

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**



**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ – ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ**

**Μ.Δ.Ε. ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ**

**Οι επιπτώσεις μιας πρόωμης εμπειρίας στο νοραδρενεργικό σύστημα  
του εγκεφάλου του επίμου**

**ΜΕΛΙΣΣΑ ΠΕΛΑΓΙΑ**

**ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**Α.Π.Θ.**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**ΑΘΗΝΑ 2012**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**



**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ – ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ**

**Μ.Δ.Ε. ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ**

**Οι επιπτώσεις μιας πρόιμης εμπειρίας στο νοραδρενεργικό σύστημα  
του εγκεφάλου του επίμυ**

**ΜΕΛΙΣΣΑ ΠΕΛΑΓΙΑ**

**ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**Α.Π.Θ.**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**ΑΘΗΝΑ 2012**

**ΕΚΠΑ, Τμήμα Νοσηλευτικής, Εργαστήριο Βιολογίας-Βιοχημείας**

**ΤΙΤΛΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ: ΟΙ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΜΙΑΣ ΠΡΩΙΜΗΣ ΕΜΠΕΙΡΙΑΣ  
ΣΤΟ ΝΟΡΑΔΡΕΝΕΡΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΟΥ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ ΤΟΥ ΕΠΙΜΥ**

Μελισσά Πελαγία, Βιολόγος

**Επιβλέπων:** Στυλιανοπούλου Φ., Καθηγήτρια

Σταματάκης Α., Επίκουρος Καθηγητής

Ευθυμιόπουλος Σ., Ανπληρωτής Καθηγητής

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οι πρώιμες εμπειρίες μεταβάλλουν την ανάπτυξη του εγκεφάλου και τη συμπεριφορά του οργανισμού κατευθύνοντας την ανάπτυξη έτσι ώστε να επιτυγχάνεται η προσαρμογή στα διαφορετικά περιβάλλοντα. Αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει αλληλεπίδραση μεταξύ του περιβάλλοντος και των γονιδίων του οργανισμού. Η έκθεση σε εμπειρίες διαφορετικού τύπου κατά τη νεογνική ηλικία είναι πιθανό να οδηγήσει στη διαμόρφωση διαφορετικών συμπεριφορικών αποκρίσεων κατά την ενήλικη ζωή. Η διερεύνηση των συμπεριφορικών και μοριακών μηχανισμών που ενέχονται στις μεταβολές αυτές είναι σε θέση να δώσει σημαντικές πληροφορίες για την οντογένεση των γνωσιακών διεργασιών.

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζει την ανάπτυξη του νεογνικού εγκεφάλου αλλά και όλη τη μετέπειτα εξέλιξη του αποτελεί η μητρική επαφή ή αντίστροφα η μητρική αποστέρηση. Είναι γνωστό ότι οι πρώιμες μεταγεννητικές εμπειρίες όπως ο νεογνικός χειρισμός ή η μητρική αποστέρηση μπορούν να προκαλέσουν αλλαγές στη συναισθηματική ανταπόκριση και στην αντίδραση του οργανισμού στο στρες στην ενήλικη ζωή. Επίσης έχει αναφερθεί ότι μια μόνιμη αλλαγή στο σύστημα απόκρισης στο στρες λόγω πρώιμων εμπειριών αποτελεί την αιτία για την ανάπτυξη ψυχοπαθολογικών διαταραχών κατά την ενηλικίωση. Στην παρούσα εργασία, στην προσπάθεια μελέτης της επίδρασης της μητρικής επαφής, πραγματοποιήθηκε εντοπισμός των  $\beta 1$  και  $\alpha 2$  αδρενεργικών υποδοχέων σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου νεογνών και ενήλικων επίμυων. Τα ζώα αυτά ως νεογνά είχαν εκπαιδευτεί σε ένα μοντέλο ήπιου στρες που βασίζεται στο λαβύρινθο σχήματος T και στο οποίο τα ζώα βιώνουν είτε συνεχή ενίσχυση μέσω της απρόσκοπτης μητρικής επαφής είτε συνεχή μη ενίσχυση (ματαιωτική μη ανταμοιβή) μέσω παρεμπόδισης της επαφής με τη μητέρα.

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιολογίας-Βιοχημείας του τμήματος Νοσηλευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του διατμηματικού Μ.Δ.Ε. «Κλινική Βιοχημεία-Μοριακή Διαγνωστική», κατά τη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2011-2012.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω καταρχήν την Καθηγήτρια κ. Φ. Στυλιανοπούλου για την ευκαιρία να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο αντικείμενο της έρευνας, για την εμπιστοσύνη της στην ανάθεση του θέματος, την καθοδήγηση και επιστημονική επίβλεψη και το καθημερινό ενδιαφέρον για την πρόοδο της δουλειάς μου και τον Επίκουρο καθηγητή κ. Α. Σταματάκη για τη συνεργασία που μου προσέφερε, την καθημερινή του καθοδήγηση

στη διεξαγωγή των πειραμάτων μου αλλά και τη συνεχή προθυμία και διάθεση να με βοηθήσει στα διάφορα προβλήματα και ζητήματα που προέκυπταν. Επίσης τον Αναπληρωτή καθηγητή κ. Σ. Ευθυμίου που με τις διαλέξεις του μου ενέπνευσε το ενδιαφέρον για τον τομέα της Νευροβιολογίας.

Τέλος, ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στη Νίκη, το Γιάννη και το Βασίλη για τη βοήθεια και τη φιλία τους καθώς και στην οικογένεια μου για τη στήριξη και τη συμπαράστασή τους.

Αθήνα, 2012

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 ΝΟΡΑΔΡΕΝΕΡΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Βιοσυνθετικά ένζυμα.....	5
1.1.2 Αδρενεργικοί υποδοχείς.....	6
1.1.3 Ανάπτυξη του Νοραδρενεργικού Συστήματος.....	10
I. Επίπεδα νοραδρεναλίνης κατά την ανάπτυξη.....	10
II. Ανάπτυξη βιοσυνθετικών ενζύμων νοραδρεναλίνης.....	11
III. Ανάπτυξη αδρενεργικών υποδοχέων.....	12
III.1 α1-αδρενεργικοί υποδοχείς.....	12
III.2 α2-αδρενεργικοί υποδοχείς.....	12
III.3 β-αδρενεργικοί υποδοχείς.....	13
IV. Ανάπτυξη του μεταφορέα της νοραδρεναλίνης (NET).....	15
<b>1.2 ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....</b>	<b>17</b>
<b>1.3 ΝΟΡΑΔΡΕΝΕΡΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΙ ΣΤΡΕΣ.....</b>	<b>19</b>
<b>1.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΤΗ ΝΟΡΑΔΡΕΝΑΛΙΝΗ .....</b>	<b>20</b>
<b>1.5 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΑΞΟΝΑ ΥΠΟΘΑΛΛΑΜΟΥ-ΥΠΟΦΥΣΗΣ-ΕΠΙΝΕΦΡΙΔΙΩΝ (ΥΥΕ) ΣΤΟ ΣΤΡΕΣ.....</b>	<b>22</b>
<b>1.6 ΠΡΩΙΜΕΣ ΕΜΠΕΙΡΙΕΣ.....</b>	<b>24</b>
1.6.1 Πρώιμες εμπειρίες – η επίδρασή τους στην ενήλικη ζωή.....	24
1.6.2 Μοντέλα πρώιμων εμπειριών.....	26
1.6.2.1 Νεογνικός χειρισμός .....	26
1.6.2.2 Μητρική αποστέρηση .....	27
1.6.3 Υποθέσεις-προσεγγίσεις-εξηγήσεις της επίδρασης των πρώιμων εμπειριών.....	28
1.6.4 Δοκιμασία λαβυρίνθου σχήματος T (T-maze).....	30
1.7 Εγκεφαλικές περιοχές και η λειτουργία τους.....	33
<b>2. ΣΚΟΠΟΣ.....</b>	<b>36</b>
<b>3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>	<b>38</b>
<b>3.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ.....</b>	<b>38</b>

<b>3.2 ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΥΠΟ ΣΥΝΕΧΟΜΕΝΗ ΜΑΤΑΙΩΣΗ Ή ΣΥΝΕΧΟΜΕΝΗ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΚΑΤΑ ΤΗ ΝΕΟΓΝΙΚΗ ΗΛΙΚΙΑ .....</b>	<b>38</b>
<b>3.3 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΟΣ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ.....</b>	<b>41</b>
3.3.1 Παρασκευή Δειγμάτων Ενήλικων Ζώων.....	42
3.3.2 Παρασκευή Δειγμάτων Νεογνών.....	42
3.3.3 Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός του β1 αδρενεργικού υποδοχέα (β1-AR).....	42
3.3.4 Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός του α <sub>2A</sub> -αδρενεργικού υποδοχέα.....	43
3.3.5 Φωτογράφιση.....	44
3.3.6 Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων.....	44
<b>3.4 IN VITRO ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΡΑΔΙΟΣΗΜΑΣΜΕΝΟΥ ΔΕΣΜΕΥΤΗ....</b>	<b>47</b>
3.4.1 In vitro πρόσδεση ραδιοσημασμένου δεσμευτή για τον β1-αδρενεργικό υποδοχέα.....	47
3.4.2 Έκθεση σε φιλμ αυτοραδιογραφίας.....	48
3.4.3 Εμφάνιση των φιλμ αυτοραδιογραφίας και ανάλυση της εικόνας.....	48
3.4.4 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων.....	49
<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>50</b>
<b>4.1 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ Β1-ΑΔΡΕΝΕΡΓΙΚΟ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΣΕ ΕΠΙΜΥΣ 13<sup>15</sup> ΜΕΤΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ ΗΜΕΡΑΣ.....</b>	<b>50</b>
<b>4.2 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ Β1-ΑΔΡΕΝΕΡΓΙΚΟ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΣΕ ΕΝΗΛΙΚΟΥΣ ΕΠΙΜΥΣ .....</b>	<b>64</b>
<b>4.3 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ α<sub>2A</sub>-ΑΔΡΕΝΕΡΓΙΚΟ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΣΕ ΕΝΗΛΙΚΟΥΣ ΕΠΙΜΥΣ.....</b>	<b>77</b>
<b>4.4 IN VITRO ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΡΑΔΙΟΣΗΜΑΣΜΕΝΟΥ ΔΕΣΜΕΥΤΗ ΓΙΑ ΤΟΝ Β1-ΑΔΡΕΝΕΡΓΙΚΟ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΣΕ ΕΠΙΜΥΣ 13<sup>15</sup> ΜΕΤΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ ΗΜΕΡΑΣ.....</b>	<b>88</b>
<b>4.5 IN VITRO ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΡΑΔΙΟΣΗΜΑΣΜΕΝΟΥ ΔΕΣΜΕΥΤΗ ΓΙΑ ΤΟΝ Β1-ΑΔΡΕΝΕΡΓΙΚΟ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΣΕ ΕΝΗΛΙΚΟΥΣ ΕΠΙΜΥΣ..</b>	<b>99</b>
<b>5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>112</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....</b>	<b>118</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>119</b>

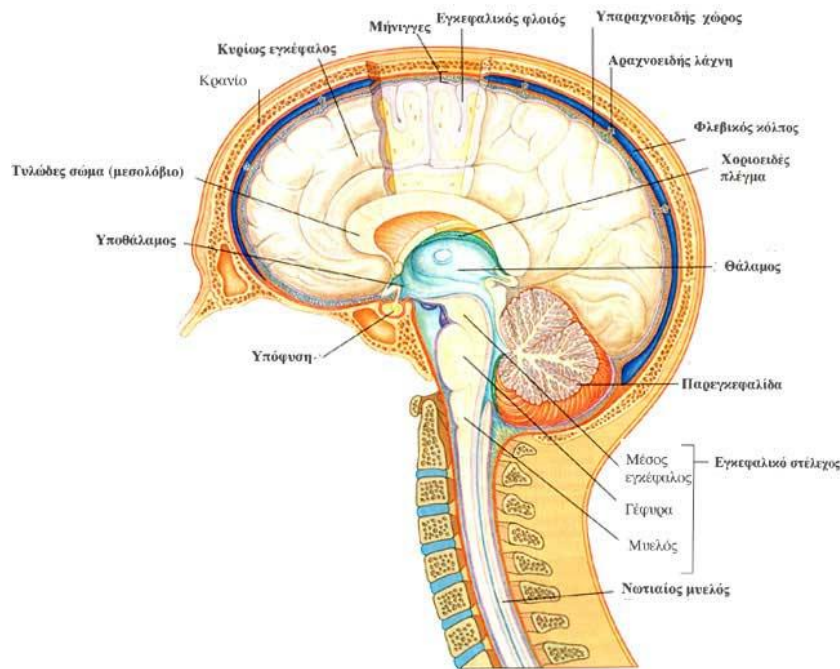
**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....120**



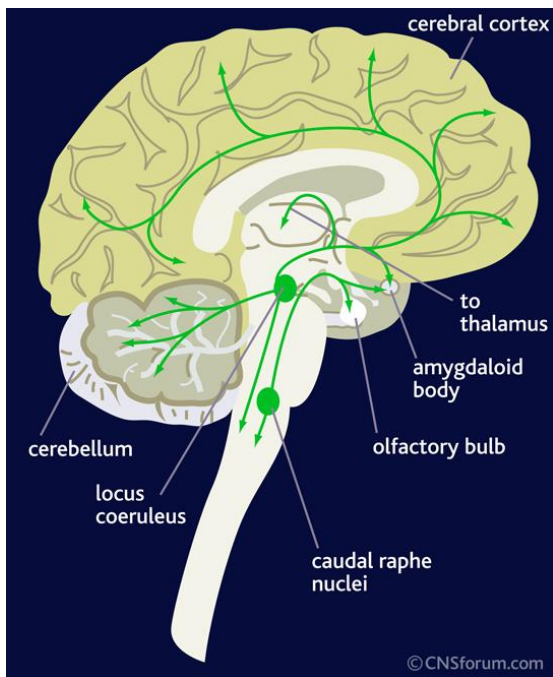
## 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 ΝΟΡΑΔΡΕΝΕΡΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Το νοραδρενεργικό σύστημα είναι το νευρωνικό σύστημα που ευθύνεται για τη σύνθεση, την αποθήκευση και την απελευθέρωση της νοραδρεναλίνης. Συναντάται τόσο στο κεντρικό (ΚΝΣ) όσο και στο περιφερικό νευρικό σύστημα. Στην περιφέρεια, η νοραδρεναλίνη είναι ο κύριος νευροδιαβιβαστής που απελευθερώνεται από το συμπαθητικό νευρικό σύστημα. Το συμπαθητικό νευρικό σύστημα μεσολαβεί την αντίδραση «πάλης ή φυγής», προετοιμάζοντας το σώμα για δράση, αφού επηρεάζει την καρδιαγγειακή λειτουργία, τη γαστρεντερική κινητικότητα και έκκριση, τη βρογχική διαστολή και το μεταβολισμό της γλυκόζης. Στο κεντρικό νευρικό σύστημα η νοραδρεναλίνη συνδέεται με διάφορες λειτουργίες όπως ο ύπνος, η μνήμη, η μάθηση και τα συναισθήματα. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση νοραδρεναλίνης στο κεντρικό νευρικό σύστημα εντοπίζεται στον υπομέλανα τόπο (*locus coeruleus*). Ο υπομέλανας τόπος βρίσκεται στη γέφυρα με εκτεταμένες προβολές σε όλο τον εγκέφαλο και παράγει πάνω από το 70% του συνόλου της νοραδρεναλίνης του εγκεφάλου. Τα κυτταρικά σώματα των νοραδρενεργικών νευρώνων εντοπίζονται στον υπομέλανα τόπο και προβάλλουν στο μετωπιαίο φλοιό, στο μεταχιακό σύστημα (ιππόκαμπο, αμυγδαλή, διάφραγμα, υποθάλαμο), στην παρεγκεφαλίδα, στο θάλαμο και στο νωτιαίο μυελό. Νευρώνες από τους ουραίους πυρήνες της ραφής δίνουν ανιούσες προβολές στην αμυγδαλή και κατιούσες στη γέφυρα (εικόνα 2) (*Drugs in health and disease, 1997*).



Εικόνα 1: Οργάνωση ανθρώπινου εγκεφάλου.



Εικόνα 2: Τα μονοπάτια της νοραδρεναλίνης στον εγκέφαλο.

Οι νοραδρενεργικοί νευρώνες που προβάλλουν στο μετωπιαίο φλοιό ρυθμίζουν την προσοχή, την εγρήγορση και τη διάθεση. Όσοι προβάλλουν στο μεταϊχμιακό σύστημα ρυθμίζουν τα συναισθήματα και το άγχος και όσοι προβάλλουν στον υποθάλαμο ρυθμίζουν την όρεξη, το βάρος, τη σεξουαλική ορμή και την ευχαρίστηση (Stahl, 2008).

Πειραματικές μελέτες σε ζώα έχουν δείξει ότι η νοραδρεναλίνη και τα νοραδρενεργικά συστήματα του εγκεφάλου συμμετέχουν σε μια σωρεία συμπεριφορών όπως η προσοχή, ο ύπνος και η εγρήγορση, η μάθηση, η μνήμη, το άγχος, η αντίληψη του πόνου, η λήψη τροφής και η διάθεση. Μεταβολές ή/και δυσλειτουργία των κεντρικών νοραδρενεργικών συστημάτων έχουν συσχετιστεί με συναισθηματικές διαταραχές και τον εθισμό (Παναγής, 2002).

Έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι το νοραδρενεργικό σύστημα του υπομέλανος τόπου συμμετέχει σε διεργασίες σχετικές με την προσοχή και τον προσανατολισμό του οργανισμού προς περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Αρχικά οι Aston-Jones και Bloom παρατήρησαν ότι οι νευρώνες του υπομέλανος τόπου πυροδοτούν περισσότερο σε καταστάσεις εγρήγορσης, λιγότερο κατά τη φάση του ύπνου βραδέων κυμάτων, ενώ σιγούσαν κατά τη διάρκεια του ύπνου REM (Aston-Jones and Bloom, 1981a). Η ίδια ερευνητική ομάδα έδειξε ότι οι νοραδρενεργικοί νευρώνες του υπομέλανος τόπου παρουσίαζαν εκφορτίσεις κατά ριπές όταν τα πειραματόζωα (επίμυες και πίθηκοι) δέχονταν απρόσμενα αισθητικά ερεθίσματα (Aston-Jones and Bloom, 1981b, Aston-Jones et al., 1994). Μελέτες έχουν δείξει ότι οι νοραδρενεργικοί νευρώνες έχουν ανασταλτική επίδραση σε νευρώνες της γέφυρας που σχετίζονται με τον ύπνο REM. Δηλαδή τα επεισόδια ύπνου REM ξεκινούν όταν μειωθεί η δραστηριότητα αυτών των νευρώνων. Αντίθετα, ο ρυθμός πυροδότησης αυτών των νευρώνων αυξάνει λίγο πριν τελειώσει το στάδιο του ύπνου REM (McCarley and Massaquoi, 1986).

Βασιζόμενος στα παραπάνω ευρήματα καθώς και στο γεγονός ότι οι νευρώνες του υπομέλανος τόπου σιγούν και σε καταστάσεις εγρήγορσης, όταν αυτές δεν σχετίζονται με επαγρύπνηση (π.χ. όταν το πειραματόζωο εκδηλώνει τυπικές του είδους συμπεριφορές όπως η αυτοπεριποίηση), ο Aston-Jones (1995) είχε προτείνει ότι ο υπομέλανος τόπος δεν σχετίζεται απλά με την εγρήγορση, αλλά ρυθμίζει την επαγρύπνηση, δηλαδή μια κατάσταση αυξημένης προσήλωσης και αντίδρασης στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Συμπεριφορικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι καταστροφές του υπομέλανος τόπου ή η παρεμπόδιση απελευθέρωσης νοραδρεναλίνης στον πρόσθιο εγκέφαλο διαταράσσουν τη μάθηση, όταν οι δοκιμασίες απαιτούν από το πειραματόζωο τη διάκριση αισθητικών ερεθισμάτων ή όταν κατά τη μαθησιακή διαδικασία παρουσιάζονται ερεθίσματα που αποσπούν την προσοχή του (Aston-Jones, 1985, Berridge et al., 1993).

Η συμπεριφορά λήψης τροφής είναι αρκετά πολύπλοκη καθώς εκτός από τους φυσιολογικούς παράγοντες που την επηρεάζουν, επηρεάζεται από ψυχο-κοινωνικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Σε ό,τι αφορά στους φυσιολογικούς παράγοντες, το

νευροανατομικό και νευροχημικό της υπόστρωμα είναι επίσης αρκετά πολύπλοκο. Στον έλεγχο της φαίνεται να συμμετέχει ένας σημαντικός αριθμός νευροδιαβιβαστών και νευροπεπτιδίων (Leibowitz, 1986), ανάμεσά τους και η νοραδρεναλίνη που παίζει καθοριστικό ρόλο. Ήδη από τη δεκαετία του 1940 ήταν γνωστό ότι αμφοτερόπλευρες βλάβες του κοιλιακού-έσω υποθαλάμου προκαλούν αύξηση στην πρόσληψη τροφής (υπερφαγία) ακόμα και σε χορτασμένα πειραματόζωα. Τριάντα περίπου χρόνια αργότερα ο Gold και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι αυτή η υπερφαγία εξαρτιόταν εν μέρει από την καταστροφή μιας δεσμίδας ινών που ξεκινά από τον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου και διασχίζει τον κοιλιακό-έσω υποθάλαμο (Gold et al., 1977). Μελέτες του Leibowitz (1978) έδειξαν ότι η μικροέγχυση νοραδρεναλίνης στον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου διεγείρει τη λήψη τροφής ακόμα και σε χορτασμένα πειραματόζωα. Μάλιστα σε αυτές τις περιπτώσεις τα πειραματόζωα φαίνεται να προτιμούν τη λήψη υδατανθράκων έναντι των πρωτεϊνών ή των λιπών ενώ αυτό που αυξάνεται είναι η ποσότητα της προσλαμβανόμενης τροφής και όχι η συχνότητα των γευμάτων (Leibowitz, 1978). Ο Stanley και οι συνεργάτες του (1989) χρησιμοποιώντας την τεχνική της *in vivo* εγκεφαλικής μικροδιαπίδυσης έδειξαν ότι τα επίπεδα της νοραδρεναλίνης στον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου αυξάνουν σε επίμυες κατά τη διάρκεια της νύχτας πριν ξεκινήσουν να τρώνε το πρώτο τους γεύμα. Μελέτες αποδεικνύουν ότι η δράση της νοραδρεναλίνης διαμεσολαβείται από μετασυναπτικούς  $\alpha_2$  υποδοχείς (για την κατηγοριοποίηση υποδοχέων βλέπε παρακάτω, σελ. 6) που βρίσκονται στην περιοχή, καθώς μπορούν να τη μιμηθούν  $\alpha_2$  αγωνιστές και να την αναστείλουν  $\alpha_2$  ανταγωνιστές (Wellman et al., 1993).

Μελέτες έχουν δείξει ότι το νοραδρενεργικό σύστημα του υπομέλανος τόπου παρουσιάζει νευροπροσαρμοστικές αλλαγές στον εθισμό. Η νοραδρεναλίνη έχει ενοχοποιηθεί εδώ και πολλά χρόνια για τα σωματικά συμπτώματα του συνδρόμου στέρησης των οπιούχων. Η πρώτη πειραματική ένδειξη προς αυτή την κατεύθυνση ήταν ο αυξημένος ρυθμός πυροδότησης των νευρώνων του υπομέλανος τόπου σε πειραματόζωα που βίωναν σύνδρομο στέρησης από οπιούχα και η καταστολή του με χορήγηση clonidine ( $\alpha_2$  αγωνιστής) (Aghajanian, 1978). Το εύρημα αυτό έχει επιβεβαιωθεί και με μικροεγχύσεις ανταγωνιστών των οπιοειδών στον υπομέλανα τόπο εξαρτημένων πειραματοζώων που προκαλούν συμπτώματα συνδρόμου στέρησης (Maldonado et al., 1992).

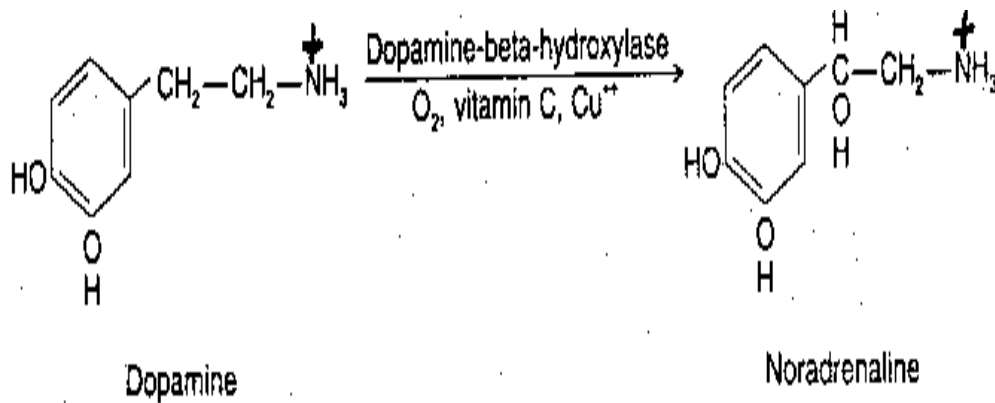
Αρκετά δεδομένα υποδεικνύουν ότι η νοραδρεναλίνη του εγκεφάλου διαμεσολαβεί την εκδήλωση άγχους. Η ερευνητική ομάδα του Redmond (1987) έχει κάνει μια σειρά

πειραμάτων, χρησιμοποιώντας ένα πρότυπο άγχους σε πρωτεύοντα θηλαστικά, για να εξετάσει το ρόλο του υπομέλανος τόπου και της νοραδρεναλίνης στο άγχος. Σύμφωνα με τα ευρήματα των μελετών τους, καταστροφές του υπομέλανος τόπου αναστέλλουν τις φοβικές αντιδράσεις των πειραματοζώων (π.χ. ταχυπαλμία, αύξηση της πίεσης του αίματος, έντονη αναπνοή, τρόμος, εφίδρωση παλαμών) που προκαλούνται από φοβογόνα ερεθίσματα. Αντίθετα, η ηλεκτρική διέγερση του υπομέλανος τόπου προκαλεί εκδηλώσεις φόβου (Παναγής, 2002).

Στους ανθρώπους, το νοραδρενεργικό σύστημα στον εγκέφαλο θεωρείται ότι παίζει έναν σημαντικό ρόλο στην προσοχή, τον ύπνο/έγερση, τη μάθηση και μνήμη, το συναίσθημα, την αναπαραγωγή και κεντρικές αποκρίσεις στο στρες (Berridge and Waterhouse, 2003, Sara, 2009). Το κεντρικό νοραδρενεργικό σύστημα επίσης εμπλέκεται σε συναισθηματικές διαταραχές (Charney, 2003) και ίσως σε διαταραχές άγχους, ειδικά σε διαταραχές πανικού ή μετα-τραυματικού στρες, καθώς οι  $\alpha_2$ -αδρενεργικοί αγωνιστές όπως η clonidine, είναι δραστικοί στο να ανακουφίζουν τα συμπτώματα των ασθενών με διαταραχές άγχους, ενώ οι  $\alpha_2$ -αδρενεργικοί ανταγωνιστές όπως η yohimbine, τα επιδεινώνουν (Charney, 2003). Αυτές οι παρατηρήσεις παρέχουν ισχυρές ενδείξεις ότι το κεντρικό νοραδρενεργικό σύστημα ίσως εμπλέκεται σε συναισθηματικές αποκρίσεις, ειδικά σε αυτές του φόβου και του άγχους.

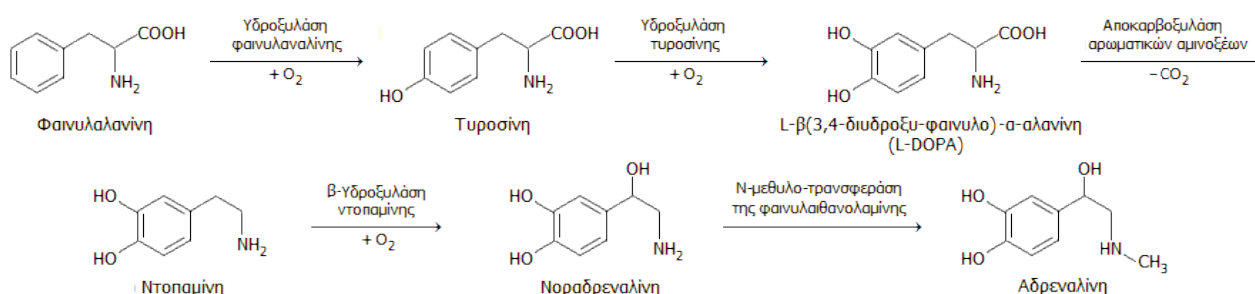
### **1.1.1 Βιοσυνθετικά ένζυμα**

Η νοραδρεναλίνη αποτελείται από μια ενιαία ομάδα αμίνης και έναν κατεχολικό πυρήνα (ένα δαχτυλίδι βενζολίου με δυο ομάδες υδροξυλίου). Η πρώτη αντίδραση στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της νοραδρεναλίνης είναι η μετατροπή της τυροσίνης σε L-DOPA μέσω της υδροξυλάσης της τυροσίνης. Η L-DOPA στη συνέχεια μέσω του ενζύμου της αποκαρβοξυλάσης αρωματικών αμινοξέων (AADC) αποκαρβοξυλιώνεται και μετατρέπεται σε ντοπαμίνη. Η ντοπαμίνη μέσω  $\beta$ -οξειδωσης από τη  $\beta$ -υδροξυλάση της ντοπαμίνης (DBH) μετατρέπεται σε νοραδρεναλίνη. Στην αντίδραση συμπαράγοντες είναι το οξυγόνο, ο χαλκός και η βιταμίνη C (εικόνα 3).



