



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ – ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ

**Ο ΜΟΡΦΟΓΕΝΗΤΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΝΤΟΠΑΜΙΝΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ
ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΠΡΟΜΕΤΩΠΙΑΙΟΥ ΦΛΟΙΟΥ ΕΠΙΜΥ**

ΝΙΚΟΛΑΚΑΚΗ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΑΘΗΝΑ, 2016

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΘΕΜΑ:

**«Ο ΜΟΡΦΟΓΕΝΗΤΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΝΤΟΠΑΜΙΝΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ
ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΠΡΟΜΕΤΩΠΙΑΙΟΥ ΦΛΟΙΟΥ ΕΠΙΜΥ»**

ΝΙΚΟΛΑΚΑΚΗ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. ΒΑΣΙΛΑΚΟΠΟΥΛΟΥ Δ., Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας Ευκαρυωτικών Οργανισμών, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
2. ΕΥΘΥΜΙΟΠΟΥΛΟΣ Σ., Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου – Νευροβιολογίας, τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
3. ΣΤΑΜΑΤΑΚΗΣ Α., Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογίας- Βιολογίας της Συμπεριφοράς, Τμήμα Νοσηλευτικής, ΕΚΠΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Σταματάκης Α., Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογίας- Βιολογίας της Συμπεριφοράς, Τμήμα Νοσηλευτικής, ΕΚΠΑ

ΑΘΗΝΑ, 2016

Αφιερώνεται στην οικογένεια μου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του διατμηματικού Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης Κλινική Βιοχημεία – Μοριακή Διαγνωστική στον τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, του τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Βιολογίας- Βιολογίας της Συμπεριφοράς του τμήματος Νοσηλευτικής, κ. Σταματάκη.

Τα πειράματα της διπλωματικής πραγματοποιήθηκαν στο τμήμα της Νοσηλευτικής, στο εργαστήριο Βιολογίας και Βιοχημείας, υπό την ευθύνη του κ. Σταματάκη, τον οποίο και θέλω να ευχαριστήσω θερμά για την επίβλεψη, την εκπαίδευση και τις πολύτιμες συμβουλές του. Να τον ευχαριστήσω επίσης, για την εξαιρετική διδακτική του προσέγγιση, κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μαθημάτων, αφορμή της οποίας στάθηκε και η εκδήλωση ενδιαφέροντος μου για να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία στο εν λόγω εργαστήριο. Θα ήταν παράλειψη να μην τον ευχαριστήσω και για την καθοδήγηση, την κατανόηση και τις πολύτιμες συμβουλές που μου προσέφερε απλόχερα και κατά την διάρκεια της συγγραφής της διπλωματικής μου εργασίας. Ιδιαίτερος οφείλω να ευχαριστήσω την ομότιμη καθηγήτρια κ. Στυλιανοπούλου, υπεύθυνη του εργαστηρίου Βιολογίας και Βιοχημείας, για την εμπιστοσύνη της και το καθημερινό ενδιαφέρον της για την πρόοδο της εργασίας μας.

Ακόμη, πρέπει να ευχαριστήσω τους διδακτορικούς του εργαστηρίου, Μανάτο Βασίλη και Καλπαχίδου Θεοδώρα, για τη συμβολή τους στην προσαρμογή μου στο εργαστήριο και την εξοικείωση μου με τις ποικίλες τεχνικές, με τις οποίες καταπιάστηκα κατά την διάρκεια της πειραματικής μου εργασίας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω στη φίλη και συμφοιτήτρια μου, Σοφία Γαλέου, για τη στήριξη της καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας, για τις γνώσεις που αποκτήσαμε μέσω της συζήτησης και της αναζήτησης, καθώς και για τις στιγμές που μοιραστήκαμε, εύκολες και δύσκολες.

Τέλος, δεν μπορώ να μην ευχαριστήσω τους γονείς μου, Μιχάλη και Σταυρούλα, για την αγάπη τους και τη στήριξη τους σε κάθε μου βήμα, αλλά και την αδερφή μου, Νατάσσα για την συμπαράσταση της και την προστασία που μου προσφέρει σε όλα τα βήματα της ζωής μου.

Αθήνα, 2016

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΚΕΦ. 1 ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΝΕΥΡΟΑΝΑΤΟΜΙΑ

| | |
|-------------------------------------|----|
| 1.1 ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ..... | 2 |
| 1.2 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΚΝΣ..... | 7 |
| 1.3 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ..... | 9 |
| 1.4 ΔΙΑΒΙΒΑΣΗ ΤΩΝ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΩΝ..... | 13 |

ΚΕΦ. 2 ΠΡΟΜΕΤΩΠΙΑΙΟΣ ΦΛΟΙΟΥΣ

| | |
|--|----|
| 2.1 ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΠΡΟΜΕΤΩΠΙΑΙΟΥ ΦΛΟΙΟΥ..... | 16 |
| 2.2 ΔΙΑΣΥΝΔΕΣΕΙΣ ΠΡΟΜΕΤΩΠΙΑΙΟΥ ΦΛΟΙΟΥ..... | 20 |
| 2.3 ΕΞΕΛΙΞΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΡΟΜΕΤΩΠΙΑΙΟΥ ΦΛΟΙΟΥ..... | 21 |
| 2.4 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΠΡΟΜΕΤΩΠΙΑΙΟΥ ΦΛΟΙΟΥ..... | 24 |
| 2.5 ΒΛΑΒΕΣ ΠΡΟΜΕΤΩΠΙΑΙΟΥ ΦΛΟΙΟΥ..... | 26 |

ΚΕΦ 3. ΝΤΟΠΑΜΙΝΗ

| | |
|--|----|
| 3.1 Η ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΝΤΟΠΑΜΙΝΗΣ..... | 29 |
| 3.2 ΝΤΟΠΑΜΙΝΕΡΓΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ..... | 32 |
| 3.3 ΝΤΟΠΑΜΙΝΕΡΓΙΚΗ ΣΥΝΑΨΗ..... | 34 |
| 3.3.1 Απελευθέρωση DA..... | 35 |
| 3.3.2 Πρότυπα απελευθέρωσης DA..... | 38 |
| 3.3.3 Υποδοχείς της Ντοπαμίνης..... | 39 |
| 3.3.4 Μεταγεννητική ανάπτυξη των D1 και D2 υποδοχέων ντοπαμίνης..... | 41 |
| 3.3.5 Αυτοϋποδοχείς..... | 41 |
| 3.3.6 Τερματισμός Δράσης DA..... | 42 |
| 3.3.7 Ο Μεταφορέας της Ντοπαμίνης (Dopamine Transporter, DAT)..... | 44 |
| 3.4 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΝΤΟΠΑΜΙΝΗΣ..... | 46 |
| 3.4.1 Αναπτυξιακός Ρόλος της Ντοπαμίνης..... | 48 |

ΚΕΦ. 4 ΠΡΩΙΜΕΣ ΕΜΠΕΙΡΙΕΣ

| | |
|--|-----------|
| 4.1 ΜΗΤΡΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ..... | 51 |
| 4.2 ΜΟΝΤΕΛΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ | 52 |
| 4.3 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΠΡΩΙΜΩΝ ΕΜΠΕΙΡΙΩΝ | 55 |
| 4.4 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΝΤΟΠΑΜΙΝΗΣ ΣΤΙΣ ΠΡΩΙΜΕΣ ΕΜΠΕΙΡΙΕΣ | 62 |
| 5. ΣΚΟΠΟΣ..... | 65 |
| <i>Πειραματικό Μέρος.....</i> | 68 |

ΚΕΦ 6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

| | |
|---|-----------|
| 6. 1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ..... | 69 |
| 6.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ..... | 71 |
| 6.2.1 Έκθεση υπό συνεχή λήψη ή συνεχόμενη παρεμπόδιση λήψης αναμενόμενης ανταμοιβής μέσω της επαφή με τη μητέρα | 73 |
| 6.2.2 Έλεγχος της Νεογνικής Μνήμης Απουσία του Ερεθίσματος της Μητέρας | 74 |
| 6.2.3 Επιπτώσεις της Εκπαίδευσης με Συνεχόμενη Ματαίωση ή Ενίσχυση (νεογνά) | 75 |
| 6.3 ΘΥΣΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ & ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΙΣΤΟΥ | 78 |
| 6.4 ΣΥΝΕΧΟΜΕΝΗ ΜΑΤΑΙΩΣΗ | 79 |
| 6.4.1. Ανοσοϊστοχημεία NeuN και v-GluT | 79 |
| 6.4.2 Ανοσοφθορισμός για Iba1 και GFAP | 84 |
| 6.4.3 TUNEL | 86 |
| 6.4.4 FluoroJade B | 87 |
| 6.5 ΣΥΝΕΧΟΜΕΝΗ ΜΑΤΑΙΩΣΗ | 87 |
| 6.6 ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΣΗ & ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ | 88 |
| 6.7 ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΑΝΟΣΟΘΕΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ | 89 |
| 6.8 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ GFAP | 89 |
| 6.9 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ..... | 90 |

| | |
|--|------------|
| ΚΕΦ. 7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 91 |
| 7.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ..... | 92 |
| 7.1.1. Ανοσοιστοχημεία NeuN | 92 |
| 7.1.2. Ανοσοιστοχημεία v-Glut..... | 94 |
| 7.1.3. Ανοσοφθορισμός Iba-1 | 95 |
| 7.1.4. Ανοσοφθορισμός GFAP | 97 |
| 7.1.5. Δοκιμασίες Tunel & Fluorojade B..... | 99 |
| 7.2 ΕΓΧΥΣΗ ΝΤΟΠΑΜΙΝΗΣ ΣΤΟ ΜΟΝΤΕΛΟ DER | 100 |
| 7.2.1 Ανοσοιστοχήμεια NeuN | 100 |
| 7.2.1.α Νεογνά πειραματόζωα (PND13)..... | 100 |
| 7.2.1.β Ενήλικα πειραματόζωα..... | 101 |
| 7.2.2 Ανοσοιστοχημεία v-GluT1 | 102 |
| 7.2.2α Νεογνά πειραματόζωα (PND13)..... | 102 |
| 7.2.2β Ενήλικα πειραματόζωα..... | 103 |
| <u>ΚΕΦ. 8 ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u> | |
| 8.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ..... | 106 |
| 8.2 ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΝΤΟΠΑΜΙΝΗΣ | 109 |
| 8.3 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΝΕΥΡΟΓΛΟΙΑ ΚΑΙ ΕΛΛΕΙΨΗ ΝΤΟΠΑΜΙΝΗΣ..... | 111 |
| 8.4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ..... | 112 |
| ΚΕΦ 9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 114 |

Περίληψη

Στον άνθρωπο, ακόμα και μια ήπιας μορφής παραμέληση σε νεογνική ηλικία, έχει αποδειχτεί ότι είναι ικανή να οδηγήσει σε δυσλειτουργικό προμετωπιαίο φλοιό. Σε μία προσπάθεια να διασαφηνιστούν οι πιθανοί νευροβιολογικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται σε αυτές τις διαδικασίες, μελετήσαμε σε επίμυς τα αποτελέσματα μίας ήπιας αρνητικής πρώιμης εμπειρίας στη δομή και λειτουργία του προμετωπιαίου φλοιού. Το μοντέλο πρώιμης εμπειρίας που χρησιμοποιήθηκε βασίζεται στην άρνηση ανταμοιβής μέσω της μητρικής επαφής και επιπρόσθετα περιέχει μία μαθησιακή συνιστώσα. Τα νεογνά εκπαιδεύονται να εντοπίζουν το κλουβί με τη μητέρα σε έναν λαβύρινθο σχήματος Ταυ κατά τις μεταγεννητικές ημέρες (PND) 10-13 και αφού την εντοπίσουν, κάθε φορά παρεμποδίζεται η επαφή μαζί της μέχρι το τέλος της εκπαίδευσης, έτσι τα νεογνά δεν λαμβάνουν την αναμενόμενη ανταμοιβή (Denied the Expected Reward, DER νεογνά). Επιπλέον, είναι γνωστό ότι μία αρνητική πρώιμη εμπειρία, επιδρά στα επίπεδα ντοπαμίνης στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο. Πρόσφατα δεδομένα μελετών αναδεικνύουν όλο και περισσότερο τον μορφογενετικό ρόλο της ντοπαμίνης, η οποία είναι παρούσα στους νεοσχηματιζόμενους εγκεφάλους από τα πρώτα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Ιδιαίτερα, φαίνεται ότι η Ντοπαμίνη παρεμβαίνει στον κυτταρικό κύκλο των άωρων νευρικών κυττάρων και ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίησή τους. Πράγματι, στον κοιλιακό προμετωπιαίο φλοιό των DER νεογνών εντοπίζεται μειωμένη πυκνότητα γλουταματερικών νευρώνων σε σχέση με τα ζώα ελέγχου, και συγκεκριμένα από τη 12^η μεταγεννητική ημέρα, την τρίτη δηλαδή ημέρα εκπαίδευσης, η οποία μάλιστα είναι εμφανής και κατά την ενήλικη ζωή. Αντίθετα, η χορήγηση εξωγενούς ντοπαμίνης στον κοιλιακό προμετωπιαίο φλοιό φαίνεται να οδηγεί σε αύξηση των γλουταματερικών κυττάρων τόσο στα DER νεογνά όσο και στα ενήλικα DER πειραματόζωα και μάλιστα η νευρωνική πυκνότητα ανέρχεται στα επίπεδα των ζώων ελέγχου. Φαίνεται λοιπόν ότι η DER πρώιμη εμπειρία μειώνει τα επίπεδα ντοπαμίνης στον προμετωπιαίο φλοιό. Η μείωση αυτή της ντοπαμίνης, με τη σειρά της, έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη γλουταματερική πυκνότητα στην εν λόγω περιοχή και μάλιστα το φαινόμενο αυτό μπορεί να αντιστραφεί με την χορήγηση εξωγενούς ντοπαμίνης γεγονός που ανιχνεύεται και στην ενήλικη ζωή.

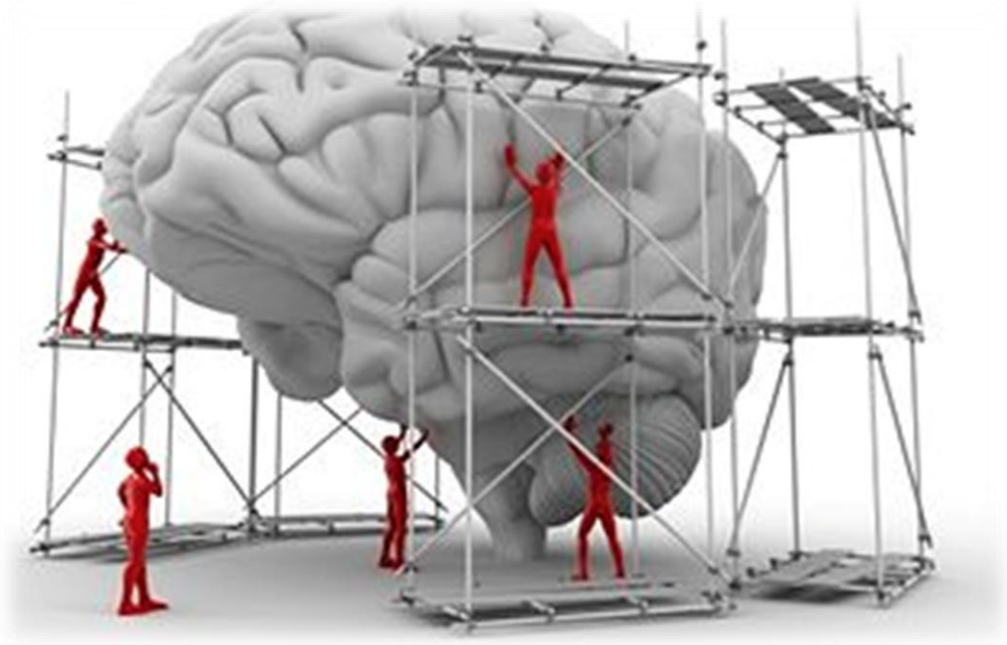
Λέξεις κλειδιά: Πρώιμες Εμπειρίες, Ντοπαμίνη, Προμετωπιαίος, NeuN, v-Glut, Γλοία

Abstract

Aversive early life experiences in humans have been shown to result in deficits in the function of the prefrontal cortex (PFC). In an effort to elucidate possible neurobiological mechanisms involved, we investigated in rats, the effects of a mildly aversive early experience on PFC structure and function. The early experience involved exposure of rat pups during postnatal days (PND) 10–13 to a T-maze in which they search for their mother, but upon finding her are prohibited contact with her, thus being denied the expected reward (DER). Furthermore, it is well known that a negative early life experience affects the levels of dopamine in the developing brain. Dopamine and its receptor binding sites are present in the embryonic brain early in development, prior to the onset of synaptogenesis. Therefore, a role for dopamine as morphogen during brain development, that is independent of its role at the synapse in the mature brain, appears likely. Notably, dopamine is one of many neurotransmitters that can influence progenitor cell proliferation in the brain. Indeed, the DER experience resulted in decreased glutamatergic neuron density in the medial orbital (MO) and infralimbic cortex (IL) in the adult brain. The decreased neuronal density was detected as early as PND12 and was accompanied by increased micro- and astroglia-density in the MO/IL. Interestingly, both in neonates and adult DER animals, a normal glutamatergic density in the PFC is detected when dopamine was administered *in vivo* during neonatal training. It thus appears that the early DER experience reduces the levels of dopamine in the prefrontal cortex. This reduction of dopamine results in reduced glutamatergic density in this specific brain area, a phenomenon which is most probably reversed by the administration of dopamine *in vivo* during neonatal training of the DER pups.

Key words: Early life experience, Dopamine, Prefrontal cortex, NeuN, v-Glut, Glia

Θεωρητικό Μέρος



Κεφάλαια 1 - 4

1. ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΝΕΥΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ

1.1 ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Το Νευρικό Σύστημα είναι ένα δίκτυο επικοινωνίας που επιτρέπει σε έναν οργανισμό να αλληλεπιδρά κατάλληλα με το περιβάλλον. Το εν λόγω σύστημα των περισσότερων ζώων μπορεί να υποδιαιρεθεί σε περιφερικό νευρικό σύστημα (ΠΝΣ) και κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), τα οποία διαχωρίζονται ανατομικά αλλά συνδέονται λειτουργικά. Το ΚΝΣ των θηλαστικών αποτελείται από τον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό, ενώ το ΠΝΣ από τις ομάδες των νευρώνων που ονομάζονται γάγγλια και από τα περιφερικά νεύρα, που βρίσκονται έξω από τον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό. Το ΠΝΣ παρέχει ένα σημείο επαφής ανάμεσα στο ΚΝΣ και στο περιβάλλον και περιλαμβάνει το αισθητικό μέρος με τα αισθητικά υποδεκτικά όργανα, και τους πρωτοταγείς προσαγωγούς νευρώνες και το κινητικό μέρος. Στο κινητικό μέρος εντάσσονται οι σωματικές κινητικές ίνες και οι αυτόνομες κινητικές ίνες. Οι αυτόνομοι νευρώνες μπορούν να υποδιαιρεθούν περαιτέρω σε συμπαθητικούς, παρασυμπαθητικούς και εντερικούς νευρώνες. Το συμπαθητικό νευρικό σύστημα συμμετέχει στην αντίδραση του σώματος στο στρες, το παρασυμπαθητικό δρα για να διατηρεί τα ενεργειακά αποθέματα του σώματος και να αποκαθιστά την ισορροπία στην κατάσταση ηρεμίας ενώ τέλος, το εντερικό ελέγχει τη λειτουργία των λείων μυϊκών κυττάρων του εντέρου, συμμετέχει δηλαδή σε πιο συνήθεις δραστηριότητες, όπως είναι η πέψη.

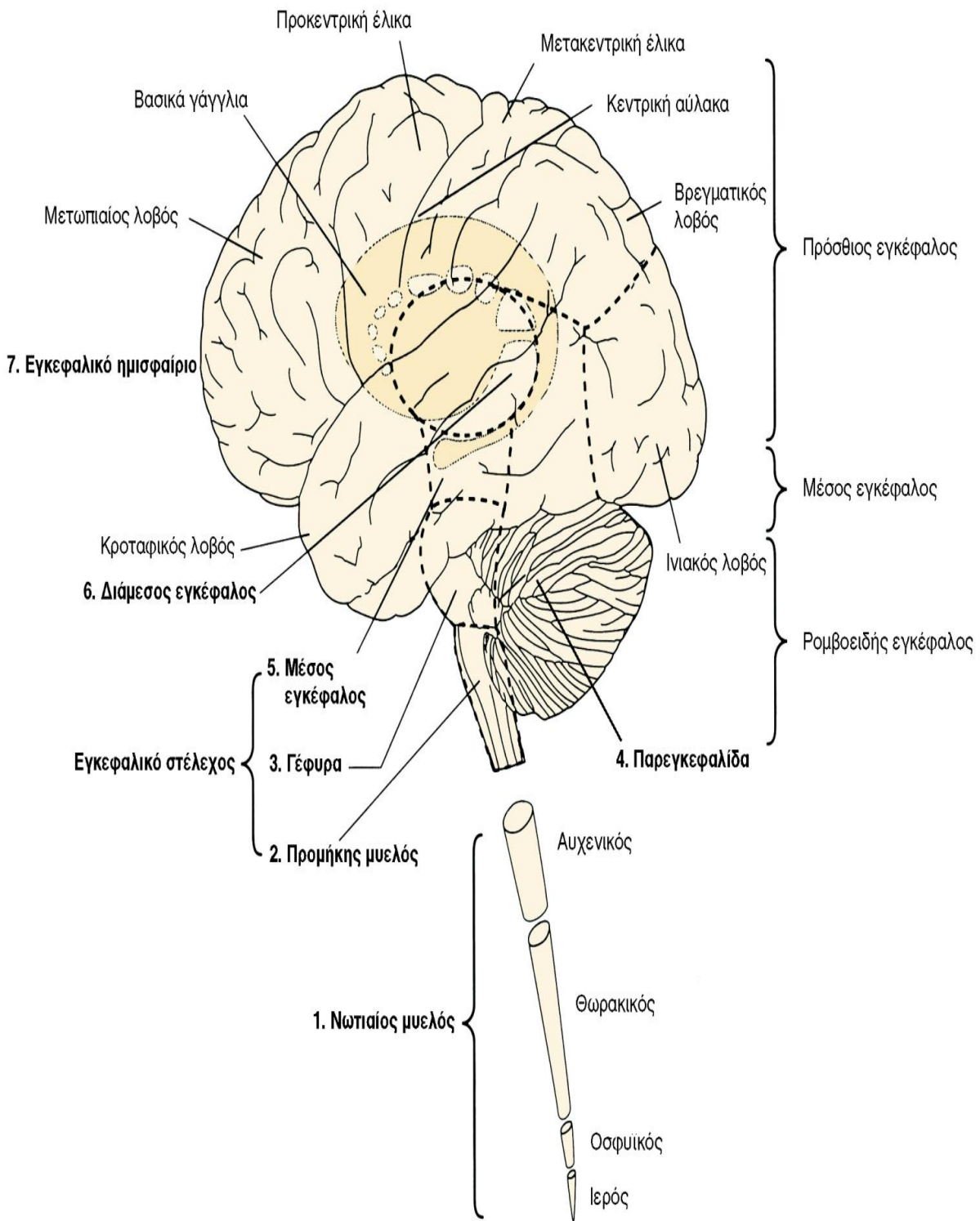
Το ΚΝΣ είναι αμφίπλευρο και όπως αναφέρθηκε ήδη ανατομικά περιλαμβάνει τον νωτιαίο μυελό και τον εγκέφαλο. Ο εγκέφαλος μπορεί να υποδιαιρεθεί περαιτέρω σε πέντε περιοχές, με βάση την εμβρυϊκή ανάπτυξη: Από πίσω προς τα εμπρός, σε έσχατο εγκέφαλο, οπίσθιο εγκέφαλο, μέσο εγκέφαλο, διάμεσο εγκέφαλο και τελικό εγκέφαλο. Στον εγκέφαλο ενός ενήλικου θηλαστικού, ο έσχατος εγκέφαλος γίνεται προμήκης μυελός, ο οπίσθιος εγκέφαλος γίνεται γέφυρα και παρεγκεφαλίδα, ο μέσος εγκέφαλος γίνεται τετράδυμο πέταλο και εγκεφαλικά σκέλη, ο διάμεσος εγκέφαλος θάλαμος και υποθάλαμος, ενώ ο τελικός εγκέφαλος αναπτύσσεται στα βασικά γάγγλια και στους διάφορους λοβούς των εγκεφαλικών ημισφαιρίων (*εικόνα 1.1*) (Berne & Levy, 2007).

Ο προμήκης μυελός, ο οποίος βρίσκεται αμέσως προς τα άνω του νωτιαίου μυελού, περιλαμβάνει αρκετά κέντρα που ρυθμίζουν ζωτικές αυτόνομες λειτουργίες, όπως είναι η πέψη,

η αναπνοή και ο έλεγχος του καρδιακού ρυθμού. Μαζί με τη γέφυρα συμμετέχει στη ρύθμιση της πίεσης του αίματος και της αναπνοής. Η γέφυρα, η οποία βρίσκεται προς τα άνω του προμήκους μυελού μεταφέρει πληροφορίες σχετικές με την κίνηση από τα εγκεφαλικά ημισφαίρια προς την παρεγκεφαλίδα. Η παρεγκεφαλίδα με την σειρά της η οποία βρίσκεται πίσω από τη γέφυρα και συνδέεται με το εγκεφαλικό στέλεχος με μεγάλες δεσμίδες ινών, οι οποίες ονομάζονται παρεγκεφαλιδικά σκέλη, δέχεται αισθητικές πληροφορίες από τον νωτιαίο μυελό, κινητικές πληροφορίες από τον φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων και πληροφορίες σχετικές με την ισορροπία από την αίθουσα και τους ημικυκλικούς σωλήνες του έσω ωτός. Η σύγκλιση αυτών των πληροφοριών, επιτρέπει στην παρεγκεφαλίδα να συντονίζει τον προγραμματισμό, τον χρόνο και τον τύπο ενέργειας των σκελετικών μυών κατά τη διάρκεια της κίνησης. Ο μέσος εγκέφαλος, οποίος κείται προς τα άνω της γέφυρας, ελέγχει πολλές αισθητικές και κινητικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένων των οφθαλμικών κινήσεων και του συντονισμού των οπτικών και ακουστικών αντανακλαστικών. Ο θάλαμος και ο υποθάλαμος που σχηματίζουν μαζί τον διάμεσο εγκέφαλο, βρίσκεται μεταξύ του μέσου εγκεφάλου και των εγκεφαλικών ημισφαιρίων, θέση στην οποία οφείλει και το όνομα του. Ο θάλαμος επεξεργάζεται και διανέμει όλες σχεδόν τις αισθητικές πληροφορίες που πηγάζουν στον φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων, προερχόμενες από το υπόλοιπο κεντρικό νευρικό σύστημα. Πιστεύεται επίσης ότι ρυθμίζει τα επίπεδα συνείδησης, καθώς και τις συναισθηματικές πλευρές της αισθητικότητας. Αντίστοιχα, ο υποθάλαμος ο οποίος κείται κοιλιακώς του θαλάμου, ενώ ρυθμίζει το αυτόνομο νευρικό σύστημα και την έκκριση ορμονών από την υπόφυση.

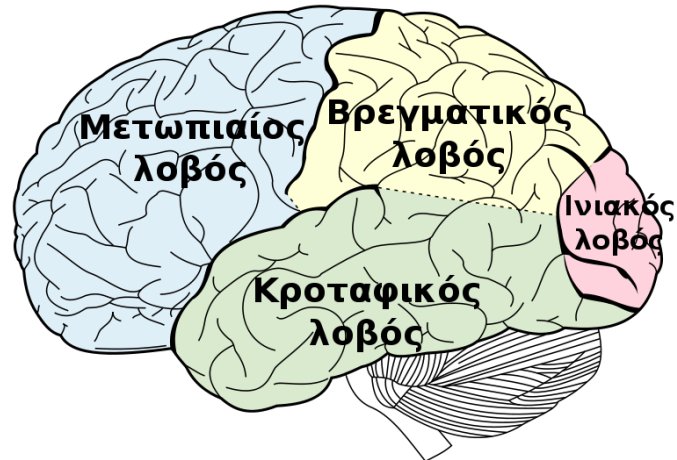
Τα εγκεφαλικά ημισφαίρια είναι οι μεγαλύτερες σε μέγεθος εγκεφαλικές δομές σε σχέση με το συνολικό μέγεθος του εγκεφάλου και περιλαμβάνουν τον φλοιό, την υποκείμενη λευκή ουσία και τρεις εν τω βάθει ομάδες νευρώνων, που ονομάζονται πυρήνες. Αυτές είναι τα βασικά γάγγλια, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην κίνηση, ο ιπποκάμπος σχηματισμός, σημαντικός στην μνήμη, και η αμυγδαλή. Η αμυγδαλή συγκεκριμένα, εμπλέκεται κυρίως σε συναισθηματικές καταστάσεις όπως φόβος, άγχος, στρες. Ο φλοιός των εγκεφαλικών ημισφαιρίων είναι η έντονα πτυχωτή επιφάνεια των ημισφαιρίων. Οι επιφανειακές, ανυψωμένες περιοχές, οι έλικες, χωρίζονται από αύλακες. Οι μικρότερες αύλακες ποικίλλουν μεταξύ των ατόμων, αλλά οι μεγαλύτερες είναι πιο σταθερές χωροταξικά, επομένως είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν ως ορόσημα για τη διαίρεση του φλοιού σε τέσσερις λοβούς, οι οποίοι

ονομάστηκαν σύμφωνα με τα υπερκείμενα οστά του κρανίου: μετωπιαίος, βρεγματικός, κροταφικός και ινιακός.



Εικόνα 1.1: Ανεπτυγμένη όψη των κύριων υποδιαίρεσεων του κεντρικού νευρικού συστήματος.

Παρόλο που το κάθε ημισφαίριο έχει ειδικές λειτουργίες, και τα δύο σχετίζονται με αντιληπτικές, γνωστικές και ανώτερες κινητικές λειτουργίες, καθώς και με το συναίσθημα και τη μνήμη. Ο μετωπιαίος λοβός σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με τον προγραμματισμό της μελλοντικής δράσης και με τον έλεγχο της κίνησης, ο βρεγματικός λοβός με την αίσθηση της αφής και την απεικόνιση του σώματος, ο ινιακός λοβός με την όραση ενώ ο κροταφικός με την ακοή και με πλευρές της μάθησης, της μνήμης και των συναισθημάτων (εικόνα 1.2).



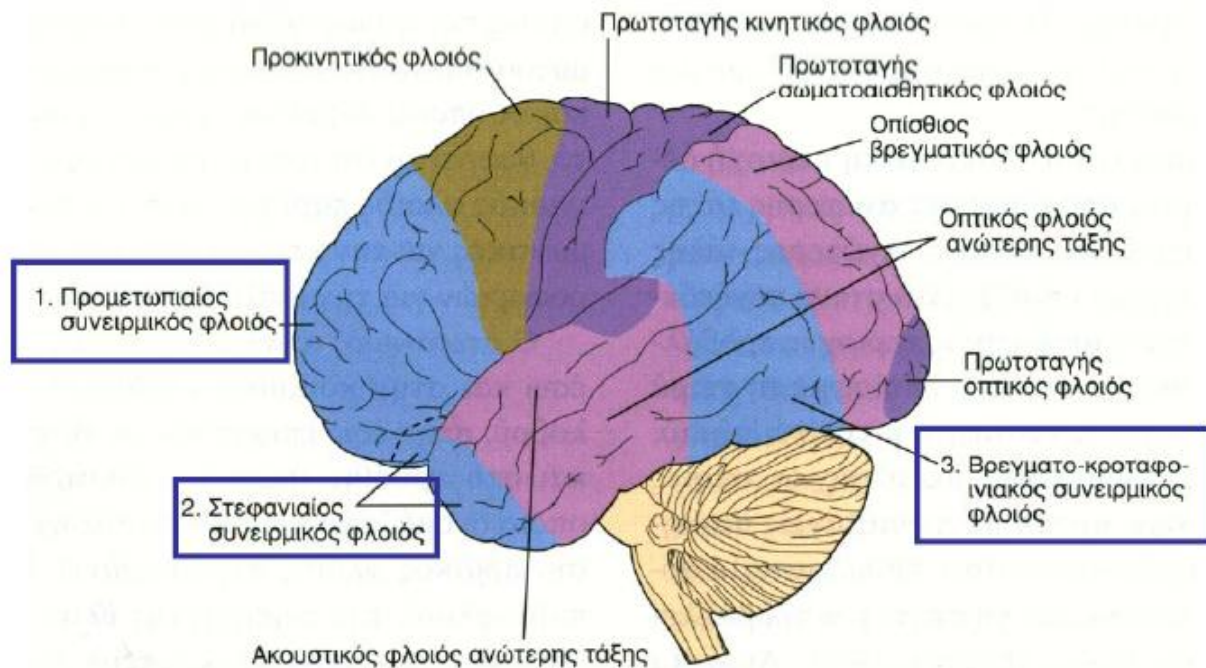
Εικόνα1.2: οι κύριες μοίρες των εγκεφαλικών ημισφαιρίων του ανθρώπου είναι ο μετωπιαίος, ο βρεγματικός, ο κροταφικός και ο ινιακός λοβός. Ο φλοιός κάθε λοβού σχηματίζει πτυχές ή έλικες που χωρίζονται μεταξύ τους από αύλακες. Τα όρια μεταξύ των λοβών ορίζονται σχετικά αυθαίρετα με τις κύριες αύλακες.

Ο φλοιός των εγκεφαλικών ημισφαιρίων έχει δυο σημαντικά χαρακτηριστικά οργάνωσης. Πρώτον, κάθε ημισφαίριο σχετίζεται κυρίως με αισθητικές και κινητικές λειτουργίες του αντίθετου ή αντίπλευρου ημιμορίου του σώματος. Μια αισθητική πληροφορία που εισέρχεται στον νωτιαίο μυελό από την αριστερή πλευρά του σώματος φέρεται στη δεξιά πλευρά του νευρικού συστήματος προτού μεταβιβαστεί στον φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων. Αντίστοιχα, οι κινητικές περιοχές στο ένα ημισφαίριο του εγκεφάλου ασκούν έλεγχο των κινήσεων του αντίθετου ημιμορίου του σώματος. Δεύτερον, παρόλο που τα ημισφαίρια φαίνεται να είναι όμοια στον άνθρωπο, δεν είναι απόλυτα συμμετρικά ως προς την κατασκευή ούτε ισοδύναμα ως προς τη λειτουργία.

Ο φλοιός της νήσου και ο στεφανιαίος φλοιός είναι δυο ακόμα περιοχές του φλοιού που δεν εντοπίζονται στην επιφάνεια του εγκεφάλου. Ο φλοιός της νήσου καταλαμβάνει το έσω τοίχωμα της πλάγιας αύλακας ενώ αντίστοιχα ο στεφανιαίος φλοιός αποτελείται από τα έσω

τμήματα του μετωπιαίου, του βρεγματικού και του κροταφικού λοβού τα οποία σχηματίζουν μια συνεχή ζώνη φλοιού επάνω από το πρόσθιο εγκεφαλικό στέλεχος και από τον διάμεσο εγκέφαλο. Η εν λόγω ζώνη, θεωρείται ενιαία λειτουργικά καθώς οι νευρώνες που την απαρτίζουν σχηματίζουν σύνθετα κυκλώματα σημαντικά για τη μάθηση, την μνήμη και το συναίσθημα.

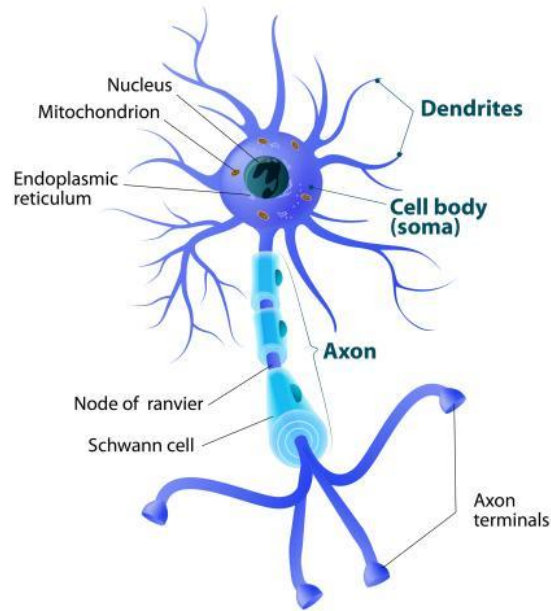
Όπως αναφέρθηκε ήδη, πολλές από τις περιοχές του φλοιού επεξεργάζονται αισθητικές και κινητικές πληροφορίες. Ανάλογα με το επίπεδο επεξεργασίας των πληροφοριών που επεξεργάζονται οι περιοχές διακρίνονται σε πρωτοταγείς, οι οποίες δέχονται ερεθίσματα κατευθείαν από το νωτιαίο μυελό ή από τα περιφερικά υποδεκτικά όργανα, οι δευτεροταγείς, οι οποίες δέχονται ερεθίσματα από τους πρωτοταγείς και επεξεργάζονται πιο σύνθετες πλευρές των πληροφοριών, οι τριτοταγείς, οι οποίες είναι ακόμα πιο σύνθετες και τέλος, οι συνειρμικές στις οποίες συνδυάζονται τα δεδομένα αισθητήριων, κινητικών και μαιχμιακών περιοχών και σχηματίζεται η ενιαία αντίληψη. Ο προμετωπιαίος, ο βρεγματο-κροταφικό-νιακός και ο στεφανιαίος συνειρμικός φλοιός είναι οι τρεις συνειρμικές περιοχές του φλοιού που μετέχουν σε διαφορετικές γνωστικές λειτουργίες όπως είναι οι εκούσιες κινήσεις, η αισθητική αντίληψη, η συναισθηματική συμπεριφορά, η μνήμη και η γλώσσα (*εικόνα 1.3*). Ο προμετωπιαίος συνειρμικός φλοιός είναι μια από τις δύο περιοχές του μετωπιαίου λοβού που βρίσκονται μπροστά από την πρωτοταγή κινητική περιοχή. Η άλλη περιοχή είναι ο προκινητικός φλοιός, μια κινητική περιοχή ανώτερης τάξης, η οποία περιλαμβάνει τη συμπληρωματική κινητική περιοχή καθώς και την προκινητική περιοχή. Η προκινητική περιοχή είναι σημαντική για την έναρξη της δράσης, ενώ η προμετωπιαία αποτελεί το κέντρο σχεδίασης των εκούσιων κινήσεων. Ο βρεγματο-κροταφικό-νιακός φλοιός παρέχει τις συνδέσεις που είναι σημαντικές για την επεξεργασία των αισθητικών πληροφοριών για την αντίληψη και τη γλώσσα. Ενώ τέλος, ο στεφανιαίος συνειρμικός φλοιός δέχεται προβολές από ανώτερης τάξης αισθητικές περιοχές και χορηγεί ίνες σε άλλες φλοιικές περιοχές συμπεριλαμβανομένου και του προμετωπιαίου φλοιού. Η οδός αυτή βρίσκεται σε σημεία του βρεγματικού, του μετωπιαίου και του κροταφικού λοβού και επιτρέπει την κινητοποίηση, το συναίσθημα και τη μνήμη (Kandel et al., 2011).



Εικόνα 1.3: Η έξω επιφάνεια του εγκεφάλου του ανθρώπου, στην οποία φαίνονται οι περιοχές του πρωτοταγούς αισθητικού και πρωτοταγούς κινητικού φλοιού, του κινητικού και του αισθητικού φλοιού ανώτερης τάξης και προβάλλονται οι τρεις περιοχές του συνειρμικού φλοιού.

1.2 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΚΝΣ

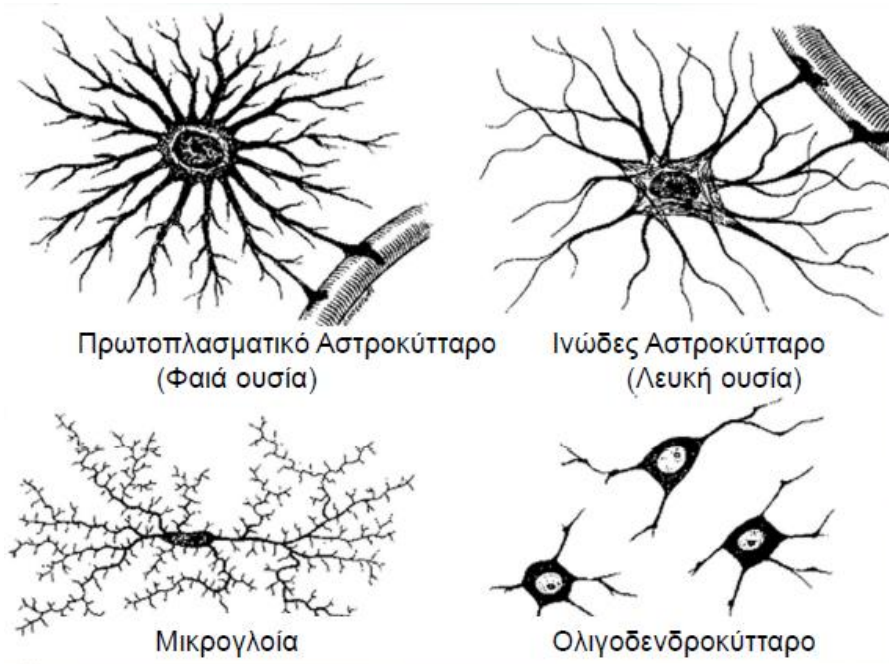
Ο νευρικός ιστός αποτελείται κυρίως από νευρώνες και νευρογλοία. Λειτουργική μονάδα του νευρικού συστήματος είναι ο νευρώνας, ένα κύτταρο του οποίου οι αποφυάδες, οι δενδρίτες και ο νευράξονας, συνάπτονται με άλλους νευρώνες σχηματίζοντας ένα δίκτυο επικοινωνιών. Οι περισσότεροι νευρώνες έχουν τα ακόλουθα μέρη: κυτταρικό σώμα, έναν ή περισσότερους δενδρίτες και έναν νευράξονα (**εικόνα 1.4**). Το κυτταρικό σώμα έχει σχήμα σφαιρικό, ωοειδές ή πολυγωνικό, ενώ περιέχει ένα σφαιρικό ευμεγέθη πυρήνα, τραχύ κοκκιώδες ενδοπλασματικό δίκτυο & ριβοσώματα (σωμάτια του Nissl), μιτοχόνδρια, νευροϊνίδια & μικροσωληνίσκους, χρωστικές και συσκευή Golgi. Με την σειρά τους οι δενδρίτες είναι προεκτάσεις του κυτταρικού σώματος και πρόκειται για πολυάριθμες αποφυάδες ποικίλου μεγέθους. Τέλος, ο νευράξονας ο οποίος εκφύεται από το κυτταρικό σώμα (ή μερικές φορές από δενδρίτη) σε μια εξειδικευμένη περιοχή που ονομάζεται εκφυτικός κώνος, είναι μια μονή κυλινδρική αποφυάδα με σταθερή διάμετρο υπεύθυνη για την παραγωγή και μεταφορά των νευρικών ερεθισμάτων σε άλλα κύτταρα (π.χ. νευρικά, μυϊκά, αδενικά) (Παυλίδης, 2011).



Εικόνα 1.4: Τμήματα και οργανίδια ενός νευρώνα. Το κυτταρικό σώμα (cell body) με τον πυρήνα (nucleus), ο οποίος είναι η αποθήκη των γενετικών πληροφοριών. Από εκεί εκφύονται οι δενδρίτες (dendrites) και ο νευράξονας (axon).

Στήριξη στους νευρώνες παρέχουν τα νευρογλοιακά κύτταρα (εικόνα 1.5), στα οποία περιλαμβάνονται τα κύτταρα Schwann στο περιφερικό νευρικό σύστημα, και τα αστροκύτταρα και τα ολιγοδενδροκύτταρα (ή αλλιώς ολιγοδενδρογλοία) στο ΚΝΣ. Επίσης νευρογλοία θεωρούνται η μικρογλοία και τα επενδυματικά κύτταρα (Berne & Levy, 2007). Τα αστροκύτταρα είναι μεγάλα κύτταρα με μακριές αποφυάδες και έχουν κατά κύριο λόγο υποστηρικτικό και δομικό ρόλο. Πιο συγκεκριμένα, συμβάλλουν στον σχηματισμό δομικού σκελετού τόσο για την καθοδήγηση της μετανάστευσης νευρικών κυττάρων κατά την εμβρυική ανάπτυξη όσο και για τους νευρώνες του ώριμου εγκεφάλου. Επίσης συμβάλουν στην μεταφορά υγρών και ιόντων από τον εξωκυττάριο χώρο προς τα αιμοφόρα αγγεία. Με τη σειρά τους τα ολιγοδενδροκύτταρα, τα οποία είναι μικρότερα με λιγότερες αποφυάδες, συμβάλλουν στην παραγωγή μυελίνης στο ΚΝΣ. Η μυελίνη είναι μια δομή που περιτυλίγει πολλούς νευράξονες και επιτρέπει την ταχεία αγωγή των νευρικών ώσεων. Η μικρογλοία αποτελείται από εξειδικευμένα ανοσοκύτταρα (μακροφάγα) του ΚΝΣ, μικρά και πυκνά με κοντές ακανθωτές αποφυάδες. Τα κύτταρα αυτά, έχουν χαμηλό επίπεδο φαγοκυτταρικής δραστηριότητας αλλά βρίσκονται στην πρώτη γραμμή άμυνας του ΚΝΣ, υποβοηθούμενα και από άλλα μονοκύτταρα που εισέρχονται από το αίμα στον εγκέφαλο όταν χρειαστεί. Τέλος, τα επενδυματικά κύτταρα τα

οποία είναι κυλινδρικά χωρίς αποφυάδες σχηματίζουν ένα επιθήλιο που διαχωρίζει το ΚΝΣ από τις κοιλίες, μια σειρά κοιλοτήτων μέσα στον εγκέφαλο (Παυλίδης, 2011).



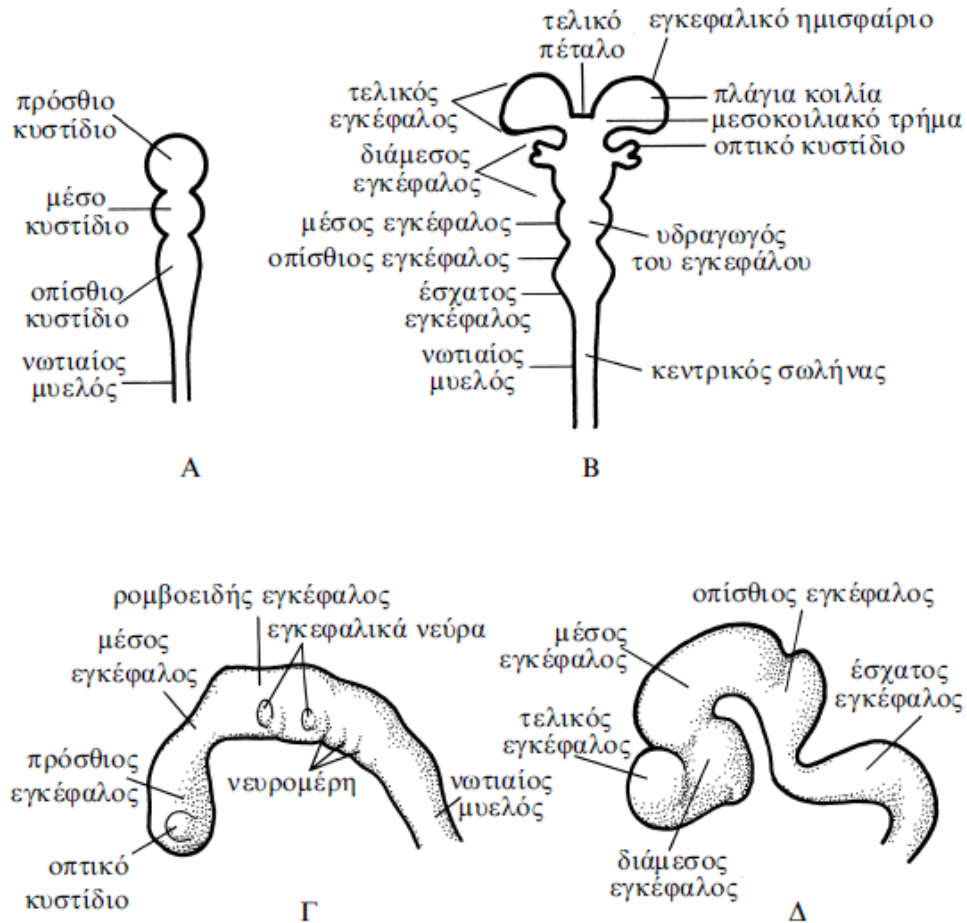
Εικόνα 1.5: Κύριοι τύποι νευρογλοιακών κυττάρων. Τα αστροκύτταρα, τα ολιγοδενδροκύτταρα και η μικρογλοία. Τα αστροκύτταρα είναι τα πιο πολυάριθμα από τα νευρογλοιακά κύτταρα.

1.3 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ

Ο ανθρώπινος εγκέφαλος αποτελεί ένα δυναμικό «ανοικτό» σύστημα που αποτελείται από πολλά αλληλεπιδρώντα και υψηλής διασυνδετικότητας λειτουργικά νευρωνικά δίκτυα, τα οποία αναπτύσσονται και οργανώνονται με έναν διαδοχικό και ιεραρχικό τρόπο, ακολουθώντας ένα γενετικό πρόγραμμα αλλά και αλληλεπιδρώντας με το περιβάλλον, από κάτω προς τα επάνω και εκ των έσω προς τα έξω, δηλαδή από τις αρχέγονες περιοχές του εγκεφάλου όπως το στέλεχος, στις πιο σύνθετες υποφλοιικές και φλοιικές περιοχές. Η ανάπτυξη του εγκεφάλου επιτελείται με εντατικούς ρυθμούς κατά την εμβρυϊκή ζωή, όμως ο εγκέφαλος δεν παύει να αναπτύσσεται και να διαφοροποιείται με τη γέννηση του οργανισμού.

Οι αλληπάλληλες κυτταρικές διαιρέσεις του γονιμοποιημένου ωαρίου, αρχικά με τη διαδικασία της αυλάκωσης, έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία αρχικά μίας συμπαγούς κυτταρικής σφαίρας, η οποία ονομάζεται μοριδίο. Τα κύτταρα της επιφάνειας του μοριδίου, βλαστομερίδια όπως αποκαλούνται, αποτελούν την τροφοβλάστη, από την οποία θα αναπτυχθούν οι εμβρυϊκοί υμένες, ενώ τα κύτταρα στο εσωτερικό του μοριδίου αποτελούν την

εμβρυοβλάστη, από την οποία θα αναπτυχθεί το έμβρυο. Για τον σχηματισμό του μεσοδέρματος ή μέσου βλαστικού δέρματος, κύτταρα της επιβλάστης μεταναστεύουν προς την αρχική γραμμή και, εισερχόμενα μεταξύ της επιβλάστης και της υποβλάστης, κινούνται προς τα εμπρός και πλάγια. Κύτταρα που μεταναστεύουν κεφαλικά από το αρχικό κομβίο αθροίζονται κατά μήκος της μέσης γραμμής και αποτελούν τη νωτιαία χορδή, η οποία θα λειτουργήσει ως επαγωγέας για τον σχηματισμό του νευρικού συστήματος. Με τη δημιουργία του μέσου βλαστικού δέρματος, το οποίο πρέπει να σημειωθεί ότι, αντίθετα με τα άλλα δύο βλαστικά δέρματα, αποτελείται από πολλούς στοιχείους κυττάρων, διαμορφώνεται το τρίστιβο γαστρίδιο. Σε αυτό το στάδιο το οποίο εντοπίζεται κατά την τρίτη εβδομάδα της εμβρυϊκής ζωής στον άνθρωπο, αρχίζει η ανάπτυξη του νευρικού συστήματος κατά μήκος της μέσης γραμμής της ραχιαίας επιφάνειας του εμβρύου. Κύτταρα του έξω βλαστικού δέρματος παχαίνουν και σχηματίζουν τη νευρική πλάκα. Η διαφοροποίηση και ο μετασχηματισμός των κυττάρων αυτών σε ειδικό ιστό, από τον οποίο θα προκύψει το νευρικό σύστημα, είναι το αποτέλεσμα μιας διαδικασίας που ονομάζεται νευρική επαγωγή και η οποία περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση της συγκεκριμένης περιοχής του εξώδέρματος με το γειτονικό μεσόδερμα και ιδιαίτερα με τη νωτιαία χορδή. Στη συνέχεια, τα πλάγια χείλη της νευρικής πλάκας ανυψώνονται και σχηματίζουν δύο επιμήκεις πτυχές, τις νευρικές μυελικές πτυχές, μεταξύ των οποίων διαμορφώνεται η νευρική αύλακα. Οι νευρικές πτυχές πλησιάζουν προοδευτικά μεταξύ τους και, όταν τελικά ενώνονται, μετατρέπουν τη νευρική αύλακα σε σωλήνα, το νευρικό σωλήνα, ο οποίος αποσυνδέεται από το επιφανειακό εξώδερμα. Η σύγκλιση του νευρικού σωλήνα, που αρχίζει στο όριο μεταξύ μελλοντικού εγκεφάλου και νωτιαίου μυελού και επεκτείνεται στη συνέχεια κεφαλικά και ουραία, αποτελεί την πρωτογενή νευροποίηση. Με τον έντονο αλλά ανομοιόβαθμο πολλαπλασιασμό του νευροεπιθηλίου εμφανίζονται τα πρώτα σημάδια διαφοροποίησης του νευρικού σωλήνα στα επιμέρους τμήματα του ΚΝΣ (*εικόνα 1.6*).



Εικόνα 1.6: Σχηματική απεικόνιση του νευρικού σωλήνα στα στάδια των τριών (Α,Γ) και των πέντε (Β,Δ) εγκεφαλικών κυστιδίων, όπως φαίνονται σε οριζόντιες τομές (Α,Β) και από πλάγια (Γ,Δ). Σημειώνονται τα παράγωγα των τοιχωμάτων και των κοιλοτήτων των κυστιδίων.

Στο πρόσθιο του άκρο, ο νευρικός σωλήνας διευρύνεται και σχηματίζονται αρχικά τα τρία πρωτογενή εγκεφαλικά κυστίδια. Συγχρόνως, ο επιμήκης άξονας αυτού του τμήματος του νευρικού σωλήνα κάμπτεται κοιλιακά, τόσο στο όριο μεταξύ μέσου και οπίσθιου κυστιδίου, όσο και στο όριο μεταξύ οπίσθιου κυστιδίου και νωτιαίου μυελού. Στη συνέχεια, το μεν κεφαλικό τμήμα του πρόσθιου κυστιδίου προσεκβάλλει σε κάθε πλάγιο σχηματίζοντας τον τελικό εγκέφαλο, το δε ουραίο τμήμα του σχηματίζει τον διάμεσο εγκέφαλο. Ταυτόχρονα, το οπίσθιο κυστίδιο διαιρείται για να σχηματίσει τον οπίσθιο και τον έσχατο εγκέφαλο. Τα πέντε αλληλοδιάδοχα εγκεφαλικά κυστίδια που προκύπτουν είναι, από εμπρός προς τα πίσω, το τελικό, το διάμεσο, το μέσο, το οπίσθιο και το έσχατο, και αποτελούν τις καταβολές των αντίστοιχων τμημάτων του εγκεφάλου.

Οι διεργασίες της νευροανάπτυξης περιλαμβάνουν τη νευρογένεση, τη μετανάστευση των νευρώνων, τη διαφοροποίηση-εξειδίκευση των νευρώνων, τη συναπτογένεση, την απόπτωση ή αλλιώς κυτταρικό θάνατος, και τη μυελίνωση. Οι πρώτοι εγκεφαλικοί νευρώνες εμφανίζονται, στον άνθρωπο, γύρω στις 40 μέρες μετά τη σύλληψη. Έχει υπολογισθεί ότι τις επόμενες 120 ημέρες οι νευρώνες σχηματίζονται με ρυθμό 580.000 το λεπτό. Κατά τη γέννηση ο εγκέφαλος διαθέτει 100 δις νευρώνες, με περίπου 10.000 συνάψεις ο καθένας, και 10 στην εκατομμυριοστή δυνατότητες νευρωνικής δραστηριότητας. Καθώς επιτελείται η νευρογένεση και ο εγκέφαλος αυξάνεται με έναν πολύπλοκο γενετικό μηχανισμό, οι νευρώνες «μεταναστεύουν», δηλαδή κατευθύνονται σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές προς συγκεκριμένες θέσεις (π.χ. φλοιός) όπου και διαφοροποιούνται. Μετά την άφιξη των νευραξόνων στους κατάλληλους στόχους, αρχίζει η δημιουργία συνάψεων. Η συναπτογένεση περιλαμβάνει τη δημιουργία επιλεκτικών συνδέσεων μεταξύ του αναπτυσσόμενου νευράξονα και των στόχων του. Υπάρχουν δύο στάδια ανάπτυξης και διατήρησης της συναπτικής ισχύος: Στο αρχικό στάδιο, η συναπτογένεση τελείται υπό τον έλεγχο γενετικών και αναπτυξιακών διεργασιών, και έτσι ολοκληρώνεται η αδρή συνδεσμολογία του νευρικού συστήματος και τίθεται σε λειτουργία ένα αδρό κύκλωμα επεξεργασίας πληροφοριών. Στο δεύτερο στάδιο γίνεται η τελική ρύθμιση των συνάψεων με βάση τη δραστηριότητα ή την εμπειρία. Με άλλα λόγια, οι συναπτικές συνδέσεις αρχίζουν να μεταβάλλονται ανάλογα με την αλληλεπίδραση του ατόμου με το περιβάλλον του, φαινόμενο που ονομάζεται νευροπλαστικότητα. Δημιουργούνται νέες συνδέσεις, οι χρήσιμες ενισχύονται, ενώ οι συνδέσεις που σπάνια χρησιμοποιούνται αποδυναμώνονται ή ακόμη και καταργούνται για πάντα. Από τους πολλαπλούς παράγοντες που επιδρούν στη συναπτική πλαστικότητα, τον σημαντικότερο ίσως ρόλο διαδραματίζει το περιβάλλον στο οποίο φιλοξενείται ο οργανισμός, καθώς και η προσπάθεια προσαρμογής του σε αυτό. Η συναπτική πλαστικότητα αποτελεί τη βιολογική βάση της μνήμης και της μάθησης, που είναι οι δύο σημαντικότεροι μηχανισμοί μέσω των οποίων το περιβάλλον επηρεάζει τη συμπεριφορά.

