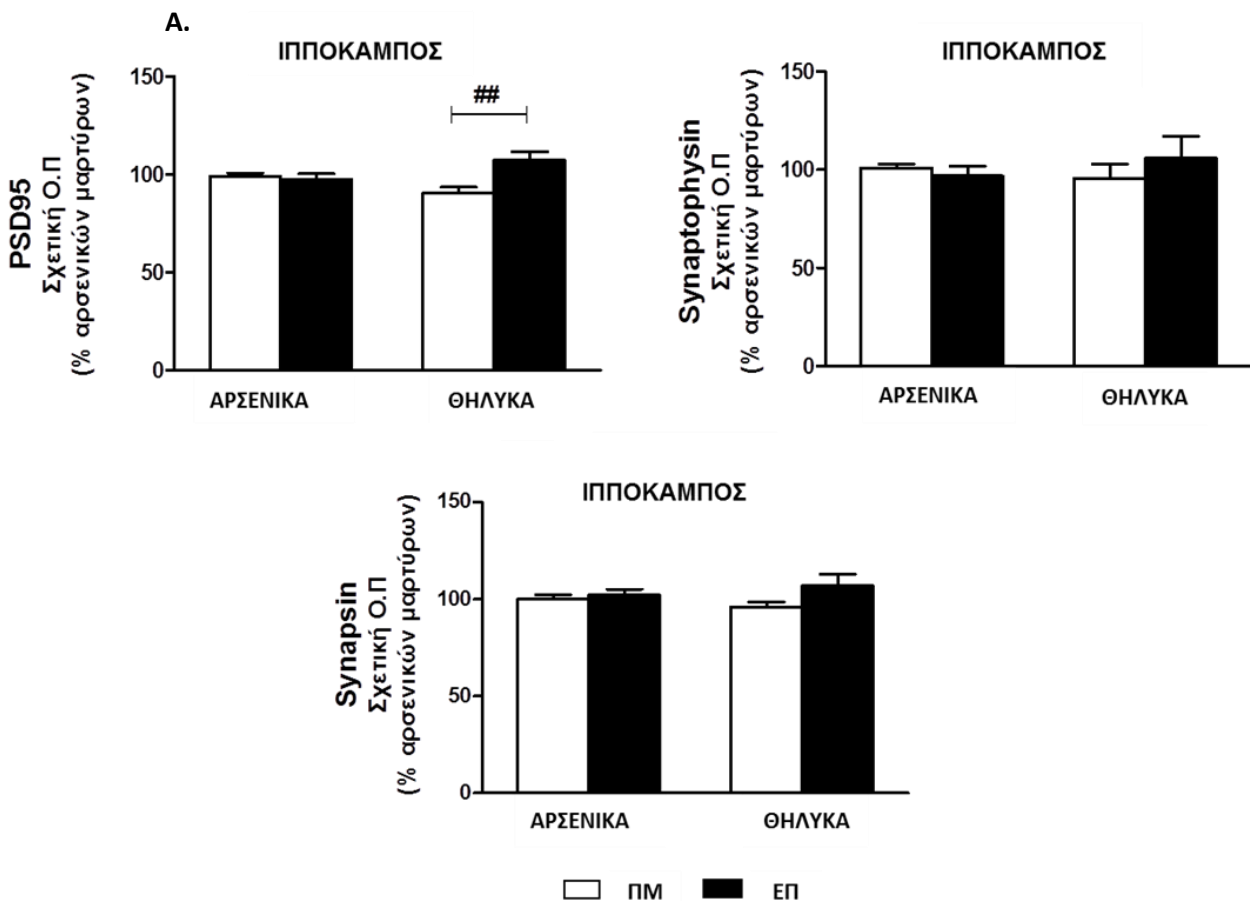
Γράφημα 6: Α) Τα επίπεδα της υπομονάδας 2B του NMDA υποδοχέα (NR2B) και Β) τα επίπεδα της υπομονάδας 2B του γλουταμικού υποδοχέα, GluR2B στον ιππόκαμπο αρσενικών και θηλυκών επίμυων. ΠΜ: Πειραματόζωα Μάρτυρες, ΕΠ: Πειραματόζωα που διαβίωναν σε Εμπλουτισμένο Περιβάλλον, Ο.Π: Οπτική Πυκνότητα.

Έπειτα, συνεχίσαμε με την μοριακή ανάλυση της μετασυναπτικής πρωτεΐνης PSD95, για το λόγο ότι είναι απαραίτητη για τη συγκρότηση και αγκυροβόληση των NMDA υποδοχέων, καθώς επίσης και άλλων πρωτεϊνών στις συνάψεις (Funke, Dakoji et al. 2005; Elias, Elias et al. 2008). Η ανάλυση μεταβλητότητας λοιπόν κατά δύο διευθύνσεις (φύλο και περιβάλλον) έδειξε αλληλεπίδραση φύλου και περιβάλλοντος στα επίπεδα της μετασυναπτικής πρωτεΐνης PSD95 [$F(1,24) = 9.028, p = 0.0061$] στον ιππόκαμπο αρσενικών και θηλυκών επίμυων που θυσιάστηκαν κατά την 90^η ημέρα της ζωής. Η ανάλυση μεταβλητότητας κατά μία διεύθυνση (φύλο και περιβάλλον ξεχωριστά) έδειξε ότι τα επίπεδα της PSD95 ήταν αυξημένα στον ιππόκαμπο των θηλυκών πειραματοζώων που διαβίωναν σε εμπλουτισμένο περιβάλλον σε σύγκριση με τα θηλυκά που διαβίωναν σε τυπικούς εργαστηριακούς κλωβούς (Γράφημα 7^Α).

Η επόμενη ανάλυση που ακολουθήθηκε ήταν της προσυναπτικής πρωτεΐνης συναπτοφυσίνης (*synaptophysin*), λόγω της εμπλοκής της στην πλαστικότητα των συνάψεων. Σύμφωνα με την ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις (φύλο και περιβάλλον) δεν παρατηρήθηκε επίδραση του περιβάλλοντος, του φύλου ή αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων στα επίπεδα

της συναπτοφυσίνης στον ιππόκαμπο των επίμυων που θυσιάστηκαν κατά την 90^η ημέρα της ζωής (Γράφημα 7^B).

Επίσης, η μελέτη συνεχίστηκε με τον προσδιορισμό των επιπέδων της *συναψίνης* (*synapsin*), η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στη νευροδιαβίβαση καθώς ρυθμίζει την απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών στις συνάψεις. Η ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις (φύλο και περιβάλλον) δεν έδειξε επίδραση του περιβάλλοντος, του φύλου ή αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων στα επίπεδα της συναψίνης στον ιππόκαμπο των επίμυων που θυσιάστηκαν κατά την 90^η ημέρα της ζωής (Γράφημα 7^Γ).



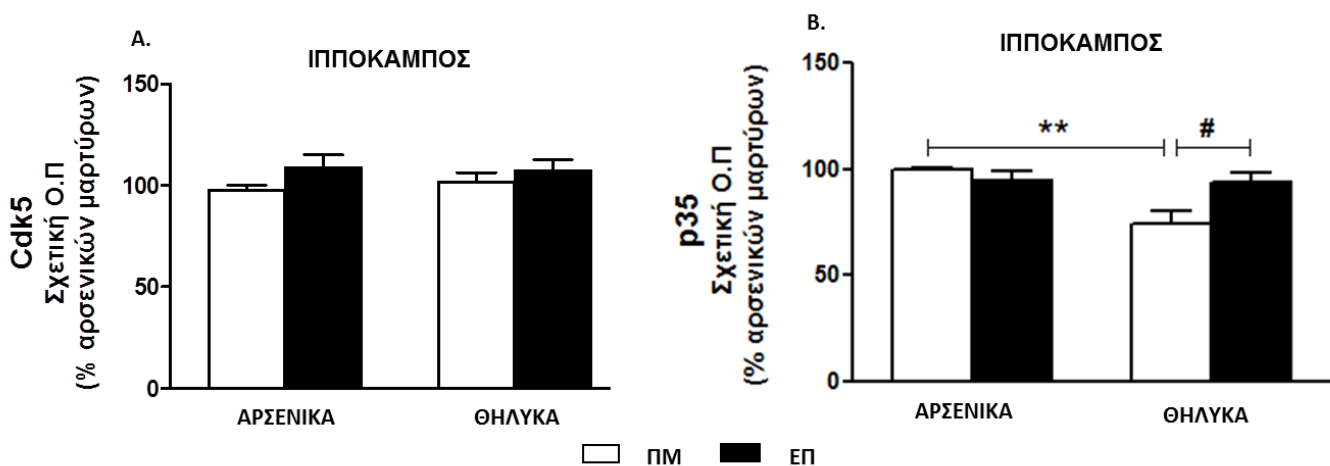
Γράφημα 7: Α) Τα επίπεδα της μετασυναπτικής πρωτεΐνης PSD95, Β) τα επίπεδα της προσυναπτικής πρωτεΐνης Συναπτοφυσίνης και Γ) τα επίπεδα της πρωτεΐνης Συναψίνης στον ιππόκαμπο αρσενικών και θηλυκών επίμυων. ΠΜ: Πειραματόζωα Μάρτυρες, ΕΠ: Πειραματόζωα που διαβίωναν σε Εμπλουτισμένο Περιβάλλον, Ο.Π: Οπτική Πυκνότητα. ## $p < 0.01$ σε one-way ANOVA, επίδραση του περιβάλλοντος.

3.4.1.2 Μοριακός προσδιορισμός συναπτικών κινασών (synaptic kinases): Cdk5 και p35.

Η επιλογή μελέτης της πρωτεΐνης Cdk5 έγινε με βάση το γεγονός ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, καθώς επίσης εμπλέκεται στη συναπτική πλαστικότητα, τη μνήμη και τη μάθηση. Για το λόγο ότι η ενεργοποίηση της Cdk5 απαιτεί την παρουσία του ρυθμιστικού ενεργοποιητή p35, η μελέτη μας επεκτάθηκε και στην ανάλυση της πρωτεΐνης p35.

Η ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις (φύλο και περιβάλλον) δεν έδειξε επίδραση του περιβάλλοντος, του φύλου ή αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων στα επίπεδα του ενεργοποιητή κινασών (activator of kinase) Cdk5 στον ιππόκαμπο των επίμυων που θυσιάστηκαν κατά την 90^η ημέρα της ζωής (Γράφημα 8^A).

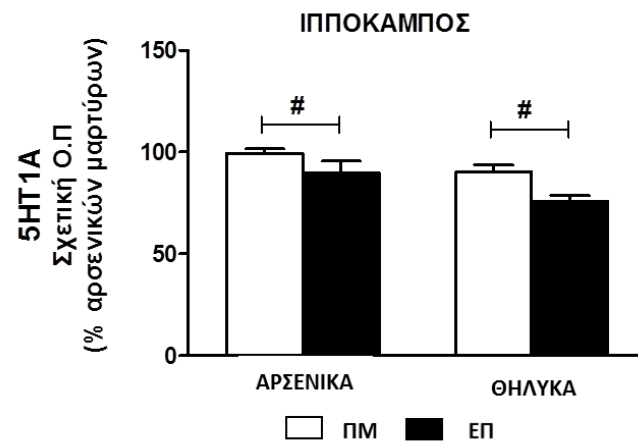
Η ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις (φύλο και περιβάλλον) έδειξε αλληλεπίδραση φύλου και περιβάλλοντος στα επίπεδα του ενεργοποιητή του Cdk5, p35, στον ιππόκαμπο αρσενικών και θηλυκών επίμυων που θυσιάστηκαν κατά την 90^η ημέρα της ζωής [$F(1,24)= 7.700$, $p=0.0105$]. Η ανάλυση μεταβλητότητας κατά μία διεύθυνση (φύλο και περιβάλλον ξεχωριστά) έδειξε επίδραση του φύλου στα επίπεδα του p35 στον ιππόκαμπο αρσενικών και θηλυκών επίμυων. Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα του p35 ήταν υψηλότερα στον ιππόκαμπο των αρσενικών πειραματοζώων που διαβίωναν σε τυπικούς εργαστηριακούς κλωβούς σε σύγκριση με τα θηλυκά πειραματόζωα που διαβίωναν στις ίδιες συνθήκες [$F(1,24)= 8.654$, $p=0.0071$]. Παρατηρήθηκε επίσης αύξηση των επιπέδων του p35 στον ιππόκαμπο των θηλυκών επίμυων που διαβίωναν σε εμπλουτισμένο περιβάλλον σε σύγκριση με τα θηλυκά που διαβίωναν σε τυπικούς εργαστηριακούς κλωβούς (Γράφημα 8^B).



Γράφημα 8: Α) Τα επίπεδα της Cdk5 και Β) τα επίπεδα του ενεργοποιητή της Cdk5, p35, στον ιππόκαμπο αρσενικών και θηλυκών επίμυων. ΠΜ: Πειραματόζωα Μάρτυρες, ΕΠ: Πειραματόζωα που διαβίωναν σε Εμπλουτισμένο Περιβάλλον, Ο.Π.: Οπτική Πυκνότητα. ** $p < 0.01$, σε one-way ANOVA, επίδραση του φύλου. # $p < 0.05$, σε one-way ANOVA, επίδραση του περιβάλλοντος.