Εικόνα 3: Σύνθεση νοραδρεναλίνης από τη ντοπαμίνη.

Η ντοπαμίνη συντίθεται στο κυτταρόπλασμα ενώ η νοραδρεναλίνη σε κυστίδια αποθήκευσης νευροδιαβιβαστών. Τέλος, η νοραδρεναλίνη μπορεί να μετατραπεί σε αδρεναλίνη μέσω μεθυλίωσης της πρώτης αμίνης της από το ένζυμο N-μεθυλοτρανσφεράση φαινυλεθανολαμίνης (PNMT). Στο κυτταρόπλασμα των νοραδρενεργικών νευρώνων και των κυττάρων του μυελού των επινεφριδίων το ένζυμο PNMT χρησιμοποιεί την S-αδενοσυλ-μεθειονίνη (SAMe) ως συμπάραγοντα που δίνει τη μεθυλομάδα της στη νοραδρεναλίνη για το σχηματισμό της αδρεναλίνης (εικόνα 4) (Basic Neurochemistry, 1999).

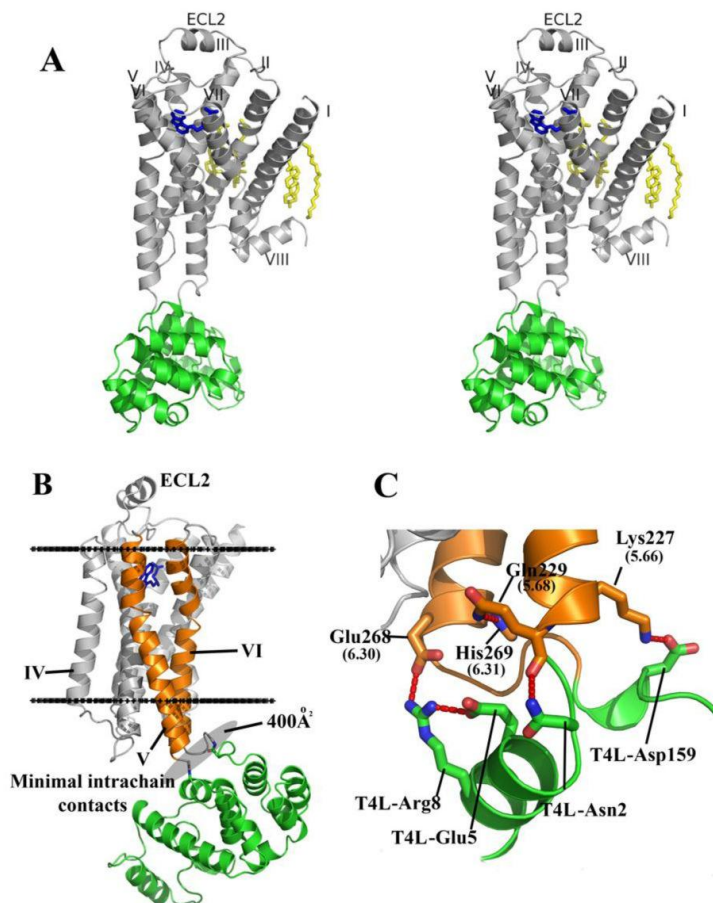


Εικόνα 4: Βιοσύνθεση νοραδρεναλίνης-αδρεναλίνης.

### 1.1.2 Αδρενεργικοί υποδοχείς

Η οικογένεια των αδρενεργικών υποδοχέων (AR) αποτελείται από τρεις τύπους, τους άλφα 1 (α1), τους άλφα 2 (α2) και τους βήτα (β). Αυτοί έχουν διαφορετικά φαρμακολογικά χαρακτηριστικά, μοριακές δομές και μονοπάτια σηματοδότησης. Καθένας από τους τρεις τύπους έχει με τη σειρά του τρεις υπότυπους (άλφα 1A,1B,1D) (άλφα 2A,2B, 2C) και (βήτα 1,2,3) (Hein and Kobilka, 1997, Bylund, 1992).

Όλοι είναι συνδεδεμένοι με G-πρωτεΐνες και έχουν 7 διαμεμβρανικά τμήματα με δομή α-έλικας, σχηματίζοντας ένα ελικοειδές πακέτο (εικόνα 5) με το N-τελικό άκρο στην εξωκυττάρια πλευρά της πλασματικής μεμβράνης. Τα κατάλοιπα που συνθέτουν τις έλικες I-VII έχουν ως εξής: έλικα I 29 έως 60, II 67- 96, III 103-136, IV 147-171, V 197-229, VI 267- 298 και έλικα VII 305- 328. Τα κατάλοιπα που σχηματίζουν τους ενδοκυττάριους (ICL) και εξωκυττάριους (ECL) βρόγχους των αδρενεργικών υποδοχέων είναι τα ICL1 61-66, ECL1 97-103, ICL2 137-146, ECL2 172-196, ICL3 230-266 και ECL3 299-304. Οι έλικες II, V, VI και VII έχουν η καθεμία συστροφή σε συντηρημένες θέσεις κατά μήκος των διαμεμβρανικών τμημάτων. Αυτές οι συστροφές θεωρείται ότι ευθύνονται για τις στερεοχημικές ανακατατάξεις που απαιτούνται για την ενεργοποίηση των G-πρωτεϊνών. Εκτός από τις 7 έλικες οι αδρενεργικοί υποδοχείς διαθέτουν την έλικα VIII και ένα ελικοειδές τμήμα στο κέντρο του ECL2 (εικόνα 5) (Cherezon et al., 2007).



Εικόνα 5: Διαμόρφωση αδρενεργικών υποδοχέων στο χώρο.

Όλοι έχουν μελετηθεί κυρίως σε τρωκτικά. Ιδιαίτερη προσοχή έχει δοθεί σε αναπτυξιακά θέματα που αφορούν το ΚΝΣ και περιφερικούς ιστούς όπως η καρδιά. Οι  $\alpha_2$ -AR, έχουν

εξεταστεί κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης ιδιαίτερα στο ΚΝΣ ενώ οι  $\alpha 1$ -AR έχουν τύχει λιγότερης προσοχής αν και εκφράζονται πυκνά στο ΚΝΣ (Basic Neurochemistry, 1999).

Οι  $\alpha$ -αδρενεργικοί υποδοχείς ενεργοποιούνται ισχυρά από τις φυσικές κατεχολαμίνες, νοραδρεναλίνη και αδρεναλίνη αλλά όχι από το συνθετικό ανάλογο ισοπροτενόλη. Αντίστροφα, οι  $\beta$ -αδρενεργικοί υποδοχείς διεγείρονται έντονα και από τους τρεις αγωνιστές. Υπότυποι των  $\beta$ -υποδοχέων βρέθηκαν τη δεκαετία του '60 ενώ των  $\alpha$  τη δεκαετία του '70 (Byland et al., 1994).

Όλοι οι  $\alpha$ -αδρενεργικοί υποδοχείς ενεργοποιούν την Gq/11, αυξάνοντας τη δραστικότητα της C $\beta$  φωσφολιπάσης και απελευθερώνοντας 1,4,5 τριφωσφορική-ινοσιτόλη και διακυλογλυκερόλη. Αυτές οι ενέργειες συνεργατικά αυξάνουν τη δραστικότητα της πρωτεϊνικής κινάσης C και προκαλούν πολλές άλλες επιδράσεις λόγω της αύξησης του ενδοκυττάρου  $Ca^{2+}$ . Επίσης οι  $\alpha$ -αδρενεργικοί υποδοχείς ενεργοποιούν την Gi που αναστέλλει την αδενυλική κυκλάση (όπως κάνουν και οι D2 υποδοχείς), οδηγώντας σε μείωση του κυκλικού AMP και συνακόλουθα της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών από την PKA. Αντίστροφα, οι  $\beta$ -αδρενεργικοί υποδοχείς ενεργοποιούν την Gs για να αυξηθεί η δραστικότητα της αδενυλικής κυκλάσης (όπως κάνουν οι D1 υποδοχείς) και ως εκ τούτου αυξάνεται το κυκλικό AMP και επακόλουθα η δραστικότητα της PKA (Basic Neurochemistry, 1999).

Και οι τρεις τύποι των  $\alpha 1$ -αδρενεργικών υποδοχέων, περιέχουν στα γονίδιά τους ένα συντηρημένο ιντρόνιο στη νουκλεοτιδική αλληλουχία κοντά στο τέλος της έκτης διαμεμβρανικής περιοχής. Οι  $\beta 3$  αλλά όχι οι  $\beta 1$  και  $\beta 2$  επίσης περιέχουν ένα ιντρόνιο μόνο μερικά αμινοξέα μακριά από το C-τελικό άκρο ενώ οι  $\beta 1$  και  $\beta 2$  δεν έχουν ιντρόνια στα γονίδιά τους (Basic Neurochemistry, 1999).

Οι αδρενεργικοί υποδοχείς υπόκεινται σε πολλές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Όπως και οι υποδοχείς ντοπαμίνης είναι γλυκοζυλιωμένοι, φωσφορυλιωμένοι και συνδεδεμένοι με παλμιτικό σε διάφορα αμινοξικά κατάλοιπα. Υπάρχουν πολλές θέσεις φωσφορυλίωσης σε κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης στην III έλικα και στο C-τελικό άκρο. Η φωσφορυλίωση είναι ίσως σημαντική στην κατάληψη των υποδοχέων από αγωνιστές και στην απευαισθητοποίηση. Έχει παρατηρηθεί τόσο εξαρτώμενη από το cAMP όσο και μη εξαρτώμενη από αυτό φωσφορυλίωση των  $\beta$ -αδρενεργικών υποδοχέων. Επίσης, έχει αναφερθεί φωσφορυλίωση τυροσίνης των  $\beta$ -αδρενεργικών υποδοχέων. Άλλοι υποδοχείς συνδεδεμένοι με τη δράση της αδενυλικής κυκλάσης μπορούν επίσης να προκαλέσουν αυτό που είναι γνωστό ως ετερόλογη απευαισθητοποίηση. Επιπλέον, πλήρωση των  $\beta$ -υποδοχέων από αγωνιστές έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της



κινάσης του β-υποδοχέα (β-ARK) η οποία οδηγεί σε φωσφορυλίωση του υποδοχέα. Σε πολλές περιπτώσεις ο φωσφορυλιωμένος υποδοχέας είναι λειτουργικά αποσυνδεδεμένος από την Gs. Στο μη-ζευγάρωμα του υποδοχέα με Gs επίσης εμφανίζεται να εμπλέκεται μια πρωτεΐνη που ονομάζεται β-arrestin, η οποία είναι όμοια με τη 48kDa arrestin του αμφιβληστροειδούς (Basic Neurochemistry, 1999).

Στους περιφερικούς ιστούς, διαφορετικοί υπότυποι συνυπάρχουν σε ιστούς και κύτταρα, αλλά ένας είναι ο κυρίαρχος. Για παράδειγμα, οι α1-αδρενεργικοί υποδοχείς είναι περισσότερο σημαντικοί στην ομαλή σύσπαση των μυών ενώ οι α2-υποδοχείς στη μείωση της έκκρισης της παγκρεατικής ινσουλίνης. Οι β1 είναι κυρίαρχοι στον καρδιακό μυ, ενώ οι β2 είναι πιο σημαντικοί στη βρογχική σύσπαση. Η ευρεία κατανομή και οι σημαντικές λειτουργικές δραστηριότητες των β-υποδοχέων είναι κάτι που τους κάνει ελκυστικούς θεραπευτικούς στόχους για την ανάπτυξη των φαρμάκων.

Εκλεκτικοί β1-ανταγωνιστές όπως η atenolol, χρησιμοποιούνται ευρέως για την αντιμετώπιση καρδιαγγειακών προβλημάτων, χωρίς την ανεπιθύμητη παρενέργεια της πρόκλησης βρογχόσπασμων που μεσολαβείται από το β2 υπότυπο. Αντίστροφα, εκλεκτικοί β2-αγωνιστές όπως η albuterol, είναι χρήσιμοι στη θεραπεία άσθματος και των χρόνιων αποφρακτικών παθήσεων των πνευμόνων, χωρίς την ανεπιθύμητη καρδιαγγειακή παρενέργεια. Εκλεκτικοί α1-αναστολείς όπως η prazosin, χρησιμοποιούνται στη θεραπεία της υπέρτασης με την αναστολή της συμπαθητικής αγγειοσύσπασης και τη μείωση της συνολικής περιφερικής αντίστασης. Εκλεκτικοί α2-αγωνιστές όπως η clonidine, επίσης χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της υπέρτασης μέσω της διέγερσης των κέντρων ελέγχου του ΚΝΣ για τη μείωση της συνολικής συμπαθητικής εκροής.

Ο ρόλος των αδρενεργικών υποδοχέων στις λειτουργίες του εγκεφάλου είναι λιγότερο κατανοητός. Υπάρχει μια εμφανώς διαφορετική κατανομή των υπότυπων στις διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου που έχει προσδιοριστεί με αυτοραδιογραφία και *in situ* υβριδισμό με ειδικές αλληλουχίες mRNA για κάθε υπότυπο των αδρενεργικών υποδοχέων.

Οι α1-αδρενεργικοί υπότυποι βρίσκονται σε υψηλά επίπεδα στις περισσότερες περιοχές του εγκεφάλου, με την πυκνότητα των α1A και α1B γενικά μεγαλύτερη από των α1D. Οι α2A και α2C υποδοχείς επίσης βρίσκονται στις περισσότερες περιοχές του εγκεφάλου ενώ οι α2B βρίσκονται κυρίως στο θάλαμο. Έρευνες έχουν δείξει ότι στον ανθρώπινο ιππόκαμπο επικρατεί ο β2 υπότυπος ενώ στον ιππόκαμπο του αρουραίου ο β1 υπότυπος (Duncan et al., 1991). Στους αρουραίους ο β1 υπότυπος κυριαρχεί στους νευρώνες του φλοιού και της παρεγκεφαλίδας και ο β2 στη γλοία και στα αιμοφόρα αγγεία των περιοχών

αυτών (Pittman et al., 1979). Οι β1 και β2 υπότυποι έχουν ευρεία κατανομή ενώ τα δεδομένα δείχνουν γενικά χαμηλά επίπεδα έκφρασης των β3 αδρενεργικών υποδοχέων στον εγκέφαλο.

Η αποσαφήνιση της λειτουργικής σπουδαιότητας των υπότυπων στο ΚΝΣ έχει παρεμποδιστεί από την έλλειψη εκλεκτικών αγωνιστών και ανταγωνιστών που να διασχίζουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, αλλά έχει πρόσφατα μερικώς μελετηθεί με τη χρήση knockout ποντικών. Για παράδειγμα, πολλές μελέτες προτείνουν ότι ο α2 υπότυπος είναι κυρίως υπεύθυνος για τις κεντρικές υποτασικές επιδράσεις των αγωνιστών των α2-αδρενεργικών υποδοχέων. Ενδιαφέρον είναι ότι α1B knockout ποντίκια δείχνουν δραματική μείωση της διέγερσης της κινητικής δραστηριότητας και της απόκρισης ανταμοιβής σε ψυχοδιεγερτικά και οπιοειδή φάρμακα αντίστοιχα, υποδεικνύοντας ένα σημαντικό ρόλο του υπότυπου αυτού στην ευπάθεια στον εθισμό (Basic Neurochemistry, 1999).

### **1.1.3 Ανάπτυξη του Νοραδρενεργικού Συστήματος**

#### I. Επίπεδα νοραδρεναλίνης κατά την ανάπτυξη

Τα κυτταρικά σώματα του νοραδρενεργικού συστήματος εκφράζουν την υδροξυλάση της τυροσίνης (TH) που είναι το ένζυμο που καταλύει το περιοριστικό βήμα (rate-limiting enzyme) στη σύνθεση της νοραδρεναλίνης, κι ως εκ τούτου αποτελεί βιοχημικό δείκτη των νοραδρενεργικών νευρώνων. Εντοπίζεται από την 4<sup>η</sup> εβδομάδα της κυοφορίας στους ανθρώπους, ενώ η νοραδρεναλίνη είναι ανιχνεύσιμη κατά την 5-6<sup>η</sup> εβδομάδα (Verney, 1999). Τα επίπεδα της νοραδρεναλίνης στους ανθρώπους αυξάνονται κατά το πρώτο τρίμηνο, ειδικά μετά το 2<sup>ο</sup> μήνα της κυοφορίας. Την αρχική αύξηση της νοραδρεναλίνης, ακολουθεί μια μείωση 30-40% της συγκέντρωσής της που συμβαίνει μεταξύ του 6<sup>ου</sup> μήνα της κυοφορίας και την πολύ αρχική νεογνική ηλικία (Lackovick et al., 1988).

Η νοραδρεναλίνη κατά την ανάπτυξη είναι ποσοτικά μικρότερη και η εμφάνισή της πιο αργή από της σεροτονίνης και της ντοπαμίνης, όπως έχουν δείξει μελέτες σε rhesus πιθήκους. Στους αρουραίους οι νοραδρενεργικοί νευρώνες διαφοροποιούνται μεταξύ της 10<sup>ης</sup> και 13<sup>ης</sup> ημέρας της κυοφορίας (Lauder and Bloom, 1974). Νοραδρενεργικές προβολές στο φλοιό εμφανίζονται μεταξύ της 16<sup>ης</sup> και 18<sup>ης</sup> ημέρας. Τα στάδια αυτά συμπίπτουν με πολλά σημαντικά γεγονότα της φλοιικής ανάπτυξης. Η φλοιική νευρογένεση για παράδειγμα, ξεκινά από τις βαθιές στιβάδες την 13<sup>η</sup> ημέρα και για τις πιο

επιφανειακές παρατηρείται την 20<sup>η</sup> ημέρα (Berger-Sweeney and Hohmann, 1997). Η μετανάστευση των φλοιικών νευρώνων ξεκινά τη 13<sup>η</sup> ημέρα και συνεχίζεται μεταγεννητικά. Περαιτέρω ωρίμανση των φλοιικών νευρώνων όπως ο σχηματισμός συναπτικής επικοινωνίας με γειτονικούς νευρώνες συμβαίνει κατά τις τρεις πρώτες εβδομάδες της μεταγεννητικής ζωής σε μια περίοδο που η νοραδρενεργική νεύρωση αυξάνεται στα επίπεδα της ενήλικης. Ενώ τα επίπεδα της νοραδρεναλίνης αυξάνονται σταθερά από τη γέννηση και μετά, δεν φτάνουν την πλήρη συγκέντρωση των ενηλίκων μέχρι τις 30-40 ημέρες μετά τη γέννηση. Στο κάτω στέλεχος και στην παρεγκεφαλίδα, η νοραδρεναλίνη φτάνει τα επίπεδα των ενηλίκων κάπως νωρίτερα, στις 2-3 εβδομάδες μετά τη γέννηση, αλλά οι περιοχές αυτές φαίνεται να είναι οι εξαιρέσεις στο γενικό κανόνα (Rho and Storey, 2001).

## II. Ανάπτυξη βιοσυνθετικών ενζύμων νοραδρεναλίνης

Η παρουσία των νευροδιαβιβαστικών συνθετικών ενζύμων της νοραδρεναλίνης κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης είναι παράλληλη με την παρουσία του νευροδιαβιβαστή. Κανένα από τα ένζυμα, υδροξυλάση της τυροσίνης (TH), αποκαρβοξυλάση αρωματικών αμινοξέων (AADC) ή β-υδροξυλάση της ντοπαμίνης (DBH), δεν είναι ειδικό μόνο για το βιοσυνθετικό μονοπάτι της νοραδρεναλίνης. Μελέτες σε ανθρώπους και πιθήκους έδειξαν ότι τα σώματα των κατεχολαμινικών νευρώνων, συμπεριλαμβανομένων των νοραδρενεργικών σωμάτων, εμφανίζονται πολύ νωρίς κατά την ανάπτυξη του ΚΝΣ. Η ολοκληρωτική ανάπτυξη του νοραδρενεργικού συστήματος διαρκεί 2 χρόνια στους πιθήκους οπότε και φτάνει τα επίπεδα των ενηλίκων (Levitt and Rakic, 1972). Η TH εντοπίζεται στον εμβρυϊκό εγκέφαλο των αρουραίων την 15<sup>η</sup> ημέρα της κυοφορίας αμέσως μόλις οι νευρώνες της νοραδρεναλίνης έχουν ολοκληρώσει τη διαίρεσή τους (Coyle and Axelrod, 1972). Υπάρχει μια έκρηξη της ανάπτυξης μεταξύ των ημερών 15-17 και μια μεταβολή της κατανομής της TH από περιοχές που περιέχουν τα κυτταρικά σώματα σε περιοχές που περιέχουν μόνο τελικές απολήξεις. Επίσης υπάρχουν τοπογραφικές διαφορές στην εμφάνιση της TH. Στο ραβδωτό σώμα, το ένζυμο αυξάνεται δραματικά κατά τη 2<sup>η</sup> μεταγεννητική εβδομάδα ενώ στο φλοιό, όπου η TH συνδέεται κυρίως με τους νευρώνες νοραδρεναλίνης, η μεγαλύτερη αύξηση εμφανίζεται μετά από τον πρώτο μήνα ζωής, γεγονός που συμβαδίζει με την εμφάνιση της νοραδρεναλίνης στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο (Coyle and Henry, 1973). Το αναπτυξιακό πρότυπο για τα άλλα

δου ένζυμα (AADC και DBH) ακολουθεί πιστά τα πρότυπα της TH και της νοραδρεναλίνης (Coyle and Axelrod, 1972).

### III. Ανάπτυξη αδρενεργικών υποδοχέων

#### III.1 α1-αδρενεργικοί υποδοχείς

Οι α1 αδρενεργικοί υποδοχείς εντοπίζονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα στον εγκέφαλο των αρουραίων κατά τη γέννηση. Αυξάνονται περισσότερο και από τα επίπεδα των ενηλίκων ως την 20<sup>η</sup> μεταγεννητική ημέρα με ιδιαίτερα ταχεία αύξηση μεταξύ της 15<sup>ης</sup> και 20<sup>ης</sup> ημέρας (Morris et al., 1980). Τις επόμενες εβδομάδες ελαττώνονται στα επίπεδα των ενηλίκων. Πιο λεπτομερείς αναλύσεις δείχνουν ότι σε ορισμένες περιοχές του εγκεφάλου, όπως η ωχρά σφαίρα (globus pallidus), υπάρχουν πάλι υψηλά επίπεδα αυτών των υποδοχέων κατά τη γέννηση, φτάνοντας τα μέγιστα τις δυο πρώτες εβδομάδες μετά τη γέννηση και στη συνέχεια μειώνονται στα επίπεδα των ενηλίκων (Jones et al., 1985). Οι περισσότερες περιοχές ωστόσο ακολουθούν το πρότυπο για ολόκληρο τον εγκέφαλο, δηλαδή αύξηση στα επίπεδα των ενηλίκων ή και σε υψηλότερα τις πρώτες τρεις εβδομάδες μετά τον τοκετό και μετά σταθεροποίηση στα επίπεδα των ενηλίκων μέσα στον επόμενο μήνα (Stotkin et al., 1990). Παρόμοια δεδομένα έχουν βρεθεί και στις γάτες (Jia et al., 1994).

#### III.2 α2-αδρενεργικοί υποδοχείς

Οι α2 υποδοχείς έχουν τρεις υπότυπους, τους α2A, α2B, α2C και οι 3 υπότυποι είναι ευρέως καταναμημένοι σε όλο το ΚΝΣ (Kable et al., 2000, Venkatesan et al., 1996). Καθένας τους όμως έχει ένα διαφορετικό μεταγραφικό προφίλ στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο. Αρκετά νωρίς το mRNA του α2A υποδοχέα εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στο φλοιό του αρουραίου. Σε περιοχές όπως τα βασικά γάγγλια, η αμυγδαλή, ο θάλαμος, ο νωτιαίος μυελός και το στέλεχος, το mRNA του α2A εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στην αρχή της ανάπτυξης και στη συνέχεια μειώνεται με την ωρίμανση του ΚΝΣ (Winzer-Serhan et al., 1997).

Αντίθετα με το mRNA των α2A, το mRNA των α2B δεν είναι παρόν στις περισσότερες δομές του εγκεφάλου των αρουραίων στην αρχή της ανάπτυξης αλλά σταδιακά αυξάνεται με την ωρίμανση του ΚΝΣ. Το mRNA των α2B εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στην αναπτυσσόμενη παρεγκεφαλίδα και στο ραβδωτό σώμα (Winzer-Serhan and Leslie, 1997).

Το mRNA των  $\alpha 2C$  εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα κύτταρα της CA1 περιοχής του υποκάμπου κατά την πρώτη μεταγεννητική ημέρα και μετά και μειώνεται ελαφρά κατά την ενηλικίωση. Αυτός ο υπότυπος επίσης εμφανίζει παροδικό αναπτυξιακό εμπλουτισμό στη μοριακή στιβάδα της παρεγκεφαλίδας που εξαφανίζεται όμως με την ενηλικίωση (Winzer-Serhan et al., 1997). Στο οσφρητικό σύστημα του αναπτυσσόμενου εγκεφάλου το mRNA των  $\alpha 2C$  αδρενεργικών υποδοχέων εκφράζεται στα επίπεδα των ενηλίκων από τη γέννηση (Winzer-Serhan et al., 1997).

Στην πλειονότητα των περιοχών του εγκεφάλου του αρουραίου, τα πρωτεϊνικά επίπεδα των  $\alpha 2$ -αδρενεργικών υποδοχέων αυξάνονται σταδιακά κατά τη διάρκεια της μεταγεννητικής περιόδου (Harpe et al., 1999), φτάνοντας τα μέγιστα επίπεδα την 15<sup>η</sup> μεταγεννητική ημέρα (Harpe et al., 2004). Η περίοδος μεταξύ 10<sup>ης</sup> και 15<sup>ης</sup> ημέρας φαίνεται να είναι η πιο σημαντική αφού όλες οι περιοχές του εγκεφάλου παρουσιάζουν σημαντική αύξηση στην πυκνότητα των  $\alpha 2$  υποδοχέων στον αρουραίο. Αυτή είναι μια περίοδος συναπτογένεσης και η αύξηση της πυκνότητας των υποδοχέων είναι αντίστοιχη. Στη συνέχεια, τα επίπεδα των υποδοχέων παραμένουν ίδια ή μειώνονται ελαφρώς σε εκείνα των ενηλίκων.

Μια πιο λεπτομερής ανατομική ανάλυση υποδηλώνει ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές από περιοχή σε περιοχή στην ανάπτυξη των  $\alpha 2$  υποδοχέων (Harpe et al., 2004). Αν και φτάνουν τα μέγιστα επίπεδα σε πολλές περιοχές του εγκεφάλου κατά τη διάρκεια της δεύτερης μεταγεννητικής εβδομάδας, το χρονοδιάγραμμα της έκφρασής τους ποικίλει από περιοχή σε περιοχή. Σε ορισμένες περιοχές όπως του φλοιού και του μεταιχμιακού συστήματος, η πυκνότητά τους αυξάνεται πάνω από τα επίπεδα των ενηλίκων και στη συνέχεια μειώνεται και φτάνει τα επίπεδα αυτά. Σε λίγες περιοχές όπως στο ραβδωτό σώμα, υπάρχει μια παροδική έκφραση των υποδοχέων δυο με τρεις εβδομάδες μετά τη γέννηση. Σε άλλες περιοχές όπως στον υπομέλανα τόπο και σε μερικούς πυρήνες του μεσεγκεφάλου, οι  $\alpha 2$  εμφανίζουν σημαντική πρόωμη ανάπτυξη και είναι κοντά στις πυκνότητες των ενηλίκων ήδη κατά τη γέννηση. Τέλος, στην παρεγκεφαλίδα και σε πολλούς πυρήνες του εγκεφαλικού στελέχους οι υποδοχείς παροδικά εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στις αρχές της μεταγεννητικής περιόδου και μετά μειώνονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα στον ενήλικο εγκέφαλο ή και εξαφανίζονται εντελώς (Harpe et al., 2004).

### III.3 $\beta$ -αδρενεργικοί υποδοχείς

Η μεταγεννητική ανάλυση των  $\beta$ -αδρενεργικών υποδοχέων έχει μελετηθεί κυρίως με τεχνικές δέσμευσης σε μεμβρανικά παρασκευάσματα (membrane binding technique) και

ως εκ τούτου υπάρχει λίγη ανατομική πληροφορία για την ανάπτυξη και προφανώς χωρίς ποσοτικο-ανατομικά δεδομένα. Οι β υποδοχείς εντοπίζονται στον πρόσθιο εγκέφαλο των αρουραίων πολύ σύντομα μετά την τελική διαφοροποίηση των νοραδρενεργικών νευρώνων (Schlumpf et al., 1987). Ωστόσο τα επίπεδα τους παραμένουν σχετικά σταθερά μέχρι τη γέννηση. Μετά τη γέννηση αναπτύσσονται ραγδαία φτάνοντας τα επίπεδα των ενηλίκων εντός δύο ή τριών εβδομάδων.