Όπως προαναφέρθηκε, η ανάπτυξη του εγκεφάλου επιτελείται με εντατικούς ρυθμούς κατά την εμβρυϊκή περίοδο. Μια δεύτερη περίοδος εντατικής νευροανάπτυξης και διαμόρφωσης των συναπτικών συνδέσεων παρατηρείται μετά τη γέννηση, κυρίως στα δύο πρώτα χρόνια της ζωής. Ο εγκέφαλος είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος σε εξωγενείς επιδράσεις που μπορούν να ασκήσουν μόνιμη επίδραση στη δομή και λειτουργία νευρωνικών κυκλωμάτων. Επειδή λοιπόν

τα εγκεφαλικά συστήματα αναπτύσσονται διαδοχικά και συνεπώς ωριμάζουν σε διαφορετικές χρονικές περιόδους, υπάρχουν περίοδοι ειδικής ευαισθησίας για την ανάπτυξη διαφόρων λειτουργιών (όπως άδηλη ή έκδηλη μνήμη, ρύθμιση συναισθήματος), κατά τη διάρκεια των οποίων η νευροανάπτυξη εξαρτάται από την έκθεση ή μη του βρέφους ή μικρού παιδιού σε συγκεκριμένα μικρο- και μακρο-περιβαλλοντικά ερεθίσματα, προκειμένου τα νευρωνικά δίκτυα να οργανωθούν σωστά από αδιαφοροποίητα σε πιο εξειδικευμένα. Ενώ η νευρωνική πλαστικότητα διαμορφώνει τον εγκέφαλο του παιδιού και του εφήβου σε απάντηση των αναγκών προσαρμογής του στο περιβάλλον, με την πάροδο του χρόνου η πλαστικότητα του εγκεφάλου μειώνεται αισθητά· με άλλα λόγια ο εγκέφαλος ανταποκρίνεται σε μικρότερο βαθμό με δομικές και λειτουργικές αλλαγές. Τέλος, ανάμεσα στην ηλικία των 2 ετών και την ηλικία της εφηβείας παρουσιάζεται ένα φαινόμενο που ονομάζεται «νευρωνικός δαρβινισμός»: όσοι νευρώνες δεν έχουν χρησιμοποιηθεί έως τότε πεθαίνουν ενώ αυτοί που έχουν χρησιμοποιηθεί συνεχίζουν να λειτουργούν. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει τη γενική αρχή που διέπει τη δημιουργία νευρωνικών κυκλωμάτων σύμφωνα με την οποία η επιβίωση των νευρώνων ρυθμίζεται από τις αλληλεπιδράσεις με τους στόχους τους. Εάν δεν υπάρχει στόχος, ο νευρώνας είναι πιθανόν να ατροφήσει και να πεθάνει. Οι δε συνάψεις αναδιαμορφώνονται με πολύ δυναμικό τρόπο και καθόλη τη διάρκεια της ζωής. Η έκθεση σε στρεσογόνους παράγοντες, όπως π.χ. έλλειψη οξυγόνου, αλκοόλ, ψυχοτρόπες ουσίες, νικοτίνη, λοίμωξη κατά την ενδομήτρια ζωή, δύναται να προκαλέσει ολοκληρωτική αποτυχία ή παρεμπόδιση ή παρεκκλίνουσα μετανάστευση των νευρώνων. Μάλιστα, ανωμαλίες της νευροανάπτυξης έχουν συσχετιστεί με τον αυτισμό, τη νοητική υστέρηση, τη δυσλεξία και τη σχιζοφρένεια.

1.4 ΔΙΑΒΙΒΑΣΗ ΤΩΝ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΩΝ

Κυτταρικές μελέτες έδειξαν ότι οι νευρώνες διαφορετικών περιοχών του νευρικού συστήματος των σπονδυλωτών, και στην πραγματικότητα όλων των ζώων, είναι όμοιοι. Εκείνο που διακρίνει μια περιοχή από μια άλλη είναι ο αριθμός των νευρώνων και έναν νευρώνα από τον άλλον ο τρόπος αλληλοσύνδεσής τους. Επιπρόσθετες έρευνες απέδειξαν ότι οι πληροφορίες γίνονται δεκτές από τις διάφορες περιοχές του εγκεφάλου και μεταβιβάζονται σε άλλες και ότι οι περιοχές αυτές συμβάλλουν στην αντίληψη και στη σχεδιασμένη δράση. Έτσι επιβεβαιώθηκε πως ένας από τους κυριότερους ρόλους των νευραξόνων είναι να διαβιβάζουν πληροφορίες από την περιοχή του κυτταρικού σώματος και των δενδριτών ενός νευρώνα προς τις συνάψεις πάνω

σε άλλους νευρώνες ή εκτελεστικά κύτταρα. Οι πληροφορίες γενικά διαβιβάζονται ως μια σειρά από νευρικές ώσεις. Οι νευρώνες επικοινωνούν μεταξύ τους σε εξειδικευμένες συνδέσεις που ονομάζονται συνάψεις. Ως σύναψη ορίζεται ο χώρος όπου ένα ηλεκτρικό σήμα διαβιβάζεται από το ένα κύτταρο στο άλλο (Berne & Levy, 2007).

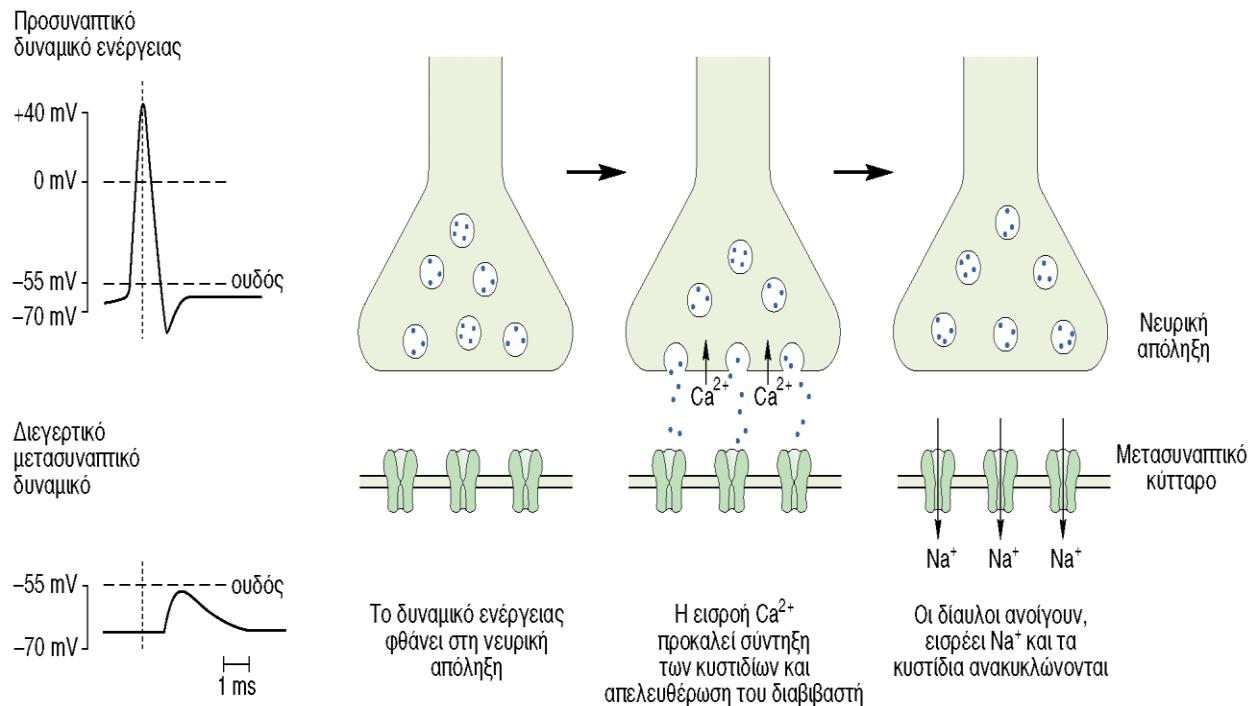
Από όλα τα κύτταρα του σώματος, οι νευρώνες έχουν την ειδική ικανότητα να επικοινωνούν ταχέως μεταξύ τους σε μεγάλες αποστάσεις και με μεγάλη ακρίβεια. Ο μέσος νευρώνας σχηματίζει 1000 περίπου συναπτικές συνδέσεις και δέχεται ακόμη περισσότερες. Ο εγκέφαλος του ανθρώπου περιέχει τουλάχιστον 10^{11} νευρώνες, αυτό σημαίνει ότι σχηματίζονται περίπου 10^{14} συναπτικές συνδέσεις στον εγκέφαλο. Παρά τον μεγάλο αριθμό συνδέσεων, η συναπτική διαβίβαση σε ολόκληρο το νευρικό σύστημα χρησιμοποιεί δυο θεμελιώδεις μηχανισμούς, την ηλεκτρική διαβίβαση και την χημική. Στον εγκέφαλο, η ηλεκτρική διαβίβαση είναι ταχεία και μάλλον στερεότυπη. Οι ηλεκτρικές συνάψεις χρησιμεύουν κυρίως για να στέλνουν απλά εκπολωτικά σήματα και δεν επιτρέπουν εύκολα ανασταλτικές δράσεις ή μακροχρόνιες μεταβολές της αποτελεσματικότητας. Αντίθετα, οι συνάψεις που λειτουργούν με χημική διαβίβαση μπορούν να δράσουν είτε διεγερτικά (Excitatory Postsynaptic Potential - EPSP) είτε ανασταλτικά (Inhibitory Postsynaptic Potential - IPSP). Σε μια διεγερτική σύναψη, η μεταβολή του δυναμικού της μετασυναπτικής μεμβράνης φέρνει το δυναμικό της μεμβράνης πιο κοντά στον ουδό εκπόλωσης. Αντίθετα, σε μια ανασταλτική σύναψη προκαλείται ένα υπερπολωτικό κλιμακωτό δυναμικό που καλείται ανασταλτικό μετασυναπτικό δυναμικό ή εναλλακτικά σταθεροποιείται το δυναμικό της μεμβράνης στην ήδη υπάρχουσα τιμή ηρεμίας. Οι χημικές συνάψεις είναι πιο ευέλικτες και έχουν την τάση να παράγουν πιο πολύπλοκες αποκρίσεις από ότι οι ηλεκτρικές συνάψεις.

Κατά τη συναπτική διαβίβαση, τον μηχανισμό δηλαδή κατά τον οποίο ένας νευρώνας επηρεάζει τη διεγερσιμότητα ενός άλλου, παίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο οι νευροδιαβιβαστές, χημικές ουσίες που συντίθενται στο προσυναπτικό κύτταρο και πακετάρονται σε κυστίδια. Οι προσυναπτικές απολήξεις περιέχουν πολλά συναπτικά κυστίδια, καθένα από τα οποία περιέχει αρκετές χιλιάδες μόρια ενός νευροδιαβιβαστή. Τα κυστίδια απελευθερώνουν τον νευροδιαβιβαστή τους στη συναπτική σχισμή, στο εξωκυττάριο χάσμα μεταξύ του προσυναπτικού και του μετασυναπτικού κυττάρου στη σύναψη, ως απόκριση στην εισροή Ca^{2+} , η οποία συνοδεύει κάθε δυναμικό ενέργειας (εικόνα 1.7). Στη συνέχεια, τα μόρια του διαβιβαστή διαχέονται στον εξωκυττάριο χώρο της συναπτικής σχισμής και προσδένονται σε

θέσεις υποδοχέα της μετασυναπτικής κυτταρικής μεμβράνης, προκαλώντας το άνοιγμα (ή το κλείσιμο) διαύλων ιόντων, με αποτέλεσμα τη μεταβολή της αγωγιμότητας της μεμβράνης και ως εκ τούτου του δυναμικού του μετασυναπτικού κυττάρου (**εικόνα 1.8**) (Kandel et al., 2011).



Εικόνα 1.7: Οι ανατομικές περιοχές της σύναψης



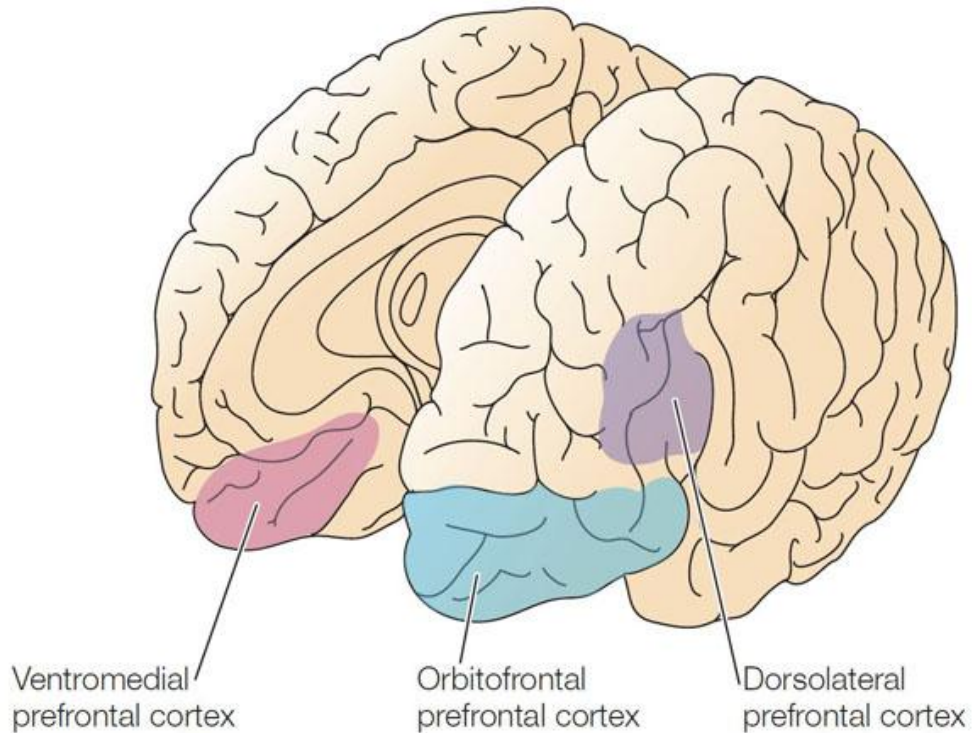
Εικόνα 1.8: Τα διάφορα στάδια της συναπτικής διαβίβασης στις χημικές συνάψεις. Ένα δυναμικό ενεργείας που φθάνει στην απόληξη ενός προσυναπτικού νευράξονα προκαλεί το άνοιγμα τασοελεγχόμενων διαύλων Ca^{2+} . Η εισροή Ca^{2+} έχει ως αποτέλεσμα τη μεγάλη αύξηση της συγκέντρωσης Ca^{2+} , το οποίο με τη σειρά του προκαλεί τη σύντηξη κυστιδίων που περιέχουν νευροδιαβιβαστή με την κυτταρική μεμβράνη και την απελευθέρωση του περιεχομένου τους στη συναπτική σχισμή. Στη συνέχεια, τα απελευθερωμένα μόρια νευροδιαβιβαστή διαχέονται στη συναπτική σχισμή και προσδένονται σε ειδικούς υποδοχείς της μετασυναπτικής μεμβράνης. Οι υποδοχείς αυτοί, προκαλούν το άνοιγμα (ή το κλείσιμο) διαύλων ιόντων με αποτέλεσμα τη μεταβολή της αγωγιμότητας της μεμβράνης και την εκπόλωση του μετασυναπτικού κυττάρου.

2. ΠΡΟΜΕΤΩΠΙΑΙΟΣ ΦΛΟΙΟΣ

Ο μετωπιαίος λοβός, υπεύθυνος για τη ρύθμιση της εκούσιας κίνησης, της σκέψης, του σχεδιασμού, της στρατηγικής, της δημιουργικότητας, του προγραμματισμού των ατομικών αναγκών και του συναισθήματος, οργανώνεται σε πολλαπλά στάδια με ιεραρχική και δυναμική δομή (Case, 1992). Το πρόσθιο τμήμα των μετωπιαίων λοβών αναφέρεται στην βιβλιογραφία ως προμετωπιαίος φλοιός (PFC) και βρίσκεται στο εμπρόσθιο τμήμα των κινητικών και προκινητικών περιοχών του εγκεφαλικού φλοιού (*εικόνα 1.3*). Αποτελεί το 30% των εγκεφαλικών δομών (Fuster, 1996) και καταλαμβάνει το ένα τρίτο των εγκεφαλικών φλοιών. Θεωρείται ότι προμετωπιαίος φλοιός είναι η περιοχή του φλοιού που λαμβάνει ερεθίσματα από τον έσω-ραχιαίο πυρήνα του θαλάμου (Kolb, 2006) και γενικά δεν αναφέρεται σε μια μεμονωμένη περιοχή αλλά σε μία ομάδα περιοχών που σχετίζονται μεταξύ τους. Ο προμετωπιαίος τροποποιεί και προσαρμόζει τη συμπεριφορά ανάλογα με τα δεδομένα, τα γεγονότα και τις απαιτήσεις του ίδιου του οργανισμού αλλά και του εξωτερικού περιβάλλοντος. Αυτή η περιοχή του εγκεφάλου ρυθμίζει τον κοινωνικό έλεγχο, όπως την καταστολή των συναισθηματικών και σεξουαλικών ορμών, εμπλέκεται στη συνείδηση, στην νόηση, στη λήψη αποφάσεων και την προσωπικότητα ενώ παράλληλα είναι υπεύθυνη για τον σχεδιασμό και την δημιουργία προσαρμοστικών στρατηγικών.

2.1 ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΠΡΟΜΕΤΩΠΙΑΙΟΥ ΦΛΟΙΟΥ

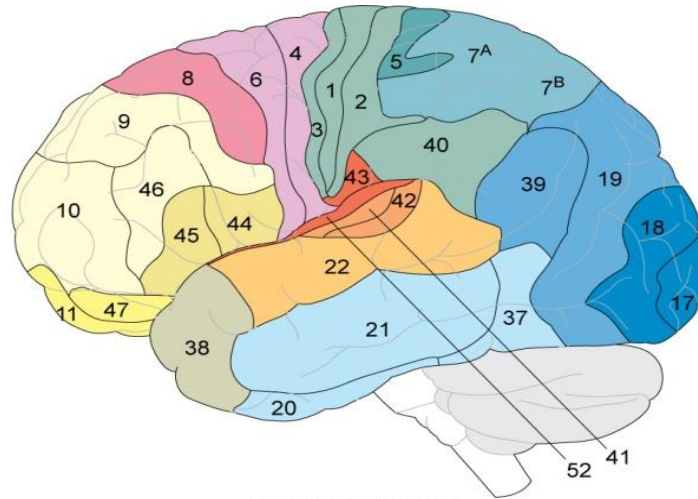
Ο Προμετωπιαίος φλοιός μπορεί να διαιρεθεί σε Έξω και Έσω τμήματα καθώς και σε Κοιλιακά και Ραχιαία. Το Έξω τμήμα υποδιαιρείται σε ραχιαίο και κοιλιακό με την κατώτερη έξω αύλακα (Moreraft et al., 2002). Από τις πιο καλά μελετημένες περιοχές του προμετωπιαίου φλοιού είναι ο έξω ραχιαίος, ο κογχομετωπιαίος και η έσω κοιλιακή περιοχή (*εικόνα 2.1*). Ο έξω ραχιαίος προμετωπιαίος φλοιός προβάλλει στον πρόσθιο φλοιό του προσαγωγίου και στον κογχομετωπιαίο φλοιό. Και οι τρεις αυτές περιοχές προβάλλουν στο κοιλιακό ραβδωτό σώμα, μια περιοχή πλούσια σε ντοπαμινεργικές συνάψεις, σημαντική για την τελική εκδήλωση της συμπεριφοράς. Ο κογχομετωπιαίος φλοιός είναι μέρος του στεφανιαίου (μetailχμιακού) συνειρμικού φλοιού και συνδέεται άμεσα με δομές του στεφανιαίου συστήματος όπως είναι η αμυγδαλή.



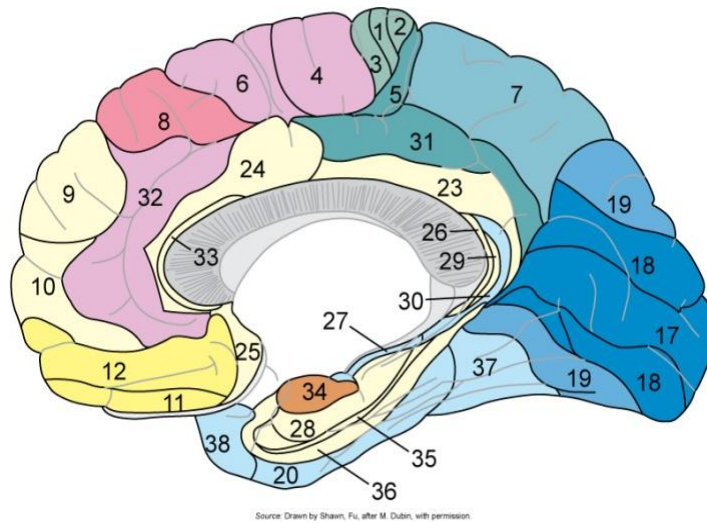
Εικόνα 2.1: Τρεις περιοχές στις οποίες διακρίνεται ο προμετωπιαίος φλοιός. Η έξω ραχιαία (dorsolateral), η κογχομετωπιαία (orbitofrontal) και η έσω κοιλιακή περιοχή (ventromedial).

Κυτταροαρχιτεκτονικά ο προμετωπιαίος φλοιός καθορίζεται από την απουσία κοκκώδους στιβάδας IV ενώ ανατομικά περιέχει τις εξής περιοχές κατά Brodmann 8, 9, 10, 11, 12, 44, 45, 46, και 47, καθεμία από τις οποίες χαρακτηρίζεται με ένα δικό της όνομα και είναι υπεύθυνη για διαφορετική λειτουργία από τις υπόλοιπες. Στην εξωτερική όψη του προμετωπιαίου φλοιού εντοπίζονται τα πεδία κατά Brodmann 8, 9, 10, 11, 44, 45, 46, και 47 (**εικόνα 2.2**), ενώ στην έσω όψη του προμετωπιαίου οι υποδιαιρέσεις κατά Brodmann 8, 9, 10, 11 και 12 (**εικόνα 2.3**). Πιο συγκεκριμένα, η περιοχή 8 περιλαμβάνει το τμήμα του προμετωπιαίου που δέχεται οπτικές πληροφορίες και το πεδίο 9 αντιπροσωπεύει το έξω ραχιαίο τμήμα του προμετωπιαίου φλοιού. Αντίστοιχα το πεδίο 10 είναι στον ρυγχαίο προμετωπιαίο φλοιό, δηλαδή στο πρόσθιο τμήμα της άνω και μέσης πρόσθιας έλικας, ενώ το πεδίο 11 και 12 στο τμήμα του κογχομετωπιαίου φλοιού. Ως κογχομετωπιαίος φλοιός αναφέρεται η περιοχή μεταξύ της άνω πρόσθιας έλικας και της κάτω πρόσθιας αύλακας. Το πεδίο 44 στη συνέχεια, είναι το Pars opercularis, δηλαδή το τμήμα της κατώτερης πρόσθιας έλικας και αποτελεί τμήμα της περιοχής Broca, περιοχή που ελέγχει τις κινήσεις της έκφρασης του προσώπου, της άρθρωσης και της φώνησης. Το πεδίο 45 με την σειρά του βρίσκεται στο τμήμα του έξω

ραχιαίου προμετωπιαίου φλοιού, ενώ το 47 στο κογχιαίο τμήμα, μέρος δηλαδή της κατώτερης πρόσθιας έλικας.



Εικόνα 2.2: Έξω όψη του Προμετωπιαίου: Πεδία κατά Brodmann 8, 9, 10, 11, 44, 45, 46, και 47.



Εικόνα 2.3: Έσω όψη του Προμετωπιαίου: Πεδία κατά Brodmann 8, 9, 10, 11 και 12.

Είναι σημαντικό να τονιστεί πως υπάρχουν ανατομικές και λειτουργικές διαφορές ανάμεσα στον προμετωπιαίο φλοιό ανθρώπινου εγκέφαλου και στον εγκέφαλο άλλων πρωτευόντων ή των τρωκτικών. Στηριζόμενοι κυρίως στην κυτταροαρχιτεκτονική και στις διασυνδέσεις των εγκεφαλικών δομών, οι Groenewegen και Uylings (2000) και Uylings με τους van Eden (1990) πρότειναν μια ανατομική προσέγγιση του προμετωπιαίου φλοιού των

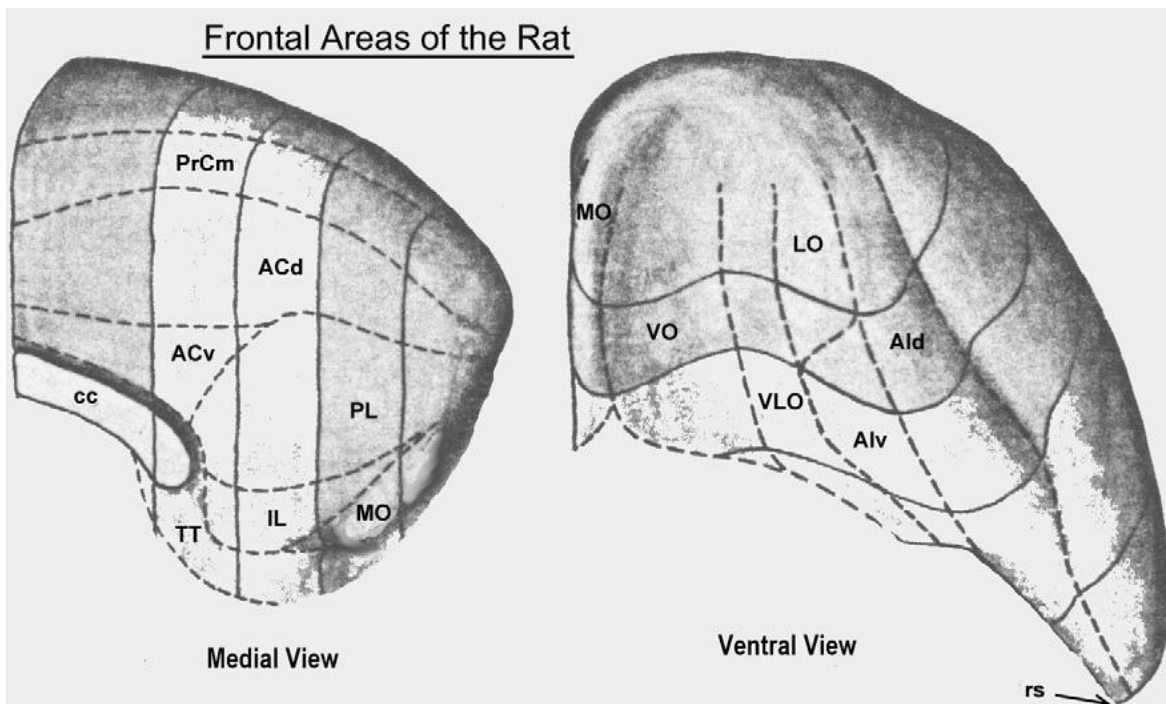
αρουραίων οργανωμένη σε υποπεριοχές. Οι υποπεριοχές αυτές περιλαμβάνουν τον έσω ραχιαίο, τον έσω κοιλιακό, τον έξω ραχιαίο και τον έξω κοιλιακό προμετωπιαίο φλοιό (*εικόνα 2.4*).

Ο έσω ραχιαίος προμετωπιαίος φλοιός περιλαμβάνει έσω ραχιαία περιοχή η οποία περιλαμβάνει τον προκεντρικό φλοιό (precentral cortex - PrCm) και τον πρόσθιο φλοιό του προσαγωγίου (anterior cingulate cortex - AC). Οι πρωτογενείς προσαγωγές και απαγωγές συνδέσεις των εν λόγω περιοχών συσχετίζονται με αισθητικά και κινητικά νεύρα καθώς οι προβολές του PrCm νευρώνουν το κεντρικό τμήμα του συμπλέγματος κερκοφόρου-κελύφους ενώ παράλληλα ο AC νευρώνει τον επικληνή πυρήνα (Heidbreder et al., 2003).

Ο έσω κοιλιακός προμετωπιαίος φλοιός με την σειρά του, μπορεί να υποδιαιρεθεί στον προμεταιχμιακό (prelimbic - PL), υπομεταιχμιακό (infralimbic - IL) και έσω κογχομετωπιαίο φλοιό (medial orbital cortices - MO). Οι πρωτογενείς προσαγωγές συνδέσεις των συγκεκριμένων περιοχών περιλαμβάνουν τον έσω ραχιαίο (medial dorsal nucleus) και τον παραταινιακό πυρήνα του θαλάμου (parataenial nucleus of the thalamus), δομές του μεταχμιακού σύστημα (limbic system), όπως τον υπόκαμπο και τον βασικό πυρήνα της αμυγδαλής. Απαγωγές συνδέσεις των περιοχών περιλαμβάνουν το έσω-κοιλιακό τμήμα του συμπλέγματος κερκοφόρου-κελύφους (ventromedial part of the caudate-putame), το έσω τμήμα του επικληνή πυρήνα (core of the nucleus accumbens), ενώ ταυτόχρονα, τμήματα των περιοχών IL και MO προβάλλουν προς το έσω κέλυφος του επικληνή πυρήνα (medial shell of the nucleus accumbens) (Heidbreder et al., 2003; Hoover et al., 2007).

Ο έξω ραχιαίος προμετωπιαίος φλοιός μπορεί να υποδιαιρεθεί στον φλοιό της νήσου [ραχιαίος και κοιλιακός φλοιό της νήσους (dorsal and ventral agranular insular - AI)] και τον έξω κογχομετωπιαίο φλοιό (lateral orbital cortices - LO)]. Οι προσαγωγές συνδέσεις των εν λόγω περιοχών περιλαμβάνουν τον οσφρητικό φλοιό (pyriform cortex) και τον οσφρητικό λοβό (olfactory bulb), τον γευστικό φλοιό και τον θάλαμο (gustatory cortex and gustatory thalamus), τμήματα της σωματοαισθητικής περιοχής I και II, τμήματα του βρεγματικού και οπτικού φλοιού καθώς και περιοχές του έσω ραχιαίου πυρήνα και του κεντρικού έσω πυρήνα του θαλάμου (medial dorsal nucleus and central medial nucleus of the thalamus). Απαγωγές συνδέσεις των περιοχών AI περιλαμβάνουν τμήμα του έξω-κοιλιακού συμπλέγματος κερκοφόρου-κελύφους (ventrolateral part of the caudate-putamen), ενώ τμήματα του LO προβάλλουν στο κεντρικό τμήμα του κερκοφόρου κελύφους (Ongur et al., 2000; Reep et al., 1996).

Ο έξω κοιλιακός προμετωπιαίος φλοιός στους αρουραίους μπορεί να υποδιαιρεθεί σε κοιλιακό κογχομετωπιαίο φλοιό (ventral orbital - VO) και σε έξω-κοιλιακό κογχομετωπιαίο φλοιό (ventrolateral orbital - VLO). Οι προσαγωγές συνδέσεις των εν λόγω περιοχών περιλαμβάνουν τον βρεγματικό φλοιό, τμήματα του οπτικού φλοιού, τον έσω ραχιαίο πυρήνα και τον κεντρικό έσω πυρήνα του θαλάμου. Απαγωγές συνδέσεις των περιοχών VLO και LO προβάλλουν στον ραχιαίο κεντρικό κερκοφόρο (dorsal central caudate), στον οπίσθιο βρεγματικό φλοιό, στον δευτερεύοντα οπτικό φλοιό και στον οσφρητικό λοβό.



Εικόνα 2.4: Μετωπιαία όψη σε εγκέφαλο αρουραίου. Α. Έσω όψη (Medial view). Β. Κοιλιακή όψη (Ventral view). PrCm – precentral cortex; AC – dorsal and ventral anterior cingulate; PL–IL – prelimbic and infralimbic cortex; MO – medial orbital cortex; AI – dorsal and ventral agranular insular cortex; LO – lateral orbital cortex; VO – ventral orbital cortex; VLO – ventrolateral orbital cortex.

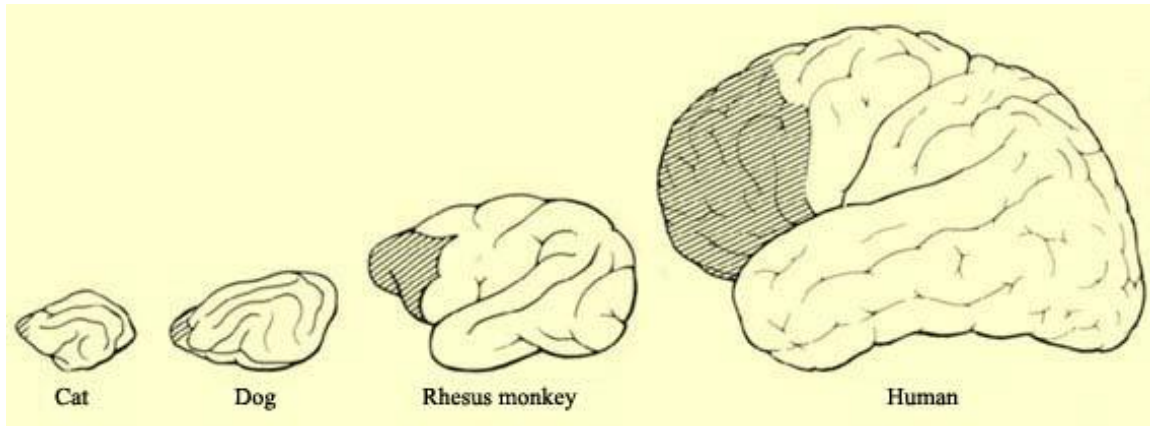
2.2 ΔΙΑΣΥΝΔΕΣΕΙΣ ΠΡΟΜΕΤΩΠΙΑΙΟΥ ΦΛΟΙΟΥ

Συσχετίζοντας ένα μεγάλο φάσμα νευρωνικών διεργασιών συμπεραίνεται ότι ο προμετωπιαίος φλοιός είναι μία συλλογή από περιοχές του νεοφλοιού που συνδέονται μεταξύ τους και που στέλνουν και λαμβάνουν πληροφορίες από σχεδόν όλα τα συστήματα του αισθητηριακού φλοιού, τα κινητικά συστήματα και πολλά συστήματα υποφλοιώδων δομών (Miller et al., 2001). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι ανατομικές συνδέσεις του

προμετωπιαίου φλοιού με το μεταιχμιακό σύστημα. Μέσω των συνδέσεων αυτών ελέγχει τη συγκινησιακή – συναισθηματική πλευρά της συμπεριφοράς μας. Προμετωπιαίες κυτταρικές επικοινωνίες με την αμυγδαλή, τον υποθάλαμο, τον μεσεγκέφαλο και τη γέφυρα μαρτυρούν ένα εκτεταμένο δίκτυο υποφλοιωδών διασυνδέσεων που είναι πιθανό να διασυνδέουν ανώτερες εξελικτικά λειτουργίες του προμετωπιαίου φλοιού με αυτές του αυτόνομου νευρικού συστήματος και το συναίσθημα (Roberts et al., 1994). Πρακτικά όλες οι προμετωπιαίες συνδέσεις είναι αμοιβαίες με εξαίρεση την περίπτωση των βασικών γαγγλίων στα οποία μόνο ο προμετωπιαίος στέλνει άμεσα σήματα αλλά δεν δέχεται άμεση είσοδο από αυτά (Kanki et al., 1952). Ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι ο προμετωπιαίος φλοιός είναι η μόνη περιοχή του φλοιού που προβάλλει απευθείας στον υποθάλαμο και στην διαφραγματική περιοχή (Buchanan et al., 1994). Όπως ήδη αναφέρθηκε παραπάνω, διαφορετικές περιοχές του προμετωπιαίου φλοιού έχουν διαφορετικές διασυνδέσεις. Πιο συγκεκριμένα, η κογχομετωπιαία περιοχή είναι κατά κύριο λόγο συνδεδεμένη με τον έσω θάλαμο, τον υποθάλαμο, τον έσω-κοιλιακό κεκροφόρο πυρήνα και την αμυγδαλή, ενώ η έξω ραχιαία περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού είναι κατά βάση συνδεδεμένη με τον έξω θάλαμο, τον ραχιαίο κεκροφόρο πυρήνα, τον ιππόκαμπο και τον νεοφλοιό (Cummings, 1993).

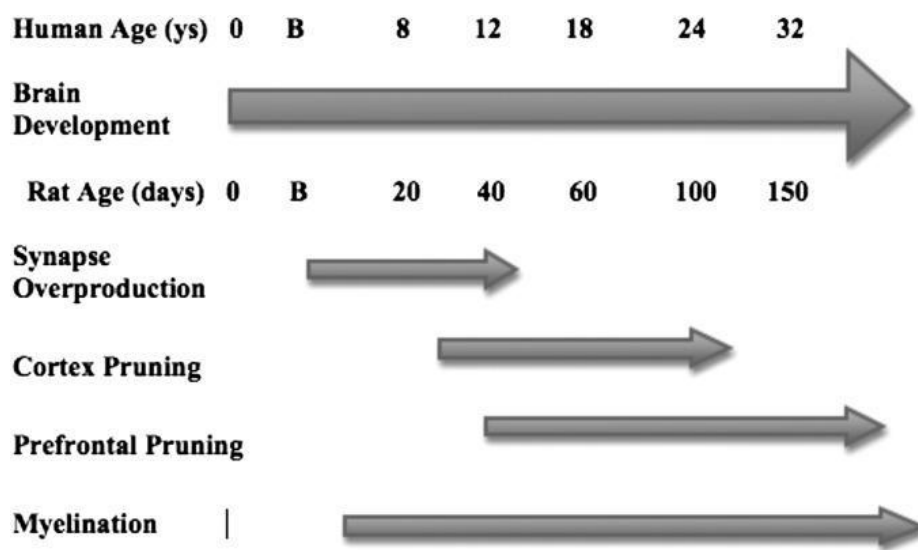
2.3 ΕΞΕΛΙΞΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΡΟΜΕΤΩΠΙΑΙΟΥ ΦΛΟΙΟΥ

Είναι γενικά αποδεκτό ότι ο προμετωπιαίος φλοιός αυξήθηκε σε μέγεθος κατά τη διάρκεια της εξέλιξης των πρωτεύοντων, ενώ μάλιστα οι Pandya και Yeterian το 1985 πρότειναν ότι η επέκταση των υποπεριοχών του προμετωπιαίου συνδέεται άμεσα με την επέκταση των αισθητικών περιοχών (Pandya et al., 1985). Έτσι, πιστεύεται ότι ο προμετωπιαίος έχει κάποια λειτουργία στη συγκλίνουσα επεξεργασία της αισθητικής πληροφορίας από διαφορετικούς τύπους αισθήσεων και όσο περισσότερες πληροφορίες επεξεργάζεται, τόσο περισσότερο αυξάνεται σε μέγεθος (*εικόνα 2.5*). Σύμφωνα με τον Brodmann (1909), ο προμετωπιαίος αντιστοιχεί στο 29% του συνόλου του φλοιού στον άνθρωπο, στο 17% του χιμπατζή, στο 11.5% στον μακάκο και στο 3.5% στη γάτα. Στις φάλαινες και τα δελφίνια που έχουν επίσης μεγάλους εγκεφάλους, ανεπτυγμένος φαίνεται ο βρεγματικός και όχι ο προμετωπιαίος. Με άλλα λόγια, ο προμετωπιαίος φλοιός είναι η περιοχή του νεοφλοιού που είναι περισσότερο αναπτυγμένη στα πρωτεύοντα, ζώα τα οποία είναι γνωστά για την ευέλικτη συμπεριφορά τους.



Εικόνα 2.5: Σύγκριση των πρόσθιων λοβών του εγκεφάλου μεταξύ ανθρωποειδών και μη-ανθρωποειδών ειδών. Σύμφωνα με τον Brodmann (1909), ο προμετωπιαίος φλοιός αντιστοιχεί στο 29% του συνόλου του φλοιού στον άνθρωπο, στο 17% του χιμπατζή, στο 11.5% στον μακάκο και στο 3.5% στη γάτα.

Σε μια αναπτυξιακή προσέγγιση είναι γνωστό ότι στο ανθρώπινο είδος, τα κύτταρα που προορίζονται να γίνουν νευρικά με σκοπό να απαρτίσουν το νευρικό σύστημα ξεκινούν να παράγονται περίπου 3 εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση, παρόλο που η ωρίμανση του εγκεφαλικού φλοιού δεν έχει ολοκληρωθεί έως ότου το άτομο φτάσει στην τέταρτη δεκαετία της ζωής του (**εικόνα 2.6**). Εν συντομία, οι νευρώνες γεννιούνται, μεταναστεύουν στην αντίστοιχη περιοχή του εγκεφαλικού φλοιού, ωριμάζουν, σχηματίζουν συνάψεις και παράλληλα δημιουργούνται τα νευρογλοιακά κύτταρα. Λόγω της πολυπλοκότητας του υπό ανάπτυξη εγκεφάλου, υπάρχει μία υπερπαραγωγή νευρώνων και των μεταξύ τους συνδέσεων στα αρχικά στάδια της ζωής.



Εικόνα 2.6: Χρονοδιάγραμμα της ανάπτυξης του εγκεφάλου στα τρωκτικά και τον άνθρωπο (B: γέννηση)

Πιο συγκεκριμένα, στα αρχικά στάδια του σχηματισμού του εγκεφάλου αναπτύσσονται βασικές δομές, όπως ο ινιακός λοβός και οι αισθητικοκινητικές περιοχές του φλοιού (Gogtay, 2004; Gogtay et al., 2010; Shaw et al., 2008). Ο υπόλοιπος φλοιός αναπτύσσεται από τον βρεγματικό προς τον μετωπιαίο φλοιό για να διασφαλιστεί η κινητική και αισθητηριακή λειτουργία, συμπεριλαμβανομένων της όρασης, της γεύσης, της οσμής. Στη συνέχεια, ακολουθούν περιοχές του εγκεφάλου που αφορούν το χωρικό προσανατολισμό, την ομιλία, τη γλώσσα και την προσοχή. Πιο συγκεκριμένα, σύνθετες εξελικτικά και λειτουργικά περιοχές του προμετωπιαίου, όπως ο έξω ραχιαίος προμετωπιαίος εγκέφαλος, που συμμετέχουν στις ανώτερες γνωστικές λειτουργίες, διαμορφώνονται κατά τα τελευταία στάδια του σχηματισμού του εγκεφάλου. Επομένως, περιοχές που συνδυάζουν λειτουργίες άλλων τμημάτων του εγκεφάλου, αναπτύσσονται μόνο όταν κατώτερης τάξης περιοχές του φλοιού έχουν ωριμάσει δομικά και λειτουργικά (Gogtay, 2004; Gogtay et al., 2010; Shaw et al., 2008).

Γενικότερα, η ανάπτυξη του εγκεφαλικού φλοιού αναπαριστά μία σύνθεση περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων. Μάλιστα, προ- και μεταγεννητικά περιβαλλοντικά γεγονότα, όπως τα διάφορα αισθητηριακά ερεθίσματα, οι ορμόνες, το στρες, τα ψυχοδραστικά φάρμακα τροποποιούν την ανάπτυξη του εγκεφαλικού φλοιού και τελικά τη συμπεριφορά του ενήλικου ατόμου. Για το λόγο αυτό όλες οι περιοχές του εγκεφαλικού φλοιού επηρεάζονται από πρώιμες εμπειρίες τα αποτελέσματα των οποίων έχουν διαφορετική επίδραση στην κάθε περιοχή του φλοιού. Είναι επίσης ενδιαφέρον το γεγονός ότι οι περιοχές του προμετωπιαίου φλοιού είναι από τις τελευταίες του εγκεφαλικού φλοιού που μυελώνονται κατά την εφηβεία (Fuster, 1997). Η συγκεκριμένη παρατεταμένη σε διάρκεια ανάπτυξή του, του επιτρέπει την απόκτηση σύνθετων γνωστικών ικανοτήτων μέσω διαφόρων εμπειριών ενώ ταυτόχρονα τον καθιστά ευάλωτο σε παράγοντες που σχετίζονται με δυσλειτουργίες οι οποίες συχνά εκδηλώνονται μέσω πολυάριθμων νευροψυχιατρικών διαταραχών.

Εμπειριστατωμένα αποδεικνύεται πια, ότι οι εμπειρίες επηρεάζουν την οργάνωση του φλοιού. Το κυριότερο αποδεικτικό χαρακτηριστικό είναι η πυκνότητα των δενδριτικών ακάνθων, χαρακτηριστικό που αντιπροσωπεύει τον αριθμό των διεγερτικών συνάψεων στους νευρώνες. Είναι γεγονός ότι στην παιδική ηλικία ο εν λόγω αριθμός είναι διπλάσιος ή και τριπλάσιος συγκριτικά με την ενήλικη ζωή, μάλιστα στον άνθρωπο η συναπτική πυκνότητα φτάνει στο μέγιστό της μεταξύ του ενός και των πέντε ετών της ζωής, ανάλογα με την περιοχή του φλοιού: νωρίτερα για τον αισθητικό φλοιό και αργότερα για τον προμετωπιαίο (Petanjek,

2011). Σημαντικό είναι να τονιστεί ότι αυτή η υπερπαραγωγή των συνάψεων αντιστρέφεται στο τέλος της παιδικής ηλικίας αν και στον προμετωπιαίο φλοιό συνεχίζει μέχρι και την τρίτη δεκαετία της ζωής (Petanjek, 2011). Ένα άλλο χαρακτηριστικό είναι ότι ενώ στον προμετωπιαίο παρατηρείται η μεγαλύτερη παραγωγή ακάνθων, ακολουθείται από τον βραδύτερο ρυθμό συναπτικής απώλειας (Elston et al., 2009). Η συγκεκριμένη ασυνήθιστα μεγάλη περίοδος αναπροσαρμογής των δενδριτικών ακανθών στον προμετωπιαίο έχει επιπτώσεις στην κατανόηση της επίδρασης του περιβάλλοντος στις επιτελικές λειτουργίες κατά την ενήλικη ζωή. Υποστηρίζεται ότι η ανάπτυξη των νευρωνικών κυκλωμάτων του προμετωπιαίου που αργότερα θα αποτελέσουν τη βάση για τις ανώτερες γνωστικές λειτουργίες, λαμβάνει χώρα ανάμεσα στην περίοδο της πρώιμης παιδικής ηλικίας και έως ότου το παιδί να πάει παιδικό σταθμό (Tsujiimoto, 2008). Είναι εμφανές πια ότι οι πρώιμες εμπειρίες στη ζωή μπορούν επομένως να επηρεάσουν το βασικό κύκλωμα που τροποποιείται κατά την εφηβεία. Είναι δεδομένο λοιπόν πως, οι πρώιμες εμπειρίες καθορίζουν την ανάπτυξη του προμετωπιαίου και έχουν μακροπρόθεσμες συνέπειες στη ρύθμιση της συμπεριφοράς.

Η πολυπλοκότητα των λειτουργιών του προμετωπιαίου φλοιού είναι μέγιστη στους ανθρώπους και απλούστερη σε θηλαστικά όπως τα τρωκτικά. Παρόλα αυτά σε κάθε τάξη θηλαστικών, υπάρχουν λειτουργίες χαρακτηριστικές για αυτή την τάξη με τις οποίες σχετίζεται ο προμετωπιαίος. Είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι εάν οι πρώιμες εμπειρίες επηρεάσουν δραματικά το κύκλωμα του προμετωπιαίου και τη συμπεριφορά σε πειραματόζωα όπως οι αρουραίοι, ανάλογες εμπειρίες είναι πιθανό να έχουν μεγαλύτερη επίδραση σε έναν ακόμη πιο σύνθετα οργανωμένο προμετωπιαίο, όπως για παράδειγμα στους ανθρώπους.

2.4 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΠΡΟΜΕΤΩΠΙΑΙΟΥ ΦΛΟΙΟΥ

Υπάρχουν πια σημαντικά στοιχεία για τον μείζονα ρόλο που παίζει ο προμετωπιαίος φλοιός στις διαδικασίες ελέγχου οι οποίες ασκούν μια εκ των άνω ρύθμιση της νόησης και της συμπεριφοράς. Οι διαφορές στη δομή των περιοχών του προμετωπιαίου φλοιού που αντικατοπτρίζονται στην κυτταροαρχιτεκτονική τους, όπως και οι διαφορετικές συνδέσεις με άλλες φλοιώδεις και υποφλοιώδεις εγκεφαλικές δομές, δείχνουν ότι οι περιοχές αυτές συμμετέχουν σε ξεχωριστές διαδικασίες ελέγχου της νόησης και της συμπεριφοράς που συνιστούν τον τομέα της προμετωπιαίας λειτουργίας (Luria, 1969; Stuss et al, 1986; Fuster, 1989; Petrides, 1996; Robbins, 1996; Shallice et al, 1996; Duncan et al., 2000; Postle et al.,

2000). Οι μετωπιαίοι λοβοί επιβλέπουν γνωστικές διεργασίες όπως η μνήμη, η προσοχή και εν τέλει η συνολική ανταπόκριση/συμπεριφορά. Ο έλεγχος της τελικής ανταπόκρισης προϋποθέτει ουσιαστικά τη διαδικασία λήψης αποφάσεων. Ίσως η πλέον σημαντική λειτουργία του προμετωπιαίου φλοιού να είναι να σταθμίζει τις συνέπειες από μελλοντικές δράσεις και να σχεδιάζει ανάλογα τις ενέργειές μας.

Ο *έξω ραχιαίος προμετωπιαίος* φλοιός οργανώνει την κίνηση καθώς επεξεργάζεται, αξιολογεί και αλληλοσυσχετίζει πληροφορίες από το σωματοαισθητικό σύστημα, οι οποίες θα χρησιμοποιηθούν από τον κινητικό φλοιό για την εκτέλεση συγκεκριμένων κινητικών αντιδράσεων. Το κύκλωμα του επίσης, παίζει σημαντικό ρόλο σε συνιστώσες ανώτερων γνωστικών λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένου του ελέγχου της προσοχής και της συνεχούς οργάνωσης της συμπεριφοράς για την επίλυση σύνθετων προβλημάτων (Cummings, 1993; Stuss et al, 2000). Ακόμα, είναι απαραίτητο για την εστίαση της προσοχής στα σημαντικά στοιχεία των ερεθισμάτων αγνοώντας τα ασήμαντα και για την επιλογή στόχων (Abe et al, 2009). Πιο συγκεκριμένα, η εν λόγω περιοχή φαίνεται να ρυθμίζει κυρίως τις γνωστικές λειτουργίες σε σχέση με προβλήματα ουδέτερης συναισθηματικής χροιάς και όχι πληροφορίες που σχετίζονται με συναίσθημα ή κίνητρα (Zelazo et al., 2002).

Αντίθετα, η κοιλιακή περιοχή του προμετωπιαίου φαίνεται να παίζει ρόλο στην συναισθηματική ρύθμιση, τον αυτοέλεγχο και την λήψη αποφάσεων συναισθηματικής χροιάς (Damasio, 1994). Συγκεκριμένα, φαίνεται να ενεργοποιείται όταν οι αντιδράσεις του ατόμου καθορίζονται από ήδη μαθημένες συμπεριφορές ή ως συνέπεια των πεποιθήσεων του (Goel et al, 2003). Ειδικά ο *κογχομετωπιαίος* φλοιός, θεωρείται μεταιχμιακή περιοχή και παίζει σημαντικό ρόλο σε διεργασίες εγρήγορσης και αγχογένεσης. Συγκεκριμένα, ο *έξω ραχιαίος* και ο *κογχομετωπιαίος* φλοιός σχετίζονται με τη συνολική ρύθμιση της συμπεριφοράς λόγω της μοναδικής τους ιδιότητας να συλλέγουν στοιχεία αισθητηριακών, συναισθηματικών και συνειρμικών πληροφοριών καθώς και πληροφοριών αποθηκευμένων στη μνήμη (Carmichael et al., 1995a; 1995b). Αυτές οι λειτουργίες δίνουν τη δυνατότητα της νοητής αναπαράστασης των πιθανών ή αναμενόμενων αποτελεσμάτων σε μια κατάσταση, μια πληροφορία που μπορεί στη συνέχεια να παίζει καθοριστικό ρόλο στον προσανατολισμό της συμπεριφοράς (Schoenbaum et al, 2002). Δηλαδή, εμπλέκεται στη μετατόπιση του κανόνα για τη ρύθμιση της συμπεριφοράς (Hornak et al., 2004). Βλάβες του, χαρακτηρίζονται από αδυναμία ελέγχου και αναστολής της συμπεριφοράς, αντικοινωνική συμπεριφορά, συναισθηματική αστάθεια και παρορμητικότητα.

2.5 ΒΛΑΒΕΣ ΠΡΟΜΕΤΩΠΙΑΙΟΥ ΦΛΟΙΟΥ

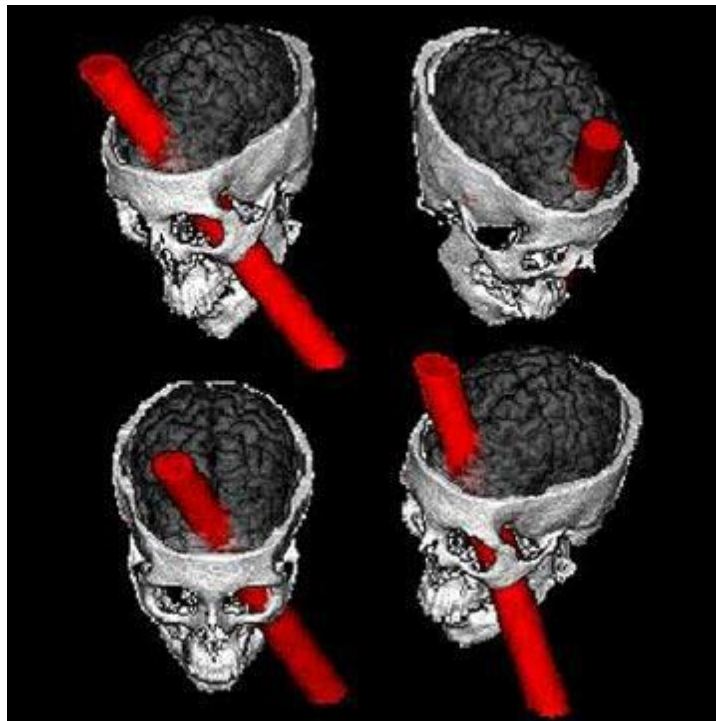
Βλάβες στον μετωπιαίο λοβό προκαλούν εξασθένηση στη δυνατότητα μάθησης αντίδρασης σε οπτικοκινητικά ερεθίσματα (Petrides, 1985; 1997). Πιο συγκεκριμένα, υποπεριοχές του, και κυρίως ο κογχομετωπιαίος φλοιός, είναι ιδιαίτερα σημαντικές για την τροποποίηση μαθημένων συνδέσεων. Οριοθετημένες βλάβες σε περιοχές εντός του κογχομετωπιαίου φλοιού σε τρωκτικά και πρωτεύοντα θηλαστικά, οδηγούν σε εμμονικές συμπεριφορές σύμφωνα με ήδη μαθημένους κανόνες. Σε σχετικές μελέτες παρά την αντιστροφή του κανόνα, τα πειραματόζωα αντιδρούσαν στα ερεθίσματα εμμονικά, παρότι μέσω της ανατροφοδότησης καθοδηγούνταν προς συγκεκριμένη, τροποποιημένη αντίδραση (Butter, 1969; Iversen et al., 1970; Jones et al., 1972; Dias et al., 1996; Izquierdo et al., 2004; Schoenbaum et al, 2002; Murray et al., 2007; Ragozzino, 2007). Ασθενείς με βλάβες στον έσω κοιλιακό προμετωπιαίο φλοιό, κάνουν λάθη στην αντιστροφή μάθησης, παρότι η δυνατότητα μάθησης νέων πληροφοριών παραμένει άθικτη (Fellows et al, 2003; Hornak et al., 2004). Ο ίδιος συμπεριφορικός φαινότυπος παρατηρείται και σε ασθενείς με δομικά και λειτουργικά προβλήματα στον κογχομετωπιαίο φλοιό, όπως και στην ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή, όπου οι εμμονικές συμπεριφορές είναι το σήμα κατατεθέν (Cavedini et al., 2002; Pujol et al., 2004; Remijnse et al., 2006; Chamberlain et al, 2008). Αυτά τα αποτελέσματα έχουν εξηγηθεί με βάση το ότι ο κογχομετωπιαίος φλοιός συμμετέχει στην αναστολή ισχυροποιημένων αντιδράσεων (Jones et al, 1972) ή ότι συμβάλει στην επικαιροποίηση των γνώσεων μέσω της επεξεργασίας της αρνητικής ανατροφοδότησης (Fellows et al., 2003).