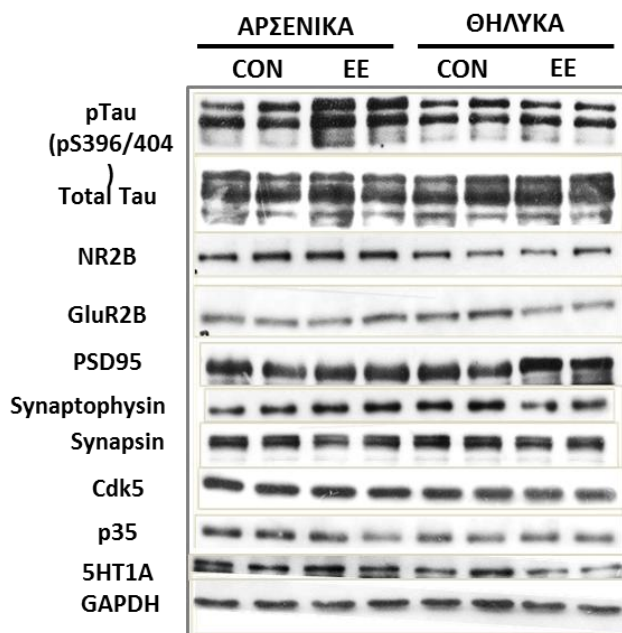
Είναι γνωστό ότι οι σεροτονινεργικοί υποδοχείς (5-HT receptors) εκφράζονται σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου, ρυθμίζουν την ανάπτυξη του εγκεφάλου, τη συναπτική διαβίβαση και την πλαστικότητα και για το λόγο αυτό εμπλέκονται σε διάφορες εγκεφαλικές λειτουργίες, όπως είναι η μνήμη και η μάθηση. Η μελέτη μας συνεχίστηκε για το λόγο αυτό με την ανάλυση του σεροτονινεργικού υποδοχέα 1A (*5HT1A*), για τον οποίο η ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις (φύλο και περιβάλλον) έδειξε ότι δεν υπήρχε αλληλεπίδραση φύλου και περιβάλλοντος στα επίπεδά του [$F(1,24) = 0.3714$, $p = 0.5480$] στον ιππόκαμπο αρσενικών και θηλυκών επίμυων. Η ανάλυση μεταβλητότητας κατά μία διεύθυνση (φύλο και περιβάλλον ξεχωριστά) έδειξε επίδραση του φύλου και του περιβάλλοντος στα επίπεδα 5HT1A στον ιππόκαμπο αρσενικών και θηλυκών επίμυων που θυσιάστηκαν κατά την ενήλικη ζωή. Τα θηλυκά που διαβίωναν σε εμπλουτισμένο περιβάλλον είχαν χαμηλότερα επίπεδα 5HT1A στον ιππόκαμπο σε σύγκριση με τα αρσενικά του ίδιου περιβάλλοντος [$F(1,24) = 9.071$, $p = 0.0060$], καθώς επίσης παρατηρήθηκε ότι γενικά τα πειραματόζωα που διαβίωναν σε εμπλουτισμένο περιβάλλον είχαν χαμηλότερα επίπεδα 5HT1A σε σύγκριση με αυτά που

διαβίωναν σε τυπικούς εργαστηριακούς κλωβούς [$F(1,24) = 9.612, p = 0.0049$] (Γράφημα 9).



Γράφημα 9: Τα επίπεδα της υπομονάδας 1A του σεροτονινεργικού υποδοχέα (5HT1A) στον ιππόκαμπο αρσενικών και θηλυκών επίμυων. ΠΜ: Πειραματόζωα Μάρτυρες, ΕΠ: Πειραματόζωα που διαβίωναν σε Εμπλουτισμένο Περιβάλλον, Ο.Π: Οπτική Πυκνότητα. # $p < 0.05$, σε one-way ANOVA, επίδραση του περιβάλλοντος.

Όλα τα αποτελέσματα της μοριακής ανάλυσης των *συναπτικών πρωτεϊνών* στον *ιππόκαμπο* παραθέτονται σχηματικά παρακάτω (Εικόνα 29), σύμφωνα με τις πρωτεϊνικές ζώνες που αποκομίσαμε μέσω της τεχνικής ανοσοαποτύπωσης Western (Western Blot).

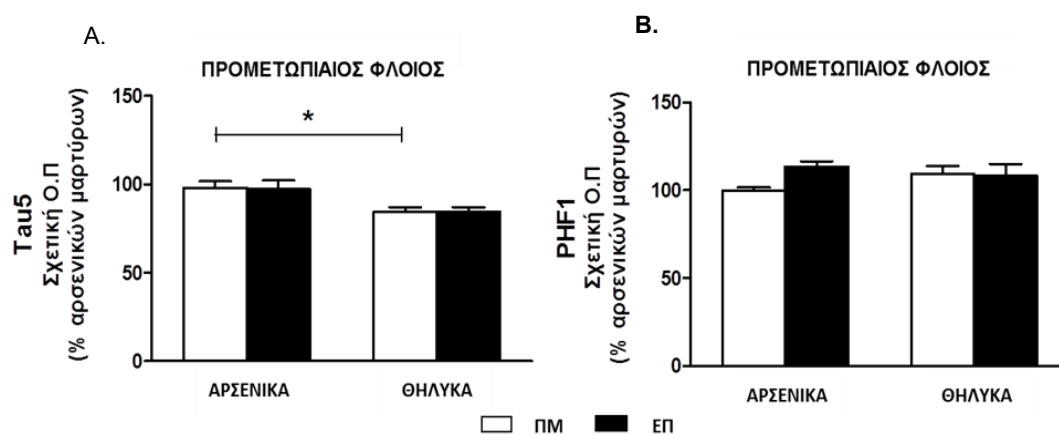


Εικόνα 29. Πρωτεϊνικές ζώνες των συναπτικών πρωτεϊνών που μελετήθηκαν στον ιππόκαμπο μέσω της τεχνικής Western Blot.

3.4.2 Προμετωπιαίος Φλοιός

Η ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις (φύλο και περιβάλλον) έδειξε επίδραση του φύλου στα επίπεδα της Tau5 στον προμετωπιαίο φλοιό αρσενικών και θηλυκών επίμυων [$F(1,24) = 14.96, p = 0.0007$]. Τα επίπεδα της Tau5 αυξάνονταν στα αρσενικά πειραματόζωα που διαβίωναν σε τυπικούς εργαστηριακούς κλωβούς σε σύγκριση με τα θηλυκά του ίδιου περιβάλλοντος (Γράφημα 10^A).

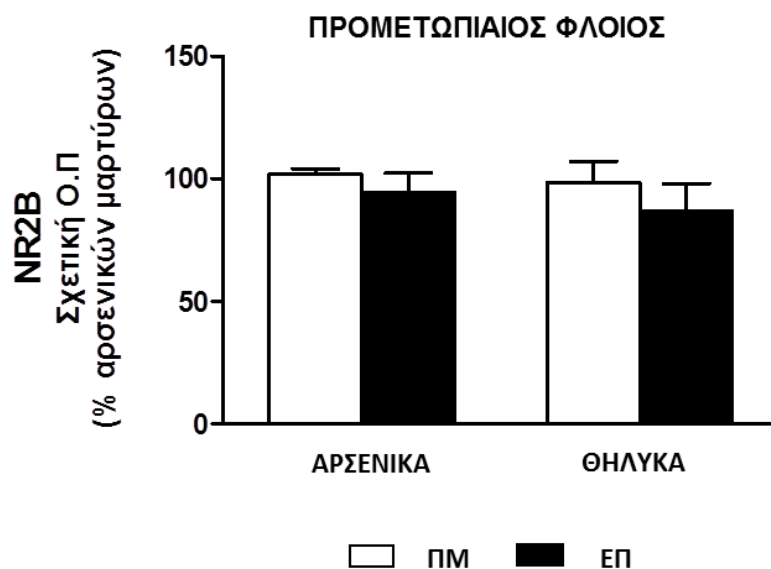
Η ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις (φύλο και περιβάλλον) δεν έδειξε επίδραση του περιβάλλοντος, του φύλου ή αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων στα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης Tau πρωτεΐνης, PHF1, στον προμετωπιαίο φλοιό των επίμυων που θυσιάστηκαν κατά την 90^η ημέρα της ζωής (Γράφημα 10^B).



Γράφημα 10: Α) Τα επίπεδα της Tau5 και Β) τα επίπεδα της PHF1 στον προμετωπιαίο φλοιό αρσενικών και θηλυκών επίμυων στον προμετωπιαίο φλοιό αρσενικών και θηλυκών επίμυων ΠΜ: Πειραματόζωα Μάρτυρες, ΕΠ: Πειραματόζωα που διαβίωναν σε Εμπλουτισμένο Περιβάλλον, Ο.Π: Οπτική Πυκνότητα. * $p < 0.05$, σε two-way ANOVA, επίδραση του φύλου.

3.4.2.1 Μοριακός προσδιορισμός του συναπτικού υποδοχέα NR2B.

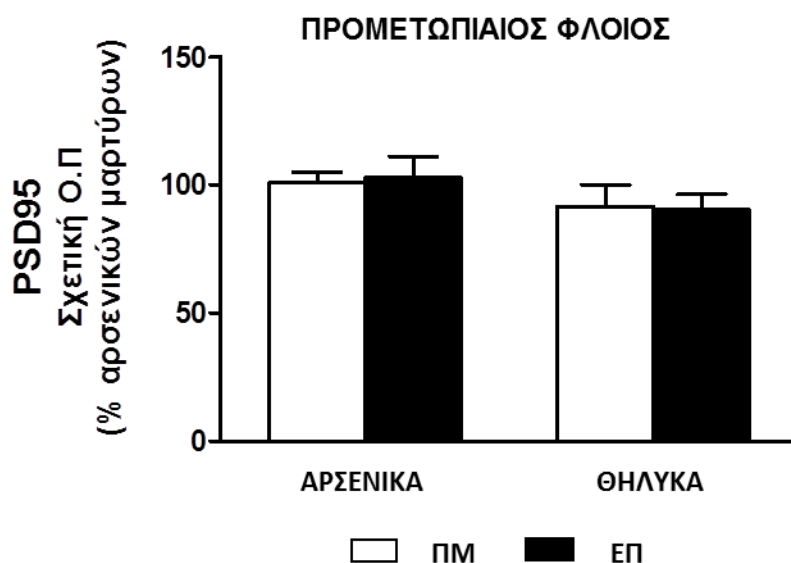
Η ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις (φύλο και περιβάλλον) δεν έδειξε επίδραση του περιβάλλοντος, του φύλου ή αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων στα επίπεδα της υπομονάδας 2B του NMDA υποδοχέα στον προμετωπιαίο φλοιό των επίμυων που θυσιάστηκαν κατά την 90^η ημέρα της ζωής (Γράφημα 11).



Γράφημα 11: Τα επίπεδα του NR2B στον προμετωπιαίο φλοιό αρσενικών και θηλυκών επίμυων. ΠΜ: Πειραματόζωα Μάρτυρες, ΕΠ: Πειραματόζωα που διαβίωναν σε Εμπλουτισμένο Περιβάλλον, Ο.Π: Οπτική Πυκνότητα.

3.4.2.2 Μοριακός προσδιορισμός της μετασυναπτικής πρωτεΐνης PSD95.

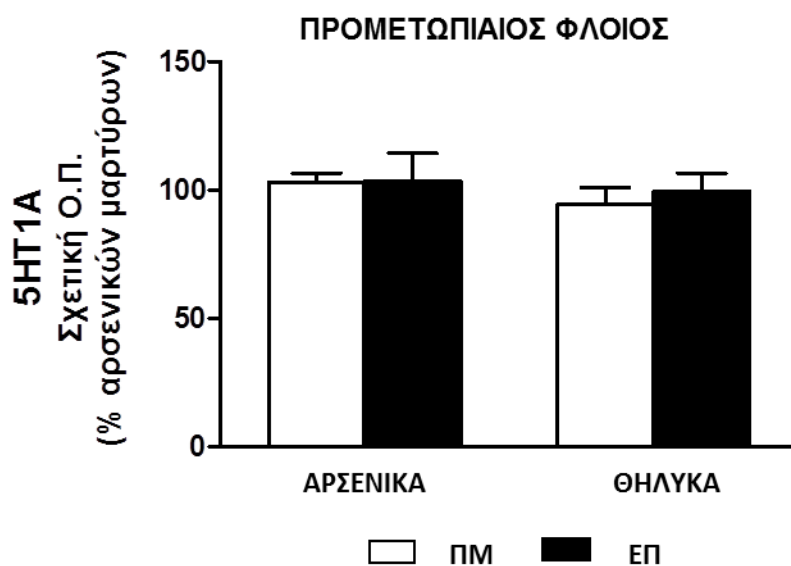
Η ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις (φύλο και περιβάλλον) δεν έδειξε επίδραση του περιβάλλοντος, του φύλου ή αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων στα επίπεδα της μετασυναπτικής PSD95 πρωτεΐνης στον προμετωπιαίο φλοιό των επίμυων που θυσιάστηκαν κατά την 90^η ημέρα της ζωής (Γράφημα 12).



Γράφημα 12: Τα επίπεδα της μετασυναπτικής πρωτεΐνης PSD95 στον προμετωπιαίο φλοιό αρσενικών και θηλυκών επίμυων. ΠΜ: Πειραματόζωα Μάρτυρες, ΕΠ: Πειραματόζωα που διαβίωναν σε Εμπλουτισμένο Περιβάλλον, Ο.Π: Οπτική Πυκνότητα.

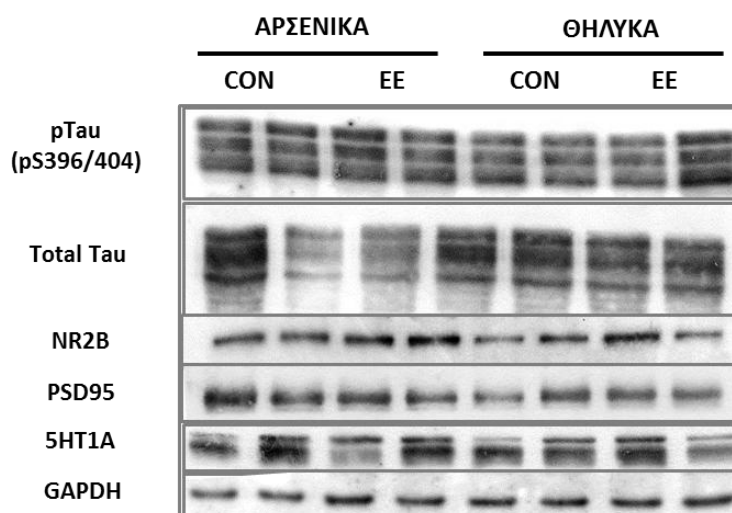
3.4.2.3 Μοριακός προσδιορισμός της υπομονάδας 1A του υποδοχέα της σεροτονίνης: 5HT1A.

Η ανάλυση μεταβλητότητας κατά δύο διευθύνσεις (φύλο και περιβάλλον) δεν έδειξε επίδραση του περιβάλλοντος, του φύλου ή αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων στα επίπεδα του σεροτονινεργικού υποδοχέα 1A (5HT1A) στον προμετωπιαίο φλοιό των επίμυων που θυσιάστηκαν κατά την 90^η ημέρα της ζωής (Γράφημα 13).