Στον εγκεφαλικό φλοιό των αρουραίων οι β υποδοχείς βρίσκονται σε χαμηλή πυκνότητα λίγο μετά τη γέννηση. Κατά τη δεύτερη μεταγεννητική εβδομάδα υπάρχει μια πολύ γρήγορη αύξηση στην πυκνότητά τους πάνω από τα επίπεδα των ενηλίκων που επιτυγχάνεται από τη 15<sup>η</sup> μέχρι την 21<sup>η</sup> μεταγεννητική ημέρα (Harden et al., 1977, Pittman et al., 1980). Αυτή η αύξηση ακολουθείται από μια αργή μείωση στα επίπεδα των ενηλίκων τους επόμενους μήνες (Pittman et al., 1980). Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του φλοιού, το ποσοστό των β1 προς τους β2 παραμένει σχετικά σταθερό με τους β1 να αποτελούν το 80% του συνόλου (Pittman et al., 1980). Η αύξηση στην πυκνότητα των β είναι παράλληλη με την αύξηση της δραστηριότητας της αδενυλικής κυκλάσης (AC) που διεγείρεται από τις κατεχολαμίνες (Harden et al., 1977, Bruinink and Lichtensteiger, 1984). Η AC είναι δείκτης για τη λειτουργία των β-υποδοχέων. Η συνολική δραστηριότητα της AC αναπτύσσεται σταθερά και πιο αργά από την έκφραση των β υποδοχέων από την προγεννητική περίοδο φτάνοντας τα επίπεδα των ενηλίκων σε ηλικία 30 ημερών. Η δραστηριότητα της AC που διεγείρεται από τη νοραδρεναλίνη σχετίζεται με την ανάπτυξη των β-υποδοχέων, δείχνοντας ότι οι υποδοχείς είναι πλήρως λειτουργικοί σε όλη την ανάπτυξη και ότι η έκφραση του υποδοχέα διέπει την ανάπτυξη της λειτουργίας του (Harden et al., 1977, Bruinink and Lichtensteiger, 1984).

Η ανάπτυξη των β-υποδοχέων της παρεγκεφαλίδας ακολουθεί μια πιο αργή πορεία, όπως θα ήταν αναμενόμενο για μια αργά αναπτυσσόμενη περιοχή του εγκεφάλου. Τα επίπεδα των υποδοχέων είναι πολύ χαμηλά την 5<sup>η</sup> ημέρα μετά τη γέννηση και αυξάνονται σταδιακά αλλά σταθερά φτάνοντας τα επίπεδα των ενηλίκων σε ηλικία έξι εβδομάδων. Στην ανάπτυξη της παρεγκεφαλίδας, οι β1 και β2 ακολουθούν διαφορετικά πρότυπα σε σχέση με το φλοιό. Αν και οι β2 είναι πάντα ο κυρίαρχος υπότυπος, στην αρχική μεταγεννητική περίοδο οι β1 αποτελούν το 20% του συνόλου. Μετά την κορύφωση της πυκνότητας την 20<sup>η</sup> ημέρα οι β1 μειώνονται με αργό ρυθμό στην παρεγκεφαλίδα φτάνοντας στην τελική τους χαμηλή πυκνότητα την 90<sup>η</sup> ημέρα, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 2% του συνολικού πληθυσμού των αδρενεργικών υποδοχέων αυτή την περίοδο (Pittman et al., 1980).

Η χρονική πορεία της ανάπτυξης των β υποδοχέων είναι παρόμοια με άλλα είδη αν και λόγω έλλειψης μελετών και διαφορών στις μεθόδους είναι δύσκολο να γίνουν ακριβείς συγκρίσεις (Erdsieck-Ernste et al., 1991).

#### IV. Ανάπτυξη του μεταφορέα της νοραδρεναλίνης (NET)

Η νεύρωση του ΚΝΣ από νοραδρενεργικούς νευρώνες είναι εκτεταμένη και οι νευρώνες αυτοί είναι γνωστό ότι εμπλέκονται σε πολλές πτυχές της φυσιολογίας του ΚΝΣ (Foote and Aston-Jones, 1995). Ο μεταφορέας της νοραδρεναλίνης παίζει κύριο ρόλο στη ρύθμιση της νοραδρενεργικής σηματοδότησης. Δεν προκαλεί έκπληξη ότι είναι στόχος πολλών φαρμάκων όπως ορισμένα αντικαταθλιπτικά, καθώς και εθιστικών ουσιών. Δεδομένου ότι ο NET είναι ο στόχος πολλών αντικαταθλιπτικών που είναι αναποτελεσματικά σε ανήλικους αλλά πολύ αποτελεσματικά σε ενήλικες, η αναπτυξιακή έκφραση της πρωτεΐνης είναι ενδιαφέρουσα για την κατανόηση της διαφορετικής απόκρισης στη θεραπεία της κατάθλιψης.

Η ανάλυση της ανάπτυξης του NET έχει μελετηθεί κυρίως σε τρωκτικά. Η έκφρασή του στους αρουραίους αυξάνει με την ανάπτυξη σε περιοχές του πρόσθιου εγκεφάλου (Sanders et al., 2005). Την 5<sup>η</sup> μέχρι και 10<sup>η</sup> μεταγεννητική ημέρα ο μεταφορέας εκφράζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα σε ολόκληρο τον εγκέφαλο αλλά από τη 15<sup>η</sup> ημέρα αυξάνεται σημαντικά στις περισσότερες περιοχές του εγκεφάλου. Από τη 15<sup>η</sup> έως την 25<sup>η</sup> ημέρα ένα υψηλότερο επίπεδο έκφρασης παρατηρείται και στη συνέχεια μειώνεται ελαφρά σε πολλές περιοχές του ενήλικου εγκεφάλου. Αντίθετα η έκφραση του NET στο στέλεχος και την παρεγκεφαλίδα είναι υψηλότερη κατά τη διάρκεια της πρώιμης μεταγεννητικής ανάπτυξης και μειώνεται δραματικά στον ενήλικο εγκέφαλο.

Η ανάπτυξη του NET συμπίπτει χρονικά με την ανάπτυξη της ενήλικης νοραδρενεργικής νεύρωσης. Η νοραδρενεργική νεύρωση φτάνει την πυκνότητα των ενηλίκων κατά τη διάρκεια της δεύτερης με τρίτης εβδομάδας μετά τη γέννηση στους αρουραίους ενώ κατά τη διάρκεια του ίδιου διαστήματος ο NET αποκτά το ενήλικο πρότυπο έκφρασης (Nakamura et al., 1987). Η έκφραση του NET αυξάνεται δραματικά μεταξύ της 10<sup>ης</sup> και 15<sup>ης</sup> ημέρας μετά τη γέννηση (Happe et al., 2004).

Μελέτες για τη νοραδρενεργική νεύρωση του εγκεφάλου των αρουραίων έχουν δείξει μια σταθερή αύξηση στην πυκνότητα των νοραδρενεργικών ιών και συνάψεων κατά τη διάρκεια των 2 πρώτων μεταγεννητικών εβδομάδων (Latsari et al., 2002).

Περίληπτικά, μελέτες αποκαλύπτουν μια δυναμική οντογένεση στο ΚΝΣ για το NET. Υπάρχει χαμηλή έκφραση του NET στον πρόσθιο εγκέφαλο κατά τη διάρκεια των πρώτων 10 ημερών μετά τη γέννηση. Την 15<sup>η</sup> μεταγεννητική ημέρα η συγκέντρωση του NET αυξάνεται σημαντικά και αναπτυξιακά συμπίπτει με την ενήλικη νοραδρενεργική τελική κατανομή και τη δραστηριότητα στον υπομέλανα τόπο. Επίσης έχουν παρατηρηθεί αναπτυξιακές αυξήσεις στον πρόσθιο εγκέφαλο ενώ αντίθετα βρέθηκαν μειώσεις σε δομές του οπίσθιου εγκέφαλου. Η πρόωμη παρουσία του NET στον οπίσθιο εγκέφαλο δείχνει ένα σημαντικό αναπτυξιακό ρόλο για το NET και/ή τη νοραδρεναλίνη σε αυτές τις δομές, προτείνοντας ότι η ανάπτυξη αυτής της περιοχής ίσως είναι επιρρεπής σε αντικαταθλιπτικά και διεγερτικά του ΚΝΣ με υψηλή συγγένεια για το NET.



## 1.2 Κλινικά στοιχεία

Η κατανόηση της ανάπτυξης των νευροδιαβιβαστών του ΚΝΣ είναι σημαντική για πολλούς λόγους. Η πληροφορία θα βοηθήσει όχι μόνο στην κατανόηση της ανάπτυξής τους αλλά επίσης πώς οι νευροδιαβιβαστές ρυθμίζουν άλλες αναπτυξιακές διαδικασίες, πώς η ανάπτυξή τους επηρεάζεται ή μεταβάλλεται από την επίδραση των ξενοβιοτικών κ.ά. Επίσης θα κατανοηθεί γιατί τα διάφορα φάρμακα έχουν διαφορετικές επιδράσεις σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια π.χ. τα τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά δεν έχουν επίδραση στα παιδιά και στους εφήβους αλλά έχουν στους ενήλικες, γεγονός που έχει προεκτάσεις σε περιπτώσεις κατάθλιψης, μια σοβαρή ψυχιατρική ασθένεια, κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας και της εφηβείας. Τόσο το σύστημα της νοραδρεναλίνης όσο και της σεροτονίνης είναι σημαντικά επειδή και τα δύο εμπλέκονται στην ανάπτυξη του ΚΝΣ και επειδή σχετίζονται με την παθοφυσιολογία της κατάθλιψης. Παιδιά και έφηβοι αντιδρούν στα αντικαταθλιπτικά με διαφορετικό τρόπο απ' ό,τι οι ενήλικες και ίσως γι' αυτό να ευθύνεται το στάδιο ανάπτυξης των δυο συστημάτων. Η κατανόηση του μηχανισμού θα βοηθήσει στην ανάπτυξη κατάλληλων αντικαταθλιπτικών θεραπειών για κάθε ομάδα ασθενών. Οι διαφορές στην ωρίμανση των δυο συστημάτων δεν θα έχουν επιπτώσεις μόνο στην κλινική αποτελεσματικότητα των φαρμάκων αλλά και στις μακροχρόνιες συνέπειές τους και στην ασφάλειά τους.

Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η ανάπτυξη του εγκεφάλου γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε να ανταποκρίνεται στις ανάγκες ή να αντισταθμίζει το περιβάλλον. Η χρόνια έκθεση σε αντικαταθλιπτικά φάρμακα αποτελεί σημαντικό περιβαλλοντικό παράγοντα για την κατάσταση αυτή. Ως εκ τούτου, η έκθεση σε ψυχοτρόπα φάρμακα ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια των ευάλωτων περιόδων της ανάπτυξης θα μπορούσε να προκαλεί αλλαγές στην τελική ανάπτυξη (Murrin et al., 2007).

Το νοραδρενεργικό σύστημα αναπτύσσεται πιο αργά σε σχέση με το σεροτενεργικό. Η διαφορά αυτή εξηγεί πιθανόν γιατί τα αντικαταθλιπτικά που δρουν περισσότερο στο νοραδρενεργικό σύστημα δεν δρουν στα παιδιά. Αφού το σύστημα δεν είναι πλήρως ανεπτυγμένο, τα φάρμακα που δρουν σε αυτό δεν έχουν το ίδιο αποτέλεσμα με αυτό στους ενήλικες (Murrin et al., 2007).

Μια άλλη σημαντική όψη του νοραδρενεργικού συστήματος είναι η πιθανή εμπλοκή του στην ανάπτυξη ευαισθησίας στην επίδραση των φαρμάκων συμπεριλαμβανομένων πολλών αντικαταθλιπτικών και ψυχοτρόπων διεγερτικών όπως οι αμφεταμίνες και η κοκαΐνη (Antelman et al., 2000). Τόσο τα αντικαταθλιπτικά όσο και τα διεγερτικά

αυξάνουν τις μονοαμίνες και συγκεκριμένα τη συγκέντρωσή τους στις συνάψεις. Υπάρχει διαφορά στον τύπο και στη διάρκεια της ευαισθησίας στις ουσίες αυτές όταν συγκρίνονται νεαρά και ενήλικα ζώα (Tirelli et al., 2003), υποστηρίζοντας την άποψη ότι το σύστημα των μονοαμινών είναι διαφορετικό στα νεαρά απ' ό,τι στα ενήλικα άτομα.

Τα περισσότερα δεδομένα για τα παραπάνω προέρχονται από έρευνες σε ζώα και ιδίως αρουραίους. Τα δεδομένα από τους ανθρώπους είναι περιορισμένα. Όμως θα πρέπει κανείς να έχει πάντα στο μυαλό του ότι η ανάπτυξη του εγκεφάλου πριν και μετά τη στιγμή της γέννησης διαφέρει σημαντικά από είδος σε είδος. Για παράδειγμα, κατά τη γέννηση, η ανάπτυξη του εγκεφάλου στους αρουραίους είναι ισοδύναμη σε σχετικό βάρος με την ανάπτυξη του ανθρώπινου εγκεφάλου στο τέλος του δεύτερου τριμήνου. Οι αρουραίοι είναι σεξουαλικά ώριμοι την πέμπτη εβδομάδα μετά τη γέννηση που αντιστοιχεί στην εφηβεία των ανθρώπων. Αντίθετα η ανάπτυξη του εγκεφάλου στους rhesus πιθήκους κατά τη γέννηση είναι παρόμοια με αυτή που βρίσκεται σε ανθρώπους ηλικίας 10-15 χρόνων. Για το λόγο αυτό χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή όταν γίνονται συγκρίσεις μεταξύ των ειδών (Murrin et al., 2007).

### 1.3 Νοραδρενεργικό σύστημα και στρες

Μια από τις κύριες λειτουργίες στις οποίες εμπλέκεται το νοραδρενεργικό σύστημα είναι η ταχεία απάντηση σε στρεσογόνα ερεθίσματα. Η παρουσία ενός στρεσογόνου ερεθίσματος οδηγεί στην έναρξη της απάντησης σε αυτό ή αλλιώς στην αντίδραση διέγερσης (arousal reaction) που έχει σκοπό την προσαρμογή, την επαναφορά και τη διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού. Η αντίδραση διέγερσης ενεργοποιεί τον άξονα Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων (ΥΥΕ) και το κεντρικό νοραδρενεργικό σύστημα που περιλαμβάνει τον υπομέλανα τόπο και τις νοραδρενεργικές περιοχές του εγκεφαλικού στελέχους καθώς και το περιφερικό νοραδρενεργικό σύστημα που περιλαμβάνει τους νοραδρενεργικούς νευρώνες του συμπαθητικού συστήματος και το μυελό των επινεφριδίων.

Η ενεργοποίηση του κεντρικού και του περιφερικού νοραδρενεργικού συστήματος έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη έκλυση νοραδρεναλίνης και αδρεναλίνης που με τη σειρά τους ασκούν επίδραση στο σύστημα του στρες και επιφέρουν αλλαγές στις οργανικές λειτουργίες ολόκληρου του σώματος. Συγκεκριμένα, οδηγούν σε ανεβασμένη πίεση και καρδιακό ρυθμό, αυξημένο ρυθμό αναπνοής, αλλαγές στην λειτουργία της πέψης και της εντερικής λειτουργίας και γενικότερες αλλαγές που συνδέονται με τη λειτουργία του συμπαθητικού συστήματος. Το παρασυμπαθητικό σύστημα δεν αποτελείται από νευρώνες που χρησιμοποιούν τη νοραδρεναλίνη ως νευροδιαβιβαστή, αλλά την ακετυλοχολίνη. Παρόλα αυτά επηρεάζει τη λειτουργία του περιφερικού νοραδρενεργικού συστήματος με δύο τρόπους: όταν μειώνεται η ενεργοποίησή του, ενισχύεται η δράση του συμπαθητικού συστήματος και άρα του περιφερικού νοραδρενεργικού συστήματος ενώ όταν ενεργοποιείται περισσότερο ασκεί ανταγωνιστική/κατασταλτική επίδραση στο συμπαθητικό και επομένως στο περιφερικό νοραδρενεργικό σύστημα.

Γενικά πάντως, το κεντρικό και το περιφερικό νοραδρενεργικό σύστημα ασκούν διεγερτική επίδραση στον άξονα ΥΥΕ και επομένως, στην έκλυση της κορτικοστερόνης. Ακόμη οδηγούν σε ενεργοποίηση μεσοφλοιικών και μεσομεταιχμιακών συστημάτων π.χ. του ιπποκάμπου και της αμυγδαλής καθώς και των νευρώνων προοπιομελανοκορτίνης του τοξοειδούς πυρήνα του υποθαλάμου που είναι υπεύθυνοι για την αναλγησία.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι ενώ η ενεργοποίηση του νοραδρενεργικού συστήματος διεγείρει την έκκριση των γλυκοκορτικοειδών, αυτά με τη σειρά τους αναστέλλουν τη λειτουργία του νοραδρενεργικού συστήματος «κλείνοντας» έτσι τον κύκλο της απάντησης στο στρες (Stone et al., 1987).

#### 1.4 Επίδραση του στρες στη νοραδρεναλίνη

Το στρες έχει αποδειχθεί ότι είναι ένας προδιαθεσικός παράγοντας σε διάφορες μορφές κατάθλιψης στους ανθρώπους (Lloyd, 1980). Μια σειρά από παρόμοιες συμπεριφορές έχει παρατηρηθεί ανάμεσα σε ανθρώπους που έχουν διαγνωστεί με κατάθλιψη και σε εργαστηριακά ζώα που έχουν εκτεθεί σε στρεσογόνες καταστάσεις (Weiss and Simson, 1986). Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι οι μονοαμίνες και οι υποδοχείς τους έχουν ένα σημαντικό ρόλο στην απάντηση του οργανισμού στο στρες (Anisman and Zacharko, 1990, Glavin, 1985). Έκθεση πειραματόζωων σε μια ποικιλία οξέων και ανεξέλεγκτων στρεσογόνων ερεθισμάτων προκαλεί εξάντληση (depletion) της νοραδρεναλίνης του εγκεφάλου (Glavin et al., 1983) που με τη σειρά της προκαλεί παροδικές αλλαγές στη συμπεριφορά και οδηγεί σε λειτουργικά ελλείμματα στα ζώα (Weiss et al., 1981). Αντίθετα, ζώα που εκτέθηκαν σε χρόνια στρες δεν επιδεικνύουν εξάντληση της νοραδρεναλίνης του εγκεφάλου (Irwin et al., 1986) αλλά τουναντίον δείχνουν μια προοδευτική μείωση των συμπεριφορικών ελλειμμάτων (Weiss et al., 1975). Σε μεγαλύτερου χρονικού διαστήματος χρόνια στρες η συγκέντρωση της νοραδρεναλίνης υπερβαίνει τα επίπεδα που παρατηρούνται σε ζώα που δεν έχουν υποστεί στρες (μάρτυρες) (Roth et al., 1982), μια κατάσταση χαρακτηριστική του χρόνιου στρες το οποίο επάγει την αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου υδροξυλάση της τυροσίνης (TH), το κύριο ένζυμο στη σύνθεση της νοραδρεναλίνης. Επίσης η αύξηση της νοραδρεναλίνης μπορεί να οφείλεται στο ότι το χρόνο στρες προκαλεί μείωση της χρησιμοποίησής της αν και η τελευταία υπόθεση δεν είναι πλήρως εξακριβωμένη.

Αμέσως μετά από ένα οξύ στρες φυσικής ακινητοποίησης παρατηρείται μείωση των υποθαλαμικών επιπέδων της νοραδρεναλίνης (Glavin et al., 1983, Nakagawa et al., 1981). Η εκλεκτική εξάντληση της υποθαλαμικής νοραδρεναλίνης οφείλεται ίσως στην αυξημένη χρήση της από αυτή την περιοχή κατά τη διάρκεια του στρες (Tanaka et al., 1982). Τα επίπεδά της στον υποθάλαμο επιστρέφουν στα επίπεδα των ζώων μαρτύρων 6 ώρες μετά το οξύ στρες (Ida et al., 1984, Roth et al., 1982). Έκθεση αρουραίων σε χρόνια στρες ακινητοποίησης δεν αλλάζει τα επίπεδα της νοραδρεναλίνης αμέσως μετά το τελευταίο στρεσογόνο ερέθισμα ούτε στον υποθάλαμο ούτε στον υπομέλανα τόπο ούτε στον υπόκαμπο ούτε στον εγκεφαλικό φλοιό. Μάλιστα τα επίπεδα της είναι παρόμοια με αυτά των μαρτύρων. Η έλλειψη αλλαγής σε αυτές τις περιοχές μπορεί να οφείλεται στην επαγωγή βιοσύνθεσης νοραδρεναλίνης που αντικαθιστά τη χρησιμοποιούμενη κατά το στρες (Stone et al., 1987). Είναι αξιοσημείωτο ότι το χρόνο στρες ακινητοποίησης

προκαλεί αυξήσεις στα υποθαλαμικά επίπεδα της, 6 και 24 ώρες μετά το τελευταίο στρες και αυξήσεις των επιπέδων της στην περιοχή του υπομέλανα τόπου 24 ώρες μετά το τελευταίο στρες. Η αύξηση στον υπομέλανα τόπο μπορεί να οφείλεται στην παρατεταμένη αύξηση της δραστηριότητας της TH που προάγεται από το χρόνιο στρες (Stone et al., 1987). 6 ώρες μετά το τελευταίο στρες στο παράδειγμα του χρόνιου στρες, η σύνθεση της νοραδρεναλίνης είναι ενισχυμένη στον υπομέλανα τόπο αλλά παρόλα αυτά ένα ουσιαστικό κλάσμα της συντίθεται και μεταφέρεται στους τελικούς προορισμούς παρά αποθηκεύεται και έτσι μπορεί να εξηγηθεί η έλλειψη της αλλαγής των επιπέδων της στην περιοχή αυτή. Όμως 24 ώρες μετά το τελευταίο στρες του χρόνιου στρες, το μεγαλύτερο κλάσμα της συντιθέμενης νοραδρεναλίνης αποθηκεύεται παρά μεταφέρεται. Για το λόγο αυτό η συγκέντρωση της νοραδρεναλίνης είναι αυξημένη σε αυτή την περιοχή, αυτή τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή (Hellriegel and D'Mello, 1996).

Μελέτη του Shimizu και των συνεργατών του το 1994, έδειξε ότι η διακοπτόμενη εφαρμογή στρες οδηγεί σε μεγαλύτερες αλλαγές στη νοραδρεναλίνη σε σχέση με το συνεχόμενο στρες (Shimizu et al., 1994), ένα εύρημα που ίσως οφείλεται στην ύπαρξη τάσης για αύξηση στις 6 ώρες μετά το στρες, στον υποθάλαμο.

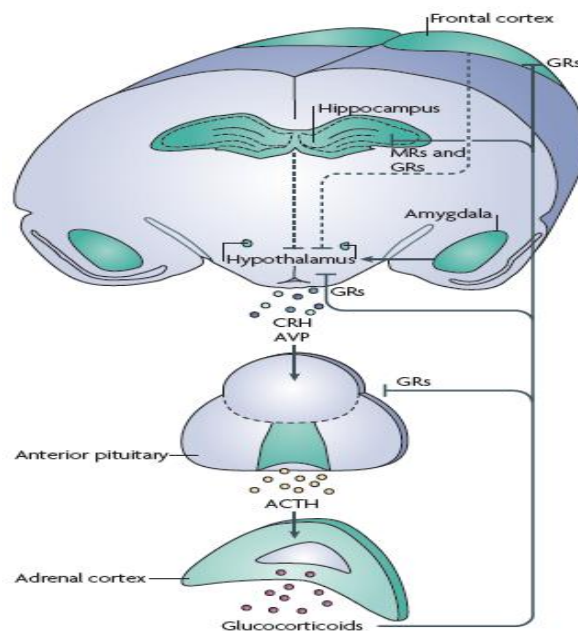
Αξίζει να αναφερθεί ότι μεταξύ των διαφορετικών ερευνητικών ομάδων παρουσιάζονται διαφορές ως προς τις στρεσοεπαγόμενες επιδράσεις στη νοραδρεναλίνη. Ο Pacak και οι συνεργάτες του (Pacak et al., 1992) βρήκαν ότι η συγκέντρωση της νοραδρεναλίνης στον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου ήταν μεγαλύτερη στα ζώα που υποβλήθηκαν σε μια μόνο ακινητοποίηση σε σχέση με τα ζώα που υποβλήθηκαν σε ακινητοποίηση για 7 συνεχόμενες ημέρες (Pacak et al., 1992). Η ίδια ομάδα βρήκε σημαντικά αυξημένα επίπεδα νοραδρεναλίνης στον κεντρικό πυρήνα της αμυγδαλής στα ποντίκια που υποβλήθηκαν σε οξύ στρες σε σχέση με αυτά που είχαν υποβληθεί σε χρόνιο στρες (Pacak et al., 1993). Αντίθετα μια άλλη ερευνητική ομάδα βρήκε ότι τα επίπεδα της νοραδρεναλίνης στον υπόκαμπο ήταν υψηλότερα στα ποντίκια ύστερα από χρόνιο στρες σε σχέση με τα ποντίκια μετά από οξύ στρες (Nisenbaum et al., 1991). Οι διαφορές αυτές πιθανόν να οφείλονται στη φύση του στρες που χρησιμοποιεί κάθε ομάδα και στις διαφορετικές περιοχές που μελετά.

## 1.5 Ο ρόλος του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (ΥΥΕ) στο στρες

Στους ενήλικες υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ της λειτουργίας του άξονα ΥΥΕ (εικόνα 6), των γλυκοκορτικοειδών και της συμπεριφοράς στην απόκριση στο στρες (De Kloet et al., 1998). Ο άξονας ΥΥΕ αντιδρά διαφορετικά σε περίπτωση οξέος και διαφορετικά σε περίπτωση χρόνιου στρες.

Εικόνα 6: άξονας ΥΥΕ

Το οξύ στρες, είτε περιβαλλοντικό είτε ψυχολογικό, επηρεάζει την απελευθέρωση της εκλυτικής ορμόνης της κορτικοτροπίνης (CRH) από τον υποθάλαμο, της φλοιοεπινεφριδιοτρόπου ορμόνης/κορτικοτροπίνη (ACTH) από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης και των γλυκοκορτικοειδών (κορτιζόλη στους ανθρώπους και κορτικοστερόνη στα τρωκτικά) από το φλοιό των επινεφριδίων.



Η δραστηριοποίηση του άξονα ΥΥΕ από το οξύ στρες προκαλεί την παροδική αύξηση των γλυκοκορτικοειδών στο πλάσμα και τη μερική αντίσταση στην αναστολή της ανατροφοδότησης της απελευθέρωσης των γλυκοκορτικοειδών. Αυτό συμβαίνει κατά τη διάρκεια και πολύ σύντομα μετά το οξύ στρεσογόνο ερέθισμα και συνεπάγεται μια γρήγορη απευαισθητοποίηση των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών στον εγκέφαλο (Leonard, 2005).

Η αναστολή της απελευθέρωσης των γλυκοκορτικοειδών προκαλείται από την ενεργοποίηση ενός συστήματος αρνητικής ανατροφοδότησης που εξαρτάται από το στρεσογόνο (Thrivikraman et al., 2000). Οι κύριες θέσεις της αρνητικής ανατροφοδότησης είναι ο ιππόκαμπος, ο υποθαλαμικός παρακοιλιακός πυρήνας και ο πρόσθιος λοβός της υπόφυσης. Η ανατροφοδότηση μεσολαβείται από υποδοχείς κορτικοστεροειδών που βρίσκονται στις περιοχές αυτές (De Kloet et al., 1993b). Δυο κορτικοστεροειδείς υποδοχείς εντοπίζονται στον εγκέφαλο, οι υποδοχείς αλατοκορτικοειδών (MR- τύπος 1) και γλυκοκορτικοειδών (GR- τύπος 2) (Evans and Arriza, 1989).

Όταν η συγκέντρωση των γλυκοκορτικοειδών της κυκλοφορίας υπερβεί τα όρια, τα οποία ελέγχονται μέσω της σύνδεσης τους με τους MR, μια αρνητική ανατροφοδότηση κατά μήκος του άξονα ΥΥΕ παρεμβαίνει μέσω της ενεργοποίησης των GR υποδοχέων σε

ορισμένες περιοχές του εγκεφάλου και του αδένα της υπόφυσης. Αυτή η παρατήρηση οδήγησε στη θεωρία ότι η ενεργοποίηση των MR είναι υπεύθυνη για την ανατροφοδοτική ρύθμιση του άξονα ΥΥΕ κατά τη διάρκεια βασικών συνθηκών ενώ η ενεργοποίηση των GR συμβαίνει κατά τη διάρκεια των περιόδων στρες (De Kloet et al., 1998).

Στον υπόκαμπο, το οξύ στρες έχει δείξει ότι μειώνει τον αριθμό των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών και ως εκ τούτου προκαλεί μια αύξηση στην κορτιζόλη και αντίσταση στην αναστολή της ανατροφοδότησης (Sapolsky and Plotsky, 1980). Ακολουθεί ο τερματισμός της απόκρισης στο οξύ στρες και η συγκέντρωση των γλυκοκορτικοειδών μειώνεται όπως μειώνεται και η απελευθέρωση της CRH από τους κεντρικούς νευρώνες. Συνεπάγεται ότι η πυκνότητα των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών και το ανασταλτικό σύστημα ανατροφοδότησης επιστρέφουν στα φυσιολογικά τους επίπεδα (Leonard, 2005).

Επίσης, εδώ και πολλές δεκαετίες είναι γνωστό ότι διαφορετικοί τύποι οξέος στρες προκαλούν την απελευθέρωση της CRF από αντίστοιχους νευρώνες στις μεσομεταιχμιακές περιοχές του εγκεφάλου. Η CRH ενεργοποιεί τον υπομέλανα τόπο, τον κύριο νοραδρενεργικό πυρήνα του εγκεφάλου και ως εκ τούτου παρέχεται η βάση για το κύριο συστατικό της απάντησης στο οξύ στρες (Gray, 1993).