Ο πιο διάσημος ασθενής με βλάβη στον κογχομετωπιαίο φλοιό, του οποίου η περίπτωση έχει μελετηθεί εκτενώς, είναι ο Phineas Gage (εικόνα 2.7). Το καλοκαίρι του 1848, στη Νέα Αγγλία μία σιδηροδρομική εταιρεία κατασκεύαζε μία νέα σιδηροδρομική γραμμή για τα τρένα της. Το συνεργείο ανατινάξεων το επέβλεπε ο Phineas Gage, ένας άνδρας 25 χρονών που οι συνάδελφοί του τον περιέγραφαν ως τον πιο αποτελεσματικό και ικανό επιστάτη τους. Ήταν γνωστός για τα χρηστά του ήθη, τον



Εικόνα 2.7 Ο Phineas Gage μετά τον τραυματισμό του

δυναμικό του χαρακτήρα και επίσης ήταν ένας πολύ έξυπνος επιχειρηματίας, πολύ ενεργητικός και επίμονος κατά την εκτέλεση των καθηκόντων του. Έπειτα από ένα ατύχημα που είχε στους σιδηροδρόμους, μία συμπαγής ράβδος πέρασε μέσω του κογχομετωπιαίου φλοιού του (*εικόνα 2.8*). Η βασική αλλαγή στην προσωπικότητα του Gage μετά τον τραυματισμό του ήταν η δυσκολία του να αναστείλει τη συμπεριφορά του και όπως αναφέρει ο John Harlow, ο γιατρός που δημοσίευσε την συγκεκριμένη περίπτωση ασθενούς, έχασε την ικανότητα να αξιολογεί την χρηματική αξία των αντικειμένων (MacMillan, 2000). Βλάβες στον κογχομετωπιαίο φλοιό οδηγούν σε απώλεια της δυνατότητας του ατόμου να καθοδηγεί τη συμπεριφορά του και του δημιουργούν ελλείμματα στον αυτοέλεγχο. Μετά το ατύχημα ο Gage ήταν ευερέθιστος, χωρίς σεβασμό για τους συνανθρώπους του και έβριζε με χυδαιότητα. Ήταν ανυπόμονος και υπήρχαν φορές που ήταν οργανωτικός και άλλες που ήταν ανοργάνωτος και συχνά εγκατέλειπε σχέδια μόλις ολοκλήρωνε τη δημιουργία τους ενώ επίσης δεν μπορούσε να κάνει σχέδια για το μέλλον, να ακολουθήσει τους κοινωνικούς κανόνες και συνήθειες ή να σχεδιάσει την καλύτερη λύση για ένα πρόβλημα. Κυκλοφόρησαν δεκάδες ιστορίες για την αλλαγή της προσωπικότητας του Gage μετά το ατύχημα ενώ ραγδαία επιδείνωση της υγείας του 12 χρόνια μετά το ατύχημα τον οδήγησε στο θάνατο.



Εικόνα 2.8: Σχηματική αναπαράσταση της συμπαγούς ράβδου που πέρασε μέσα από τον κογχομετωπιαίο φλοιό του Phineas Gage.

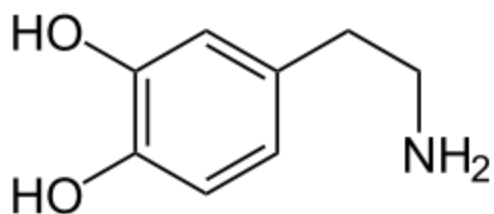
Αυτή η αλλαγή στην προσωπικότητα του Cage είναι σύμφωνη με την επικρατούσα άποψη ότι μια από τις βασικές λειτουργίες του κογχομετωπιαίου φλοιού είναι η ευελιξία, να μπορεί να αξιολογεί κανείς τη σημαντικότητα των περιβαλλοντικών ερεθισμάτων, καθορίζοντας κανόνες για το πώς το περιβάλλον επηρεάζει και επηρεάζεται από τις ενέργειές του ατόμου (Schoenbaum et al, 2006). Άλλες συνέπειες των αλλοιώσεων στον κογχομετωπιαίο φλοιό περιλαμβάνουν τις παρορμητικές και τις εμμονικές συμπεριφορές (Bechara et al, 1994; Berlin et al., 2004; Rolls, 2004). Σε περιπτώσεις μετωποκροταφικής άνοιας, με αλλοιώσεις του κογχομετωπιαίου φλοιού έχουμε συμπτωματολογία καταναγκαστικά επαναλαμβανόμενης συμπεριφοράς, συμπεριλαμβανομένης της υπερφαγίας, των τυχερών παιχνιδιών και της κατάχρησης ουσιών (Gorno et al., 2004; Ikeda et al, 2002; Rosen et al., 2005; Thompson et al., 2003; Whitwell et al., 2007; Williams et al., 2005; Woolley et al., 2007). Έτσι, από τα παραπάνω και από έρευνες σε πρωτεύοντα θηλαστικά και τρωκτικά (Bechara, 2005; Schoenbaum et al., 2006) φαίνεται ότι οι αλλοιώσεις στον κογχομετωπιαίο φλοιό οδηγούν σε εθιστικές, καταναγκαστικές και παρορμητικές συμπεριφορές.

3. ΝΤΟΠΑΜΙΝΗ

Η ντοπαμίνη είναι μια απλή οργανική ουσία που ανήκει στην οικογένεια των κατεχολαμινών. Στην εν λόγω οικογένεια ανήκουν ακόμα η επινεφρίνη και η νορεπινεφρίνη με τις οποίες έχουν κοινή βιοσυνθετική οδό ξεκινώντας από την τυροσίνη. Μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του '50 θεωρούνταν αποκλειστικά ενδιάμεσο μόριο στη βιοσύνθεση των κατεχολαμινών ωστόσο το 1957 ο Carlsson και η ομάδα του ανακάλυψαν τη φυσιολογική λειτουργία ενός μεταβολίτη του αμινοξέος της τυροσίνης, της 4- (2-αμινοαιθυλο) -βενζολο-1,2-διόλης ή ευρέως γνωστή ως ντοπαμίνη. Το όνομα της προέρχεται από τη χημική δομή της. Πιο συγκεκριμένα, είναι μια αμίνη η οποία συντίθενται αποκαρβοξυλιώνοντας το πρόδρομο μόριο της, την L-DOPA, η οποία συντίθεται στον εγκέφαλο και τα επινεφρίδια. Η ντοπαμίνη (DA) απέκτησε τον τίτλο του νευροδιαβιβαστή καθώς αποτελεί τον κυρίαρχο κατεχολαμινικό νευροδιαβιβαστή του ανθρώπινου κεντρικού συστήματος και εμπλέκεται στον έλεγχο μια πληθώρας λειτουργιών μέσα στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η μάθηση, το συναίσθημα, η κινητοποίηση, το στρες και οι διαδικασίες της ανταμοιβής (Civelli et al., 1991; Nieoullon et al., 2003; Wise, 2004). Τέλος, το ενδιαφέρον για τη δράση του συγκεκριμένου μορίου εντείνεται καθώς εμπλέκεται σε διάφορες νευρολογικές και ψυχιατρικές διαταραχές, όπως τη νόσο Parkinson, την κατάθλιψη, τη σχιζοφρένεια, το σύνδρομο ADHD (Διαταραχή Ελλειμματικής Προσοχής-Υπερκινητικότητας), το σύνδρομο Tourette καθώς και σε καταστάσεις εθισμού σε ουσίες (Tritsch et al, 2012). Παρόλα αυτά οι ακριβείς μηχανισμοί μέσω των οποίων η DA επάγει τη δράση της παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι, λόγω της πολλαπλότητας και της πολυπλοκότητας των δράσεων της.

3.1 Η ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΝΤΟΠΑΜΙΝΗΣ

Οι κατεχολαμίνες είναι οργανικές ενώσεις που περιέχουν έναν κατεχολικό πυρήνα, δηλαδή έναν βενζολικό δακτύλιο (C_6H_6) που φέρει δύο διαδοχικές υδροξυλικές υποκαταστάσεις και μία αμινομάδα (NH_2) (Εικόνα 3.1).

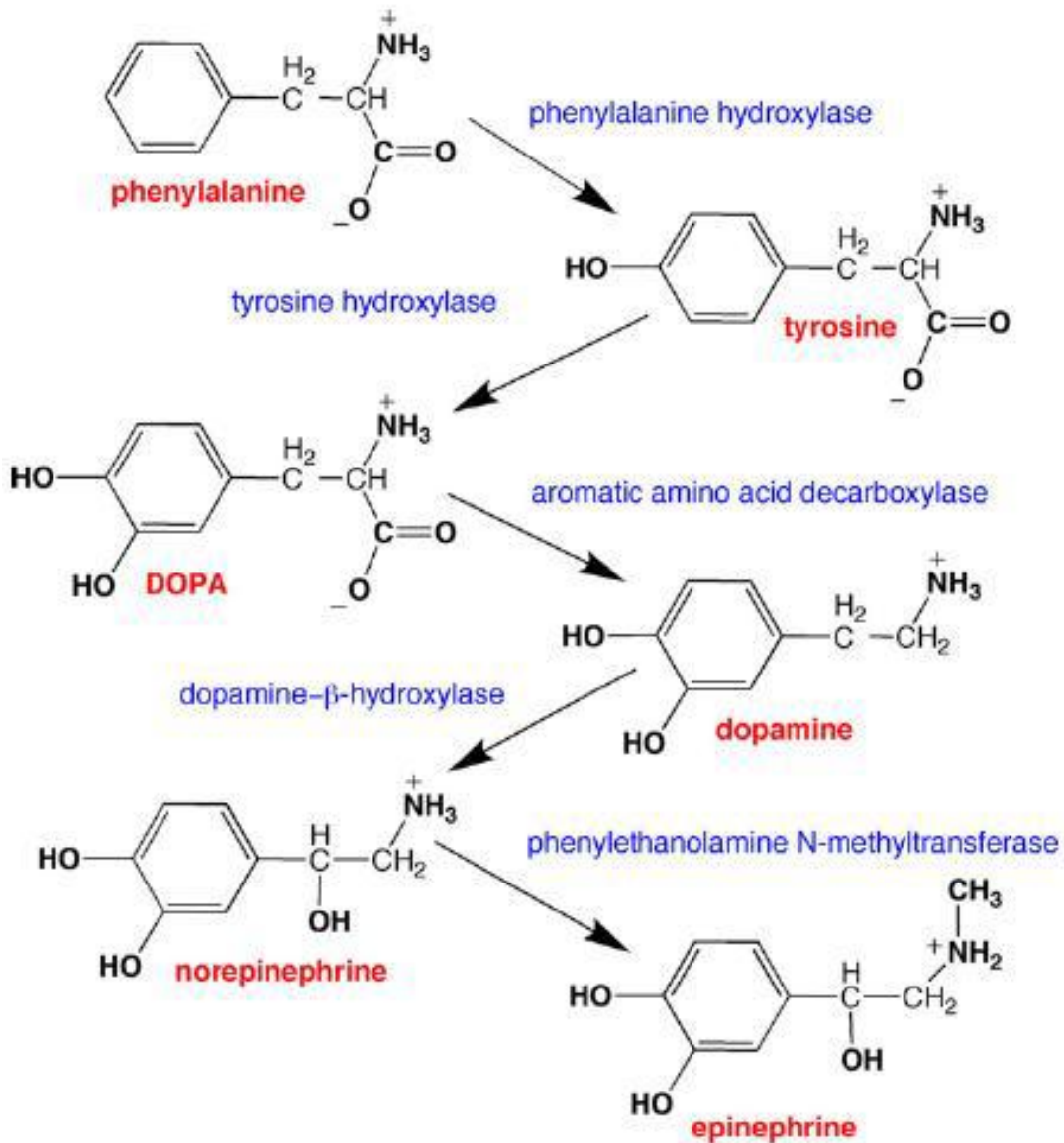


Εικόνα 3.1: Χημική δομή του νευροδιαβιβαστή ντοπαμίνη.

Η ντοπαμίνη συντίθεται στο σώμα από τους νευρώνες και τον μυελό των επινεφριδίων. Συγκεκριμένα στον εγκέφαλο συντίθεται από νευρικά κύτταρα του μεσεγκεφάλου, κυρίως στη μέλαινα ουσία (substantia nigra, SN) και στην κοιλιακή καλυπτική περιοχή (ventral tegmental area, VTA). Η παραγωγή της μπορεί να πραγματοποιηθεί από οποιοδήποτε από τα ακόλουθα τρία αμινοξέα: L- φαινυλαλανίνη, L- Τυροσίνη, L- DOPA, ενώ η πλήρης μεταβολική οδός παρουσιάζεται παρακάτω (εικόνα 3.2).

Η διαδικασία βιοσύνθεσης της DA λαμβάνει χώρα στο κυττόςολιο των κατεχολαμινεργικών νευρώνων και ξεκινά με την L-φαινυλαλανίνη που μετατρέπεται σε L-τυροσίνη από το ένζυμο υδροξυλάση φαινυλαλανίνης με σημαντική τη συμβολή του μοριακού οξυγόνου (O_2) και της τετραϋδροβιοπτερίνης (BH_4) ως συμπαραγοντες. Η L-τυροσίνη μετατρέπεται σε 3,4-διυδροξυ-φαινυλαλανίνης (L-DOPA) από το ένζυμο υδροξυλάση της τυροσίνης (TygH) η οποία περιορίζει τον ρυθμό σύνθεσης της ντοπαμίνης και άρα παίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της διαθεσιμότητας κυττοσολικής DA για την πλήρωση των συναπτικών κυστιδίων (Westerink, 2006). Η παραπάνω οξειδωτική αντίδραση ρυθμίζεται ισχυρά και εξαρτάται από την τετραϋδροβιοπτερίνης (Tetrahydrobiopterin, BH_4), ενός συμπαραγοντα που είναι απαραίτητος για τη βέλτιστη ενζυμική δράση. Στη συνέχεια η L-DOPA αποκαρβοξυλιώνεται σχεδόν ακαριαία από την αποκαρβοξυλάση των L-αρωματικών αμινοξέων (L-aromatic amino acid decarboxylase, AADC) και μετατρέπεται σε DA καθώς με απελευθέρωση CO_2 .

Στους επίμυες εκτός αυτής της κλασσικής οδού φαίνεται να υπάρχει και ένα δεύτερο βιοσυνθετικό μονοπάτι το οποίο καταλύεται από το κυτόχρωμα P450, η συνεισφορά του οποίου φαίνεται να είναι μικρή ως προς τη συνολική σύνθεση DA (Meiser et al., 2013).



Εικόνα 4.2: Βιοσυνθετικό μονοπάτι των κατεχολαμινικών νευροδιαβιβαστών

Οι αντιδράσεις σταματούν σε αυτό το σημείο όταν πρόκειται για ντοπαμινεργικούς νευρώνες, ενώ για τους νοραδρενεργικούς η βιοχημική οδός συνεχίζει με το ένζυμο β -υδροξυλάση ντοπαμίνης (dopamine β -hydroxylase - BYN) να μετατρέπει την ντοπαμίνη σε νορεπινεφρίνη (νοραδρεναλίνη) με O_2 και L-ασκορβικό οξύ ως συμπαραγόντες. Σε αντίθεση με τα υπόλοιπα ένζυμα των βιοσυνθετικών οδών των μικρομοριακών νευροδιαβιβαστών, η BYN συνδέεται με τη μεμβράνη. Πιο συγκεκριμένα, η υδροξυλάση συνδέεται σταθερά με την έσω επιφάνεια των αμινεργικών κυστιδίων όπως θα έκανε μια περιφερική πρωτεΐνη. Επομένως, η

νορεπινεφρίνη είναι ο μοναδικός νευροδιαβιβαστής που συντίθενται μέσα στα συναπτικά κυστίδια. Τέλος, η νορεπινεφρίνη μετατρέπεται σε επινεφρίνη (αδρεναλίνη) από το ένζυμο N-μεθυλοτρανσφεράση της φαινυλαιθανολαμίνης (PNMT), ένα κυτταροπλασματικό ένζυμο, μεθυλιώνοντας την στον μυελό των επινεφριδίων με S-αδενοσυλ-L-μεθειονίνη (SAMe) ως συμπαράγοντα, που δρα ως δότη μεθυλικών ομάδων.

Ανεπάρκεια σε οποιαδήποτε απαιτούμενο αμινοξύ ή συμπαράγοντα θα οδηγήσει σε δυσλειτουργία σύνθεσης ντοπαμίνης, νορεπινεφρίνης, και επινεφρίνης. Με άλλα λόγια, μόνο τα κύτταρα που απελευθερώνουν επινεφρίνη διαθέτουν και τα πέντε βιοσυνθετικά ένζυμα. Οι νευρώνες που χρησιμοποιούν νορεπινεφρίνη δεν εκφράζουν την μεθυλοτρανσφεράση και οι νευρώνες που απελευθερώνουν ντοπαμίνη δεν εκφράζουν την τρανφεράση ή την β-υδροξυλάση της ντοπαμίνης (Kandel et al., 2011). Κατά την ανάπτυξη, η έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα που συμμετέχουν στη σύνθεση των κατεχολαμινών ρυθμίζεται ανεξάρτητα. Η μετατροπή της τυροσίνης σε L-DOPA είναι το καθοριστικό σημείο στην αλυσίδα βιοσύνθεσης των κατεχολαμινών. Στους περισσότερους κατεχολαμινεργικούς νευρώνες, η δράση της TyrH δεν ρυθμίζεται από τα επίπεδα της τυροσίνης, τα οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι αρκετά υψηλά, αλλά από τα επίπεδα της ανηγμένης τετραϋδροβιοπτερίνης (Tetrahydrobiopterin, BH4), ενός συμπαράγοντα που μαζί με ιόντα Fe^{2+} και μοριακό οξυγόνο είναι απαραίτητος για την βέλτιστη ενζυμική δράση. Οι συντιθέμενες κατεχολαμίνες ανταγωνίζονται τον συμπαράγοντα BH4 για την πρόσδεση τους στην καταλυτική θέση του ενζύμου. Συνεπώς υψηλά επίπεδα κατεχολαμινών αναστέλλουν τη δραστηριότητα της TH, και ως εκ τούτου ρυθμίζουν τις δικές τους ενδοκυττάρειες συγκεντρώσεις μέσω αρνητικής ανατροφοδοτικής ρύθμισης. Η αύξηση της συγκέντρωσης της TH δεν θα οδηγήσει σε μεγαλύτερη παραγωγή της L-DOPA, εφόσον η TyrH λειτουργεί στη μέγιστη καταλυτική της δραστηριότητα.

3.2 ΝΤΟΠΑΜΙΝΕΡΓΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ

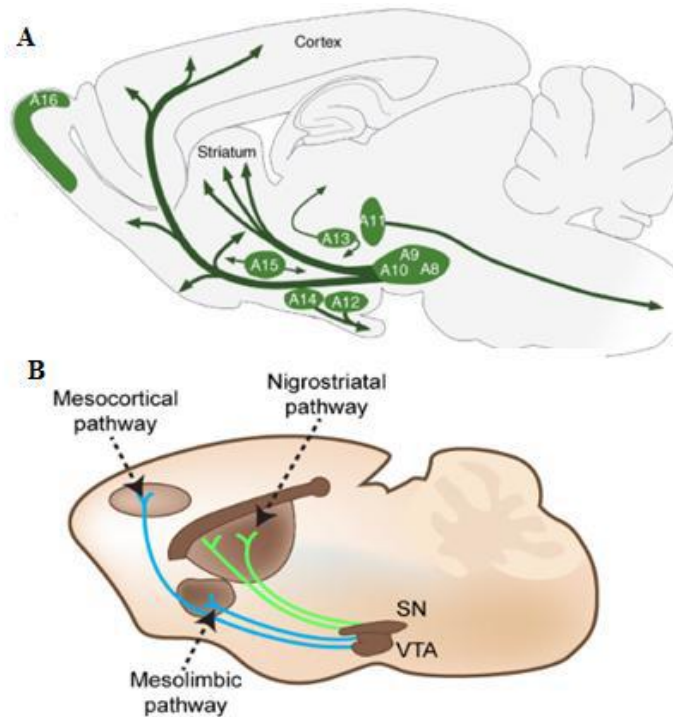
Οι ντοπαμινεργικές προβολές είναι κυρίαρχες στον εγκέφαλο (Beaulieu et al., 2011). Τα κεντρικά ντοπαμινεργικά συστήματα έχουν πολυσύνθετη οργάνωση παρά το σχετικά μικρό αριθμό ντοπαμινεργικών νευρώνων στον εγκέφαλο, π.χ. οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες του μεσεγκεφάλου έχουν υπολογιστεί περίπου στους 15.000-20.000 σε κάθε πλευρά. Στον ενήλικο

εγκέφαλο οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες είναι μία ετερογενής ομάδα κυττάρων ανατομικά και λειτουργικά, που εντοπίζονται στο μεσεγκέφαλο, στο διεγκέφαλο και στον οσφρητικό βολβό (Björklund et al, 2007). Παρόλα αυτά, το σύνολο σχεδόν των ντοπαμινεργικών κυττάρων βρίσκονται στην κοιλιακή περιοχή του μεσεγκεφάλου (**εικόνα 3.3 A**). Οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες εντοπίζονται κυρίως στη συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας (SNpc), στην κοιλιακή καλυπτική περιοχή (VTA) και στον υποθάλαμο σχηματίζοντας τέσσερα διακριτά μονοπάτια (**εικόνα 3.3 B**)

1. **τη Ντοπαμινεργική Μελαινοραβδωτή οδό** που ξεκινά από τη συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας (SNpc) και καταλήγει κυρίως στο νεοραβδωτό ελέγχοντας την έναρξη και τη διατήρηση της κινητικής λειτουργίας (Bayer et al., 1995; Kawano et al., 1995)
2. **τη Ντοπαμινεργική Μεσομεταιχμιακή οδό** που ξεκινά από την κοιλιακή καλυπτική περιοχή (VTA) και καταλήγει στον επικλινή πυρήνα, την αμυγδαλή και τον ιππόκαμπο, σε περιοχές δηλαδή του μεταιχμιακού συστήματος. Οι νευρώνες αυτής της οδού έχουν το κυτταρικό τους σώμα στην VTA και προβάλλουν άξονες στις παραπάνω περιοχές. Η οδός αυτή εμπλέκεται στις συμπεριφορές με κίνητρο και ανταμοιβή, στην συναισθηματική σταθερότητα και στην πρόκληση συναισθημάτων ευχαρίστησης. Η συγκεκριμένη οδός ρυθμίζει τη μνήμη, αλλά ταυτόχρονα ενοχοποιείται έντονα για καταστάσεις εθισμού, κατάθλιψης αλλά και σχιζοφρένειας
3. **τη Ντοπαμινεργική Μεσοφλοιϊκή οδό**, που ξεκινά και αυτή από την VTA και καταλήγει στον προμετωπιαίο, περιρινικό και φλοιό του προσαγωγίου. Αποτελεί σημαντικό ντοπαμινεργικό μονοπάτι για τη ρύθμιση διαφόρων γνωστικών και επιτελικών λειτουργιών του προμετωπιαίου συνειρμικού φλοιού, με αποτέλεσμα τη συμβολή αυτού του μονοπατιού στο συνδυασμό και την εκτέλεση σύνθετων κινητικών δράσεων καθώς και στη ρύθμιση της συναισθηματικής συμπεριφοράς
4. **τη Ντοπαμινεργική Φυματοχοανική οδό**, που προβάλλουν από τον τοξοειδή και τον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου στον διάμεσο λοβό της υπόφυσης. Αυτοί οι νευρώνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της απελευθέρωσης

υποφυσιακών ορμονών, κυρίως της προλακτίνης (Anden et al., 1964; Dahlstroem et al., 1964).

Όλα τα ντοπαμινεργικά μονοπάτια θεωρούνται πως είναι ώριμα ήδη από τις πρώτες μεταγεννητικές εβδομάδες τόσο στους επίμυες (Voorh et al., 1988) όσο και στους ανθρώπους, αν και σε κάποιες περιπτώσεις η εν λόγω ωρίμανση π.χ. στον προμετωπιαίο λοβό, μπορεί να παραταθεί έως την πρώιμη ενήλικη ζωή (Benes et al., 2000).



*Εικόνα 3.3. A. Κατανομή των εννέα διάκριτων DA νευρωνικών κυτταρικών πληθυσμών στον εγκέφαλο ενήλικου επίμυ. B Απεικόνιση των κύριων ντοπαμινεργικών οδών του εγκεφάλου. **Nigrostriatal pathway**: μελαίνο-ραβδωτή οδός, **Mesolimbic pathway**: μεσομεταιχμιακή οδός, **Mesocortical pathway**: μεσοφλοιϊκή οδός*

3.3 ΝΤΟΠΑΜΙΝΕΡΓΙΚΗ ΣΥΝΑΨΗ

Η ντοπαμινεργική σηματοδότηση περιλαμβάνει πληθώρα μορίων συμπεριλαμβανομένων κινασών, φωσφατασών, μεταγραφικών παραγόντων, ιοντικών καναλιών και μεμβρανικών υποδοχέων. Επιπρόσθετα, οι δράσεις της DA ποικίλουν σε μεγάλο βαθμό μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών τύπων, καθώς εξαρτώνται από την ισχύ και τη διάρκεια διέγερσης των ντοπαμινικών υποδοχέων, επηρεάζονται από την παρούσα και προγενέστερη κυτταρική κατάσταση και

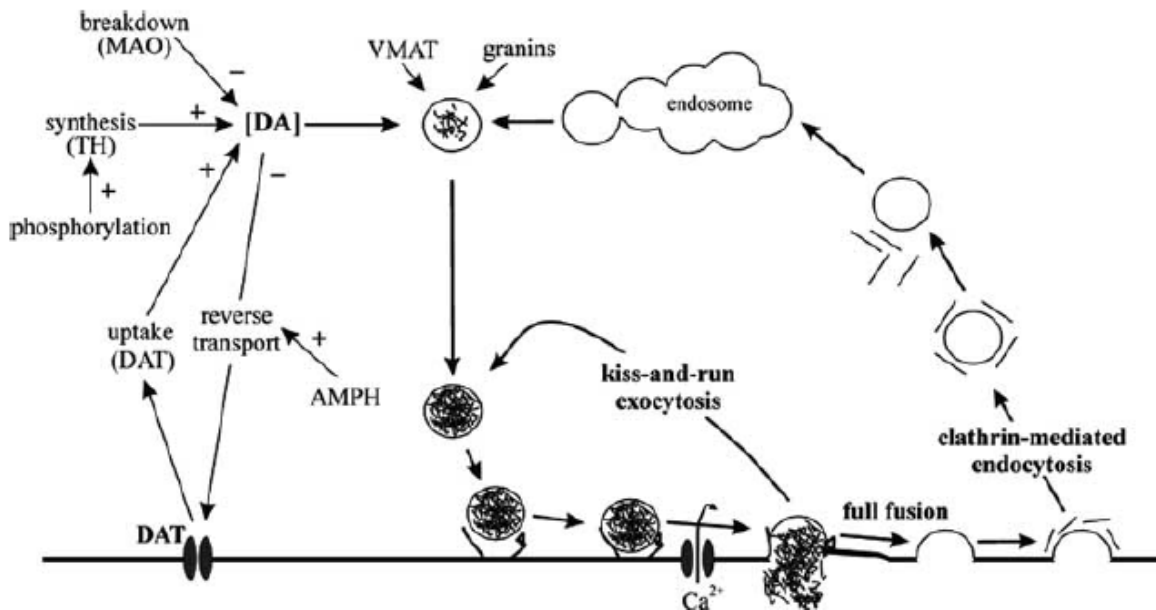
ανταγωνίζονται/συνεργούν με άλλα νευροτροποποιητικά συστήματα. Ιδιαίτερα μεγάλη σημασία για τη δράση της DA έχει το γεγονός ότι η ντοπαμινεργική σύναψη θεωρείται “ανοιχτή” σύναψη, δηλαδή σύναψη η οποία ευνοεί τη διάχυση της DA στον εξωκυττάριο χώρο (extracellular space, ECS) ούτως ώστε αυτή να φθάσει απομακρυσμένα κύτταρα-στόχους (Zoli et al, 1997).

3.3.1 Απελευθέρωση DA

Μετά την σύνθεση της η DA μεταφέρεται ενεργητικά με τη βοήθεια πρωτεϊνικού φορέα στο εσωτερικό αποθηκευτικών κυστιδίων. Όταν γίνει εκπόλωση του προσυναπτικού νευρώνα λόγω της άφιξης στην απόληξη ενός δυναμικού ενεργείας, τα κυστίδια που περιέχουν DA συντήκονται με την προσυναπτική μεμβράνη και η DA απελευθερώνεται στη συναπτική σχισμή, διαχέεται στη συνέχεια προς τη μετασυναπτική μεμβράνη όπου δεσμεύεται στους ντοπαμινεργικούς υποδοχείς (βλ. παρακάτω) και προκαλεί μια σειρά μεταβολών στον μετασυναπτικό νευρώνα.

Η συχνότητα της απελευθέρωσης DA αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την νευροδιαβίβαση. Τα συναπτικά κυστίδια θα πρέπει να κινητοποιηθούν και να δεξαμενιστούν πριν η αύξηση της συγκέντρωσης του Ca^{2+} επάγει τη συναπτική σύντηξη. Συνεπώς η συχνότητα απελευθέρωσης ρυθμίζεται από τον αριθμό των διαθέσιμων κυστιδίων καθώς και από μοριακές αλληλεπιδράσεις που διέπουν τον δεξαμενισμό, την κινητοποίηση και τη συναπτική σύντηξη (Westerink, 2006). Η απελευθέρωση της DA πραγματοποιείται με τον κλασσικό μηχανισμό Ca^{2+} -εξαρτώμενης συναπτικής εξωκυττάρωσης, ο οποίος λαμβάνει χώρα στην αξονική απόληξη του ντοπαμινεργικού νευρώνα. Επίσης, η DA μπορεί να απελευθερωθεί και μέσω του μεταφορέα επαναπρόσληψης της (DAT), υπό την επίδραση ορισμένων φαρμάκων, όπως για παράδειγμα της μεθαμφεταμίνης (Methamphetamine, METH), που έχουν ως αποτέλεσμα την αντιστροφή της φοράς δράσης του μεταφορέα, άρα και μεταφορά της DA στον εξωκυττάριο αντί του ενδοκυττάρου χώρου (Rice et al., 2011). Η διαδικασία της εξωκυττάρωσης (απελευθέρωση DA) ακολουθεί είτε την οδό της πλήρους σύντηξης των συναπτικών κυστιδίων και την μετέπειτα επαγόμενη μέσω κλαθρίνης ενδοκυττάρωση είτε την οδό “kiss-and-run” εξωκυττάρωσης (**εικόνα 3.4**). Ο τύπος της εξωκυττάρωσης που ακολουθείται έχει ιδιαίτερη σημασία καθώς επηρεάζει όχι μόνο τη συχνότητα απελευθέρωσης αλλά επίσης και τη χρονική διάρκεια του γεγονότος, επηρεάζοντας με αυτόν τον τρόπο και την ποσότητα της DA που απελευθερώνεται ανά συμβάν.

Κατά την πλήρη σύντηξη τα συναπτικά κυστίδια συντήκονται με τη κυτταρική μεμβράνη και απελευθερώνεται ολόκληρη η ποσότητα του νευροδιαβιβαστή που περιέχεται στο κυστίδιο. Κατά την “kiss-and-run” εξωκυττάρωση η σύντηξη είναι παροδική και η έκκριση συμβαίνει αποκλειστικά μέσω του πόρου συγχώνευσης. Μετά το κλείσιμο του πόρου συγχώνευσης, τα κυστίδια ανακτώνται ταχέως αντί να υποβάλλονται σε επαγόμενη μέσω κλαθρίνης ενδοκυττάρωση. Η “kiss-and-run” εξωκυττάρωση πιθανόν είναι ένας μηχανισμός που συμβαδίζει με υψηλής συχνότητας διέγερση. Επιπρόσθετα μέσω αυτής ρυθμίζεται το κβαντικό μέγεθος απελευθέρωσης DA, καθώς ο χρόνος που παραμένει ανοικτός ο πόρος συγχώνευσης καθορίζει το ποσό της DA που απελευθερώνεται ανά κυστίδιο (Westerink, 2006).

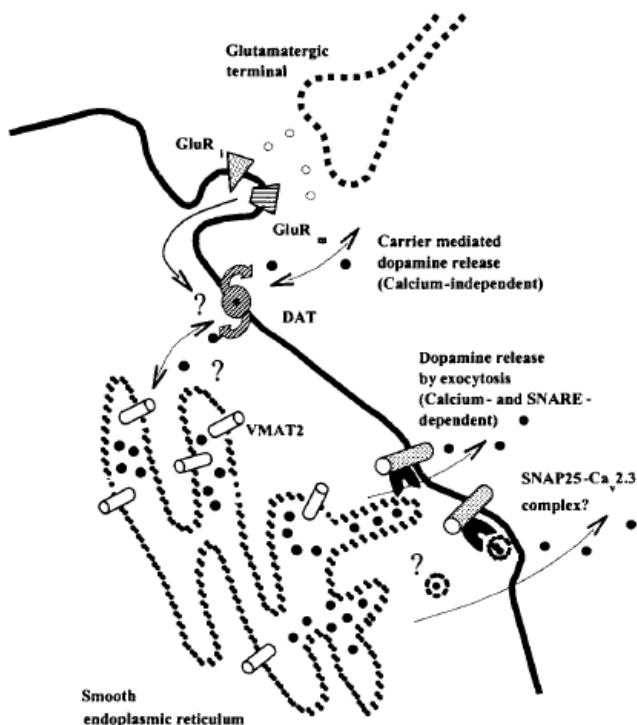


Εικόνα 3.4: Ο δεξαμενισμός, η συγχώνευση και η εξωκυττάρωση των DA συναπτικών κυστιδίων τελούν υπό τον έλεγχο εισροής Ca²⁺. Ο βαθμός πλήρωσης των κυστιδίων εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα της κυττοσολικής DA, η οποία με τη σειρά της καθορίζεται από την υπάρχουσα ισορροπία μεταξύ επαναπρόσληψης (DAT), σύνθεσης (TyrH) και αποικοδόμησης (MAO). Η συγχώνευση των δεξαμενισμένων κυστιδίων και η απελευθέρωση του περιεχόμενου τους επάγεται από την αύξηση της [Ca²⁺]. Εναλλακτικά μπορεί να επέλθει και η πλήρης σύντηξη των συναπτικών κυστιδίων, ακολουθούμενη από αργή, επαγόμενη από κλαθρίνη, ενδοκυττάρωσή τους. Πάντως και στις δύο περιπτώσεις τα ανακτηθέντα κυστίδια επαναπληρούνται για μετέπειτα κύκλους εξωκυττάρωσης (Westerink R., 2006).

Η απελευθέρωση DA από τα κυτταρικά σώματα ή τους δενδρίτες των νευρώνων καλείται σωματοδενδριτική απελευθέρωση (εικόνα 3.5). Δύο χαρακτηριστικές περιοχές στις οποίες παρατηρείται είναι η SNpc και η VTA. Μάλιστα στην SNpc οι θέσεις απελευθέρωσης

DA είναι αποκλειστικά σωματοδενδρικές, ενώ η VTA δέχεται ντοπαμινεργική είσοδο από την SNpc καθώς και από παράπλευρους άξονες των νευρώνων της (Rice et al., 2011). Η σωματοδενδρική απελευθέρωση, όπως και η αξονική, είναι Ca^{2+} - εξαρτώμενη όμως απαιτεί την είσοδο ελάχιστης ποσότητας Ca^{2+} . Η ελάχιστη αυτή απαίτηση ως προς την είσοδο Ca^{2+} ίσως υποδηλώνει τη συμμετοχή μιας διαδικασίας ενίσχυσης, που περιλαμβάνει την Ca^{2+} - επαγόμενη απελευθέρωση Ca^{2+} από ενδοκυτταρικές αποθήκες (Rice et al., 2011).

Είναι πιθανόν η απελευθέρωση DA από σωματοδενδρικές περιοχές να περιλαμβάνει διαφορετικό μηχανισμό εξωκυττάρωσης σε σχέση με την αξονική. Η παραπάνω υπόθεση ενισχύεται από το γεγονός ότι στους δενδρίτες της SNpc οι κύριες αποθήκες DA δεν είναι τα κυστίδια, όπως στους άξονες, αλλά ένα διαμέρισμα του ενδοπλασματικού δικτύου. Συνεπώς προτείνονται εναλλακτικοί μηχανισμοί σωματοδενδρικής απελευθέρωσης όπως η αντιστροφή του DAT (Rice et al., 2011). Η απελευθέρωση DA έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση D2 αυτοϋποδοχέων (βλ. παρακάτω), οι οποίοι με τη σειρά τους αναστέλλουν τη σωματοδενδρική απελευθέρωση DA στην SNpc και την αξονική απελευθέρωση στο ραβδωτό (Rice et al., 2011).



Εικόνα 3.5. Προτεινόμενος μηχανισμός σωματοδενδρικής απελευθέρωσης DA. Οι μαύροι κύκλοι παριστάνουν την DA ενώ οι λευκοί το γλουταμινικό οξύ. Παραμένει αδιευκρίνιστο εάν η εξωκυττάρωση και η αντιστροφή του DAT λειτουργούν ταυτόχρονα ως μηχανισμοί [82].

3.3.2 Πρότυπα απελευθέρωσης DA

Οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες *in vivo* εμφανίζουν τρία κύρια μοτίβα ενεργότητας: (α) μία ανενεργή, υπερπολωμένη κατάσταση (β) ένα χαμηλό (2-10 Hz), ακανόνιστο ‘τονικό’ πρότυπο πυροδότησης (γ) ένα ‘φασικό’ πρότυπο πυροδότησης (Grace et al., 1983).

Σε φυσιολογικές καταστάσεις ~50% των μεσεγκεφαλικών νευρώνων δεν είναι ενεργοί (Freeman et al., 1985). Ένας υποπληθυσμός στην VTA φαίνεται ότι διατηρείται σε μια υπερπολωμένη-ανενεργή κατάσταση μέσω της δράσης της κοιλιακής ωχράς σφαίρας. Απενεργοποίηση της δομής αυτής απελευθερώνει τους νευρώνες της VTA από την ανενεργή κατάσταση, οδηγώντας σε αυτόματη απελευθέρωση της DA (Grace et al., 2007). Αυτή η κατάσταση χαρακτηρίζεται τονική έκλυση DA και ελέγχεται από το εξής νευρωνικό κύκλωμα: ένα σημαντικό ρυθμιστικό μονοπάτι από το κοιλιακό υπόθεμα του ιππόκαμπου (ventral subiculum of the hippocampus) διεγείρει τον επικλινή πυρήνα που με την σειρά του αναστέλλει την κοιλιακή ωχρά σφαίρα και απελευθερώνει τους νευρώνες που είναι υπεύθυνοι για την έκκριση της DA από την ανενεργή κατάσταση. Το κύκλωμα αυτό σχετίζεται με την ικανότητα του ιππόκαμπου να ρυθμίζει την αποθήκευση νέων πληροφοριών (Grace et al., 2007). Η τονική πυροδότηση των ντοπαμινεργικών νευρώνων είναι υπεύθυνη για τα βασικά επίπεδα στη συγκέντρωση DA εντός του ραβδωτού σώματος (10-20nM). Προτείνεται ότι τα παραπάνω επίπεδα διαμορφώνονται από τη “διαφυγή” της DA από τη συναπτική σχισμή προς τον εξω-συναπτικό χώρο.

Αντιθέτως, η ‘φασική’ ενεργοποίηση του ντοπαμινεργικού συστήματος εξαρτάται κυρίως από τις διεγερτικές γλουταμινεργικές εισόδους προς τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες. Ο συγκεκριμένος τύπος πυροδότησης έχει ως αποτέλεσμα τη μαζική απελευθέρωση DA εντός της συναπτικής σχισμής και τη μετέπειτα έντονη και γρήγορη επαναπρόσληψη της μέσω του DAT, πριν προλάβει να διαφύγει από τη συναπτική σχισμή. Συνεπώς, η φασική απελευθέρωση DA λειτουργεί παροδικά εντός της συναπτικής σχισμής, σε πολύ κοντινή απόσταση από τη σύναψη (Goto et al., 2007). Ο DAT ασκεί μεγαλύτερη επιρροή στη ντοπαμινεργική διαβίβαση όταν υπάρχει απελευθέρωση φορτίου πολλών κυστιδίων, γεγονός το οποίο αποδεικνύεται και από την μεγαλύτερη επίδραση του μεταφορέα στο απελευθερούμενο ποσό DA κατά τη διάρκεια αυξημένης φασικής, ντοπαμινεργικής νευρωνικής δραστηριότητας σε σχέση με αύξηση του ρυθμού της τονικής πυροδότησης (Rice et al., 2011). Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες για τη γλουταμινο-εξαρτώμενη πυροδότηση *in vivo* απαιτούνται σήματα ενεργοποίησης που

προέρχονται από την έξω ραχιαία καλύπτρα, τα οποία παρέχουν την επιτρεπτή «πύλη» για την απόκριση των ντοπαμινεργικών νευρώνων στο γλουταμινικό οξύ. Τα γλουταμινικά σήματα είναι πιθανόν να προέρχονται από τον προμετωπιαίο φλοιό, τη σκελαιο-γεφυρική καλύπτρα και την έξω προοπτική-ραχιαία υποθαλαμική περιοχή (Grace et al., 2007).

Η τονική πυροδότηση της έκκρισης της DA σχετίζεται με τον χρόνο απόκρισης του οργανισμού σε ένα ερέθισμα. Με άλλα λόγια, υψηλά επίπεδα DA συνδέονται με υψηλό ρυθμό απόκρισης σε ερεθίσματα, ενώ χαμηλά επίπεδα επάγουν λήθαργο. Από την άλλη πλευρά, η φασική πυροδότηση της έκκρισης της DA καθορίζει τη φύση της επιλογής του οργανισμού, προκειμένου να ανταποκριθεί σε κάποιο ερέθισμα.

3.3.3 Υποδοχείς της Ντοπαμίνης

Η DA μόλις απελευθερώνεται από τις προσυναπτικές απολήξεις, ενεργοποιεί μεταβολοτρόπους ντοπαμινεργικούς υποδοχείς που κατηγοριοποιούνται σε πέντε τύπους: D1, D2, D3, D4, D5. Οι εν λόγω υποδοχείς ομαδοποιούνται σε δυο βασικούς υπότυπους, οι D1 και οι D5 είναι μέλη της οικογένειας D1-like υποδοχείς, αμφότεροι κωδικοποιούμενοι από γονίδια δίχως εσόνια και συνεπώς χωρίς δυνατότητα εναλλακτικού ματίσματος, ενώ οι D2, D3 και D4 υποδοχείς είναι μέλη της οικογένειας D2-like υποδοχείς, όλοι κωδικοποιούμενοι από γονίδια με εσόνια γεγονός που παρέχει τη δυνατότητα πολλαπλών ισομορφών (Beaulieu et al., 2011; Missale, 1998; Missale, 2010). Ο διαχωρισμός αυτός στηρίζεται αφενός στην ικανότητα των υποδοχέων να επάγουν (D1-like) ή να αναστελούν (D2-like) την παραγωγή της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP) για να προκαλέσουν μια κυτταρική απόκριση και αφετέρου σε στις φαρμακολογικές τους ιδιότητες (Kebabian et al., 1979).

Οι υποδοχείς τη DA είναι ευρέως κατανομημένοι στο ΚΝΣ. Η σχετική αφθονία τους στους επίμυες είναι η ακόλουθη D1>D2>D3>D5>D4 [61]. Με βάση τα ντοπαμινεργικά μονοπάτια που έχουν περιγραφεί, οι υποδοχείς αντίστοιχα εντοπίζονται κυρίως στο ραβδωτό, στο μεταιχμιακό σύστημα, στον εγκεφαλικό φλοιό και στη χοάνη. Οι υποδοχείς αυτοί διαμεσολαβούν την επίδραση της DA στη μάθηση, το συναίσθημα, την κινητοποίηση, τη ρύθμιση της πείνας και του αισθήματος κορεσμού και το ενδοκρινικό σύστημα (Pivonello et al., 2007).

Οι υποδοχείς της οικογένειας D1 έχουν την ευρύτερη και εντονότερη παρουσία στο ΚΝΣ καθώς και τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης συγκριτικά με τους υποδοχείς της οικογένειας των D2 υποδοχέων. Εντοπίζονται στο ραβδωτό σώμα, τον επικλινή πυρήνα, το οσφρητικό φύμα, τη

μέλαινα ουσία, το κοιλιακό καλυπτρικό πεδίο αλλά και τον εγκεφαλικό φλοιό, με υψηλότερα επίπεδα στον πρόσθιο φλοιό και χαμηλότερα στον οπτικό φλοιό. Στις περισσότερες περιοχές, οι D1 υποδοχείς εντοπίζονται μετασυναπτικά. Εξάιρεση αποτελεί η μέλαινα ουσία, στην οποία οι D1 υποδοχείς εντοπίζονται στις αξονικές απολήξεις των προβολών του ραβδωτού σώματος στη δικτυωτή μοίρα της μέλαινας ουσίας (Levey et al., 1993; Khan et al., 1998).

Οι υποδοχείς της οικογένειας D2 εμφανίζουν υψηλά επίπεδα στο ραβδωτό σώμα, τον επικλινή πυρήνα, το οσφρητικό φύμα όπου και εκφράζονται από τους GABAεργικούς νευρώνες που είναι ευαίσθητοι στην DA και εκφράζουν και εγκεφαλίνες (Le Moine et al, 1995). Επίσης εντοπίζονται στη συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας, το κοιλιακό καλυπτρικό πεδίο, τη δικτυωτή μοίρα της μέλαινας ουσίας και τον εγκεφαλικό φλοιό όπου και εκφράζονται από ντοπαμινεργικούς νευρώνες. Οι D2 υποδοχείς εντοπίζονται μετασυναπτικά δηλαδή σε ντοπαμινοδεκτικούς νευρώνες, προσυναπτικά στις αξονικές απολήξεις των ντοπαμινεργικών νευρώνων αλλά και στη σωματοδενδριτική περιοχή των ντοπαμινεργικών νευρώνων (Levey et al., 1993, Khan et al., 1998). Τέλος, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι υποδοχείς αυτοί εκφράζονται και στην υπόφυση, όπου και μεσολαβούν την επίδραση της DA στη ρύθμιση της σύνθεσης και της έκκρισης των υποφυσιακών ορμονών. Ο κύριος ρόλος των D2 υποδοχέων στην υπόφυση είναι ο ανασταλτικός έλεγχος της έκκρισης της προλακτίνης καθώς επίσης και η ανάπτυξη των λακτοτρόπων κυττάρων (Levey et al., 1993).

Τόσο οι D1 όσο και οι D2 εκφράζονται ευρέως σε πυραμιδικούς νευρώνες και σε ενδονευρώνες στον προμετωπιαίο φλοιό (Santana et al., 2009) αν και η συνεντόπιση τους στον ίδιο νευρώνα είναι σχετικά μικρή (Vincent et al., 1993).

Οι D3 υποδοχείς εντοπίζονται σε πολύ μικρό ποσοστό στο ραβδωτό σώμα και σε σημαντικά επίπεδα στον επικλινή πυρήνα και στο οσφρητικό φύμα, δηλαδή σε υποδιαίρεση του κοιλιακού ραβδωτού σώματος. Επίσης οι D3 υποδοχείς εντοπίζονται στην οδοντωτή έλικα και τη CA1 περιοχή του ιπποκάμπου, τον εγκεφαλικό φλοιό στις στιβάδες IV και V και τη δικτυωτή μοίρα της μέλαινας ουσίας. Οι συγκεκριμένοι υποδοχείς παρουσιάζουν ιδιαίτερο κλινικό ενδιαφέρον γιατί τα νευροληπτικά φάρμακα (αγωνιστές της DA) που δείχνουν υψηλή χημική συγγένεια για αυτούς τους υποδοχείς φαίνεται να προκαλούν λιγότερες εξωπυραμιδικές παρενέργειες από ό,τι τα τυπικά νευροληπτικά (Jaber et al., 1996). Οι D4 υποδοχείς εντοπίζονται στον πρόσθιο, τον κροταφικό, το βρεγματικό και τον οπτικό φλοιό, στις περισσότερες υποπεριοχές του ιπποκάμπου, τον επικλινή πυρήνα και λιγότερο στο ραβδωτό σώμα, το

οσφρητικό φύμα και τη δικτυωτή μοίρα της μέλαινας ουσίας (Khan et al., 1998). Οι D5 εκφράζονται ομοίως με τους D3 και τους D4 κυρίως σε φλοιώδεις και μεταιχμιακές περιοχές.

3.3.4 Μεταγεννητική ανάπτυξη των D1 και D2 υποδοχέων ντοπαμίνης

Από μελέτες έχει δειχθεί ότι οι D1 και D2 υποδοχείς της ντοπαμίνης, παρά τις διαφορές που παρουσιάζουν στην ανατομική τους κατανομή αλλά και στις σχετικές τους ποσότητες, ακολουθούν παράλληλη και συγχρονισμένη μεταγεννητική ανάπτυξη σε πολλές εξωπυραμιδικές, μεταιχμιακές και φλοιικές περιοχές του εγκεφάλου στους επίμυς. Στο ραβδωτό και στον επικλινή πυρήνα, ο αριθμός των D1 και D2 υποδοχέων της ντοπαμίνης αυξάνεται σταδιακά από τη μέρα της γέννησης και εμφανίζει μέγιστο κατά την 28^η μεταγεννητική εβδομάδα (εφηβεία). Στη συνέχεια, τα επίπεδα των υποδοχέων αυτών μειώνονται σημαντικά από την 35^η μεταγεννητική μέρα της εφηβείας, φτάνοντας τα επίπεδα των ενήλικων ζώων στα οποία παραμένουν αμετάβλητα. Στον πρόσθιο φλοιό, στον ιππόκαμπο και στον ενδορινικό φλοιό οι υποδοχείς της ντοπαμίνης αυξάνονται σταδιακά από την γέννηση, φτάνοντας τα μέγιστα επίπεδα στην ενηλικίωση, χωρίς να υφίστανται μείωση κατά τα διάρκεια της εφηβείας (Tarazi and Baldessarini, 2000)

Η φυσιολογική έκφραση και ανάπτυξη των υποδοχέων της ντοπαμίνης πιθανόν να επηρεάζει σημαντικά την ωρίμανση των συναπτικών δομών και λειτουργιών και ίσως να διαδραματίζει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην οργάνωση και την επικοινωνία μεταξύ των φλοιικών και των μελανοραβδωτών συστημάτων στον εγκέφαλο. Είναι γνωστό ότι η μη φυσιολογική ανάπτυξη και η δυσλειτουργία αυτών των υποδοχέων έχει συνδεθεί με την παθοφυσιολογία της σχιζοφρένειας και επομένως η μη φυσιολογική ανάπτυξη και λειτουργία των D1 και D2 πιθανόν να τροποποιεί τα λειτουργικά κυκλώματα μεταξύ των φλοιικών και μεσομεταιχμιακών εγκεφαλικών περιοχών και πιθανόν με αυτόν τον τρόπο να εμπλέκονται στην νευροπαθολογία ποικίλων ιδιοπαθών ψυχιατρικών διαταραχών (Tarazi and Baldessarini, 2000).

3.3.5 Αυτοϋποδοχείς

Αυτοϋποδοχείς μπορεί να υπάρχουν στα περισσότερα τμήματα των ντοπαμινεργικών νευρώνων, δηλαδή στο σώμα, τους δενδρίτες και τις νευρικές απολήξεις. Η ενεργοποίησή τους οδηγεί σε μείωση της περαιτέρω απελευθέρωσής της. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης της ντοπαμίνης που οδηγεί σε μείωση της ενεργότητας της TH και τελικά την έμμεση μείωση της σύνθεσης της ντοπαμίνης. Συγκεκριμένα, η διέγερση των

αυτοϋποδοχέων που εντοπίζονται στην περιοχή του σώματος και των δενδριτών επιβραδύνει το ρυθμό εκφόρτισης των ντοπαμινεργικών νευρώνων, ενώ η διέγερση αυτοϋποδοχέων που βρίσκονται στις νευρικές απολήξεις αναστέλλει τη σύνθεση και την έκλυση της ντοπαμίνης. Η σύνθεση της ντοπαμίνης είναι δυνατόν να μειωθεί άμεσα και πάλι με τη διαμεσολάβηση ειδικών αυτοϋποδοχέων που ρυθμίζουν τη σύνθεση, δηλαδή την ενεργότητα της TH, οι οποίοι όμως δεν εντοπίζονται σε όλους τους τύπους ντοπαμινεργικών νευρώνων, καθώς χαρακτηριστική είναι η απουσία τους από τους υποθαλαμο-υποφυσιακούς ντοπαμινεργικούς νευρώνες.

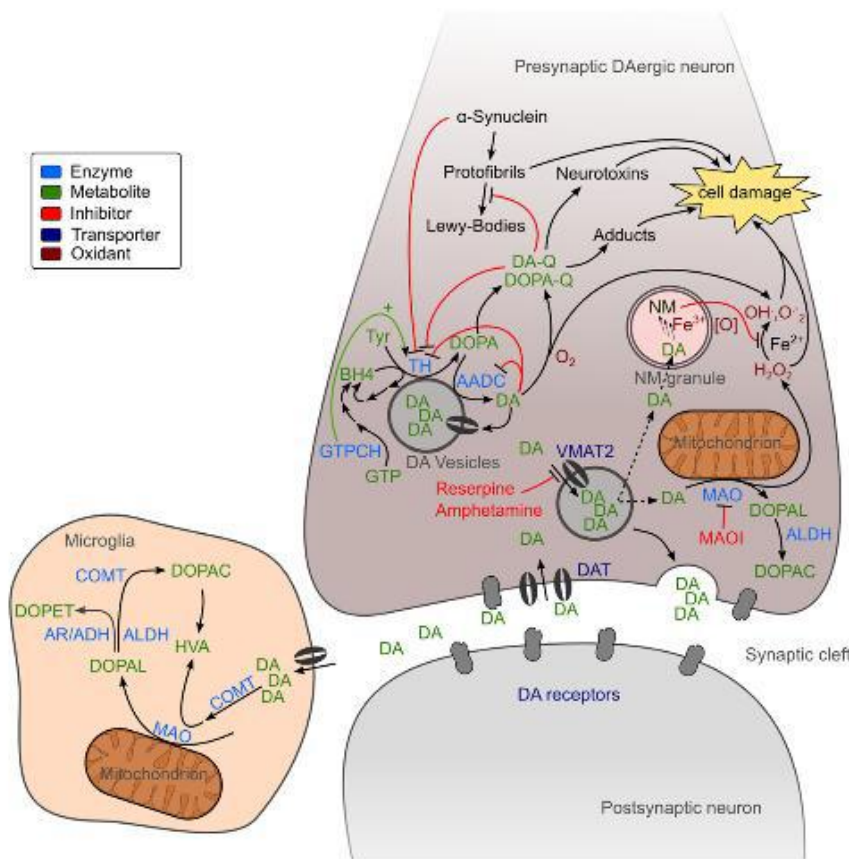
3.3.6 Τερματισμός Δράσης DA

Υπό κανονικές συνθήκες, οι νευροδιαβιβαστές δεν παραμένουν για πολύ στη μετασυναπτική μεμβράνη, αλλά αποσυνδέονται από τον υποδοχέα και στη συνέχεια επαναπροσλαμβάνονται από τον προσυναπτικό νευρώνα, στις περισσότερες περιπτώσεις αναλλοίωτοι και επαναχρησιμοποιούνται. Συγκεκριμένα για την DA υπάρχουν τρεις ευρέως διαδεδομένοι τρόποι για τον τερματισμό της δράσης της στη σύναψη (Siegel et al., 2006; Cousins et al., 2009): (1) η ενζυματική διάσπαση της από την κατεχολο-μεθυλο-τρανσφεράση (COMT) και την μονοαμινο-οξειδάση (MAO), (2) η άμεση επαναπρόσληψή της στον προσυναπτικό νευρώνα από τον μεταφορέα της (DAT) και τέλος, (3) η διάχυση της μακριά από τις θέσεις του υποδοχέα και τη συναπτική σχισμή.

Πιο αναλυτικά, η DA που απελευθερώνεται στον εξωκυττάριο χώρο επαναπροσλαμβάνεται στην προσυναπτική απόληξη, προκειμένου να τερματιστεί η δράση της στη σύναψη, από τον μεταφορέα της ντοπαμίνης (Dopamine Transporter, DAT -βλ. παρακάτω) μέσω ενεργητικού μηχανισμού επαναπρόσληψης. Η ενδοκυττάρια DA που δεν αποθηκεύεται σε κυστίδια μεταβολίζεται από την μονοάμινο-οξειδάση (MAOA και MAOB). Συνεπώς είναι πιθανόν αλλαγές στη MAO να μπορούν να επηρεάσουν άμεσα τη διαθέσιμη κυτσοσολικής DA για την πλήρωση των κυστιδίων (Westerink, 2006). Η MAO εδράζεται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και καταλύει την οξειδωτική απαμίνωση των μονοαμινών, μετατρέποντάς τες σε ασταθή και ανενεργά αλδεϋδικά παράγωγα τα οποία στη συνέχεια καταβολίζονται περαιτέρω (Meiser et al., 2013). Συγκεκριμένα, η MAO καταβολίζει την DA σε 3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ (3,4- dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC). Στο ΚΝΣ η MAO εντοπίζεται στους νευρώνες, τα μικρογλοιακά κύτταρα και τα αστροκύτταρα. Η MAOA είναι υπεύθυνη για την οξείδωση της DA στους επίμυες ενώ η MAOB στους ανθρώπους. Η DA της συναπτικής σχισμής προσλαμβάνεται και από τα γλοιακά κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά

αποικοδομούν την DA μέσω της MAO καθώς και μέσω της Ο-μεθυλο-τρανσφεράση των κατεχολαμινών (COMT). Η COMT, που εντοπίζεται τόσο ενδο- όσο και εξωκυτταρικά, καταβολίζει την DA σε 3-μεθοξυ-τυραμίνη (3-methoxytyramine, 3-MT). Τα προϊόντα καταβολισμού κάθε ενζύμου αποτελούν υπόστρωμα για το άλλο ένζυμο, ώστε να είναι πιο αποτελεσματική η απομάκρυνση των τοξικών παραπροϊόντων. Τα προϊόντα DOPAC και 3-MT καταβολίζονται περαιτέρω σε ομοβανιλικό οξύ (homovanillic acid, HVA) (εικόνα 3.6) (Meiser et al., 2013).