Γράφημα 13: Τα επίπεδα του σεροτονινεργικού υποδοχέα 1A (5HT1A) στον προμετωπιαίο φλοιό αρσενικών και θηλυκών επίμυων. ΠΜ: Πειραματόζωα Μάρτυρες, ΕΠ: Πειραματόζωα που διαβίωναν σε Εμπλουτισμένο Περιβάλλον, Ο.Π: Οπτική Πυκνότητα.

Όλα τα αποτελέσματα της μοριακής ανάλυσης των *συναπτικών πρωτεϊνών* στον προμετωπιαίο φλοιό παραθέτονται σχηματικά παρακάτω (Εικόνα 30), σύμφωνα με τις πρωτεϊνικές ζώνες που αποκομίσαμε μέσω της τεχνικής ανοσοαποτύπωσης Western (Western Blot).



4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση του περιβάλλοντος στο γλουταματεργικό σύστημα σε αρσενικούς και θηλυκούς επίμυες από την ημέρα της γέννησης μέχρι και την 90^η ημέρα της ζωής τους (P0-P90). Επιλέχθηκε να μελετηθούν οι εγκεφαλικές περιοχές του ιπποκάμπου και του προμετωπιαίου φλοιού που σχετίζονται με τη μνήμη και τη μάθηση καθώς επίσης και με το γνωσιακό έλεγχο των λειτουργιών που είναι απαραίτητες για το σωστό προγραμματισμό της συμπεριφοράς.

4.1 Συμπεριφορά ανοιχτού πεδίου (Open Field Test)

Η δοκιμασία ανοιχτού πεδίου χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της κινητικότητας και της εξερευνητικότητας (Antoniou, Galanopoulos et al. 2005), ενώ παράλληλα χρησιμοποιείται και για την εκτίμηση της αγχώδους συμπεριφοράς των πειραματοζώων. Πιο συγκεκριμένα, επίμυες και μύες τείνουν να αποφεύγουν έντονα φωτισμένους, καινούργιους, ανοιχτούς χώρους, οπότε το περιβάλλον της δοκιμασίας ανοιχτού πεδίου λειτουργεί ως στρεσογόνο ερέθισμα και επιτρέπει την εκτίμηση της προκαλούμενης από άγχος κινητικής δραστηριότητας και τη συμπεριφορά εξερεύνησης. Τα πειραματόζωα που εμφανίζουν αυξημένη κινητικότητα και αυξημένο χρόνο παραμονής στο κέντρο του κλωβού της πειραματικής διάταξης του ανοιχτού πεδίου, ο οποίος αποτελεί γι' αυτά ένα νέο περιβάλλον, θεωρούνται ως λιγότερο αγχωμένα, σε σύγκριση με αυτά που παρουσιάζουν αντίθετη συμπεριφορά (Walsh and Cummins 1976).

Στη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου, κατά τη βιβλιογραφία, υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που ποικίλλουν κατά τη διεξαγωγή των εκάστοτε πειραμάτων. Οι παράγοντες αυτοί περιλαμβάνουν για παράδειγμα το γεγονός ότι ο πειραματικός κλωβός μπορεί να διαφέρει στα διάφορα πειραματικά πρωτόκολλα, ως προς το μέγεθος, το σχήμα ή ακόμα και το χρώμα του. Επίσης η δοκιμασία μπορεί να εκτελεστεί σε μία συνεδρία ή και σε επαναλαμβανόμενες.

Σημαντικός επίσης είναι και ο χρόνος διεξαγωγής της κάθε δοκιμασίας, ο οποίος μπορεί να κυμαίνεται από 5 έως και 10 λεπτά (Fukushiro, Calzavara et al. 2007).

Στην συγκεκριμένη εργασία, η δοκιμασία ανοιχτού πεδίου διεξήχθη για χρονικό διάστημα 5 λεπτών σε πειραματόζωα που γεννήθηκαν και διαβίωσαν σε εμπλουτισμένο περιβάλλον μέχρι την ενήλικη ζωή. Στη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ των πειραματοζώων που διαβίωναν σε εμπλουτισμένο περιβάλλον σε σύγκριση με τα πειραματόζωα που διαβίωναν σε τυπικούς εργαστηριακούς κλωβούς. Πιο συγκεκριμένα, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων στις οριζόντιες και κάθετες μετρήσεις, στον αριθμό εισόδων στο κέντρο του κλωβού καθώς επίσης και στο χρόνο παραμονής στο κέντρο αυτού, ανεξαρτήτως του περιβάλλοντος διαβίωσης. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται να επιβεβαιώσουν παλαιότερες μελέτες που δείχνουν ότι οι παράγοντες κινητικότητας των πειραματοζώων που μελετήθηκαν δεν επηρεάζονται από το περιβάλλον διαβίωσης (Dhanushkodi, Bindu et al. 2007; Zhu, Codita et al. 2009). Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί σε άλλες μελέτες ότι στη συμπεριφορά ανοιχτού πεδίου υπάρχουν διαφορές μεταξύ πειραματοζώων που διαβιώνουν σε ένα εμπλουτισμένο περιβάλλον σε σύγκριση με εκείνα που διαβιώνουν σε τυπικούς εργαστηριακούς κλωβούς. Πιο συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι επίμυες που διαβιώνουν σε εμπλουτισμένο περιβάλλον μπορεί να εμφανίσουν αυξημένες επιδόσεις στη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου σε σύγκριση με τα πειραματόζωα μάρτυρες (Holson 1986), ενώ άλλες μελέτες έχουν αντιθέτως καταδείξει ότι τα πειραματόζωα που διαβιώνουν σε εμπλουτισμένο περιβάλλον παρουσιάζουν μειωμένη κινητικότητα σε σύγκριση με τα πειραματόζωα μάρτυρες (van Rijzingen, Gispen et al. 1997). Ίσως η μεταβολή των κινητικών δραστηριοτήτων των επίμυων να εξαρτάται από τη χρονική διάρκεια παραμονής σε εμπλουτισμένο περιβάλλον.

Ο παράγοντας φύλο στην παρούσα μελέτη φαίνεται ότι δεν επηρεάζει τα επίπεδα της αγχώδους συμπεριφοράς στους επίμυες που έχουν διαβιώσει σε εμπλουτισμένο περιβάλλον ή σε συνθήκες ελέγχου. Το εύρημα αυτό, έρχεται σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες που αναφέρονται στη βιβλιογραφία και οι

οποίες ισχυρίζονται την υπερίσχυση των θηλυκών επίμυων στην εμφάνιση αγχώδους συμπεριφοράς (Alstott and Timberlake 2009).

Συμπερασματικά στην παρούσα μελέτη φαίνεται ότι η συμπεριφορά ανοιχτού πεδίου φαίνεται να μην επηρεάζεται από το περιβάλλον διαβίωσης (εμπλουτισμένο περιβάλλον ή τυπικός εργαστηριακός κλωβός).

4.2 Δοκιμασία αναγνώρισης αντικειμένου (Object Recognition Test)

Η επίδοση των πειραματοζώων στη δοκιμασία αναγνώρισης αντικειμένου μπορεί να αξιολογηθεί από τις διαφορές στο χρόνο εξερεύνησης ενός νέου αντικειμένου (novel object) σε σχέση με ένα παλαιό οικείο (familiar object).

Στην παρούσα μελέτη τα αρσενικά πειραματόζωα που γεννήθηκαν και διαβίωσαν σε εμπλουτισμένο περιβάλλον μέχρι την ενήλικη ζωή τους, παρουσίασαν αυξημένο ολικό χρόνο εξερεύνησης των αντικειμένων στην πρώτη συνεδρία της δοκιμασίας σε σύγκριση με τα πειραματόζωα μάρτυρες. Αντιθέτως δεν παρατηρήθηκε αύξηση της εξερευνητικότητας στα θηλυκά πειραματόζωα που διαβίωναν σε εμπλουτισμένο περιβάλλον. Κατά τη δεύτερη συνεδρία τόσο οι αρσενικοί όσο και οι θηλυκοί επίμυες που διαβίωναν σε εμπλουτισμένο περιβάλλον έδειξαν μεγαλύτερη προτίμηση για το νέο αντικείμενο. Ο δείκτης προτίμησης του νέου αντικειμένου των αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων που διαβίωναν σε εμπλουτισμένο περιβάλλον ήταν αυξημένος σε σύγκριση με τα πειραματόζωα που διαβίωναν σε τυπικούς εργαστηριακούς κλωβούς. Αν και η προσοχή (όπως αυτή εκτιμάται από τον ολικό χρόνο εξερεύνησης) ήταν αυξημένη στους αρσενικούς επίμυες του εμπλουτισμένου περιβάλλοντος σε σύγκριση με τους θηλυκούς του ίδιου περιβάλλοντος, τα θηλυκά όπως και τα αρσενικά εμφάνισαν αυξημένη ικανότητα στο να αναγνωρίσουν το νέο αντικείμενο και άρα γνωσιακή βελτίωση.

Με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα, η δοκιμασία αναγνώρισης αντικειμένου χρησιμοποιείται εδώ και πολλά χρόνια για τη μελέτη της μη-χωροτακτικής

μνήμης (Ennaceur and Delacour 1988). Η μνήμη μελετάται αξιολογώντας την ικανότητα του πειραματοζώου να αναγνωρίσει ένα αντικείμενο που του έχει παρουσιαστεί σε προηγούμενη συνεδρία. Με αυτόν τον τρόπο η δοκιμασία αναγνώρισης αντικειμένου δίνει πληροφορίες για τη βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη μνήμη αλλά και την επίδραση κάποιου φαρμάκου ή άλλου παράγοντα στη μνημονική διαδικασία. Παράλληλα εκτιμάται η συμπεριφορά εξερεύνησης του πειραματοζώου που σχετίζεται με την προσοχή (Puma, Deschaux et al. 1999). Επίσης, έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την εκτίμηση της μνήμης σε πειραματικά μοντέλα για τη νόσο Alzheimer αλλά και για την επίδραση της ηλικίας στην μνήμη (Burke, Hartzell et al. 2012; Yassine, Lazaris et al. 2013).

Στην παρούσα μελέτη φαίνεται ότι ο εμπλουτισμός του περιβάλλοντος από τη γέννηση αυξάνει τη μνήμη και στα δύο φύλα, ενώ αυξάνει μόνο την προσοχή των αρσενικών πειραματοζώων. Παρόλα αυτά οι θηλυκοί επίμυες που διαβίωναν σε εμπλουτισμένο περιβάλλον, χρειάστηκαν λιγότερο χρόνο ενασχόλησης με τα δύο όμοια αντικείμενα στην πρώτη συνεδρία για να αναγνωρίσουν τη διαφορετικότητα του νέου αντικειμένου στη δεύτερη συνεδρία. Τα αποτελέσματα αυτά μπορεί να σχετίζονται με υπάρχουσες μελέτες που δείχνουν ότι ο εμπλουτισμός του περιβάλλοντος οδηγεί σε ανάκαμψη της μνήμης σε θηλυκά πειραματόζωα που έχουν γεννηθεί με περιγεννητική υποξία (Pereira, Strapasson et al. 2008).

4.3 Νευροχημικός προσδιορισμός γλουταμικού οξέος στον προμετωπιαίο φλοιό και στον ιππόκαμπο.

Το σύστημα του γλουταμικού οξέος βρίσκεται στο επίκεντρο πολλών ερευνών που σχετίζονται με τη μελέτη των αιτιοπαθολογικών αλλά και θεραπευτικών μηχανισμών της κατάθλιψης, και φαίνεται να εμπλέκεται σε πολλές νευρολογικές και ψυχιατρικές διαταραχές (Krystal, Sanacora et al. 2002).

Στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκε ότι στον προμετωπιαίο φλοιό, αρσενικών και θηλυκών επίμυων, που γεννήθηκαν και διαβίωσαν στο εμπλουτισμένο περιβάλλον μέχρι την ενήλικη ζωή, τα επίπεδα του γλουταμικού οξέος δεν επηρεάζονταν από το εμπλουτισμένο περιβάλλον, εν αντιθέσει με τον ιππόκαμπο στον οποίο βρέθηκε ότι το εμπλουτισμένο περιβάλλον μειώνει τα επίπεδα του γλουταμικού οξέος μόνο στα θηλυκά πειραματόζωα. Αυτό δείχνει ένα φύλο-εξαρτώμενο προφίλ στις επιδράσεις του εμπλουτισμένου περιβάλλοντος στην πλαστικότητα και στις γνωσιακές διεργασίες.

Το εμπλουτισμένο περιβάλλον έχει δείξει ότι ενισχύει τη μνήμη καθώς επίσης προστατεύει από την απώλεια αυτής. Διάφοροι ερευνητές μετά από σειρά συμπεριφορικών πειραμάτων έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι πειραματόζωα που διαβιώνουν σε εμπλουτισμένο περιβάλλον εμφανίζουν αυξημένες γνωσιακές ικανότητες σε σύγκριση με εκείνα που διαβιώνουν σε τυπικούς εργαστηριακούς κλωβούς (Mohammed, Zhu et al. 2002), ίσως λόγω αυξημένης γλουταματεργικής δραστηριότητας στον ιππόκαμπο (Frick, Stearns et al. 2003).

Η εμπλοκή του γλουταμικού οξέος με τη μνήμη και τη μάθηση συνδέεται κυρίως με την ικανότητα των NMDA υποδοχέων να επάγουν μακρόχρονη συναπτική ενδυνάμωση (Long Term Potentiation). Πολλές μελέτες έχουν συνδέσει τους NMDA υποδοχείς με τους περισσότερους τύπους μακρόχρονης συναπτικής ενδυνάμωσης που παράγονται στον ιππόκαμπο (Lynch, Clements et al. 1988). Αν και ο υποδοχέας NMDA διαδραματίζει βασικό ρόλο στην επαγωγή της μακρόχρονης συναπτικής ενδυνάμωσης (LTP), η διατήρησή της φαίνεται να εμπλέκει και άλλους υποδοχείς του γλουταμικού οξέος και κυρίως τους AMPA (Davies, Lester et al. 1989). Συμπεριφορικά πειράματα σε πειραματόζωα έχουν δείξει επίσης τη σύνδεση μεταξύ της μακρόχρονης συναπτικής ενδυνάμωσης και του υποδοχέα NMDA. Υπάρχει ισχυρή συσχέτιση των περιοχών δέσμευσης των υποδοχέων NMDA στον ιππόκαμπο και το νεοφλοιό σε νεαρούς επίμυες, με την απόδοσή τους σε δοκιμασίες μνήμης και μάθησης (Wenk, Grey et al. 1989).