Οι αλλαγές στον άξονα ΥΥΕ από το χρόνιο στρες είναι διαφορετικές και ποικίλουν ανάλογα με το αν το άτομο έχει αναπτύξει στρατηγικές αντιμετώπισης του στρες. Εμφανίζεται μια μείωση στα γλυκοκορτικοειδή του πλάσματος και στη συγκέντρωση της ACTH, αν συγκριθούν με τα αντίστοιχα επίπεδα σε περιπτώσεις οξέος στρες (Kant et al., 1987). Παρόλα αυτά το χρόνιο στρες συχνά έχει ως αποτέλεσμα την υπερέκκριση των επινεφριδικών γλυκοκορτικοειδών και μια παρατεταμένη ενεργοποίηση των κεντρικών και των περιφερικών συστημάτων (Irwin et al., 1991). Αυτές οι αλλαγές συμβαίνουν ως αποτέλεσμα της απευαισθητοποίησης των κεντρικών υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών και της αντίστασης στην αναστολή της ανατροφοδότησης.

Υπάρχει πειραματική απόδειξη ότι προγενέστερη έκθεση σε στρεσογόνο ερέθισμα μπορεί να αυξήσει την απόκριση των γλυκοκορτικοειδών σε ένα παροδικό στρεσογόνο ερέθισμα (Dallman and Jones, 1973). Έτσι το χρόνιο στρες το οποίο συχνά δρα ως ενεργοποιητής της έναρξης της κατάθλιψης, έχει συσχετιστεί με υπερέκκριση της CRH και με μείωση της ευαισθησίας της ανασταλτικής ανατροφοδότησης από την κορτιζόλη. Η αύξηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης στο πλάσμα στο χρόνιο στρες ενισχύεται από την απελευθέρωση της αργινίνης βασοπρεσίνης (AVP) από τον υποθάλαμο (Dinan et al., 1994).

## 1.6 ΠΡΩΙΜΕΣ ΕΜΠΕΙΡΙΕΣ

### 1.6.1 Πρώιμες εμπειρίες – η επίδρασή τους στην ενήλικη ζωή

Η ικανότητα του πρώιμου περιβάλλοντος να τροποποιεί την ανάπτυξη του άξονα ΥΥΕ και την επακόλουθη λειτουργία του έχει περιγραφεί από το Levine το 1957. Η έρευνα στον τομέα της Αναπτυξιακής Ψυχολογίας και της Νευροβιολογίας έχει δείξει ότι οι πρώιμες εμπειρίες της ζωής ενός οργανισμού επηρεάζουν την ανάπτυξη του εγκεφάλου και επιδρούν στη συμπεριφορά του και ειδικά στην απάντηση στο στρες. Η επίδραση των πρώιμων εμπειριών στη συμπεριφορική ανάπτυξη διαπιστώθηκε αρχικά με πειράματα σε τρωκτικά (Denenberg, 1963, Levine, 1962, Greenbough, 1975) και αργότερα ελέγχθηκε σε πρωτεύοντα είδη (Harlow and Harlow, 1965) και σε ανθρώπους (Ainsworth, 1969, Bowlby, 1965) με αποτέλεσμα να αλλάξει ο τρόπος σκέψης για την ανάπτυξη των παιδιών. Οι πρώιμες εμπειρίες θεωρούνται σήμερα ως ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες για τον καθορισμό της μελλοντικής προσαρμοστικής ικανότητας του ανθρώπου στις απαιτήσεις του περιβάλλοντος του καθώς και για την προδιάθεσή του για ψυχικές και σωματικές ασθένειες.

Η έρευνα στην Αναπτυξιακή Ψυχολογία βασίζεται σε δύο σημαντικές θεωρητικές παραδοχές. Η πρώτη θεωρεί ότι τα πρώιμα γεγονότα και οι εμπειρίες καθιστούν το βρέφος ικανό να δημιουργήσει ένα σύνολο χαρακτηριστικών και στρατηγικών που θα του είναι εξαιρετικά χρήσιμες κατά την προσαρμογή στο περιβάλλον που είναι πιθανό να συναντήσει στην ενήλικη ζωή του. Οι αλλαγές αυτές στη συμπεριφορά και στη στρατηγική αντιμετώπισης καταστάσεων που καθοδηγούνται και προκαλούνται από τις πρώιμες εμπειρίες, γίνονται στο πλαίσιο της κατάλληλης προσαρμογής σε ένα δεδομένο περιβάλλον. Η άλλη σημαντική παραδοχή είναι ότι κάθε οργανισμός είναι ιδιαίτερα ευάλωτος στην αλληλεπίδραση μεταξύ γονιδιώματος και περιβαλλοντικών ερεθισμάτων κατά τη διάρκεια συγκεκριμένων χρονικών περιόδων (κρίσιμες περίοδοι). Σε αυτές τις περιόδους, τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα μπορούν να επιφέρουν μόνιμες αλλαγές στην ανάπτυξη του εγκεφάλου και επομένως στη συμπεριφορά ενώ ανάλογα με την έντασή τους μπορούν να καταστήσουν τον οργανισμό ευάλωτο και ευπαθή σε ψυχικές νόσους (π.χ. κατάθλιψη, μετατραυματικό στρες) αλλά και σε σωματικές ασθένειες (π.χ. ορμονική απορρύθμιση, καρδιαγγειακά προβλήματα). Οι κρίσιμες περίοδοι είναι ως επί το πλείστον παρόμοιες για άτομα που ανήκουν στο ίδιο είδος αλλά υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ειδών.



Οι πρώιμες εμπειρίες μπορεί να είναι είτε προγεννητικές είτε μεταγεννητικές. Οι προγεννητικές εμπειρίες ενός οργανισμού περιλαμβάνουν τις εμπειρίες και τον τρόπο ζωής της εγκύου και μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη του εμβρύου είτε θετικά είτε αρνητικά. Επομένως η προγεννητική περίοδος κατά την οποία το έμβρυο και το κεντρικό νευρικό σύστημα αναπτύσσονται ταχύτατα είναι ιδιαίτερα κρίσιμη και γεγονότα κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου μπορούν να οδηγήσουν σε άμεσες φυσιολογικές αλλαγές στο εμβρυϊκό περιβάλλον. Αν οι αλλαγές στο εμβρυϊκό περιβάλλον είναι επιβλαβείς και παρεμποδίζουν τη φυσιολογική ανάπτυξη του οργανισμού υπάρχει πιθανότητα μεγαλύτερης προδιάθεσης για ψυχικές και άλλες ασθένειες. Η κακή διατροφή της εγκύου, η κατάχρηση ουσιών, το κάπνισμα, η κακή ψυχολογική κατάσταση κ.λ.π. είναι μόνο παραδείγματα των παραγόντων που μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά την ανάπτυξη ενός οργανισμού προγεννητικά. Επίσης η μόλυνση της μητέρας κατά την περίοδο της κύησης από κάποιον ιό ή βακτήριο συνδέεται με συγκεκριμένες νευροψυχιατρικές ασθένειες που ίσως έχουν αναπτυξιακή προέλευση όπως η σχιζοφρένεια (Brown et al., 2004, Mednick et al., 1988), ο αυτισμός (Miller et al., 2005) και η νοητική υστέρηση (Revello and Gerna, 2004).

Οι μεταγεννητικές πρώιμες εμπειρίες είναι εκείνες που βιώνει ένας οργανισμός μετά τη γέννησή του και εξαρτώνται κυρίως από τη σχέση του με τον/την τροφό του. Ανάλογα με την ποιότητα του μεταγεννητικού περιβάλλοντος και τη συμπεριφορά του/της τροφού μπορεί να ασκηθεί αρνητική ή θετική επίδραση στην ανάπτυξη του βρέφους. Παραδείγματα μεταγεννητικών εμπειριών που συνδέονται με αρνητικές επιδράσεις στην ανάπτυξη των γνωσιακών, συγκινησιακών και γενικά των προσαρμοστικών ικανοτήτων του οργανισμού είναι η παραμέληση, η κακοποίηση, η ανατροφή χωρίς τους γονείς σε ίδρυμα (ιδρυματισμός- hospitalism syndrome) κ.ά. Ιδιαίτερα για την τελευταία περίπτωση, είναι γνωστό ότι παιδιά που μεγάλωσαν σε τέτοιο στείρο, αυστηρό και ακατάλληλο περιβάλλον εμφάνισαν σοβαρές και πολλές φορές μόνιμες ελλείψεις στο λόγο καθώς και προβλήματα στην ανάπτυξη της κοινωνικής συμπεριφοράς και της προσωπικότητας.

## **1.6.2 Μοντέλα πρώιμων εμπειριών**

### **1.6.2.1 Νεογνικός χειρισμός**

Ένα από τα πιο γνωστά ζωικά μοντέλα πρώιμων μεταγεννητικών εμπειριών είναι αυτό του νεογνικού χειρισμού (neonatal handling). Στις αρχές της δεκαετίας του '50 ο Weininger (1954) πρώτος παρατήρησε ότι το χάιδεμα των νεογνών (neonatal gentling) για δέκα λεπτά κάθε μέρα τις τρεις πρώτες εβδομάδες της ζωής τους, μείωνε τη μετέπειτα συμπεριφορική εκδήλωση φόβου σε επίμυς. Η σημασία των πρώτων αυτών εμπειριών καταδείχθηκε πιο εμπεριστατωμένα όταν το 1959 οι Levine και Lewis έδειξαν πως η καθημερινή απομάκρυνση των νεογνών από τη μητέρα τους για 3 λεπτά είχε ανάλογα αποτελέσματα (νεογνικός χειρισμός).

Τα τρωκτικά στη φύση, όταν έχουν νεογνά είναι αναγκασμένα για κάποιες ώρες της ημέρας να εγκαταλείπουν τη φωλιά τους για αναζήτηση τροφής. Αυτό το πρότυπο της μητρικής απομάκρυνσης από τη φωλιά έχει μετατραπεί στα πλαίσια του εργαστηρίου στο μοντέλο του νεογνικού χειρισμού. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό τα νεογνά αποχωρίζονται τη μητέρα τους και τη φωλιά τους για 15 λεπτά μέχρι τον απογαλακτισμό (Levine, 1957).

Γενικά, αν το νεογνό απομακρυνθεί από τη μητέρα του για σχετικά μικρό χρονικό διάστημα υφίσταται μια περίοδο συμπεριφορικής ενεργοποίησης που χαρακτηρίζεται από αυξημένη κινητικότητα, καρδιακό και αναπνευστικό ρυθμό και παραγωγή υπέρηχων φωνήσεων (ultrasonic vocalizations). Αυτό το μοτίβο συμπεριφοράς αντιπροσωπεύει την αντίδραση των περισσότερων θηλαστικών που υποβάλλονται σε κοινωνική απομόνωση κατά τη νεογνική ηλικία και αποτελεί μια γενικευμένη έκφραση του άγχους αποχωρισμού (separation distress). Αυτός ο βραχύς αποχωρισμός (νεογνικός χειρισμός/neonatal handling) έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει την κινητικότητα των νεογνών και κατά την ενήλικη ζωή, μειώνει την αφόδευση (δείκτης φόβου και άγχους), τα επίπεδα κορτικοστερόνης και την απόκριση της φλοιοεπινεφριδιοτρόπου ορμόνης (ACTH) στο στρες. Επίσης ενισχύει το ρυθμό επαναφοράς της αντίδρασης της κορτικοστερόνης και ελαττώνει την έκφραση της CRH στον υποθάλαμο.

Ενήλικοι επίμυς οι οποίοι ως νεογνά είχαν υποβληθεί σε νεογνικό χειρισμό, στις περισσότερες μελέτες επιδεικνύουν μειωμένο φόβο σε δοκιμασίες ανοιχτού πεδίου (Open Field), μειωμένο άγχος σε δοκιμασίες όπως ο υπερυψωμένος λαβύρινθος σχήματος «+» (Elevated Plus Maze) (McIntosh et al., 1999, Meerlo et al., 1999), αυξημένη ανθεκτικότητα στην εμφάνιση καταθλιπτικών συμπεριφορών (Meaney et al., 1991) καθώς και βελτιωμένη μνήμη και μάθηση (Liu et al., 2000, Fenoglio et al., 2005). Στο

σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι το να δείχνουν τα ζώα αυτά μειωμένο άγχος και απαντητικότητα σε στρεσογόνα ερεθίσματα μπορεί να είναι μία αλλαγή η οποία στην πραγματικότητα να επηρεάζει αρνητικά και όχι θετικά την επιβίωσή τους.

#### **1.6.2.2 Μητρική αποστέρηση**

Ένα άλλο διαδεδομένο ζωικό μοντέλο για τη μελέτη των πρώιμων μεταγεννητικών εμπειριών είναι αυτό της μητρικής αποστέρησης (maternal deprivation). Αυτό το μοντέλο περιλαμβάνει την απομάκρυνση των νεογνών από τη μητέρα, καθημερινά κατά την περίοδο της γαλουχίας, αλλά για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από αυτό του νεογνικού χειρισμού (τουλάχιστον δύο ώρες ημερησίως). Αυτές οι παρατεταμένες ή επαναλαμβανόμενες περιόδους κοινωνικής απομόνωσης των νεογνών (μητρική αποστέρηση) οδηγούν σε επιβράδυνση των σχετιζόμενων με την ανάπτυξη ενζύμων, μειώσεις του καρδιακού ρυθμού, αυξημένη ευαισθησία του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (ΥΥΕ) (Rosenfeld et al., 1992) και στην ενήλικη ζωή μια γενικευμένη συμπεριφορική καταστολή ανάλογη με αυτή που εμφανίζεται κατά την κατάθλιψη.

Επίμυς που ως νεογνά εκτέθηκαν στο μοντέλο της μητρικής αποστέρησης αδυνατούν να ενταχθούν και να αλληλεπιδράσουν φυσιολογικά με άλλα μέλη του είδους (Lévy et al., 2003). Τελευταία, η μητρική αποστέρηση για παρατεταμένο χρονικό διάστημα έχει προταθεί και ως πιθανό ζωικό μοντέλο σχιζοφρένειας αφού εκτός από τις μεταβολές στη λειτουργία του άξονα ΥΥΕ, προκαλεί αλλαγές στην επεξεργασία ακουστικών ερεθισμάτων, αλλαγές στα νευροχημικά συστήματα του εγκεφάλου καθώς και στις γνωστικές λειτουργίες του ζώου κατά την ενηλικίωσή του (π.χ. χωρική μάθηση-μνήμη στο λαβύρινθο σχήματος T, ή στον υδάτινο λαβύρινθο κατά Morris) (Garner et al., 2007). Γενικά έχει βρεθεί ότι τα ζώα τα οποία ως νεογνά είχαν βιώσει μητρική αποστέρηση έχουν αυξημένα επίπεδα ACTH και γενικά αυξημένη απαντητικότητα σε στρεσογόνα ερεθίσματα κατά την ενήλικη ζωή (Dent et al., 2000).

Εναλλακτικό μοντέλο για τη μελέτη της επίδρασης της μητρικής αποστέρησης αποτελεί η μελέτη ζώων που έχουν κατά τη δοκιμασία απομακρυνθεί πλήρως και από τη μητέρα αλλά και από τα υπόλοιπα ζώα της φωλιάς. Στην περίπτωση αυτή, τα νεογνά τρέφονται τεχνητά με τη χρήση αντλίας (pump) και η θερμοκρασία του σώματος αλλά και η σίτιση ρυθμίζεται συστηματικά. Με αυτόν τον τρόπο δεν υφίσταται επανένωση και συνεπώς καθόλου επιπλέον μητρική διέγερση. Σε αυτές τις πρακτικές είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί προσομοίωση του περιβάλλοντος της φωλιάς δίνοντας στο απομονωμένο νεογνό ερεθίσματα γλειψίματος, μυρωδιές της φωλιάς και επαφή με άλλα νεογνά. Στις

λίγες μελέτες που έχει χρησιμοποιηθεί η παραπάνω μεθοδολογία έχουν αναφερθεί μακροχρόνιες επιδράσεις στο ζώο. Για παράδειγμα η ανατροφή χωρίς τη μητέρα οδηγεί σε αυξημένο άγχος στη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου και αλλάζει την ενήλικο κοινωνική και μητρική συμπεριφορά των υπό δοκιμασία ζώων. Επιπλέον στα ίδια ζώα φαίνεται ότι επηρεάζεται και η ικανότητά τους για χωρική μάθηση (Gonzalez et al., 2001).

### ***1.6.3 Υποθέσεις-προσεγγίσεις-εξηγήσεις της επίδρασης των πρώιμων εμπειριών***

Μία σημαντική υπόθεση των ερευνητών στην προσπάθειά τους να εξηγήσουν τις μεταβολές και τις αλλαγές στη συμπεριφορά και στην απάντηση του συστήματος του στρες που συμβαίνει σε ενήλικα ζώα τα οποία έχουν εμπειρία μητρικής αποστέρησης, νεογνικού χειρισμού ή άλλου παρόμοιου πρωτοκόλλου, είναι η υπόθεση της μητρικής μεσολάβησης (maternal mediation hypothesis) (Liu et al., 1997). Σύμφωνα με αυτή, ο πρώιμος χειρισμός ή η απομάκρυνση μπορεί να δρα έμμεσα στα νεογέννητα ζώα μέσω των συνεπειών τους στην αλληλεπίδρασή τους με την μητέρα τους (Barnett and Burn, 1967, Meaney, 2001). Πιο συγκεκριμένα, η συμπεριφορά της μητέρας προς τα νεογνά μεταβάλλεται όταν τα νεογνά επιστρέφουν στη φωλιά και μπορεί π.χ. να τα φροντίζει περισσότερο ή λιγότερο λόγω του δικού της άγχους. Αυτή η μεταβολή στο επίπεδο της φροντίδας μπορεί να μεταβάλει την απαντητικότητα του συστήματος του στρες των νεογνών.

Μια προσέγγιση της υπόθεσης αυτής είναι να εξετάσει κανείς τις συνέπειες των διαφόρων ειδών μητρικής φροντίδας που συμβαίνουν φυσικά σε νεογνά που δεν έχουν υποστεί χειρισμό. Οι μελέτες αυτές υποδεικνύουν ότι οι ενήλικοι απόγονοι μητέρων που φυσικά δείχνουν υψηλό επίπεδο φροντίδας και θηλάζουν πιο συχνά στην τοξωτή στάση θηλασμού (arched-back nursing – «ABN», τις ονομάζουμε υψηλές LG-ABN μητέρες) (εικόνα 7) μοιάζουν περισσότερο με τα νεογνά που έχουν υποστεί νεογνικό χειρισμό σε μετρήσεις συμπεριφορικών και ενδοκρινικών αποκρίσεων στο στρες. Αντίθετα απόγονοι που έχουν δεχθεί λιγότερη φροντίδα ή έχουν θηλάσει λιγότερο στη συγκεκριμένη στάση (χαμηλές LG-ABN μητέρες) μοιάζουν με τα νεογνά που δεν έχουν υποστεί νεογνικό χειρισμό. Ειδικότερα οι ενήλικοι απόγονοι των υψηλών LG-ABN μητέρων δείχνουν μειωμένο φόβο κάτω από συνθήκες ήπιου στρες και μέτρια απόκριση του άξονα ΥΥΕ, όπως αυτή προσδιορίζεται από τα χαμηλά επίπεδα της ACTH ή της κορτικοστερόνης στο πλάσμα του αίματος. Μελέτες στις οποίες νεογνά που γεννήθηκαν από υψηλές LG-ABN μητέρες δόθηκαν μετά τη γέννα σε χαμηλές LG-ABN μητέρες αποκαλύπτουν μια ευθεία σχέση ανάμεσα στη μητρική φροντίδα και στη μεταγεννητική ανάπτυξη των διαφορών στη

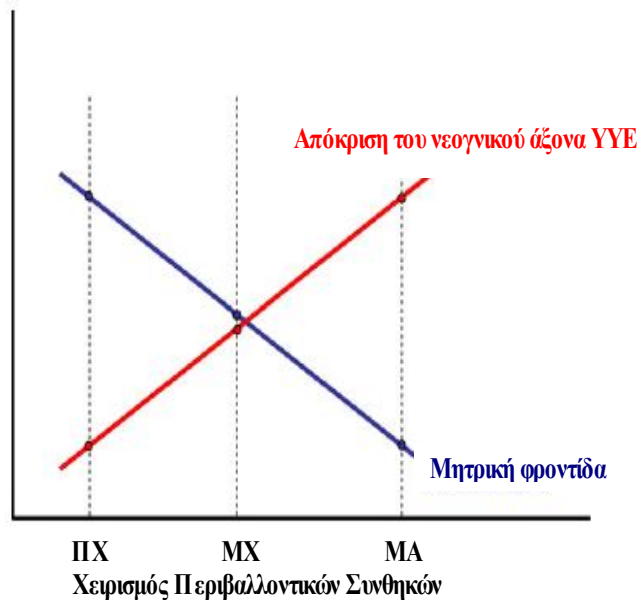
συμπεριφορική και ενδοκρινική απόκριση στο στρες αφού τα επίπεδα της ACTH και της κορτικοστερόνης ήταν αυξημένα και τα ζώα έδειχναν αυξημένο φόβο κάτω από καταστάσεις ήπιου στρες (Moshe Szyf et.al., 2005).



*Εικόνα 7: arched-back nursing – «τοξωτή στάση θηλασμού»*

Παρόλα αυτά η υπόθεση της μητρικής μεσολάβησης που θεωρεί ότι οι αλλαγές στη μητρική συμπεριφορά ευθύνονται για τα αποτελέσματα του πρώιμου χειρισμού στα νεογνά, δεν είναι σε θέση να εξηγήσει πλήρως την αναπτυξιακή πλαστικότητα του άξονα ΥΥΕ και των αποκρίσεων φόβου. Έτσι προστέθηκε ο παράγοντας του περιβαλλοντικού στρες π.χ. από τον αποχωρισμό από τη μητέρα που επιδρά ανεξάρτητα και αντίστροφα απ' ότι η μητρική συμπεριφορά στον άξονα ΥΥΕ και στις αποκρίσεις φόβου των νεογνών (εικόνα 8). Το μοντέλο που έχει προκύψει περιγράφει τα αποτελέσματα της αλληλεπίδρασης των δύο παραγόντων, της μητρικής συμπεριφοράς και του περιβαλλοντικού στρες, τόσο σε συνθήκες πρώιμου χειρισμού όσο και μητρικής αποστέρησης, παρέχοντας μια ερμηνεία του ευρήματος ότι απολύτως σταθερό και ασφαλές, αλλά και έντονα στρεσογόνο μητρικό περιβάλλον οδηγεί σε μεγάλη αντιδραστικότητα του άξονα ΥΥΕ και σε έντονες αποκρίσεις φόβου σε σχέση με ένα

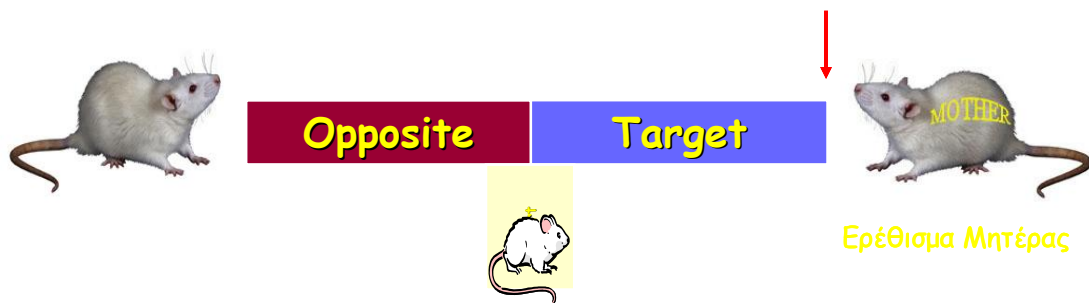
μητρικό περιβάλλον που προκαλεί μεσαίου βαθμού εγρήγορση στα νεογνά (Macri and Wurbel, 2006).



**Εικόνα 8:** Αλληλεπίδραση μεταξύ Απόκρισης του άξονα ΥΥΕ και Μητρικής φροντίδας, ανάλογα με τον χειρισμό των περιβαλλοντικών συνθηκών σε νεογνά. ΠΧ : Πρώμος Χειρισμός, ΜΧ: Μη Χειρισμός, ΜΑ: Μητρική Αποστέρηση

#### 1.6.4 Δοκιμασία λαβυρίνθου σχήματος T (T-maze)

Προκειμένου να μελετηθεί ένας εναλλακτικός τύπος νεογνικής εμπειρίας που περιλαμβάνει μια συνιστώσα μάθησης κατά τη νεογνική περίοδο, πριν ακόμα τα νεογνά ανοίξουν τα μάτια τους, σχεδιάστηκε στο εργαστήριο Βιολογίας-Βιοχημείας του τμήματος Νοσηλευτικής μια καινοτόμος διαδικασία κατά την οποία τα νεογνά εκπαιδεύονται σε λαβύρινθο σχήματος T. Κάθε ένα από τα νεογνά τοποθετείται στο σημείο έναρξης του λαβύρινθου και στη διάρκεια 60 δευτερολέπτων προσπαθεί να εντοπίσει τη μητέρα. Η επιτυχής επαφή με τη μητέρα θεωρείται ως θετικό ενθαρρυντικό ερέθισμα ενώ αντίθετα η αποτυχία επαφής μαζί της ως στέρηση ανταμοιβής (Panagiotaropoulos et al., 2009) (Για περισσότερες λεπτομέρειες βλέπε Υλικά και Μέθοδοι σελ. 38). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι το να κάνουν τη σωστή επιλογή κατεύθυνσης αποτελεί ένα σημαντικό συστατικό της συμπεριφοράς των νεογνών αφού είναι απαραίτητο για να εξερευνήσουν το μικροπεριβάλλον της φωλιάς αλλά και για την επαφή τους με τη μητέρα ώστε να σχηματιστεί ο δεσμός μητέρας- νεογνού.



Εικόνα 9: Πειραματική διάταξη κατά την εκπαίδευση των νεογνών (Panagiotaropoulos, 2009)

Κατά τη νεογνική περίοδο, τα ζώα που ακόμα έχουν άμεσα την ανάγκη της μητέρας για την επιβίωσή τους σχηματίζουν έναν δεσμό επαφής με τη μητέρα τους και η μητρική αυτή επαφή αποτελεί μια σημαντική πηγή περιβαλλοντικών ερεθισμάτων. Η σίτιση των νεογνών από τη μητέρα, ο θηλασμός καθώς και η μητρική φροντίδα, η περιποίηση και το γλείψιμο (licking και grooming) αποτελούν ένα θετικό και ενθαρρυντικό ερέθισμα, ενώ αντίθετα η άρνηση της μητρικής επαφής επιδρά ως αρνητικό και ματαιωτικό ερέθισμα. Πριν τα νεογνά ανοίξουν τα μάτια τους, κάτι που συμβαίνει μεταξύ της 13ης και 14ης ημέρας, τα νεογνά αλληλεπιδρούν με τα υπόλοιπα νεογνά της φωλιάς και κυρίως με τη μητέρα τους μέσω απτικών, οσφρητικών και ακουστικών ερεθισμάτων. Αυτά τα ερεθίσματα αποτελούν τις πρώτες εμπειρίες μάθησης που εστιάζουν κυρίως στο σχηματισμό και τη διατήρηση του δεσμού με τη μητέρα και χαράζουν τα πρώτα μονοπάτια μνήμης. Το να ψάχνει το νεογνό για τη μητέρα του για να έρθει σε επαφή μαζί της είναι ένα πολύ ισχυρό ένστικτο με μεγάλη σημασία για την επιβίωση του ζώου (Leon, 1992). Έγινε λοιπόν η υπόθεση ότι το ενθαρρυντικό ερέθισμα επιβράβευσης (η επαφή με τη μητέρα) μπορεί να εξυπηρετήσει τη μάθηση του μονοπατιού σε έναν λαβύρινθο σχήματος T, να στρίψει δηλαδή το νεογνό από το σημείο έναρξης στο λαβύρινθο προς τη μητέρα ακολουθώντας ένα μονοπάτι που οδηγεί προς αυτήν (ομάδα REW). Μέσα από επαναλαμβανόμενες δοκιμασίες τα νεογνά αναμένεται ότι θα αναπτύξουν διαδικαστικού τύπου μνήμη, ανεξάρτητα από την παρουσία του ερεθίσματος. Από την άλλη μεριά, η άρνηση της αναμενόμενης ανταμοιβής μέσω της στέρησης της επαφής με τη μάνα (ομάδα

DER) δεν ευνοεί στο να μάθει το νεογνό να κάνει τη σωστή επιλογή μονοπατιού στο λαβύρινθο.

Προκειμένου να διερευνηθεί η νευρωνική ενεργοποίηση στον εγκέφαλο των νεογνών πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία χρησιμοποιώντας το ογκογονίδιο c-Fos, ένα ογκογονίδιο που θεωρείται δείκτης νευρωνικής ενεργότητας. Όταν τα νεογνά εκπαιδεύτηκαν στην παραπάνω διαδικασία για 4 μέρες (κατά τη 10<sup>η</sup> με 13<sup>η</sup> ημέρα ζωής), τα ζώα υπό ανταμοιβή έμαθαν να σχετίζουν το δεξιό βραχίονα του λαβυρίνθου με την παρουσία της μητέρας και μέσα από την επαναλαμβανόμενη εκπαίδευση τα ζώα όντως ανέπτυξαν μια διαδικαστικού τύπου μνήμη. Στα ζώα που επιβραβεύτηκαν με την επαφή τους με τη μητέρα τα επίπεδα του c-Fos ήταν αυξημένα στο ραχιαίο ραβδωτό σώμα σε σχέση με τα ζώα με το ματαιωτικό ερέθισμα. Είναι αξιοσημείωτο ότι και τα ζώα που υπέστησαν ματαίωση καταφέρνουν επίσης να μάθουν τη θέση της μητέρας αν και λιγότερο αποτελεσματικά σε σχέση με τα ζώα υπό ανταμοιβή.