Εικόνα 3.6: Νευρωνικός μεταβολισμός της DA. Στην απόληξη ενός ντοπαμινεργικού νευρώνα η DA συντίθεται από τη συνδυασμένη δράση της TH και της AADC και μεταφέρεται σε συναπτικά κυστίδια από τον μεταφορέα VMAT2 (vesicular monoamine transporter 2). Η DA που διαρρέει από τα κυστίδια απαμινώνεται από τη MAO. Έπειτα από νευρωνική διέγερση η DA απελευθερώνεται στη συναπτική σχισμή για τη μεταγωγή σήματος. Η ντοπαμινεργική σηματοδότηση σταματά είτε έπειτα από επαναπρόσληψη και ανακύκλωση της DA στον προσυναπτικό νευρώνα είτε έπειτα από πρόσληψη της από παρακείμενα



μικρογλοιακά κύτταρα και μετέπειτα αποικοδόμηση της από τις MAO και COMT

μικρογλοιακά κύτταρα και μετέπειτα αποικοδόμηση της από τις MAO και COMT

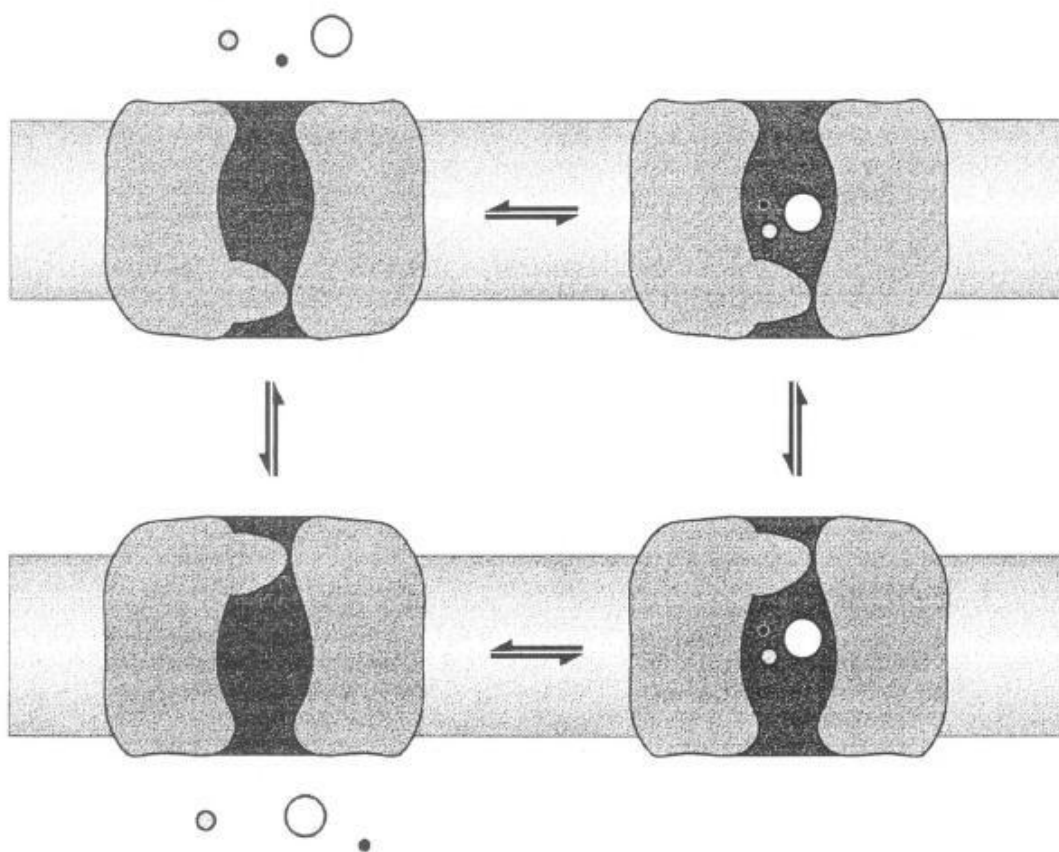
3.3.7 Ο Μεταφορέας της Ντοπαμίνης (*Dopamine Transporter, DAT*)

Ο Μεταφορέας της Ντοπαμίνης (DAT) είναι μέλος μιας μεγάλης οικογένειας Na^+/Cl^- -εξαρτώμενων νευρωνικών μεταφορέων της πλασματικής μεμβράνης, η οποία επίσης περιλαμβάνει το μεταφορέα της νορεπινεφρίνης (NET) και της σεροτονίνης (SERT) καθώς και τους μεταφορείς των αμινοξέων: γ -αμινοβουτυρικό οξύ (GAT), γλυκίνη, προλίνη, ταυρίνη, κρεατίνη και μπεταΐνη (Gainetdinov et al., 2003). Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον DAT κλωνοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1991 από διαφορετικές ομάδες ερευνητών (Giros et al., 1993; Shimada et al., 1991; Usdin et al., 1991) ταυτόχρονα με τους NET και SERT, ενώ μέχρι σήμερα έχει γίνει αλληλούχιση του DAT σε εννέα διαφορετικά είδη. Ο DAT των θηλαστικών εμφανίζει υψηλή ομοιότητα στις αμινοξικές του αλληλουχίες, τόσο ανάμεσα στα διαφορετικά είδη όσο και με άλλους μεταφορείς της ίδιας γονιδιακής οικογένειας, με την μεγαλύτερη μάλιστα ομοιότητα να εμφανίζεται με τον NET (περίπου 66%), με τον SERT (περίπου 49%) και με τον GAT (περίπου 45%). Γενικά παρατηρείται υψηλός βαθμός συντήρησης μεταξύ των αμινοξικών αλληλουχιών των μεταφορέων των μονοαμινών (DAT, NET, SERT) μέσα στο ίδιο είδος.

Ο DAT είναι ενεργός μόνο όταν βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη (Zahniser et al., 2009) επάγοντας τη μετάθεση του υποστρώματός του κατά μήκος της πλασματικής μεμβράνης, προς το εσωτερικό του νευρώνα. Δεδομένου ότι η μετακίνηση της DA γίνεται ενάντια στην κλίση συγκέντρωσης της, ο DAT θερμοδυναμικώς συζεύγει τη μετακίνηση του υποστρώματος με την προς τα έξω εισροή ιόντων μέσω της οποίας ο DAT αντλεί την ηλεκτρογόνο δύναμή του (Williams et al., 2006). Η πρόσληψη της DA και η μετακίνηση της προς το κυτοσόλιο του προσυναπτικού νευρώνα απαιτεί την παράλληλη είσοδο ιόντων Na^+ και ιόντων Cl^- (συμμεταφορά) σε αναλογία 1 μόριο νευροδιαβιβαστή/2 ιόντα Na^+ /1 ιόν Cl^- . Η κατευθύνουσα δύναμη που οδηγεί στην πρόσληψη της DA από τον DAT είναι η ιοντική κλίση της συγκέντρωσης Na^+ , που δημιουργείται από την ηλεκτρογόνο αντλία Na^+/K^+ ATPάση. Πιο συγκεκριμένα το γεγονός ότι το Na^+ μεταφέρεται κατά τη φορά της ηλεκτροχημικής του κλίσης παρέχει την απαιτούμενη ενέργεια για την θερμοδυναμικώς μη-ευνοούμενη μεταφορά της DA προς τα έξω.

Υπό φυσιολογικές τιμές pH, η DA είναι θετικά φορτισμένη και έτσι η ταυτόχρονη προς τα έξω μετακίνηση ενός μορίου DA μαζί με δύο ιόντα Na^+ και ένα ιόν Cl^- είναι ηλεκτρογόνος, καθώς έχουμε μετάθεση δύο θετικών φορτίων σε κάθε κύκλο μεταφοράς (Williams et al., 2006).

Για την μεταφορά της DA έχει προταθεί ένας μηχανισμός εναλλασσόμενης πρόσβασης που αποτελείται από εσωτερικές και εξωτερικές πύλες οι οποίες ρυθμίζουν την κίνηση του υποστρώματος στο ενδοκυττάριο περιβάλλον της απόληξης (Jardetzky, 1966; Rudnick, 1998). Έτσι η πρόσδεση των ιόντων Na^+ στον DAT μαζί με το υπόστρωμα προκαλεί μία διαμορφωτική αλλαγή οδηγώντας στη μετάβαση του μεταφορέα από την «προς τα έξω» διαμόρφωση, κατά την οποία η θέση πρόσδεσης του υποστρώματος είναι εκτεθειμένη στο εξωκυττάριο μέσο, στην «προς τα έσω» διαμόρφωση κατά την οποία η θέση πρόσδεσης του υποστρώματος είναι εκτεθειμένη πλέον στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον (Rudnick, 1998) (εικόνα 3.7).



Εικόνα 3.7: Προτεινόμενος μηχανισμός της συζευγμένης με ιόντα μεταφοράς νευροδιαβιβαστών. Το εξωκυττάριο υπόστρωμα μαζί με τα συμμεταφερόμενα ιόντα (επάνω αριστερά) προσδένονται στη θέση δέσμευσης του μεταφορέα (επάνω δεξιά) αλλά δεν μπορούν να εισέλθουν στο κυτταρόπλασμα εξαιτίας του φραγμού. Έπειτα από διαμορφωτική αλλαγή ο φραγμός αποτρέπει την προς τα έξω μετακίνηση, αλλά πλέον το κυτταρόπλασμα είναι προσβάσιμο στη θέση πρόσδεσης (κάτω δεξιά). Την αποδέσμευση των προσδεσμένων μορίων (κάτω δεξιά) ακολουθεί μια διαμορφωτική αλλαγή που επαναφέρει τον μεταφορέα στην αρχική του κατάσταση (Rudnick, 1998).

Μέχρι πρόσφατα, ήταν αποδεκτό ότι η ιοντική αγωγιμότητα που σχετίζεται με τον DAT συμμετείχε μόνο ως μία παθητική διεργασία που είναι απαραίτητη στην θερμοδυναμικώς επαγόμενη μετατόπιση της DA. Ωστόσο πρόσφατα ενδιαφέροντα ευρήματα πειραμάτων ηλεκτροφυσιολογίας υποστηρίζουν την άποψη ότι οι μεταφορείς των βιογενών αμινών εμφανίζουν βιοφυσικά χαρακτηριστικά παρόμοια με εκείνα των τασεο-ελεγχόμενων και ελεγχόμενων από πρόσδεμα ιοντικών καναλιών. Συνεπώς προτείνεται ότι ο DAT δημιουργεί ηλεκτρικά ρεύματα μέσω δύο οδών : (α) η πρώτη συζεύγνυται με τη μεταφορά DA (transporter-like) (β) η δεύτερη είναι μη συζευγμένη (channel-like), αλλά μερικώς υποβοηθούμενη από την μεταφορά της DA. Πιθανότατα τα ρεύματα αυτά εμπλέκονται στη ρύθμιση της νευρωνικής διεγερσιμότητας και πιθανότατα θεωρούνται ως ένας εναλλακτικός μηχανισμός απελευθέρωσης DA από ντοπαμινεργικούς νευρώνες (Williams et al., 2006).

Ο DAT θεωρείται ένας ειδικός μάρτυρας για τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες καθώς εκφράζεται αποκλειστικά και μόνο στους νευρώνες που συνθέτουν DA. Τόσο ο DAT όσο και ο μεταφορέας της νορεπινεφρίνης (NET) έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να μεταφέρουν DA καθώς και νορεπινεφρίνη (NE), δηλαδή ο καθένας τους μεταφέρει εκτός από το δικό του υπόστρωμα και το υπόστρωμα του άλλου. Πιο συγκεκριμένα, ο NET μεταφέρει NE και DA με παρόμοια τιμή Km (περίπου 1μM) ενώ ο DAT εμφανίζει 10 φορές μεγαλύτερη συγγένεια για την DA σε σχέση με την NE. Όπως έχει ήδη αναφερθεί ο DAT μεταφέρει DA και στην συναπτική σχισμή, καθώς λόγω της μεγάλης συσσώρευσης της DA ενδοκυτταρικά δημιουργούνται οι κατάλληλες θερμοδυναμικές συνθήκες που προάγουν την αντίστροφη μεταφορά, έχοντας ως αποτέλεσμα την εκροή υποστρώματος από τον ενδο- στον εξωκυττάριο χώρο (Liang et al., 1982).

3.4 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΝΤΟΠΑΜΙΝΗΣ

Η ντοπαμίνη έχει πολλές λειτουργίες στον εγκέφαλο, όπως στην εθελούσια κίνηση, τη γνωστική λειτουργία, την προσοχή, τη μνήμη και τη μάθηση, τα κίνητρα, την τιμωρία και την ανταμοιβή, τη διάθεση, τον ύπνο, τα όνειρα, την αναστολή της παραγωγής προλακτίνης (γαλουχία και σεξουαλική ικανοποίηση). Διακρίνεται ωστόσο για τον ρόλο της στη ρύθμιση της ανταμοιβής και της κίνησης. Έχει βρεθεί ότι οι υποδοχείς D1 καθώς και οι D4 υποδοχείς είναι υπεύθυνοι για τις γνωστικές επιδράσεις της ντοπαμίνης, ενώ υποδοχείς D2 είναι πιο ειδικοί για δράσεις κίνησης.

Η πλέον σημαντική λειτουργία της ντοπαμίνης είναι αυτή στο σύστημα ανταμοιβής. Κάθε είδος ανταμοιβής που έχει μελετηθεί αυξάνει τα επίπεδα DA στον εγκέφαλο, και μια ποικιλία από εθιστικά φάρμακα, συμπεριλαμβανομένων των διεγερτικών, όπως η κοκαΐνη και η μεθαμφεταμίνη, δρουν απευθείας στο σύστημα ντοπαμίνης. Χαρακτηριστικά της προσωπικότητας, όπως η εξωστρέφεια και η ανταμοιβή έχουν συνδεθεί με τη μεγαλύτερη ευαισθησία του μεσομεταιχμιακού συστήματος στην DA. Πιο συγκεκριμένα, η DA σχετίζεται προκαλώντας συναισθήματα ευχαρίστησης και ενίσχυσης ώστε να κινητοποιηθούν συγκεκριμένες προδραστικές δραστηριότητες. Ως μέρος της ανταμοιβής, η ντοπαμίνη παράγεται σε νευρικά κυτταρικά σώματα που βρίσκονται εντός της κοιλιακής περιοχής (VTA) και απελευθερώνεται στον επικλινή πυρήνα και τον προμετωπιαίο φλοιό. Επιπλέον, οι αποκρίσεις των ντοπαμινεργικών νευρώνων κωδικοποιούν την πληροφορία ανταμοιβής και η κωδικοποίηση ακολουθεί το σχέδιο της πρόβλεψης του λάθους. Αυτή η ιδιότητα επιτρέπει στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες να εκπέμπουν ένα «διδασκτικό σήμα» προτεραιότητας και εκμάθησης της καθοδηγούμενης συμπεριφοράς και να κωδικοποιήσουν μια πληροφορία ανταμοιβής σχετική με τις προβλέψεις.

Σημαντική επίδραση φαίνεται να έχει η ντοπαμίνη και στο κύκλωμα κινητοποίησης των βασικών γαγγλίων το οποίο με τη σειρά του επιδρά στον τρόπο που ο εγκέφαλος ελέγχει τις κινήσεις. Οι κινητικές λειτουργίες συνδέονται με μια ξεχωριστή οδό, που ξεκινά από νευρώνες στη μέλαινα ουσία που παράγουν και απελευθερώνουν DA στο ραβδωτό σώμα. Έλλειψη της ντοπαμίνης και συγκεκριμένα απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων στο μελαινοραβδωτό μονοπάτι σχετίζεται με την νόσο Parkinson, μια ασθένεια στην οποία χάνεται η ικανότητα εκτέλεσης ομαλών και ελεγχόμενων κινήσεων.

Στον μετωπιαίο λοβό η ντοπαμίνη ελέγχει την εισροή πληροφοριών από άλλες περιοχές του εγκεφάλου ενώ είναι παρούσα σε δυο βασικές περιοχές του μετωπιαίου φλοιού των αρουραίων. Έχει εντοπιστεί κυρίως στον έσω μετωπιαίο φλοιό και στο φλοιό του προσαγωγίου (Thierry et al., 1976; Lindvall et al., 1974). Διαταραχή της συγκέντρωσης της ντοπαμίνης είναι ικανή να προκαλέσει μείωση των γνωστικών λειτουργιών κυρίως της μνήμης, της προσοχής και της επίλυσης προβλημάτων. Εν γέννη, οι κατεχολαμινικοί νευροδιαβιβαστές φαίνεται να παίζουν καθοριστικό ρόλο στην λειτουργία του προμετωπιαίου φλοιού. Πιστεύεται ότι η μείωση της συγκέντρωσης της ντοπαμίνης στον προμετωπιαίο φλοιό συγκεκριμένα σχετίζεται με την

διαταραχή της ελλειμματικής προσοχής και τη σχιζοφρένεια. Τέλος, η ντοπαμίνη είναι ο κύριος ρυθμιστής της έκκρισης της προλακτίνης από την πρόσθια υπόφυση δρώντας ανασταλτικά.

3.4.1 Αναπτυξιακός Ρόλος της Ντοπαμίνης

Ο αναπτυξιακός ρόλος της ντοπαμίνης είναι ιδιαίτερα καθοριστικός καθώς σε περιοχές όπως ο προμετωπιαίος φλοιός και το ραβδωτό εντοπίζονται οι υποδοχείς της ντοπαμίνης και νευρώνονται από ντοπαμινεργικά δίκτυα που εκφράζουν υποδοχείς ντοπαμίνης. Οι συγκεκριμένες περιοχές, όπως έχει ήδη αναφερθεί, ρυθμίζουν την μνήμη, το συναίσθημα, γνωστικές λειτουργίες και άλλα. Νευροαναπτυξιακές διαταραχές στις εν λόγω περιοχές εμπλέκονται σε νευροψυχιατρικές ασθένειες όπως τον αυτισμό και την σχιζοφρένεια (Simpson et al., 2010; Langen et al., 2012; Jonas et al., 2013; Bjorklund et al., 2007; Tritsch et al., 2012). Στην πραγματικότητα, η ντοπαμίνη και άλλοι νευροδιαβιβαστές εκφράζονται πριν από την συναπτογένεση και η ενεργοποίηση των υποδοχέων τους κατά την ανάπτυξη διαφοροποιεί κάποιες εγκεφαλικές λειτουργίες και συνδεσιμότητες, αποτελέσματα των οποίων αντικατοπτρίζονται στην ενήλικη ζωή (Schmidt et al., 1996; Spencer et al., 1998; Stanwood et al., 2001; 2007). Οι ντοπαμινεργικές συνάψεις και η έκφραση του υποδοχέα της ντοπαμίνης εμφανίζονται από νωρίς στην ανάπτυξη και ωριμάζουν κατά την εφηβεία, κατά την διάρκεια της οποίας υπάρχουν πολλές κρίσιμες περιόδους.

Αλλαγές στα συναπτικά πρότυπα της ντοπαμίνης αλλά και στην έκφραση του υποδοχέα της έχουν βρεθεί σε πολλές εγκεφαλικές δυσλειτουργίες, όπως και σε ψυχιατρικές ασθένειες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η μείωση των ντοπαμινεργικών αξόνων στα βαθύτερα στρώματα του εσω-προμετωπιαίου φλοιού και η μείωση της πρόσδεσης ανταγωνιστή του D1 υποδοχέα που συμβαίνει σε ασθενείς με σχιζοφρένεια (Okubo et al., 1997; Akil et al., 1999). Επιπρόσθετα, στο ραβδωτό έχει παρατηρηθεί αυξημένη πρόσδεση ανταγωνιστή του D2 υποδοχέα σε ασθενείς με το σύνδρομο της διαταραχής της ελλειμματικής προσοχής – υπερκινητικότητας (ADHD) και κατάθλιψης (D’Haenen and Bossuyt, 1994; Shah et al., 1997). Ο μετωπιαίος φλοιός στα τρωκτικά αρχίζει να νευρώνεται με ντοπαμινεργικούς άξονες στη μέση της κύησης, κατά τη γέννηση η συγκέντρωση των νευρώνων αυτών αυξάνεται και τελικά οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες ωριμάζουν στη μεταγεννητική ημέρα 60 (PND 60). Η ντοπαμινεργική ανάπτυξη συνεχίζει και μετά τη γέννηση ενώ ταυτόχρονα επηρεάζει την συναπτογένεση και τη συνδεσιμότητα του πρόσθιου εγκεφάλου, γεγονός που αποδεικνύεται με τη μείωση των D1

υποδοχέων που συμβαίνει κατά την εφηβεία (Andersen et al., 2000). Οι Jung και Benett (1996) απέδειξαν ότι η έκφραση του D1 υποδοχέα μειώνεται σταδιακά μετά το πέρας της 4^{ης} μεταγεννητικής εβδομάδας (Andersen et al., 2000; Araki et al., 2007; Brenhouse et al., 2008).

Υπάρχουν φυλογενετικές διαφορές στην ανάπτυξη του εγκεφάλου μεταξύ των τρωκτικών και των ανώτερων θηλαστικών (Workman et al., 2013). Οι ντοπαμινεργικές νευρώσεις στον ανθρώπινο εγκέφαλο συμβαίνουν νωρίς στην ανάπτυξη και εγκαθιδρύονται στα μέσα της κύησης (Olson et al., 1973; Verney et al., 1991, 1993; Zecevic and Verney, 1995). Αυτή η εξέλιξη στα πρωτεύοντα υποδηλώνει έναν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο της ντοπαμίνης καθώς συνδέεται με αυξημένες νευροψυχιατρικές ασθένειες που εμφανίζονται κατά την διάρκεια της εφηβείας την περίοδο δηλαδή που το ντοπαμινεργικό σύστημα ωριμάζει. Νευροψυχιατρικές ασθένειες όπως η σχιζοφρένεια και το σύνδρομο της διαταραχής ελλειμματικής προσοχής εμφανίζουν δυσλειτουργίες σε περιοχές που είναι πλούσιες στην ντοπαμίνη όπως ο προμετωπιαίος φλοιός και το ραβδωτό (Arnsten, 2006, 2011; Leppanen, 2006; Andersen and Teicher, 2009; Arnsten et al., 2012).

4. ΠΡΩΙΜΕΣ ΕΜΠΕΙΡΙΕΣ

Το αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα χαρακτηρίζεται από έντονη πλαστικότητα, όπως καλείται η ευαισθησία της ανάπτυξης των νευρώνων στις περιβαλλοντικές αλλαγές, και αυτή παίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στις μεταβολές των νευρικών κυκλωμάτων ανάλογα με τις εμπειρίες, ακόμα και στην ενήλικη ζωή. Γενικότερα, η ανάπτυξη του ανθρώπινου οργανισμού είναι μία πολυσύνθετη διαδικασία, η οποία επηρεάζεται από ένα ευρύ φάσμα αλληλεπιδράσεων μεταξύ γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Πλήθος μελετών έχουν επιβεβαιώσει το ότι οι αλληλεπιδράσεις γονιδίων – περιβάλλοντος μεσολαβούν στον προσδιορισμό της αντιμετώπισης διαφόρων περιβαλλοντικών προκλήσεων αλλά και της γνωστικής συμπεριφοράς στους ενήλικες (Bagot et al., 2010).

Τα εκάστοτε χαρακτηριστικά κληρονομούνται μέσω του DNA, το οποίο περιέχει τα γονίδια που με την σειρά τους μεταφέρουν πληροφορίες για τις αλληλουχίες όλων των πρωτεϊνών τις οποίες μπορεί να εκφράσει ο οργανισμός, και μεταβιβάζουν τις πληροφορίες αυτές μέσω της αντιγραφής. Επομένως, το DNA των γονιδίων που εκφράζονται στον εγκέφαλο κωδικοποιεί πρωτεΐνες οι οποίες είναι σημαντικές για την ανάπτυξη, τη διατήρηση και τη ρύθμιση νευρικών κυκλωμάτων που αποτελούν τη βάση της συμπεριφοράς. Σε προγεννητικό επίπεδο τα γονίδια είναι οι κύριοι ρυθμιστές της ανάπτυξης του εγκεφάλου καθώς ο οργανισμός δεν είναι δυνατόν να παρέμβει στην αλληλουχία των γονιδίων του και να την τροποποιήσει. Ο δε ρόλος του περιβάλλοντος εστιάζεται σε αυτό που αποκαλείται πρώιμη εμπειρία. Δυσμενείς εμπειρίες σε αρχικά στάδια της ζωής σχετίζονται με ποικίλες ψυχοπαθολογίες που εκδηλώνονται στην ενήλικη ζωή (De Bellis, 2001; Heim et al., 2010; Rutter et al., 1997).

Σήμερα, ο παράγοντας των πρώιμων εμπειριών θεωρείται ως ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες για τον καθορισμό της μελλοντικής προσαρμοστικής ικανότητας του ανθρώπου στις απαιτήσεις του περιβάλλοντός του, καθώς και για την προδιάθεσή του για ψυχικές και σωματικές ασθένειες. Συγκεκριμένα, οι δυσμενείς πρώιμες εμπειρίες και η παιδική παραμέληση φαίνεται πως επιδρούν στο γονιδίωμα του ανθρώπινου οργανισμού και επηρεάζουν τόσο την ανάπτυξη του όσο και τη φυσική νοητική του υγεία. Για αυτό μάλιστα υποστηρίζεται πως η σταθερή σχέση μεταξύ μητέρας και απόγονου, σε συνδυασμό με την αποκαλούμενη μητρική φροντίδα, συμβάλλουν στη φυσιολογική ανάπτυξη και ενηλικίωση του νεογνού, σε

αντίθεση με την αδιαφορία και την κακομεταχείριση που μπορεί να οδηγήσουν σε ψυχοπαθολογικές καταστάσεις (Heim et al., 2001; McEwen, 2003; Nemeroff, 2004).

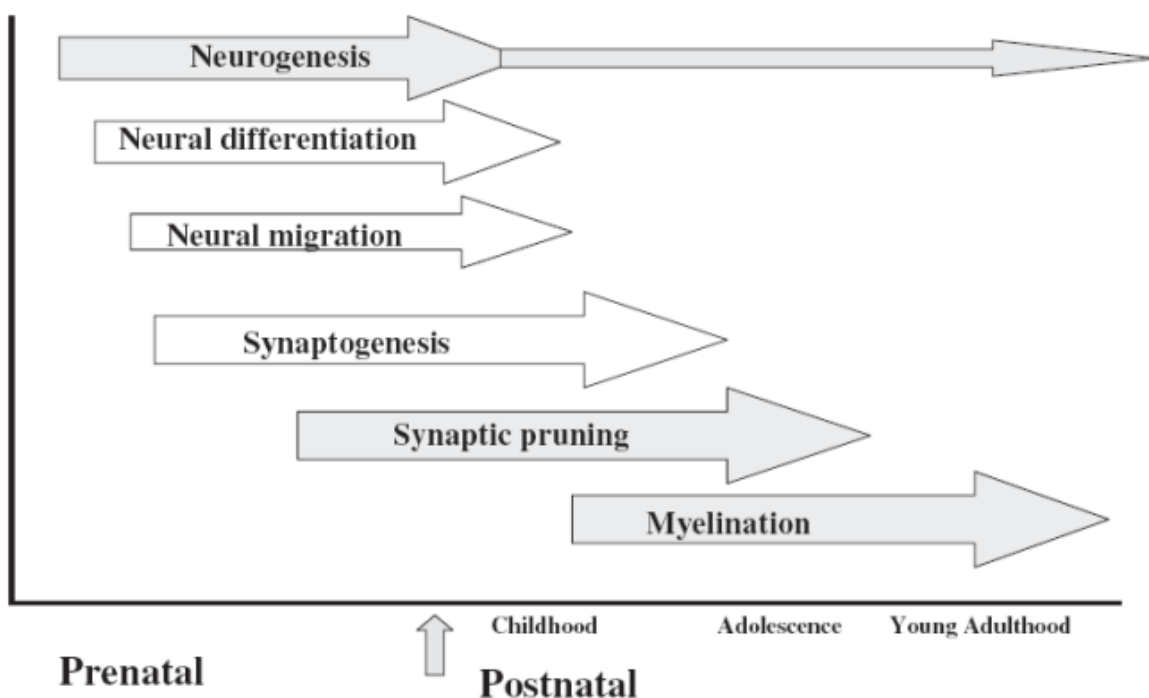
Βέβαια, οι πρώιμες αυτές εμπειρίες δεν περιλαμβάνουν μόνο τις μεταγεννητικές «εμπειρίες» του νεογνού μέχρι την ενηλικίωση αλλά και του εμβρύου, από την αρχή της κύησης, ή όπως αποκαλούνται, τις προγεννητικές εμπειρίες. Κατά τα στάδια αυτά ο εγκέφαλος, όπως και ο υπόλοιπος οργανισμός, αναπτύσσεται· έτσι, οποιαδήποτε επίδραση στην ανάπτυξη αυτή μπορεί να επιφέρει μόνιμες αλλαγές στη λειτουργία του οργανισμού. Είναι λογικό λοιπόν, ότι αν οι αλλαγές στο εμβρυϊκό περιβάλλον είναι επιβλαβείς και παρεμποδίζουν τη φυσιολογική ανάπτυξη του οργανισμού, υπάρχει πιθανότητα μεγαλύτερης προδιάθεσης για ψυχικές και άλλες ασθένειες. Για παράδειγμα, η κακή διατροφή της εγκύου, η κατάχρηση ουσιών, το κάπνισμα, η κακή ψυχολογική κατάσταση κ.λπ. είναι κάποια παραδείγματα των παραγόντων που μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά την ανάπτυξη ενός οργανισμού προγεννητικά.

4.1 ΜΗΤΡΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ

Οι πρώτες εμπειρίες της ζωής και ιδιαίτερα η σχέση μητέρας – νεογνού είναι γνωστό ότι παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη του οργανισμού. Ψυχαναλυτικές θεωρίες, παλαιότερες και νεότερες, τόνισαν την καθοριστική σχέση του γονέα με το βρέφος του για τη μετέπειτα ανάπτυξη του παιδιού, δίνοντας ιδιαίτερη έμφαση στο ρόλο της σχέσης μητέρας-νεογνού. Συγκεκριμένα, στα νεογνά η μητέρα αποτελεί την πιο βασική και ουσιαστική πηγή αισθητικών πληροφοριών στο μεταγεννητικό περιβάλλον και η αλληλεπίδραση μητέρας νεογνού επηρεάζει την ανάπτυξη του εγκεφάλου και ειδικά τη λειτουργία των συνάψεων και τη δημιουργία νευρωνικών κυκλωμάτων. Μάλιστα, οι πρώτες αλληλεπιδράσεις δεν είναι σημαντικές μόνο για να μάθει το βρέφος τις βασικές δεξιότητες επικοινωνίας, αλλά προσαρμόζοντας η μητέρα τη συμπεριφορά της στο βρέφος της, το βοηθάει να μειώσει το στρες και να ρυθμίσει τη συναισθηματική του κατάσταση (Dennis, 2006).

Όπως γίνεται κατανοητό, η ψυχολογία δίνει έμφαση στις πρώιμες εμπειρίες της ζωής του ανθρώπου, στην αλληλεπίδρασή του με τα σημαντικά πρόσωπα του περιβάλλοντός του και ιδίως με το πρόσωπο που τον φροντίζει στην αρχή της ζωής του, που είναι συνήθως η μητέρα του. Η αρχική σχέση μητέρας και βρέφους συντελεί στην απαρτίωση της εικόνας του εαυτού, καθώς και στη διαμόρφωση του τρόπου που ο κάθε άνθρωπος μαθαίνει να σχετίζεται με τους άλλους ανθρώπους. Η περίοδος της ενδομήτριου ζωής και η παιδική ηλικία είναι καθοριστικές για την

ανάπτυξη του εγκεφάλου. Συγκεκριμένα, στην ενδομήτριο ζωή συμβαίνει μια υπερπαραγωγή νευρώνων και τα τέσσερα πρώτα χρόνια της ζωής πληθαίνουν οι συνάψεις μεταξύ των νευρώνων και σχηματίζονται νευρωνικά δίκτυα. Προοδευτικές διαδικασίες ωρίμανσης, όπως η μυελίνωση των νευραξόνων, συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας και της εφηβείας (Simpson et al., 2010; De Bellis, 2005) (εικόνα 4.1). Οι εμπειρίες κατά τη διάρκεια αυτών των χρονικών περιόδων της ζωής του ανθρώπου μπορούν να έχουν σημαντικές επιπτώσεις στη νοητική και συγκινησιακή ανάπτυξη. Σχετικά ευρήματα προκύπτουν από μελέτες παιδιών που έζησαν σε συνθήκες παραμέλησης ή που κακοποιήθηκαν, από τη μελέτη της επίδρασης της επαρκούς μητρικής συμπεριφοράς καθώς και του προγεννητικού stress στον απόγονο.



Εικόνα 4.1: Η ανάπτυξη του εγκεφάλου από την ενδομήτριο ζωή έως την ενηλικίωση.

4.2 ΜΟΝΤΕΛΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ

Δεδομένου ότι στον άνθρωπο, όπως και σε άλλα θηλαστικά, τα νεογνά είναι απόλυτα εξαρτημένα από τη μητέρα για την επιβίωσή τους, η ποιότητα των πρώιμων εμπειριών συνδέεται άρρηκτα με την ποιότητα της μητρικής φροντίδας και του δεσμού που αναπτύσσεται μεταξύ μητέρας-νεογνού. Εννοιολογικά σχήματα που χρησιμοποιούνται κλασικά από ψυχολόγους όπως

δεσμός και συναισθηματική ρύθμιση πιθανώς αντικατοπτρίζουν προϊόντα νευροχημικών διεργασιών που διαμορφώνονται μέσα από την εμπειρία (Pollak, 2005). Έτσι, έχουν αναπτυχθεί πειραματικά μοντέλα που εφαρμόζονται σε τρωκτικά, με στόχο την διερεύνηση των ευεργετικών και των επιβλαβών χειρισμών του πρώιμου μεταγεννητικού περιβάλλοντος που εστιάζονται στην παραπάνω σχέση (Schmidt et al, 2011). Ένα σημαντικό πλεονέκτημα που προσφέρουν τα ζωικά μοντέλα (κυρίως μυών και επίμυων) είναι ότι επιτυγχάνεται ελεγχόμενο γενετικό υπόβαθρο αλλά και ανάπτυξη των νεογνών σε ένα καθορισμένο περιβάλλον, όπου όλα τα νεογνά έρχονται αντιμέτωπα με τις ίδιες εμπειρίες. Επιπλέον, δίνεται η δυνατότητα διερεύνησης αλλαγών σε συγκεκριμένα νευρωνικά κυκλώματα, νευροδιαβιβαστές καθώς και σε σηματοδοτικά μονοπάτια που πιθανότατα να διαμεσολαβούν την επίδραση των πρώιμων εμπειριών στην ενήλικη ζωή.

Ήδη από τη δεκαετία του 1950, ο Seymour Levine περιέγραψε την καταλυτική επίδραση πειραματικών χειρισμών που αφορούν τη σχέση μητέρας-νεογνού στην ανάπτυξη και εκδήλωση συμπεριφορικών και νευροενδοκρινικών αποκρίσεων σε καταστάσεις στρες κατά την ενήλικη ζωή επίμυων (Levine, 1957; 1960; 2001). Ο αποχωρισμός νεογέννητων επίμυων από τη μητέρα (μητρικός αποχωρισμός, MA, maternal separation) αποτελεί μια μεθοδολογική προσέγγιση πειραματικού χειρισμού του πρώιμου μεταγεννητικού περιβάλλοντος καθώς διαταράσσει τη σχέση μητέρας - νεογνού, που τις τελευταίες δεκαετίες χρησιμοποιείται ευρύτατα στη βασική έρευνα. Έχουν αναπτυχθεί διάφορα πειραματικά πρωτόκολλα εφαρμογής MA (Faturi et al., 2010; Tata, 2012). Πιο συγκεκριμένα, νεογέννητοι επίμυες ή μύες αποχωρίζονται εφάπαξ (Enthoven 2008a; 2008b; 2008c) είτε επαναλαμβανόμενα κατά τις πρώτες μεταγεννητικές εβδομάδες για σύντομα ή παρατεταμένα (Aisa et al., 2007; 2009a; 2009b) χρονικά διαστήματα από τη μητέρα τους ή και από τα υπόλοιπα νεογέννητα (συνθήκη αποστέρησης, early deprivation).

Έχει παρατηρηθεί ότι οι διαφορετικοί χειρισμοί MA οδηγούν στην ανάπτυξη διαφορετικών βιοψυχολογικών προτύπων. Ειδικότερα, ο επαναλαμβανόμενος σύντομος MA (διάρκειας 15min), ο οποίος ορίζεται ως συνθήκη νεογενικού χειρισμού (neonatal handling) (Meaney et al., 1985; 1988), φαίνεται να ενισχύει την αποτελεσματική αντιμετώπιση στρεσογόνων ερεθισμάτων κατά την ενήλικη ζωή των επίμυων, να συμβάλλει στην υγιή νευροφυσιολογική ανάπτυξη (Meaney et al, 1991; Weaver et al., 2004) και να διαδραματίζει έναν νευροπροστατευτικό ρόλο σε περιπτώσεις προσβολών του ΚΝΣ. Το αντίθετο παρατηρείται

στις εφαρμογές επαναλαμβανόμενου παρατεταμένου MA διάρκειας 180min είτε παραπάνω (Ladd et al., 2005; Aisa et al., 2007), είτε εφάπαξ εφαρμογής 24ωρου αποχωρισμού, χειρισμοί οι οποίοι αποτελούν συνθήκη πρώιμου μεταγεννητικού στρες (Tata, 2012; Aisa et al., 2009a; 2009b; 2007; 2008; Lehmann et al., 2002). Οι συνθήκες απόλυτης αποστέρησης κατά την πρώιμη ζωή επηρεάζουν τη φυσιολογική κοινωνικοποίηση των ζώων. Σύμφωνα με τους Levy et al., 2003, στα νεογνά που μεγάλωσαν σε συνθήκες απόλυτης αποστέρησης (τόσο από τη μητέρα όσο και από τα υπόλοιπα νεογνά της ίδιας γέννας), επηρεάζεται η κοινωνική μάθηση και η δυνατότητα να αναγνωρίσουν τα μέλη του ίδιου είδους, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στα ελλιπή οσφρητικά ερεθίσματα που έχουν λάβει κατά την ανάπτυξη.

Οι παρατηρούμενες διαφορές στη βιοψυχολογική εξέλιξη, ως απόρροια των συγκεκριμένων χειρισμών, σχετίζονται άμεσα με τη ποιότητα και τη συχνότητα της μητρικής φροντίδας που παρέχεται στο νεογνό κατά τη μεταγεννητική περίοδο. Ειδικότερα, η μητρική συμπεριφορά φροντίδας σε τρωκτικά λαμβάνει τη μορφή του θηλασμού με καμπύλωση της ράχης (arched-back nursing) της μητέρας, έτσι ώστε να «αγκαλιάζει» τα μικρά με την κοιλιακή της χώρα, σε συνδυασμό με συμπεριφορές γλειψίματος / περιποίησης (licking / grooming) (Franklin et al., 2010; Liu et al., 1997; 2000). Η μητρική συμπεριφορά φροντίδας κατά την επανένωση των νεογνών με τη μητέρα φαίνεται να αυξάνεται σε συνθήκες σύντομου MA (δηλαδή νεογνικού χειρισμού) (Liu et al., 1997; 2000; Weaver et al., 2002;2006) και να μειώνεται σε συνθήκες παρατεταμένου MA ή αποστέρησης (Beery et al., 2011). Εξάλλου η εμπειρία παρατεταμένου μητρικού αποχωρισμού επηρεάζει κι άλλες μορφές συναισθηματικής συμπεριφοράς των μητέρων, και ειδικότερα συνδέεται με αύξηση εκδήλωσης καταθλιπτικόμορφων και αγχωδών συμπεριφορών (Maniam et al., 2010). Με άλλα λόγια, η έκθεση στην εμπειρία του νεογνικού χειρισμού έχει μόνιμες επιδράσεις στον εγκέφαλο του επίμυ, καθώς τροποποιεί τη λειτουργία του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια και κατ' επέκταση την εκδηλούμενη συμπεριφορά, τροποποιώντας την ικανότητα του οργανισμού να προσαρμόζεται και να χειρίζεται αποτελεσματικά στρεσογόνα ερεθίσματα.

4.3 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΠΡΩΙΜΩΝ ΕΜΠΕΙΡΙΩΝ

Ο εγκέφαλος φέρει την ισόβια ικανότητα να προσαρμόζεται στο περιβάλλον. Οι εμπειρίες ενσωματώνονται στα βιολογικά δίκτυα ενός οργανισμού (είτε στιγμιαία, είτε καθώς αναπτύσσεται ο οργανισμός, είτε, ακόμη, καθώς εξελίσσεται το είδος του), με στόχο την κατάλληλη προσαρμογή του στο εκάστοτε περιβαλλοντικό πλαίσιο (Beery et al., 2011). Κατά τη νεογνική περίοδο, ωστόσο, συντελούνται ποικίλες και πολύπλοκες διεργασίες καθορισμού της ταυτότητας των νευρικών κυττάρων, οι οποίες αφορούν κυρίως τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση, τη συνάθροιση, τη διαφοροποίηση και εξειδίκευσή τους, καθώς και την μυελίνωση αλλά και τον προγραμματισμένο αποπτωτικό θάνατο (Bally-Cuif et al., 2003). Τα πρώιμα βιώματα της μητρικής φροντίδας επιδρούν καθοριστικά στη διαμόρφωση δομικών / μορφολογικών και λειτουργικών νευρωνικών δικτύων (Korosi et al, 2009; McEwen, 2010; 2012, καθώς επηρεάζουν δραματικά τη γονιδιακή έκφραση (συνεπώς και την ταυτότητα) των κυττάρων (McGowan et al., 2011; Meaney et al., 2010; 2005; Weaver, 2009a; b; Roth et al., 2011) και τις μεταξύ τους δενδριτικές και συναπτικές σχέσεις (Aisa et al., 2009a; Bagot et al., 2010), μέσω των συστημάτων νευροδιαβίβασης (σεροτονεργικό, χολινεργικό, ντοπαμινεργικό, γλουταμινικό, GABAεργικό, κ.ά.) με τη συνέργεια αυξητικών παραγόντων π.χ. συναπτοφυσίνη, νευροτροφικοί παράγοντες (Roth et al., 2011).

Οι εξαρτώμενες από την πρώιμη εμπειρία μοριακές μεταβολές καθορίζουν τον τρόπο λειτουργίας του άξονα ΥΥΕ και, ως εκ τούτου, το ορμονικό περιβάλλον του οργανισμού (Korosi et al., 2009; Macrì et al., 2006; Szyf et al., 2005). Οι πρώιμες εμπειρίες με αναφορά στη σχέση μητέρας-νεογνού φαίνεται ότι επηρεάζουν ιδιαίτερα τη βιοφυσιολογική απόκριση του οργανισμού σε καταστάσεις στρες, καθώς και τη γνωστική και συναισθηματική έκδηλη συμπεριφορά τόσο άμεσα (Litvin et al, 2010) όσο και μακροπρόθεσμα (Kalinichev et al., 2002), αν και όχι πάντοτε γραμμικά. Ουσιαστικά, υποστηρίζεται ότι η μητρική συμπεριφορά φροντίδας «προγραμματίζει» τη δια βίου συμπεριφορική και φυσιολογική λειτουργία, και την απόκριση στο στρες (Champagne et al., 2009; Champagne, 2010) και επηρεάζει ευρύτερα τη φυσική και ψυχική υγεία (Lupien et al., 2009; Szyf, 2009).

Από μια βιοχημική όψη, παρατηρούνται διαμεσολαβούμενες από την εμπειρία μεταβολές στα νευροδιαβιβαστικά συστήματα. Αναλυτικότερα, έχουν καταγραφεί μεταβολές στο σεροτονινεργικό σύστημα στον ιππόκαμπο και κυρίως στον προμετωπιαίο φλοιό (Matthews et al., 2001) σε ενήλικες επίμυες με αρνητικές πρώιμες εμπειρίες, κι αντίστοιχα στο

νοραδρενεργικό σύστημα του υποθαλάμου, του υποθαλάμου και του μετωπιαίου φλοιού (Veenema et al., 2006) και σε μεταιχμιακές περιοχές (Brake et al., 2004; Meaney et al., 2002). Πιο συγκεκριμένα, οι επιδράσεις που δέχονται τα τρωκτικά κατά την πρώιμη περίοδο της ζωής έχουν μακροπρόθεσμες επιπτώσεις στη συγκινησιακή κατάσταση και στην απαντητικότητα των ζώων στο stress. Πολλές μελέτες δείχνουν ότι η απομάκρυνση των νεογνών από τη μητέρα τους την πρώιμη περίοδο (μετά τη γέννηση) προκαλεί σταθερή αύξηση των αγχωδών και φοβικών συμπεριφορών (Champagne et al., 2005; Holmes et al., 2005). Φαίνεται ότι προκαλείται υπερδραστηριότητα του άξονα υποθάλαμος- υπόφυση-επινεφρίδια ως απάντηση στα στρεσογόνα ερεθίσματα (αυξημένα επίπεδα CRH, ACTH και κορτικοστερόνης). Αυτή η υπερδραστηριότητα διαρκεί εφόρου ζωής. Η εκσεσημασμένη δράση των γλυκοκορτικοειδών προκαλεί μια μόνιμη μείωση στη νευρογένεση του υπόκαμπου, που αποτελεί ένα πιθανό αιτιολογικό μηχανισμό των γνωστικών ελλειμμάτων που εμφανίζονται στην ενήλικη ζωή.

Μελετάται ιδιαίτερα ο ρόλος της CRH. Υπάρχουν ενδείξεις μιας σταθερής προς τα πάνω ρύθμισης της CRH στα πειραματόζωα που έχουν υποστεί παραμέληση στην πρώιμη περίοδο της ζωής. Τα νεογνά τα οποία έχουν υποστεί μητρική αποστέρηση εμφανίζουν αργότερα αύξηση της ορμόνης κυρίως στις περιοχές που έχουν σχέση με τις συγκινήσεις, όπως είναι ο υποθάλαμος και η αμυγδαλή. Επίσης είναι εξαιρετικά ευαίσθητα στην αγχολυτική δράση ανταγωνιστών των υποδοχέων της CRH. Στη ρύθμιση της έκλυσης της ορμόνης συμμετέχουν και οι υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών GR που βρίσκονται στον υπόκαμπο. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η ικανότητα αυτών των υποδοχέων να δρουν ανασταλτικά στην έκλυση CRH μπορεί να παραβλαφθεί ανεπανόρθωτα όταν το άτομο υποστεί stress κατά την πρώιμη ζωή. Αρουραίοι που υπέστησαν μητρική αποστέρηση επιδεικνύουν σημαντική μείωση των υποδοχέων GR στον πρόσθιο εγκέφαλο (forebrain) και μια ανεπάρκεια στη φυσιολογική προς τα κάτω ρύθμιση του άξονα μετά από χορήγηση συνθετικών κορτικοειδών κατά την ενήλικη ζωή.

Η στρεσογόνος επίδραση που έχει στη μητέρα η απομάκρυνση των νεογνών ευθύνεται (τουλάχιστον εν μέρει) για τις αρνητικές συνέπειες της μητρικής αποστέρησης στους αρουραίους. Σύμφωνα με μια μελέτη αν δώσουμε στις μητέρες ξένα νεογνά κατά την περίοδο του αποχωρισμού από τα δικά τους νεογνά, τα δικά τους νεογνά δεν εμφανίζουν αυξημένες αγχώδεις συμπεριφορές στο μέλλον (Holmes et al., 2005).

Επιπλέον, η μητρική αποστέρηση εμποδίζει την παραγωγή ορμονών κι άλλων παραγόντων που προωθούν την ανάπτυξη του απογόνου και που φυσιολογικά εκλύονται λόγω

της μητρικής φροντίδας. Συγκεκριμένα, τα απτικά ερεθίσματα της μητέρας διεγείρουν την έκκριση αυξητικής ορμόνης και μειώνουν την έκκριση γλυκοκορτικοειδών στο μωρό της. Τα μικρά που υφίστανται μακρές περιόδους μητρικής αποστέρησης έχουν αυξημένα επίπεδα γλυκοκορτικοειδών και χαμηλά επίπεδα αυξητικής ορμόνης. Αυτά τα φαινόμενα μπορούν να αντιστραφούν αν τα «χαϊδέσουμε» με βούρτσα, δηλαδή με ένα χειρισμό ο οποίος μιμείται τα απτικά ερεθίσματα που δέχεται το μωρό όταν το φροντίζει η μητέρα (Holmes et al., 2005).

Επιπρόσθετα, η μητρική αποστέρηση επηρεάζει τα συστήματα ενδογενών αμινών. Στους αρουραίους που υπέστησαν μητρική αποστέρηση υπάρχει αυξημένη έκφραση CRH στις κύριες θέσεις που ελέγχουν τη δραστηριότητα της σεροτονίνης και της νοραδρεναλίνης (πυρήνας της ραφής και υπομέλας τόπος αντίστοιχα). Μετά από επανειλημμένη μητρική αποστέρηση, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων σεροτονίνης στο ραχιαίο ιππόκαμπο σε ζώα και των δύο φύλων, ενώ τα επίπεδα σεροτονίνης ήταν μειωμένα στο μέσο προμετωπιαίο φλοιό (mPFC) μόνο αρσενικών αρουραίων. Τα επίπεδα νοραδρεναλίνης ήταν αυξημένα στον κοιλιακό ιππόκαμπο των θηλυκών αλλά όχι των αρσενικών αρουραίων που είχαν υποστεί μητρική αποστέρηση. Αυτά τα δεδομένα παρέχουν ενδείξεις ότι η μητρική αποστέρηση οδηγεί σε μεταβολές στις ενδογενείς αμίνες σε συνάρτηση με το φύλο και την περιοχή του εγκεφάλου (Matthews et al., 2001).

Οι Arborelius et al. (2007) μελέτησαν θηλυκούς αρουραίους οι οποίοι υπέστησαν μητρική αποστέρηση για 180 λεπτά δύο φορές την ημέρα τις δύο πρώτες εβδομάδες μετά τη γέννηση. Στη μέση ηλικία (15 μήνες ζωής για τους αρουραίους) βρέθηκαν μεταβολές στα συστήματα σεροτονίνης, νοραδρεναλίνης και ντοπαμίνης σε περιοχές του εγκεφάλου που πιστεύεται ότι συμμετέχουν στην παθογένεια της κατάθλιψης. Επιπλέον, φαίνεται ότι η μητρική αποστέρηση παραβλάπτει την ανάπτυξη των νευρικών συστημάτων που σχετίζονται με την ανταμοιβή και προκαλεί μεταβολές στα συστήματα νευροδιαβιβαστών (ντοπαμίνη, οπιοειδή) στις περιοχές του εγκεφάλου που σχετίζονται με την ανταμοιβή όπως είναι ο μετωπιαίος φλοιός και ο επικλινής πυρήνας.

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η μητρική αποστέρηση στους αρουραίους αυξάνει την εθελούσια κατανάλωση αλκοόλης και εντείνει τις συμπεριφορικές και ντοπαμινεργικές απαντήσεις σε ψυχοτρόπες ουσίες (Holmes et al., 2005; Huot et al., 2001). Γνωρίζοντας ότι η δυσλειτουργία των συστημάτων ενδογενών αμινών (σεροτονίνης, νοραδρεναλίνης και ντοπαμίνης) σχετίζεται με την εμφάνιση ψυχικών διαταραχών στην ενήλικη ζωή, θα μπορούσαμε να πούμε ότι οι

έρευνες αυτές παρέχουν ενδείξεις για τη σχέση των αντίξοων πρώιμων εμπειριών με την εμφάνιση ψυχοπαθολογίας αργότερα στη διάρκεια της ζωής.

Σε συνάφεια με τα προηγούμενα συμπεράσματα, μια σειρά μελετών (Caldji et al., 1998; Francis et al., 1999; Levine et al., 1994; Stern et al., 1997), υποδεικνύει ότι οι θετικές επιδράσεις του νεογνικού χειρισμού σχετίζονται με ποιοτικές μεταβολές στην αλληλεπίδραση μητέρας-βρέφους (αύξηση της καλής μητρικής συμπεριφοράς). Αυτές οι μητρικές συμπεριφορές είναι σταθερές κατά τη διάρκεια του χρόνου και ανεξάρτητες από τα νεογνά. Τόσο ο νεογνικός χειρισμός όσο και η καλή μητρική συμπεριφορά που προκαλεί προκαλούν αύξηση της σεροτονεργικής νευροδιαβίβασης στον ιππόκαμπο των νεογέννητων αρουραίων. Η αύξηση αυτή παρατηρείται στον ιππόκαμπο και στον προμετωπιαίο λοβό, όπου είναι αυξημένοι επιλεκτικά οι υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών. Δεν φαίνεται να υπάρχουν αλλαγές στη σεροτονεργική δραστηριότητα στον υποθάλαμο, στο διάφραγμα ή στην αμυγδαλή. Στις περιοχές αυτές δεν επηρεάζεται ούτε ο αριθμός των υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών.

Αξίζει να αναφερθεί ότι οι μακροχρόνιες επιδράσεις της πρώιμης εμπειρίας αντανakλούν επιγενετικές τροποποιήσεις στην έκφραση γονιδίων μέσω των μηχανισμών της μεθυλίωσης του DNA και της ακετυλίωσης (μεταξύ άλλων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων) των ιστονών³ οι οποίες έχουν συχνά συσχετισθεί με συμπεριφορικές μεταβολές (McClelland et al., 2011). Πληθώρα δεδομένων (Roth et al., 2009) φανερώνουν ότι κυρίως η πρώτη μεταγεννητική εβδομάδα των επίμυων είναι εξαιρετικά δεκτική στην εμπειρία μητρικής φροντίδας, λόγω της έντονης πλαστικότητας της μεθυλίωσης. Πιο συγκεκριμένα, η μειωμένη μητρική συμπεριφορά φροντίδας κατά τη πρώτη μεταγεννητική εβδομάδα (όπως παρατηρείται σε συνθήκες MA) διαταράσσει τις μετα-μεταφραστικές μοριακές διεργασίες (π.χ. ακετυλίωσης ιστονών και μεθυλίωσης του DNA) με αποτέλεσμα να επικρατεί χαμηλή έκφραση υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών (GR) στον ιππόκαμπο (Weaver et al., 2002; 2006) και στον μετωπιαίο φλοιό (Ladd et al., 2005). Η μειωμένη μητρική φροντίδα σχετίζεται, επιπλέον, με αυξημένη mRNA έκφραση υποδοχέων του εκλυτικού παράγοντα κορτικοτροπίνης (CRF1) στον υποθάλαμο (Korosi et al., 2009) και τον μετωπιαίο φλοιό (Wang et al., 2011). Τα διαταραγμένα επίπεδα έκφρασης των GR και CRF1 υποδοχέων στον ιππόκαμπο παρατηρούνται ήδη από πολύ νωρίς σε επίμυες που υποβάλλονται σε επαναλαμβανόμενο παρατεταμένο MA (Litvin et al., 2010). Αντιθέτως, επίμυες με εμπειρίες νεογνικού χειρισμού παρουσιάζουν αυξημένη GR έκφραση σε περιοχές του ιπποκάμπου και του μετωπιαίου φλοιού.

Η επιγενετική διαμόρφωση του ΚΝΣ που διαμεσολαβείται από τις πρώτες συναισθηματικές εμπειρίες αφορά σημεία κλειδιά για την συμπεριφορική λειτουργία (Danese et al., 2012; McEwen et al., 2010; Meaney et al., 2007), καθώς στοχεύει κρίσιμες γονιδιακές ομάδες σε αντίστοιχα κρίσιμες για τη συμπεριφορά περιοχές, όπως ο υπόκαμπος, ο υποθάλαμος, κι ο μετωπιαίος φλοιός (Kaffman et al., 2007). Γενικά, φαίνεται ότι ο παρατεταμένος ΜΑ καλλιεργεί πιο παθητικά πρότυπα αντιμετώπισης καταστάσεων στρες (Gardner et al., 2005), και μακροπρόθεσμα ενισχύει τις μορφές μάθησης μέσω φόβου (Sullivan et al., 2006). Από την άλλη, ενήλικοι επίμυες που βίωσαν παρατεταμένο ΜΑ τις πρώτες δύο μεταγεννητικές εβδομάδες παρουσιάζουν έντονη υποδραστηριότητα και στερεότυπη συμπεριφορά, συγκριτικά με μάρτυρες και επίμυες που βίωσαν σύντομο ΜΑ (Lippmann et al., 2007).