Το 1989 οι Mandadori και συνεργάτες χρησιμοποιώντας ανταγωνιστές του υποδοχέα NMDA, MK-801 και AP7, βρήκαν ότι προκαλούν είτε ενίσχυση της

μνήμης είτε μείωση της δυνατότητας ανάκλησης. Οδηγήθηκαν λοιπόν στο συμπέρασμα ότι οι συναγωνιστικοί ανταγωνιστές του NMDA υποδοχέα επηρεάζουν τη μάθηση με έναν τρόπο που εξαρτάται από τη δοκιμασία στην οποία υποβάλλεται το πειραματόζωο (Mondadori, Ducret et al. 1989).

Σε γενικές γραμμές και βάσει των βιβλιογραφικών δεδομένων, φαίνεται ότι ενίσχυση της γλουταματεργικής δραστηριότητας έχει την τάση να βελτιώνει τη μνήμη και τη μάθηση, ενώ η αναστολή αυτής της δραστηριότητας μειώνει τόσο τη μνήμη όσο και τη μάθηση. Αν και οι περισσότερες μελέτες έχουν εστιάσει στην αναστολή του υποδοχέα NMDA, πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι φάρμακα που στοχεύουν σε μη-NMDA υποδοχείς του γλουταμικού οξέος επηρεάζουν επίσης τη μνήμη και τη μάθηση (McEntee and Crook 1993). Στην παρούσα μελέτη στον ιππόκαμπο των θηλυκών πειραματοζώων που διαβίωναν σε εμπλουτισμένο περιβάλλον παρατηρήθηκε, μείωση των επιπέδων του γλουταμικού οξέος και αύξηση των επιπέδων του ασπαρτικού, που δείχνουν ότι το εμπλουτισμένο περιβάλλον επηρεάζει τα επίπεδα των αμινοξέων μόνο στα θηλυκά πειραματόζωα.

Η επίδραση του εμπλουτισμένου περιβάλλοντος στον ιππόκαμπο έχει μελετηθεί τα τελευταία χρόνια σε δύο άξονες: στην επίδρασή του σε μοντέλα κατάθλιψης και στην επίδρασή του στη μνήμη και τη μάθηση. Το εμπλουτισμένο περιβάλλον επάγει τη νευρογένεση που παρατηρείται στον ιππόκαμπο (Zhong, Yan et al. 2007). Ο μηχανισμός μέσω του οποίου επιτυγχάνεται αυτό είναι μέχρι στιγμής άγνωστος. Από τα τελευταία βιβλιογραφικά δεδομένα προτείνεται ότι το ποσοστό της νευρογένεσης στον ιππόκαμπο σχετίζεται με την εμφάνιση της κατάθλιψης (Paizanis, Hamon et al. 2007). Παλαιότερα δεδομένα από το εργαστήριο Φαρμακολογίας έχουν δείξει ότι η «καταθλιπτική μορφή» συμπεριφορά στα θηλυκά πειραματόζωα σχετίζεται με μειωμένη σεροτονινεργική δραστηριότητα στον ιππόκαμπο, ενώ αυτό δε συμβαίνει στα αρσενικά (Drossopoulou, Antoniou et al. 2004; Dalla, Antoniou et al. 2005). Επίσης η σεροτονίνη συμμετέχει στο σχηματισμό των συνάψεων και στην αναδιαμόρφωσή τους καθώς επίσης αλληλεπιδρά και με τους υποδοχείς του γλουταμικού (Beique, Chapin-Penick et al. 2004).

Με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα και σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, φαίνεται ότι τα μειωμένα επίπεδα γλουταμικού οξέος που παρατηρούνται στα θηλυκά πειραματόζωα που διαβιώνουν σε εμπλουτισμένο περιβάλλον από τη γέννηση, μπορεί να συνδέονται με την αύξηση της σεροτονινεργικής δραστηριότητας στον ιππόκαμπο (Διατριβή Ιατρού, Δ. Μπεσίνη, 2013). Με τον τρόπο αυτό, μπορεί να ενισχύεται η πλαστικότητα των συνάψεων στον ιππόκαμπο οδηγώντας σε περαιτέρω ενίσχυση της μνήμης και της μάθησης.

4.4 Επιπτώσεις του εμπλουτισμένου περιβάλλοντος στα επίπεδα των συναπτικών πρωτεϊνών σε ιππόκαμπο και προμετωπιαίο φλοιό.

Μελέτες έχουν δείξει ότι επίμυες που μεγαλώνουν σε εμπλουτισμένο περιβάλλον έχουν παχύτερο εγκεφαλικό φλοιό (3.3-7%) και περιέχουν 25% περισσότερες συνάψεις (Diamond, Krech et al. 1964; Diamond, Law et al. 1966). Αυτό συμβαίνει είτε ο εμπλουτισμός γίνει αμέσως μετά τη γέννηση, είτε μετά τον απογαλακτισμό, είτε κατά την ενήλικη ζωή (Bennett, Diamond et al. 1964; Diamond, Krech et al. 1964; Diamond, Law et al. 1966; Schapiro and Vukovich 1970; Briones, Klintsova et al. 2004). Όταν ο αριθμός των συνάψεων αυξάνει στους ενήλικους επίμυες, παραμένει αυξημένος ακόμα και 30 ημέρες μετά την επιστροφή σε «φτωχό» περιβάλλον, γεγονός που δείχνει ότι η αύξηση αυτή δεν είναι παροδική (Briones, Klintsova et al. 2004). Παρόλα αυτά, η αύξηση του αριθμού των συνάψεων φαίνεται να μειώνεται κατά την πάροδο των ετών (Holtmaat, Trachtenberg et al. 2005).

Αξιοσημείωτη είναι επίσης η επίδραση του εμπλουτισμένου περιβάλλοντος στην πολυπλοκότητα και το μήκος των δενδριτικών απολήξεων πάνω στις οποίες σχηματίζονται οι συνάψεις. Η πολυπλοκότητα και η υψηλού βαθμού δενδριτική διακλάδωση αυξάνει με τον εμπλουτισμό του περιβάλλοντος (Volkmar and Greenough 1972; Greenough and Volkmar 1973; Wallace, Kilman et al. 1992) και οι συνάψεις τείνουν να είναι μεγαλύτερες (Sirevaag and Greenough 1985). Εκτός

όμως από την αύξηση του αριθμού των συνάψεων, το εμπλουτισμένο περιβάλλον αυξάνει και την ενεργοποίησή τους (Sirenaag and Greenough 1987). Η αυξημένη ανάγκη για ενέργεια καλύπτεται από την αύξηση των γλοιακών κυττάρων και την τοπική τριχοειδική αιμάτωση. Ο αριθμός των γλοιακών κυττάρων ανά νευρώνα αυξάνει κατά 12-14% (Diamond, Krech et al. 1964; Sirenaag and Greenough 1987). Επιπροσθέτως, αυξάνεται η πυκνότητα των τριχοειδών αγγείων αλλά και η διάμετρός τους (Borowsky and Collins 1989). Αυτές οι ενεργειακές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα στο νευροπίλημα (εκτός από τον αυξημένο αριθμό συνάψεων) είναι πιθανώς υπεύθυνες για τον αυξημένο όγκο του εγκεφαλικού φλοιού.

Για να προσδιορίσουμε τη νευροβιολογική απάντηση σε συνθήκες εμπλουτισμένου περιβάλλοντος στην παρούσα εργασία, μελετήσαμε τα αποτελέσματα του εμπλουτισμένου περιβάλλοντος στα επίπεδα συναπτικών πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη δομή και τη λειτουργία των συνάψεων στον ιππόκαμπο και στον προμετωπιαίο φλοιό αρσενικών και θηλυκών επίμυων που γεννήθηκαν και διαβίωσαν σε εμπλουτισμένο περιβάλλον μέχρι την ενήλικη ζωή.

Εκτός από τις μεταβολές των συναπτικών πρωτεϊνών, ο εμπλουτισμός του περιβάλλοντος επηρεάζει και την έκφραση των υποδοχέων του γλουταμικού. Μελέτες έχουν δείξει, ότι αυξάνεται η έκφραση του NMDA και του AMPA υποδοχέα οδηγώντας σε συναπτική ενδυνάμωση και αυξημένη πλαστικότητα όπως αυτή παρουσιάζεται με τη μακροπρόθεσμη ενδυνάμωση της σύναψης (LTP) (Foster and Dumas 2001; Artola, von Frijtag et al. 2006). Σημαντικά στοιχεία δείχνουν ότι οι NMDA υποδοχείς παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της νευρωνικής αρχιτεκτονικής κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης (Cline and Haas 2008). Πιο συγκεκριμένα, η υπομονάδα 2B του NMDA υποδοχέα (NR2B) μπορεί να αλληλεπιδρά με διάφορες πρωτεΐνες της οικογένειας MAGUK, μεταξύ των οποίων είναι και η PSD95 (Cousins and Stephenson 2012), η οποία είναι απαραίτητη για την ομαδοποίηση και αγκυροβόληση των NMDA υποδοχέων και άλλων πρωτεϊνών στις συνάψεις (Funke, Dakoji et al. 2005).

Στην παρούσα μελέτη, η ανάλυση της φωσφορυλιωμένης Tau πρωτεΐνης καθώς επίσης και της υπομονάδας 2B του NMDA υποδοχέα (NR2B) έδειξαν

αλληλεπίδραση του φύλου και του περιβάλλοντος στον ιππόκαμπο καθώς τα αρσενικά πειραματόζωα επηρεάζονταν περισσότερο από το εμπλουτισμένο περιβάλλον σε σύγκριση με τα θηλυκά. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει δομική και λειτουργική αλληλεπίδραση της Tau με τους NMDA υποδοχείς στις συνάψεις η οποία διαμεσολαβείται μέσω της κινάσης Fyn (Ittner, Ke et al. 2010). Τα επίπεδα του γλουταμικού υποδοχέα GluR2B στον ιππόκαμπο τόσο των αρσενικών όσο και των θηλυκών πειραματοζώων παρέμειναν ανεπηρέαστα από το εμπλουτισμένο περιβάλλον. Από τα δεδομένα αυτά προκύπτει λοιπόν, ότι το εμπλουτισμένο περιβάλλον μειώνοντας τα επίπεδα του γλουταμικού οξέος στα θηλυκά πειραματόζωα, μπορεί να σηματοδοτεί την έναρξη ενός μηχανισμού που στόχο έχει την αύξηση των συναπτικών πρωτεϊνών στα θηλυκά και την κατ' επέκταση αύξηση των συνάψεων.

Από την άλλη μεριά, είναι πλέον γνωστό ότι το εμπλουτισμένο περιβάλλον προκαλεί αύξηση των συναπτικών πρωτεϊνών, όπως η προσυναπτική συναπτοφυσίνη (synaptophysin) και η μετασυναπτική PSD-95 (postsynaptic density 95 protein) εξηγώντας μερικώς τη συναπτογένεση που εμφανίζεται κατά τον εμπλουτισμό (Frick and Fernandez 2003; Nithianantharajah, Levis et al. 2004). Στην παρούσα εργασία, βρέθηκε ότι το εμπλουτισμένο περιβάλλον αυξάνει τα επίπεδα της μετασυναπτικής πρωτεΐνης PSD95 στον ιππόκαμπο των θηλυκών επίμυων, πράγμα το οποίο δεν παρατηρήθηκε στα επίπεδα της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στον προμετωπιαίο φλοιό, ενώ η διαβίωση σε εμπλουτισμένο περιβάλλον εμφανίζει παρόμοια τάση αλλαγής των επιπέδων συναπτοφυσίνης και συναψίνης στον ιππόκαμπο αρσενικών και θηλυκών επίμυων χωρίς όμως να είναι στατιστικώς σημαντική.

Είναι πιθανό η ευεργετική δράση του εμπλουτισμένου περιβάλλοντος να φαίνεται περισσότερο σε μετασυναπτικό επίπεδο, καθώς η πρωτεΐνη PSD95 είναι μία μετασυναπτική πρωτεΐνη, ενώ η συναπτοφυσίνη, η οποία φαίνεται να μην επηρεάζεται ξεκάθαρα από το εμπλουτισμένο περιβάλλον, είναι μία προσυναπτική πρωτεΐνη. Περαιτέρω μοριακές μελέτες που θα στοχεύουν στις συνάψεις (μέσω της τεχνικής western blot) , καθώς επίσης και η δενδριτική και συναπτική απεικόνιση (μέσω της τεχνικής χρώσεως των νευρώνων-Golgi) θα

μπορέσουν να δώσουν επιπλέον απαντήσεις και να διευκρινίσουν τα παραπάνω ερωτήματα που προκύπτουν.

Από τη βιβλιογραφία, έχειδειχθεί ότι οι συναπτικές κινάσες, όπως οι Src κινάσες και η Cdk5 κινάση, εμπλέκονται στην εξαρτώμενη από τον NMDA υποδοχέα ρύθμιση της συναπτικής διαβίβασης, στη συναπτική πλαστικότητα και στη μνήμη-μάθηση (Kalia, Gingrich et al. 2004; Salter and Kalia 2004) καθώς επίσης παίζουν σημαντικό ρόλο στην επαγωγή της μακρόχρονης συναπτικής ενδυνάμωσης (LTP). Πριν μερικά χρόνιαδείχθηκε ότι η πρωτεΐνη Fyn, μέλος της οικογένειας των Src κινασών, φωσφορυλιώνει το επίτοπο Y1472 του NR2B και ρυθμίζει την ενεργοποίηση και έκφραση του υποδοχέα NMDA στην επιφάνεια του κυττάρου (Prybylowski, Chang et al. 2005). Από την άλλη μεριά, η Cdk5 είναι μία κινάση απαραίτητη για την ανάπτυξη του εγκεφάλου, η οποία ενεργοποιείται από την υπομονάδα p35 και ρυθμίζεται από τη δραστηριότητα του NMDA (Wei, Tomizawa et al. 2005). Η Cdk5 φωσφορυλιώνει το αμινο-τελικό άκρο της PSD95 σε μία περιοχή που επικαλύπτει τη θέση σύνδεσης της Src (Morabito, Sheng et al. 2004), γεγονός που υποδηλώνει ότι η Cdk5 ρυθμίζοντας την πρόσδεση της Src με την PSD95, μπορεί να ρυθμίσει τη φωσφορυλίωση της Y1472 NR2B και την επιφανειακή έκφραση του NR2B (Zhang, Edelmann et al. 2008).