Τα ζώα αυτά είχαν επίσης αυξημένη ενεργοποίηση της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου καθώς και του προμετωπιαίου φλοιού όπως φάνηκε από ανοσοϊστοχημεία τομών εγκεφάλου για το c-Fos (Panagiotaropoulos et al., 2009). Όπως είναι γνωστό, η μη ανταμοιβή του ζώου, όταν αυτή αναμένεται, αποτελεί ένα ματαιωτικό ερέθισμα για το ζώο και φέρει ποικιλία επιπτώσεων όπως καταστολή μιας ενεργής συμπεριφοράς, συμπεριφορική ακαμψία, εμμονή και παροδική αύξηση της κινητικότητας (Amsel, 1992). Αξίζει να σημειωθεί, ότι ενώ η παράλειψη της ανταμοιβής οδηγεί σε παροδικά αυξημένη κινητικότητα, η καθυστέρηση της ανταμοιβής (καθώς στο πείραμα το ζώο επιστρέφει στη φωλιά μετά το πέρας περίπου 15 λεπτών) οδηγεί σε πτώση της κινητικότητας που οδηγεί σε μείωση της απόδοσης στη δοκιμασία.

Στη δοκιμασία μνήμης, απουσία της μητέρας, τα νεογνά που δεν είχαν ανταμοιβή κατά την εκπαίδευση δεν έδειξαν καμία προτίμηση για το βραχίονα στον οποίο βρισκόταν η μητέρα κατά την εκπαίδευση, γεγονός που μπορεί να θεωρηθεί ως ανεπιτυχής ανάκτηση μνήμης ή λήθη. Η ερμηνεία αυτή ωστόσο, μπορεί να είναι παραπλανητική, καθώς η μη επιτυχής συμπεριφορά δεν σημαίνει απαραίτητα ελλειμματική μάθηση ή μνήμη αλλά μπορεί να αντικατοπτρίζει μια αναστολή της συμπεριφοράς λόγω της έλλειψης κινήτρου για το ζώο (Panagiotaropoulos et al., 2009).

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, στα DER ζώα υπήρχε μεγαλύτερη ενεργοποίηση στη CA1 περιοχή του ιπποκάμπου. Η περιοχή αυτή θεωρείται ότι δρα ως ανιχνευτής των ασυμφωνιών ανάμεσα στο αναμενόμενο, το οποίο αποθηκεύεται ως πληροφορία στην οδοντωτή έλικα και στην περιοχή CA3 και στην πληροφορία για το περιβάλλον που



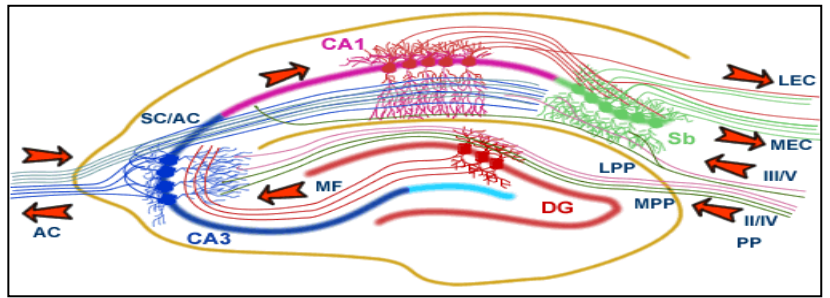
εισέρχεται από τον ενδορινικό φλοιό (Vinogradova, 2001). Στη συγκεκριμένη δοκιμασία, η ασυμφωνία προκύπτει λόγω του ότι αφενός υπάρχει αντίληψη της οσμής της μάνας και πιθανώς ακουστικών πληροφοριών στη συγκεκριμένη χωρική διάταξη στο λαβύρινθο αλλά αφετέρου το ζώο βιώνει την άρνηση της ανταμοιβής όταν φτάσει στο σημείο που βρίσκεται η μάνα. Από την άλλη, δεδομένου ότι η CA1 εμπλέκεται στην μάθηση και μνήμη μέσω πλαισίου, η ενεργοποίηση της περιοχής αυτής στα DER ζώα μπορεί να υποδηλώνει επεξεργασία της πληροφορίας πλαισίου που απορρέει από την παρουσία της μάνας. Αντίθετα, τα μειωμένα επίπεδα ενεργοποίησης στα RER ζώα πιθανόν να αντικατοπτρίζουν μειωμένη ευαισθησία στα στοιχεία της μάνας ως αποτέλεσμα της συνεχούς ενθάρρυνσης που δέχτηκαν και άρα να πραγματοποιούν χαμηλότερη κωδικοποίηση του πλαισίου/περιεχομένου της δοκιμασίας.

### **1.7 Εγκεφαλικές περιοχές και η λειτουργία τους**

Στον άνθρωπο ο προμετωπιαίος φλοιός ή προμετωπιαία περιοχή αποτελεί το μεγαλύτερο τμήμα του μετωπιαίου λοβού. Διαιρείται σε τρεις περιοχές, το ραχιαίο, τον έσω και τον κάτω ή κοιλιακό ή κογχικό προμετωπιαίο φλοιό. Πρόκειται για μια συνειρμική περιοχή που απαρτιώνει τις αισθητικές πληροφορίες από τον προκινητικό φλοιό και τις συνειρμικές περιοχές του βρεγματικού και κροταφικού φλοιού. Δεν συμμετέχει στη διεκπεραίωση διαφόρων μερών της κίνησης ή στις κινητικές συνδέσεις των μυών αλλά ελέγχει συνολικά τον κινητικό προγραμματισμό προσδίδοντας ευελιξία και προσαρμοστικότητα στην κινητική δραστηριότητα. Έτσι τροποποιεί και προσαρμόζει τη συμπεριφορά ανάλογα με τα δεδομένα, τα γεγονότα και τις απαιτήσεις του ίδιου του οργανισμού αλλά και του εξωτερικού περιβάλλοντος. Επίσης συνδέεται με το μεταιχμιακό σύστημα και μέσω αυτής της σύνδεσης ελέγχει τη συγκινησιακή-συναισθηματική πλευρά της συμπεριφοράς. Για το λόγο αυτό βλάβες του προμετωπιαίου φλοιού συνεπάγονται αλλαγές σε βασικές πλευρές της προσωπικότητας και της κοινωνικής συμπεριφοράς (π.χ. νωθρότητα, έλλειψη ενδιαφέροντος για τις συνέπειες των πράξεων, μωρία, απρεπή συμπεριφορά) (Παναγής, 2002).

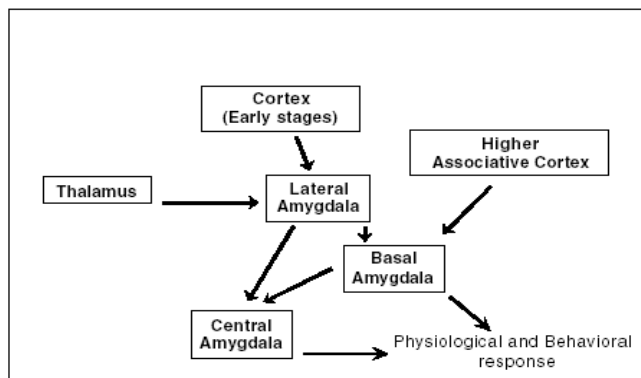
Ο υπόκαμπος (εικόνα 10) έχει σημαντικό ρόλο στην αποθήκευση και στην ανάκληση νέων πληροφοριών που εμπíπτουν στον τύπο της δηλωτικής ή έκδηλης μνήμης (μνήμη γεγονότων και εμπειριών και οι σχετικές με αυτά πληροφορίες). Αφαίρεση ή βλάβη του υπόκαμπου έχει ως αποτέλεσμα αδυναμία μεταφοράς νέων πληροφοριών στη μακροπρόθεσμη μνήμη. Μελέτες σε πειραματόζωα έχουν δείξει ότι συμμετέχει επίσης

στην κωδικοποίηση οπτικοχωροταξικών πληροφοριών και στην αντίληψη του χώρου (Παναγιής, 2002). Ο ιππόκαμπος εμπλέκεται και στην παθοφυσιολογία της σχιζοφρένειας (Arnold et al., 1995).



Εικόνα 10: Ο ιπποκάμπιος σχηματισμός

Η αμυγδαλή είναι ένα σύμπλεγμα πυρήνων σχήματος αμυγδάλου που διακρίνεται στο σύμπλεγμα των βασικών-έξω αμυγδαλικών πυρήνων (basolateral, lateral), στον κεντρικό (central) πυρήνα και στους έσω πυρήνες (medial). Η αμυγδαλή συνδέεται αμφίδρομα με τον υποθάλαμο, το θάλαμο, τον ιππόκαμπο και το φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων.



Εικόνα 11: Μοντέλο παράλληλης επεξεργασίας συναισθηματικά

φορτισμένων πληροφοριών, στο οποίο αυξάνεται σταδιακά η πολυπλοκότητα και ο συσχετισμός της εισερχόμενης πληροφορίας από τον έξω πυρήνα της αμυγδαλής (basolateral nuclei) στο βασικό (lateral nuclei).

Οι βασικοί-έξω (basolateral) πυρήνες αποτελούν τη θέση εισόδου αισθητικών και σπλαχνικών πληροφοριών στην αμυγδαλή, στις οποίες αυτή προσθέτει συναισθηματικό περιεχόμενο-νόημα. Οι έσω (medial) πυρήνες δέχονται προβολές κυρίως από τους οσφρητικούς βολβούς σχετικές με την όσφρηση και από το εγκεφαλικό στέλεχος πληροφορίες σχετικές με σπλαχνικές αισθήσεις, πόνο, γεύση και όσφρηση, πιθανότατα προσδίδοντας συναισθηματική χροιά σε αυτές τις αισθήσεις. Εξάλλου είναι γνωστό ότι οι έσω αμυγδαλικοί πυρήνες προβάλλουν στον υποθάλαμο που ελέγχει διεργασίες σχετικές με τη λήψη τροφής. Τέλος ο κεντρικός (central) πυρήνας αποτελεί την κύρια έξοδο της

αμυγδαλής. Οι προβολές του καταλήγουν στον υποθάλαμο και σε περιοχές του εγκεφαλικού στελέχους που ρυθμίζουν τις αντιδράσεις του αυτόνομου νευρικού συστήματος σε καταστάσεις συναισθηματικής φόρτισης. Μέσω της σύνδεσής του με τον κογχικό μετωπιαίο φλοιό και την έλικα του προσαγωγίου συντελεί στη συνειδητοποίηση των συναισθημάτων και ιδιαίτερα του άγχους (εικόνα 11) (Παναγής, 2002). Συνολικά η αμυγδαλή συμμετέχει στο συναίσθημα (ειδικά στο στρες, το άγχος και το φόβο), στα κίνητρα και στην ανταμοιβή και επηρεάζει τη λειτουργία του αυτόνομου νευρικού συστήματος. Αμφοτερόπλευρη αφαίρεσή της προκαλεί συναισθηματικές αλλαγές όπως επίπεδο συναίσθημα και καταργεί τις αντιδράσεις φόβου (Παναγής, 2002).

## 2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο εγκέφαλος των θηλαστικών συνεχίζει να αναπτύσσεται και μετά τη γέννηση και συγκεκριμένα στην πρώιμη νεογνική ηλικία διαμορφώνονται και ωριμάζουν οι πιο πρόσφατες εξελικτικά περιοχές (Pechtel και Pizzagalli, 2011). Μεταξύ αυτών και οι περιοχές του προμετωπιαίου φλοιού, υπεύθυνες για τις ανώτερες γνωστικές λειτουργίες (Leh et al 2010) αλλά και του ιππόκαμπου που παίζει σημαντικό ρόλο στην ικανότητα προσαρμογής σε στρεσογόνες καταστάσεις αλλά και στην ικανότητα μάθησης και μνήμης (Chandramohan et al 2007).

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζει την ανάπτυξη του νεογνικού εγκεφάλου αλλά και όλη τη μετέπειτα εξέλιξή του είναι η μητρική επαφή. Στην προσπάθεια μελέτης των συμπεριφορικών μηχανισμών της ενίσχυσης ή της ματαίωσης μέσω της μητρικής επαφής κατά τη νεογνική ηλικία, αναπτύχθηκε ένα νέο ζωικό μοντέλο βασισμένο στην έκθεση νεογνών επίμυων (ηλικίας 10-13 ημερών) σε έναν λαβύρινθο σχήματος T (T-maze), στην άκρη του ενός βραχίονα του οποίου βρίσκεται το κλουβί με την μητέρα και στην άκρη του άλλου βραχίονα ένα κλουβί με ένα άσχετο, παρθένο θηλυκό. Το μοντέλο αυτό αντιμετωπίζεται ως ήπιο κοινωνικό στρες, όπου η μία ομάδα «επιβραβεύεται» μέσω της μητρικής επαφής, ενώ η άλλη «ματαιώνεται» μέσω της μη-ενίσχυσης από την παρεμπόδιση της αναμενόμενης μητρικής επαφής.

Το μοντέλο αναπτύχθηκε στο εργαστήριο Βιολογίας-Βιοχημείας του Τμήματος Νοσηλευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών στο πλαίσιο της διδακτορικής διατριβής του Θ. Παναγιωταρόπουλου (2005).

Οι Aston-Jones (1985) και Redmond (1987) με πειράματα σε τρωκτικά, έδειξαν ότι το νοραδρενεργικό σύστημα του εγκεφάλου εμπλέκεται στην απόκριση του οργανισμού στο στρες. Στους ανθρώπους, το νοραδρενεργικό σύστημα στον εγκέφαλο θεωρείται ότι παίζει έναν σημαντικό ρόλο στην προσοχή, τον ύπνο/έγερση, τη μάθηση και μνήμη, το συναίσθημα, την αναπαραγωγή και κεντρικές αποκρίσεις στο στρες (Berridge and Waterhouse, 2003, Sara, 2009). Τα σώματα των νευρώνων του νοραδρενεργικού συστήματος του εγκεφάλου έντοπίζονται στον υπομέλανα τόπο και μια μεγάλη ποικιλία στρεσογόνων παραγόντων αυξάνει τη δραστηριότητα των νευρώνων αυτών (Belujon and Grace, 2011). Στο εργαστήριο Βιολογίας-Βιοχημείας του Τμήματος Νοσηλευτικής, έχει βρεθεί ότι η νοραδρεναλίνη, ο κύριος νευροδιαβιβαστής, που συνδέεται με διάφορες λειτουργίες όπως ο ύπνος, η μνήμη, η μάθηση και τα συναισθήματα, είναι αυξημένη στα

ενήλικα «επιβραβεύμενα» σε σχέση με τα «ματαιωμένα» και τα ζώα ελέγχου σε όλες τις περιοχές του εγκεφάλου τους.

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι να εξετάσει το κατά πόσο η νεογνική εκπαίδευση επίμυων στον λαβύρινθο σχήματος «T» δύναται να επηρεάσει τη χωρική και την ποσοτική κατανομή των αδρενεργικών υποδοχέων ή να επιφέρει αλλαγές στη λειτουργικότητά τους, στον εγκέφαλο νεογνών και ενήλικων επίμυων. Μελετήθηκαν οι β1 και α2A υπότυποι των αδρενεργικών υποδοχέων. Πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός των υπότυπων σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου (προμετωπιαίος φλοιός, ιππόκαμπος και αμυγδαλή) νεογνών που εκτέθηκαν στο παραπάνω πειραματικό μοντέλο και ενήλικων ζώων που ως νεογνά είχαν εκτεθεί επίσης στο παραπάνω πειραματικό μοντέλο. Επίσης εξετάστηκαν τα επίπεδα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα σε pmol/gr πρωτεΐνη στις ίδιες περιοχές του εγκεφάλου που αναφέρθηκαν παραπάνω, με τη μέθοδο της *in vitro* πρόσδεσης ραδιοσημασμένου δεσμευτή για τον β1-αδρενεργικό υποδοχέα. Οι περιοχές επιλέχθηκαν επειδή έχει δειχθεί σε προηγούμενες μελέτες ότι επηρεάζονται τόσο από το συγκεκριμένο μοντέλο που χρησιμοποιήσαμε (Panagiotaropoulos et al., 2009, Diamantopoulou et al., 2011 ) όσο και εν γένει από τις πρώιμες εμπειρίες (Roth et al., 2011). Η επιλογή μελέτης των συγκεκριμένων υπότυπων βασίστηκε στα αποτελέσματα μελετών που δείχνουν ότι α) οι β1 και οι α2 εντοπίζονται κυρίως στον εγκέφαλο των αρουραίων (Duncan et al., 1991, Pittman et al., 1979) και β) χορήγηση β1ανταγωνιστών και α2 αγωνιστών ανακουφίζουν στους ανθρώπους τα συμπτώματα του άγχους (Charney, 2003), που είναι γνωστό ότι επηρεάζεται από τις πρώιμες εμπειρίες.

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα πειράματα της παρούσας μελέτης ήταν επίμυς στελέχους **Wistar**, που ανατράφηκαν στην αποικία πειραματόζωων του εργαστηρίου Βιολογίας-Βιοχημείας του Τμήματος Νοσηλευτικής. Οι συνθήκες διαβίωσης των πειραματόζωων ήταν σταθερές και ελεγχόμενες, με σταθερή θερμοκρασία 24°C και σταθερό κύκλο φωτισμού (8:00- 20:00 φως και 20:00- 8:00 σκοτάδι). Τα πειραματόζωα είχαν ad libitum πρόσβαση σε τροφή και νερό.



Οι επίμυς του στελέχους Wistar αποτελούν ένα ετερόμικτο στέλεχος αλφικών επίμων που ανήκουν στο είδος *Rattus norvegicus*. Το στέλεχος αναπτύχθηκε στο Ίδρυμα Wistar με σκοπό να χρησιμοποιηθεί για έρευνα βιολογικού και ιατρικού περιεχομένου και αποτελεί το πρώτο στέλεχος που αναπτύχθηκε για να υπηρετήσει το σκοπό αυτό σε μια περίοδο που όλα τα εργαστήρια χρησιμοποιούσαν μύς του είδους *Mus musculus* ως πειραματόζωα.

#### 3.2 ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΥΠΟ ΣΥΝΕΧΟΜΕΝΗ ΜΑΤΑΙΩΣΗ Ή ΣΥΝΕΧΟΜΕΝΗ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΚΑΤΑ ΤΗ ΝΕΟΓΝΙΚΗ ΗΛΙΚΙΑ

Η εκπαίδευση υπό συνεχόμενη ματαίωση ή συνεχόμενη ενίσχυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας έναν λαβύρινθο σχήματος T (T-maze) προσαρμοσμένο στο μέγεθος των νεογνών επίμων. Το κουτί έναρξης (start box) του λαβυρίνθου είχε διαστάσεις 8 x 6 εκατοστά και οδηγούσε άμεσα, χωρίς την παρεμβολή κάποιου διαχωριστικού, σε δύο βραχίονες οι οποίοι οδηγούσαν σε δύο ξεχωριστά κλουβιά. Συγκεκριμένα, ο δεξιός βραχίονας του λαβυρίνθου οδηγούσε σε ένα κλουβί με διαστάσεις 30 x 22 εκατοστά, στρωμένο με ροκανίδι, μέσα στο οποίο βρισκόταν η μητέρα των νεογνών. Ο αριστερός βραχίονας του λαβυρίνθου οδηγούσε σε ένα δεύτερο κλουβί, ίδιων διαστάσεων με το πρώτο, στρωμένο επίσης με ροκανίδι, μέσα στο οποίο βρισκόταν ένα άλλο, παρθένο, θηλυκό ζώο. Το πλάτος των δύο βραχιόνων ήταν 7 εκατοστά ενώ το μήκος τους ήταν συνολικά 70 εκατοστά, το οποίο αντιστοιχούσε σε 30 εκατοστά για κάθε βραχίονα και 10

εκατοστά για την περιοχή που αποτελούσε την άμεση προέκταση του κουτιού έναρξης. Στο τέλος του δεξιού βραχίονα μια μικρή ανασυρόμενη θυρίδα με διαστάσεις 9 x 11 εκατοστά οδηγούσε στο εσωτερικό του κλουβιού της μητέρας.



Εικόνα 12: Σχηματική κάτοψη της πειραματικής διάταξης για τη μελέτη της επίδρασης της ενίσχυσης κατά τη νεογνική ηλικία στη μάθηση και μνήμη.

Για την εκπαίδευση χρησιμοποιήθηκαν αρσενικά και θηλυκά πειραματόζωα ηλικίας 10-13 ημερών. Ως πρώτη μεταγεννητική ημέρα (postnatal day 1, P1) ορίστηκε η πρώτη ημέρα μετά τη γέννηση των ζώων. Πριν από τη γέννησή τους, όλα τα πειραματόζωα κάθε γέννας, κατατάσσονταν τυχαία σε μία από τις δύο κατηγορίες (ματαίωση ή ενίσχυση).

Τα πειραματόζωα που εκτέθηκαν στη συνεχόμενη ενίσχυση, υποβλήθηκαν σε δέκα δοκιμασίες καθημερινά (σύνολο 40 δοκιμασίες για τις τέσσερις ημέρες εκπαίδευσης). Αρχικά, η μητέρα των πειραματόζωων απομακρυνόταν από το κλουβί μέσα στο οποίο διαβίωνε με τα νεογνά και τοποθετούνταν στο δεξιό κλουβί της πειραματικής διάταξης του λαβυρίνθου σε σχήμα T. Στη συνέχεια, όλα τα ζώα της γέννας τοποθετούνταν επίσης στο δεξιό κλουβί της πειραματικής διάταξης. Έπειτα, με τη σειρά, κάθε νεογνό τοποθετούνταν στη θέση έναρξης του λαβυρίνθου και παρέμενε σε αυτόν για 60 δευτερόλεπτα. Όταν το πειραματόζωο έβρισκε το κλουβί της μητέρας, η θυρίδα του κλουβιού άνοιγε και το πειραματόζωο έμπαινε μέσα στο κλουβί. Τη χρονική στιγμή εύρεσης του κλουβιού της μητέρας η καταγραφή των συμπεριφορικών δεδομένων σταματούσε. Σε κάθε άλλη περίπτωση μη-εύρεσης του κλουβιού της μητέρας, η καταγραφή των συμπεριφορικών δεδομένων σταματούσε αμέσως μετά την ολοκλήρωση των 60 δευτερολέπτων και ο πειραματιστής οδηγούσε με απαλές κινήσεις το πειραματόζωο στην είσοδο του κλουβιού της μητέρας. Εκεί η θυρίδα άνοιγε και το ζώο έμπαινε μέσα στο κλουβί. Μετά το τέλος κάθε δοκιμασίας ο λαβύρινθος καθαριζόταν με διάλυμα αιθυλικής αλκοόλης προκειμένου να απομακρυνθούν οι οσμές που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν από τα

πειραματόζωα προκειμένου να προσανατολιστούν στο χώρο. Στη συνέχεια, ο πειραματιστής έπαιρνε το επόμενο πειραματόζωο από το κλουβί με τη μητέρα και το τοποθετούσε στη θέση έναρξης. Όταν όλα τα πειραματόζωα είχαν εκτεθεί στην πρώτη διαδικασία με τον ίδιο τρόπο εκτίθονταν και στη δεύτερη κ.ο.κ. Στο τέλος των δέκα δοκιμασιών, η μητέρα των πειραματόζωων και αμέσως μετά τα πειραματόζωα, επέστρεφαν στο κλουβί διαβίωσής τους και στο δωμάτιο των πειραματόζωων.

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

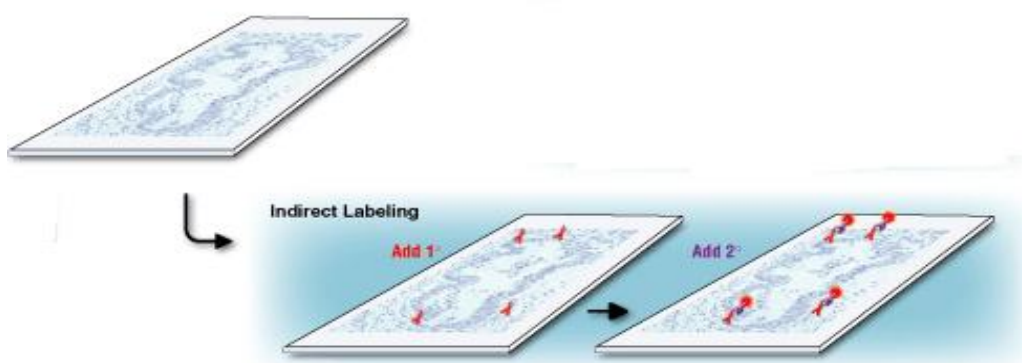
Σημειώνεται ότι στη συνθήκη της ματαίωσης, η θυρίδα παρέμενε κλειστή, ενώ παράλληλα υπήρχε η προσθήκη ενός δεύτερου συρμάτινου πλέγματος μπροστά από αυτή. Η τροποποίηση αυτή έγινε προκειμένου να αυξηθεί η απόσταση μεταξύ κλουβιού και πειραματόζωου στην άκρη του βραχίονα (2 εκατοστά), με σκοπό την απουσία απτικών ερεθισμάτων από τη μητέρα προς το νεογνό. Γίνεται αντιληπτό ότι το πειραματόζωο κατά τη διάρκεια της έκθεσής του στο λαβύρινθο δεν είχε οπτικά ή απτικά ερεθίσματα από τη μητέρα που να το οδηγούν προς το κλουβί. Τα οπτικά ερεθίσματα απουσίαζαν καθώς οι επίμυς στελέχους Wistar έχουν τα μάτια τους κλειστά έως και τη 13<sup>η</sup> μεταγεννητική ημέρα (ανοίγουν τα μάτια τους περίπου κατά την 14<sup>η</sup> μεταγεννητική ημέρα). Αν και δεν υπήρχε



δυνατότητα ελέγχου της συμβολής των εξωτερικών ερεθισμάτων στη συμπεριφορά του πειραματόζωου φαίνεται ότι ο προσανατολισμός γινόταν βάσει ιδιοδεκτικών ερεθισμάτων, πιθανόν από τα τοιχώματα του λαβυρίνθου καθώς και μέσω οσφρητικών. Μετά 2 ώρες από την τελευταία δοκιμασία, ακολουθούσε η δοκιμασία ελέγχου μνήμης όπου κάθε νεογνό αφήνεται στη θέση έναρξης του λαβυρίνθου και στη διάρκεια 60 δευτερολέπτων προσπαθεί να προσανατολιστεί προς την κατεύθυνση που προηγουμένως βρισκόταν το κλουβί της μητέρας. Τα κλουβιά με τα δύο θηλυκά εκατέρωθεν του λαβύρινθου έχουν απομακρυνθεί.

### 3.3 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΟΣ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ

Σε αυτή την τεχνική γίνεται χρήση ενός αντισώματος προκειμένου να γίνει σύνδεση ενός κυτταρικού αντιγόνου με έναν ιχνηθέτη ώστε να καθίσταται δυνατή η παρατήρηση του αντιγόνου με το μικροσκόπιο.



*Εικόνα 13: Στην εικόνα φαίνεται σχηματικά η χρήση του πρώτου αντισώματος (σκούρο κόκκινο χρώμα), ειδικό για το κυτταρικό αντιγόνο και η χρήση ενός δεύτερου αντισώματος (μωβ χρώμα), το οποίο χρησιμοποιείται για τη σύνδεση του ιχνηθέτη (ανοιχτό κόκκινο χρώμα) και καθιστά εύκολη την παρατήρηση της κατανομής του αντιγόνου.*

### **3.3.1 Παρασκευή Δειγμάτων Ενήλικων Ζώων**

Μεταξύ 90<sup>ης</sup> και 100<sup>ης</sup> ημέρας μετά τη γέννηση και ενώ τα πειραματόζωα, αρσενικά και θηλυκά βρίσκονταν σε βαθιά αναισθησία με τη χρήση χλωράλης (400mg/kg βάρους σώματος), αυτά θυσιάζονταν.

Αμέσως μετά τη θυσία, οι εγκεφαλοι των πειραματόζωων αφαιρούνταν και εμβαπτίζονταν σε ισοπεντάνιο (-30° C) για 5 λεπτά της ώρας και στη συνέχεια αποθηκεύονταν στους -80° C.

Στεφανιαίες τομές (coronal) πάχους 20 μm κόβονταν σε ψυχόμενο μικροτόμο, συλλέγονταν σε αντικειμενοφόρους πλάκες καλυμμένες με σιλάνιο (2% 3-αμινοπροπυλτριοξοσιλάνιο της Sigma, διαλυμένο σε ακετόνη) και φυλάσσονταν στους -80° C.

### **3.3.2 Παρασκευή Δειγμάτων Νεογνών**

Τη 13<sup>η</sup> μεταγεννητική ημέρα, 2 ώρες μετά την τελευταία δοκιμασία εκπαίδευσης κι αμέσως μετά τη δοκιμασία ελέγχου μνήμης στο λαβύρινθο σχήματος T, αρσενικά και θηλυκά πειραματόζωα θυσιάζονταν με αποκεφαλισμό. Αμέσως μετά τη θυσία, οι εγκεφαλοι των πειραματόζωων αφαιρούνταν και εμβαπτίζονταν σε ισοπεντάνιο (-30° C) για 5 λεπτά της ώρας και στη συνέχεια αποθηκεύονταν στους -80° C.