Ένα από τα γονίδια που συσχετίζεται με τις γνωσιακές διεργασίες είναι αυτό που ελέγχει τη σύνθεση της κατεχολ-Ο- μεθυλοτρανσφεράσης, ενός ενζύμου που αποδομεί το νευροδιαβιβαστή ντοπαμίνη στον εγκέφαλο. Έχει συσχετιστεί με τις λειτουργίες του προμετωπιαίου φλοιού, δηλαδή με το γνωσιακό έλεγχο και τις εκτελεστικές λειτουργίες, όπως είναι ο προγραμματισμός, η στοχοθέτηση, η εναρμόνιση των σκέψεων και της συμπεριφοράς με τα εσωτερικά κίνητρα, η πρόβλεψη των συνεπειών των πράξεων κλπ. Επίσης, η μνήμη εργασίας είναι γνωστό ότι ελέγχεται από τον προμετωπιαίο φλοιό. Η κατεχολ-Ο-μεθυλοτρανσφεράση δεν είναι το μόνο ένζυμο που μειώνει τα επίπεδα ντοπαμίνης στη σύναψη. Ο ρόλος της είναι ίσως πιο σημαντικός στον προμετωπιαίο φλοιό γιατί εκεί δεν υπάρχει σε μεγάλη ποσότητα μια άλλη πρωτεΐνη, ο μεταφορέας ντοπαμίνης, που διαμεσολαβεί την επαναπρόσληψη της ντοπαμίνης στο προσυναπτικό κύτταρο και έτσι μειώνονται τα επίπεδά της στη σύναψη. Ο μεταφορέας ντοπαμίνης βρίσκεται σε μεγάλη ποσότητα σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου, όπως τα βασικά γάγγλια, όπου η κατεχολ-Ο-μεθυλοτρανσφεράση έχει δευτερεύοντα ρόλο (Goldberg et al., 2004). Το γονίδιο που ελέγχει τη σύνθεση της κατεχολ-Ο-μεθυλοτρανσφεράσης βρίσκεται στο χρωμόσωμα 22 (22q11). Ένα αλληλόμορφο του γονιδίου που προκύπτει από αντικατάσταση μίας βάσης (γουανίνη) από μία άλλη (αδενίνη) στην αλληλουχία του DNA, οδηγεί στην αντικατάσταση ενός αμινοξέος από ένα άλλο (συγκεκριμένα της βαλίνης από μεθειονίνη) στο ένζυμο, με αποτέλεσμα την αλλαγή της δραστηριότητάς του. Το ένζυμο που περιέχει βαλίνη είναι πιο σταθερό, πιο δραστικό κι ευθύνεται για μεγαλύτερη αποδόμηση ντοπαμίνης σε σχέση με το ένζυμο που περιέχει μεθειονίνη (Goldberg et al., 2004).

Ο Egan (2001) προσπάθησε να καθορίσει τη σχέση του γονιδίου της κατεχολ-Ο-μεθυλοτρανσφεράσης με τις γνωσιακές διεργασίες του προμετωπιαίου φλοιού και με τη μνήμη εργασίας σε ένα δείγμα που περιλάμβανε ασθενείς με σχιζοφρένεια, τους υγιείς αδελφούς τους και υγιή άτομα (ομάδα ελέγχου). Βρήκε ότι τα άτομα με δύο αλληλόμορφα του γονιδίου που κωδικοποιούσε τη μορφή της πρωτεΐνης με μεθειονίνη είχαν καλύτερες επιδόσεις και τα άτομα που δεν είχαν καθόλου το γονίδιο αυτό είχαν τις χειρότερες επιδόσεις. Ο ερευνητής συμπέρανε ότι το γονίδιο που ευθύνεται για τη σύνθεση του λιγότερο δραστικού ενζύμου επιτρέπει μεγαλύτερη διαθεσιμότητα ντοπαμίνης στη σύναψη και σχετίζεται με καλύτερες επιδόσεις. Επιπλέον, διαπίστωσε ότι υπήρχε σημαντικά αυξημένη μεταβίβαση του γονιδίου που κωδικοποιεί το πιο δραστικό ένζυμο στους σχιζοφρενείς απογόνους των οικογενειών που μελετούσε. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι το γονίδιο που κωδικοποιεί το πιο δραστικό ένζυμο οδηγεί σε εντονότερο καταβολισμό ντοπαμίνης στον προμετωπιαίο λοβό και με τον τρόπο αυτό επηρεάζει τις γνωσιακές λειτουργίες και αυξάνει τον κίνδυνο σχιζοφρένειας.

Παράλληλα, μεταβολές ως απόρροια της πρώιμης εμπειρίας παρατηρούνται στην έκφραση νευροτροφικών παραγόντων. Γενικά, οι νευροτροφικοί παράγοντες ενισχύουν την υγιή συναπτική και δενδριτική ανάπτυξη των νευρώνων (Lee et al., 2012) καθώς και την επιβίωσή τους (Huang & Reichardt, 2001). Σε περιπτώσεις δυσμενών πρώιμων εμπειριών, παρατηρείται χαμηλότερη έκφραση του εγκεφαλικού νευροτροφικού παράγοντα (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) στον ιππόκαμπο και το ραβδωτό σώμα ενήλικων επίμυων που βίωσαν παρατεταμένο MA, σε σχέση με μάρτυρες και επίμυες με εμπειρία σύντομου MA (Lippmann, Bress, Nemeroff, Plotsky, & Monteggia, 2007). Αναφέρονται, ακόμη, διαταραχές στην DNA μεθυλίωση του BDNF στον προμετωπιαίο φλοιό ενήλικων επίμυων που είχαν εκτεθεί σε πρώιμο στρες, συγκεκριμένα, παρέμεναν με στρεσοσαρισμένους φροντιστές για 30min καθημερινά κατά τη πρώτη μεταγεννητική εβδομάδα (Roth et al, 2005), και σε θηλυκούς επίμυες με έκθεση σε πρώιμο στρες (Burton et al., 2007). Επιπλέον, αναφέρεται μειωμένη κατά ~30% η έκφραση του BDNF στην οδοντωτή έλικα και στις CA1 και CA3 περιοχές του ιπποκάμπου σε ενήλικες επίμυες με εμπειρίες πρώιμης μητρικής αποστέρησης (Choy et al., 2008).

Σε μοριακό επίπεδο, η αυξημένη μητρική φροντίδα επιδρά στην έκφραση γονιδίων στους νευρώνες του ιπποκάμπου. Στα τρωκτικά, την έκτη μέρα μετά τη γέννηση, οι απόγονοι «καλών» μητέρων είχαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης γονιδίων (Fish et al, 2004) τα οποία αφενός σχετίζονται με τη μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων όπως είναι ο μεταφορέας γλυκόζης,

η οξειδάση του κυτοχρώματος C και ο υποδοχέας LDL, αφετέρου ελέγχουν τη σύνθεση αυξητικών παραγόντων, όπως είναι ο νευροτροφικός παράγοντας που προέρχεται από τον εγκέφαλο (BDNF), και τέλος σχετίζονται με τη λειτουργία του υποδοχέα του γλουταμικού οξέος, του κυριότερου διεγερτικού νευροδιαβιβαστή στον εγκέφαλο.

Στον άνθρωπο συγκεκριμένα, έχει πιστοποιηθεί ότι η παιδική παραμέληση και η κακοποίηση είναι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση ψυχοπαθολογίας στο μέλλον όπως κατάθλιψη, αντικοινωνικής συμπεριφοράς κ.α.. Αν και τα αίτια των επιπτώσεων της παραμέλησης είναι σύνθετα (ενδεχομένως συμμετέχουν και άλλα περιβαλλοντικά καθώς και γενετικά αίτια), φαίνεται ότι η παιδική παραμέληση είναι αιτιολογικά και ανεξάρτητα συνδεδεμένη με τον κίνδυνο εμφάνισης ψυχοπαθολογίας (De Bellis, 2005). Τα νήπια που δεν διαμορφώνουν ένα σταθερό ασφαλές δεσμό βρίσκονται σε μια κατάσταση χρόνιου άγχους. Επιπλέον, έχει προταθεί ότι οι αντίξοες πρώιμες εμπειρίες (κακοποίηση, παραμέληση) επιδρούν στον εγκέφαλο και διαταράσσουν την ομαλή ανάπτυξή του, με αποτέλεσμα την καθυστέρηση στην γνωσιακή και συγκινησιακή ανάπτυξη του παιδιού και την εμφάνιση ψυχοπαθολογίας.

Πολλοί μηχανισμοί έχουν προταθεί μέσω των οποίων η κακομεταχείριση του παιδιού διαταράσσει την ομαλή ανάπτυξη του εγκεφάλου. Σύμφωνα με μελέτες, παιδιά που είχαν υποστεί κακομεταχείριση εμφάνιζαν μεταβολές στην λειτουργία του υποθαλαμο-υποφυσιακού άξονα και αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης (Gilmer et al., 2003). Στον εγκέφαλο, η αμυγδαλή αφενός διεγείρει τον υποθάλαμο, με αποτέλεσμα την έκκριση CRH, αφετέρου διεγείρει το μέσο προμετωπιαίο φλοιό. Ο προμετωπιαίος φλοιός με τη σειρά του ελέγχει εκτελεστικές γνωσιακές λειτουργίες όπως ο προγραμματισμός της συμπεριφοράς, η λήψη αποφάσεων, η μνήμη εργασίας και η προσοχή. Η διέγερση του προμετωπιαίου φλοιού παρέχει έναν πιθανό μηχανισμό μέσω του οποίου η προσοχή και άλλες γνωσιακές διεργασίες εντείνονται στα πλαίσια της απόκκρισης στο στρεσογόνο ερέθισμα. Ωστόσο, το χρόνιο stress και η διαρκής ενεργοποίηση του φλοιού μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά τις γνωσιακές λειτουργίες, προκαλώντας διάσπαση προσοχής, υπερδιέγερση, δυσκολίες στη μάθηση νέας πληροφορίας, διαταραχή της αντίληψης (ψυχωτική συμπτωματολογία) κ.λ.π. Σε φυσιολογικές συνθήκες, ο μέσος προμετωπιαίος φλοιός αναστέλλει τη δράση της αμυγδαλής. Ωστόσο, το σοβαρό stress αναστέλλει την κατασταλτική δράση του φλοιού στην αμυγδαλή. Αυτή η καταστολή παρατηρείται στον εγκέφαλο ενηλίκων που είχαν υποστεί κακομεταχείριση (παραμέληση ή κακοποίηση) ως παιδιά. Έχει υποθεθεί επίσης ότι η παραμέληση παρεμποδίζει τη φυσιολογική ανάπτυξη του προμετωπιαίου φλοιού, γι' αυτό και

οδηγεί σε διάσπαση προσοχής, δυσκολία στη συγκέντρωση, κακές ακαδημαϊκές επιδόσεις. Τέλος, στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο, όπως έχει ήδη αναφερθεί, το stress μπορεί να οδηγήσει σε αναστολή της νευρογένεσης, μείωση των επιπέδων των νευροτροφικών παραγόντων, όπως ο νευροτροφικός παράγοντας που προέρχεται από τον εγκέφαλο, απώλεια νευρώνων, καθυστερήσεις στη μυελίνωση (De Bellis, 2005)

4.4 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΝΤΟΠΑΜΙΝΗΣ ΣΤΙΣ ΠΡΩΙΜΕΣ ΕΜΠΕΙΡΙΕΣ

Όπως είναι αναμενόμενο, οι επιπτώσεις των πρώιμων εμπειριών διαφέρουν από νευρωνικό κύκλωμα σε κύκλωμα. Σε μελέτες σε τρωκτικά φαίνεται ότι το περιγεννητικό στρες μειώνει τα βασικά επίπεδα ντοπαμίνης στον προμετωπιαίο, ενώ αντίθετα τα αυξάνει στον επικλινή πυρήνα και το ραβδωτό (Boksa et al, 2003). Ταυτόχρονα, η περιγεννητική ανοξία, που αυξάνει την απελευθέρωση ντοπαμίνης λόγω στρες στον επικλινή πυρήνα, δεν αυξάνει και την ντοπαμίνη του προμετωπιαίου στον ίδιο βαθμό, το οποίο υποδηλώνει πως τα ντοπαμινεργικά μονοπάτια (μεσοφλοιώδες, μεσομεταιχμιακό και μελαινοραβδωτό) έχουν διαφορετική ευαισθησία στις βλαπτικές επιπτώσεις του πρώιμου στρες (Brake et al., 1997; 2000). Ένα διαφορετικό χρονοδιάγραμμα στην ανάπτυξη και την ωρίμανση της κάθε περιοχής, ή ακόμα και διαφορετικά εγγενή χαρακτηριστικά, θα μπορούσαν να ερμηνεύσουν αυτές τις διαφορετικές επιπτώσεις στο στρες.

Τέσσερις είναι οι πιθανοί στόχοι του στρες στο ντοπαμινεργικό: ο αριθμός των κυττάρων, ο μεταβολισμός του νευρώνα [και η παραγωγή ντοπαμίνης και η ανακύκλωσή της (turnover)], η μορφολογία του νευρώνα και η έκφραση των ντοπαμινεργικών υποδοχέων. Αυτές οι επιπτώσεις μπορεί να είναι είτε παροδικές είτε μόνιμες και έτσι πιστεύεται πως διαμορφώνονται και εκφράζονται οι συμπεριφορές που ρυθμίζονται από τη ντοπαμίνη.

Παρά τη θεωρητική σύνδεση των πρώιμων εμπειριών με τη ντοπαμινεργική νευροδιαβίβαση και την ανάπτυξη ψυχοπαθολογίας, η σχετικές κλινικές μελέτες παραμένουν λίγες. Παρ' όλα αυτά, έχει βρεθεί πως η χαμηλή γονεϊκή φροντίδα σχετίζεται με υψηλότερα επίπεδα κορτιζόλης και κατά συνέπεια, αυξημένη ντοπαμίνη στο κοιλιακό ραβδωτό, ως απάντηση σε κοινωνικό στρες (Pruessner et al., 2004). Επιπλέον, έχει δειχθεί πως η αλληλεπίδραση ενός πολυμορφισμού του ντοπαμινεργικού ενζύμου COMT με ένα τραύμα κατά την πρώιμη ηλικία, συμβάλει στην αύξηση του κινδύνου για ανάπτυξη διαταραχών προσωπικότητας (Savitz et al., 2010). Ο πολυμορφισμός της COMT φαίνεται να έχει σημασία

και για την εμφάνιση συμπτωμάτων κατάθλιψης σε παιδιά που είχαν εκτεθεί σε κοινωνική αποστέρηση (Drury et al., 2010) και για τη ρύθμιση της συναισθηματικότητας σε παιδιά που είχαν κακοποιηθεί σεξουαλικά (Perroud et al., 2010). Ακόμα, ένας πολυμορφισμός που οδηγεί σε υψηλότερη έκφραση της MAO (βλ. παρακάτω), έχει φανεί να συνδέεται με μειωμένη πιθανότητα εμφάνισης αντικοινωνικών συμπεριφορών σε κακοποιημένα παιδιά (Caspi et al., 2002; Kim-Cohen et al., 2006). Συνολικά, αυτά τα ευρήματα δείχνουν πως διακυμάνσεις στο μεταβολισμό της ντοπαμίνης μπορούν να επιδρούν στον αντίκτυπο των πρώιμων εμπειριών στη συμπεριφορά, προτείνοντας μία ισχυρή συσχέτιση μεταξύ ντοπαμίνης, στρες και ψυχικής ασθένειας (Rodrigues et al., 2011).

Έχει επίσης βρεθεί σε επίμυες πως η χορήγηση γλυκοκορτικοειδών κατά το τέλος της κύησης (E18-E19) φαίνεται να αυξάνει την αναλογία των αποπτωτικών κυττάρων σε σχέση με τα βλαστικά στην κοιλιακή περιοχή της καλύπτρας, με αποτέλεσμα μια σημαντική μείωση των ντοπαμινεργικών προβολών στον επικλινή πυρήνα (Leao et al., 2007). Με την ίδια αγωγή (γλυκοκορτικοειδή) μεταβάλλονται και συμπεριφορές όπως το άγχος (Fride et al., 1988), η προπαλμική αναστολή (prepulse inhibition) και η επιλεκτική λήψη φαρμάκου (drug preference) (Leão, Rodrigues et al., unpublished observations), οι οποίες μπορεί να ερμηνεύονται από την αυξημένη ανακύκλωση της ντοπαμίνης προγεννητικά στον προμετωπιαίο φλοιό (Fride et al., 1988) και τον επικλινή πυρήνα (Alonso et al., 1994). Ακόμα, ο μητρικός αποχωρισμός, οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα απελευθέρωσης ντοπαμίνης στον επικλινή πυρήνα μετά από χορήγηση αμφεταμίνης (Hall et al, 1999; Moffett et al., 2006).

Οι πρώιμες εμπειρίες μπορούν ακόμα να επιδράσουν στην έκφραση, τη λειτουργία και την ευαισθησία τόσο του μεταφορέα ντοπαμίνης όσο και των ντοπαμινεργικών υποδοχέων. Συνεκτιμώντας τα ευρήματα μελετών σε πειραματόζωα και σε ανθρώπους βλέπουμε πως σε επίμυες ο μητρικός αποχωρισμός μειώνει τα επίπεδα του μεταφορέα ντοπαμίνης στον επικλινή πυρήνα, το οποίο είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον σε συνδυασμό με το εύρημα σε ανθρώπους πως η αναστολή του μεταφορέα, ενισχύει τα ευχάριστα συναισθήματα έπειτα από χορήγηση κοκαΐνης (Brake et al, 2004) Ακόμα, το προγεννητικό στρες φαίνεται να μεταβάλλει τον σχετικό αριθμό των σταθερών δενδριτικών ακάνθων με σχήμα μανιταριού σε σχέση με άλλους τύπους στον προμετωπιαίο φλοιό (Michelsen et al., 2007).

Σε ζώα που έχουν εκτεθεί σε νεογνικό χειρισμό, δηλαδή ένα ήπιο στρες, βρέθηκε πως ο μεταβολισμός της ντοπαμίνης είναι υψηλότερος στο μεσοφλοιώδες μονοπάτι του δεξιού

ημισφαιρίου σε σχέση με τα ζώα που δεν έχουν εκτεθεί σε καμία εμπειρία. Το μεσοφλοιώδες μονοπάτι φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην αυξημένη προσαρμοστική συμπεριφορά και τον πιο αποτελεσματικό έλεγχο του άξονα ΥΥΕ που εμφανίζουν τα ζώα που έχουν υποστεί νεογενικό χειρισμό (Sullivan et al., 2006).

Όπως προκύπτει από την παραπάνω σύντομη επισκόπηση, οι πρώιμες εμπειρίες μπορούν να οδηγήσουν είτε σε υπερ- είτε σε υπο-λειτουργία του ντοπαμινεργικού συστήματος. Έτσι, η υπερλειτουργία του ντοπαμινεργικού στο μεσομεταιχμιακό μονοπάτι μπορεί να οδηγήσει σε σχιζοφρένεια και αυξημένο φόβο, ενώ μειωμένη λειτουργία και στο μεσομεταιχμιακό και στο μεσοφλοιώδες, μπορεί να οδηγήσει σε διαταραχές στη μνήμη (ιππόκαμπος και προμετωπιαίος) και τη διάθεση (μετωπιαίος φλοιός, κοιλιακό ραβδωτό σώμα). Ακόμα, υπολειτουργία του ντοπαμινεργικού στον ιππόκαμπο, μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη έκκριση γλυκοκορτικοειδών, η οποία με τη σειρά της θα προκαλέσει νευρωνική δυσλειτουργία και συμπεριφορικά ελλείμματα. Από την άλλη πλευρά, τα μακροχρόνια αυξημένα επίπεδα στρες μπορούν να οδηγήσουν σε επιγενετικές αλλαγές και σε ρύθμιση προς τα κάτω (downregulation) τόσο του άξονα ΥΥΕ όσο και συγκεκριμένων ντοπαμινεργικών κυκλωμάτων. Συνέπεια αυτού έχει φανεί να είναι η υπολειτουργία του ντοπαμινεργικού συστήματος στο μεσομεταιχμιακό και το μεσοφλοιώδες σύστημα, κάτι που αυξάνει τις συμπεριφορές αναζήτησης νέων εμπειριών (novelty-seeking) και εθιστικές συμπεριφορές (Rodrigues et al., 2011).

Σκοπός



Κεφάλαιο 5. Σκοπός

5. ΣΚΟΠΟΣ

Ο γενικός σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση του μορφογενετικού ρόλου της ντοπαμίνης στα κύτταρα του προμετωπιαίου φλοιού. Η ντοπαμίνη είναι ένας πανταχού παρόν νευροδιαβιβαστής ο οποίος εμπλέκεται σε πολυάριθμες γνωστικές λειτουργίες όπως στη ρύθμιση της διάθεσης, στα κίνητρα αλλά και στην κινητική λειτουργία σε έναν ώριμο εγκέφαλο. Είναι γνωστό ότι η ντοπαμίνη και οι υποδοχείς της είναι παρόντες στον εμβρυϊκό εγκέφαλο ήδη από τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης. Επομένως, εκτός του ρόλου της στις συνάψεις, η ντοπαμίνη φαίνεται πως εμπλέκεται και στην ανάπτυξη του εγκεφάλου (Lauder, 1988, 1993; Levitt et al., 1997; Nguyen et al., 2001). Η κατανόηση των επιδράσεων της ντοπαμίνης στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση αωρων κυττάρων είναι ικανή να ερμηνεύσει πιθανές διαταραχές, που έχουν προκληθεί από την ανισορροπία του συγκεκριμένου νευροδιαβιβαστή, στην κυτταροαρχιτεκτονική των ώριμων εγκεφάλων.

Ο προμετωπιαίος φλοιός είναι μια περιοχή η οποία συνεχίζει να αναπτύσσεται και μετά τη γέννηση, οπότε και είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στις επιδράσεις των πρώιμων εμπειριών. Η παρατεταμένη σε διάρκεια ανάπτυξή του, του επιτρέπει την απόκτηση σύνθετων γνωστικών ικανοτήτων μέσω διαφόρων εμπειριών αλλά ταυτόχρονα τον καθιστά ευάλωτο σε παράγοντες που σχετίζονται με μη φυσιολογική λειτουργία που συχνά εκδηλώνεται μέσω ποικίλων νευροψυχιατρικών διαταραχών. Ο παράγοντας των πρώιμων εμπειριών θεωρείται σήμερα ως ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες για τον καθορισμό της μελλοντικής προσαρμοστικής ικανότητας του ανθρώπου στις απαιτήσεις του περιβάλλοντός του, καθώς και για την προδιάθεσή του για ψυχικές και σωματικές ασθένειες.

Για να πραγματοποιηθεί η εν λόγω μελέτη, χρησιμοποιήθηκε ένα μοντέλο πρώιμων μεταγεννητικών εμπειριών το οποίο βασίζεται στην παροχή ή την παρεμπόδιση της ανταμοιβής μέσω της μητρικής επαφής. Η δοκιμασία αυτή, φαίνεται να επιδρά ως ένα γεγονός ήπιας συναισθηματικής αντιξοότητας και να επηρεάζει διάφορα νευροδιαβιβαστικά συστήματα του εγκεφάλου, όπως το ντοπαμινεργικό και το σεροτονινεργικό σύστημα (Raftogianni, Diamantopoulou et al. 2012, Raftogianni, Stamatakis et al. 2014, Stamatakis, Diamantopoulou et al. 2014). Σε προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριο μας τα πειραματόζωα που εκπαιδεύτηκαν με συνεχόμενη ματαίωση (DER), είχαν μικρότερη νευρωνική και συναπτική πυκνότητα, ενώ αντίθετα είχαν αυξημένη πυκνότητα γλοιακών κυττάρων, στην περιοχή του έσω

κογχομετωπιαίου/υπομεταιχμιακού φλοιού (MO/IL) καθώς επίσης και μειωμένα επίπεδα ντοπαμίνης στην ίδια περιοχή.

Στο πλαίσιο αυτό, ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν αρχικά να εντοπιστεί η μεταγεννητική ημέρα εμφάνισης κυτταρικών μεταβολών, στον MO/IL στα DER πειραματόζωα, καθώς και η κυτταρική τους ταυτότητα. Στη συνέχεια, ειδικότερος στόχος αποτελούσε η συσχέτιση των κυτταρικών ελειμμάτων στον προμετωπιαίο των DER ζώων με την έλλειψη της ντοπαμίνης στην περιοχή αυτή, μέσω αναπλήρωσης της με έγχυση ντοπαμίνης στην εν λόγω περιοχή, στα νεογνά DER ζώα. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε έλεγχος της κυτταρικής πυκνότητας νευρικών και γλοιακών κυττάρων τόσο σε εγκεφάλους πειραματόζωων 10^{ης} - 13^{ης} μεταγεννητικής ημέρας όσο και σε εγκεφάλους ενήλικων πειραματόζωων.

Πειραματικό Μέρος



Κεφάλαιο 6. Υλικά και Μέθοδοι

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6. 1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα πειράματα της παρούσας μελέτης ήταν αρσενικοί και θηλυκοί επίμυς του στελέχους **Wistar** από εσωτερική αναπαραγωγή του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ. Οι επίμυες του στελέχους Wistar αποτελούν ένα ετερόμικτο στέλεχος αλφικών επίμυων, που ανήκουν στο είδος *Rattus norvegicus*. Αποτελεί το πρώτο στέλεχος που αναπτύχθηκε για να υπηρετήσει το σκοπό αυτό, ενώ όλα τα εργαστήρια εκείνη την εποχή χρησιμοποιούσαν μυς του είδους *Mus musculus* ως πειραματόζωα. Το εν λόγω γένος, αναπτύχθηκε στο Ίδρυμα Wistar το 1906, από τον Henry Donaldson με σκοπό να χρησιμοποιηθεί για έρευνα βιολογικού και ιατρικού περιεχομένου. Τα χαρακτηριστικά των επίμυων που ανήκουν σε αυτό το γένος περιέχουν φαρδύ κεφάλι, μακριά αυτιά και ουρά, το μήκος της οποίας δεν υπερβαίνει το μήκος του σώματος. Την εποχή που δημιουργήθηκε το γένος αυτό, στα εργαστήρια ήταν διαδεδομένη η χρήση οικόσιτων μυών του είδους *Mus musculus*, όμως, μετά την καθιέρωση της χρήσης Wistar επίμυων προέκυψαν και νέα στελέχη εργαστηριακών επίμυων όπως τα Sprague Dawley και Long Evans τα οποία αναπτύχθηκαν από το στέλεχος Wistar.



Εικόνα 6.1: ο επίμυς στελέχους Wistar

Το στέλεχος αυτό χαρακτηρίζεται από φαρδύ κεφάλι, μακριά αυτιά και από ουρά, το μήκος της οποίας δεν υπερβαίνει το μήκος του σώματος. Για την απόκτηση των νεογνών, θηλυκοί και αρσενικοί επίμυες, σε αναλογία 1:1, τοποθετήθηκαν σε κοινά κλουβιά για περίπου 7 ημέρες. Κατόπιν, οι αρσενικοί επίμυες απομακρύνθηκαν, ενώ η εκάστοτε υποψήφια μητέρα τοποθετήθηκε σε ξεχωριστό κλουβί, όπου και παρέμεινε μόνη της για το υπόλοιπο της κύησης (κύηση 22 ημερών). Η ημέρα του τοκετού θεωρήθηκε ως ημέρα 0 μετά την γέννηση (PND 0 - PostNatal Day 0). Από την PND0 μέχρι την PND10 η οποιαδήποτε επαφή με τα ζώα περιορίστηκε στο ελάχιστο για την αποφυγή επίδρασης στρεσογόνων συνθηκών, που θα επηρέαζαν την πειραματική διαδικασία. Η πειραματική διαδικασία νεογνικής έκθεσης σε λήψη ή αποστέρηση αναμενόμενης ανταμοιβής

πραγματοποιήθηκε με πειραματόζωα ηλικίας 10 έως 13 ημερών. Τα ενήλικα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν παρέμεναν με την μητέρα τους μέχρι τον απογαλακτισμό, ο οποίος λάμβανε χώρα κατά την 22^η μεταγεννητική ημέρα και περιλάμβανε την απομάκρυνση της μητέρας καθώς και το μαρκάρισμα των ζώων για την ταυτοποίηση (τρύπημα αυτιών). Στη συνέχεια, τα ζώα τοποθετήθηκαν σε κλουβιά ανάλογα με το φύλο και την εκπαίδευση τους (3-4 ζώα ανά κλουβί) και κρατήθηκαν εκεί μέχρι να ενηλικιωθούν, δηλαδή μετά το πέρας των τριών μηνών ζωής. Τα ζώα ζούσαν υπό σταθερές και ελεγχόμενες συνθήκες με θερμοκρασία 23 ± 1 °C, και σταθερό κύκλο φωτισμού 12:12h (8:00-20:00 φως και 20:00 με 8:00 σκοτάδι). Αναφορικά με την τροφή (Kounker-Keramari Bros. &Co., Αθήνα, Ελλάδα) και το νερό είχαν πρόσβαση *ad libitum*. Αμέσως μετά την γέννηση, την 1^η μεταγεννητική ημέρα, (PND0) όλα τα ζώα μιας γέννας κατανεμήθηκαν τυχαία σε μια από τις δυο πειραματικές ομάδες (νεογνά με μητρική αποστέρηση – DER ή με μητρική επιβράβευση – RER, βλ. § Β. Πειραματική Διαδικασία Εκπαίδευσης) ή στην ομάδα των ζώων ελέγχου (Control, CTR). Καθ' όλη τη διάρκεια της γαλούχησης φρέσκα ροκανίδια προστίθονταν στα κλουβιά ανά 4 με 5 ημέρες, χωρίς να παρενοχλούνται τα ζώα.

Για την πραγματοποίηση της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές κοόρτες ζώων. Αρσενικά και θηλυκά ζώα της πρώτης κοόρτης και από τις τρεις πειραματικές ομάδες χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του αναπτυξιακού προφίλ εμφάνισης κυτταρικών μεταβολών στον προμετωπιαίο φλοιό και συγκεκριμένα για τα πειράματα ανοσοϊστοχημείας, ανοσοφθορισμού και των δοκιμασιών TUNEL και FluoroJade B τις μεταγεννητικές ημέρες 11, 12 και 13. Για κάθε αναπτυξιακό στάδιο τα ίδια ζώα χρησιμοποιήθηκαν για όλα τα πειράματα ανοσοεπισήμανσης (6 ζώα ανά πειραματική ομάδα σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο). Αρσενικά DER και CTR ζώα της δεύτερης και τρίτης κοόρτης χρησιμοποιήθηκαν για τη διερεύνηση των επιπτώσεων της έγχυσης ντοπαμίνης στις κυτταρικές μεταβολές στον προμετωπιαίο φλοιό. Τα ζώα των κοορτών αυτών διαχωρίστηκαν σε τέσσερις κατηγορίες: 1) πειραματόζωα ελέγχου που δεν εκτέθηκαν σε κανενός είδους εκπαίδευση (Control, CTRL), 2) πειραματόζωα που εκτέθηκαν ως νεογνά σε εκπαίδευση με συνεχόμενη ματαίωση (Denied the Expected Reward, DER), 3) πειραματόζωα που ως νεογνά όχι μόνο εκτέθηκαν σε εκπαίδευση με συνεχόμενη ματαίωση αλλά επίσης τους εγχύθηκε στην περιοχή ενδιαφέροντος φυσιολογικός ορός (Denied the Expected Reward +Saline, DER+SAL) άπαξ ημερησίως κατά τις μεταγεννητικές ημέρες 10 έως και 13, και τέλος, πειραματόζωα που ως νεογνά όχι μόνο εκτέθηκαν σε εκπαίδευση με συνεχόμενη ματαίωση αλλά επίσης τους εγχύθηκε

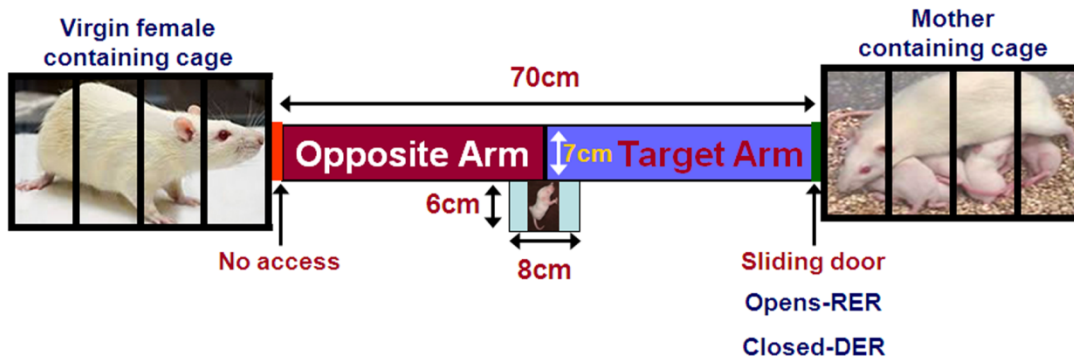
νοτοπαμίνη (Denied the Expected Reward +Dopamine, DER+DA) άπαξ ημερησίως κατά τις μεταγεννητικές ημέρες 10 έως και 13. Συγκεκριμένα, ενήλικα DER και CTR αρσενικά ζώα της δεύτερης κοόρτης (6 ζώα ανά πειραματική ομάδα) χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα ανοσοϊστοχημείας, ενώ DER και CTR ζώα της τρίτης κοόρτης χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα ανοσοϊστοχημείας κατά την μεταγεννητική ημέρα 13, την ημέρα που ολοκληρώνεται η εκπαίδευση στον λαβύρινθο Ταυ (6 ζώα ανά πειραματική ομάδα). Τα ζώα της δεύτερης κοόρτης, την PND22 (απογαλακτισμός), διαχωρίστηκαν και κατανεμήθηκαν σε κλουβιά ανά 3-4 άτομα του ίδιου φύλλου και της ίδιας πειραματικής ομάδας (DER, DER+DA, DER+SAL, CTR). Μετά τον απογαλακτισμό, τα κλουβιά καθαρίζονταν εβδομαδιαίως χωρίς να παρενοχλούνται τα ζώα. Σε αυτές τις συνθήκες ανατράφηκαν μέχρι την ενηλικίωση (3 μήνες).

Όλα τα πειράματα διεκπεραιώθηκαν σύμφωνα με τους κανόνες βιοηθικής που ορίζονται από την Ευρωπαϊκή Οδηγία (European Community Council Directive) στις 22 Σεπτεμβρίου 2010 (2010/63/EU) με όσο το δυνατόν λιγότερη ταλαιπωρία και ελάχιστο δυνατό αριθμό ζώων.

6.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ

Πολλά δεδομένα μελετών τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ζώα αναδεικνύουν το γεγονός ότι οι πρώιμες εμπειρίες έχουν μακροχρόνιες επιπτώσεις που επηρεάζουν τη λειτουργία του εγκεφάλου και τη συμπεριφορά των ενήλικων ατόμων. Μάλιστα, όταν οι πρώιμες εμπειρίες περιέχουν κάποια αντιξοότητα, μπορούν να οδηγήσουν ακόμη και στην ανάπτυξη κάποιας ψυχοπαθολογίας, συγκεκριμένα δυσλειτουργική απάντηση στο στρες αργότερα στη ζωή, αγχώδεις διαταραχές, κατάθλιψη κ.ά. Στα ζωικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται για την μελέτη των επιπτώσεων των πρώιμων εμπειριών στην ενήλικη ζωή ο κύριος παράγοντας που τροποποιείται είναι η φροντίδα που δέχεται το νεογνό από την μητέρα-τροφό του. Στο εργαστήριο Βιολογίας-Βιοχημείας της Σχολής Επιστημών Υγείας του ΕΚΠΑ, αναπτύχθηκε ένα νέο μοντέλο πρώιμων εμπειριών, στο οποίο νεογνά επίμυ εκπαιδεύονται σε έναν λαβύρινθο σχήματος T (Εικόνα 6.2) χρησιμοποιώντας την επαφή με την μητέρα ως ανταμοιβή και την άρνηση της επαφής με την μητέρα ως εμπειρία ήπιας αντιξοότητας. Το μοντέλο αυτό βασίστηκε σε παλαιότερες μελέτες των Kenny και Blass (Kenny and Blass, 1977) καθώς και των Chen και Amsel (Chen & Amsel, 1980) και περιέχει επιπλέον μία μαθησιακή συνιστώσα για τα νεογνά (Stamatakis et al., 2013).

T-Maze setup



Εικόνα 6.2: Σχηματική κάτοψη της πειραματικής διάταξης εκπαίδευσης νεογνών επίμων κατά τη 10-13 μεταγεννητική ημέρα, υπό συνθήκες λήψης ανταμοιβής μέσω της επαφής με την μητέρα, ή παρεμπόδισης λήψης ανταμοιβής.

Τα νεογνά, τα οποία δεν έχουν ανοίξει ακόμα τα μάτια τους, ξεκινούν να εκπαιδεύονται στον λαβύρινθο σχήματος T, την PND10 (10^η Μεταγεννητική Ημέρα), διαδικασία που ολοκληρώνεται την PND13 (13^η Μεταγεννητική Ημέρα). Τα νεογνά φαίνεται ότι διαθέτουν την ικανότητα να μαθαίνουν τον λαβύρινθο T κατά τις μεταγεννητικές ημέρες 10^η- 13^η και μάλιστα, η ικανότητά τους αυτή, οφείλεται σε πραγματική μάθηση και όχι στην ανάπτυξη των κινητικών δυνατοτήτων τους όπως δείχνουν πειράματα του εργαστηρίου (Panagiotaropoulos et al., 2009). Ο λαβύρινθος έχει προσαρμοστεί στο μέγεθος των νεογνών: Το κουτί έναρξης (start box) του λαβυρίνθου έχει διαστάσεις 8 x 6 εκατοστά και οδηγεί άμεσα, χωρίς την παρεμβολή κάποιου διαχωριστικού, σε δύο βραχίονες (arms) οι οποίοι οδηγούν σε δύο ξεχωριστά κλουβιά. Συγκεκριμένα, ο δεξιός βραχίονας (target arm) του λαβυρίνθου οδηγεί σε ένα κλουβί με διαστάσεις 30 x 22 εκατοστά, στρωμένο με ροκανίδι, μέσα στο οποίο βρισκόταν η μητέρα των νεογνών. Ο αριστερός βραχίονας (opposite arm) του λαβυρίνθου οδηγεί σε ένα δεύτερο κλουβί, ίδιων διαστάσεων με το πρώτο, στρωμένο επίσης με ροκανίδι, μέσα στο οποίο βρισκόταν ένα άλλο παρθένο, θηλυκό ζώο. Το πλάτος των δύο βραχιόνων είναι 7 εκατοστά ενώ το μήκος τους ήταν συνολικά 70 εκατοστά, το οποίο αντιστοιχούσε σε 30 εκατοστά για κάθε βραχίονα και 10 εκατοστά για την περιοχή που αποτελούσε την άμεση προέκταση του κουτιού έναρξης. Στο τέλος του δεξιού βραχίονα μια μικρή ανασυρόμενη θυρίδα (sliding door) με διαστάσεις 9 x 11 εκατοστά οδηγούσε στο εσωτερικό του κλουβιού της μητέρας. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα κλουβιά δεν καθαρίζονται από την PND 10 έως την PND 13 ώστε να διατηρήσουν στο μέγιστο

την μυρωδιά της φωλιάς και ότι τα δύο θηλυκά ενήλικα ζώα είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό κατά τη διάρκεια της εκπαίδευσης.

Τα νεογνά εκπαιδεύονται με δύο διαφορετικούς τρόπους, διαμορφώνοντας έτσι δύο διαφορετικές πειραματικές ομάδες, τα νεογνά που δέχονται την ανταμοιβή μέσω της επαφής με τη μητέρα (RER, receiving the expected reward) και τα νεογνά που δεν λαμβάνουν την αναμενόμενη ανταμοιβή (DER, denied the expected reward). Συγκεκριμένα, τα νεογνά της RER πειραματικής ομάδας εκπαιδεύονται ως εξής: κατά την άφιξη του νεογνού έξω από το κλουβί της μητέρας, μέσω μίας συρόμενης πόρτας, του επιτρέπεται η είσοδος στο κλουβί, με αποτέλεσμα να λαμβάνει αμέσως την αναμενόμενη ανταμοιβή της μητρικής φροντίδας. Αντίθετα, στα νεογνά της DER πειραματικής ομάδας κατά την άφιξη τους έξω από το κλουβί της μητέρας δεν τους επιτρέπεται η είσοδος, με αποτέλεσμα να μη λαμβάνει την αναμενόμενη ανταμοιβή της μητρικής φροντίδας. Αναλυτικότερα η διαδικασία εκπαίδευσης παρατίθεται παρακάτω.

6.2.1 Έκθεση υπό συνεχή λήψη ή συνεχόμενη παρεμπόδιση λήψης αναμενόμενης ανταμοιβής μέσω της επαφής με τη μητέρα

Πριν από την έναρξη της εκπαίδευσης όλα τα πειραματόζωα κάθε γέννας, κατατάσσονται τυχαία σε μία από τις τρεις κατηγορίες. Τα πειραματόζωα και από τις δύο πειραματικές κατηγορίες υποβάλλονται καθημερινά σε 10 δοκιμασίες εκπαίδευσης λαβυρίνθου (σύνολο 40 δοκιμασίες για τις 4 ημέρες που διαρκεί η εκπαίδευση). Αρχικά, η μητέρα των πειραματόζωων απομακρύνεται από το κλουβί μέσα στο οποίο διαβιώνει με τα νεογνά και τοποθετείται στο δεξί κλουβί της πειραματικής διάταξης του λαβυρίνθου σε σχήμα T (Εικόνα 6.2). Στη συνέχεια, όλα τα ζώα της γέννας τοποθετούνται επίσης στο δεξί κλουβί της πειραματικής διάταξης. Έπειτα, με τη σειρά, κάθε νεογνό τοποθετείται στο κουτί έναρξης του λαβυρίνθου και παραμένει σε αυτόν για μέγιστο διάστημα 60 δευτερολέπτων. Όσον αφορά τα πειραματόζωα της RER ομάδας, όταν βρουν το κλουβί της μητέρας, η θυρίδα του κλουβιού ανοίγει και το πειραματόζωο μπαίνει μέσα στο κλουβί. Στη συνέχεια, ο πειραματιστής παίρνει το επόμενο πειραματόζωο από το κλουβί της διάταξης και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Αντίθετα, τα πειραματόζωα της DER ομάδας ακόμα και αν καταφέρουν να βρουν το κλουβί της μητέρας, η θυρίδα που οδηγεί στο κλουβί παραμένει κλειστή και το νεογνό παραμένει σε αυτό το σημείο για 20 δευτερόλεπτα. Αμέσως μετά, ο πειραματιστής επιστρέφει το πειραματόζωο στο

κουτί έναρξης του λαβυρίνθου για να υποβληθεί στην επόμενη δοκιμασία, μέχρι την ολοκλήρωση των 10 δοκιμασιών ανά ημέρα εκπαίδευσης. Τη χρονική στιγμή εύρεσης του κλουβιού της μητέρας η καταγραφή των συμπεριφορικών δεδομένων σταματά. Σε κάθε άλλη περίπτωση μη-εύρεσης του κλουβιού, η καταγραφή των συμπεριφορικών δεδομένων σταματά αμέσως μετά την ολοκλήρωση των 60 δευτερολέπτων και ο πειραματιστής οδηγεί με απαλές κινήσεις το πειραματόζωο στην είσοδο του κλουβιού της μητέρας. Εκεί ανάλογα με την ομάδα, η θυρίδα ανοίγει και το ζώο μπαίνει μέσα στο κλουβί (RER) ή το ζώο παραμένει μπροστά στην κλειστή θυρίδα για 20 δευτερόλεπτα (DER). Μετά το τέλος κάθε δοκιμασίας ο λαβύρινθος καθαρίζεται με διάλυμα αιθανόλης 70% και στη συνέχεια στεγνώνεται, προκειμένου να απομακρυνθούν οσμές που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν από τα πειραματόζωα για να προσανατολιστούν στο χώρο. Όταν όλα τα νεογνά μίας γέννας έχουν εκτεθεί στην πρώτη δοκιμασία εκπαίδευσης, με τον ίδιο τρόπο εκτίθενται και στη δεύτερη κ.ο.κ. Στο τέλος των δέκα δοκιμασιών, η μητέρα των πειραματόζωων και αμέσως μετά τα πειραματόζωα, επέστρεφαν στο κλουβί διαβίωσής τους και στο δωμάτιο των πειραματόζωων. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα νεογνά και των δύο κατηγοριών επιστρέφουν στο κλουβί με τη μητέρα απευθείας μετά το τέλος της εκπαίδευσής τους στον λαβύρινθο T, η οποία διαρκεί περίπου 10 λεπτά για το κάθε νεογνό. Έτσι, κατά την επιστροφή τους στην φωλιά τόσο τα DER όσο και τα RER νεογνά δέχονται τη μητρική φροντίδα, με τη διαφορά ότι τα DER νεογνά τη δέχονται με δέκα λεπτά καθυστέρηση.

6.2.2 Έλεγχος της Νεογνικής Μνήμης Απουσία του Ερεθίσματος της Μητέρας

Την τελευταία μέρα της εκπαίδευσης (PND 13), δύο ώρες μετά την ολοκλήρωση της τελευταίας δοκιμασίας στον λαβύρινθο με σχήμα T, κάθε πειραματόζωο τοποθετείται στο κουτί έναρξης του λαβύρινθου και υποβάλλεται σε μία μοναδική δοκιμασία ελέγχου μνήμης διάρκειας 60 δευτερολέπτων. Στη συγκεκριμένη δοκιμασία ελέγχου μνήμης, τα κλουβιά της διάταξης απομακρύνονται (απουσία της μητέρας) και οι έξοδοι των βραχιόνων του λαβύρινθου φράζονται. Κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας ελέγχου μνήμης καταγράφονται τα συμπεριφορικά δεδομένα των νεογνών. Μετά την ολοκλήρωση της δοκιμασίας το πειραματόζωο επιστρέφει στο κλουβί της μητέρας, μέσα στο δωμάτιο διαβίωσης των πειραματόζωων.

Όπως φαίνεται από τα συμπεριφορικά δεδομένα καθ' όλη τη διάρκεια της εκπαίδευσης, τα νεογνά και των δύο ομάδων μαθαίνουν το T-λαβύρινθο, αφού λόγω της μάθησης αυξάνουν σταδιακά τον αριθμό των επιτυχημένων δοκιμασιών (επιλέγουν δηλαδή τον δεξί βραχίονα του

λαβυρίνθου που περιέχει το κλουβί με τη μητέρα) και μειώνουν το χρόνο που τους χρειάζεται για να βρουν το κλουβί που περιέχει τη μητέρα. Επιπλέον, τα νεογνά και των δύο ομάδων αναπτύσσουν μια σαφή προτίμηση για το δεξί βραχίονα του λαβυρίνθου, αυτού δηλαδή που οδηγεί στο κλουβί με τη μητέρα. Ωστόσο, τα RER ζώα μαθαίνουν πιο γρήγορα σε σχέση με τα DER ζώα (Panagiotaropoulos et al., 2009). Τη διαφορά αυτή θα μπορούσε να ερμηνεύσει το γεγονός ότι τα RER νεογνά έχουν μεγαλύτερο κίνητρο να βρουν το κλουβί της μητέρας καθώς λαμβάνουν την επιβράβευση άμεσα και επαναλαμβανόμενα κάθε φορά που το πετυχαίνουν. Από την άλλη μεριά η DER εκπαίδευση φαίνεται να είναι μία μορφή «λανθάνουσας» μάθησης. Αυτό το συμπέρασμα, προκύπτει από πειράματα σε νεογνά τα οποία εκπαιδεύτηκαν σε DER συνθήκες τις τρεις πρώτες μέρες (PND 10-12) και την τέταρτη (PND13) εκπαιδεύτηκαν ως RER. Τα νεογνά αυτά έδειξαν καλύτερες επιδόσεις από τα DER ζώα και ουσιαστικά ίδιες με τα RER, ενώ η επίδοσή τους ήταν πολύ καλύτερη από των νεογνών που εκτέθηκαν στην RER εμπειρία μόνο την 1η και την 4η μέρα (PND10 και PND13) (Panagiotaropoulos et al., 2009). Αυτά τα ευρήματα δείχνουν πως η DER εμπειρία κατά τις πρώτες 3 μέρες της εκπαίδευσης (PND10-12) δημιουργεί κάποιες προϋποθέσεις ώστε τα νεογνά να μαθαίνουν ευκολότερα την τέταρτη (PND13) ημέρα. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τη θεωρία των Tolman και Honzik οι οποίοι πρότειναν ότι μπορεί να υπάρξει μάθηση, η οποία όμως θα εκφράζεται μόνο έπειτα από τα κατάλληλα ερεθίσματα (Tolman and Honzik, 1930, Reynolds, 1945). Τέλος, το νεογνικό μοντέλο εκπαίδευσης στο λαβύρινθο T διαθέτει κοινά χαρακτηριστικά με το μοντέλο πρώιμων εμπειριών που έχει αναπτύξει η Sullivan και οι συνεργάτες της στο ότι η μάθηση των νεογνών έχει ως κινητήρια δύναμη την παρουσία της μητέρας (Sullivan et al., 2000, Moriceau et al., 2006).

6.2.3 Επιπτώσεις της Εκπαίδευσης με Συνεχόμενη Ματαίωση ή Ενίσχυση (νεογνά)

Κατά την επιστροφή τους στην φωλιά τόσο τα DER όσο και τα RER νεογνά δέχονται τη μητρική φροντίδα, με τη διαφορά ότι τα DER νεογνά τη δέχονται με δέκα λεπτά καθυστέρηση (Stamatakis et al., 2013). Αξίζει να σημειωθεί ότι και οι δύο πειραματικές ομάδες λαμβάνουν αυξημένη μητρική φροντίδα κατά την επιστροφή τους στη φωλιά, όπως έχει παρατηρηθεί και στο μοντέλο του νεογνικού χειρισμού, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Control, CTR) η οποία δεν εκτίθεται στην εκπαίδευση (Diamantopoulou et al., 2013a). Επιπλέον, τα DER ζώα κατά τη διάρκεια που περιμένουν μπροστά στην πόρτα του κλουβιού με τη μητέρα, εκτίθενται

στις μυρωδιές τις φωλιάς και της μητέρας, ερεθίσματα που έχει δειχθεί ότι αυξάνουν τις υπερηχητικές φωνήσεις των νεογνών, έναν δείκτη του στρες αποχωρισμού (Conely & Bell, 1978; D'Amato & Cabib, 1987; Lyons & Banks, 1982).

Με βάση τα δύο τελευταία σημεία, υπήρξε η υπόθεση ότι η DER εκπαίδευση είναι μία σχετικά ήπια αρνητική εμπειρία αλλά με επιπλέον στοιχεία απογοήτευσης (frustration). Ενώ η RER εκπαίδευση είναι μία θετικά φορτισμένη, ενισχυτική εμπειρία, μέσα από τη συνεχή επιβράβευση των δράσεων των νεογνών. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε από τα αποτελέσματα πειραμάτων τα οποία έδειξαν ότι η DER εμπειρία την πρώτη μέρα οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα κορτικοστερόνης στα DER νεογνά σε σχέση με τα νεογνά ελέγχου. Τις επόμενες μέρες της εκπαίδευσης όμως, τα επίπεδα κορτικοστερόνης εμφανίστηκαν μειωμένα γεγονός που καταδεικνύει πιθανόν εξοικείωση στην εμπειρία (Diamantopoulou et al., 2013). Ενώ, τα RER νεογνά έδειξαν μειωμένα επίπεδα κορτικοστερόνης σε σχέση με τα ζώα ελέγχου σε όλη την διάρκεια της εκπαίδευσης. Τα αποτελέσματα αυτά που αφορούσαν νεογνά που δέχθηκαν αυξημένη μητρική φροντίδα μετά την καθημερινή εκπαίδευση καταδεικνύουν την επίδραση της μητρικής φροντίδας στον άξονα του στρες των νεογνών.

Έτσι, το μοντέλο αυτό αναφέρεται σε πρώιμες εμπειρίες που δεν είναι τόσο ακραίες όπως η μητρική αποστέρηση, μοντέλο που θεωρείται ότι προσομοιάζει στον άνθρωπο έντονες συνθήκες παιδικής παραμέλησης, αλλά αναφέρεται είτε σε ήπιες στρεσογόνες καταστάσεις (DER), είτε σε υπερπροστατευτικές συμπεριφορές (RER), δηλαδή εμπειρίες με τις οποίες οι άνθρωποι έρχονται συχνά αντιμέτωποι (Stamatakis et al., 2013, 2014). Ως μοντέλο πρώιμων εμπειριών, το μοντέλο της εκπαίδευσης με συνεχόμενη ενίσχυση ή ματαίωση έχει βρεθεί ότι συντελεί τόσο σε βραχύχρονες όσο και σε μακροχρόνιες επιπτώσεις στη λειτουργία των ενήλικων οργανισμών, μάλιστα, ευρήματα του εργαστηρίου δείχνουν ότι το μοντέλο έχει διαφορετικές επιπτώσεις μεταξύ των δύο φύλων.

Είναι σημαντικό στο σημείο αυτό να αναφέρουμε ότι τόσο η RER όσο και η DER εμπειρία έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν, μέσω επιγενετικών μηχανισμών την έκφραση γονιδίων σημαντικών για τη λειτουργία του νευρικού συστήματος. Η DER εμπειρία έχει δειχθεί ότι επηρεάζει τη φωσφορυλίωση και την ακετυλίωση της ιστόνης 3 στην αμυγδαλή ενήλικων επίμυων (Diamantopoulou et al., 2013a), ενώ έχουν δειχθεί διαφορές και στη μεθυλίωση του DNA που προκαλείται τόσο από την RER όσο και από την DER εμπειρία εκπαίδευσης σε περιοχές του μεταιχμιακού συστήματος (Stamatakis et al., 2013).

Κατά τη χρονική περίοδο που τα νεογνά των επίμυων εκτίθενται στο λαβύρινθο σχήματος T, ο εγκέφαλος τους ακόμα αναπτύσσεται [βασικά γάγγλια (Antonopoulos et al., 2002; Chesselet et al., 2007), ιππόκαμπος (Morys et al., 1998; Dumas, 2005), προμετωπιαίος φλοιός (Kalsbeek et al., 1988, Koss et al., 2014) και αμυγδαλή (Thompson et al., 2008, Koss et al., 2014)]. Συνεπώς οι δύο εμπειρίες, RER και DER, προβλέπεται να προκαλούν ενεργοποίηση διάφορων περιοχών του εγκεφάλου και να επηρεάζουν τις αναπτυξιακές διεργασίες, με αποτέλεσμα μακροπρόθεσμες μεταβολές στη λειτουργικότητα των υπό ανάπτυξη περιοχών. Στον εγκέφαλο, η RER εμπειρία έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του ραχιαίου τμήματος των βασικών γαγγλίων, όπως φαίνεται από την ανοσοδραστικότητα του δείκτη νευρωνικής ενεργοποίησης c-Fos στην παραπάνω περιοχή, υποδεικνύοντας ότι τα ζώα της ομάδας αυτής επιστρατεύουν μάθηση και μνήμη συντελεστικού τύπου (Panagiotaropoulos et al., 2009).

Αντίθετα, η DER εμπειρία οδηγεί σε αυξημένη ενεργοποίηση του προμετωπιαίου φλοιού και του ιππόκαμπου, αντανακλώντας την αυξημένη εγρήγορση και αξιολόγηση των περιβαλλοντικών στοιχείων. Η ενεργοποίηση του προμετωπιαίου φλοιού και του ιππόκαμπου που παρατηρείται στα DER νεογνά έχει δείχτει σε άλλα μοντέλα πρώιμων εμπειριών ότι συμβαίνει όταν μία αναμενόμενη ανταμοιβή δεν είναι πλέον παρούσα ή η πρόσβαση σε αυτήν δεν είναι εφικτή (Ranck, 1973, O'Keefe, 1976, Thorpe et al., 1983, Siegrist et al., 2005, Feierstein et al., 2006). Η DER εμπειρία οδηγεί και στην ενεργοποίηση της αμυγδαλής κατά την πρώτη ημέρα της εκπαίδευσης (PND10), η οποία μπορεί να εξηγηθεί από την αύξηση των επιπέδων της κορτικοστερόνης που παρατηρείται την ίδια ημέρα (Diamantopoulou et al., 2013b), καθώς είναι γνωστό ότι αύξηση των κυκλοφορούντων κορτικοστεροειδών επάγει την ωρίμανση της αμυγδαλής (Moriceau et al., 2004, Moriceau et al., 2006). Ακόμα, έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι και άλλα μοντέλα «αρνητικών» πρώιμων εμπειριών, όπως ο μητρικός αποχωρισμός, οδηγούν στην πρόωρη ωρίμανση των νευρωνικών κυκλωμάτων που εμπλέκονται στην εκμάθηση του φόβου (Callaghan & Richardson, 2013). Η αυξημένη κορτικοστερόνη πλάσματος αποτελεί ένδειξη ότι η DER εμπειρία κατά την πρώτη ημέρα είναι στρεσογόνα και ο στρεσογόνος παράγοντας αφορά την αρχική παρεμπόδιση λήψης της μητρικής φροντίδας. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με την παρατήρηση ότι κατά την πρώιμη νεογνική ηλικία η παρουσία της μητέρας δρα κατασταλτικά στη στρεσοεξαρτώμενη αύξηση της κορτικοστερόνης στα νεογνά (Moriceau and Sullivan, 2006). Σε αντίθεση με τη DER εμπειρία,

τα RER νεογνά δεν παρουσιάζουν αύξηση στα επίπεδα της κορτικοστερόνης σε καμία ημέρα εκπαίδευσης.

6.3 ΘΥΣΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ & ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΙΣΤΟΥ

Τα ζώα της πρώτης κούρτης θυσιάζονταν κατά την 11^η, 12^η ή 13^η μεταγεννητική ημέρα· τα ζώα της τρίτης κούρτης θυσιάστηκαν την 13^η μεταγεννητική ημέρα, 2 ώρες μετά το τέλος της εκπαίδευσης όντας βαθιά αναισθητοποιημένα, με αποκεφαλισμό. Τα ζώα της δεύτερης κούρτης μετά την εκπαίδευση στον λαβύρινθο-T αφέθηκαν να μεγαλώσουν ως την ηλικία των 3 μηνών, οπότε και θυσιάστηκαν όντας βαθιά αναισθητοποιημένα.