Στην παρούσα μελέτη βρήκαμε ότι το εμπλουτισμένο περιβάλλον δεν επηρεάζει τα επίπεδα της Cdk5 στον ιππόκαμπο αρσενικών και θηλυκών επίμυων, αλλά αυξάνει τα επίπεδα του p35 (ενεργοποιητή της κινάσης Cdk5) στον ιππόκαμπο των θηλυκών επίμυων. Με βάση αυτό, συμπεραίνουμε ότι το εμπλουτισμένο περιβάλλον επιφέρει μία ενεργοποίηση της Cdk5, η οποία μέσω της επίδρασής της με την PSD95 και τον NR2B θα μπορούσε να ενισχύσει τη συναπτική δομή και σταθερότητα, προσδίδοντας ευεργετικές επιπτώσεις στη μνήμη των θηλυκών επίμυων, όπως φαίνεται και από την συμπεριφορική ανάλυση. Το προτεινόμενο αυτό μοντέλο δράσης του εμπλουτισμένου περιβάλλοντος στις νευρικές συνάψεις του ιπποκάμπου, δε φαίνεται να ισχύει στα αρσενικά πειραματόζωα τα οποία παρουσίασαν εντελώς διαφορετικό μοριακό προφίλ, με βάση πάντα την ανάλυση των συναπτικών πρωτεϊνών

Στοιχεία που προκύπτουν από διάφορες μελέτες δείχνουν, ότι η μειωμένη συναπτική συνδεσιμότητα, που οφείλεται κατά κύριο λόγο στην ελαττωμένη δενδριτική πολυπλοκότητα, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξασθένηση της μνήμης και στα γνωσιακά ελλείμματα που παρατηρούνται κατά τη διάρκεια της γήρανσης, καθώς επίσης και σε διάφορες νευροεκφυλιστικές νόσους (Kulkarni and Firestein 2012). Κατανοώντας λοιπόν τους μοριακούς μηχανισμούς που διέπουν τη δυναμική και σταθεροποίηση των δενδριτών κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, θα μπορούσε να επιτραπεί η επανενεργοποίηση της δενδριτογένεσης των ώριμων νευρώνων, ώστε να ενισχυθεί η νευρωνική συνδεσιμότητα σε ηλικιωμένα άτομα, αλλά και γενικότερα σε ανθρώπους με εγκεφαλικές διαταραχές.

Από τα αποτελέσματα αυτά μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η γέννηση και διαβίωση σε εμπλουτισμένο περιβάλλον επηρεάζουν τη μνημονική λειτουργία με διαφορετικό τρόπο στα αρσενικά και θηλυκά πειραματόζωα, μέσω μοριακών μηχανισμών που εμπλέκουν μια σειρά πρωτεϊνών οι οποίες παίζουν καθοριστικό ρόλο στη δομή και στη λειτουργία των συνάψεων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας φαίνεται ότι η αντικαταθλιπτική δράση του εμπλουτισμένου περιβάλλοντος επέρχεται από τις διάφορες μεταβολές που προκαλούνται στον ιππόκαμπο τόσο σε επίπεδο νευροχημικό όσο και σε επίπεδο μοριακό. Επίσης, είναι σημαντικό ότι οι διαφορές του φύλου που παρατηρήθηκαν αφορούν κυρίως σε παραμέτρους που μελετήθηκαν στον ιππόκαμπο, ενώ στον προμετωπιαίο φλοιό δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές.

Συμπερασματικά

- Το εμπλουτισμένο περιβάλλον δεν επιδρά στις επιδόσεις της δοκιμασίας ανοιχτού πεδίου. Οι παράγοντες κινητικότητας που μελετήθηκαν δεν επηρεάζονται από το περιβάλλον διαβίωσης.
 - Ο εμπλουτισμός του περιβάλλοντος από τη γέννηση, αυξάνει τις γνωσιακές ικανότητες και στα αρσενικά και στα θηλυκά πειραματόζωα που έχουν διαβιώσει σε εμπλουτισμένο περιβάλλον.
 - Ο εμπλουτισμός του περιβάλλοντος από τη γέννηση μέχρι την ενήλικη ζωή, μειώνει τα επίπεδα του γλουταμικού οξέος μόνο στον ιππόκαμπο των

θηλυκών πειραματοζώων, σηματοδοτώντας με τον τρόπο αυτό πιθανώς την έναρξη ενός μηχανισμού που στοχεύει στην αύξηση των συναπτικών πρωτεϊνών και των συνάψεων.

- Το εμπλουτισμένο περιβάλλον επιφέρει αλλαγές σε κυτταροσκελετικές και συναπτικές πρωτεΐνες στον ιππόκαμπο με φυλο-εξαρτώμενο τρόπο. Πιο συγκεκριμένα, το εμπλουτισμένο περιβάλλον αυξάνει τα επίπεδα του NR2B και της φωσφορυλιωμένης Ταυ πρωτεΐνης στον ιππόκαμπο των αρσενικών πειραματοζώων, ενώ αντιθέτως προκαλεί αύξηση της PSD95 και του p35 στον ιππόκαμπο των θηλυκών πειραματοζώων.

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης δείχνουν την επίδραση του περιβάλλοντος στο γλουταματεργικό σύστημα. Ταυτόχρονα επισημαίνεται η επίδραση του φύλου στο νευροχημικό και μοριακό προφίλ των περιοχών που μελέτηθηκαν. Φαίνεται ότι ο αυξημένος αριθμός ερεθισμάτων από τη γέννηση, επιδρά θετικά στη δημιουργία των συνάψεων. Επίσης, η παρούσα εργασία στρέφεται στη διερεύνηση του ρόλου του εμπλουτισμένου περιβάλλοντος στη μνήμη και στη μάθηση και τονίζεται η σημασία των περιοχών του εγκεφάλου που σχετίζονται με αυτή, ενώ αποτελεί αντικείμενο περαιτέρω μελέτης για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων για διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alder, J., Z. P. Xie, et al. (1992). "Antibodies to synaptophysin interfere with transmitter secretion at neuromuscular synapses." *Neuron* **9**(4): 759-768.
- Alstott, J. and W. Timberlake (2009). "Effects of rat sex differences and lighting on locomotor exploration of a circular open field with free-standing central corners and without peripheral walls." *Behav Brain Res* **196**(2): 214-219.
- Altman, J. (1963). "Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats." *Anat Rec* **145**: 573-591.
- Altman, J. (1969). "Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb." *J Comp Neurol* **137**(4): 433-457.
- Altman, J. and G. D. Das (1964). "AUTORADIOGRAPHIC EXAMINATION OF THE EFFECTS OF ENRICHED ENVIRONMENT ON THE RATE OF GLIAL MULTIPLICATION IN THE ADULT RAT BRAIN." *Nature* **204**: 1161-1163.
- Altman, J. and G. D. Das (1965). "Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats." *J Comp Neurol* **124**(3): 319-335.
- Amaral, D. G. and M. P. Witter (1989). "The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data." *Neuroscience* **31**(3): 571-591.
- Anagnostaras, S. G., S. Maren, et al. (1999). "Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination." *J Neurosci* **19**(3): 1106-1114.
- Antoniou, K., A. Galanopoulos, et al. (2005). "Behavioral pharmacological properties of a novel cannabinoid 1',1'-dithiolane delta8-THC analog, AMG-3." *Behav Pharmacol* **16**(5-6): 499-510.
- Antoniou, K., E. Kafetzopoulos, et al. (1998). "D-amphetamine, cocaine and caffeine: a comparative study of acute effects on locomotor activity and behavioural patterns in rats." *Neurosci Biobehav Rev* **23**(2): 189-196.
- Arendash, G. W., M. F. Garcia, et al. (2004). "Environmental enrichment improves cognition in aged Alzheimer's transgenic mice despite stable beta-amyloid deposition." *Neuroreport* **15**(11): 1751-1754.
- Astur, R. S., M. L. Ortiz, et al. (1998). "A characterization of performance by men and women in a virtual Morris water task: a large and reliable sex difference." *Behav Brain Res* **93**(1-2): 185-190.
- Auvergne, R., C. Lere, et al. (2002). "Delayed kindling epileptogenesis and increased neurogenesis in adult rats housed in an enriched environment." *Brain Res* **954**(2): 277-285.
- Bakos, J., N. Hlavacova, et al. (2009). "Enriched environment influences hormonal status and hippocampal brain derived neurotrophic factor in a sex dependent manner." *Neuroscience* **164**(2): 788-797.
- Balazs, R., N. Hack, et al. (1990). "Selective stimulation of excitatory amino acid receptor subtypes and the survival of cerebellar granule cells in culture: effect of kainic acid." *Neuroscience* **37**(1): 251-258.
- Baldelli, P., A. Fassio, et al. (2007). "Lack of synapsin I reduces the readily releasable pool of synaptic vesicles at central inhibitory synapses." *J Neurosci* **27**(49): 13520-13531.

- Barnea, A. and F. Nottebohm (1994). "Seasonal recruitment of hippocampal neurons in adult free-ranging black-capped chickadees." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(23): 11217-11221.
- Baumann, K., E. M. Mandelkow, et al. (1993). "Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5." FEBS Lett **336**(3): 417-424.
- Beique, J. C., E. M. Chapin-Penick, et al. (2004). "Serotonergic facilitation of synaptic activity in the developing rat prefrontal cortex." J Physiol **556**(Pt 3): 739-754.
- Bekkers, J. M. and C. F. Stevens (1989). "NMDA and non-NMDA receptors are co-localized at individual excitatory synapses in cultured rat hippocampus." Nature **341**(6239): 230-233.
- Bennett, E. L., M. C. Diamond, et al. (1964). "CHEMICAL AND ANATOMICAL PLASTICITY BRAIN." Science **146**(3644): 610-619.
- Bennett, J. C., P. A. McRae, et al. (2006). "Long-term continuous, but not daily, environmental enrichment reduces spatial memory decline in aged male mice." Neurobiol Learn Mem **85**(2): 139-152.
- Berninger, B., D. E. Garcia, et al. (1993). "BDNF and NT-3 induce intracellular Ca²⁺ elevation in hippocampal neurones." Neuroreport **4**(12): 1303-1306.
- Bessinis, D. P., C. Dalla, et al. (2013). "Sex-dependent neurochemical effects of environmental enrichment in the visual system." Neuroscience **254**: 130-140.
- Bezard, E., S. Dovero, et al. (2003). "Enriched environment confers resistance to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and cocaine: involvement of dopamine transporter and trophic factors." J Neurosci **23**(35): 10999-11007.
- Binder, L. I., A. Frankfurter, et al. (1985). "The distribution of tau in the mammalian central nervous system." J Cell Biol **101**(4): 1371-1378.
- Black, J. E., K. R. Isaacs, et al. (1990). "Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis, in cerebellar cortex of adult rats." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(14): 5568-5572.
- Blair, M. L. (2007). "Sex-based differences in physiology: what should we teach in the medical curriculum?" Adv Physiol Educ **31**(1): 23-25.
- Blanchard, R. J., E. B. Yudko, et al. (1993). "Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety." Behav Brain Res **58**(1-2): 155-165.
- Bliss, T. V. and G. L. Collingridge (1993). "A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus." Nature **361**(6407): 31-39.
- Bliss, T. V. and T. Lomo (1973). "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path." J Physiol **232**(2): 331-356.
- Borowsky, I. W. and R. C. Collins (1989). "Metabolic anatomy of brain: a comparison of regional capillary density, glucose metabolism, and enzyme activities." J Comp Neurol **288**(3): 401-413.
- Brandt, R. and G. Lee (1993). "Functional organization of microtubule-associated protein tau. Identification of regions which affect microtubule growth, nucleation, and bundle formation in vitro." J Biol Chem **268**(5): 3414-3419.
- Bredt, D. S. and R. A. Nicoll (2003). "AMPA receptor trafficking at excitatory synapses." Neuron **40**(2): 361-379.
- Bredy, T. W., T. Y. Zhang, et al. (2004). "Peripubertal environmental enrichment reverses the effects of maternal care on hippocampal development and glutamate receptor subunit expression." Eur J Neurosci **20**(5): 1355-1362.
- Brewer, J. B., Z. Zhao, et al. (1998). "Making memories: brain activity that predicts how well visual experience will be remembered." Science **281**(5380): 1185-1187.