Στεφανιαίες τομές (coronal) πάχους 20 μm κόβονταν σε ψυχόμενο μικροτόμο, συλλέγονταν σε αντικειμενοφόρους πλάκες καλυμμένες με σιλάνιο (2% 3-αμινοπροπυλτριοξοσιλάνιο της Sigma, διαλυμένο σε ακετόνη) και φυλάσσονταν στους -80° C.

### **3.3.3 Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός του β1 αδρενεργικού υποδοχέα (β1-AR)**

Ο ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός πραγματοποιήθηκε σε εγκεφάλους νεογνών και ενήλικων ζώων. 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% παραφορμαλδεΰδη σε 0,1 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) pH 7,4 στους 4° C. Ακολουθούσαν 3 ξεπλύματα σε PBS, 5 λεπτά το καθένα, σε θερμοκρασία δωματίου και ακόμα δύο (5 και 10 λεπτών) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH7,4 , που περιείχε απορρυπαντικό Triton X- 100 συγκέντρωσης 0,2% για την αύξηση της διεισδυτικότητας των αντισωμάτων. Ακολούθως, οι τομές επωάσθησαν με ένα διάλυμα παρεμπόδισης της μη ειδικής σύνδεσης των αντισωμάτων στον ιστό (διάλυμα PBS, το οποίο περιείχε τον απαιτούμενο ορό κατσίκας, NGS, σε συγκέντρωση 10% καθώς

και 0,2% Triton X-100 ) για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Αμέσως μετά, και χωρίς να μεσολαβήσει πλύσιμο των τομών, οι τομές επώασθησαν στους 4° C με διάλυμα που περιέχει το πρώτο αντίσωμα, καθώς και τον απαιτούμενο ορό σε συγκέντρωση 4% και Triton X-100 (0,2%). Η επώαση με το πολυκλωνικό αντίσωμα αντί-β1-AR κουνελιού (1/100 αραιώση) είχε διάρκεια 48 ώρες. Μετά την επώαση αυτή, οι τομές πλύθηκαν σε PBS (3x5 λεπτά) και ακολούθησε η επώασή τους με το αντίστοιχο δεύτερο βιοτινυλιωμένο αντίσωμα (IgG κατσίκας έναντι κουνελιού), σε αραιώση 1/200 για 120 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου μαζί με 2% από τον αντίστοιχο ορό. Η περίσσεια του αντισώματος απομακρύνθηκε με πλύσιμο των τομών σε PBS (3x5 λεπτά) και ακολούθησε επώαση με διάλυμα Αβιδίνης-Βιοτίνης (AB complex) 1:100 συνδεδεμένης με υπεροξειδάση, για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η περίσσεια του διαλύματος AB complex ξεπλύθηκε με PBS (3x5 λεπτά). Τέλος, η ανοσοϊστοχημική χρώση επιτεύχθηκε με την αντίδραση της υπεροξειδάσης με το χρωμογόνο υπόστρωμα DAB παρουσία H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για περίπου 3-4 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. 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). 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.

### **3.3.4 Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός του α<sub>2A</sub>-αδρενεργικού υποδοχέα**

Ο ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός πραγματοποιήθηκε σε εγκεφάλους ενήλικων ζώων. 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% παραφορμαλδεΰδη σε 0,1 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) pH 7,4 στους 4° C. Ακολουθούσαν 3 ξεπλύματα σε PBS, 5 λεπτά το καθένα, σε θερμοκρασία δωματίου και ακόμα δύο (5 και 10 λεπτών) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH7,4 , που περιείχε απορρυπαντικό Triton X- 100 συγκέντρωσης 0,5% για την αύξηση της διεισδυτικότητας των αντισωμάτων. Ακολούθως, οι τομές επώαστηκαν με ένα διάλυμα παρεμπόδισης της μη ειδικής σύνδεσης των αντισωμάτων στον ιστό (διάλυμα PBS, το οποίο περιείχε τον απαιτούμενο ορό γαιδάρου, NDS, σε συγκέντρωση 10% καθώς και 0,5% Triton X-100 ) για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Αμέσως μετά, και χωρίς να μεσολαβήσει πλύσιμο των τομών, οι τομές επώαστηκαν στους 4° C με διάλυμα που

περιείχε το πρώτο αντίσωμα, καθώς και τον απαιτούμενο ορό σε συγκέντρωση 4% και Triton X-100 (0,5%). Η επώαση με το πολυκλωνικό αντίσωμα αντί- $\alpha_{2\alpha}$ -AR κατσίκας (1/100 αραιώση) είχε διάρκεια 48 ώρες.

Μετά την επώαση αυτή, οι τομές πλύθηκαν σε PBS (3x5 λεπτά) και ακολούθησε η επώασή τους με το αντίστοιχο δεύτερο βιοτινυλιωμένο αντίσωμα (IgG γαϊδάρου έναντι κατσίκας), σε αραιώση 1/500 για 120 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου μαζί με 2% από τον αντίστοιχο ορό. Η περίσσεια του αντισώματος απομακρύνθηκε με πλύσιμο των τομών σε PBS (3x5 λεπτά) και ακολούθησε επώαση με διάλυμα Αβιδίνης-Βιοτίνης (AB complex) 1:100 συνδεδεμένης με υπεροξειδάση, για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η περίσσεια του διαλύματος AB complex ξεπλύθηκε με PBS (3x5 λεπτά). Τέλος, η ανοσοϊστοχημική χρώση επιτεύχθηκε με την αντίδραση της υπεροξειδάσης με το χρωμογόνο υπόστρωμα DAB παρουσία  $H_2O_2$  για περίπου 4 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Για τη διατήρηση, αποθήκευση και παρατήρηση των τομών ακολούθησε σταδιακή αφυδάτωσή τους σε διάλυμα αιθανόλης σταδιακά αυξανόμενης συγκέντρωσης και τοποθέτηση καλυπτριδών με τη χρήση ειδικής ρητίνης κάλυψης (DePeX). 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.

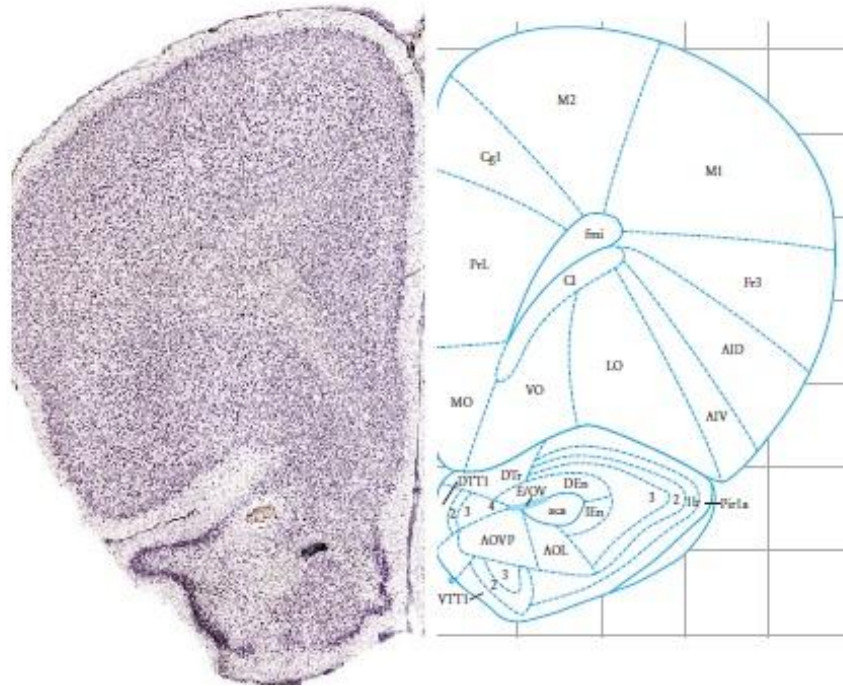
### **3.3.5 Φωτογράφιση**

Η παρατήρηση των τομών μετά την ανοσοϊστοχημεία έγινε με οπτικό μικροσκόπιο (Eclipse E400, Nikon). Η ψηφιακή φωτογράφιση των τομών πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ψηφιακής κάμερας (Infinity 1) που ήταν συνδεδεμένη με ηλεκτρονικό υπολογιστή και τη χρήση του λογισμικού Infinity Capture.

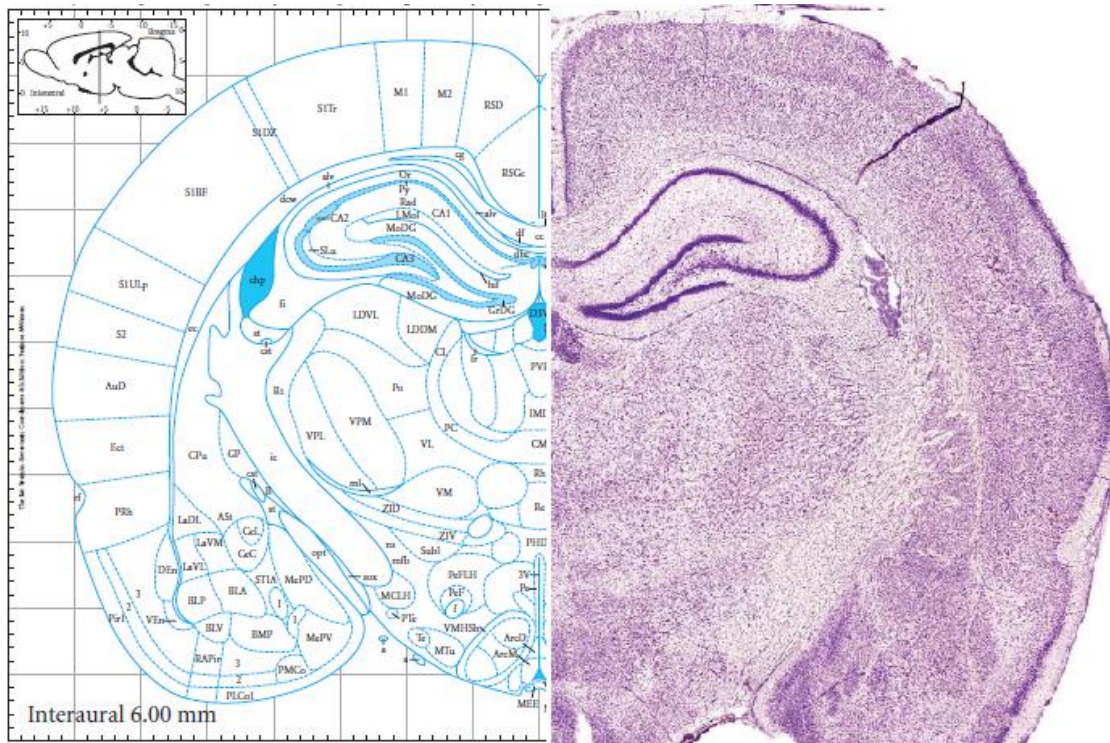
### **3.3.6 Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων**

Για κάθε ένα από τα ζώα, μετρήθηκε ο συνολικός αριθμός των κυττάρων που ήταν ανοσοθετικά για τον αντίστοιχο αδρενεργικό υποδοχέα ( $\beta_1$  ή  $\alpha_2\alpha$ ) σε έξι οπτικά πεδία ανά περιοχή, σε τρεις διαδοχικές τομές και υπολογίστηκε ο μέσος όρος ανά ζώο και ανά περιοχή. Χρησιμοποιήθηκαν αρσενικά και θηλυκά, ενήλικα και νεογνά 13<sup>ης</sup> μεταγεννητικής ημέρας ζώα. Η μεγέθυνση του μικροσκοπίου (Eclipse E400, Nikon) ήταν 20x και οι εγκεφαλικές δομές που μελετήθηκαν ήταν οι περιοχές 1 και 3 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου (Cg1 και Cg3), ο έξω κοιλιακός κογχομετωπιαίος φλοιός (VLO), ο έσω κογχομετωπιαίος φλοιός (MO) και ο κάτω μεταχιακός φλοιός (IL) (εικόνα 14,16),

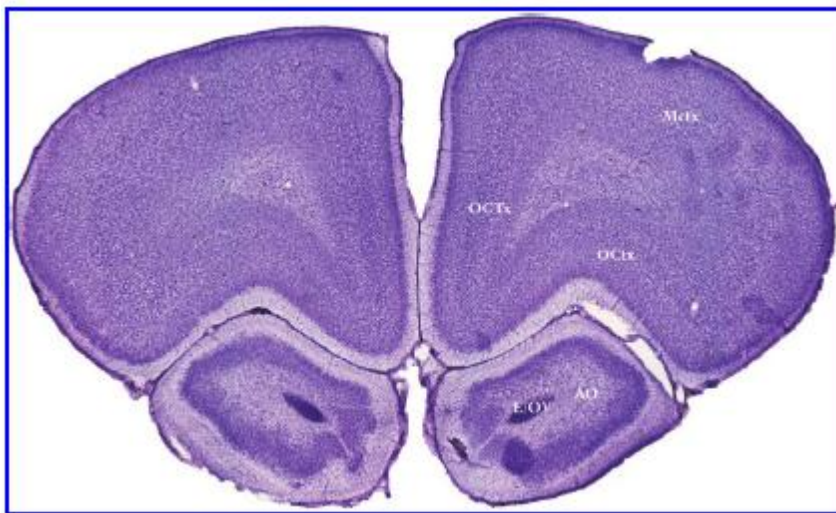
οι περιοχές CA1 και CA3 του ιπποκάμπου και οι περιοχές BLA (έξω βασικός πυρήνας), MeA (μέσος πυρήνας), CeL (κεντρικός πυρήνας) της αμυγδαλής (εικόνα 15,17). Η αναγνώριση των εγκεφαλικών περιοχών στα ενήλικα ζώα έγινε με βάση τον ανατομικό άτλαντα Paxinos and Watson, 2<sup>nd</sup> edition και στα νεογνά με βάση τον ανατομικό άτλαντα Taylor and Francis, 2011.



Εικόνα 14: Εικόνα του επιπέδου όπου μελετήθηκαν οι περιοχές: Cg1, Cg3, VLO, IL, MO σε ενήλικα ζώα.

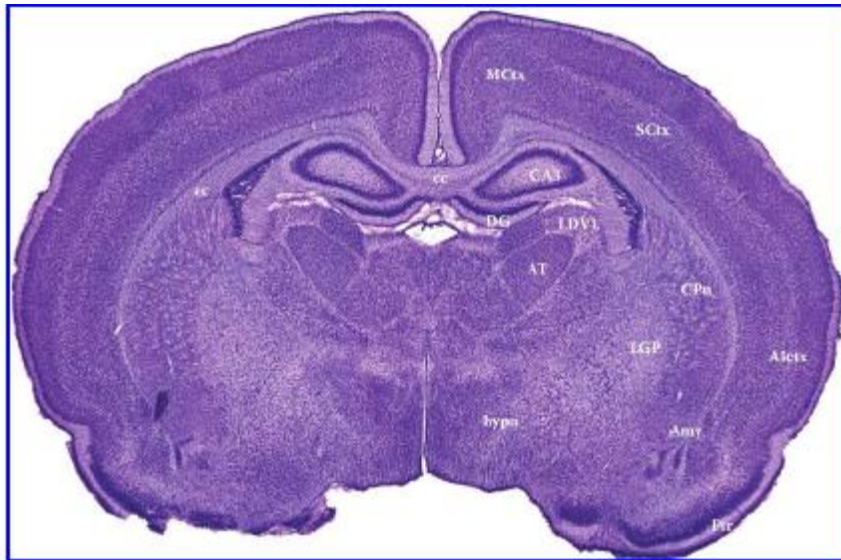


Εικόνα 15: Εικόνα του επιπέδου όπου μελετήθηκαν οι περιοχές CA1 και CA3 του ιπποκάμπου και οι περιοχές BLA, MeA και CeL της αμυγδαλής σε ενήλικα ζώα.



Εικόνα 16: Εικόνα εγκεφάλου αρουραίου 14<sup>ης</sup> μεταγεννητικής ημέρας στο επίπεδο όπου μελετήθηκαν οι περιοχές: Cg1, Cg3, VLO, IL, MO σε αρουραίους 13<sup>ης</sup> μεταγεννητικής ημέρας.





*Εικόνα 17: Εικόνα εγκεφάλου αρουραίου 14<sup>ης</sup> μεταγεννητικής ημέρας στο επίπεδο όπου μελετήθηκαν οι περιοχές CA1 και CA3 του ιπποκάμπου και οι περιοχές BLA, MeA και CeL της αμυγδαλής σε αρουραίους 13<sup>ης</sup> μεταγεννητικής ημέρας.*

### **3.4 IN VITRO ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΡΑΔΙΟΣΗΜΑΣΜΕΝΟΥ ΔΕΣΜΕΥΤΗ**

#### **3.4.1 In vitro πρόσδεση ραδιοσημασμένου δεσμευτή για τον β1-αδρενεργικό υποδοχέα**

Πριν την έναρξη της in vitro πρόσδεσης έγινε εξισορρόπηση της θερμοκρασίας των τομών μέχρι τη θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε επώασή τους με ρυθμιστικό διάλυμα Tris (50 mM Tris-HCl, pH 7,4) για 1 ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου για την απομάκρυνση ενδογενών αναστολέων της πρόσδεσης του δεσμευτή καθώς και για την απομάκρυνση του ενδογενούς νευροδιαβιβαστή. Αφού οι τομές στέγνωσαν σε θερμοκρασία δωματίου, επώαστηκαν για 1 ώρα στην ίδια θερμοκρασία με τον ραδιοσημασμένο δεσμευτή ((-)-CGP-12177, [5,7-<sup>3</sup>H]-) σε συγκέντρωση 4 nM, διαλυμένο σε διάλυμα Tris. Μετά το τέλος της επώασης, ο ελεύθερος ραδιοσημασμένος δεσμευτής απομακρύνθηκε με 2 ξεπλύματα των 5 λεπτών σε παγωμένο Tris 50 mM, pH 7,4 και στη συνέχεια 5 εμβαπτίσματα σε παγωμένο απεσταγμένο νερό. Τέλος οι τομές ξεράθηκαν σε ρεύμα ψυχρού αέρα.

### 3.4.2 Έκθεση σε φιλμ αυτοραδιογραφίας

Μετά την ολοκλήρωση του πειράματος της *in vitro* πρόσδεσης, οι αντικειμενοφόροι πλάκες με τις αφυδατωμένες τομές εκτέθηκαν μαζί με μία σειρά  $^3\text{H}$ -προ-βαθμονομημένων πλαστικών προτύπων ( $[^3\text{H}]$  American Radiolabeled Chemical Int) σε φιλμ (Kodak), ευαίσθητο στην ιονίζουσα ακτινοβολία του  $^3\text{H}$ , μέσα σε κασέτες αυτοραδιογραφίας, στους  $4^\circ\text{C}$ . Στα αυτοραδιογραφικά φιλμ η εικόνα σχηματίζεται από κόκκους αργύρου που παράγονται από κρυστάλλους αλογονιδίου του αργύρου μετά την ενεργοποίησή τους από την ιονίζουσα ακτινοβολία (σωματίδια  $\beta$ ) που εμφανίζεται κατά τη μεταστοιχείωση του  $^3\text{H}$ . Οι κρύσταλλοι αυτοί με την εμφάνιση του φιλμ δίνουν τους μεταλλικούς κόκκους αργύρου που προκαλούν την αμαύρωση του φιλμ. Το χρονικό διάστημα έκθεσης των φιλμ ήταν 2 μήνες στους  $4^\circ\text{C}$ .

### 3.4.3 Εμφάνιση των φιλμ αυτοραδιογραφίας και ανάλυση της εικόνας

Μετά την ολοκλήρωση της έκθεσης, τα φιλμ εμφανίστηκαν σε σκοτεινό θάλαμο με κόκκινο φως ασφαλείας, αφού η θερμοκρασία τους εξισορροπήθηκε με τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Αρχικά, κάθε φιλμ εμβαπτίστηκε σε διάλυμα εμφανιστή D-19 (KODAK) για 4-5 λεπτά, μονιμοποιήθηκε σε διάλυμα στερεωτή ACIDOFIX (AGFA) για 10 λεπτά, ξεπλύθηκε με τρεχούμενο νερό για 45 λεπτά και ξηράθηκε σε ρεύμα ψυχρού αέρα.

Στις αυτοραδιογραφίες που προέκυψαν έγινε ανάλυση εικόνας για τη μετατροπή της αμαύρωσης του φιλμ λόγω της έκθεσής του στην ενσωματωμένη στον ιστό ραδιενέργεια, σε συγκέντρωση ενσωματωμένης ραδιοσημασμένης ουσίας. Η μετατροπή βασίζεται στη χρήση πρότυπης καμπύλης που συσχετίζει γνωστές συγκεντρώσεις ραδιενέργειας με την προκαλούμενη αμαύρωση στο φιλμ (οπτική πυκνότητα του φιλμ) και υπολογίζεται με τη βοήθεια των προβαθμονομημένων πλαστικών προτύπων που εκτίθενται μαζί με τις εγκεφαλικές τομές στο φιλμ. Ιδιαίτερη μέριμνα λαμβάνεται ώστε αυτή η συσχέτιση να είναι γραμμική και να μην έχει συμβεί κορεσμός του φιλμ (πάνω από ένα ποσό ραδιενέργειας το φιλμ δίνει την ίδια αμαύρωση, οπότε και οι ποσότητες ραδιενέργειας δεν είναι δυνατόν να διακριθούν και να ποσοτικοποιηθούν). Η ανάλυση εικόνας έγινε με το υπολογιστικό πρόγραμμα Scion Image. Η αναγνώριση των εγκεφαλικών περιοχών όπου καθορίστηκε η συγκέντρωση του  $\beta 1$ -αδρενεργικού υποδοχέα στα ενήλικα ζώα έγινε με βάση τον ανατομικό άτλαντα (Paxinos and Watson, 2<sup>nd</sup> edition) και στα νεογνά με βάση τον ανατομικό άτλαντα Taylor and Francis, 2011. Χρησιμοποιήθηκαν αρσενικά και θηλυκά, ενήλικα και νεογνά  $13^{\text{η}}$  μεταγεννητικής ημέρας ζώα, που εκπαιδεύτηκαν υπό



συνεχόμενη ενίσχυση (REW), ή υπό συνεχόμενη ματαίωση (DER) ή ήταν ζώα ελέγχου (control).

#### **3.4.4 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων**

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές την πειραματική ομάδα (ζώα που εκπαιδεύτηκαν υπό συνεχόμενη ενίσχυση REW, ζώα που εκπαιδεύτηκαν υπό συνεχόμενη ματαίωση DER και ζώα ελέγχου CTRL) και το φύλο.

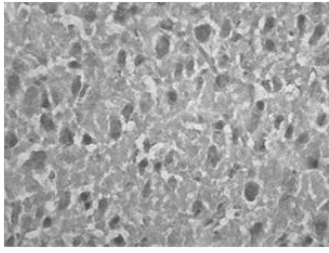
## **4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### **4.1 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ Β1-ΑΔΡΕΝΕΡΓΙΚΟ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΣΕ ΕΠΙΜΥΣ 13<sup>ης</sup> ΜΕΤΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ ΗΜΕΡΑΣ**

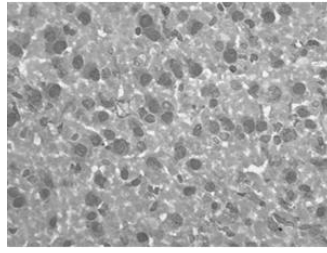
Στα γραφήματα 1 έως 10 παρουσιάζεται ο αριθμός των θετικών κυττάρων για τον β1-αδρενεργικό υποδοχέα ανά οπτικό πεδίο κατά τον ανοσοϊστοχημικό έλεγχο διαφόρων περιοχών του εγκεφάλου επίμυων 13<sup>ης</sup> μεταγεννητικής ημέρας και των έξι πειραματικών ομάδων (αρσενικοί μάρτυρες, θηλυκοί μάρτυρες, αρσενικά υπό ματαίωση, θηλυκά υπό ματαίωση, αρσενικά υπό ανταμοιβή, θηλυκά υπό ανταμοιβή). Μεταξύ του αριστερού και του δεξιού ημισφαιρίου του εγκεφάλου των επίμυων δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στον αριθμό των ανοσοθετικών κυττάρων, οπότε παρουσιάζεται ο μέσος όρος τους.

#### **Φλοιός έλικας προσαγωγίου, περιοχές 1 και 3**

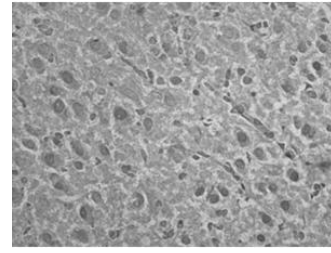
Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα έδειξε στατιστικά σημαντική επίδραση της πειραματικής ομάδας ( $F_{5,34}=8,749$ ,  $p=0,001$ ) στον αριθμό των ανοσοθετικών κυττάρων για τον β1-αδρενεργικό υποδοχέα στην περιοχή 1 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου. Πιο συγκεκριμένα, στην περιοχή 1, ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων ήταν αυξημένος στην ομάδα των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (post hoc  $p=0,05$ ) και σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων (post hoc  $p<0,001$ ). Επιπροσθέτως, ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων ήταν μειωμένος στην ομάδα των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων σε σχέση με τα ζώα της ομάδας ελέγχου (post hoc  $p=0,039$ ). Δεν παρατηρήθηκε επίδραση του φύλου.



**Ομάδα ελέγχου**

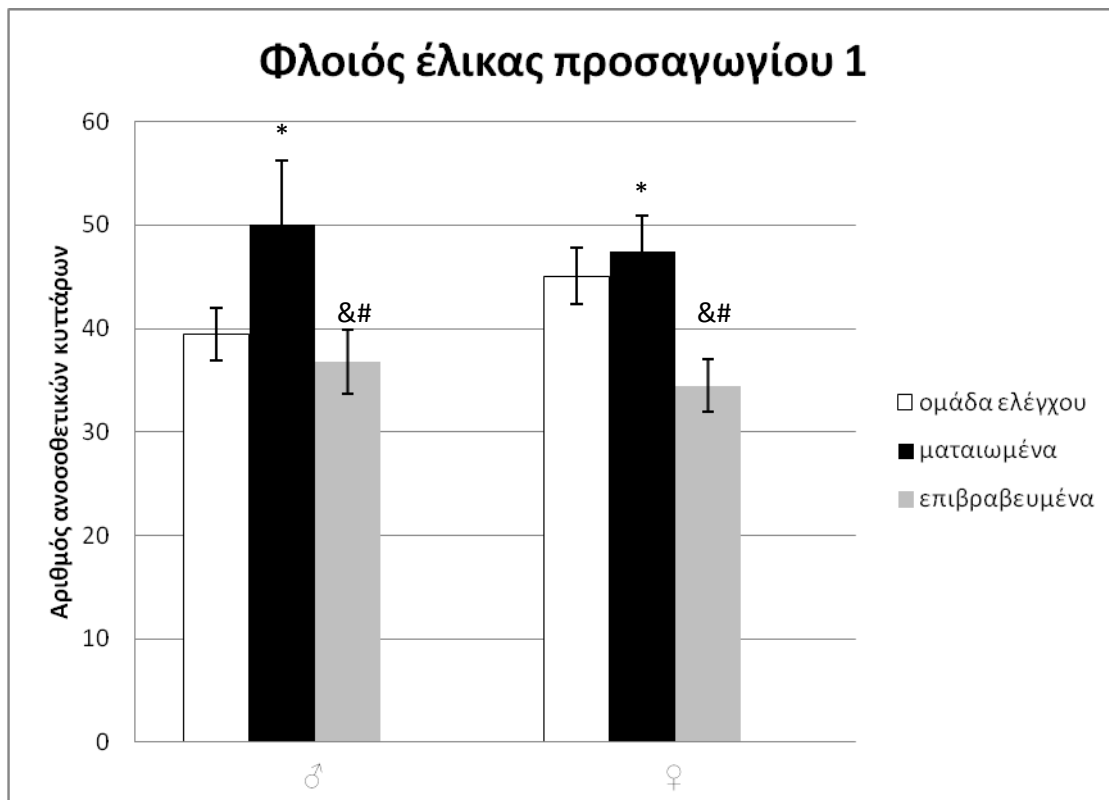


**«ματαιωμένα»**



**«επιβραβευμένα»**

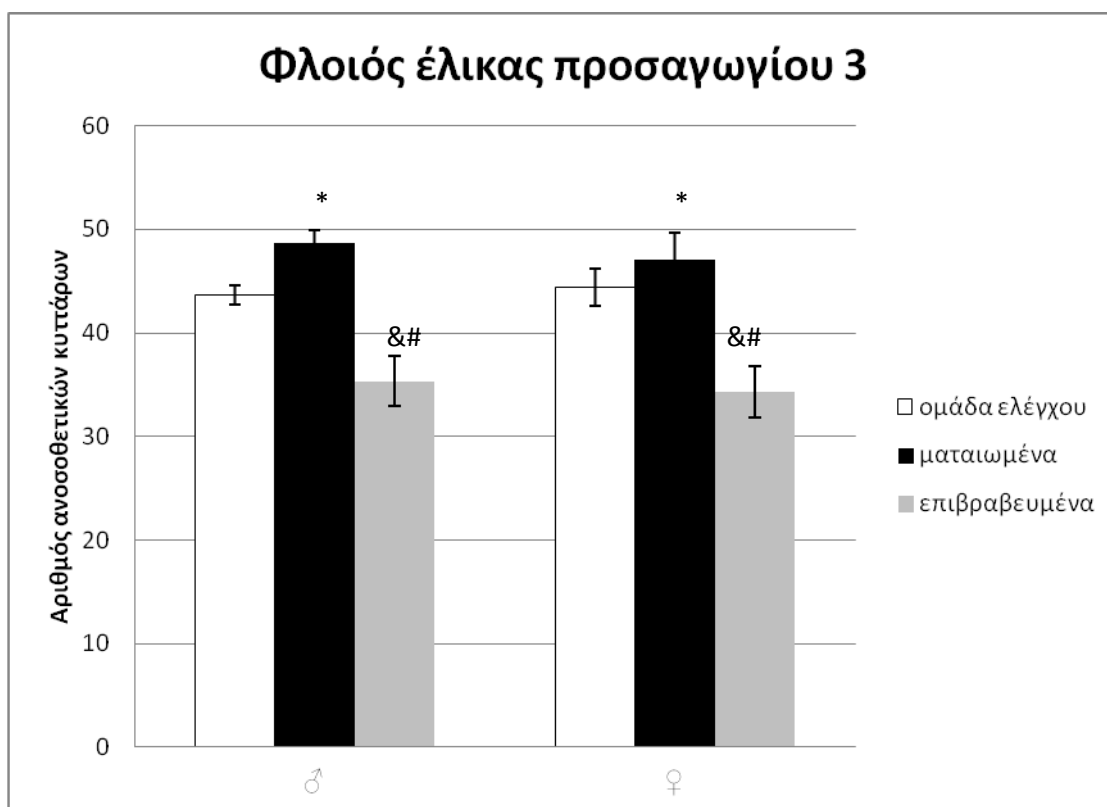
***Εικόνα 18:** Ανοσοθετικά κύτταρα για τον  $\beta 1$ -αδρενεργικό υποδοχέα στην περιοχή 1 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου.*



**Γράφημα 1:** Αριθμός ανοσοθετικών κυττάρων για τον β1 αδρενεργικό υποδοχέα στην περιοχή 1 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο αριθμού κυττάρων για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ζώα 13<sup>ης</sup> μεταγεννητικής ημέρας. Ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων ήταν αυξημένος στην ομάδα των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (post hoc \*  $p=0,05$ ) και σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων (post hoc &  $p<0,001$ ). Ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων ήταν μειωμένος στην ομάδα των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων σε σχέση με τα ζώα της ομάδας ελέγχου (post hoc #  $0,01<p<0,05$ ).