Οι εγκέφαλοι των ζώων από όλες τις κούρτες απομονώθηκαν αμέσως μετά τη θυσία τους, τοποθετήθηκαν σε ισοπεντάνιο, σε θερμοκρασία -30°C , προκειμένου να καταψυχθούν χωρίς να αλλοιωθεί η δομή τους και φυλάχθηκαν σε βαθιά κατάψυξη (-80°C) μέχρι να κοπούν σε κρυτόμο (Εικόνα 6.3) στους -20°C . Οι τομές κόπηκαν με στεφανιαίο προσανατολισμό (coronal) σε πάχος 20 μm . Τέλος συλλέχθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες επεξεργασμένες με σιλάνιο (3-αμινοπροπυλ-τριαιθοξυ-σιλάνιο, Sigma) και φυλάχθηκαν σε βαθιά κατάψυξη έως ότου χρησιμοποιηθούν για τα πειράματα.



Εικόνα 6.3: Η κρυτόμος (-20°C), τομή πάχους 20 μm

Η σιλανοποίηση των αντικειμενοφόρων πλακών πραγματοποιήθηκε με επώαση των πλακών σε διάλυμα υδροχλωρίου 0,2M για 30s, έπειτα, εμβάπτιση σε αποσταγμένο νερό (ddH₂O), ακόλουθη επώαση σε διάλυμα σιλανίου σε ακετόνη 2% για 30s, εμβάπτιση σε δύο διαδοχικά διαλύματα ακετόνης και τέλος για τουλάχιστον 2 min εμβάπτιση σε αποσταγμένο νερό. Μετά τη σιλανοποίηση οι αντικειμενοφόροι αφήνονταν να στεγνώσουν για 24 ώρες σε

θερμοκρασία δωματίου (κατά τη φύλαξη πρέπει να αποφεύγονταν οι υψηλές θερμοκρασίες και η έκθεση σε φως).

6.4 ΣΥΝΕΧΟΜΕΝΗ ΜΑΤΑΙΩΣΗ

Στα πειράματα αυτά ερευνήθηκε το ενδεχόμενο η πρόωμη εμπειρία ήπιας αντιξοότητας DER να επηρεάζει τη δομή του PFC δηλαδή, τη νευρωνική πυκνότητα, δεδομένου ότι έχει αποδειχθεί ότι πρόωμες εμπειρίες που περιέχουν αντιξοότητα, όπως η μητρική στέρηση ή το προγεννητικό στρες, επηρεάζουν αρνητικά την νευρωνική πυκνότητα (Aksic' et al 2013; Chocyk et al. 2013) καθώς και τον απόλυτο αριθμό των νευρώνων (Mychasiuk et al. 2012). Έτσι, για να διερευνηθεί η σχέση μεταξύ της DER πρόωμης εμπειρίας και των πιθανών κυτταρικών ελλειμμάτων στον PFC, προσδιορίστηκε η πυκνότητα των νευρωνικών κυττάρων στον PFC με ανοσοϊστοχημεία έναντι του νευρωνικού δείκτη NeuN καθώς και η πυκνότητα των γλουταμινεργικών νευρώνων στον PFC με ανοσοϊστοχημεία έναντι του vGluT κατά τις μεταγεννητικές ημέρες 11-13, δηλαδή, κατά τη διάρκεια της εκπαίδευσης στο λαβύρινθο T. Επίσης, προσδιορίστηκε η πυκνότητα της μικρογλοίας και αστρογλοίας με ανοσοφθορισμό (Iba-1 και GFAP αντίστοιχα) αφού έχει αναφερθεί ότι οι πρόωμες εμπειρίες αντιξοότητας οδηγούν σε αλλαγές των δεικτών φλεγμονής των νευρώνων (Barros et al 2006;. Llorente et al. 2009; Ntiz-Chaves et al. 2012; Marco et al. 2013; 'Slusarczyk Et al. 2015; Zhao et al. 2015), οι οποίες με τη σειρά τους έχουν συνδεθεί με ψυχοπαθολογία (Re'us et al. 2015). Τέλος, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα αποπτωτικών κυττάρων με τη δοκιμασία Tunel και κυττάρων που βρίσκονται στην διαδικασία κυτταρικού θανάτου με τη δοκιμασία FluoroJade B.

6.4.1. Ανοσοϊστοχημεία NeuN και v-GluT

Με αφορμή τη συμπεριφορική δυσλειτουργία των DER ενήλικων ζώων σε πειράματα που ελέγχουν την απόδοση του προμετωπιαίου φλοιού, εξετάστηκε το ενδεχόμενο κυτταρικών αλλοιώσεων σε νεογνά πειραματόζωα (μεταγεννητικές ημέρες 11-13) σε μία περιοχή του εγκεφάλου των νεογνών ζώων που αντιστοιχεί στην περιοχή του έσω κορχομετωπιαίου (MO) και του υπομεταιχμιακού (infralimbic) φλοιού (IL) των ενήλικων ζώων. Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκε αρχικά η πυκνότητα των νευρώνων στις περιοχές αυτές του προμετωπιαίου φλοιού με ανοσοϊστοχημεία έναντι του νευρωνικού αντιγόνου NeuN. Η πρωτεΐνη NeuN είναι μία νευροειδική πρωτεΐνη που προσδένεται στο DNA των περισσότερων τύπων νευρωνικών

κυττάρων του κεντρικού και περιφερειακού νευρικού συστήματος. Η εντόπιση της πρωτεΐνης αυτής περιορίζεται στους πυρήνες των νευρωνικών κυττάρων τόσο εμβρυικών όσο και ενήλικων εγκεφάλων, ενώ εμφανίζεται από το στάδιο της τελικής διαφοροποίησης των νευρικών κυττάρων. Η ισχυρή ανοσοϊστοχημική πυρηνική χρώση υποδεικνύει πιθανό ρυθμιστικό ρόλο της πρωτεΐνης NeuN στην μεταγραφή ενώ μέχρι σήμερα δεν έχει ταυτοποιηθεί κάποιος ρόλος της πρωτεΐνης αυτής στο κυτταρόπλασμα.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία έναντι του κυστιδιακού μεταφορέα του γλουταμικού (vGluT) με σκοπό την ταυτοποίηση των «χαμένων» κυττάρων. Το γλουταμικό οξύ είναι αποθηκευμένο σε κυστίδια που βρίσκονται στο προσυναπτικό άκρο και απελευθερώνονται στην συναπτική σχισμή (Sudhof, 1995; Takamori, 2006). Για την αποτελεσματικότητα του γλουταμικού οξέος ως νευροδιαβιβαστή κρίσιμο ρόλο παίζουν οι μεταφορείς του. Σύμφωνα με τη δομή και τη δράση τους οι μεταφορείς γλουταμικού κατατάσσονται σε δύο υπεροικογένειες: τους μεταφορείς της πλασματικής μεμβράνης (plasma membrane transporters- EAATs) και τους κυστιδιακούς μεταφορείς (vGLUTs). Μελέτες στις οποίες κατέστειλαν ή υπερέκφρασαν τους μεταφορείς έχουν δείξει ότι οι vGLUTs παίζουν καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση της λειτουργικής συναπτικής διαβίβασης. Σε ποντίκια με έλλειψη των μεταφορέων vGLUT έχουν παρατηρηθεί βλάβες στην συναπτική διαβίβαση, στον προσανατολισμό και στην μνήμη και μάθηση γενικότερα (Balschun et al., 2010; Fremeau et al., 2004; Moechars et al., 2006; Seal et al., 2008, 2009; Smear et al., 2007; Wojcik et al., 2004). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η καταστολή ή υπερέκφραση των vGLUT μεταφορέων έχει συσχετιστεί με ποικίλες νευρολογικές και ψυχιατρικές παθήσεις συμπεριλαμβανομένης και της επιληψίας (Juge et al., 2010; Schallier et al., 2009), του πόνου (Moechars et al., 2006; Seal et al., 2009) και τη σχιζοφρένεια (Eastwood and Harrison, 2005; Varea et al., 2012; Uezato et al., 2009; Oni-Orisan et al., 2008). Εν τέλει, έχει πια επιβεβαιωθεί ότι αναστολείς των vGLUT μπορούν να διαμορφώσουν τη συναπτική διαβίβαση τόσο στον υπόκαμπο όσο και στον προμετωπιαίο φλοιό, γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό τόσο στην παθοφυσιολογία διάφορων νευρολογικών ασθενειών όσο και ως φαρμακολογικός στόχος (Neale et al., 2013).

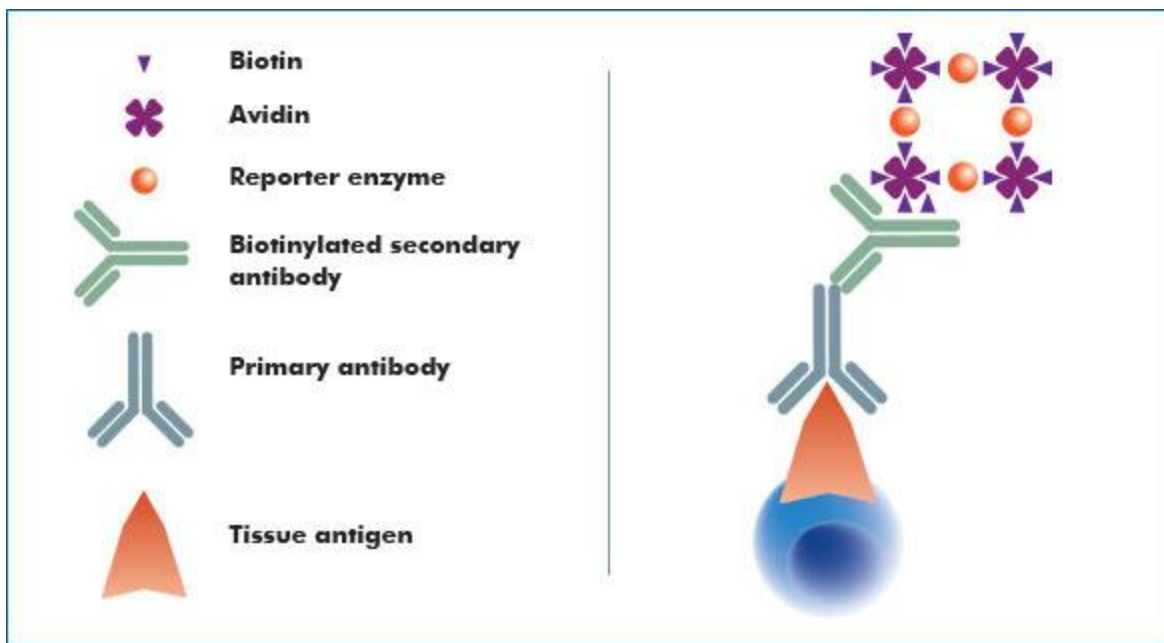
Η ανοσοϊστοχημεία (immunohistochemistry) αποτελεί μία εργαστηριακή τεχνική που συνδυάζει τη βιοχημεία με την ανοσολογία και την ιστολογία. Η μέθοδος βασίζεται στη χρήση ειδικών αντισωμάτων με τα οποία, μέσω της απόλυτα ειδική αλληλεπίδρασης αντιγόνου-αντισώματος, καθίσταται δυνατός ο εντοπισμός του αντιγόνου τόσο σε κυτταρικό όσο και σε

υποκυτταρικό επίπεδο. Τα αντισώματα ή ανοσοσφαιρίνες είναι πρωτεϊνικά μόρια που έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν και να συνδέονται ειδικά με συγκεκριμένα αντιγόνα. Τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται σε ανοσοϊστοχημικές μεθόδους ανήκουν κυρίως στην οικογένεια των ανοσοσφαιρινών IgG και σπανίως στην οικογένεια των IgM, παρασκευάζονται με ανοσοποίηση ζώων με καθαρό αντιγόνο (ολόκληρη πρωτεΐνη, πεπτίδιο, επικράτεια κλπ.) και διακρίνονται σε δύο βασικές κατηγορίες: τα μονοκλωνικά και τα πολυκλωνικά. Τα πολυκλωνικά ονομάζονται έτσι καθώς στον παραγόμενο αντιορό περιέχονται IgG που είναι προϊόντα πολλών διαφορετικών κλώνων Β-λεμφοκυττάρων και κατά συνέπεια αναγνωρίζουν διαφορετικούς επιτόπους του αντιγόνου. Τα μονοκλωνικά αντισώματα παράγονται συνήθως σε ποντικό. Η ανοσοποίηση ακολουθείται από απομόνωση διακριτών κλώνων Β-λεμφοκυττάρων, καθένας εκ των οποίων παράγει ένα μόνο αντίσωμα με την ίδια μοριακή δομή, ειδικότητα και συγγένεια, το οποίο αναγνωρίζει έναν συγκεκριμένο επίτοπο. Το βασικό πλεονέκτημα των μονοκλωνικών αντισωμάτων είναι η μεγάλη τους ειδικότητα για το αντιγόνο ενώ, τα πολυκλωνικά σε σύγκριση με τα μονοκλωνικά εμφανίζουν υψηλότερη συγγένεια και ευρύτερη δραστηριότητα, αναγνωρίζοντας πιο αποτελεσματικά το υπό μελέτη αντιγόνο, αφού αναγνωρίζουν περισσότερους επιτόπους πάνω στο αντιγόνο. Η μέθοδος της ανοσοϊστοχημείας χαρακτηρίζεται από μεγάλο βαθμό ακρίβεια και ειδικότητα και επιτρέπει την ανίχνευση ποικιλίας αντιγόνων σε διάφορους τύπους ιστού. Χρησιμοποιείται δε ευρέως τόσο στη διάγνωση μη φυσιολογικών κυττάρων όπως αυτά που εντοπίζονται σε καρκινικούς όγκους όσο και στη βασική έρευνα για τον χαρακτηρισμό του χωροχρονικού προτύπου έκφρασης μιας πρωτεΐνης κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης ενός οργανισμού όπως επίσης και στην ανάλυση της κατανομής ή/και του εντοπισμού διαφορετικών πρωτεϊνών σε διαφορετικές περιοχές ενός ιστού, όπως στην περίπτωση της δικιάς μας μελέτης. Η ανοσοϊστοχημεία συγκεντρώνει πολλά πλεονεκτήματα: Είναι ταχεία, έχει πολύ ικανοποιητική ευαισθησία, ειδικότητα, επαναληψιμότητα και δυνατότητα συσχέτισης του εντοπισμού με μορφολογικές παραμέτρους.

Η αρχική μέθοδος ανοσοϊστοχημείας επινοήθηκε από τον A. Coons και τους συνεργάτες του (Coons & Kaplan 1950, Coons et al 1955). Έκτοτε, σε συνδυασμό με τη ραγδαία εξέλιξη στις τεχνικές της παραγωγής, της απομόνωσης και του χαρακτηρισμού της ειδικότητας των αντισωμάτων αναπτύχθηκαν πολλές διαφορετικές μέθοδοι και πρωτόκολλα ανοσοϊστοχημείας. Επιπλέον, η ανακάλυψη νέων φθορίζοντων μορίων επέτρεψε τη σήμανση των αντισωμάτων ενώ, η ανάπτυξη μεθόδων ανίχνευσης του συμπλέγματος αντιγόνου-αντισώματος και ενίσχυσης

του σήματος, οδήγησαν στη δημιουργία πολλών τεχνικών σήμανσης των αντισωμάτων με σύνδεση ομάδων, ενζύμων ή ενζυμικών συστημάτων πάνω στα αντισώματα. Έτσι, η επιλογή της κατάλληλης κάθε φορά μεθόδου θα πρέπει να βασίζεται τόσο στο είδος του υπό μελέτη δείγματος, όσο και στο βαθμό της ευαισθησίας που απαιτείται. Επομένως, η επιλογή του αντισώματος, του τρόπου προετοιμασίας του δείγματος και των μαρτύρων που θα χρησιμοποιηθούν είναι οι βασικές αποφάσεις που πρέπει να ληφθούν πριν την εφαρμογή της μεθόδου.

Πιο συγκεκριμένα, στα εν λόγω πειράματα, τόσο για την ανοσοϊστοχημεία έναντι του NeuN όσο και έναντι του vGluT, χρησιμοποιήθηκε η έμμεση μέθοδος ανοσοϊστοχημείας αβιδίνης-βιοτίνης. Η επιλογή μεθόδου ανοσοϊστοχημείας εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως από τον ιστό που μελετάται, από την προετοιμασία του δείγματος, από τα επίπεδα έκφρασης του υπό μελέτη αντιγόνου, από το είδος και τα χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου αντισώματος και τα διαθέσιμα συστήματα αντίχενσης καθώς και από τον διαθέσιμο εξοπλισμό και την οικονομική δυνατότητα του εκάστοτε εργαστηρίου. Λαμβάνοντας όλα τα παραπάνω στοιχεία υπόψη επιλέχθηκε η έμμεση μέθοδος Ανοσοϊστοχημείας Αβιδίνης-Βιοτίνης· χρησιμοποιήθηκε ως δεύτερο αντίσωμα ένα βιοτινυλιωμένο αντίσωμα IgG γαϊδάρου έναντι αντισωμάτων IgG κασίικας. Οι έμμεσες μέθοδοι είναι μέθοδοι δύο ή περισσότερων βημάτων: το πρώτο βήμα περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση του αντισώματος με το αντιγόνο που αναγνωρίζει, ενώ το δεύτερο βήμα επώαση του συμπλέγματος αντιγόνου-πρώτου αντισώματος με δεύτερο αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει το σταθερό τμήμα των IgG του ζωικού είδους στο οποίο έχει δημιουργηθεί το πρώτο αντίσωμα (Εικόνα 6.4). Το δεύτερο αντίσωμα είναι συνδεδεμένο με μια φθορίζουσα ομάδα ή κάποιο ένζυμο (π.χ. υπεροξειδάση) ή άλλο μόριο (π.χ. βιοτίνη) που καθιστά δυνατή την αντίχενση του συμπλέγματος. Σε πολλές περιπτώσεις, ειδικά όταν τα επίπεδα του υπό μελέτη αντιγόνου είναι χαμηλά χρησιμοποιούνται έμμεσες μέθοδοι ενίσχυσης περισσότερων βημάτων.



Εικόνα 6.4: Η έμμεση ανοσοϊστοχημική μέθοδος με την συμβολή του συμπλόκου Αβιδίνης Βιοτίνης

Πρωτόκολλο Ανοσοεντόπισης NeuN και v-GluT: Μετά την εξισορρόπηση της θερμοκρασίας των τομών από τους -80°C (θερμοκρασία φύλαξης) σε θερμοκρασία δωματίου (RT), οι τομές μονιμοποιούνται σε 4% διάλυμα παραφορμαλδεϋδης σε φωσφορικά (PB) με pH 7,4, για μία ώρα. Έπειτα από τρία ξεπλύματα (x 5 λεπτά το καθένα) σε ρυθμιστικό διάλυμα (0,1M διάλυμα φωσφορικών αλάτων, PBS), ακολουθούσε διαπερατοποίηση των τομών, με ένα διάλυμα απορρυπαντικού Triton X- 100 συγκέντρωσης 0,4% σε PBS 0.1 M (για το v-GluT) ή 0,3% Triton X- 100 (για το NeuN), για την αύξηση της διεισδυτικότητας των αντισωμάτων στις τομές (3 ξεπλύματα x 5 λεπτά το καθένα). Σε αυτό το χρονικό διάστημα πραγματοποιούνταν και η περιχάρακωση των τομών με PAP PEN, ένα υδροφοβικό υλικό, ώστε να περιοριστεί ο χώρος της αντίδρασης σύνδεσης αντισώματος-αντιγόνου και να αποφευχθεί η διαφυγή του διαλύματος. Στη συνέχεια παρεμποδιζόταν η μη ειδική πρόσδεση του 2^{ου} αντισώματος με επώαση των τομών, για μία ώρα, σε διάλυμα παρεμπόδισης μη ειδικής σύνδεσης των αντισωμάτων (blocking) που περιείχε 10% φυσιολογικό ορό γαϊδάρου (NDS) σε PBS που περιείχε 0,4% Triton X- 100 (για το v-GluT) και 10% (NDS) σε PBS που περιείχε 0,3% Triton X- 100 (για το NeuN), σε RT. Έπειτα, οι τομές επώαζονταν για 72 ώρες στους 4°C με διάλυμα 1^{ου} αντισώματος, μονοκλωνικό IgG1 αντίσωμα ποντικού έναντι του πυρηνικού αντιγόνου NeuN (1:400 anti-NeuN clone A60, MAB377, Millipore, USA), είτε πολυκλωνικό αντίσωμα κατσίκας

έναντι του κυστιδιακού μεταφορέα v-GluT (1:1000 anti-vGluT, AB1520, Millipore, USA). Το anti- vGluT διαλύονταν σε διάλυμα PBS που περιείχε 0,4% Triton X- 100 και 4% NDS και το anti- NeuN σε διάλυμα PBS που περιείχε 0,3% Triton X- 100 και 4% NDS. Μετά την επώαση με το 1^ο αντίσωμα οι τομές ξεπλένονταν σε PBS (3 ξεπλύματα x 5 λεπτά το καθένα) και ακολουθούσε επώαση για δύο ώρες σε RT με το διάλυμα του 2^{ου} αντισώματος σε PBS που περιείχε 2% NDS. Τα δεύτερα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ένα βιοτινυλιωμένο IgG αντίσωμα γαϊδάρου έναντι ποντικού (1:400 AP192B, Millipore) για τα πειράματα ανοσοϊστοχημείας έναντι του NeuN και, ένα βιοτινυλιωμένο αντίσωμα γαϊδάρου έναντι κατσίκας (1:200 AP180B, Millipore) για τα πειράματα ανοσοϊστοχημείας έναντι του v-GluT. Η περίσσεια του αντισώματος απομακρύνθηκε με πλύσιμο των τομών σε PBS (5x5 λεπτά). Ακολουθούσε επώαση με διάλυμα Αβιδίνης-Βιοτίνης συνδεδεμένης με υπεροξειδάση (AB complex A, B 1:100 σε PBS 0.1M, Εικόνα), για 60 λεπτά σε RT. Η περίσσεια του διαλύματος AB complex ξεπλύθηκε με PBS (3x5 λεπτά).

Εμφάνιση Χρώσης: Τέλος, η ανοσοϊστοχημική χρώση επιτεύχθηκε με την αντίδραση της υπεροξειδάσης με το χρωμογόνο υπόστρωμα DAB [DAB (1.7 mM, Sigma-Aldrich, USA)] diluted in Tris-HCl buffer (10 mM, pH7.6) and 0.03 % H₂O₂] για 2-5 λεπτά σε RT. Για τη διατήρηση, αποθήκευση και παρατήρηση των τομών ακολούθησε σταδιακή αφυδάτωσή τους σε διάλυμα αιθανόλης σταδιακά αυξανόμενης συγκέντρωσης και τοποθέτηση καλυπτρίδων με τη χρήση ειδικής ρητίνης κάλυψης [DePeX (SERVA, Germany)]. Ως μάρτυρες της πειραματικής αυτής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν τομές, οι οποίες δεν επώαστηκαν με το πρώτο ειδικό αντίσωμα και οι οποίες δεν έδωσαν καμία ανοσοϊστοχημική χρώση.

6.4.2 Ανοσοφθορισμός για *Iba1* και *GFAP*

Για τον προσδιορισμό της πυκνότητας της μικρογλοίας στον προμετωπιαίο φλοιό χρησιμοποιήθηκε έμμεση μέθοδος ανοσοφθορισμού έναντι της πρωτεΐνης Iba-1. Η Iba-1 είναι μία ασβεστο-δεσμευόμενη πρωτεΐνη η οποία εκφράζεται συγκεκριμένα στα ενεργοποιημένα μακροφάγα και μικρογλοιακά κύτταρα. Η Iba1 έχει δραστικότητα δεσμοποίησης ακτίνης και συμμετέχει στις αναδιπλώσεις της μεμβράνης και τη φαγοκυττάρωση από την ενεργοποιημένη μικρογλοία (Ohsawa K, Imai Y, Sasaki Y, Kohsaka S, 2004). Αντίστοιχα, για τον προσδιορισμό της αστρογλοίας στον προμετωπιαίο φλοιό χρησιμοποιήθηκε έμμεση μέθοδος ανοσοφθορισμού έναντι της πρωτεΐνης GFAP. Η GFAP είναι μία κυτταροπλασματική πρωτεΐνη του κυτταρικού σκελετού των αστροκυττάρων και έχει αποδειχθεί ότι είναι ο πιο ειδικός δείκτης για την

εντόπιση των κυττάρων αυτών. Η δομή της πρωτεΐνης αυτής εμφανίζει σημαντική ομολογία με τα ενδιάμεσα νημάτια. Θεωρείται ότι τα νημάτια GFAP παίζουν σημαντικό ρόλο στην κινητικότητα των αστροκυττάρων καθώς και το σχήμα τους παρέχοντας δομική σταθερότητα, σημαντική για τις αστροκυτταρικές διεργασίες. Μετά από βλάβη στο ανθρώπινο ΚΝΣ που προκαλείται από τραύμα, γενετικές διαταραχές, ή χημικές ουσίες, τα αστροκύτταρα πολλαπλασιάζονται και η έκφραση της GFAP είναι αυξημένη.

Ο ανοσοφθορισμός είναι η μέθοδος κατά την οποία χρησιμοποιούνται φθορίζοντα αντισώματα για την ανίχνευση και εντόπιση αντιγόνου ή αντισώματος σε ιστούς ή κύτταρα. Χρησιμοποιείται κυρίως για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων. Στον φθορισμό χρησιμοποιείται υπεριώδες φως (UV) το οποίο πέφτει πάνω στα ηλεκτρόνια των ατόμων του φθοριοχρώματος. Τότε αυτά διεγείρονται και απελευθερώνουν με τη μορφή φωτονίων την ενέργεια που προσέλαβαν. Μέρος της αρχικής διεγείρουσας ενέργειας καταναλώνεται με αποτέλεσμα το φθοριόχρωμα να εκπέμπει φως μικρότερης ενέργειας (μεγαλύτερου μήκους κύματος) από τη διεγείρουσα ακτινοβολία.

Πρωτόκολλο Ανοσοφθορισμού για Iba-1 και GFAP: Μετά την εξισορρόπηση της θερμοκρασίας των τομών από τους -80°C (θερμοκρασία φύλαξης) σε θερμοκρασία δωματίου (RT), οι τομές μονιμοποιούνταν σε 4% διάλυμα παραφορμαλδεΐδης σε φωσφορικά (PB) με pH 7,4, για μία ώρα. Έπειτα από τρία ξεπλύματα (x 5 λεπτά το καθένα) σε ρυθμιστικό διάλυμα (0,1M διάλυμα φωσφορικών αλάτων, PBS), ακολουθούσε διαπερατοποίηση των τομών, με ένα διάλυμα απορρυπαντικού Triton X- 100 συγκέντρωσης 0,4% σε PBS 0.1 M (για το GFAP) και 0,1% Triton X- 100 0,4% σε PBS 0.1 M (για το Iba1), για την αύξηση της διεισδυτικότητας των αντισωμάτων στις τομές (3 ξεπλύματα x 5 λεπτά το καθένα). Στη συνέχεια παρεμποδιζόταν η μη ειδική πρόσδεση του 2^{ου} αντισώματος με επώαση των τομών, για μία ώρα, σε διάλυμα παρεμπόδισης μη ειδικής σύνδεσης των αντισωμάτων (blocking) που περιείχε 10% φυσιολογικό ορό γαϊδάρου (NDS) σε PBS που περιείχε 0,4% Triton X- 100 (για το GFAP) ή 0,01 % Triton X- 100, 10% NDS και 1% ορό βοδιού (BSA, για το Iba1) , σε RT. Έπειτα, οι τομές επωάζονταν στους 4°C με διάλυμα 1^{ου} αντισώματος, πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι του Iba-1 (72h anti-Iba1, 1:500, WEK6254, Wako, Japan; διαλυμένο σε PBS 0.01 % Triton, 1 % NDS, και 1 % BSA) είτε πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι του GFAP (anti-GFAP για 24 ώρες, 1:500, Z0334, DakoCytomation, Glostrup, Denmark; διαλυμένο σε PBS 0.4 % Triton X-100 και 4 % NDS). Μετά την επώαση με το 1^ο αντίσωμα οι τομές ξεπλένονταν σε PBS (3 ξεπλύματα x 5

λεπτά το καθένα) και ακολουθούσε επώαση για 2 ώρες σε RT με ένα αντίσωμα IgG γαϊδάρου έναντι κουνελιού συζευγμένο με Alexafluor555 (A21206, συγκέντρωση 1:200 σε PBS που περιείχε 2 % NDS). Η περίσσεια του αντισώματος απομακρύνθηκε με πλύσιμο των τομών σε PBS (5x5 λεπτά) και ακολουθούσε κάλυψη των τομών με καλυπτρίδα με τη χρήση διαλύματος γλυκερόλης (Mowiol mounting medium).

6.4.3 TUNEL

Η τεχνική TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase -TdT- mediated dUTP Nick End Labeling) αποτελεί τεχνική εντόπισης των αποπτωτικών κυττάρων και στηρίζεται στη σύνδεση του ενζύμου TdT με τα 3'-OH άκρα των θραυσμάτων του DNA και στην προσθήκη του βιοτινυλιωμένου νουκλεοτιδίου στις θέσεις εντομής. Το σήμα στο σχηματιζόμενο πολυμερές πολυδεσοξυνουκλεοτιδικό μόριο, ενισχύεται συνδεόμενο με αβιδίνη – υπεροξειδάση και ακολουθεί η ιστοχημική ανίχνευση του. Η μέθοδος TUNEL εφαρμόστηκε με επιτυχία σε ιστούς που χαρακτηρίζονται από ταχύ ρυθμό κυτταρικής ανανέωσης και δεν περιορίζεται μόνο στην εντόπιση κυττάρων που διανύουν αρχικά στάδια απόπτωσης [243] αλλά επεκτείνεται και στην ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων τα οποία έχουν φαγοκυτταρωθεί από τα μακροφάγα.

Πρωτόκολλο Απόπτωσης TUNEL: Αρχικά οι τομές αφήνονταν σε θερμοκρασία δωματίου για 15-20 λεπτά ώστε να εξισορροπηθεί η θερμοκρασία τους και να στεγνώσουν. Στη συνέχεια οι τομές μονιμοποιούνταν για 20 λεπτά σε 4% παραφορμαλδεΐδη σε 0,1 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) pH 7,4 σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούσαν 3 ξεπλύματα σε PBS, 10 λεπτά το καθένα, σε θερμοκρασία δωματίου ενώ παράλληλα περιχαράκωνονταν οι τομές όπως έχει περιγραφεί και προηγουμένως. Έπειτα, για την αύξηση της διεισδυτικότητας των αντισωμάτων πραγματοποιούνταν η διαδικασία της διαπερατοποίησης με τη συμβολή απορρυπαντικού Triton X- 100 συγκέντρωσης 0,1% σε 0.1w/v sodium citrate για 2 λεπτά στον πάγο. Ακολουθούσαν 2 γρήγορα ξεπλύματα με το ρυθμιστικό διάλυμα PBS και η αντίδραση του TUNEL. Τοποθετούνταν οι τομές για μια ώρα σε κλίβανο θερμοκρασίας 37°C μαζί με 450μl από το Label Solution και 50μl από το Enzyme Solution. Ακολουθούσαν γρήγορα ξεπλύματα με PBS και αποθηκεύονταν στο ψυγείο καλυμμένες με γλυκερόλη.

6.4.4 FluoroJade B

Πρόκειται για ένα φθοριόχρωμα, πολυανιόκω παράγωγω της φλουορεσκεΐνης το οποίο προσδένεται με αυξημένη ειδικότητα και ευαισθησία στους υπό εκφύλιση νευρώνες. Πιο συγκεκριμένα συμβάλει στον προσδιορισμό του εκφυλισμού των κυττάρων, ιδιαίτερας των νευρώνων του εγκεφάλου, αφού συνδέεται σε κύτταρα υπό κυτταρικό θάνατο μετά από την έκθεση σε διάφορους νευροτοξικούς παράγοντες. Η χρώση αυτή κάθε αυτή ανιχνεύει νευρικά κύτταρα που υπόκεινται εκφύλιση και δεν βάφει υγιείς νευρώνες, μυελίνη ή αγγεία. Ο βαθμός και το πρότυπο της χρώσης εξαρτάται από τη φύση της νευροτοξικής προσβολής και το μετέπειτα διάστημα επιβίωσης. Η χρώση πραγματοποιείται καθώς ο εκφυλιζόμενος νευρώνας ίσως εκφράζει ένα πολύ βασικό μόριο που εμφανίζει συγγένεια με το όξινο FluoroJade B.

Πρωτόκολλο FluoroJade B: Αρχικά οι τομές αφήνονταν σε θερμοκρασία δωματίου για 15-20 λεπτά ώστε να εξισορροπηθεί η θερμοκρασία τους και να στεγνώσουν. Στη συνέχεια οι τομές μονιμοποιούνταν για 1 ώρα σε 4% παραφορμαλδεϋδη σε 0,1 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) pH 7,4 στους 4° C. Ακολουθούσαν 4 ξεπλύματα σε PBS, 3 λεπτά το καθένα, σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια η διαδικασία της ενυδάτωσης για 4 λεπτά σε 100% αιθανόλη, για 5 λεπτά σε 80% αιθανόλη και 1% NaOH, για 2 λεπτά 70% και τέλος για 3 λεπτά σε δις-απεσταγμένο νερό. Οι τομές μετά την επώαση τους για 30 λεπτά σε 0,06% Υπερμαγγανικό Κάλιο (KMnO₄) με ήπια ανάδευση, ξεπλένονταν με δις-απεσταγμένο νερό και τοποθετούνταν στη χρώση 0.001% FluoroJade B μαζί με 0.1% οξικό οξύ για 30 λεπτά σε ήπια ανάδευση. Μετά τα τελευταία ξεπλύματα με δις-απεσταγμένο νερό οι τομές τοποθετούνταν στο κενό για να στεγνώσουν για 15 λεπτά και στη συνέχεια σε ξυλόλη για να μπορέσουν να μονιμοποιηθούν με Depex (Serva, Heidelberg, Germany). Οι μονιμοποιημένες πια τομές μπορούσαν να παρατηρηθούν σε μικροσκόπιο επιφθορισμού στα 450-490nm.

6.5 ΣΥΝΕΧΟΜΕΝΗ ΜΑΤΑΙΩΣΗ

Για τη μελέτη των επιπτώσεων έγχυσης ντοπαμίνης στις κυτταρικές μεταβολές που προκάλεσε η νεογνική εκπαίδευση με συνεχόμενη ματαιώση (DER) στον προμετωπιαίο φλοιό πραγματοποιήθηκε έμμεσος ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός έναντι του νευρωνικού αντιγόνου NeuN και έναντι του κυστιδιακού μεταφορέα v-GluT ακολουθώντας ακριβώς το ίδιο πρωτόκολλο με αυτό που περιγράφεται στην §6.4. Έτσι, προσδιορίστηκε η πυκνότητα των νευρωνικών κυττάρων, και συγκεκριμένα των γλουταμινεργικών νευρώνων στην περιοχή

MO/IL εγκεφάλων τουλάχιστον έξι νεογνών επίμυων και την MO εγκεφάλων τουλάχιστον έξι ενήλικων ζώων. Πιο συγκεκριμένα, τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν σε τομές εγκεφάλων DER ενήλικων (n=6) και νεογνών (PND 13, n=6) ζώων στα οποία είχε πραγματοποιηθεί έγχυση ντοπαμίνης στον προμετωπιαίο φλοιό, κατά την πρώτη μεταγεννητική ημέρα (Denied the Expected Reward +Dopamine, DER+DA). Επίσης, ελέγχθηκε η πυκνότητα των νευρωνικών κυττάρων καθώς και των γλουταμινεργικών νευρώνων (ανοσοϊστοχημεία NeuN και v-GluT βλ. §5.4) σε ενήλικα (n=6) και νεογνά (PND 13, n=6) ζώα DER χωρίς καμία άλλη παρέμβαση, σε ενήλικα (n=6) και νεογνά (PND 13, n=6) ζώα DER στα οποία είχε πραγματοποιηθεί έγχυση φυσιολογικού ορού στην περιοχή ενδιαφέροντος (Denied the Expected Reward +Saline, DER+SAL) και τέλος σε ζώα ελέγχου (Control, CTR, n=6/ηλικία).

6.6 ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΣΗ & ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Για την παρατήρηση και τη φωτογράφιση των αποτελεσμάτων όλων των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν: το οπτικό μικροσκόπιο Eclipse E 400, Nikon και η ψηφιακή κάμερα Infinity 1 που ήταν συνδεδεμένη με ηλεκτρονικό υπολογιστή και το λογισμικό Infinity Capture. Οι περιοχές ενδιαφέροντος του προμετωπιαίου φλοιού για τα νεογνά ζώα τόσο στα πειράματα για τον προσδιορισμό του αναπτυξιακού προφίλ όσο και στα πειράματα μελέτης της έγχυσης ντοπαμίνης (PND 11, 12, 13 και PND 13 DER, DER+DA, DER+SAL, CTR 6 ζώα ανά πειραματική ομάδα και ηλικία) ήταν η περιοχή MO/IL που αντιστοιχεί στην περιοχή που καλύπτουν ο έσω κογχομετωπιαίος φλοιός (Medial Orbitofrontal, MO) και ο υπομεταιχμιακός φλοιός (Infralimbic, IL) ενήλικων ζώων. Συγκεκριμένα φωτογραφήθηκαν 2 οπτικά πεδία από πέντε τομές για κάθε ζώο και ο προσδιορισμός της περιοχής αυτής έγινε με βάση τον ανατομικό άτλαντα των Ramachandra και Subramanian (2011). Για τα ενήλικα ζώα και από τις τέσσερις πειραματικές ομάδες (DER, DER+DA, DER+ SAL, CTR) φωτογραφήθηκαν 2 οπτικά πεδία για τον MO από τουλάχιστον τρεις τομές εγκεφάλου κάθε ζώου. Η αναγνώριση της περιοχής ενδιαφέροντος έγινε με βάση τον ανατομικό άτλαντα των Paxinos και Watson (7th ed., 2014).

6.7 ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΑΝΟΣΟΘΕΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η μέτρηση των σημασμένων κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού ανάλυσης εικόνας ImageJ (v.1.46R, NIH, USA) με το οποίο ορίστηκε το κατώφλι του θορύβου εξαιτίας μη ειδικής χρώσης· έτσι, λήφθηκαν υπόψη μόνο τα κύτταρα που ήταν πάνω από το όριο αυτό. Για κάθε ζώο η συνολική τιμή πυκνότητας των κυττάρων σε κάθε πείραμα μέτρησης ανοσοσημασμένων κυττάρων υπολογίστηκε με τη διαίρεση του μέσου όρου του αριθμού των ανοσοθετικών κυττάρων από όλα τα οπτικά πεδία, όλων των τομών, με την επιφάνεια του οπτικού πεδίου που μετρούνταν (αριθμός ανοσοθετικών κυττάρων / μm^2).

6.8 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ GFAP

Ο προσδιορισμός της πυκνότητας των GFAP αστροκυτταρικών προβολών διεξήχθη στις ίδιες περιοχές του φλοιού των νεογνών ζώων (PND 11, 12, 13) όπως περιγράφεται παραπάνω. Για κάθε περιοχή ενδιαφέροντος από κάθε ζώο, μετρήθηκαν 5 τυχαία επιλεγμένες τομές, σε κάθε μία από τις οποίες αξιολογήθηκαν δύο οπτικά πεδία ($20,660 \mu\text{m}^2$). Το ποσοστό της συνολικής περιοχής που κάλυπταν οι GFAP θετικές προβολές, σε κάθε τομή, υπολογίστηκε σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία: Χρησιμοποιώντας το λογισμικό ανάλυσης εικόνας ImageJ, αφαιρέθηκε η χρώση υποβάθρου (αλγόριθμος «κυλιόμενης σφαίρας» με μια ακτίνα 1 pixel) και εφαρμόστηκε ένα αυτόματο κατώφλι. Στη μέτρηση συμπεριλήφθησαν μόνο οι GFAP θετικές προβολές πάνω από το επίπεδο υποβάθρου, ενώ η περιοχή που κάλυπταν αυτές οι προβολές υπολογίστηκε ως το ποσοστό του συνολικού εμβαδού του οπτικού πεδίου που αναλύθηκε. Για κάθε περιοχή του εγκεφάλου ενός ζώου, η πυκνότητα των GFAP θετικών προβολών υπολογίστηκε από τα δεδομένα από όλα τα οπτικά πεδία που αναλύθηκαν. Οι σύνθετες μικροφωτογραφίες παρήχθησαν με το λογισμικό Adobe Photoshop CS2 (Adobe Systems).

6.9 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για όλα τα πειράματα ανοσοϊστοχημικού εντοπισμού και των δοκιμασιών TUNEL και FluoroJadeB, οι τιμές για τις πειραματικές ομάδες (DER και RER για τα πειράματα αναπτυξιακού προφίλ, DER, DER-SAL, DER-DA ενήλικων και PND 13 για τα πειράματα έγχυσης ντοπαμίνης) εκφράστηκαν ως επί τοις εκατό ποσοστό των αντίστοιχων τιμών των ζώων της ομάδας ελέγχου. Αναφορικά με τα πειράματα μελέτης του αναπτυξιακού προφίλ του προμετωπιαίου φλοιού τα στοιχεία αναλύθηκαν σε μια διπλής κατεύθυνσης ANOVA με τις ομάδες των ζώων (CTRL, DER, RER) και το αναπτυξιακό στάδιο (PND11, PND12 και PND13) ως ανεξάρτητες μεταβλητές και εξαρτημένη μεταβλητή τον αριθμό ανοσοθετικών κυττάρων για το NeuN, v-GluT και Iba-1. Για κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε ξεχωριστή στατιστική ανάλυση. Ομοίως διπλής κατεύθυνσης ANOVA με τις ομάδες των ζώων (CTRL, DER, RER) και το αναπτυξιακό στάδιο (PND11, PND12 και PND13) ως ανεξάρτητες μεταβλητές αναλύθηκαν και τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού του GFAP. Τα δεδομένα των πειραμάτων μελέτης της επίδρασης της ντοπαμίνης τόσο στα ενήλικα όσο και στα νεογνά (PND 13) πειραματόζωα αναλύθηκαν με μονής κατεύθυνσης ANOVA με την ομάδα των ζώων (CTRL, DER, DER-SAL, DER-DA) ως την ανεξάρτητη μεταβλητή και τον αριθμό των ανοσοθετικών κυττάρων για το NeuN ή το v-GluT ως εξαρτημένη μεταβλητή. Όπου θεωρήθηκε απαραίτητο χρησιμοποιήθηκε και το LSD τεστ για post-hoc ανάλυση. Το επίπεδο σημαντικότητας για όλες τις στατιστικές αναλύσεις ορίστηκε στο 0.05 ενώ όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο στατιστικό πακέτο SPSS (Release 22, SPSS, USA).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

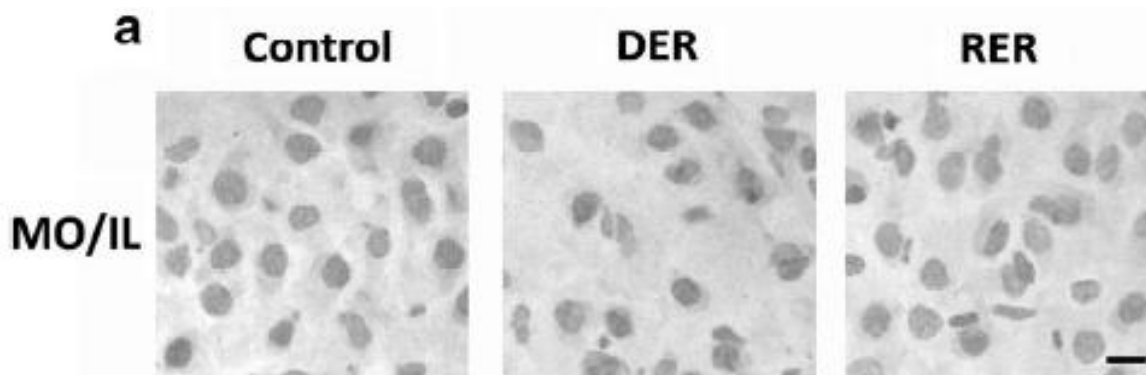
7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

7.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ

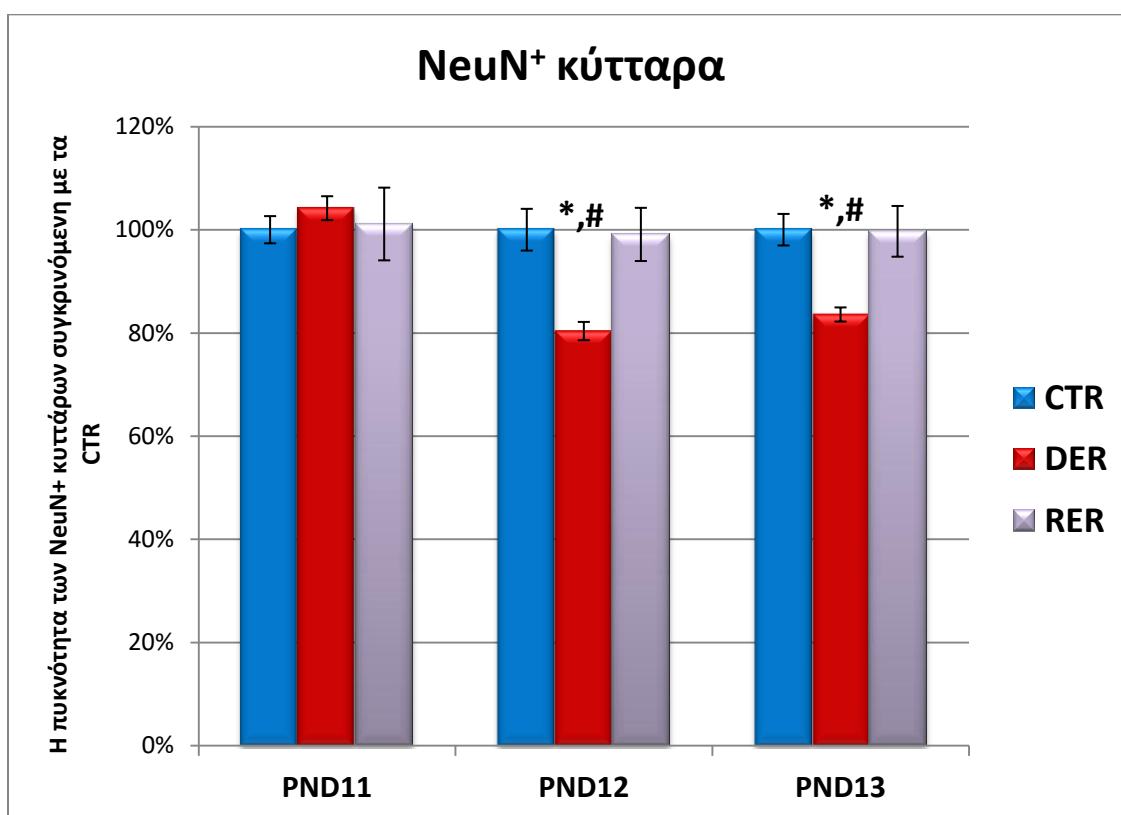
Με αφορμή τη συμπεριφορική δυσλειτουργία των DER ενήλικων ζώων σε πειράματα που ελέγχουν την απόδοση του προμετωπιαίου φλοιού, εξετάστηκε το ενδεχόμενο κυτταρικών αλλοιώσεων σε νεογνά πειραματόζωα (μεταγεννητικές ημέρες 11-13) στην περιοχή του έσω κογχομετωπιαίου (MO) και του υπομεταιχμιακού (infralimbic) φλοιού (IL) σε ζώα των τριών διαφορετικών κατηγοριών. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν ζώα ελέγχου που δεν εκτέθηκαν σε κανενός είδους εκπαίδευση (Control, CTR), ζώα που εκτέθηκαν ως νεογνά σε εκπαίδευση με συνεχόμενη ματαίωση (Denied the Expected Reward, DER) καθώς και ζώα που εκτέθηκαν ως νεογνά σε εκπαίδευση με συνεχόμενη ενίσχυση (Receiving the Expected Reward - RER). Πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοϊστοχημείας και ανοσοφθορισμού σε πειραματόζωα τριών διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων (11^η, 12^η και 13^η μεταγεννητική ημέρα - PND11, PND12, PND13 αντίστοιχα), τα αποτελέσματα των οποίων παρουσιάζονται παρακάτω.

7.1.1. Ανοσοϊστοχημεία NeuN

Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με τις ομάδες των ζώων (CTR, DER, RER) και το αναπτυξιακό στάδιο (PND11, PND12, PND13) ως ανεξάρτητες μεταβλητές και με τα επίπεδα των ανοσοθετικών κυττάρων για το πυρηνικό αντιγόνο NeuN ως εξαρτημένη μεταβλητή, έδειξε την ύπαρξη στατιστικά σημαντικής αλληλεπίδρασης ομάδας ζώων x αναπτυξιακό στάδιο ($F_{4,53}=3.885$, $p=0.009$). Περαιτέρω Post-hoc ανάλυση αποκάλυψε ότι στις ημέρες PND12 και PND13 –όχι όμως και στην PND11-, στις περιοχές MO και IL τα ζώα DER εμφάνιζαν μειωμένη νευρωνική πυκνότητα (NeuN⁺ κύτταρα) σε σχέση τόσο με τα CTR όσο και με τα RER ζώα (Post-hoc ανάλυση: PND12, *DER vs. CTR $p=0.001$, #DER vs. RER $p=0.002$; PND13, *DER vs. CTR $p=0.002$, #DER vs. RER $p=0.002$, **Εικόνα 7.1** και **Γραφική Παράσταση 7.1**). Αντίθετα, δεν βρέθηκε διαφορά μεταξύ των CTR και των RER πειραματόζωων (**Εικόνα 7.1**) σε κανένα από τα 3 αναπτυξιακά στάδια που μελετήθηκαν.



Εικόνα 7.1: Ανοσοθετικά κύτταρα για το νευρωνικό πυρηνικό αντιγόνο NeuN σε νεογνά πειραματόζωα (PND13) στην περιοχή Έσω Κορχομετωπιαίος (MO)/ Υπομεταιχμιακός Φλοιός (IL)

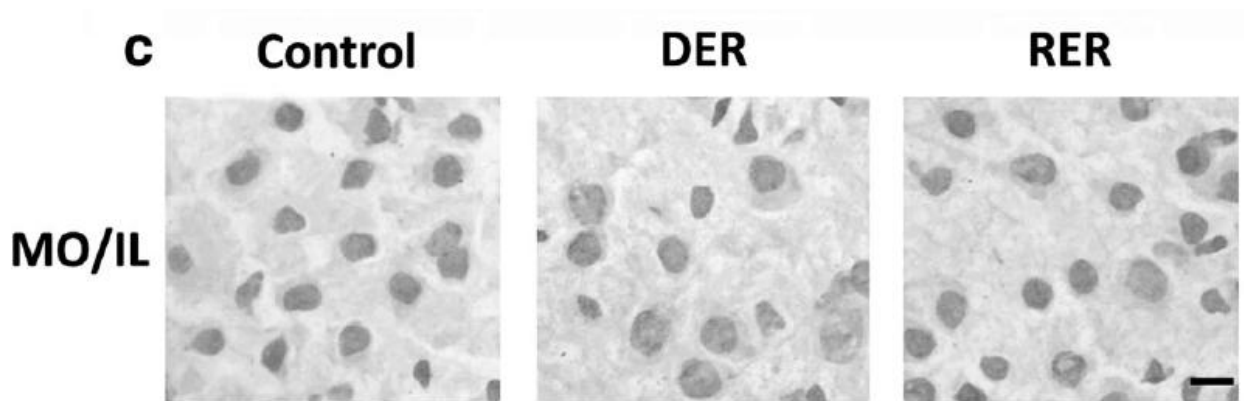


Γραφική παράσταση 7.1: Η επίδραση της DER εμπειρίας στα επίπεδα του νευρωνικού πυρηνικού αντιγόνου NeuN στην περιοχή του Έσω Κορχομετωπιαίου (MO)/ Υπομεταιχμιακού φλοιού (IL) σε νεογνά επίμυ (PND12, PND12 και PND13) κατά τη περίοδο της εκπαίδευσης. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο του αριθμού των NeuN⁺ κυττάρων που μετρήθηκαν ανά οπτικό πεδίο για κάθε κατηγορία ζώων \pm SEM (*DER vs. CTR, #DER vs. RER, $p < 0,05$).

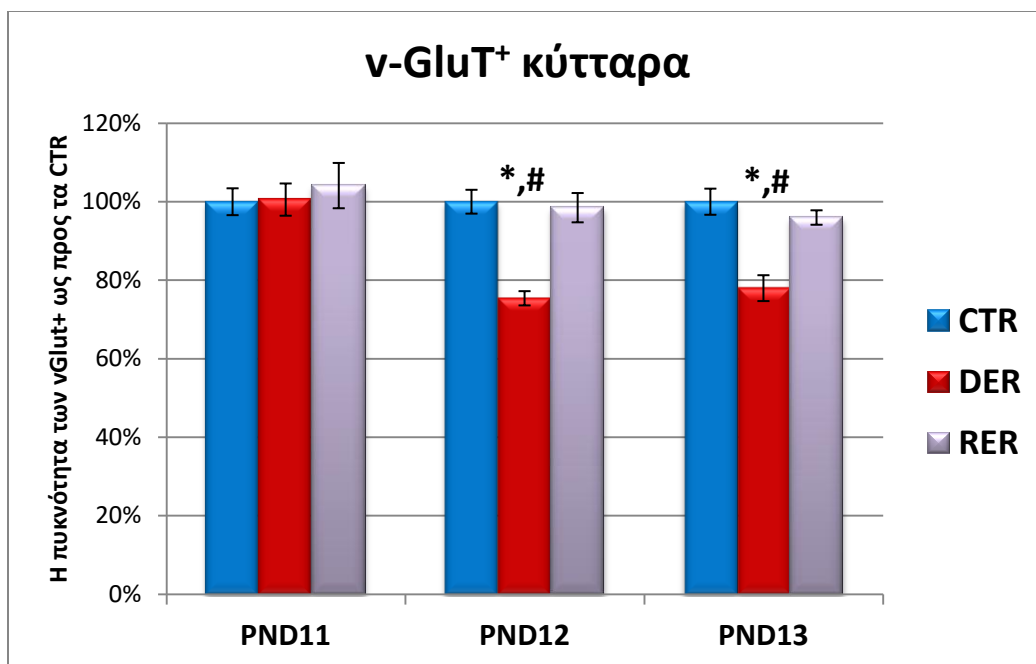
7.1.2. Ανοσοιστοχημεία *v-Glut*

Τα μειωμένα επίπεδα των NeuN ανοσοθετικών κυττάρων στην περιοχή του MO/IL μας κινητοποίησαν για να ταυτοποιήσουμε τον φαινότυπο των «χαμένων» κυττάρων. Έτσι, προσδιορίστηκε στην εν λόγω περιοχή, η πυκνότητα των γλουταμετεργικών κυττάρων χρησιμοποιώντας ως δείκτη τον κυστιδιακό μεταφορέα του γλουταμινικού *v-GluT1*, σε πειραματόζωα διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων (PND11, PND12, PND13), στις τρεις πειραματικές ομάδες.

Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με τις ομάδες των ζώων (CTR, DER, RER) και το αναπτυξιακό στάδιο (PND11, PND12, PND13) ως ανεξάρτητες μεταβλητές και τα επίπεδα των ανοσοθετικών κυττάρων για τον *vGluT1* ως εξαρτημένη μεταβλητή, έδειξε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση ομάδας ζώων x αναπτυξιακό στάδιο ($F_{6,53}=4.925$, $p=0.002$). Πιο συγκεκριμένα, στις μεταγεννητικές ημέρες PND12 και PND13 τα DER πειραματόζωων παρουσίασαν μειωμένη πυκνότητα *vGluT1*⁺ κυττάρων στην περιοχή MO/IL (Post hoc ανάλυση: PND12, *DER vs. CTR $p<0.001$, #DER vs. RER $p<0.001$; PND13, *DER vs. CTR $p<0.001$, #DER vs RER $p<0.001$; **Εικόνα 7.2** και **Γραφική παράσταση 7.2**).