- Brion, J. P., J. N. Octave, et al. (1994). "Distribution of the phosphorylated microtubule-associated protein tau in developing cortical neurons." *Neuroscience* **63**(3): 895-909.
- Briones, T. L., A. Y. Klintsova, et al. (2004). "Stability of synaptic plasticity in the adult rat visual cortex induced by complex environment exposure." *Brain Res* **1018**(1): 130-135.
- Brody, J. F., P. A. DeFeudis, et al. (1969). "Effects of micro-injections of L-glutamate into the hypothalamus on attack and flight behaviour in cats." *Nature* **224**(5226): 1330.
- Brower, V. (2002). "Sex matters. In sickness and in health, men and women are clearly different." *EMBO Rep* **3**(10): 921-923.
- Brown, T. A., B. F. Chorpita, et al. (1998). "Structural relationships among dimensions of the DSM-IV anxiety and mood disorders and dimensions of negative affect, positive affect, and autonomic arousal." *J Abnorm Psychol* **107**(2): 179-192.
- Brown, T. H., P. F. Chapman, et al. (1988). "Long-term synaptic potentiation." *Science* **242**(4879): 724-728.
- Browning, P. G. and D. Gaffan (2008). "Prefrontal cortex function in the representation of temporally complex events." *J Neurosci* **28**(15): 3934-3940.
- Bruel-Jungerman, E., S. Laroche, et al. (2005). "New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment." *Eur J Neurosci* **21**(2): 513-521.
- Burke, S. N. and C. A. Barnes (2006). "Neural plasticity in the ageing brain." *Nat Rev Neurosci* **7**(1): 30-40.
- Burke, S. N., A. L. Hartzell, et al. (2012). "Layer V perirhinal cortical ensemble activity during object exploration: a comparison between young and aged rats." *Hippocampus* **22**(10): 2080-2093.
- Bustos, F. J., L. Varela-Nallar, et al. (2014). "PSD95 suppresses dendritic arbor development in mature hippocampal neurons by occluding the clustering of NR2B-NMDA receptors." *PLoS One* **9**(4): e94037.
- Carlsson, K., J. Andersson, et al. (2006). "Predictability modulates the affective and sensory-discriminative neural processing of pain." *Neuroimage* **32**(4): 1804-1814.
- Cartmell, J. and D. D. Schoepp (2000). "Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors." *J Neurochem* **75**(3): 889-907.
- Chen, X., L. Vinade, et al. (2005). "Mass of the postsynaptic density and enumeration of three key molecules." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(32): 11551-11556.
- Cheng, K. and N. Y. Ip (2003). "Cdk5: a new player at synapses." *Neurosignals* **12**(4-5): 180-190.
- Cheung, Z. H., A. K. Fu, et al. (2006). "Synaptic roles of Cdk5: implications in higher cognitive functions and neurodegenerative diseases." *Neuron* **50**(1): 13-18.
- Chudasama, Y. and T. W. Robbins (2004). "Dopaminergic modulation of visual attention and working memory in the rodent prefrontal cortex." *Neuropsychopharmacology* **29**(9): 1628-1636.
- Ciucci, F., E. Putignano, et al. (2007). "Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) mediates the effects of enriched environment (EE) on visual cortical development." *PLoS One* **2**(5): e475.
- Clayton, D. A., M. H. Mesches, et al. (2002). "A hippocampal NR2B deficit can mimic age-related changes in long-term potentiation and spatial learning in the Fischer 344 rat." *J Neurosci* **22**(9): 3628-3637.
- Cleveland, D. W., S. Y. Hwo, et al. (1977). "Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly." *J Mol Biol* **116**(2): 227-247.
- Cline, H. and K. Haas (2008). "The regulation of dendritic arbor development and plasticity by glutamatergic synaptic input: a review of the synaptotrophic hypothesis." *J Physiol* **586**(6): 1509-1517.

- Collins, D. W. and D. Kimura (1997). "A large sex difference on a two-dimensional mental rotation task." *Behav Neurosci* **111**(4): 845-849.
- Conn, P. J. and J. P. Pin (1997). "Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**: 205-237.
- Cousins, S. L. and F. A. Stephenson (2012). "Identification of N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor subtype-specific binding sites that mediate direct interactions with scaffold protein PSD-95." *J Biol Chem* **287**(16): 13465-13476.
- Cryan, J. F. and F. F. Sweeney (2011). "The age of anxiety: role of animal models of anxiolytic action in drug discovery." *Br J Pharmacol* **164**(4): 1129-1161.
- Daenen, E. W., G. Wolterink, et al. (2003). "Hyperresponsiveness to phencyclidine in animals lesioned in the amygdala on day 7 of life. Implications for an animal model of schizophrenia." *Eur Neuropsychopharmacol* **13**(4): 273-279.
- Dalla, C., K. Antoniou, et al. (2005). "Chronic mild stress impact: are females more vulnerable?" *Neuroscience* **135**(3): 703-714.
- Davies, S. N., R. A. Lester, et al. (1989). "Temporally distinct pre- and post-synaptic mechanisms maintain long-term potentiation." *Nature* **338**(6215): 500-503.
- De Camilli, P., R. Cameron, et al. (1983). "Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. I. Its general distribution in synapses of the central and peripheral nervous system demonstrated by immunofluorescence in frozen and plastic sections." *J Cell Biol* **96**(5): 1337-1354.
- De Camilli, P., S. M. Harris, Jr., et al. (1983). "Synapsin I (Protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. II. Its specific association with synaptic vesicles demonstrated by immunocytochemistry in agarose-embedded synaptosomes." *J Cell Biol* **96**(5): 1355-1373.
- Del Arco, A. and F. Mora (2001). "Dopamine release in the prefrontal cortex during stress is reduced by the local activation of glutamate receptors." *Brain Res Bull* **56**(2): 125-130.
- Del Arco, A., G. Segovia, et al. (2007). "Environmental enrichment reduces the function of D1 dopamine receptors in the prefrontal cortex of the rat." *J Neural Transm* **114**(1): 43-48.
- Del Arco, A., G. Segovia, et al. (2007). "Stress, prefrontal cortex and environmental enrichment: studies on dopamine and acetylcholine release and working memory performance in rats." *Behav Brain Res* **176**(2): 267-273.
- Delacourte, A. and L. Buee (2000). "Tau pathology: a marker of neurodegenerative disorders." *Curr Opin Neurol* **13**(4): 371-376.
- Delalle, I., P. G. Bhide, et al. (1997). "Temporal and spatial patterns of expression of p35, a regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5, in the nervous system of the mouse." *J Neurocytol* **26**(5): 283-296.
- Dhanushkodi, A., B. Bindu, et al. (2007). "Exposure to enriched environment improves spatial learning performances and enhances cell density but not choline acetyltransferase activity in the hippocampus of ventral subicular-lesioned rats." *Behav Neurosci* **121**(3): 491-500.
- Diamond, M. C., D. Krech, et al. (1964). "THE EFFECTS OF AN ENRICHED ENVIRONMENT ON THE HISTOLOGY OF THE RAT CEREBRAL CORTEX." *J Comp Neurol* **123**: 111-120.
- Diamond, M. C., F. Law, et al. (1966). "Increases in cortical depth and glia numbers in rats subjected to enriched environment." *J Comp Neurol* **128**(1): 117-126.
- Diamond, M. C., M. R. Rosenzweig, et al. (1972). "Effects of environmental enrichment and impoverishment on rat cerebral cortex." *J Neurobiol* **3**(1): 47-64.
- Drechsel, D. N., A. A. Hyman, et al. (1992). "Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau." *Mol Biol Cell* **3**(10): 1141-1154.

- Drossopoulou, G., K. Antoniou, et al. (2004). "Sex differences in behavioral, neurochemical and neuroendocrine effects induced by the forced swim test in rats." Neuroscience **126**(4): 849-857.
- During, M. J. and L. Cao (2006). "VEGF, a mediator of the effect of experience on hippocampal neurogenesis." Curr Alzheimer Res **3**(1): 29-33.
- Efron, R., E. W. Yund, et al. (1987). "Scanning the visual field without eye movements--a sex difference." Neuropsychologia **25**(4): 637-644.
- Elias, G. M., L. A. Elias, et al. (2008). "Differential trafficking of AMPA and NMDA receptors by SAP102 and PSD-95 underlies synapse development." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(52): 20953-20958.
- Elias, G. M. and R. A. Nicoll (2007). "Synaptic trafficking of glutamate receptors by MAGUK scaffolding proteins." Trends Cell Biol **17**(7): 343-352.
- Ennaceur, A. and J. Delacour (1988). "A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data." Behav Brain Res **31**(1): 47-59.
- Escorihuela, R. M., A. Fernandez-Teruel, et al. (1995). "Early environmental stimulation produces long-lasting changes on beta-adrenoceptor transduction system." Neurobiol Learn Mem **64**(1): 49-57.
- Evans, G. J. and M. A. Cousin (2005). "Tyrosine phosphorylation of synaptophysin in synaptic vesicle recycling." Biochem Soc Trans **33**(Pt 6): 1350-1353.
- Evergren, E., F. Benfenati, et al. (2007). "The synapsin cycle: a view from the synaptic endocytic zone." J Neurosci Res **85**(12): 2648-2656.
- Faherty, C. J., K. Raviie Shepherd, et al. (2005). "Environmental enrichment in adulthood eliminates neuronal death in experimental Parkinsonism." Brain Res Mol Brain Res **134**(1): 170-179.
- Falkenberg, T., A. K. Mohammed, et al. (1992). "Increased expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus is associated with improved spatial memory and enriched environment." Neurosci Lett **138**(1): 153-156.
- Federman, D. D. (2006). "The biology of human sex differences." N Engl J Med **354**(14): 1507-1514.
- Ferreira, A., H. T. Kao, et al. (2000). "Synapsin III: developmental expression, subcellular localization, and role in axon formation." J Neurosci **20**(10): 3736-3744.
- Fornasiero, E. F., D. Bonanomi, et al. (2010). "The role of synapsins in neuronal development." Cell Mol Life Sci **67**(9): 1383-1396.
- Franconi, F., S. Brunelleschi, et al. (2007). "Gender differences in drug responses." Pharmacol Res **55**(2): 81-95.
- Frick, K. M. and S. M. Fernandez (2003). "Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice." Neurobiol Aging **24**(4): 615-626.
- Frick, K. M., N. A. Stearns, et al. (2003). "Effects of environmental enrichment on spatial memory and neurochemistry in middle-aged mice." Learn Mem **10**(3): 187-198.
- Frieder, B. and V. E. Grimm (1987). "Prenatal monosodium glutamate causes long-lasting cholinergic and adrenergic changes in various brain regions." J Neurochem **48**(5): 1359-1365.
- Fukushiro, D. F., M. B. Calzavara, et al. (2007). "Effects of environmental enrichment and paradoxical sleep deprivation on open-field behavior of amphetamine-treated mice." Physiol Behav **92**(4): 773-779.
- Funke, L., S. Dakoji, et al. (2005). "Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions." Annu Rev Biochem **74**: 219-245.
- Gendron, T. F. and L. Petrucelli (2009). "The role of tau in neurodegeneration." Mol Neurodegener **4**: 13.

- Giovanello, K. S., D. M. Schnyer, et al. (2004). "A critical role for the anterior hippocampus in relational memory: evidence from an fMRI study comparing associative and item recognition." *Hippocampus* **14**(1): 5-8.
- Gitler, D., Q. Cheng, et al. (2008). "Synapsin IIa controls the reserve pool of glutamatergic synaptic vesicles." *J Neurosci* **28**(43): 10835-10843.
- Goedert, M., R. A. Crowther, et al. (1991). "Molecular characterization of microtubule-associated proteins tau and MAP2." *Trends Neurosci* **14**(5): 193-199.
- Goedert, M., M. G. Spillantini, et al. (1989). "Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease." *Neuron* **3**(4): 519-526.
- Gong, S. L., F. Q. Xia, et al. (1995). "Harmful effects of MSG on function of hypothalamus-pituitary-target gland system." *Biomed Environ Sci* **8**(4): 310-317.
- Goto, S. and A. Hirano (1990). "Synaptophysin expression in the striatum in Huntington's disease." *Acta Neuropathol* **80**(1): 88-91.
- Greenamyre, J. T. (1986). "The role of glutamate in neurotransmission and in neurologic disease." *Arch Neurol* **43**(10): 1058-1063.
- Greenamyre, J. T., W. F. Maragos, et al. (1988). "Glutamate transmission and toxicity in Alzheimer's disease." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **12**(4): 421-430.
- Greengard, P., F. Valtorta, et al. (1993). "Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function." *Science* **259**(5096): 780-785.
- Greenough, W. T. and F. R. Volkmar (1973). "Pattern of dendritic branching in occipital cortex of rats reared in complex environments." *Exp Neurol* **40**(2): 491-504.
- Grillon, C. (2008). "Models and mechanisms of anxiety: evidence from startle studies." *Psychopharmacology (Berl)* **199**(3): 421-437.
- Hamann, S. (2005). "Sex differences in the responses of the human amygdala." *Neuroscientist* **11**(4): 288-293.
- Harlow, H. F., G. L. Rowland, et al. (1964). "THE EFFECT OF TOTAL SOCIAL DEPRIVATION ON THE DEVELOPMENT OF MONKEY BEHAVIOR." *Psychiatr Res Rep Am Psychiatr Assoc* **19**: 116-135.
- Hata, Y. and Y. Takai (1999). "Roles of postsynaptic density-95/synapse-associated protein 90 and its interacting proteins in the organization of synapses." *Cell Mol Life Sci* **56**(5-6): 461-472.
- Hebb, D. O. (1955). "The mammal and his environment." *Am J Psychiatry* **111**(11): 826-831.
- Hirsch, S. R., I. Das, et al. (1997). "A pivotal role for glutamate in the pathogenesis of schizophrenia, and its cognitive dysfunction." *Pharmacol Biochem Behav* **56**(4): 797-802.
- Hisanaga, S. and R. Endo (2010). "Regulation and role of cyclin-dependent kinase activity in neuronal survival and death." *J Neurochem* **115**(6): 1309-1321.
- Hobin, J. A., J. Ji, et al. (2006). "Ventral hippocampal muscimol disrupts context-specific fear memory retrieval after extinction in rats." *Hippocampus* **16**(2): 174-182.
- Hock, B. J., Jr. and M. D. Bunsey (1998). "Differential effects of dorsal and ventral hippocampal lesions." *J Neurosci* **18**(17): 7027-7032.
- Hockly, E., P. M. Cordery, et al. (2002). "Environmental enrichment slows disease progression in R6/2 Huntington's disease mice." *Ann Neurol* **51**(2): 235-242.
- Hof, P. R. and J. H. Morrison (2004). "The aging brain: morphomolecular senescence of cortical circuits." *Trends Neurosci* **27**(10): 607-613.
- Holdstock, J. S., A. R. Mayes, et al. (2005). "Item recognition is less impaired than recall and associative recognition in a patient with selective hippocampal damage." *Hippocampus* **15**(2): 203-215.
- Hollmann, M. and S. Heinemann (1994). "Cloned glutamate receptors." *Annu Rev Neurosci* **17**: 31-108.