Τα αποτελέσματα στην περιοχή 3 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου ήταν παρόμοια με αυτά στην περιοχή 1: Συγκεκριμένα, αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων για τον β1-αδρενεργικό υποδοχέα ήταν αυξημένος στην ομάδα των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (post hoc  $p=0,05$ ) και σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων (post hoc  $p<0,001$ ). Επίσης, ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων ήταν μειωμένος στην ομάδα

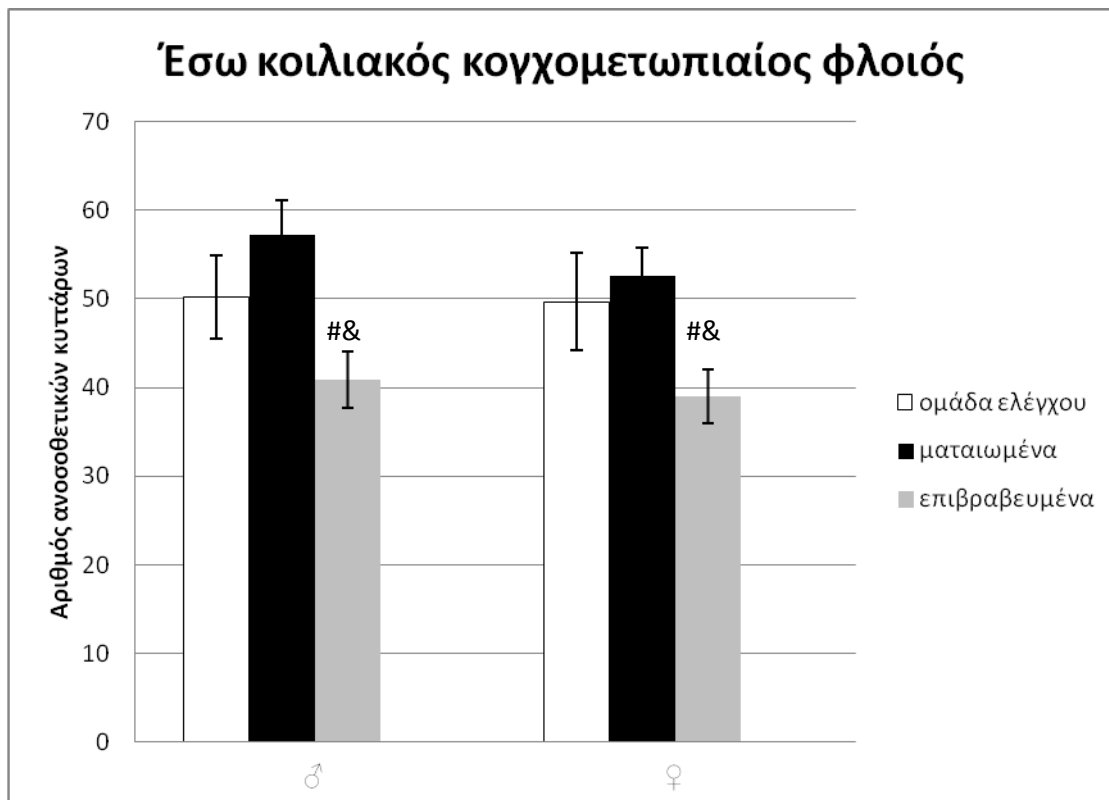
των «επιβραβευμένων» ζώων σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (post hoc  $p < 0,001$ ). Δεν παρατηρήθηκε επίδραση του φύλου ( $F_{5,34} = 24,943$ ,  $p < 0,001$ )



**Γράφημα 2:** Αριθμός ανοσοθετικών κυττάρων στην περιοχή 3 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο αριθμού κυττάρων για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ζώα 13<sup>ης</sup> μεταγεννητικής ημέρας. Ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων για τον  $\beta 1$ -αδρενεργικό υποδοχέα ήταν αυξημένος στην ομάδα των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (post hoc\*  $p = 0,05$ ) και σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων (post hoc &  $p < 0,001$ ). Επιπλέον, ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων ήταν μειωμένος στην ομάδα των «επιβραβευμένων» ζώων σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (post hoc #  $p < 0,001$ ).

### **Έσω κοιλιακός κογχομετωπιαίος φλοιός**

Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα έδειξε στατιστικά σημαντική επίδραση της πειραματικής ομάδας στον αριθμό των ανοσοθετικών κυττάρων για τον  $\beta 1$ -αδρενεργικό υποδοχέα στην περιοχή του έσω κοιλιακού κογχομετωπιαίου φλοιού ( $F_{5,34}=8,38$ ,  $p=0,001$ ). Πιο συγκεκριμένα, ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων ήταν μειωμένος στις ομάδες των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στις ομάδες ελέγχου (post hoc  $p=0,01$ ) και σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στις ομάδες των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων (post hoc  $p<0,001$ ). Πάντως ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων δεν διέφερε στατιστικά μεταξύ των ομάδων ελέγχου και των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων. Δεν παρατηρήθηκε επίδραση του φύλου.

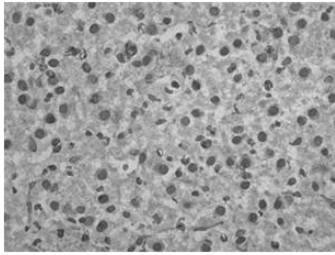


**Γράφημα 3:** Αριθμός ανοσοθετικών για τον β1 αδρενεργικό υποδοχέα κυττάρων στην περιοχή του έσω κοιλιακού κογχομετωπιαίου φλοιού. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο αριθμού κυττάρων για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ζώα 13<sup>ης</sup> μεταγεννητικής ημέρας. Ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων για τον β1-αδρενεργικό υποδοχέα ήταν μειωμένος στις ομάδες των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στις ομάδα ελέγχου (post hoc #  $p=0,01$ ) και σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στις ομάδες των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων (post hoc &  $p<0,001$ ).

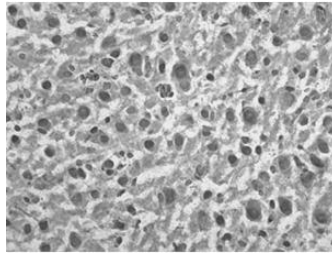
### Έξω κοιλιακός κογχομετωπιαίος φλοιός

Στην περιοχή αυτή τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια με αυτά για τον έσω κοιλιακό κογχομετωπιαίο φλοιό. Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα έδειξε στατιστικά σημαντική επίδραση της πειραματικής ομάδας ( $F_{5,34}=14,863$ ,  $p<0,001$ ) στον αριθμό των ανοσοθετικών κυττάρων για τον β1-αδρενεργικό υποδοχέα στην περιοχή του έξω κοιλιακού κογχομετωπιαίου φλοιού. Πιο συγκεκριμένα ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων ήταν αυξημένος στα ζώα που ανήκουν στις ομάδες των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων σε

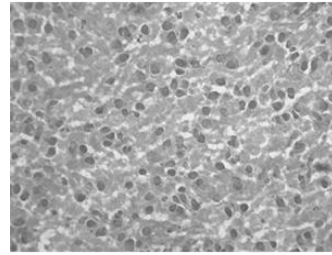
σχέση με τα ζώα που ανήκουν στις ομάδες των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων (post hoc  $p < 0,001$ ). Ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων για τον β-αδρενεργικό υποδοχέα ήταν μειωμένος στις ομάδες των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στις ομάδες ελέγχου (post hoc  $p < 0,001$ ). Πάντως ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων για τον β1-αδρενεργικό υποδοχέα δε διέφερε στατιστικά μεταξύ των ομάδων ελέγχου και των ομάδων των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων. Δεν παρατηρήθηκε επίδραση του φύλου.



**Ομάδα ελέγχου**



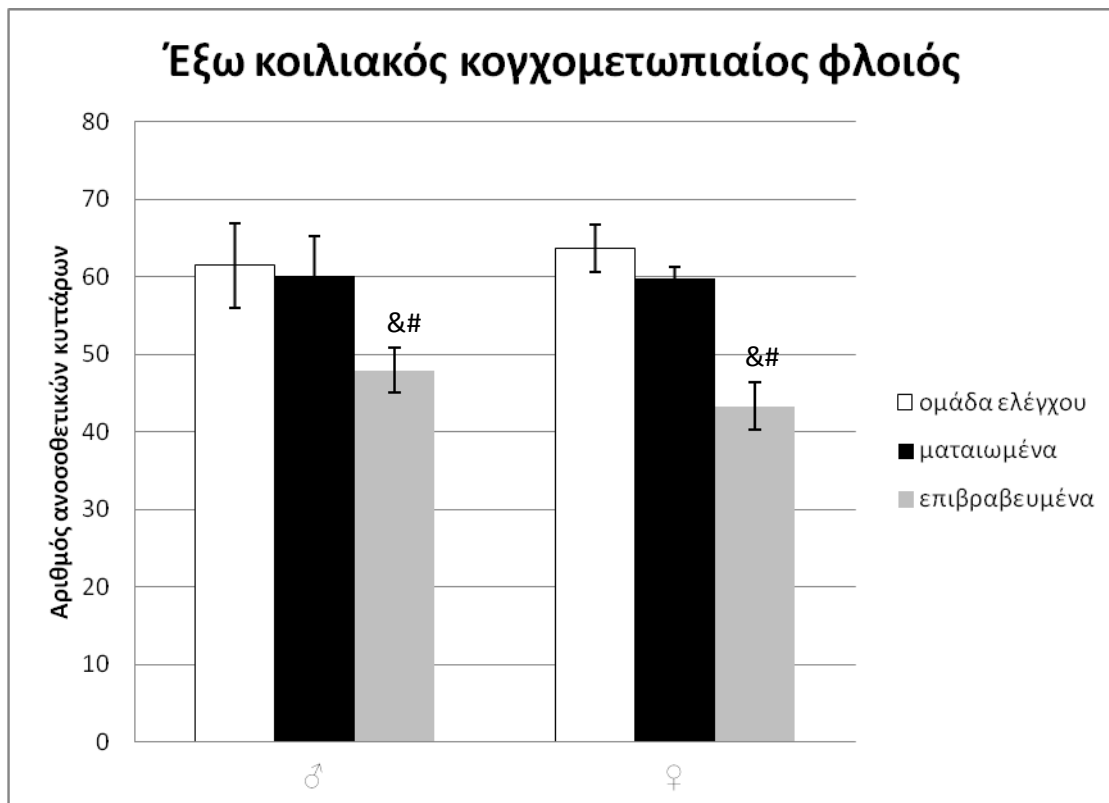
**«ματαιωμένα»**



**«επιβραβευμένα»**

**Εικόνα 19:** Ανοσοθετικά κύτταρα για τον β1-αδρενεργικό υποδοχέα στην περιοχή του έξω κοιλιακού κορχομετωπιαίου φλοιού.



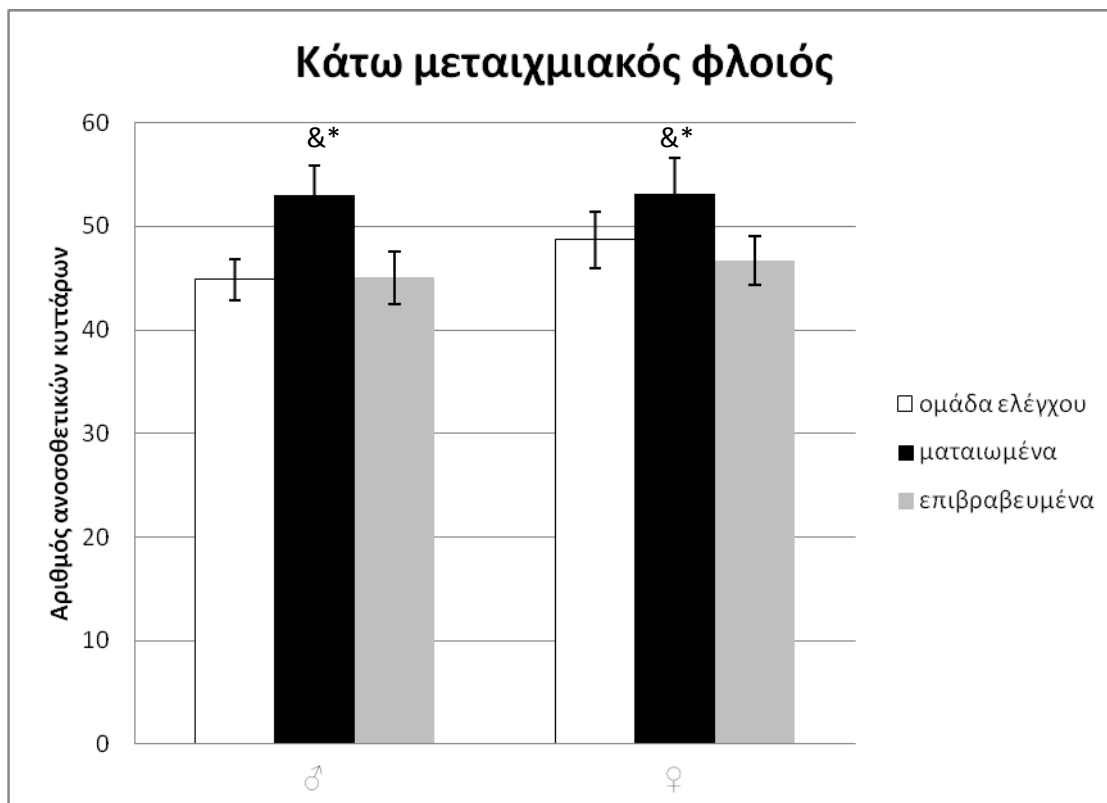


**Γράφημα 4:** Αριθμός ανοσοθετικών κυττάρων στην περιοχή του έξω κοιλιακού κορχομετωπιαίου φλοιού. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο αριθμού κυττάρων για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ζώα 13<sup>ης</sup> μεταγεννητικής ημέρας. ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων για τον  $\beta 1$ -αδρενεργικό υποδοχέα ήταν αυξημένος στα ζώα που ανήκουν στις ομάδες των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στις ομάδες των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων (*post hoc* &  $p < 0,001$ ). Ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων για τον  $\beta 1$ -αδρενεργικό υποδοχέα ήταν μειωμένος στις ομάδες των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στις ομάδες ελέγχου (*post hoc* #  $p < 0,001$ ).

### Κάτω μεταιχμιακός φλοιός

Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα έδειξε στατιστικά σημαντική επίδραση της πειραματικής ομάδας ( $F_{5,34}=5,003$ ,  $p=0,014$ ) στον αριθμό των ανοσοθετικών κυττάρων για τον  $\beta 1$ -αδρενεργικό υποδοχέα στην περιοχή του κάτω μεταιχμιακού φλοιού. Πιο συγκεκριμένα, ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων ήταν αυξημένος στην ομάδα των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στις ομάδες των νεογνικά «επιβραβευμένων» (*post hoc*

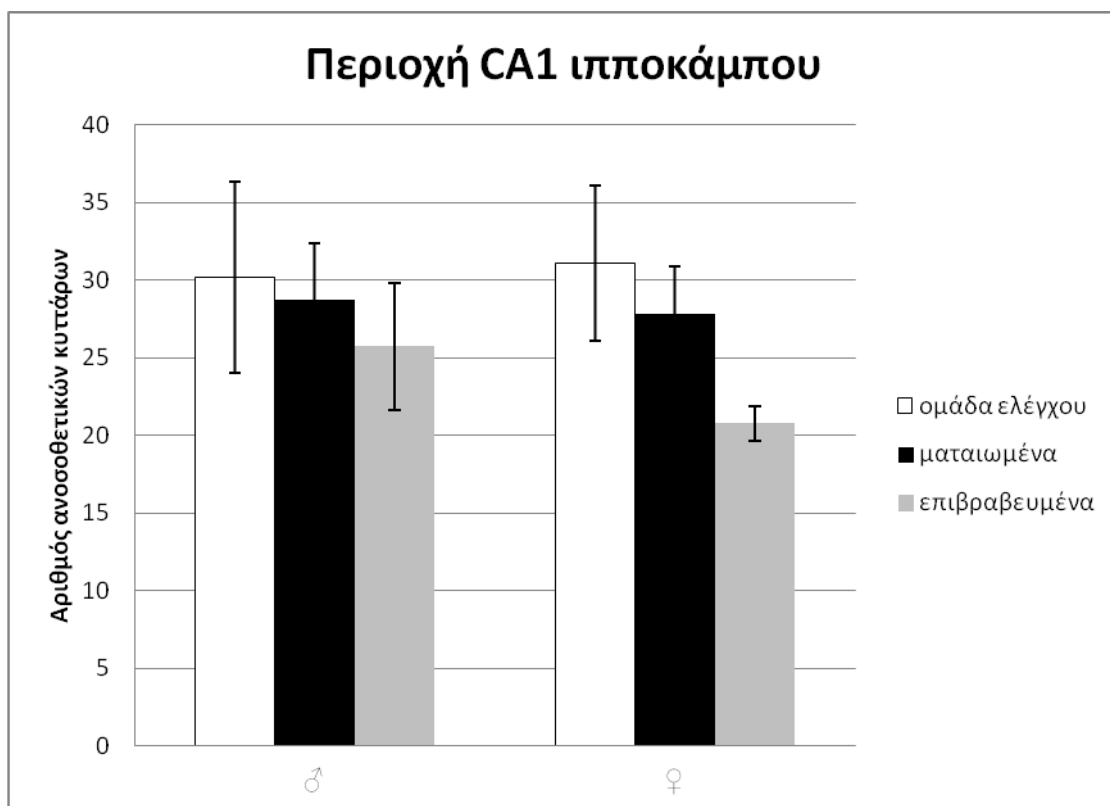
$p=0,006$ ) και των ζώων ελέγχου (post hoc  $p=0,016$ ). Πάντως ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων για τον  $\beta 1$ -αδρενεργικό υποδοχέα δεν διέφερε στατιστικά μεταξύ των ομάδων ελέγχου και των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων. Δεν παρατηρήθηκε επίδραση του φύλου.



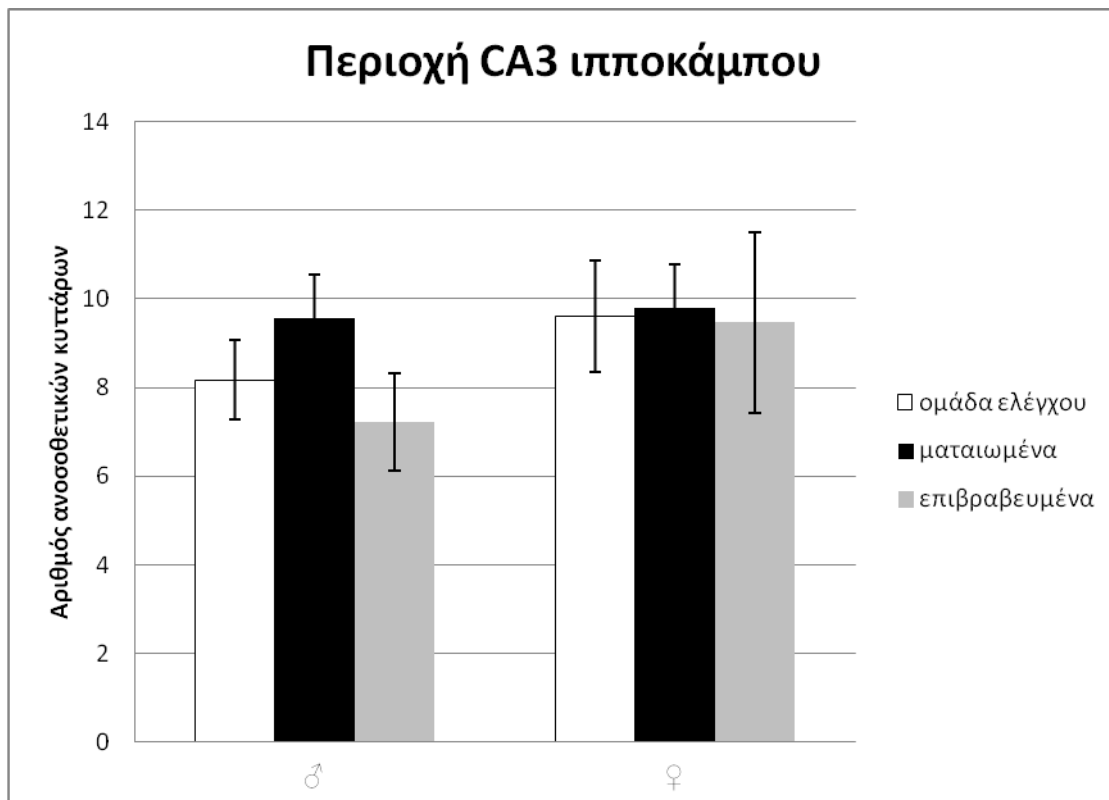
**Γράφημα 5:** Αριθμός ανοσοθετικών κυττάρων στην περιοχή του κάτω μεταιχμιακού φλοιού. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο αριθμού κυττάρων για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ζώα 13<sup>ης</sup> μεταγεννητικής ημέρας. Ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων για τον  $\beta 1$ -αδρενεργικό υποδοχέα ήταν αυξημένος στην ομάδα των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στις ομάδες των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων (post hoc &  $0,01 < p < 0,05$ ) και των ζώων ελέγχου (post hoc \*  $0,01 < p < 0,05$ ).

## Περιοχές CA1 και CA3 του ιπποκάμπου

Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές επιδράσεις στον αριθμό των ανοσοθετικών κυττάρων για τον β1-αδρενεργικό υποδοχέα στις περιοχές CA1 και CA3 του ιπποκάμπου. Ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων τόσο σε νεογνικά «ματαιωμένα» ζώα, όσο και σε «επιβραβευμένα» δεν διέφερε στατιστικά σε σχέση με τα ζώα των ομάδων ελέγχου. Δεν παρατηρήθηκε επίδραση του φύλου.



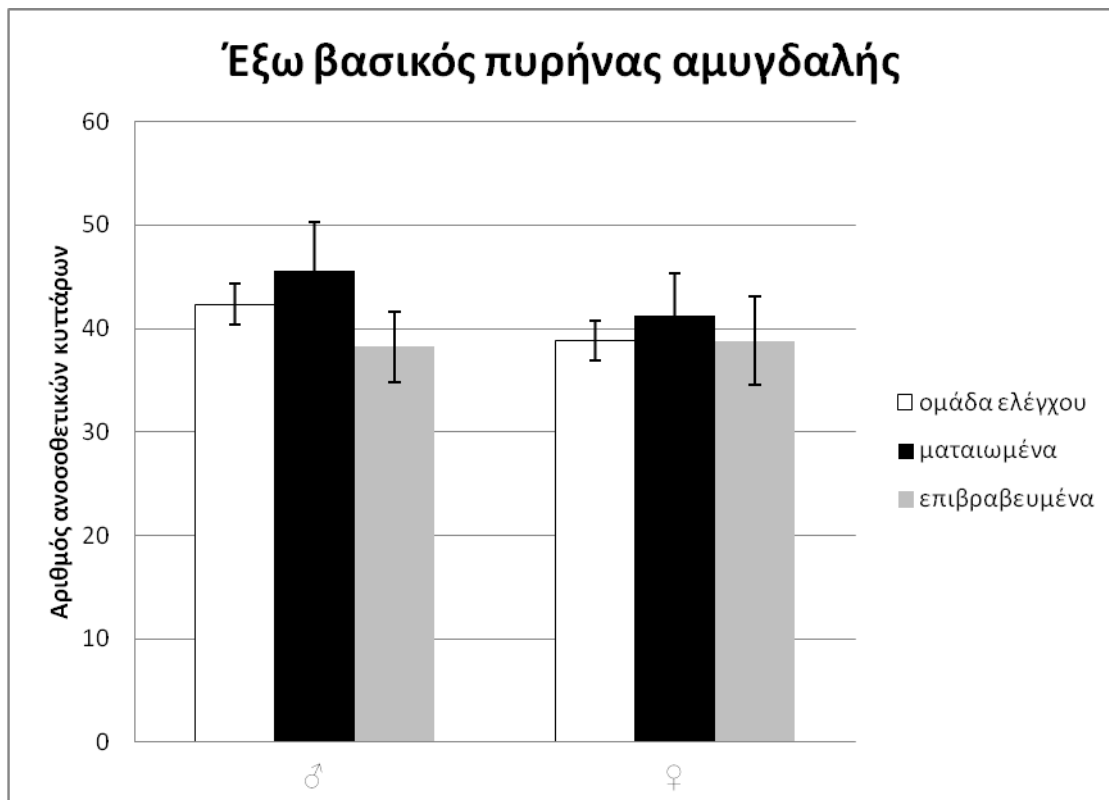
**Γράφημα 6:** Αριθμός ανοσοθετικών κυττάρων στην περιοχή CA1 του ιπποκάμπου. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο αριθμού κυττάρων για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ζώα 13<sup>ης</sup> μεταγεννητικής ημέρας.



**Γράφημα 7:** Αριθμός ανοσοθετικών κυττάρων στην περιοχή CA3 του ιπποκάμπου. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο αριθμού κυττάρων για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ζώα 13<sup>ης</sup> μεταγεννητικής ημέρας.

### Έξω βασικός πυρήνας αμυγδαλής

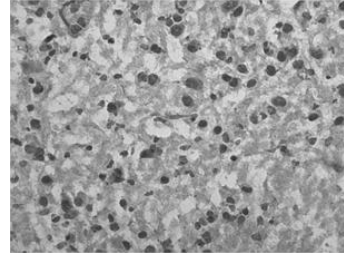
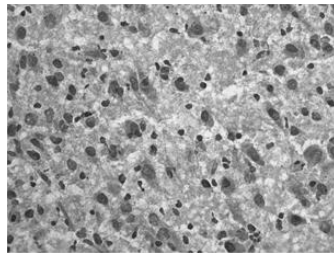
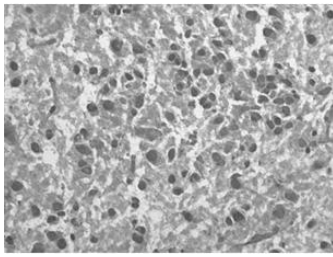
Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές επιδράσεις στον αριθμό των ανοσοθετικών κυττάρων για τον β1-αδρενεργικό υποδοχέα στην περιοχή του έξω βασικού πυρήνα της αμυγδαλής. Ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων τόσο σε νεογνικά «ματαιωμένα» ζώα, όσο και σε «επιβραβευμένα» δεν διέφερε στατιστικά σε σχέση με τα ζώα των ομάδων ελέγχου.



**Γράφημα 8:** Αριθμός ανοσοθετικών κυττάρων στην περιοχή του έξω βασικού πυρήνα της αμυγδαλής. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο αριθμού κυττάρων για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ζώα 13<sup>ης</sup> μεταγεννητικής ημέρας.

### Μέσος πυρήνας αμυγδαλής

Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα έδειξε στατιστικά σημαντική επίδραση της πειραματικής ομάδας ( $F_{5,33}=5,625$ ,  $p=0,009$ ) στον αριθμό των ανοσοθετικών κυττάρων για τον  $\beta 1$ -αδρενεργικό υποδοχέα στην περιοχή του μέσου πυρήνα της αμυγδαλής. Πιο συγκεκριμένα, ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων ήταν αυξημένος στην ομάδα των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στις ομάδες των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων (post hoc  $p=0,002$ ) και των ζώων ελέγχου (post hoc  $p=0,037$ ). Πάντως ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων για τον  $\beta 1$ -αδρενεργικό υποδοχέα δεν διέφερε στατιστικά μεταξύ των ομάδων ελέγχου και των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων. Δεν παρατηρήθηκε επίδραση του φύλου.