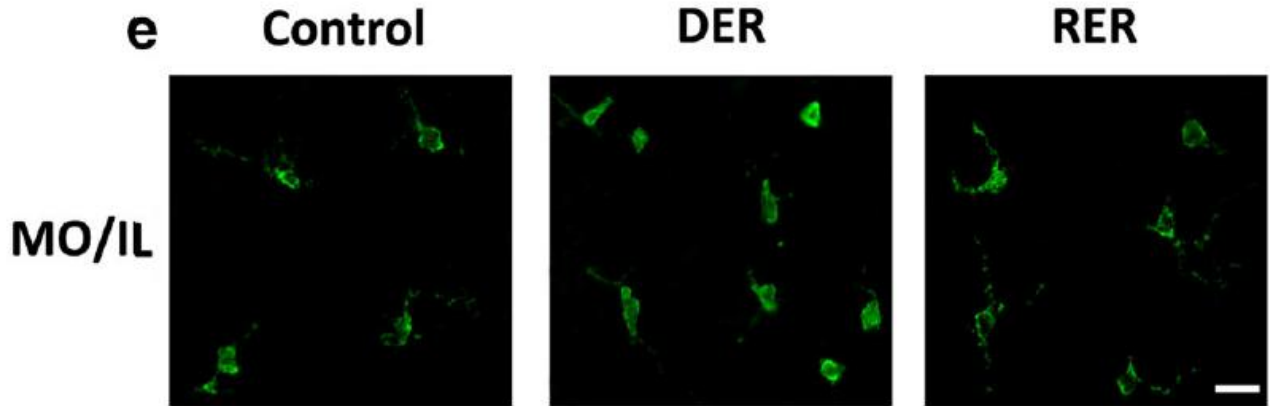
Εικόνα 7.2: Ανοσοθετικά κύτταρα για τον *v-GluT* σε νεογνά πειραματόζωα (PND13) στην περιοχή έσω κορχομετωπαίος (MO)/ υπομεταιχμακός φλοιός (IL)



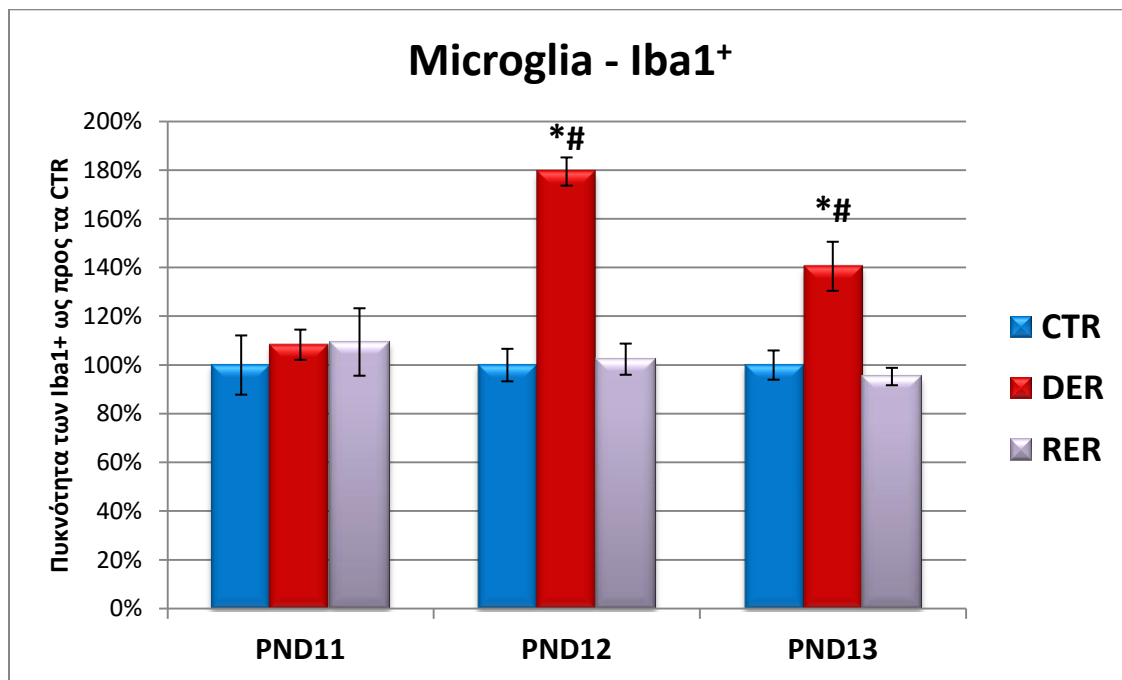
Γραφική παράσταση 7.2: Η επίδραση της DER εμπειρίας στην πυκνότητα των γλουταματεργικών νευρώνων στην περιοχή του Έσω Κορχομετωπιαίου (MO)/ Υπομεταιχμιακού φλοιού (IL) σε νεογνά επίμω (PND12, PND12 και PND13) κατά τη περίοδο της εκπαίδευσης. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο του αριθμού των vGluT⁺ κυττάρων που μετρήθηκαν ανά οπτικό πεδίο για κάθε κατηγορία ζώων \pm SEM (*DER vs. CTR, #DER vs. RER, $p < 0,05$).

7.1.3. Ανοσοφθορισμός Iba-1

Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης στα ανοσοθετικά κύτταρα για την πρωτεΐνη που εκφράζεται στην ενεργοποιημένη μικρογλοία, Iba1 με τις ομάδες των ζώων (CTR, DER, RER) και το αναπτυξιακό στάδιο (PND11, PND12, PND13) ως ανεξάρτητες μεταβλητές και τα επίπεδα των ανοσοθετικών κυττάρων ως προς το Iba1 ως εξαρτημένη μεταβλητή, έδειξε την ύπαρξη σημαντικής αλληλεπίδρασης ομάδας ζώων x αναπτυξιακό στάδιο ($F_{6,53}=7,955$, $p < 0,001$). Περαιτέρω ανάλυση αποκάλυψε αυξημένη πυκνότητα μικρογλοίας την PND12 και PND13 στα DER πειραματόζωα, ενδεικτικό νευροεκφύλισης (Post hoc ανάλυση: PND12, *DER vs. CTR $p < 0,001$, #DER vs. RER $p < 0,001$; στα PND13, *DER vs. CTR $p < 0,001$, #DER vs RER $p < 0,001$; **Εικόνα 7.3** και **Γραφική παράσταση 7.3**).



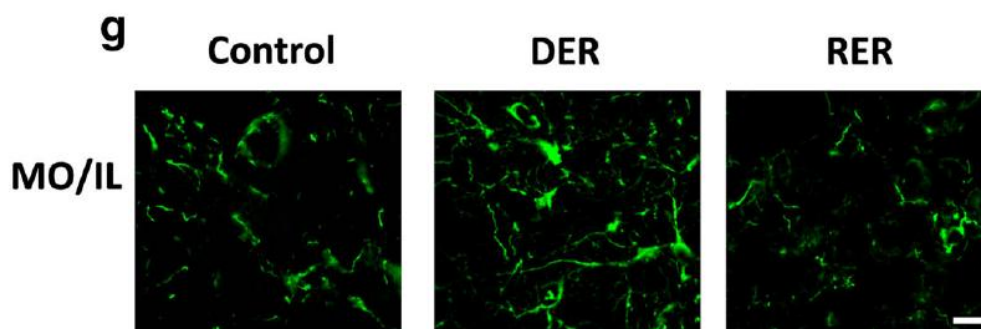
Εικόνα 7.3: Αντιπροσωπευτικές μικροφωτογραφίες του ανοσοφθορισμού για Iba1⁺ σε νεογνά πειραματόζωα (PND13) στην περιοχή MO/IL στις τρεις ομάδες ζώων



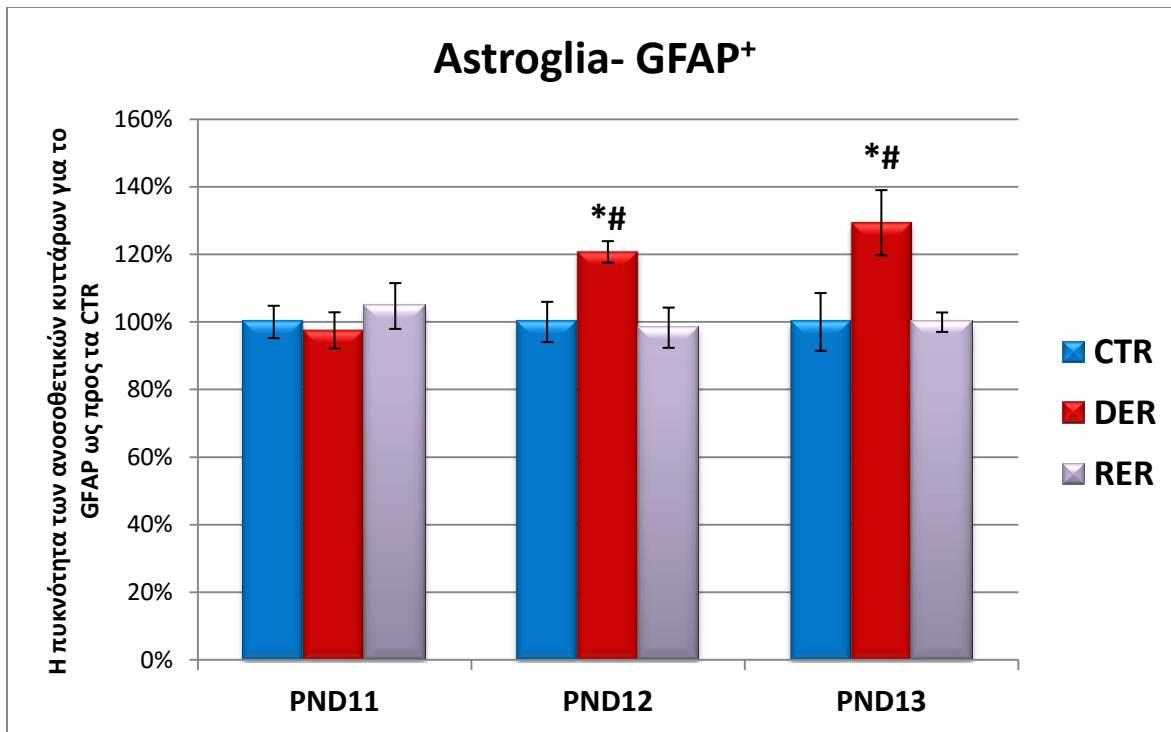
Γραφική παράσταση 7.3: Η επίδραση της DER εμπειρίας στην πυκνότητα των μικρογλοιακών κυττάρων στην περιοχή του Έσω Κορχομετωπιαίου (MO)/Υπομetailχμιακού φλοιού (IL) σε νεογνά επίμυ (PND12, PND12 και PND13) κατά τη περίοδο της εκπαίδευσης. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο του αριθμού των Iba-1⁺ κυττάρων που μετρήθηκαν ανά οπτικό πεδίο για κάθε κατηγορία ζώων ±SEM (DER vs. CTR, # DER vs. RER, p<0,05).*

7.1.4. Ανοσοφθορισμός GFAP

Ομοίως, πραγματοποιήθηκε ANOVA διπλής κατεύθυνσης για έναν δείκτη που διακρίνει τα αστροκύτταρα από τα υπόλοιπα νευρογλοιακά κύτταρα, την GFAP. Οι ομάδες των ζώων (CTR, DER, RER) και το αναπτυξιακό στάδιο (PND11, PND12, PND13) θεωρήθηκαν ανεξάρτητες μεταβλητές, ενώ τα επίπεδα των ανοσοθετικών κυττάρων για την GFAP θεωρήθηκε η εξαρτημένη μεταβλητή. Η στατιστική ανάλυση έδειξε την ύπαρξη αλληλεπίδρασης ομάδα ζώων x αναπτυξιακό στάδιο: $F_{6,53}=3,370$, $p=0.017$. Πιο συγκεκριμένα, η Post-hoc ανάλυση πιστοποίησε ότι την PND12 και PND13, στα DER ζώα παρατηρείται αυξημένη πυκνότητα GFAP ανοσοθετικών κυττάρων (**Εικόνα 7.4**) (Post-hoc ανάλυση: PND12, *DER vs. CTR $p=0.007$, #DER vs. RER $p=0.004$; PND13, *DER vs. CTR $p=0.009$, #DER vs RER $p=0.009$; **Γραφική παράσταση 7.4**).



Εικόνα 7.4: Αντιπροσωπευτικές μικροφωτογραφίες του ανοσοφθορισμού για GFAP σε νεογνά πειραματόζωα (PND13) στην περιοχή MO/IL στις τρεις ομάδες ζώων



Γραφική παράσταση 7.4: Η επίδραση της DER εμπειρίας στην πυκνότητα των αστρογλοιακών κυττάρων στην περιοχή του Έσω Κορχομετωπιαίου (MO)/Υπομεταιχμιακού φλοιού (IL) σε νεογνά επίμυ (PND12, PND12 και PND13) κατά τη περίοδο της εκπαίδευσης. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο του αριθμού των GFAP⁺ κυττάρων που μετρήθηκαν ανά οπτικό πεδίο για κάθε κατηγορία ζώων \pm SEM (DER vs. CTR, # DER vs. RER, $p < 0,05$).*

7.1.5. Δοκιμασίες Tunel & Fluorojade B

Δεν διαπιστώθηκε διαφορά στα επίπεδα κυττάρων που βρίσκονται στη διαδικασία κυτταρικού θανάτου (TUNEL⁺, **Εικόνα 7.5**; Fluro-JadeB⁺, **Εικόνα 7.6**) στην περιοχή MO/IL, μεταξύ των 3 ομάδων ζώων (CTR, DER, RER) ούτε την PND12 ούτε την PND13.



Εικόνα 7.5: Αντιπροσωπευτική μικροφωτογραφία αποπτωτικού κυττάρου (TUNEL⁺) στην περιοχή MO/IL νεογνού την PND12.



Εικόνα 7.6: Αντιπροσωπευτική μικροφωτογραφία κυττάρου σε διαδικασία κυτταρικού θανάτου (Fluoro Jade B⁺) στην περιοχή MO/IL νεογνού την PND12.

7.2 ΕΓΧΥΣΗ ΝΤΟΠΑΜΙΝΗΣ ΣΤΟ ΜΟΝΤΕΛΟ DER

Διερευνώντας το ρόλο της Ντοπαμίνης στα κύτταρα του προμετωπιαίου φλοιού και συγκεκριμένα στην περιοχή του έσω κορχομετωπιαίου φλοιού (MO) πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε ζώα τεσσάρων διαφορετικών πειραματικών συνθηκών: 1) πειραματόζωα ελέγχου που δεν εκτέθηκαν σε κανενός είδους εκπαίδευση (Control, CTR), 2) πειραματόζωα που ως νεογνά εκτέθηκαν σε εκπαίδευση με συνεχόμενη ματαίωση (Denied the Expected Reward, DER), 3) πειραματόζωα που ως νεογνά εκτέθηκαν σε εκπαίδευση με συνεχόμενη ματαίωση αλλά επίσης τους εγχύθηκε φυσιολογικός ορός άπαξ ημερησίως 15min πριν την έναρξη της εκπαίδευσης από την PND10 έως και την PND13 (Denied the Expected Reward+Saline, DER+SAL) και τέλος, πειραματόζωα που ως νεογνά εκτέθηκαν σε εκπαίδευση με συνεχόμενη ματαίωση αλλά επίσης τους εγχύθηκε ντοπαμίνη άπαξ ημερησίως 15min πριν την έναρξη της εκπαίδευσης από την PND10 έως και την PND13 (Denied the Expected Reward+Dopamine, DER+DA).

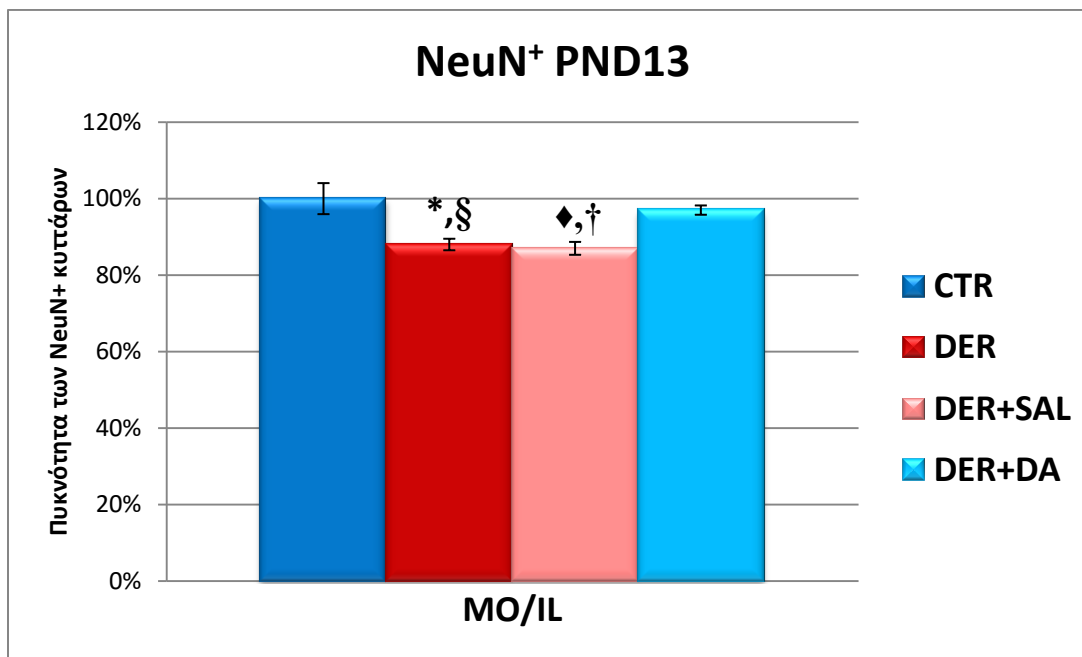
7.2.1 Ανοσοιστοχέμια NeuN

Ο προσδιορισμός της πυκνότητας των νευρώνων έγινε χρησιμοποιώντας ειδικό νευρωνικό πυρηνικό αντίσωμα (antiNeuronal Nuclei – antiNeuN) σε πειραματόζωα και των τεσσάρων ομάδων (CTR, DER, DER-SAL, DER-DA) τόσο κατά την 13^η μεταγεννητική ημέρα (PND13) όσο και κατά την ενήλικη ζωή.

7.2.1.α Νεογνά πειραματόζωα (PND13)

Η ανάλυση διακύμανσης μονής κατεύθυνσης με ανεξάρτητη μεταβλητή τις ομάδες των πειραματόζωων (CTRL, DER, DER-SAL, DER-DA) και εξαρτημένη μεταβλητή τα επίπεδα των NeuN ανοσοθετικών κυττάρων στην περιοχή MO/IL νεογνών επίμυων (PND13) έδειξε την ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς στο επίπεδο των ανοσοθετικών κυττάρων (NeuN⁺) ανάμεσα στις τέσσερις ομάδες πειραματόζωων ($F_{3,27}=9.489$, $p<0.001$). Με περαιτέρω Post hoc ανάλυση (LSD δοκιμασία) αφενός, επιβεβαιώνεται ότι τα DER ζώα εμφανίζουν μειωμένη νευρωνική πυκνότητα (NeuN⁺) σε σχέση με τα ζώα ελέγχου (*CTR vs DER $p=0,001$) αλλά επιπρόσθετα διαπιστώνεται ότι η χορήγηση ντοπαμίνης αίρει αυτό το φαινόμενο (CTR vs. DER+DA $p=0,346$; §DER vs DER+DA $p=0,006$), ενώ αντίθετα στα DER ζώα που χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός τα επίπεδα NeuN+ κυττάρων ήταν χαμηλότερα από τα φυσιολογικά, αντίστοιχα με αυτά των ζώων DER χωρίς έγχυση κάποιας ουσίας (♦CTRL vs DER+SAL

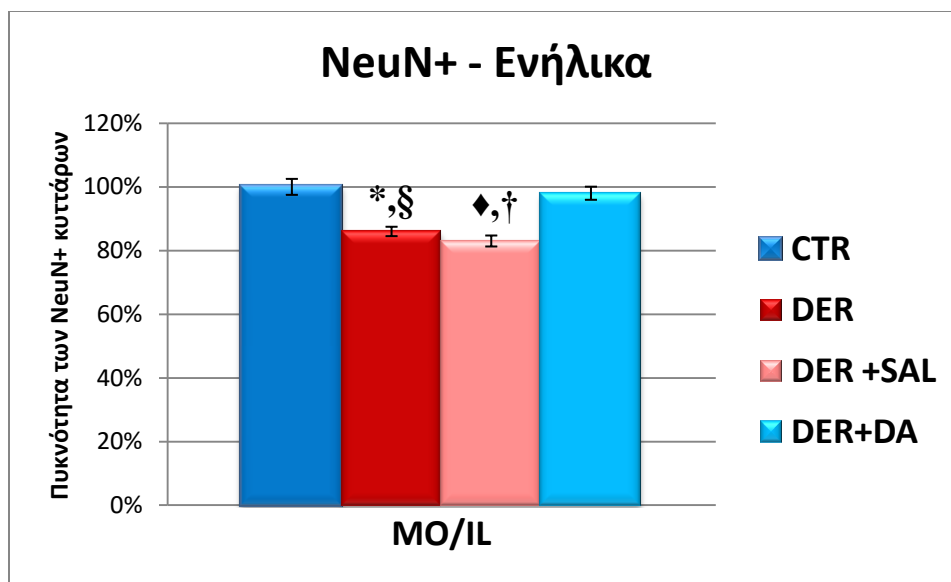
$p < 0.001$; †DER+DA vs DER+SAL $p < 0,001$; DER vs DER+SAL $p = 0.665$, **Γραφική παράσταση 7.5).**



Γραφική παράσταση 7.5: Η επίδραση της έγχυσης ντοπαμίνης στα επίπεδα του νευρωνικού πυρηνικού αντιγόνου NeuN στην περιοχή του έσω κορχομετωπιαίου/υπομεταιχμιακού φλοιού (MO/IL) σε νεογνά επίμυες (PND13) στις τέσσερις πειραματικές κατηγορίες (CTR, DER, DER-SAL, DER-DA). Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο του αριθμού των NeuN⁺ που μετρήθηκαν ανά οπτικό πεδίο για κάθε κατηγορία ζώων \pm SEM (*DER vs CTR, § DER+DA vs DER, ♦ DER+SAL vs CTR, †DER+SAL vs DER+DA, $p < 0,05$)

7.2.1.β Ενήλικα πειραματόζωα

Η ανάλυση διακύμανσης μονής κατεύθυνσης με ανεξάρτητη μεταβλητή τις ομάδες των ζώων (CTR, DER, DER-SAL, DER-DA) και εξαρτημένη μεταβλητή τα επίπεδα των NeuN⁺ ανοσοθετικών κυττάρων στην περιοχή MO/IL έδειξε την ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς ανάμεσα στις τέσσερις ομάδων πειραματόζωων ($F_{3,23}=22.127$, $p < 0.001$). Με περαιτέρω Post-hoc ανάλυση προέκυψε εικόνα αντίστοιχη με αυτή στα νεογνά την PND13: Τα DER είχαν χαμηλότερα επίπεδα NeuN⁺ κυττάρων από τα CTR και τα DER+DA, τα DER+DA δεν διέφεραν από τα CTR ενώ τα DER+Sal δεν διέφεραν από τα DER (Post-hoc test, *CTR vs DER $p < 0,001$; §DER vs DER+DA $p < 0.001$; ♦DER+SAL vs. CTR $p < 0,001$; †DER+SAL vs DER+DA $p < 0,001$, **Γραφική παράσταση 7.6).**



*Γραφική παράσταση 7.6: Η επίδραση της έγχυσης ντοπαμίνης στα επίπεδα του νευρωνικού πυρηνικού αντιγόνου NeuN στην περιοχή του έσω κορχομετωπιαίου/υπομεταιχμιακού φλοιού (MO/IL) σε ενήλικες επίμυες στις τέσσερις πειραματικές κατηγορίες (CTR, DER, DER-SAL, DER-DA). Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο του αριθμού των NeuN⁺ που μετρήθηκαν ανά οπτικό πεδίο για κάθε κατηγορία ζώων \pm SEM (*DER vs CTR, § DER+DA vs DER, ♦ DER+SAL vs CTR, †DER+SAL vs DER+DA, $p < 0,05$.)*

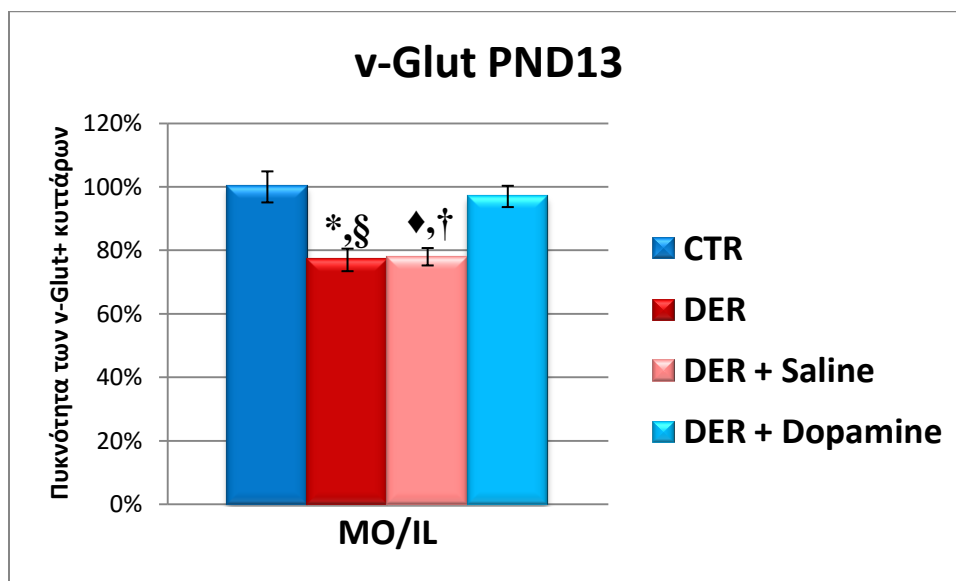
7.2.2 Ανοσοιστοχημεία v-GluT1

Η αποκατάσταση των επιπέδων των NeuN ανοσοθετικών κυττάρων στην περιοχή MO/IL μετά την έγχυση της ντοπαμίνης σε νεογνά, λειτούργησε ως κίνητρο για την ταυτοποίηση του φαινοτύπου των «ανεκτημένων» κυττάρων. Έτσι προσδιορίστηκε στην εν λόγω περιοχή, η πυκνότητα των γλουταματεργικών κυττάρων χρησιμοποιώντας ως δείκτη τον κυστιδιακό μεταφορέα του γλουταμινικού (v-GluT1) σε πειραματόζωα και των τεσσάρων πειραματικών συνθηκών (CTR, DER, DER-SAL, DER-DA) τόσο κατά την 13^η μεταγεννητική ημέρα (PND13) όσο και κατά την ενήλικη ζωή.

7.2.2α Νεογνά πειραματόζωα (PND13)

Η ανάλυση διακύμανσης μονής κατεύθυνσης με ανεξάρτητη μεταβλητή τις ομάδες των πειραματόζωων (CTR, DER, DER-SAL, DER-DA) και εξαρτημένη μεταβλητή τα επίπεδα των ανοσοθετικών κυττάρων για τον μεταφορέα του γλουταμινικού (v-GluT1) σε νεογνά επίμυες (PND13), στην περιοχή του έσω κορχομετωπιαίου/υπομεταιχμιακού φλοιού (MO/IL), έδειξε την

ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς ανάμεσα στις τέσσερις ομάδων πειραματόζωων ($F_{3,27}=12.847$, $p<0.001$). Με περαιτέρω Post-hoc ανάλυση επιβεβαιώθηκε ότι τα DER ζώα είχαν μειωμένο αριθμό v-GluT1 κυττάρων συγκριτικά με τα CTR (*DER vs. CTR $p<0.001$), ενώ ταυτόχρονα διαπιστώθηκε ότι η χορήγηση ντοπαμίνης αίρει αυτό το φαινόμενο (CTR vs. DER+DA $p=0,538$; §DER vs DER+DA $p<0,001$). Αντίθετα στα DER ζώα που χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός τα επίπεδα v-GluT1+ κυττάρων ήταν χαμηλότερα από τα φυσιολογικά, αντίστοιχα με αυτά των ζώων DER (♦CTRL vs DER+SAL $p<0.001$; †DER+DA vs DER+SAL $p<0,001$; DER vs DER+SAL $p=0.794$, **Γραφική παράσταση 7.7**).

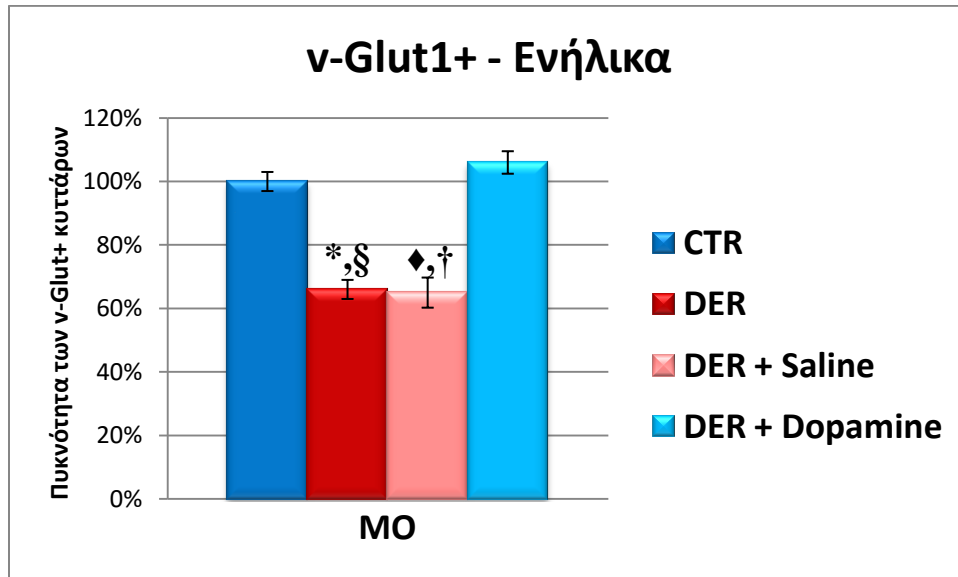


Γραφική παράσταση 7.7: Η επίδραση της έγχυσης ντοπαμίνης στα επίπεδα του δείκτη γλουταματεργικών κυττάρων (v-GluT1) στην περιοχή του έσω κορχομετωπιαίου/υπομεταιχμιακού φλοιού (MO/IL) σε νεογνά επίμυες (PND13) στις τέσσερις πειραματικές κατηγορίες (CTR, DER, DER-SAL, DER-DA). Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο του αριθμού των NeuN⁺ που μετρήθηκαν ανά οπτικό πεδίο για κάθε κατηγορία ζώων ±SEM (*DER vs CTR, § DER+DA vs DER, ♦ DER+SAL vs CTR, †DER+SAL vs DER+DA, $p<0,05$.)

7.2.2β Ενήλικα πειραματόζωα

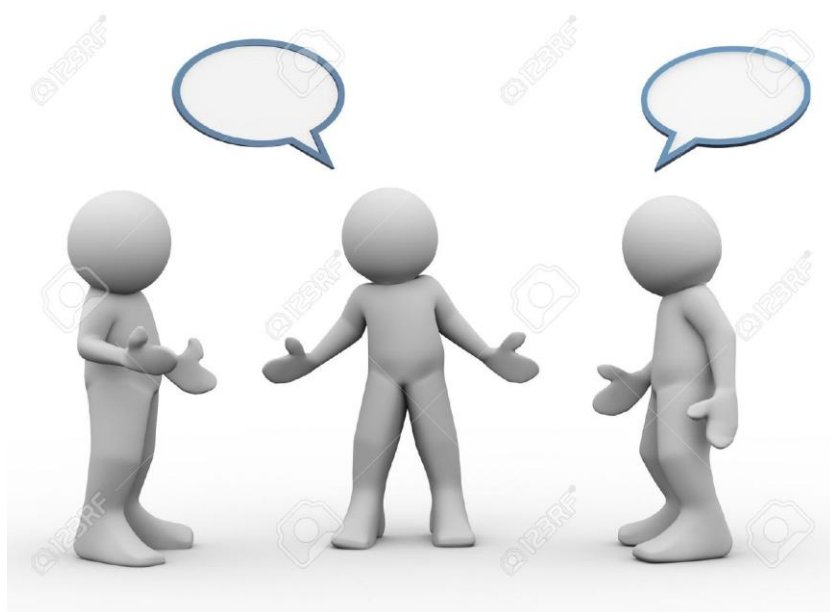
Η ανάλυση διακύμανσης μονής κατεύθυνσης με ανεξάρτητη μεταβλητή τις ομάδες των πειραματόζωων (CTR, DER, DER-SAL, DER-DA) και εξαρτημένη μεταβλητή τα επίπεδα των v-GluT1 ανοσοθετικών κυττάρων στην περιοχή MO/IL, έδειξε την ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς ανάμεσα στις τέσσερις ομάδων πειραματόζωων ($F_{3,23}=43,727$, $p<0.001$). Πιο συγκεκριμένα, με περαιτέρω Post-hoc ανάλυση, διαπιστώθηκε ότι τα DER είχαν

χαμηλότερα επίπεδα NeuN⁺ κυττάρων από τα CTR και τα DER+DA, τα DER+DA δεν διέφεραν από τα CTR ενώ τα DER+Sal δεν διέφεραν από τα DER (Post-hoc test, *CTR vs DER p<0,001; §DER vs DER+DA p<0.001, ♦DER+SAL vs. CTR P<0,001; †DER+SAL vs DER+DA p<0,001, **Γραφική παράσταση 7.8**).



Γραφική παράσταση 7.8: Η επίδραση της έγχυσης ντοπαμίνης στα επίπεδα του δείκτη γλουταματεργικών κυττάρων (v-GluT1) στην περιοχή του έσω κορχομετωπιαίου/υπομεταιχμιακού φλοιού (MO/IL) σε ενήλικες επίμνες στις τέσσερις πειραματικές κατηγορίες (CTR, DER, DER-SAL, DER-DA). Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο του αριθμού των NeuN⁺ που μετρήθηκαν ανά οπτικό πεδίο για κάθε κατηγορία ζώων ±SEM (*DER vs CTR, § DER+DA vs DER, ♦ DER+SAL vs CTR, †DER+SAL vs DER+DA, p<0,05 .)

ΣΥΖΗΤΗΣΗ



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

8.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ

Η έρευνα περί της σχέσης εγκεφάλου και στρες έχει δείξει μέσω πλήθους πειραματικών και κλινικών μελετών ότι οι πρώιμες εμπειρίες μπορούν να επηρεάσουν τον ενήλικο εγκεφαλο και τις λειτουργίες που αυτός ελέγχει (Glover, 1997). Με γνώμονα τη μελέτη των εμπειριών που μπορεί να βιώσει ένας επίμυς και πώς αυτές επιδρούν στη φυσιολογία του εγκεφάλου του, έχει χρησιμοποιηθεί μια σειρά μοντέλων ανάλογα με το ερώτημα που τίθεται στην εκάστοτε μελέτη. Τα χαρακτηριστικά της εμπειρίας της νεογνικής ματαίωσης, στην παρούσα εργασία, που περιλαμβάνει μητρική αποστέρηση για σύντομο χρονικό διάστημα, θυμίζουν τη μητρική παραμέληση στους ανθρώπους. Επιπλέον, ο φαινότυπος της συμπεριφοράς των ζώων που εκπαιδεύτηκαν με συνεχόμενη ματαίωση (DER) προσομοιάζει τη συμπεριφορά εφήβων και ενηλίκων ανθρώπων που έχουν υποστεί παραμέληση ως παιδιά. Για αυτό το λόγο η DER εμπειρία θα μπορούσε να είναι ένα βολικό ζωικό μοντέλο, για τη μελέτη των μακροπρόθεσμων επιπτώσεων των πρώιμων δυσμενών εμπειριών, όπως η παραμέληση (Stamatakis et al, 2013).

Ο προμετωπιαίος φλοιός είναι η περιοχή του εγκεφάλου που ωριμάζει τελευταία. Κατά τη διάρκεια της περιγεννητικής περιόδου αναπτύσσεται μέσω ποικίλων διαδικασιών όπως η νευρωνική ωρίμανση, οι αξονικές προεκβολές, η συναπτογέννεση, η δημιουργία νευρωνικών δικτύων και η μυελίνωση (Petit et al., 1988; Benes et al., 2000; Kolb et al., 2012). Είναι λογικό επομένως, οι νέοι εγκεφαλοι να είναι ευάλωτοι στις πρώιμες εμπειρίες, είτε πρόκειται για πειραματόζωα που υπόκεινται μητρικό αποχωρισμό (Bock et al., 2005; Helmeke et al., 2008; Baudin et al., 2012; Aksić et al. 2013; Chocyk et al., 2013; Li et al., 2013) είτε για πειραματόζωα που έχουν υποστεί κακοποίηση (Blaze and Roth, 2013; Ventura et al., 2013) ή γονεϊκή απομόνωση (Pascual et al. 2006; Bock et al. 2008; Krolow et al. 2012; Wall et al. 2012; Baarendse et al. 2013; Swerdlow et al., 2013) ή νεογνικό χειρισμό (Noschang et al., 2012) ή τέλος, προγεννητικό στρες (Green et al., 2011; Mychasiuk et al., 2012; Luoni et al., 2014).

Από την ανάλυση των δεδομένων που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη φαίνεται ότι στα πειραματόζωα που εκτέθηκαν σε ήπιο στρες (εκπαίδευση με συνεχόμενη ματαίωση – DER), επηρεάστηκε η δομή και η λειτουργία του προμετωπιαίου φλοιού τους. Ταυτόχρονα, στα πειραματόζωα που ως νεογνά εκτέθηκαν στην εκπαίδευση με συνεχόμενη ενίσχυση (RER) δεν

εντοπίστηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με τα ζώα ελέγχου (Control) σε καμία από τις υπό μελέτη παραμέτρους. Όπως έχει αποδειχθεί από προηγούμενα πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο Βιολογίας- Βιοχημείας του τμήματος Νοσηλευτικής, σε κυτταρικό επίπεδο, τα DER πειραματόζωα, είχαν μικρότερη νευρωνική και αξονική πυκνότητα στην περιοχή του έσω κογχομετωπιαίου φλοιού (MO). Παρόμοια ευρήματα μέσω πειραμάτων μητρικού αποχωρισμού (Aksic et al., 2013) ή προγεννητικού στρες (Mychasiuk et al., 2012) είχαν ήδη υποδηλώσει αντίστοιχα σχετικά μειωμένη νευρωνική πυκνότητα και μειωμένο απόλυτο αριθμό νευρώνων στην περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης φανερώνουν με σαφήνεια ότι ο DER χειρισμός επέδρασε στα γλουταματεργικά κύτταρα του προμετωπιαίου φλοιού και συγκεκριμένα υπήρχε μείωση στον αριθμό των κυττάρων αυτών. Η προκείμενη μείωση ενδέχεται να υποδηλώνει ότι η DER εμπειρία μπορεί να επηρεάσει την ισορροπία μεταξύ ανασταλτικών και διεγερτικών συνάψεων. Αξίζει να σημειωθεί ότι και ο μητρικός αποχωρισμός οδηγεί σε τέτοια ανισορροπία επηρεάζοντας όμως τον αριθμό των GABAεργικών κυττάρων, ενώ αφήνει άθικτο τον αριθμό των γλουταματεργικών σε αντίθεση με την DER εμπειρία (Helmeke et al., 2008; Aksic et al., 2013). Θα ήταν σημαντικό να αναφερθεί ότι οι συνιστώσες των νευρωνικών κυκλωμάτων επηρεάζονται διαφορετικά από τους διάφορους τύπους δυσμενών εμπειριών που δέχονται τα νεογνά. Ωστόσο, ο κοινός παρονομαστής είναι ότι οι δυσμενείς εμπειρίες στην πρώιμη ηλικία είναι δυνατόν να προκαλέσουν μία ανισορροπία μεταξύ διεγερτικής και ανασταλτικής νευροδιαβίβασης, η οποία πιθανόν αποτελεί τη βάση για μία ποικιλία ψυχοπαθολογικών νόσων. Μία τέτοια ανισορροπία μπορεί να αναπτυχθεί ως αποτέλεσμα είτε μειωμένης διεγερτικής (γλουταματεργική) νευροδιαβίβασης, όπως στην περίπτωση της σχιζοφρένειας και του αυτισμού (Kehrer et al., 2008; Garey, 2010; Laruelle, 2014; Tebartz van Elst et al., 2014), είτε αυξημένης λειτουργίας των GABA-εργικών νευρώνων όπως π.χ. στις διαταραχές της διάθεσης (Bielau et al., 2007).

Τα μειωμένα γλουταματεργικά κύτταρα εντοπίστηκαν τη 12^η μεταγεννητική ημέρα, όπως αντίστοιχα μειωμένα ήταν και στην ενήλικη ζωή. Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά τη 13^η μεταγεννητική ημέρα, δηλαδή την τελευταία ημέρα της πρώιμης εμπειρίας στο μοντέλο που χρησιμοποιήσαμε, η μείωση στους νευρώνες ήταν ιδιαίτερα εμφανής. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα θα μπορούσαν να στοχοποιήσουν τον νεογνικό χειρισμό της στρεσογόνου DER

εμπειρίας ως το λόγο της νευρωνικής μείωσης, η οποία ήταν παρούσα και σε ενήλικους εγκεφάλου.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αποτελέσματα που δείχνουν ότι η αντίστοιχη νευρωνική πτώση της 12^{ης} και 13^{ης} ημέρας συνοδεύεται με αύξηση στους νευροεκφυλιστικούς δείκτες όπως η μικρογλοία και η αστρογλοία. Βέβαια, οφείλει να τονιστεί ότι στους εγκεφάλους των ενήλικων DER πειραματόζωων δεν εντοπίστηκε κάποια αντίστοιχη αύξηση, γεγονός που υποδηλώνει την μετέπειτα εξισορρόπηση της κατάστασης. Η ενεργοποίηση των γλοιακών κυττάρων κατά τη νεογνική ηλικία θα μπορούσε να είναι η απάντηση στους «χαμένους» νευρώνες (Harry, 2013; Katsumoto et al., 2014). Γενικά, αποτελεί τεκμήριο πια ότι μια στρεσογόνος εμπειρία όπως το προγεννητικό στρες (Barros et al., 2006; Diz-Chaves et al., 2012; Ślusarczyk et al., 2015; Zhao et al., 2015) ή ο μητρικός αποχωρισμός (Llorente et al., 2009; Marco et al., 2013) συχνά οδηγεί σε αύξηση της μικρογλοίας και της αστρογλοίας. Αξίζει να σημειωθεί ότι αυξημένος αριθμός στην μικρογλοία έχει συσχετισθεί με ποικίλες ψυχοπαθολογίες στον άνθρωπο όπως σχιζοφρένεια, κατάθλιψη, αυτισμός (Réus et al., 2015). Στα ευρήματα της συγκεκριμένης εργασίας η παρατηρούμενη, κατά τη 12^η ημέρα, αύξηση στην μικρογλοία δεν ήταν εμφανής σε ενήλικους εγκεφάλους. Ωστόσο, αλλαγές στη δομή των νευρωνικών δικτύων κατά την μεταγεννητική περίοδο, όπως η πτώση στον αριθμό των νευρώνων, η οποία ήταν παρούσα κατά την ενήλικη ζωή, πιθανόν να υποδηλώνει κάποια δυσλειτουργία στην περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού.

Στους πιθανούς παράγοντες που θα μπορούσε να αποδοθεί η εν λόγω κυτταρική ανισορροπία είναι τα επίπεδα της κορτικοστερόνης τα οποία στην DER εμπειρία κυμαίνονται με αυξομειούμενο τρόπο, σε σχέση με τα φυσιολογικά επίπεδα, κατά την αναπτυξιακή περίοδο που μελετήσαμε. Πιο συγκεκριμένα, στα πειραματόζωα που έχουν υποστεί την DER εμπειρία τα επίπεδα της κορτικοστερόνης είναι αυξημένα τη 10^η μεταγεννητική ημέρα (PND10), ενώ την 11^η και 12^η ημέρα τα επίπεδα μειώνονται δραματικά (Diamantopoulou et al., 2013). Εν γένει, η μελέτη των επιπέδων κορτικοστερόνης θα ήταν ιδιαίτερα σημαντική για την κατανόηση της δομής και της λειτουργίας του εγκεφάλου καθώς, έχει δειχθεί, ότι η απόκλιση της από τα φυσιολογικά επίπεδα μπορεί να οδηγήσει σε νευρωνική απώλεια (Yu et al., 2008) και ενεργοποίηση της μικρογλοίας (Réus et al., 2015).

Εναλλακτικά, όπως θα συζητηθεί αναλυτικότερα παρακάτω, τόσο η μείωση στον αριθμό των γλουταματρεργικών νευρώνων όσο και η αύξηση στα επίπεδα της γλοίας, θα μπορούσαν να

συνδέονται με μία κοινή αιτία, δλδ. τη μείωση των επιπέδων ντοπαμίνης που παρατηρείται στον εγκέφαλο των DER νεογνών.

8.2 ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΝΤΟΠΑΜΙΝΗΣ

Ένα σημαντικό εύρημα του εργαστηρίου Βιολογίας - Βιοχημείας του τμήματος Νοσηλευτικής, είναι ότι οι επίμυς που εκπαιδεύτηκαν με συνεχόμενη ματαίωση, όπως αυτή έχει περιγραφεί προηγουμένως, έχουν μειωμένα επίπεδα ντοπαμίνης στον προμετωπιαίο φλοιό σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου (Raftogianni et al., 2014). Έχει ήδη αναφερθεί ότι η ντοπαμίνη είναι ο νευροδιαβιβαστής που κατεξοχήν ρυθμίζει τις λειτουργίες του προμετωπιαίου φλοιού (Everitt et al., 2008). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί με χρώση Golgi-Cox ότι η πυκνότητα των δεδριτικών ακάνθων, τα σημεία δηλαδή, όπου σχηματίζονται συνάψεις, είναι μειωμένη στον έσω κογχομετωπιαίο φλοιό των DER επίμυων (Stamatakis et al., 2015), υποδηλώνοντας μειωμένη νευρωνική επικοινωνία σε αυτήν τη περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού. Με αφορμή το μορφογενετικό ρόλο της ντοπαμίνης κατά την ανάπτυξη του εγκεφάλου διερευνήθηκε το αποτέλεσμα έγχυσης ντοπαμίνης στον προμετωπιαίο φλοιό DER πειραματόζωων 10^{ης} έως 13^{ης} μεταγεννητικής ημέρας και ο φαινότυπος που προκύπτει τόσο κατά τη νεογνική ηλικία όσο και κατά την ενήλικη ζωή.

Από την ανάλυση των δεδομένων που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη επιβεβαιώνεται αφενός ότι τα DER πειραματόζωα έχουν μειωμένη νευρωνική πυκνότητα σε σχέση με τα ζώα ελέγχου και αφετέρου ότι η χορήγηση ντοπαμίνης αίρει το φαινόμενο αυτό. Η έλλειψη των κυττάρων στον προμετωπιαίο φλοιό, και συγκεκριμένα στην περιοχή MO/IL, μπορεί να οφείλεται σε δυο πιθανές αιτίες είτε δεν υπήρχαν νευρικά κύτταρα από την αρχή, είτε υπήρχαν και οδηγήθηκαν σε απόπτωση. Από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για τον έλεγχο πιθανής απόπτωσης, και συγκεκριμένα με το Fluorojade B και το TUNEL, προκύπτει ότι δεν είναι αυξημένος ο κυτταρικός θάνατος. Πιθανολογείται επομένως, ότι η μείωση της πυκνότητας των νευρικών κυττάρων οφείλεται σε παρεμβάσεις στον κυτταρικό κύκλο των βλαστικών κυττάρων που δίνουν νευρώνες στον προμετωπιαίο φλοιό.

Η ντοπαμίνη είναι ένας από τους νευροδιαβιβαστές που μπορεί να επηρεάσει τον πολλαπλασιασμό των άωρων κυττάρων (LoTurco et al., 1995; Lavdas et al., 1997; Haydar et al.,

2000; Popovik & Haynes, 2000; Demarque et al., 2002; Luk et al., 2003]. Η ντοπαμίνη είναι παρούσα στον εγκέφαλο από τις αρχές της εμβρυϊκής ζωής αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα η ντοπαμίνη να επηρεάζει την ανάπτυξη του εγκεφάλου (Jung & Bennett, 1996; Diaz et al., 1997; Shearman et al., 1997; Ohtani et al., 2003) και μάλιστα αναφορές μαρτυρούν τον εντοπισμό της ακόμα και πριν την συναπτογένεση προσδίδοντας στην ντοπαμίνη έναν ακόμα ρόλο, καθοριστικό στην ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των νευρώνων (Lauder, 1988, 1993; Levitt et al., 1997; Nguyen et al., 2001). Επιπλέον, πειράματα έχουν αποδείξει ότι μείωση της *in vivo* ντοπαμίνης οδηγεί σε μείωση του πολλαπλασιασμού των πρόδρομων κυττάρων στην υποκοιλιακή ζώνη καθώς μειώνεται η παραγωγή του αυξητικού παράγοντα EGF (O’Keeffe et al., 2009). Το φαινόμενο αντίστοιχα αναστράφηκε όταν χορηγήθηκε το πρόδρομο μόριο της ντοπαμίνης, η L-DOPA. Υποδηλώνεται επομένως, ότι η διέγερση της ντοπαμίνης ρυθμίζει κυτταρικές λειτουργίες όπως τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (O’Keeffe et al., 2009). Περιληπτικά, έχει φανεί ότι η ντοπαμίνη διεγείρει την απελευθέρωση του αυξητικού παράγοντα EGF μέσω του μονοπατιού της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC). Ο απελευθερωμένος EGF προσδένεται στον υποδοχέα του, ο οποίος με τη σειρά του ενεργοποιεί πολλαπλές ενδοκυτταρικές αποκρίσεις για την επιλεκτική αύξηση των βλαστικών κυττάρων (O’Keeffe et al., 2009).

Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας ανέδειξαν μειωμένη διαθεσιμότητα ντοπαμίνης λόγω αυξημένου μεταβολισμού της (Κόλλια, 2007; Raftogianni., 2014) στην περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού σε εγκεφάλους DER επίμυων. Τα ευρήματα αυτά σε συνδυασμό, με τον γνωστό πλέον ρόλο της ντοπαμίνης ως ρυθμιστή του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των νευρικών κυττάρων, θα μπορούσαν να εξηγούν τη μείωση της νευρωνικής πυκνότητας που παρατηρείται στην εν λόγω περιοχή, από την 12^η μεταγεννητική ημέρα και παραμένει μέχρι την ενήλικη ζωή, στους εγκεφάλους των DER επίμυων. Από την άλλη μεριά, μετά την έγχυση ντοπαμίνης παρατηρείται αύξηση των νευρωνικών κυττάρων τόσο στα DER νεογνά (PND13) όσο και στα ενήλικα πειραματόζωα. Μάλιστα, η αύξηση αυτή ανέρχεται σε επίπεδα όμοια με εκείνα των ζώων ελέγχου. Ομοίως με την μείωση της νευρωνικής πυκνότητας έτσι και η αύξηση της, θα μπορούσε να αποδίδεται στην δράση της ντοπαμίνης ως ρυθμιστής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στον εγκέφαλο. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αποτελούν ισχυρή ένδειξη για τον αναπτυξιακό ρόλο της

ντοπαμίνης, εφόσον η έλλειψη της, λόγω της DER εμπειρίας, οδηγεί σε μείωση της νευρωνικής πυκνότητας, ενώ η εξωγενής έγχυση της είναι ικανή να αντιστρέψει τη νευρωνική μείωση.

8.3 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΝΕΥΡΟΓΛΟΙΑ ΚΑΙ ΕΛΛΕΙΨΗ ΝΤΟΠΑΜΙΝΗΣ

Ένα ακόμα αξιοσημείωτο εύρημα που ανέδειξαν τα πειράματα της παρούσας μελέτης αποτελεί η ενεργοποιημένη αστρογλοία και μικρογλοία που παρατηρήθηκαν στον προμετωπιαίο φλοιό των DER νεογνών. Τα νευρογλοιακά κύτταρα, όρος που περιγράφει τα αστρογλοιακά και μικρογλοιακά κύτταρα, είναι απαραίτητα για την διατήρηση της ομοιόστασης του εγκεφάλου. Τα ενεργοποιημένα νευρογλοιακά κύτταρα συμμετέχουν στην ανοσολογική απορρύθμιση και τις εκτεταμένες φλεγμονές που παρατηρούνται τόσο στους γερασμένους εγκεφάλους όσο και σε εγκεφάλους που πάσχουν από άλλες νευροεκφυλιστικές διαταραχές.

Τα μικρογλοιακά κύτταρα προσελκύονται και συσσωρεύονται στην περιοχή της φλεγμονής διαδραματίζοντας καθοριστικό ρόλο στην φαγοκυττάρωση του κατεστραμμένου νευρικού ιστού και τον καθαρισμό των κυτταρικών θραυσμάτων. Στη μικρογλοιακή ενεργοποίηση εμπλέκονται μόρια του ανοσοποιητικού όπως το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας II (MHC II) (Morigoka et al., 1993). Επίσης, τα μικρογλοιακά κύτταρα εκφράζουν υποδοχείς για χημειοκίνες και κυτταροκίνες αλλά και για νευροδιαβιβαστές όπως το GABA (Kuhn et al., 2004.) και το γλουταμινικό (Noda et al., 2000). Είναι αξιοσημείωτο δε, ότι τα κύτταρα αυτά εκφράζουν και ντοπαμινεργικούς υποδοχείς οι οποίοι μάλιστα ρυθμίζουν τις ανοσολογικές ιδιότητες των μικρογλοιακών κυττάρων (Farber et al., 2005). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι όλοι οι νευροδιαβιβαστές που εξετάστηκαν, συμπεριλαμβανομένης και της ντοπαμίνης, εκτός του γλουταμινικού, μειώνουν τα επίπεδα ενεργοποίησης της μικρογλοίας. Έτσι, θα μπορούσε κανείς να υποθέσει ότι η μικρογλοία διατηρείται ανενεργή λόγω της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών από τα νευρικά κύτταρα.

Τα αστροκύτταρα με τη σειρά τους, είναι δυναμικά στοιχεία του εγκεφάλου που παρέχουν μηχανική υποστήριξη στις συνάψεις, και ρυθμίζουν τη σύσταση τόσο του προσυναπτικού όσο και του μετασυναπτικού νευρώνα σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις, οδηγώντας στην ιδέα της τριμερούς σύναψης (Araque, 1999). Έτσι λοιπόν, τα αστροκύτταρα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της συναπτικής διαβίβασης και πλαστικότητας (Haber et al, 2006). Τα αστροκύτταρα ενεργοποιούνται όταν το γλουταμικό ή το

GABA προσδεθούν στους αντίστοιχους υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων αυτών, δημιουργώντας ροές ιόντων ασβεστίου που εξαπλώνονται εντός του πληθυσμού της αστρογλοίας. Υπάρχουν ευρήματα που δείχνουν ότι η μειωμένη λειτουργία των ντοπαμινεργικών συνάψεων οδηγεί σε δομική και λειτουργική αναδιαμόρφωση των αστροκυττάρων άρα και μεταβολές στην ενεργοποίησή τους. Πιο συγκεκριμένα, σε περίπτωση αλλοίωσης των ντοπαμινεργικών νευρώνων έχει φανεί ότι υπάρχει μια σημαντική αναδιάταξη των αστροκυττάρων που βρίσκονται στις γλουταματεργικές συνάψεις. Παράλληλα, όταν εμποδίζεται η απελευθέρωση της ντοπαμίνης, ενισχύεται αυτόματα η ενεργότητα του ασβεστίου και κατ' επέκταση η ενεργοποίηση των αστροκυττάρων (Bosson et al., 2014)

Συμπερασματικά λοιπόν, δεδομένου ότι η μειωμένη νευρωνική πυκνότητα, όπως έχει ήδη ειπωθεί, οφείλεται πιθανόν σε παρέμβαση στον κυτταρικό κύκλο και όχι σε αποπτωτικές διεργασίες, η μικρογλοία δεν μπορεί να διεγείρεται από αυξημένο κυτταρικό θάνατο. Σε συνδυασμό λοιπόν με τα παραπάνω, η ενεργοποίηση της μικρογλοίας αλλά και της αστρογλοίας θα μπορούσε να προκαλείται άμεσα από τα μειωμένα επίπεδα της ντοπαμίνης στον προμετωπιαίο φλοιό καθώς φαίνεται ότι η απουσία ντοπαμίνης μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση και των δύο αυτών κατηγοριών γλοιακών κυττάρων.

Σε μια δεύτερη σκέψη, θα μπορούσε να επέρχεται και έμμεση ενεργοποίηση των νευρογλοιακών κυττάρων λόγω της υποστροφής των νευρικών απολήξεων, οι οποίες δεν βρήκαν στόχους για να κάνουν συνάψεις. Με άλλα λόγια, πιθανολογείται ότι αφού δεν γεννιούνται νευρικά κύτταρα, οι εισερχόμενες στον προμετωπιαίο φλοιό προβολές δεν βρίσκουν στόχους για να κάνουν συνάψεις επομένως υποστρέφουν ενώ παράλληλα η γλοία ενεργοποιείται για να τις φαγοκυτταρώσει. Γενικότερα, για να επιτευχθεί ένα λειτουργικό και ώριμο νευρωνικό κύκλωμα, το νευρικό σύστημα αναδιαμορφώνεται εκτενώς (Chung, 2013). Αυτές οι διαδικασίες αναδιαμόρφωσης περιλαμβάνουν την απομάκρυνση της περίσσειας των αξόνων, τους δενδρίτες, τις συνάψεις και τα υπολείμματα τους (Barres, 2012).