- Holson, R. R. (1986). "Mesial prefrontal cortical lesions and timidity in rats. III. Behavior in a semi-natural environment." *Physiol Behav* **37**(2): 239-247.
- Holtmaat, A. J., J. T. Trachtenberg, et al. (2005). "Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo." *Neuron* **45**(2): 279-291.
- Hoover, B. R., M. N. Reed, et al. (2010). "Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration." *Neuron* **68**(6): 1067-1081.
- Hutchinson, E., A. Avery, et al. (2005). "Environmental enrichment for laboratory rodents." *ILAR J* **46**(2): 148-161.
- Hutchinson, K. M., K. J. McLaughlin, et al. (2012). "Environmental enrichment protects against the effects of chronic stress on cognitive and morphological measures of hippocampal integrity." *Neurobiol Learn Mem* **97**(2): 250-260.
- Hyde, J. S., S. M. Lindberg, et al. (2008). "Diversity. Gender similarities characterize math performance." *Science* **321**(5888): 494-495.
- Hyman, S. (2000). "Mental illness: genetically complex disorders of neural circuitry and neural communication." *Neuron* **28**(2): 321-323.
- Ickes, B. R., T. M. Pham, et al. (2000). "Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain." *Exp Neurol* **164**(1): 45-52.
- Ishiguro, K., S. Kobayashi, et al. (1994). "Identification of the 23 kDa subunit of tau protein kinase II as a putative activator of cdk5 in bovine brain." *FEBS Lett* **342**(2): 203-208.
- Issa, A. M., W. Rowe, et al. (1990). "Hypothalamic-pituitary-adrenal activity in aged, cognitively impaired and cognitively unimpaired rats." *J Neurosci* **10**(10): 3247-3254.
- Ittner, L. M., Y. D. Ke, et al. (2010). "Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models." *Cell* **142**(3): 387-397.
- Izquierdo, I., J. A. Quillfeldt, et al. (1997). "Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats." *Eur J Neurosci* **9**(4): 786-793.
- Jacobs, B., M. Schall, et al. (1993). "A quantitative dendritic analysis of Wernicke's area in humans. II. Gender, hemispheric, and environmental factors." *J Comp Neurol* **327**(1): 97-111.
- Jacobs, B. and A. B. Scheibel (1993). "A quantitative dendritic analysis of Wernicke's area in humans. I. Lifespan changes." *J Comp Neurol* **327**(1): 83-96.
- Jacobs, L. F. (2003). "The evolution of the cognitive map." *Brain Behav Evol* **62**(2): 128-139.
- Jacobs, L. F., S. J. Gaulin, et al. (1990). "Evolution of spatial cognition: sex-specific patterns of spatial behavior predict hippocampal size." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(16): 6349-6352.
- Jadavji, N. M., B. Kolb, et al. (2006). "Enriched environment improves motor function in intact and unilateral dopamine-depleted rats." *Neuroscience* **140**(4): 1127-1138.
- Jankowsky, J. L., G. Xu, et al. (2003). "Environmental enrichment exacerbates amyloid plaque formation in a transgenic mouse model of Alzheimer disease." *J Neuropathol Exp Neurol* **62**(12): 1220-1227.
- Jarrard, L. E. (1978). "Selective hippocampal lesions: differential effects on performance by rats of a spatial task with preoperative versus postoperative training." *J Comp Physiol Psychol* **92**(6): 1119-1127.
- Jedema, H. P. and B. Moghaddam (1994). "Glutamatergic control of dopamine release during stress in the rat prefrontal cortex." *J Neurochem* **63**(2): 785-788.
- Jeffery, K. J. and R. Hayman (2004). "Plasticity of the hippocampal place cell representation." *Rev Neurosci* **15**(5): 309-331.
- Johnston, A. R., J. R. Fraser, et al. (1998). "Synaptic plasticity in the CA1 area of the hippocampus of scrapie-infected mice." *Neurobiol Dis* **5**(3): 188-195.

- Kalia, L. V., J. R. Gingrich, et al. (2004). "Src in synaptic transmission and plasticity." *Oncogene* **23**(48): 8007-8016.
- Kandel, E. R. and L. R. Squire (2000). "Neuroscience: breaking down scientific barriers to the study of brain and mind." *Science* **290**(5494): 1113-1120.
- Kao, H. T., P. Li, et al. (2008). "Early involvement of synapsin III in neural progenitor cell development in the adult hippocampus." *J Comp Neurol* **507**(6): 1860-1870.
- Kassuba, T., C. Klinge, et al. (2013). "Vision holds a greater share in visuo-haptic object recognition than touch." *Neuroimage* **65**: 59-68.
- Katsuki, F. and C. Constantinidis (2012). "Early involvement of prefrontal cortex in visual bottom-up attention." *Nat Neurosci* **15**(8): 1160-1166.
- Keegan, D. L., D. D. Ash, et al. (1976). "Blindness. Some psychological and social implications." *Can Psychiatr Assoc J* **21**(5): 333-340.
- Kempermann, G., H. G. Kuhn, et al. (1997). "More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment." *Nature* **386**(6624): 493-495.
- Kessler, R. C. (2003). "Epidemiology of women and depression." *J Affect Disord* **74**(1): 5-13.
- Khan, A., K. A. Schwartz, et al. (2007). "BMI, sex, and antidepressant response." *J Affect Disord* **99**(1-3): 101-106.
- Kim, E. and M. Sheng (2004). "PDZ domain proteins of synapses." *Nat Rev Neurosci* **5**(10): 771-781.
- Kim, J. J., M. R. Foy, et al. (1996). "Behavioral stress modifies hippocampal plasticity through N-methyl-D-aspartate receptor activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(10): 4750-4753.
- Kim, M. J., A. W. Dunah, et al. (2005). "Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in Ras-ERK signaling and AMPA receptor trafficking." *Neuron* **46**(5): 745-760.
- Kleim, J. A., T. M. Hogg, et al. (2004). "Cortical synaptogenesis and motor map reorganization occur during late, but not early, phase of motor skill learning." *J Neurosci* **24**(3): 628-633.
- Klingberg, H., J. Brankack, et al. (1987). "Long-term effects on behaviour after postnatal treatment with monosodium-L-glutamate." *Biomed Biochim Acta* **46**(10): 705-711.
- Kokras, N., K. Antoniou, et al. (2009). "Sex-related differential response to clomipramine treatment in a rat model of depression." *J Psychopharmacol* **23**(8): 945-956.
- Kozorovitskiy, Y., C. G. Gross, et al. (2005). "Experience induces structural and biochemical changes in the adult primate brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(48): 17478-17482.
- Krawczyk, D. C. (2002). "Contributions of the prefrontal cortex to the neural basis of human decision making." *Neurosci Biobehav Rev* **26**(6): 631-664.
- Krech, D., M. R. Rosenzweig, et al. (1960). "Effects of environmental complexity and training on brain chemistry." *J Comp Physiol Psychol* **53**: 509-519.
- Krugers, H. J., B. R. Douma, et al. (1997). "Exposure to chronic psychosocial stress and corticosterone in the rat: effects on spatial discrimination learning and hippocampal protein kinase Cgamma immunoreactivity." *Hippocampus* **7**(4): 427-436.
- Krystal, J. H., G. Sanacora, et al. (2002). "Glutamate and GABA systems as targets for novel antidepressant and mood-stabilizing treatments." *Mol Psychiatry* **7 Suppl 1**: S71-80.
- Kulkarni, V. A. and B. L. Firestein (2012). "The dendritic tree and brain disorders." *Mol Cell Neurosci* **50**(1): 10-20.
- Laakso, A., H. Vilkmann, et al. (2002). "Sex differences in striatal presynaptic dopamine synthesis capacity in healthy subjects." *Biol Psychiatry* **52**(7): 759-763.
- Lavezzari, G., J. McCallum, et al. (2003). "Differential binding of the AP-2 adaptor complex and PSD-95 to the C-terminus of the NMDA receptor subunit NR2B regulates surface expression." *Neuropharmacology* **45**(6): 729-737.

- Lazic, S. E., H. E. Grote, et al. (2006). "Neurogenesis in the R6/1 transgenic mouse model of Huntington's disease: effects of environmental enrichment." *Eur J Neurosci* **23**(7): 1829-1838.
- Lee, G., S. T. Newman, et al. (1998). "Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases." *J Cell Sci* **111 (Pt 21)**: 3167-3177.
- Leritz, E. C., L. J. Grande, et al. (2006). "Temporal lobe epilepsy as a model to understand human memory: the distinction between explicit and implicit memory." *Epilepsy Behav* **9**(1): 1-13.
- Leuner, B., S. Mendolia-Loffredo, et al. (2004). "Learning enhances the survival of new neurons beyond the time when the hippocampus is required for memory." *J Neurosci* **24**(34): 7477-7481.
- Lindwall, G. and R. D. Cole (1984). "Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly." *J Biol Chem* **259**(8): 5301-5305.
- Liston, C., M. M. Miller, et al. (2006). "Stress-induced alterations in prefrontal cortical dendritic morphology predict selective impairments in perceptual attentional set-shifting." *J Neurosci* **26**(30): 7870-7874.
- Lucas, D. R. and J. P. Newhouse (1957). "The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina." *AMA Arch Ophthalmol* **58**(2): 193-201.
- Lynch, M. A., M. P. Clements, et al. (1988). "Increased hydrolysis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate in long-term potentiation." *Neurosci Lett* **84**(3): 291-296.
- Maguire, E. A., C. D. Frith, et al. (1998). "Knowing where things are parahippocampal involvement in encoding object locations in virtual large-scale space." *J Cogn Neurosci* **10**(1): 61-76.
- Maguire, E. A., C. J. Mummery, et al. (2000). "Patterns of hippocampal-cortical interaction dissociate temporal lobe memory subsystems." *Hippocampus* **10**(4): 475-482.
- Malinow, R. and R. C. Malenka (2002). "AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity." *Annu Rev Neurosci* **25**: 103-126.
- Maslah, E., R. D. Terry, et al. (1991). "Cortical and subcortical patterns of synaptophysinlike immunoreactivity in Alzheimer's disease." *Am J Pathol* **138**(1): 235-246.
- Mattison, D. and A. Zajicek (2006). "Gaps in knowledge in treating pregnant women." *Gend Med* **3**(3): 169-182.
- Mattson, M. P. and T. Magnus (2006). "Ageing and neuronal vulnerability." *Nat Rev Neurosci* **7**(4): 278-294.
- Mayeux, R. (2003). "Epidemiology of neurodegeneration." *Annu Rev Neurosci* **26**: 81-104.
- McEntee, W. J. and T. H. Crook (1993). "Glutamate: its role in learning, memory, and the aging brain." *Psychopharmacology (Berl)* **111**(4): 391-401.
- McGivern, R. F., J. P. Huston, et al. (1997). "Sex differences in visual recognition memory: support for a sex-related difference in attention in adults and children." *Brain Cogn* **34**(3): 323-336.
- McReynolds, W. T. (1976). "Behavior therapy for obesity: another fad or a new set of facts?" *Nebr Med J* **61**(8): 289-290.
- Mlynarik, M., B. B. Johansson, et al. (2004). "Enriched environment influences adrenocortical response to immune challenge and glutamate receptor gene expression in rat hippocampus." *Ann N Y Acad Sci* **1018**: 273-280.
- Mohammed, A. H., S. W. Zhu, et al. (2002). "Environmental enrichment and the brain." *Prog Brain Res* **138**: 109-133.
- Mondadori, C., T. Ducret, et al. (1989). "The memory-enhancing effects of the piracetam-like nootropics are dependent on experimental parameters." *Behav Brain Res* **33**(1): 79-82.

- Mondragon-Rodriguez, S., E. Trillaud-Doppia, et al. (2012). "Interaction of endogenous tau protein with synaptic proteins is regulated by N-methyl-D-aspartate receptor-dependent tau phosphorylation." *J Biol Chem* **287**(38): 32040-32053.
- Mora, F., G. Segovia, et al. (2007). "Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain." *Brain Res Rev* **55**(1): 78-88.
- Morabito, M. A., M. Sheng, et al. (2004). "Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates the N-terminal domain of the postsynaptic density protein PSD-95 in neurons." *J Neurosci* **24**(4): 865-876.
- Morris, R. G., P. Garrud, et al. (1982). "Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions." *Nature* **297**(5868): 681-683.
- Morris, R. G., C. E. Polkey, et al. (1998). "Independent recovery of memory and language functioning during the Intracarotid Sodium Amytal Test." *J Clin Exp Neuropsychol* **20**(4): 433-444.
- Moser, M. B., M. Trommald, et al. (1997). "Spatial training in a complex environment and isolation alter the spine distribution differently in rat CA1 pyramidal cells." *J Comp Neurol* **380**(3): 373-381.
- Murray, I. J., N. R. Parry, et al. (2012). "Sex-related differences in peripheral human color vision: a color matching study." *J Vis* **12**(1).
- Myhrer, T., L. Utsikt, et al. (1992). "Differential rearing conditions in rats: effects on neurochemistry in neocortical areas and cognitive behaviors." *Brain Res Bull* **28**(3): 427-434.
- Nadel, L. and L. MacDonald (1980). "Hippocampus: cognitive map or working memory?" *Behav Neural Biol* **29**(3): 405-409.
- Nadel, L. and M. Moscovitch (1997). "Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex." *Curr Opin Neurobiol* **7**(2): 217-227.
- Neeper, S. A., F. Gomez-Pinilla, et al. (1995). "Exercise and brain neurotrophins." *Nature* **373**(6510): 109.
- Niethammer, M., E. Kim, et al. (1996). "Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases." *J Neurosci* **16**(7): 2157-2163.
- Nikolic, M., M. M. Chou, et al. (1998). "The p35/Cdk5 kinase is a neuron-specific Rac effector that inhibits Pak1 activity." *Nature* **395**(6698): 194-198.
- Nikolic, M., H. Dudek, et al. (1996). "The cdk5/p35 kinase is essential for neurite outgrowth during neuronal differentiation." *Genes Dev* **10**(7): 816-825.
- Nikonenko, I., P. Jourdain, et al. (2002). "Activity-induced changes of spine morphology." *Hippocampus* **12**(5): 585-591.
- Nithianantharajah, J. and A. J. Hannan (2006). "Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system." *Nat Rev Neurosci* **7**(9): 697-709.
- Nithianantharajah, J., H. Levis, et al. (2004). "Environmental enrichment results in cortical and subcortical changes in levels of synaptophysin and PSD-95 proteins." *Neurobiol Learn Mem* **81**(3): 200-210.
- Noudoost, B. and T. Moore (2011). "Control of visual cortical signals by prefrontal dopamine." *Nature* **474**(7351): 372-375.
- O'Keefe, J. and J. Dostrovsky (1971). "The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat." *Brain Res* **34**(1): 171-175.
- Ohlsson, A. L. and B. B. Johansson (1995). "Environment influences functional outcome of cerebral infarction in rats." *Stroke* **26**(4): 644-649.
- Olney, J. W. (1993). "Role of excitotoxins in developmental neuropathology." *APMIS Suppl* **40**: 103-112.