8.4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, η πρώιμη DER εμπειρία, οδηγεί μέσω της μείωσης της ντοπαμίνης, σε μείωση της πυκνότητας των γλουταματεργικών νευρώνων στην περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού στους εγκεφάλους των DER επίμυων. Η μείωση αυτή

εντοπίζεται κατά την 12^η μεταγεννητική ημέρα και είναι εμφανής και στην ενήλικη ζωή. Τα ευρήματα αυτά, υποδηλώνουν μια σχετική υπολειτουργία του προμετωπιαίου φλοιού που έχει αντίκτυπο και σε συμπεριφορικό επίπεδο (Diamantopoulou et al., 2011, 2012, 2013a & 2013b). Επιπλέον, μετά την έγχυση εξωγενούς ντοπαμίνης παρατηρείται αύξηση της νευρωνικής πυκνότητας στον προμετωπιαίο φλοιό τόσο των νεογνών όσο και των ενήλικων DER επίμυων. Φαίνεται λοιπόν, ότι μια ήπια στρεσογόνος εμπειρία κατά τα αρχικά στάδια της ζωής, όπως αυτή στην οποία εκτίθενται τα DER πειραματόζωα, μπορεί να επιδράσει στην αρχιτεκτονική και τη νευροχημεία του έσω κορχομετωπιαίου φλοιού και πιθανόν πιο συγκεκριμένα στη ντοπαμινεργική εννεύρωση του (Raftogianni et al., 2014). Από την άλλη μεριά, η αλλαγή αυτή μπορεί να αντιστραφεί με την έγχυση του αρχικού παράγοντα που την προκάλεσε. Με βάση αποτελέσματα κλινικών, νευροψυχολογικών και νευροαπεικονιστικών μελετών έχει προταθεί ότι στη σχιζοφρένεια υπάρχει υπολειτουργία του προμετωπιαίου φλοιού (“hypofrontality”) και διαταραχή της φυσιολογικής λειτουργίας τους μεσοφλοιώδους ντοπαμινεργικού συστήματος (Pae et al., 2004) που σχετίζονται με αρνητικά συμπτώματα της νόσου. Επίσης, μελέτες που αφορούν στο Σύνδρομο Ελλειμματικής Προσοχής και Υπερκινητικότητας - ADHD υποστηρίζουν ότι τόσο ο προμετωπιαίος φλοιός όσο και άλλες εγκεφαλικές περιοχές όπως το ραβδωτό εμπλέκονται σε μια σειρά νευρωνικών λειτουργιών που σχετίζονται με το παραπάνω σύνδρομο (Sullivan & Brake, 2003).

Η σημαντικότητα του ευρήματος αυτού έγκειται στην υπόθεση ότι τα αποτελέσματα μιας αρνητικά φορτισμένης πρώιμης εμπειρίας θα μπορούσαν να αντιστραφούν χάρη στην πλαστικότητα των νευρώνων, βιώνοντας μια θετική εμπειρία. Η μελέτη τέτοιων μοντέλων πρώιμων εμπειριών είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς αποτελεί εργαλείο για την κατανόηση του τρόπου με τον οποίο σχετίζεται το περιβάλλον με την ανάπτυξη του εγκεφάλου σε διάφορα στάδια της ζωής των οργανισμών και ένα μέσο που μπορεί να βοηθήσει στην εξέταση αναλογιών και αντιστοιχιών με τον ανθρώπινο εγκέφαλο, συμβάλλοντας έτσι στην εύρεση απαντήσεων που αφορούν τις αιτίες ψυχοπαθολογικών διαταραχών αλλά και πιθανούς τρόπους θεραπείας αυτών στο μέλλον.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ



Κεφάλαιο 9: Βιβλιογραφία

9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abe M, Hanakawa T. Functional coupling underlying motor and cognitive functions of the dorsal premotor cortex. *Behav Brain Res* 2009;198:13–23.
- Aisa, B., Elizalde, N., Tordera, R., Lasheras, B., Ríó, J. D., & Ramírez, M. J. (2009a). Effects of neonatal stress on markers of synaptic plasticity in the hippocampus: Implications for spatial memory. *Hippocampus*, 19, 1222–1231.
- Aisa, B., Gil-Bea, F. J., Marcos, B., Tordera, R., Lasheras, B., Del Ríó, J., & Ramírez, M. J. (2009b). Neonatal stress affects vulnerability of cholinergic neurons and cognition in the rat: Involvement of the HPA axis. *Psychoneuroendocrinology*, 34, 1495-1505.
- Aisa, B., Tordera, R., Lasheras, B., Del Rio, J., & Ramirez, M. J. (2008). Effects of maternal separation on hypothalamic-pituitary-adrenal responses, cognition and vulnerability to stress in adult female rats. *Neuroscience*, 154, 1218-1226.
- Aisa, B., Tordera, R., Lasheras, B., Del Ríó, J., & Ramírez, M. J. (2007). Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 32(3), 256-266.
- Akil, M., Pierri, J.N., Whitehead, R.E., Edgar, C.L., Mohila, C., Sampson, A.R., et al. (1999). Lamina-specific alterations in the dopamine innervations of the prefrontal cortex in schizophrenic subjects. *Am.J.Psychiatry* 156, 1580–1589.
- Aksić Milan, Nevena V. Radonjić, Dubravka Aleksić, Gordana Jevtić, Branka Marković, Nataša Petronijević, Vidosava Radonjić, and Branislav Filipović “Long-term effects of the maternal deprivation on the volume and number of neurons in the rat neocortex and hippocampus”, *Acta Neurobiol Exp* 2013, 73: 394–403
- Alonso SJ, Navarro E, Rodriguez M (1994) Permanent dopaminergic alterations in the nucleus accumbens after prenatal stress. *Pharmacol Biochem Behav* 49:353–358
- Anden NE, Carlsson A, Dahlstroem A, Fuxe K, Hillarp NA, and Larsson K (1964) Demonstration and mapping out of nigro-neostriatal dopamine neurons. *Life Sci* 3:523–530.

Andersen, S.L., and Teicher, M.H. (2009). Desperately driven and no brakes: developmental stress exposure and subsequent risk for substance abuse. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 33, 516–524. doi:10.1016/j.neubiorev.2008.09.009

Andersen, S.L., Thompson, A.T., Rutstein, M., Hostetter, J.C., and Teicher, M. H. (2000). Dopamine receptor pruning in prefrontal cortex during the periadolescent period in rats. *Synapse* 37, 167–169.

Antonopoulos, J., Dori, I., Dinopoulos, A., Chiotelli, M., & Parnavelas, J. G. (2002). Postnatal development of the dopaminergic system of the striatum in the rat. *Neuroscience*, 110, 245–256

Araki, K.Y., Sims, J.R., and Bhidre, P.G. (2007). Dopamine receptor mRNA and protein expression in the mouse corpus striatum and cerebral cortex during pre- and postnatal development. *Brain Res.* 1156, 31–45. doi:10.1016/j.brainres.2007.04.043

Arborelius, L., Eklund, M.B. (2007) “Both long and brief maternal separation produces persistent changes in tissue levels of brain monoamines in middle-aged female rats” *Neuroscience*, 145 (2): 738-750

Arnsten, A.F. (2006). Fundamentals of attention - deficit/ hyperactivity disorder: circuits and pathways. *J. Clin. Psychiatry* 67(Suppl.8), 7–12.

Arnsten, A.F. (2011). Prefrontal cortical network connections: key site of vulnerability in stress and schizophrenia. *Int. J. Dev. Neurosci.* 29, 215–223. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2011.02.006

Arnsten, A.F., Wang, M.J., and Paspalas, C.D. (2012). Neuromodulation of thought: flexibilities and vulnerabilities in prefrontal cortical network synapses. *Neuron* 76, 223–239. doi:10.1016/j.neuron.2012.08.038

Bagot RC., Meaney MJ., Epigenetics and the biological basis of gene x environment interactions. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2010 Aug;49(8):752-71. doi: 10.1016/j.jaac.2010.06.001.

Bally-Cuif, L., & Hammerschmidt, M. (2003). Induction and patterning of neuronal development, and its connection to cell cycle control. *Current Opinion in Neurobiology*, 13, 16-25.

Barros MH, Myers AM, Van Driesche S, Tzagoloff A, COX24 codes for a mitochondrial protein required for processing of the COX1 transcript. *J Biol Chem* 281(6):3743-51

Bayer SA, Wills KV, Triarhou LC, Ghetti B (1995) Time of neuron origin and gradients of neurogenesis in midbrain dopaminergic neurons in the mouse. *Exp Brain Res* 105:191–199

Beaulieu JM, Gainetdinov RR. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev.* 2011 Mar;63(1):182-217. doi: 10.1124/pr.110.002642. Epub 2011 Feb 8.

Bechara A, Damasio AR, Damasio H, Anderson SW. Insensitivity to future consequences following damage to human prefrontal cortex. *Cognition* 1994;50:7–15.

Bechara A. Decision making, impulse control and loss of willpower to resist drugs: a neurocognitive perspective. *Nat Neurosci* 2005;8:1458–63.

Beery, A. K., & Francis, D. D. (2011). Adaptive significance of natural variations in maternal care in rats: A translational perspective. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 35, 1552–1561.

Benes FM, Taylor JB, Cunningham MC (2000) Convergence and plasticity of monoaminergic systems in the medial prefrontal cortex during the postnatal period: implications for the development of psychopathology. *Cereb Cortex* 10:1014–1027

Berlin HA, Rolls ET, Kischka U. Impulsivity, time perception, emotion and reinforcement sensitivity in patients with orbitofrontal cortex lesions. *Brain* 2004;127:1108–26.

Berne M. R. and Levy N. M., *Αρχές Φυσιολογίας*, 4^η εκδ., Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 2007, pp 53-109.

Björklund A, Dunnett SB (2007) Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci* 30:194-202.

Bock, G.-W., Zmud, R. W., Kim, Y.-G., & Lee, J.-N. (2005). Behavioral intention formation in knowledge sharing: Examining the roles of extrinsic motivators, social-psychological forces, and organizational climate. *MIS Quarterly*, 29(1), 87-111.

Boksa P, El-Khodor BF (2003) Birth insult interacts with stress at adulthood to alter dopaminergic function in animal models: possible implications for schizophrenia and other disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 27:91–101

Brake WG, Noel MB, Boksa P, Gratton A (1997) Influence of perinatal factors on the nucleus accumbens dopamine response to repeated stress during adulthood: an electrochemical study in the rat. *Neuroscience* 77:1067–1076

Brake WG, Sullivan RM, Gratton A (2000) Perinatal distress leads to lateralized medial prefrontal cortical dopamine hypofunction in adult rats. *J Neurosci* 20:5538–5543

Brake WG, Zhang TY, Diorio J, Meaney MJ, Gratton A (2004) Influence of early postnatal rearing conditions on mesocorticolimbic dopamine and behavioural responses to psychostimulants and stressors in adult rats. *Eur J Neurosci* 19:1863–1874

Brenhouse, H.C., Sonntag, K.C., and Andersen, S.L. (2008). Transient D1 dopamine receptor expression on prefrontal cortex projection neurons: relationship to enhanced motivational salience of drug cues in adolescence. *J. Neurosci.* 28, 2375–2382. doi:10.1523/jneurosci.5064-07.2008

Buchanan SL, Thompson RH, Maxwell BL, Powell DA. Efferent connections of the medial PFC. *Exp Brain Res.* 1994;100:469–83

Burton, C. L., Chatterjee, D., Chatterjee-Chakraborty, M., Lovic, V., Grella, S., L., Steiner, M., & Fleming, A. S. (2007). Prenatal restraint stress and motherless rearing disrupts expression of plasticity markers and stress-induced corticosterone release in adult female Sprague-Dawley rats. *Brain Research*, 1158, 28-38.

Butter CM (1969): Perseveration in extinction and in discrimination reversal tasks following selective frontal ablations in *Macaca mulatta*. *Physiol Behav* 4:163–171

Caldji, C., Tannenbaum, B., Sharma, S., Francis, D., Plotsky, P.M., Meaney, M.J., (1998). “Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat.” *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95: 5335–5340.

Callaghan B. L., & Richardson, R. (2013). Early experiences and the development of emotional learning systems in rats. *Biology of Mood & Anxiety Disorders*, 3, 8. eCollection 2013.

Carlsson A, Lindqvist M, and Magnusson T (1957) 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature* 180:1200.

Carmichael ST, Price JL. Limbic connections of the orbital and medial prefrontal cortex in macaque monkeys. *J Comp Neurol* 1995a;363:615–41.

- Carmichael ST, Price JL. Sensory and premotor connections of the orbital and medial prefrontal cortex of macaque monkeys. *J Comp Neurol* 1995b;363:642–64.
- Case R. The role of frontal lobes in the regulation of cognitive development. *Brain Cog.* 1992;20:51–73.
- Caspi A, McClay J, Moffitt TE, Mill J, Martin J, Craig IW, Taylor A, Poulton R (2002) Role of genotype in the cycle of violence in maltreated children. *Science* 297:851–854
- Cavedini P, Riboldi G, D’Annunzi A, Belotti P, Cisima M, Bellodi L. 2002. Decision-making heterogeneity in obsessive-compulsive disorder: ventromedial prefrontal cortex function predicts different treatment outcomes. *Neuropsychologia*. 40(2):205--211.
- Chamberlain SR, Menzies L, Hampshire A, Suckling J, Fineberg NA, del Campo N, Aitken M, Craig K, Owen AM, Bullmore ET, et al. 2008. Orbitofrontal dysfunction in patients with obsessive-compulsive disorder and their unaffected relatives. *Science*. 321(5887):421—422
- Champagne, F. A. (2010). Epigenetic influence of social experiences across lifespan. *Developmental Psychobiology*, 52, 299-311.
- Champagne, F. A., & Curley, J. P. (2009). Epigenetic mechanisms mediating the long-term effects of maternal care on development. *Neuroscience and Neurobehavioral Reviews*, 33(4), 593-600.
- Champagne, F.A., Curley, J.P. (2005) “How social experiences influence the brain” *Current Opinion in Neurobiology*, 15:704–709
- Chen J. S., & Amsel, A. (1980). Retention under changed reward conditions of persistence learned by infant rats. *Developmental Psychobiology*, 13, 468–480
- Chesselet, M. F., Plotkin, J. L., Wu, N., & Levine, M. S. (2007). Development of striatal fast-spiking GABAergic interneurons. *Progress in Brain Research*, 160, 261–272.
- Chocyk Agnieszka, Iwona Majcher-Macelanka, Dorota Dudys, Aleksandra Przyborowska, Krzysztof Wêdzony “Impact of early-life stress on the medial prefrontal cortex functions – a search for the pathomechanisms of anxiety and mood disorders” *Pharmacological Reports* 2013, 65, 1462-1470

Choy, K. H., de Visser, Y., Nichols, N. R., & van den Buuse, M. (2008). Combined neonatal stress and young-adult glucocorticoid stimulation in rats reduce BDNF expression in hippocampus: Effects on learning and memory. *Hippocampus*, 18(7), 6555-667.

Civelli O1, Bunzow JR, Grandy DK, Zhou QY, Van Tol HH. Molecular biology of the dopamine receptors. *Eur J Pharmacol*. 1991 Aug 14;207(4):277-86.

Conely L., & Bell, R. W. (1978). Neonatal ultrasounds elicited by odor cues. *Developmental Psychobiology*, 11, 193–197

Cousins, D. A., Butts, K., & Young, A. H. (2009). The role of dopamine in bipolar disorder. *Bipolar disorders*, 11(8), 787-806.

Cummings JL. Frontal sub-cortical circuits and human behaviour. *Arch Neurol*. 1993;50:873–80

D'Amato F. R., & Cabib, S. (1987). Chronic exposure to a novel odor increases pups' vocalizations, maternal care, and alters dopaminergic functioning in developing mice. *Behavioral Neural Biology*, 48, 197–205

D'Haenen H,A., and Bossuyt,A.(1994).Dopamine D2 receptors in depression measured with single photon emission computed tomography. *Biol. Psychiatry* 35, 128–132.doi:10.1016/0006-3223(94)91202-5

Dahlstroem A and Fuxe K (1964) Evidence for the existence of monoaminecontaining neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand* 232 (Suppl): 231–255.

Damasio, A. R. (1994). *Descartes's error*. New York: Harper & Collins.

Danese, A., & McEwen, B. S. (2012). Adverse childhood experiences, allostasis, allostatic load, and age-related disease. *Physiology & Behavior*, 106(1), 29-39.

De Bellis, M. D. (2001). Developmental traumatology: the psychobiological development of maltreated children and its implications for research, treatment, and policy. *Dev Psychopathol* 13 (3): 539-64

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

Diamantopoulou, A., Raftogianni, A., Stamatakis, A., Tzanoul inou, S., Oitzl, M.S., & Stylianopoulou, F. (2013). Denial or receipt of expected reward through maternal contact during

the neonatal period differentially affect the development of the rat amygdala and program its function in adulthood in a sex-dimorphic way. *Psychoneuroendocrinology*, 38, 1757–1771a

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

Dias R, Robbins TW, Roberts AC (1996) Dissociation in prefrontal cortex of affective and attentional shifts. *Nature* 380:69–72.

Drury SS, Theall KP, Smyke AT, Keats BJ, Egger HL, Nelson CA, Fox NA, Marshall PJ, Zeanah CH (2010) Modification of depression by COMT val158met polymorphism in children exposed to early severe psychosocial deprivation. *Child Abuse Negl* 34:387–395

Dumas, T. C. (2005). Late postnatal maturation of excitatory synaptic transmission permits adult-like expression of hippocampal-dependent behaviors. *Hippocampus*, 15, 562–578

Duncan J & Owen AM (2000). Common regions of the human frontal recruited by diverse cognitive demands. *Trends Neurosci* 23, 475-483.

Egan, M.F., Goldberg, T.E., Kolachana, B.S., Callicott, J. H., Mazzanti, C. M., Straub, R. E., Goldman, D. and Weinberger, D. R. (2001) “Effect of COMT Val108/158 Met genotype on frontal lobe function and risk for schizophrenia” *PNAS*, 98 (120):6917–6922

Elston GN, Oga T, Fujita I. Spinogenesis and pruning scales across functional hierarchies. *J Neurosci*. 2009;29:3271–3275

Enthoven, L., de Kloet, E. R., & Oitzl, M. S. (2008a). Differential development of stress system (re)activity at weaning dependent on time of disruption of maternal care. *Brain Research*, 1217, 62-69.

Enthoven, L., de Kloet, E. R., & Oitzl, M. S. (2008b). Effects of maternal deprivation of CD1 mice on performance in the water maze and swim test. *Behavioral Brain Research*, 187, 195-199.

Enthoven, L., Oitzl, M. S., Koning, N., van der Mark, M., & de Kloet, E. R. (2008c). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity of newborn mice rapidly desensitizes to repeated maternal absence but becomes highly responsive to novelty. *Endocrinology*, 149(12), 6366-6377.

Faturi, C. B., Tiba, P. A., Kawakami, S. E., Catallani, B., Kerstens, M., & Suchecki, D. (2010). Disruptions of the mother-infant relationship and stress-related behaviours: Altered corticosterone secretion does not explain everything. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 34(6), 821–834.

Feierstein, C. E., Quirk, M. C., Uchida, N., Sosulski, D. L., & Mainen, Z. F. (2006). Representation of spatial goals in rat orbitofrontal cortex. *Neuron*, 51, 495–507

Fellows LK, Farah MJ. 2003. Ventromedial frontal cortex mediates affective shifting in humans: evidence from a reversal learning paradigm. *Brain*. 126(Pt 8):1830--1837.

Fish E.W., Shahrokh D., Bagot R., Caldji C., Bredy T., Szyf M., Meaney M.J. (2004) “Epigenetic Programming of Stress Responses through Variations in Maternal Care” *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1036: 167–180

Francis, D., Diorio, J., Liu, D., Meaney, M.J., (1999). “ Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat.” *Science*, 286: 1155–1158.

Franklin, T. B., Russig, H., Weiss, I. C., Gräff, J., Linder, N., Michalon, A., Vizi, S., & Mansuy, I. M. (2010). Epigenetic transmission of the impact of early stress across generations. *Biological Psychiatry*, 68, 408-415.

Freeman, A.S., Meltzer, L.T., Bunney, B.S., 1985, Firing properties of substantia nigra dopaminergic neurons in freely moving rats. *Life sci*, 36, 1983-1994

Fride E, Weinstock M (1988) Prenatal stress increases anxiety related behavior and alters cerebral lateralization of dopamine activity. *Life Sci* 42:1059–1065

Fuster JM 1989. The prefrontal cortex. Anatomy, physiology, and neuropsychology of the frontal lobe. New York: Raven Press.

Fuster JM. Frontal lobe syndrome. In: Fogel BS, Scheffer RB, Rao SM, editors. *Neuropsychiatry*. London: Williams and Wilkins; 1996. pp. 407–13.

Fuster JM. *The PFC: Anatomy, physiology and neuropsychology of the frontal lobe*. New York: Lippincott-Raven; 1997.

Gainetdinov RR, Caron MG (2003) Monoamine transporters: from genes to behavior. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43:261-284.

Gardner, K. L., Thirivikraman, K. V., Lightman, S. L., Plotsky, P. M., & Lowry, C. A. (2005). Early life experience alters behavior during social defeat: Focus on serotonergic systems. *Neuroscience*, 136, 181-191

Gilmer, W. S., McKinney W. T. (2003) "Early experience and depressive disorders: human and non-human primate studies" *Journal of Affective Disorders*, 75: 97–113

Giros B, Caron MG (1993) Molecular characterization of the dopamine transporter. *Trends Pharmacol Sci* 14:43-49.

Goel V, Dolan RJ. Explaining modulation of reasoning by belief. *Cognition*. 2003 Feb;87(1):B11-22.

Gogtay N, Giedd J, Lusk L, Hayashi K, Greenstein D, Vaituzis A et al (2004): Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:8174–8179

Gogtay N, Thompson PM (2010):Mapping gray matter development: implications for typical development and vulnerability to psychopathology. *Brain Cogn* 72:6–15

Goldberg, T. E., Egan, M. F., Gscheidle, T., Coppola, R., Weickert, T., Kolachana, B. S., Goldman, D., Weinberger, D. R. (2003) "Executive Subprocesses in Working Memory Relationship to Catechol- O-methyltransferase Val158Met Genotype and Schizophrenia" *Arch Gen Psychiatry*, 60:889-896

Gorno-Tempini ML, Rankin KP, Woolley JD, Rosen HJ, Phengrasamy L, Miller BL. Cognitive and behavioral profile in a case of right anterior temporal lobe neurodegeneration. *Cortex* 2004;40:631–44. a journal devoted to the study of the nervous system and behaviour

Goto Y, Otani S, Grace AA (2007) The Yin and Yang of dopamine release: a new perspective. *Neuropharmacology* 53:583-587.

Grace, A. A, and Bunney, B. S., 1983, Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons . III. Evidence for electrotonic coupling. *Neuroscience*, 10, 333-348.

Grace, A.A. Floresco, S.B., Yukiori Goto and Lodge D.J., 2007, Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. *Trends in Neurosciences*, 30, 220-227.

Groenewegen, H. J., & Uylings, H. B. M. (2000). The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. In H. B. M. Uylings, C. G. van Eden, J. P. C. de Bruin, M. P. G. Feenstra, & C. M. A. Pennartz (Eds.). *Cognition, emotion, and autonomic responses: The integrative role of the prefrontal cortex and limbic structures*. Progress in Brain Research (Vol. 127). Amsterdam: Elsevier

Hall FS, Wilkinson LS, Humby T, Robbins TW (1999) Maternal deprivation of neonatal rats produces enduring changes in dopamine function. *Synapse* 32:37–43

Heidbreder, C. A., & Groenewegen, H. J. (2003). The medial prefrontal cortex in the rat: Evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27, 555–579.

Heim C, Shugart M, Craighead WE, Nemeroff CB (2010) Neurobiological and psychiatric consequences of child abuse and neglect. *Dev Psychobiol* 52:671-690.

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

Holmes, A., le Guisquet, A.M., Vogel, E., Millstein, R.A., Leman, S., Belzung, C. (2005) "Early life genetic, epigenetic and environmental factors shaping emotionality in rodents" *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29 :1335–1346

Hoover, W. B., & Vertes, R. P. (2007). Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain, Structure and Function*, 212, 149–179.

Hornak J, O'Doherty J, Bramham J, Rolls ET, Morris RG, Bullock PR, Polkey CE. 2004. Reward-related reversal learning after surgical excisions in orbito-frontal or dorsolateral prefrontal cortex in humans. *J Cogn Neurosci*. 16(3):463--478.

Huot R.L.,Thrivikraman, K., Meaney, M.J., M. Plotsky, P.M. (2001) "Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment." *Psychopharmacology (Berl.)* 158:366–373

Ikeda M, Brown J, Holland AJ, Fukuhara R, Hodges JR. Changes in appetite, food preference, and eating habits in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002;73:371–6.

- Iversen SD, Mishkin M. 1970. Perseverative interference in monkeys following selective lesions of inferior prefrontal convexity. *Exp Brain Res.* 11(4):376—386
- Izquierdo A, Suda RK, Murray EA. 2004. Bilateral orbital prefrontal cortex lesions in rhesus monkeys disrupt choices guided by both reward value and reward contingency. *J Neurosci.* 24(34): 7540--7548.
- Jaber M., Robinson SW., Missale C. and Caron MG., 1996. Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology* 35 (11): 1503-1519.
- Jardetzky O (1966) *Simple allosteric model for membrane pumps.* *Nature* 211:969-970.
- Jonas,R.K., Montojo,C.A., and Bearden,C.E.(2013).The 22q11.2 deletion Syndrome as a window into complex neuropsychiatric disorders over the lifespan. *Biol. Psychiatry* doi:10.1016/j. biopsych. 2013.07.019 [Epubaheadofprint].
- Jones B, Mishkin M. 1972. Limbic lesions and the problem of stimulus- reinforcement associations. *Exp Neurol.* 36(2):362--377.
- Jung,A.B.,andBennett,J.P.Jr.(1996).Development of striatal dopaminergic function. I.Pre-and postnatal development of mRNAs and binding sites for striatal D1(D1a)and D2(D2a) receptors. *BrainRes.Dev.BrainRes.* 94, 109–120.
- Kaffman, A., & Meaney, M. J. (2007). Neurodevelopmental sequelae of postnatal maternal care in rodents: Clinical and research implications of molecular insights. *The Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 48, 224-244.
- Kalinichev, M., Easterling, K. W., Plotsky, P. M., & Holtzman, S. G. (2002). Longlasting changes in stress-induced corticosterone response and anxiety-like behaviors as a consequence of neonatal maternal separation in Long-Evans rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 73(1), 131-140.
- Kalsbeek, A., Voorn, P., Buijs, R. M., Pool, C. W., & Uylings, H. B. M. (1998). Development of the dopaminergic innervations in the prefrontal cortex of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 269, 58–72.
- Kandel R. E., Schwartz H. J. and Jessell M. T., *Νευροεπιστήμες και Συμπεριφορά*, 8^η εκδ., Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 2011, pp 9-323

Kanki T, Ban T. Cortical fugal connections of frontal lobe in man 1952. In: Fuster JM, editor. *The PFC: Anatomy, physiology and neuropsychology of the frontal lobe*. New York: Lippincott-Raven; 1997

Kawano H, Ohyama K, Kawamura K, Nagatsu I (1995) Migration of dopaminergic neurons in the embryonic mesencephalon of mice. *Brain Res Dev Brain Res* 86:101–113

Kebabian JW and Calne DB (1979) Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277: 93–96.

Kenny J. T., & Blass, E. M. (1977). Suckling as incentive to instrumental learning in preweanling rats. *Science*, 196, 898–899

Khan Z, Gutierrez A, Martin R, Peniafiel A, Rivera A, de la Calle A, 1998. Differential regional and cellular distribution of dopamine D2-like receptors: an immunocytochemical study of subtype-specific antibodies in rat and human brain. *J. Comp. Neurol.* 402: 353-371.

Kim-Cohen J, Caspi A, Taylor A, Williams B, Newcombe R, Craig IW, Moffitt TE (2006) MAOA, maltreatment, and geneenvironment interaction predicting children's mental health: new evidence and a meta-analysis. *Mol Psychiatry* 11:903– 913

Kolb B. Do all mammals have a prefrontal cortex? In: Kaas J, editor. *Evolution of Nervous Systems: A Comprehensive Reference*. Vol 3. New York: Elsevier; 2006. pp. 443–450.

Korosi, A., & Baram, T. Z. (2009). The pathways from mother's love to baby's future. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 3, 1-8.

Koss, W. A., Belden, C. E., Hristov, A. D., & Juraska, J. M. (2014). Dendritic remodeling in the adolescent medial prefrontal cortex and the basolateral amygdala of male and female rats. *Synapse*, 68,61–72

Ladd, C. O., Thrivikraman, K. V., Huot, R. L., & Plotsky, P. M. (2005). Differential neuroendocrine responses to chronic variable stress in adult Long Evans rats exposed to handling-maternal separation as neonates. *Psychoneuroendocrinology*, 30, 520-533.

Langen, M., Leemans,A., Johnston,P., Ecker,C., Daly,E., Murphy,C.M., et al.(2012). Front-striatal circuitry and inhibitory control in autism:findings from diffuseon tensor imaging tractography. *Cortex* 48, 183-93. doi:10.1016/j.cortex.2011.05.018

Le Moine C and Bloch B, 1995, D1 and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum: sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D1 and D2 mRNAsin

distinct neuronal populations of the dorsal and the ventral striatum. *L Comp Neurol* 355: 418-426.

Leao P, Sousa JC, Oliveira M, Silva R, Almeida OF, Sousa N (2007) Programming effects of antenatal dexamethasone in the developing mesolimbic pathways. *Synapse* 61:40–49

Lehmann, J., Pryce, C. R., Jongen-Rêlo, A. L., Stöhr, T., Pothuizen, H. H., & Feldon, J.(2002). Comparison of maternal separation and early handling in terms of their neurobehavioral effects in aged rats. *Neurobiology of Aging*, 23(3), 457-66.

Leppanen, J.M.(2006).Emotional information processing in mood disorders:a review of behavioral and neuroimaging findings. *Curr.Opin.Psychiatry* 19, 34–39. doi:10.1097/01.yco.0000191500.46411.00

Levey A, Hersch S, Rye D, Sunahara R, Niznik H, Kitt C, Price D, Maggio R, Brann M, Ciliax B, 1993. Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype specific antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 : 8861-8865.

Levine S. (1957). Infantile experience and resistance to physiological stress. *Science*, 126, 405-406.

Levine, S. (1960). Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *American Journal of Pathology*, 36, 1-17.

Levine, S. (2001). Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Physiology and Behavior*, 73, 255-260.

Levine, S., (1994). “The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis.The influence of maternal factors.” *Ann. NY Acad. Sci.* 746:275–288.

Liang NY, Rutledge CO (1982) Evidence for carrier-mediated efflux of dopamine from corpus striatum. *Biochem Pharmacol* 31:2479-2484.

Lindvall O, Björklund A, Moore RY, Stenevi U. Mesencephalic dopamine neurons projecting to neocortex. *Brain Res.* 1974 Dec 6;81(2):325-31.

Lippmann, M., Bress, A., Nemeroff, C. B., Plotsky, P. M., & Monteggia, L. M. (2007). Long-term behavioural and molecular alterations associated with maternal separation in rats. *European Journal of Neuroscience*, 25(10), 3091- 3098.

- Litvin, Y., Tovote, P., Pentkowski, N. S., Zeyda, T., King, L. B., Vasconcellos, A. J., Dunlap, C., Spiess, J., Blanchard, D. C., & Blanchard, R. J. (2010). Maternal separation modulates short-term behavioral and physiological indices of the stress response. *Hormones and Behavior*, 58(2), 241-249.
- Liu, D., Diorio, J., Day, J. C., Francis, D. D., & Meaney, M. J. (2000). Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nature Neuroscience*, 3, 799-806.
- Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., Sharma, S., Pearson, D., Plotsky, P. M., Meaney, M. J. (1997) Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*, 277 (5332), 1659-1662.
- Llorente A.M., LoPresti C. And Satz P. (2008), Neuropsychological and neurobehavioral sequelae associated with pediatric HIV infection, *Handbook of Clinical Child Neuropsychology*, 3rd ed., p.p. 635-669
- Lupien, S. J., McEwen, B. S., Gunnar, M. R., & Heim, C. (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nature Reviews Neuroscience*, 10, 434-445.
- Luria AR (1969). Frontal-lobe syndromes. In *Handbook of clinical neurology* (ed. PJ Vinken & GW Bruyn), 2:725-757. Amsterdam: North Holland.
- Lyons D. M., & Banks, E. M. (1982). Ultrasounds in neonatal rats: Novel, predator and conspecific odor cues. *Developmental Psychobiology*, 15, 455-460
- MacMillan M. *An odd kind of fame: stories of Phineas Gage*. Cambridge, MA: MIT Press; 2000.
- Macrì, S., & Würbel, H. (2006). Developmental plasticity of HPA and fear responses in rats: A critical review of the maternal mediation hypothesis. *Hormones and Behavior*, 50(5), 667-680.
- Maniam, J. & Morris, M. J. (2010). Long-term postpartum anxiety and depressionlike behavior in mother rat subjected to maternal separation are ameliorated by palatable high fat diet. *Behavioural Brain Research*, 208, 72-79.
- Marco E, Dorn JF, Hsu PH, Jaqaman K, Sorger PK, Danuser G, S. cerevisiae Chromosomes Biorient via Gradual Resolution of Syntely between S Phase and Anaphase. *Cell* 154(5):1127-39

Matthews K1, Dalley JW, Matthews C, Tsai TH, Robbins TW. Periodic maternal separation of neonatal rats produces region- and gender-specific effects on biogenic amine content in postmortem adult brain. *Synapse*. 2001 Apr;40(1):1-10.

Matthews, K., Dalley, J.W., Matthews, C., Tsai, T.H., Robbins, T.W. (2001) "Periodic maternal separation of neonatal rats produces region- and genderspecific effects on biogenic amine content in postmortem adult brain" *Synapse*. 40(1):1-10

McClelland, S., Korosi, A., Cope, J., Ivy, A., & Baram, T. Z. (2011). Emerging roles of epigenetic mechanisms in the enduring effects of early-life stress and experience on learning and memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 96(1), 79-88.

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

McEwen, B. S., & Gianaros, P. J. (2010). Central role of the brain in stress and adaptation: Links to socioeconomic status, health, and disease. *Annals of New York Academy of Sciences*, 1186, 190-222.

McEwen, B. S., Eiland, L., Hunter, R. G., & Miller, M. M. (2012). Stress and anxiety: Structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. *Neuropharmacology*, 62, 3-12.

McEwen, B.S. (2010). Stress, sex, and neural adaptation to a changing environment: Mechanisms of neuronal remodeling. *Annals of New York Academy of Sciences*, 1204, 38-59.

McGowan, P. O., Suderman, M., Sasaki, A., Huang, T. C., Hallett, M., Meaney, M. J., & Szyf, M. (2011). Broad epigenetic signature of maternal care in the brain of adult rats. *PLoS One* 6(2), e14739.

Meaney MJ, Brake W, Gratton A (2002) Environmental regulation of the development of mesolimbic dopamine systems: a neurobiological mechanism for vulnerability to drug abuse? *Psychoneuroendocrinology* 27:127–138

Meaney, M. J. (2010). Epigenetics and the biological definition of gene×environment interactions. *Child Development*, 81, 41-79.

Meaney, M. J., & Szyf, M. (2005). Environmental programming of stress responses through DNA methylation: Life at the interface between a dynamic environment and a fixed genome. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 7(2), 103-123.

Meaney, M. J., Aitken, D. H., Bodnoff, S. R., Iny, L. J., Tatarewicz, J. E., Sapolsky, R. M. (1985). Early postnatal handling alters glucocorticoid receptor concentrations in selected brain regions. *Behavioral Neuroscience*, 99 (4), 765- 770.

Meaney, M. J., Aitken, D. H., van Berkel, C., Bhatnagar, S., & Sapolsky, R. M. (1988). Effect of neonatal handling on age-related impairments associated with the hippocampus. *Science*, 239 (4841),766-768.

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

Meaney, M. J., Szyf, M., & Seckl, J. R. (2007). Epigenetic mechanisms of perinatal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal function and health. *Trends in Molecular Medicine*, 13(7), 269-277.

Meiser J, Weindl D, Hiller K (2013) Complexity of dopamine metabolism. *Cell Commun Signal* 11:34.

Michelsen KA, van den Hove DL, Schmitz C, Segers O, Prickaerts J, Steinbusch HW (2007) Prenatal stress and subsequent exposure to chronic mild stress influence dendritic spine density and morphology in the rat medial prefrontal cortex. *BMC Neurosci* 8:107

Miller Earl K., Cohen Jonathan D. (2001):An Integrative Theory of Prefrontal Cortex Function. *Annual Review of Neuroscience*, March, Vol. 24: 167-202

Missale, C., et al.,1998.Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol.Rev.*78,189–225.

Missale, C., et al.,2010.The neurobiology of dopamine receptors: evolution from the dual concept to heterodimer complexes .*J. Recept. Signal Transduct.Res.*30,347–354.

Moffett MC, Harley J, Francis D, Sanghani SP, Davis WI, Kuhar MJ (2006) Maternal separation and handling affects cocaine selfadministration in both the treated pups as adults and the dams. *J Pharmacol Exp Ther* 317:1210–1218

Moriceau Stephanie and Regina M Sullivan “Maternal presence serves as a switch between learning fear and attraction in infancy”, *Nat Neurosci*. 2006 August ; 9(8): 1004–1006

- Moriceau, S., Roth, T. L., Okotoghaide, T., & Sullivan, R. M. (2004). Corticosterone controls the developmental emergence of fear and amygdala function to predator odors in infant rat pups. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 22, 415–422.
- Moriceau, S., Wilson, D. A., Levine, S., & Sullivan, R. M. (2006). Dual circuitry for odor-shock conditioning during infancy: Corticosterone switches between fear and attraction via amygdala. *Journal of Neuroscience*, 26, 6737–6748
- Morys', J., Berdel, B., Kowian'ski, P., & Dziewiatkowski, J. (1998). The pattern of synaptophysin changes during the maturation of the amygdaloid body and hippocampal hilus in the rat. *Folia Neuropathologica*, 36, 15–23
- Murray EA, O'Doherty JP, Schoenbaum G. 2007. What we know and do not know about the functions of the orbitofrontal cortex after 20 years of cross-species studies. *J Neurosci*. 27(31):8166--8169.
- Mychasiuk Richelle , Robbin Gibb, Bryan Kolbb ” Prenatal bystander stress induces neuroanatomical changes in the prefrontal cortex and hippocampus of developing rat offspring”, *BRAIN RESEARCH* 1412 (2011) 55 – 62
- Nemeroff, C. B. (2004). "Neurobiological consequences of childhood trauma." *J Clin Psychiatry* 65 Suppl 1: 18-28.
- Nieoullon A, Coquerel A (2003) Dopamine: a key regulator to adapt action, emotion, motivation and cognition. *Curr Opin Neurol* 16(Suppl. 2):S3–S9.
- O'Keefe, J. (1976). Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Experimental Neurology*, 51, 78–109
- Ohsawa K1, Imai Y, Sasaki Y, Kohsaka S. Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity, *J Neurochem*. 2004 Feb;88(4):844-56.
- Okubo, Y., Suhara, T., Suzuki, K., Kobayashi, K., Inoue, O., Terasaki, O., et al. (1997). Decreased prefrontal dopamine D1 receptors in schizophrenia revealed by PET. *Nature* 385, 634–636. doi:10.1038/385634a0
- Olson, L., Boréus, L. O., and Seiger, Å. (1973). Histochemical demonstration and mapping of 5-hydroxytryptamine- and catecholamine-containing neurons systems in the human fetal brain. *Z. Anat. Entwicklungsgesch.* 139, 259–282. doi:10.1007/bf00519968

Ongur, D., & Price, J. L. (2000). The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. *Cerebral Cortex*, 10, 206–219.

Panagiotaropoulos T, Diamantopoulou A, Stamatakis A, Dimitropoulou M, Stylianopoulou F. Learning of a T-maze by rat pups when contact with the mother is either permitted or denied. *Neurobiol Learn Mem* (2009) 91:2–12. doi:10.1016/j.nlm.2008.09.007

Pandya DN, Yeterian EH. Architecture and connections of cortical association areas. In: Peters A, Jones EG, editors. *Cerebral Cortex*. Vol 4. New York: Plenum; 1985. pp. 3–61.

Perroud N, Jaussent I, Guillaume S, Bellivier F, Baud P, Jollant F, Leboyer M, Lewis CM, Malafosse A, Courtet P (2010) COMT but not serotonin-related genes modulates the influence of childhood abuse on anger traits. *Genes Brain Behav* 9:193–202

Petanjek Z. Extraordinary neoteny of synaptic spines in the human prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:13281–13286.

Petrides M (1996) Specialized systems for the processing of mnemonic information within the primate frontal cortex. *Phil Trans R Soc B* 351, 1455- 1462.

Petrides M. 1985. Deficits on conditional associative-learning tasks after frontal- and temporal-lobe lesions in man. *Neuropsychologia*. 23(5):601--614.

Petrides M. 1997. Visuo-motor conditional associative learning after frontal and temporal lesions in the human brain. *Neuropsychologia*. 35(7):989--997.

Pivonello R., Ferone D., Lombardi G., Colao A., Lamberts S. W. J. and Holfand L.J., 2007, Novel sights in dopamine receptor physiology. *Journal of Endocrinology* 156: 13-21

Pollak, S. D. (2005). Early adversity and mechanisms of plasticity: Integrating affective neuroscience with developmental approaches to psychopathology. *Development and Psychopathology*, 17, 735-752.

Postle B. & D' Esposito M (2000). Evaluating models of the topographical organization of working memory function in frontal cortex with event-related fMRI study. *Psychobiology* 28,132-145.

Pruessner JC, Champagne F, Meaney MJ, Dagher A (2004) Dopamine release in response to a psychological stress in humans and its relationship to early life maternal care: a positron emission tomography study using [11C]raclopride. *J Neurosci* 24:2825–2831

Pujol J, Soriano-Mas C, Alonso P, Cardoner N, Menchon JM, Deus J, Vallejo J. 2004. Mapping structural brain alterations in obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 61(7):720--730.

Ragozzino ME. 2007. The contribution of the medial prefrontal cortex, orbitofrontal cortex, and dorsomedial striatum to behavioural flexibility. *Ann N Y Acad Sci*. 1121:355—375

Ranck, J. B. Jr., (1973). Studies on single neurons in dorsal hippocampal formation and septum in unrestrained rats. *Experimental Neurology*, 41, 461–531

Reep, R. L., Corwin, J. V., & King, V. (1996). Neuronal connections of orbital cortex in rats: Topography of cortical and thalamic afferents. *Experimental Brain Research*, 111, 215–232.

Remijnse PL, Nielen MM, van Balkom AJ, Cath DC, van Oppen P, Uylings HB, Veltman DJ. 2006. Reduced orbitofrontal-striatal activity on a reversal learning task in obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 63(11):1225--1236.

Reynolds, B. (1945). A repetition of the Blodgett experiment on 'latent learning'. *Journal of experimental Psychology*, 35, 504–516

Rice ME, Patel JC, Cragg SJ (2011) Dopamine release in the basal ganglia. *Neuroscience* 198:112-137.

Robbins TW (1996). Dissociating executive functions of the prefrontal cortex. *Phil Trans R Soc B* 351, 1463-1470.

Roberts RJ, Hager L, Heron C. Prefrontal cognitive processes, working memory and inhibition of antisaccade task 1994. In: Krasnegor NA, Lyon GR, Goldman-Rakic, editors. *Development of PFC: Evolution, neurobiology and behaviour*. London: Paul H. Brooks Publishing Co; 1997. pp. 265–82. as cited in: Pennington BF. *Dimensions of executive function in normal and abnormal development*.

Rodrigues, A. J., Leão, P., Carvalho, M., Almeida, O. F., & Sousa, N. (2011). Potential programming of dopaminergic circuits by early life stress. *Psychopharmacology*, 214(1), 107-120.

Rolls, E. T. (2004). The functions of the orbitofrontal cortex. *Brain and Cognition*, 55, 11_29.

Rosen HJ, Allison SC, Schauer GF, Gorno-Tempini ML, Weiner MW, Miller BL. Neuroanatomical correlates of behavioural disorders in dementia. *Brain* 2005;128: 2612–25.

- Roth, T. L., & Sweatt, J. D. (2011). Epigenetic marking of the BDNF gene by early life adverse experiences. *Hormones & Behavior*, 59(3), 315-320.
- Roth, T. L., Lubin, F. D., Funk, A. J., Sweatt, J. D. (2009). Lasting epigenetic influence of early-life adversity on the BDNF gene. *Biological Psychiatry*, 65, 760-769.
- Rudnick G (1998) Bioenergetics of neurotransmitter transport. *J Bioenerg Biomembr* 30:173-185.
- Rutter M. and Maughan B. (1997). Psychosocial Adversities in Childhood and Adult Psychopathology. *Journal of Personality Disorders*: Vol. 11, No. 1, pp. 4-18.
- Santana, N., Mengod, G., Artigas, F., 2009. Quantitative analysis of the expression of dopamine D1 and D2 receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cereb. Cortex* 19, 849–860.
- Savitz J, van der Merwe L, Newman TK, Stein DJ, Ramesar R (2010) Catechol-O-methyltransferase genotype and childhood trauma may interact to impact schizotypal personality traits. *Behav Genet* 40:415–423
- Schmidt, M. V., Wang, X-D., & Meijer, O. C. (2011). Early life stress paradigms in rodents: Potential animal models of depression? *Psychopharmacology*, 214, 131-140.
- Schmidt, U., Beyer, C., Oestreicher, A. B., Reisert, I., Schilling, K., and Pilgrim, C. (1996). Activation of dopaminergic D1 receptors promotes morphogenesis of developing striatal neurons. *Neuroscience* 74, 453–460. doi:10.1016/0306-4522(96)00201-1
- Schoenbaum G, Nugent SL, Saddoris MP, Setlow B. 2002. Orbitofrontal lesions in rats impair reversal but not acquisition of go, no-go odor discriminations. *Neuroreport*. 13(6):885--890.
- Schoenbaum G, Roesch MR, Stalnaker TA. Orbitofrontal cortex, decision-making and drug addiction. *Trends Neurosci* 2006;29:116–24.
- Shah, P. J., Ogilvie, A. D., Goodwin, G. M., and Ebmeier, K. P. (1997). Clinical and psychometric correlates of dopamine D2 binding in depression. *Psychol. Med.* 27, 1247–1256. doi:10.1017/S0033291797005382
- Shallice T & Burgess DF (1996). The domain of supervisory processes and temporal organisation of behaviour. *Phil Trans R Soc B* 351, 1405-1411.

Shaw P, Kabani NJ, Lerch JP, Eckstrand K, Lenroot R, Gogtay N et al (2008): Neurodevelopmental trajectories of the human cerebral cortex. *J Neurosci* 28:3586–3594

Shimada S, Kitayama S, Lin CL, Patel A, Nanthakumar E, Gregor P, Kuhar M, Uhl G (1991) Cloning and expression of a cocaine-sensitive dopamine transporter complementary DNA. *Science* 254:576-578.

Siegel, G. J., Agranoff, B. W., Albers, R. W., Fisher, S. K., & Uhler, M. D. (2006). *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*.

Siegrist, J., Menrath, I., Stoöcker, T., Klein, M., Kellermann, T., Shah, N. J., ... Schneider, F. (2005). Differential brain activation according to chronic social reward frustration. *Neuroreport*, 16, 1899–1903

Simpson, E.H., Kellendonk, C., and Kandel, E. (2010). A possible role for the striatum in the pathogenesis of the cognitive symptoms of schizophrenia. *Neuron* 65, 585–596. doi:10.1016/j.neuron.2010.02.014

Slusarczyk Joanna, Ewa Trojan, Katarzyna Glombik, Anna Piotrowska, Boguslawa Budziszewska, Marta Kubera, Katarzyna Popiolek-Barczyk, Wladyslaw Lason, Joanna Mika and Agnieszka Basta-Kaim “Anti-inflammatory properties of tianeptine on lipopolysaccharide-induced changes in microglial cells involve toll-like receptor-related pathways” © 2015 International Society for Neurochemistry, *Journal of Neurochemistry* Volume 136, Issue 5, pages 958–970, March 2016, DOI: 10.1111/jnc.13452

Spencer, G.E., Klumperman, J., and Syed, N.I. (1998). Neurotransmitters and neurodevelopment. Role of dopamine in neurite out growth, target selection and specific synapse formation. *Perspect. Dev. Neurobiol.* 5, 451–467.

Stamatakis A., Manatos V., Kalpachidou Th., Stylianopoulou F., (2015). Exposure to a mildly aversive early life experience leads to prefrontal cortex deficits in the rat. *Brain Struct Funct* DOI 10.1007/s00429-015-1154-0

Stamatakis, A., Diamantopoulou, A., Panagiotaropoulos, T., Raftogianni, A., & Stylianopoulou, F. (2013). Effects of an early experience involving training in a T-maze under either denial or receipt of expected reward through maternal contact. *Frontiers in endocrinology*, 4.

- Stamatakis, A., Diamantopoulou, A., Panagiotaropoulos, T., Raftogianni, A., & Stylianopoulou, F. (2014). A novel model of early experiences involving neonatal learning of a T-maze using maternal contact as a reward or its denial as an event of mild emotional adversity. *Developmental Psychology*
- Stanwood, G. D., and Levitt, P. (2007). Prenatal exposure to cocaine produces unique developmental and long term adaptive changes in dopamine D1 receptor activity and subcellular distribution. *J. Neurosci.* 27, 152–157. doi:10.1523/JNEUROSCI.4591-06.2007
- Stanwood, G., and Levitt, P. (2001). “The effects of cocaine on the developing nervous system,” *Hand book of Developmental Cognitive Neuroscience*, eds C.A. Nelson and M. Luciana (Cambridge: MIT Press), 519–536.
- Stern, J.M., (1997). “Offspring-induced nurturance: animal–human parallels.” *Dev. Psychobiol.* 31 : 19–37.
- Stuss DT & Benson DF (1986). *The frontal lobes*. New York: Raven Press.
- Stuss DT, Alexander MP. Executive functions and the frontal lobes: a conceptual view. *Psychol Res* 2000;63:289–98.
- Sullivan RM, Dufresne MM (2006) Mesocortical dopamine and HPA axis regulation: role of laterality and early environment. *Brain Res* 1076:49–59
- Sullivan RM, Stackenwalt G, Nasr F, Lemon C, Wilson DA. Association of an odor with activation of olfactory bulb noradrenergic beta-receptors or locus coeruleus stimulation is sufficient to produce learned approach responses to that odor in neonatal rats. *Behav Neurosci* (2000) 114:957–62. doi:10.1037/0735-7044.114. 5.957
- Szyf, M. (2009). The early life environment and the epigenome. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1790(9), 878-885.
- Szyf, M., Weaver, I. C. G., Champagne, F. A., Diorio, J., & Meaney, M. J. (2005). Maternal programming of steroid receptor expression and phenotype through DNA methylation in the rat. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 26, 139-162.
- Tarazi F. I. and Baldessarini R. J., (2000). “Comparative postnatal development of dopamine D1, D2, D4 receptors in rat forebrain. *Int. J. Devl Neuroscience* 18:29-37

Tata, D. A. (2012). Maternal separation as a model of early stress: Effects on aspects of emotional behavior and neuroendocrine function. *Hellenic Journal of Psychology*, 9, 84-101.

Thierry A. M., Tassin J. P., Blanc G. & Glowinski J., Selective activation of the mesocortical DA system by stress. *Nature* 263, 242 - 244 (16 September 1976); doi:10.1038/263242a0

Thompson SA, Patterson K, Hodges JR. Left/right asymmetry of atrophy in semantic dementia: behavioral-cognitive implications. *Neurology* 2003;61:1196–203.

Thompson, J. V., Sullivan, R. M., & Wilson, D. A. (2008). Developmental emergence of fear learning corresponds with changes in amygdala synaptic plasticity. *Brain Research*, 1200, 58–65

Thorpe, S. J., Rolls, E. T., & Maddison, S. (1983). Neuronal activity in the orbitofrontal cortex of the behaving monkey. *Experimental Brain Research*, 49, 93–115

Tolman E. C., & Honzik, C. H. (1930). "Insight" in rats. *University of California Publications in Psychology*, 4, 215-232

Tritsch N. X., Sabatini B. L. (2012). Dopaminergic modulation of synaptic transmission in cortex and striatum. *Neuron* 76 33–50 10.1016/j.neuron.2012.09.023

Tsujimoto S. The prefrontal cortex: Functional neural development during early childhood. *Neuroscientist*. 2008;14:345–358.

Uzdin TB, Mezey E, Chen C, Brownstein MJ, Hoffman BJ (1991) Cloning of the cocaine-sensitive bovine dopamine transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 11168-11171.

Uylings, H. B. M., & van Eden, C. G. (1990). Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and in primates, including humans. *Progress in Brain Research*, 85, 31–61.

Veenema, A. H., Blume, A., Niederle, D., Buwalda, B., & Neumann, I. D. (2006). Effects of early life stress on adult male aggression and hypothalamic vasopressin and serotonin. *European Journal of Neuroscience*, 24, 1711-1720.

Verney, C., Milosevic, A., Alvarez, C., and Berger, B. (1993). Immunocytochemical evidence of well-developed dopaminergic and noradrenergic innervations in the frontal cerebral cortex of human fetuses at midgestation. *J. Comp. Neurol.* 336, 331–344. doi:10.1002/cne.903360303

Verney, C., Zecevic, N., Nikolic, B., Alvarez, C., and Berger, B. (1991). Early evidence of catecholaminergic cell groups in 5- and 6-week-old human embryos using tyrosine hydroxylase

and dopamine- β -hydroxylase immunocytochemistry. *Neurosci.Lett.* 131, 121–124. doi:10.1016/0304-3940(91) 90351-S

Vincent, S.L., Khan, Y., Benes, F.M., 1993. Cellular distribution of dopamine D1 and D2 receptors in rat medial prefrontal cortex. *J. Neurosci.* 13, 2551–2564

Voorn P, Kalsbeek A, Jorritsma-Byham B, Groenewegen HJ (1988) The pre- and postnatal development of the dopaminergic cell groups in the ventral mesencephalon and the dopaminergic innervation of the striatum of the rat. *Neuroscience* 25:857– 887.

Wang, X. D., Rammes, G., Kraev, I., Wolf, M., Liebl, C., Scharf, S. H., Rice, C. J., Wurst, W., Holsboer, F., Deussing, J. M., Baram, T. Z., Stewart, M. G., Müller, M. B., & Schmidt, M. V. (2011). Forebrain CRF1 modulates early-life stress-programmed cognitive deficits. *Journal of Neuroscience*, 31(38), 13625-13634.

Weaver, I. C. G. (2009a). Epigenetic effects of glucocorticoids. *Seminars in fetal & Neonatal Medicine*, 14(3), 143-150.

Weaver, I. C. G. (2009b). Shaping adult phenotypes through early life environments. *Birth Defects Research*, 87, 314-326.

Weaver, I. C. G., Cervoni, N., Champagne, F. A., D'Alessio, A. C., Sharma, S., Seckl, J. R., Dymov, S., Szyf, M., & Meaney, M. J. (2004). Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature Neuroscience*, 7, 847-854.

Weaver, I. C., Meaney, M. J., & Szyf, M. (2006). Maternal care effects on the hippocampal transcriptome and anxiety-mediated behaviors in the offspring that are reversible in adulthood. *PNAS*, 103(9), 3480-3485.

Weaver, I. C., Szyf, M., & Meaney, M. J. (2002). From maternal care to gene expression: DNA methylation and the maternal programming of stress responses. *Endocrine Research*, 28(4), 699.

Westerink RH (2006) Targeting exocytosis: ins and outs of the modulation of quantal dopamine release. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5:57-77.

Whitwell JL, Sampson EL, Loy CT, Warren JE, Rossor MN, Fox NC, et al. VBM signatures of abnormal eating behaviours in frontotemporal lobar degeneration. *Neuroimage* 2007;35:207–13.

Williams GB, Nestor PJ, Hodges JR. Neural correlates of semantic and behavioural deficits in frontotemporal dementia. *Neuroimage* 2005;24:1042–51.

Williams JM, Galli A (2006) The dopamine transporter: a vigilant border control for psychostimulant action. *Handb Exp Pharmacol* 175:215-232.

Wise RA (2004) Rewards wanted: molecular mechanisms of motivation. *Discov Med* 4:180–186.

Woolley JD, Gorno-Tempini ML, Seeley WW, Rankin K, Lee SS, Matthews BR, et al. Binge eating is associated with right orbitofrontal–insular–striatal atrophy in frontotemporal dementia. *Neurology* 2007;69:1424–33.

Workman, A.D., Charvet, C.J., Clancy, B., Darlington, R.B., and Finlay, B. L. (2013). Modeling transformations of neurodevelopmental sequences across mammalian species. *J. Neurosci.* 33, 7368–7383. doi:10.1523/jneurosci.5746-12.2013

Yolanda Diz-Chaves, Olga Pernía, Paloma Carrero and Luis M Garcia-Segura Prenatal stress causes alterations in the morphology of microglia and the inflammatory response of the hippocampus of adult female mice *Journal of Neuroinflammation* 20129:71 DOI: 10.1186/1742-2094-9-71

Zahniser NR, Sorkina T1, Richards TL, Rao A, , Sorkin A., (2009). “Negative regulation of dopamine transporter endocytosis by membrane-proximal N-terminal residues”. *J Neurosci.* 2009 Feb 4;29(5):1361-74. doi:

Zecevic, N., and Verney, C. (1995). Development of the catecholamine neurons in human embryos and fetuses, with special emphasis on the innervation of the cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* 351, 509–535. doi:10.1002/cne.903510404

Zelazo, P. D., & Muller, U. (2002). Executive function in typical and atypical development. In U. Goswami (Ed.), *Handbook of child cognitive development*. Oxford: Blackwell.

Zhao Bin , Shuxiao Wang, Neil M. Donahue, Wayne Chuang, Lea Hildebrandt Ruiz, Nga L. Ng, Yangjun Wang, and Jiming Hao Evaluation of One-Dimensional and Two-Dimensional Volatility Basis Sets in Simulating the Aging of Secondary Organic Aerosol with Smog-Chamber Experiments, *Environ. Sci. Technol.* 2015, 49, 2245 – 2254

Zoli M, Torri C, Ferrari R, Jansson A, Zini I, Fuxe K, Agnati LF (1998) "The emergence of the volume transmission concept". *Brain Res. Brain Res. Rev* 26: 136–147.

Παυλίδης Μ., Εργαστήριο Ιστολογίας, Ηράκλειο, 2011