- Paizanis, E., M. Hamon, et al. (2007). "Hippocampal neurogenesis, depressive disorders, and antidepressant therapy." *Neural Plast* **2007**: 73754.
- Palmada, M. and J. J. Centelles (1998). "Excitatory amino acid neurotransmission. Pathways for metabolism, storage and reuptake of glutamate in brain." *Front Biosci* **3**: d701-718.
- Palmer, A. M. and S. Gershon (1990). "Is the neuronal basis of Alzheimer's disease cholinergic or glutamatergic?" *FASEB J* **4**(10): 2745-2752.
- Papathodoropoulos, C. and G. Kostopoulos (2000). "Decreased ability of rat temporal hippocampal CA1 region to produce long-term potentiation." *Neurosci Lett* **279**(3): 177-180.
- Patrick, G. N., P. Zhou, et al. (1998). "p35, the neuronal-specific activator of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) is degraded by the ubiquitin-proteasome pathway." *J Biol Chem* **273**(37): 24057-24064.
- Paudel, H. K., J. Lew, et al. (1993). "Brain proline-directed protein kinase phosphorylates tau on sites that are abnormally phosphorylated in tau associated with Alzheimer's paired helical filaments." *J Biol Chem* **268**(31): 23512-23518.
- Pereira, L. O., A. C. Strapasson, et al. (2008). "Early enriched housing results in partial recovery of memory deficits in female, but not in male, rats after neonatal hypoxia-ischemia." *Brain Res* **1218**: 257-266.
- Perez-Otano, I. and M. D. Ehlers (2005). "Homeostatic plasticity and NMDA receptor trafficking." *Trends Neurosci* **28**(5): 229-238.
- Pham, T. M., B. Ickes, et al. (1999). "Changes in brain nerve growth factor levels and nerve growth factor receptors in rats exposed to environmental enrichment for one year." *Neuroscience* **94**(1): 279-286.
- Phillips, R. G. and J. E. LeDoux (1994). "Lesions of the dorsal hippocampal formation interfere with background but not foreground contextual fear conditioning." *Learn Mem* **1**(1): 34-44.
- Polyn, S. M., K. A. Norman, et al. (2009). "Task context and organization in free recall." *Neuropsychologia* **47**(11): 2158-2163.
- Pooler, A. M., A. Usardi, et al. (2012). "Dynamic association of tau with neuronal membranes is regulated by phosphorylation." *Neurobiol Aging* **33**(2): 431 e427-438.
- Pozzo-Miller, L. D., W. Gottschalk, et al. (1999). "Impairments in high-frequency transmission, synaptic vesicle docking, and synaptic protein distribution in the hippocampus of BDNF knockout mice." *J Neurosci* **19**(12): 4972-4983.
- Prybylowski, K., K. Chang, et al. (2005). "The synaptic localization of NR2B-containing NMDA receptors is controlled by interactions with PDZ proteins and AP-2." *Neuron* **47**(6): 845-857.
- Puma, C., O. Deschaux, et al. (1999). "Nicotine improves memory in an object recognition task in rats." *Eur Neuropsychopharmacol* **9**(4): 323-327.
- Rampon, C., C. H. Jiang, et al. (2000). "Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(23): 12880-12884.
- Rasmuson, S., T. Olsson, et al. (1998). "Environmental enrichment selectively increases 5-HT1A receptor mRNA expression and binding in the rat hippocampus." *Brain Res Mol Brain Res* **53**(1-2): 285-290.
- Rehm, H., B. Wiedenmann, et al. (1986). "Molecular characterization of synaptophysin, a major calcium-binding protein of the synaptic vesicle membrane." *EMBO J* **5**(3): 535-541.
- Renner, S. W. (1988). "Immunoblotting and dot immunobinding. Emerging techniques in protein immunochemistry." *Arch Pathol Lab Med* **112**(8): 780-786.
- Rosenzweig, M. R. (1984). "Experience, memory, and the brain." *Am Psychol* **39**(4): 365-376.

- Rosenzweig, M. R. and E. L. Bennett (1996). "Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior." Behav Brain Res **78**(1): 57-65.
- Rosenzweig, M. R., D. Krech, et al. (1962). "Variation in environmental complexity and brain measures." J Comp Physiol Psychol **55**: 1092-1095.
- Rothman, S. M. and J. W. Olney (1986). "Glutamate and the pathophysiology of hypoxic--ischemic brain damage." Ann Neurol **19**(2): 105-111.
- Ruiz Cantero, M. T. and M. Angeles Pardo (2006). "European Medicines Agency policies for clinical trials leave women unprotected." J Epidemiol Community Health **60**(11): 911-913.
- Sacktor, T. C. (2008). "PKMzeta, LTP maintenance, and the dynamic molecular biology of memory storage." Prog Brain Res **169**: 27-40.
- Sale, A., E. Putignano, et al. (2004). "Enriched environment and acceleration of visual system development." Neuropharmacology **47**(5): 649-660.
- Salter, M. W. and L. V. Kalia (2004). "Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation." Nat Rev Neurosci **5**(4): 317-328.
- Schapiro, S. and K. R. Vukovich (1970). "Early experience effects upon cortical dendrites: a proposed model for development." Science **167**(3916): 292-294.
- Schilling, G., A. V. Savonenko, et al. (2004). "Environmental, pharmacological, and genetic modulation of the HD phenotype in transgenic mice." Exp Neurol **187**(1): 137-149.
- Schrijver, N. C., N. I. Bahr, et al. (2002). "Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats." Pharmacol Biochem Behav **73**(1): 209-224.
- Segovia, G., A. Del Arco, et al. (2008). "Effects of an enriched environment on the release of dopamine in the prefrontal cortex produced by stress and on working memory during aging in the awake rat." Behav Brain Res **187**(2): 304-311.
- Segovia, G. and F. Mora (2005). "Effects of the metabotropic glutamate receptor agonist, ACPD, on the extracellular concentrations of GABA and acetylcholine in the prefrontal cortex of the rat during the normal process of aging." Brain Res Bull **65**(1): 11-16.
- Segovia, G., A. G. Yague, et al. (2006). "Environmental enrichment promotes neurogenesis and changes the extracellular concentrations of glutamate and GABA in the hippocampus of aged rats." Brain Res Bull **70**(1): 8-14.
- Shutoh, F., S. Hamada, et al. (2000). "Long term depletion of serotonin leads to selective changes in glutamate receptor subunits." Neurosci Res **38**(4): 365-371.
- Sirevaag, A. M. and W. T. Greenough (1985). "Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. II. Synaptic morphometry." Brain Res **351**(2): 215-226.
- Sirevaag, A. M. and W. T. Greenough (1987). "Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. III. Neuronal and glial nuclei, boutons, dendrites, and capillaries." Brain Res **424**(2): 320-332.
- Smith, Y., A. Charara, et al. (2001). "Ionotropic and metabotropic GABA and glutamate receptors in primate basal ganglia." J Chem Neuroanat **22**(1-2): 13-42.
- Soliman, A. M. (2010). "Exploring the central executive in situation awareness." Psychol Rep **106**(1): 105-118.
- Song, I. and R. L. Huganir (2002). "Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity." Trends Neurosci **25**(11): 578-588.
- Spencer, R. M., M. Sunm, et al. (2006). "Sleep-dependent consolidation of contextual learning." Curr Biol **16**(10): 1001-1005.
- Spires, T. L., H. E. Grote, et al. (2004). "Environmental enrichment rescues protein deficits in a mouse model of Huntington's disease, indicating a possible disease mechanism." J Neurosci **24**(9): 2270-2276.

- Spruijt, B. M. and W. H. Gispen (1984). "Behavioral sequences as an easily quantifiable parameter in experimental studies." Physiol Behav **32**(5): 707-710.
- Squire, L. R., J. G. Ojemann, et al. (1992). "Activation of the hippocampus in normal humans: a functional anatomical study of memory." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(5): 1837-1841.
- Steedmann, A. T. (1962). "Dr. Harlow's famous case: the "impossible" accident of Phineas P. Gage." Surgery **52**: 952-958.
- Stein-Behrens, B. A., E. M. Elliott, et al. (1992). "Glucocorticoids exacerbate kainic acid-induced extracellular accumulation of excitatory amino acids in the rat hippocampus." J Neurochem **58**(5): 1730-1735.
- Swain, R. A., A. B. Harris, et al. (2003). "Prolonged exercise induces angiogenesis and increases cerebral blood volume in primary motor cortex of the rat." Neuroscience **117**(4): 1037-1046.
- Thomas, L., K. Hartung, et al. (1988). "Identification of synaptophysin as a hexameric channel protein of the synaptic vesicle membrane." Science **242**(4881): 1050-1053.
- Torasdóttir, M., M. Metsis, et al. (1998). "Environmental enrichment results in higher levels of nerve growth factor mRNA in the rat visual cortex and hippocampus." Behav Brain Res **93**(1-2): 83-90.
- Toro, C. and J. F. Deakin (2005). "NMDA receptor subunit NR1 and postsynaptic protein PSD-95 in hippocampus and orbitofrontal cortex in schizophrenia and mood disorder." Schizophr Res **80**(2-3): 323-330.
- Tsai, L. H., I. Delalle, et al. (1994). "p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5." Nature **371**(6496): 419-423.
- Tsai, L. H., T. Takahashi, et al. (1993). "Activity and expression pattern of cyclin-dependent kinase 5 in the embryonic mouse nervous system." Development **119**(4): 1029-1040.
- Valle, F. P. (1970). "Effects of strain, sex, and illumination on open-field behavior of rats." Am J Psychol **83**(1): 103-111.
- Valtorta, F., D. Pozzi, et al. (2011). "The synapsins: multitask modulators of neuronal development." Semin Cell Dev Biol **22**(4): 378-386.
- van Praag, H., G. Kempermann, et al. (2000). "Neural consequences of environmental enrichment." Nat Rev Neurosci **1**(3): 191-198.
- van Praag, H. M. (2000). "Serotonin disturbances and suicide risk: is aggression or anxiety the interjacent link?" Crisis **21**(4): 160-162.
- van Rijzingen, I. M., W. H. Gispen, et al. (1997). "Postoperative environmental enrichment attenuates fimbria-fornix lesion-induced impairments in Morris maze performance." Neurobiol Learn Mem **67**(1): 21-28.
- Volkmar, F. R. and W. T. Greenough (1972). "Rearing complexity affects branching of dendrites in the visual cortex of the rat." Science **176**(4042): 1445-1447.
- Wagner, A. K., X. Chen, et al. (2005). "Gender and environmental enrichment impact dopamine transporter expression after experimental traumatic brain injury." Exp Neurol **195**(2): 475-483.
- Wallace, C. S., V. L. Kilman, et al. (1992). "Increases in dendritic length in occipital cortex after 4 days of differential housing in weanling rats." Behav Neural Biol **58**(1): 64-68.
- Walsh, R. N. and R. A. Cummins (1976). "The Open-Field Test: a critical review." Psychol Bull **83**(3): 482-504.
- Wei, F. Y., K. Tomizawa, et al. (2005). "Control of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) activity by glutamatergic regulation of p35 stability." J Neurochem **93**(2): 502-512.
- Wenk, G. L., C. M. Grey, et al. (1989). "Retention of maze performance inversely correlates with N-methyl-D-aspartate receptor number in hippocampus and frontal neocortex in the rat." Behav Neurosci **103**(3): 688-690.

- West, M. J. (1990). "Stereological studies of the hippocampus: a comparison of the hippocampal subdivisions of diverse species including hedgehogs, laboratory rodents, wild mice and men." *Prog Brain Res* **83**: 13-36.
- White, T. L. and S. L. Youngentob (2004). "The effect of NMDA-NR2B receptor subunit over-expression on olfactory memory task performance in the mouse." *Brain Res* **1021**(1): 1-7.
- Whitlock, J. R., A. J. Heynen, et al. (2006). "Learning induces long-term potentiation in the hippocampus." *Science* **313**(5790): 1093-1097.
- Wiedenmann, B. and W. W. Franke (1985). "Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles." *Cell* **41**(3): 1017-1028.
- Wittchen, H. U., F. Jacobi, et al. (2011). "The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010." *Eur Neuropsychopharmacol* **21**(9): 655-679.
- Wong, P. T., L. H. Neo, et al. (1997). "Deficits in water escape performance and alterations in hippocampal cholinergic mechanisms associated with neonatal monosodium glutamate treatment in mice." *Pharmacol Biochem Behav* **57**(1-2): 383-388.
- Wood, D. A., J. E. Buse, et al. (2005). "Differential environmental exposure alters NMDA but not AMPA receptor subunit expression in nucleus accumbens core and shell." *Brain Res* **1042**(2): 176-183.
- Yassine, N., A. Lazaris, et al. (2013). "Detecting spatial memory deficits beyond blindness in tg2576 Alzheimer mice." *Neurobiol Aging* **34**(3): 716-730.
- Yorks, M. L. (2005). "More on Phineas Gage." *N Engl J Med* **352**(9): 944; author reply 944.
- Yoshida, H. and Y. Ihara (1993). "Tau in paired helical filaments is functionally distinct from fetal tau: assembly incompetence of paired helical filament-tau." *J Neurochem* **61**(3): 1183-1186.
- Young, D., P. A. Lawlor, et al. (1999). "Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective." *Nat Med* **5**(4): 448-453.
- Zhang, S., L. Edelmann, et al. (2008). "Cdk5 regulates the phosphorylation of tyrosine 1472 NR2B and the surface expression of NMDA receptors." *J Neurosci* **28**(2): 415-424.
- Zhong, L., C. H. Yan, et al. (2007). "[Prewaning exposure to enriched environment improves spatial memory and study on the mechanism based on microarray technique]." *Zhonghua Er Ke Za Zhi* **45**(10): 781-783.
- Zhu, S. W., A. Codita, et al. (2009). "Influence of environmental manipulation on exploratory behaviour in male BDNF knockout mice." *Behav Brain Res* **197**(2): 339-346.
- Ziv, Y., N. Ron, et al. (2006). "Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood." *Nat Neurosci* **9**(2): 268-275.
- Zyzak, D. R., T. Otto, et al. (1995). "Cognitive decline associated with normal aging in rats: a neuropsychological approach." *Learn Mem* **2**(1): 1-16.