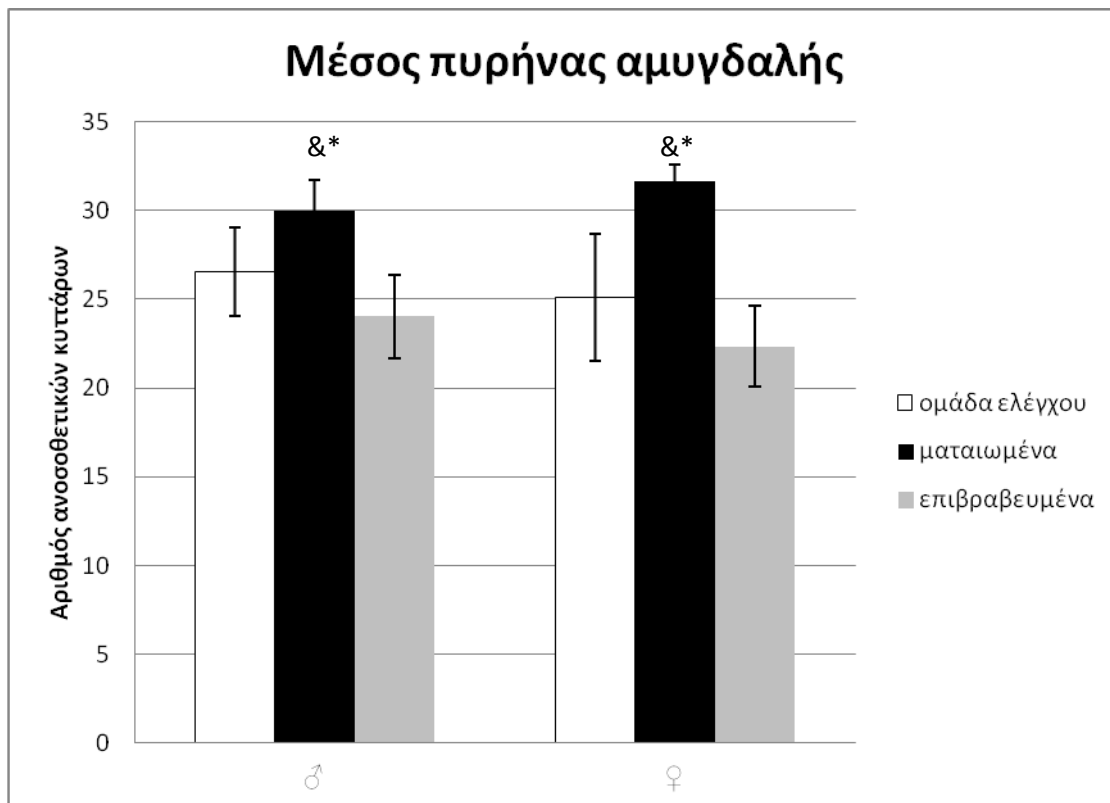


Ομάδα ελέγχου

«ματαιωμένα»

«επιβραβευμένα»

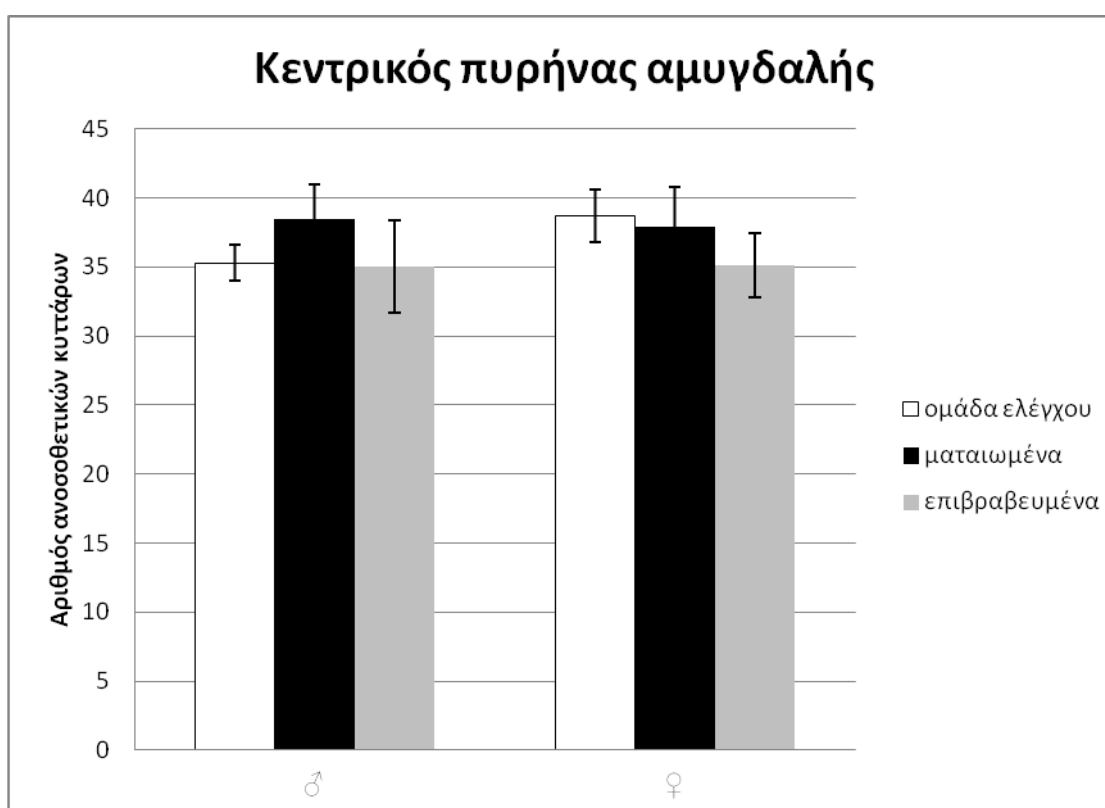
**Εικόνα 20:** Ανοσοθετικά κύτταρα για τον  $\beta 1$ -αδρενεργικό υποδοχέα στην περιοχή του μέσου πυρήνα της αμυγδαλής.



**Γράφημα 9:** Αριθμός ανοσοθετικών κυττάρων στην περιοχή του μέσου πυρήνα της αμυγδαλής. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο αριθμού κυττάρων για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ζώα 13<sup>ης</sup> μεταγεννητικής ημέρας. Ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων για τον  $\beta 1$ -αδρενεργικό υποδοχέα ήταν αυξημένος στις ομάδες των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στις ομάδες των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων (*post hoc* &  $0,01 < p < 0,05$ ) και σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στις ομάδες ελέγχου (*post hoc* \*  $0,01 < p < 0,05$ ).

## Κεντρικός πυρήνας αμυγδαλής

Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές επιδράσεις στον αριθμό των ανοσοθετικών κυττάρων για τον β-αδρενεργικό υποδοχέα στην περιοχή του κεντρικού πυρήνα της αμυγδαλής. Ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων τόσο σε νεογνικά «ματαιωμένα» ζώα, όσο και σε «επιβραβευμένα» δεν διέφερε στατιστικά σε σχέση με τα ζώα των ομάδων ελέγχου. Δεν παρατηρήθηκε επίδραση του φύλου.



**Γράφημα 10:** Αριθμός ανοσοθετικών κυττάρων στην περιοχή του μέσου πυρήνα της αμυγδαλής. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο αριθμού κυττάρων για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ζώα 13<sup>ης</sup> μεταγεννητικής ημέρας.

Συμπερασματικά στον εγκέφαλο αρουραίων 13ης μεταγεννητικής ημέρας βρέθηκε ότι στις περιοχές 1 και 3 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου, στον έσω και έξω κογχομετωπιαίο φλοιό, στον κάτω μαιχμακό φλοιό και στο μέσο πυρήνα της αμυγδαλής τα ματαιωμένα ζώα είχαν μεγαλύτερο αριθμό β1-ανοσοθετικών κυττάρων σε σχέση με τα

επιβραβευμένα ζώα. Αντίθετα στις περιοχές CA1 και CA3 του ιπποκάμπου και στον έξω βασικό και κεντρικό πυρήνα της αμυγδαλής δεν παρατηρήθηκε επίδραση της πειραματικής ομάδας στον αριθμό των β1-ανοσοθετικών κυττάρων.

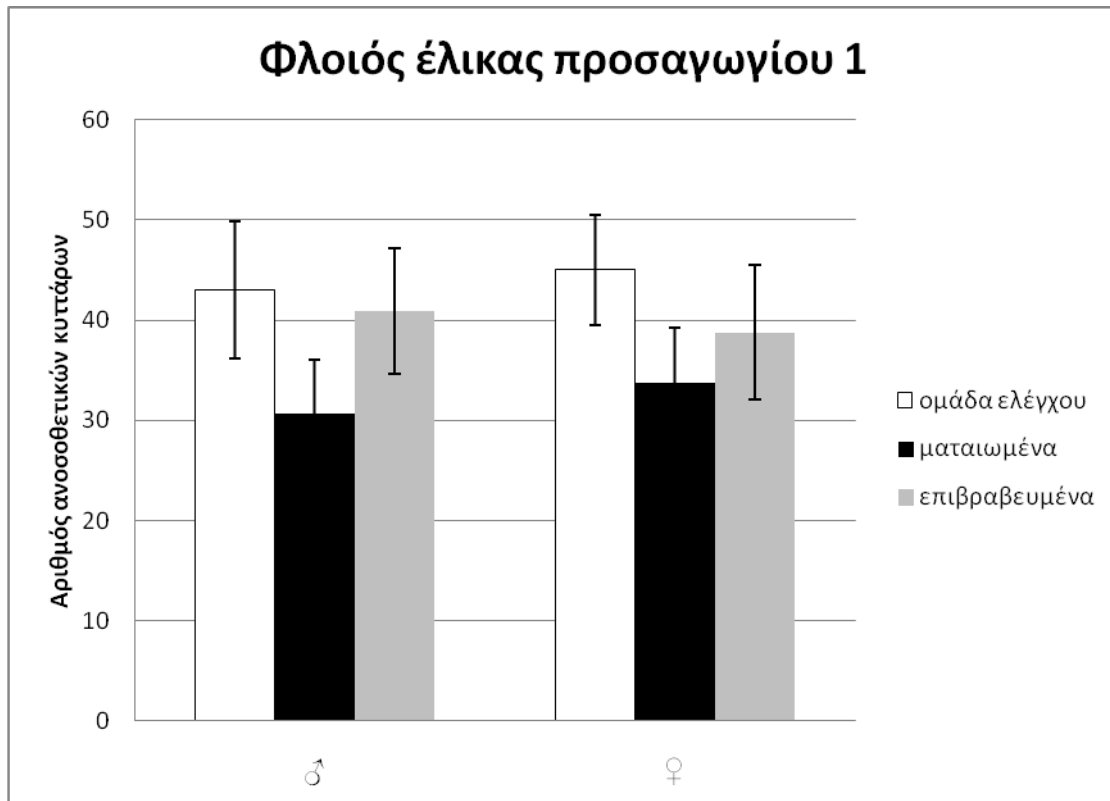
## **4.2 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ Β1-ΑΔΡΕΝΕΡΓΙΚΟ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΣΕ ΕΝΗΛΙΚΟΥΣ ΕΠΙΜΥΣ**

Στα γραφήματα 11 έως 20 παρουσιάζεται ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων για τον β1-αδρενεργικό υποδοχέα ανά οπτικό πεδίο κατά τον ανοσοϊστοχημικό έλεγχο διαφόρων περιοχών του εγκεφάλου ενήλικων επίμυων και των έξι πειραματικών ομάδων (αρσενικοί μάρτυρες, θηλυκοί μάρτυρες, αρσενικά υπό ματαίωση, θηλυκά υπό ματαίωση, αρσενικά υπό ανταμοιβή, θηλυκά υπό ανταμοιβή). Μεταξύ του αριστερού και του δεξιού ημισφαιρίου του εγκεφάλου των επίμυων δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στον αριθμό των ανοσοθετικών κυττάρων, οπότε παρουσιάζεται ο μέσος όρος τους.

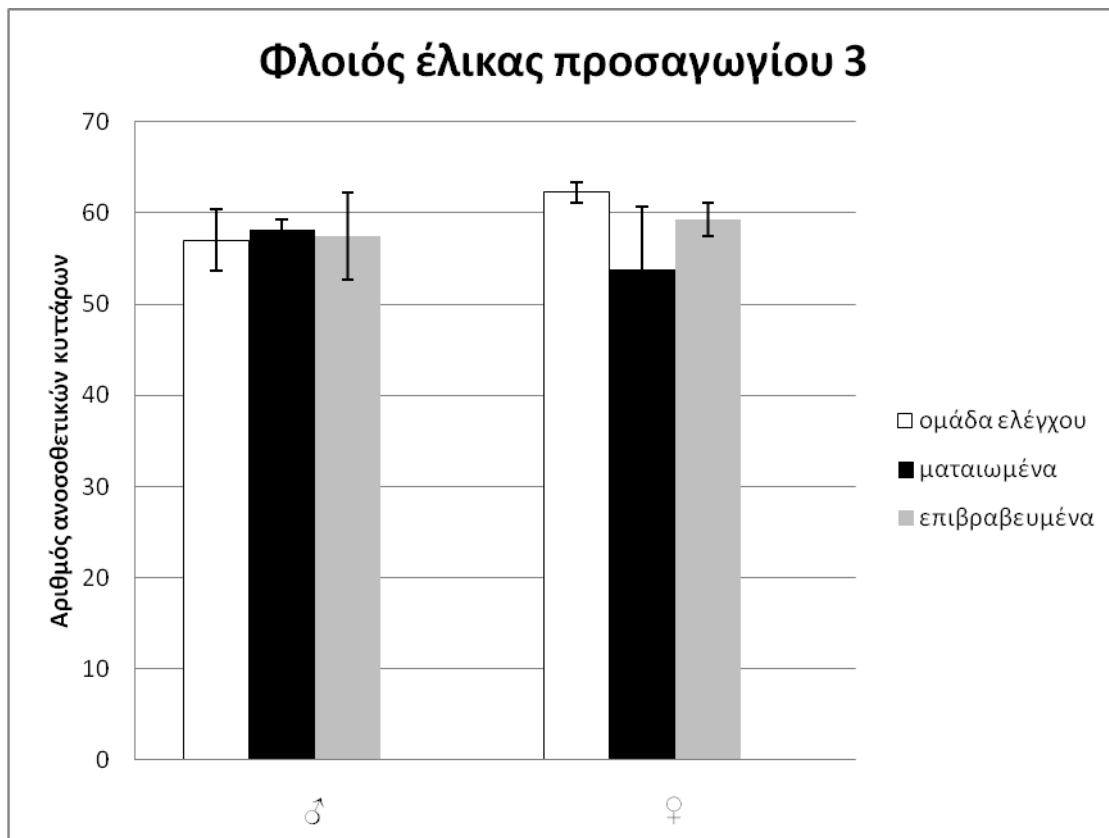
### **Φλοιός έλικας προσαγωγίου, περιοχές 1 και 3**

Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές επιδράσεις στον αριθμό των ανοσοθετικών κυττάρων για τον β1-αδρενεργικό υποδοχέα στις περιοχές 1 και 3 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου. Ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων τόσο σε νεογνικά «ματαιωμένα» ζώα, όσο και σε «επιβραβευμένα» δεν διέφερε στατιστικά σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ζώων.





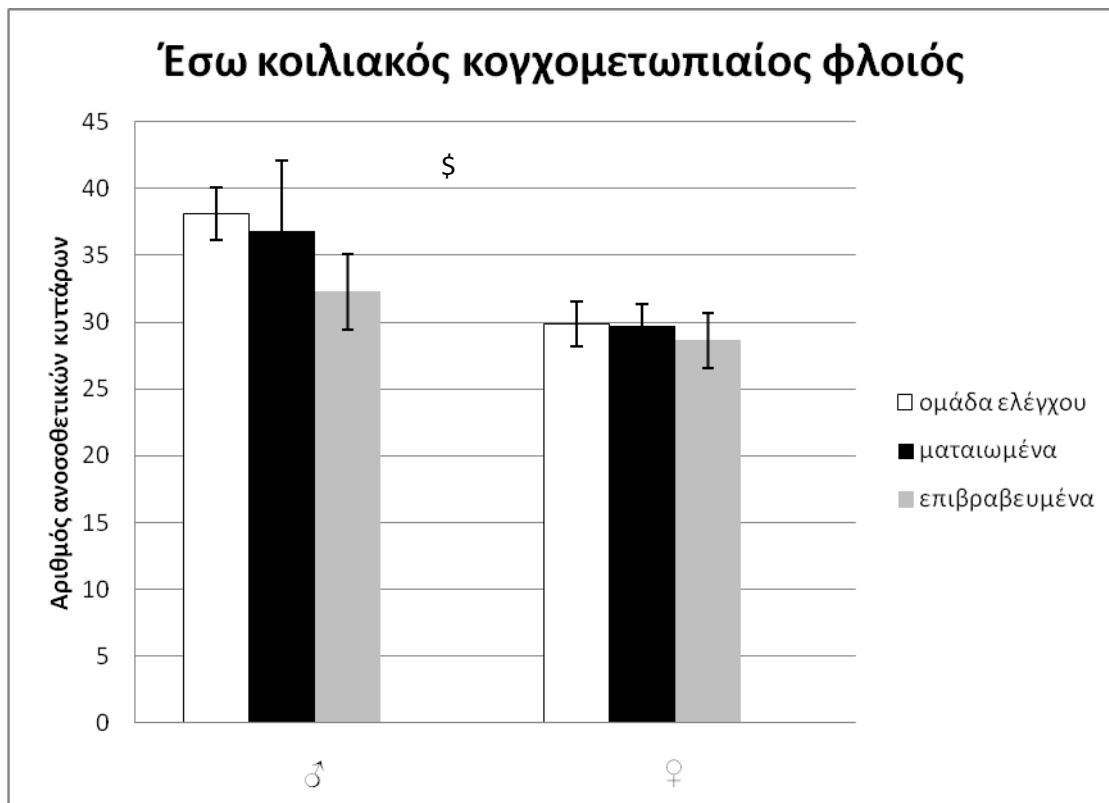
**Γράφημα 11:** Αριθμός ανοσοθετικών κυττάρων στην περιοχή 1 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο αριθμού κυττάρων για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ενήλικα ζώα.



**Γράφημα 12:** Αριθμός ανοσοθετικών κυττάρων στην περιοχή 3 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο αριθμού κυττάρων για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ενήλικα ζώα.

### Έσω κοιλιακός κορχομετωπιαίος φλοιός

Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα έδειξε στατιστικά σημαντική επίδραση του φύλου στον αριθμό των ανοσοθετικών κυττάρων για τον β-αδρενεργικό υποδοχέα στην περιοχή του έσω κοιλιακού κορχομετωπιαίου φλοιού ( $F_{5,29}=10,467$ ,  $p=0,004$ ). Πιο συγκεκριμένα ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων ήταν μειωμένος και στις τρεις πειραματικές ομάδες των θηλυκών ζώων ( $p=0,004$ ) σε σχέση με τα αντίστοιχα αρσενικά ζώα. Δεν παρατηρήθηκε όμως επίδραση της πειραματικής ομάδας στον έσω κοιλιακό κορχομετωπιαίο φλοιό.

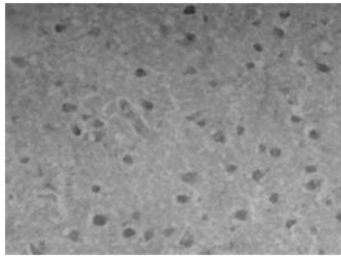


**Γράφημα 13:** Αριθμός ανοσοθετικών κυττάρων στην περιοχή του έσω κοιλιακού κογχομετωπιαίου φλοιού. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο αριθμού κυττάρων για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ενήλικα ζώα. Ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων για τον  $\beta 1$ -αδρενεργικό υποδοχέα ήταν μειωμένος και στις τρεις πειραματικές ομάδες των θηλυκών ζώων ( $\$ 0,01 < p < 0,05$ ) σε σχέση με τα αντίστοιχα αρσενικά ζώα.

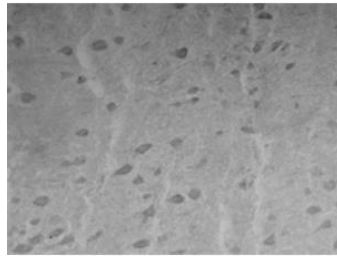
### Έξω κοιλιακός κογχομετωπιαίος φλοιός

Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα έδειξε στατιστικά σημαντική επίδραση της πειραματικής ομάδας ( $F_{5,31}=29,462, p < 0,001$ ) στον αριθμό των ανοσοθετικών κυττάρων για τον  $\beta 1$ -αδρενεργικό υποδοχέα στην περιοχή του έξω κοιλιακού κογχομετωπιαίου φλοιού. Πιο συγκεκριμένα ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων και στα δυο φύλα ήταν αυξημένος στην ομάδα των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (post hoc  $p < 0,001$ ) και σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων (post hoc  $p < 0,001$ ). Πάντως ο αριθμός των ανοσοθετικών

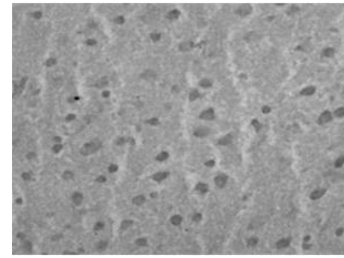
κυττάρων για τον  $\beta_1$ -αδρενεργικό υποδοχέα δεν διέφερε στατιστικά μεταξύ των ομάδων ελέγχου και των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων.



**Ομάδα ελέγχου**

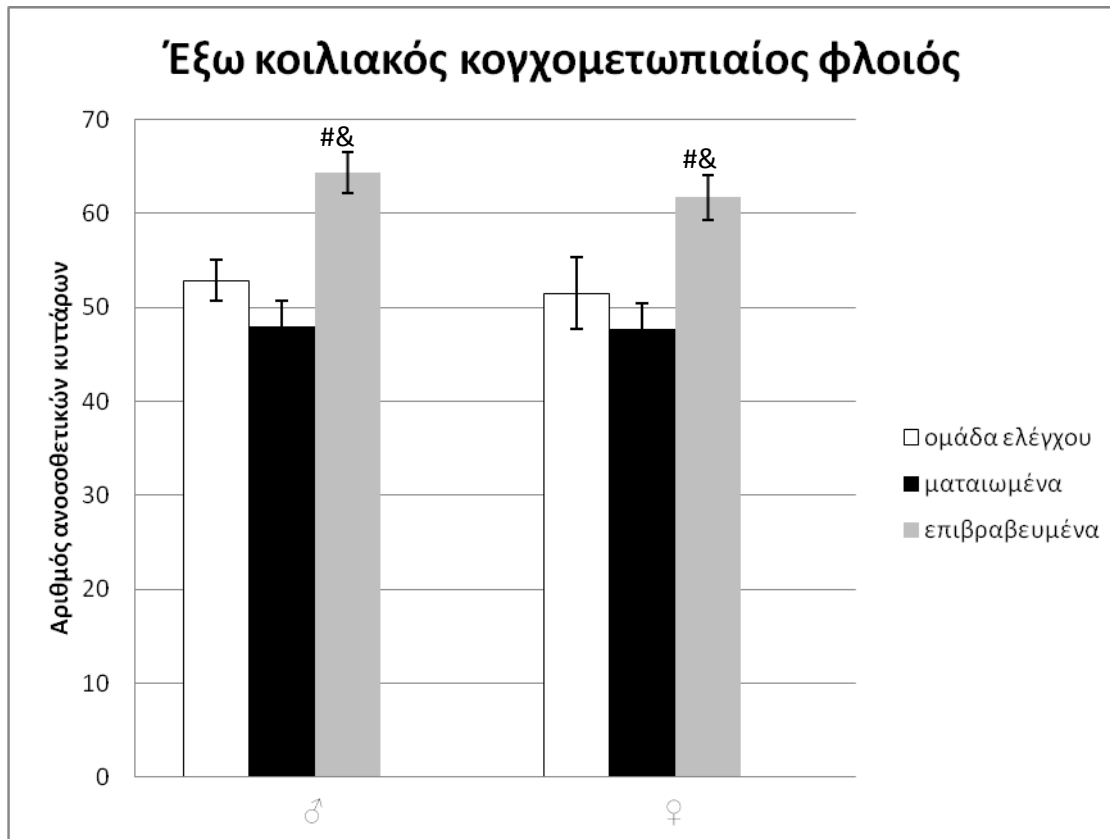


**«ματαιωμένα»**



**«επιβραβευμένα»**

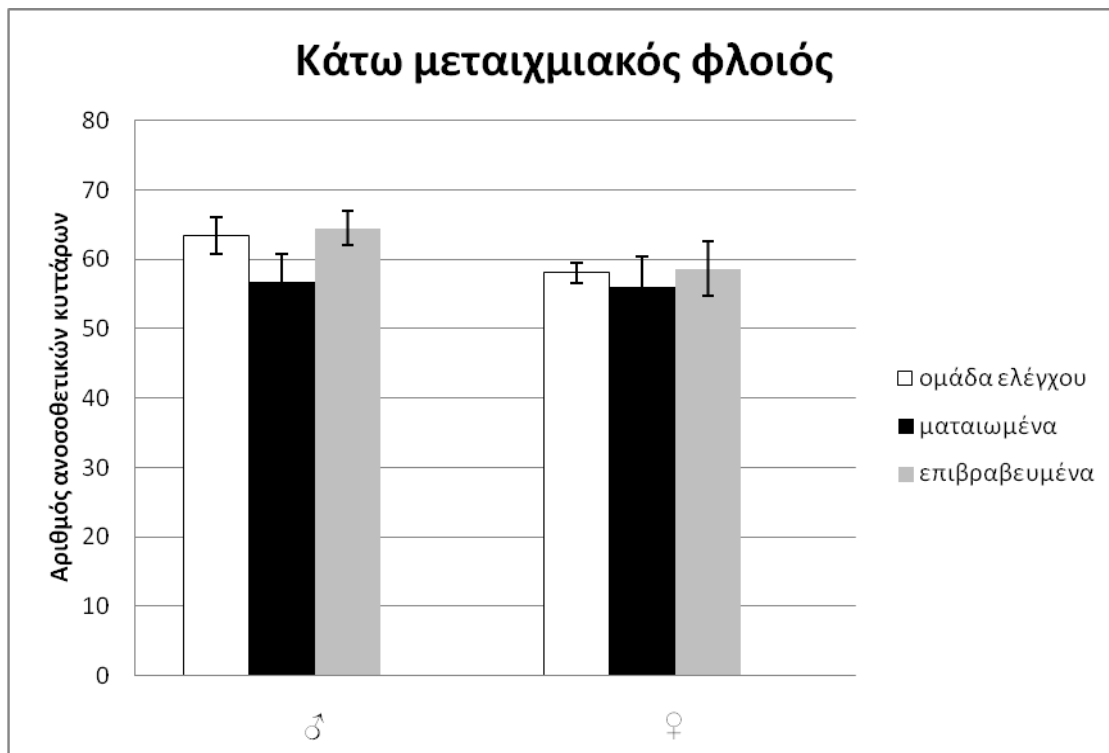
***Εικόνα 21:** Ανοσοθετικά κύτταρα για τον  $\beta$ -αδρενεργικό υποδοχέα στην περιοχή του έξω κοιλιακού κογχομετωπιαίου φλοιού.*



**Γράφημα 14:** Αριθμός ανοσοθετικών κυττάρων στην περιοχή του έξω κοιλιακού κορχομετωπιαίου φλοιού. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο αριθμού κυττάρων για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ενήλικα ζώα. Ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων για τον  $\beta 1$ -αδρενεργικό υποδοχέα ήταν αυξημένος στην ομάδα των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (*post hoc* #  $p < 0,001$ ) και σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων (*post hoc* &  $p < 0,001$ ).

### Κάτω μεταιχμιακός φλοιός

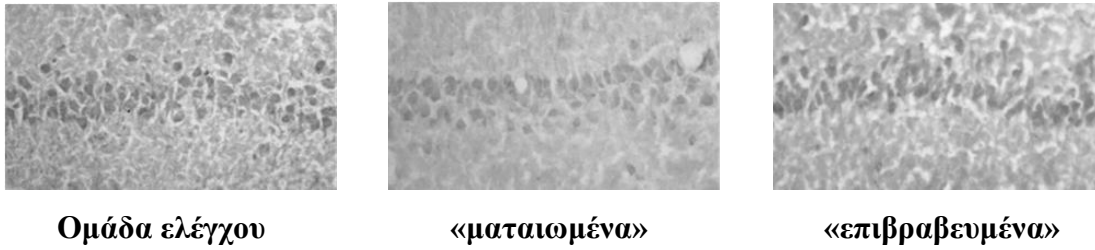
Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές επιδράσεις στον αριθμό των ανοσοθετικών κυττάρων για τον  $\beta 1$ -αδρενεργικό υποδοχέα στην περιοχή του κάτω μεταιχμιακού φλοιού. Ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων τόσο σε νεογνικά «ματαιωμένα» ζώα, όσο και σε «επιβραβευμένα» δεν διέφερε στατιστικά σε σχέση με τα ζώα της ομάδας ελέγχου. Δεν παρατηρήθηκε επίδραση του φύλου.



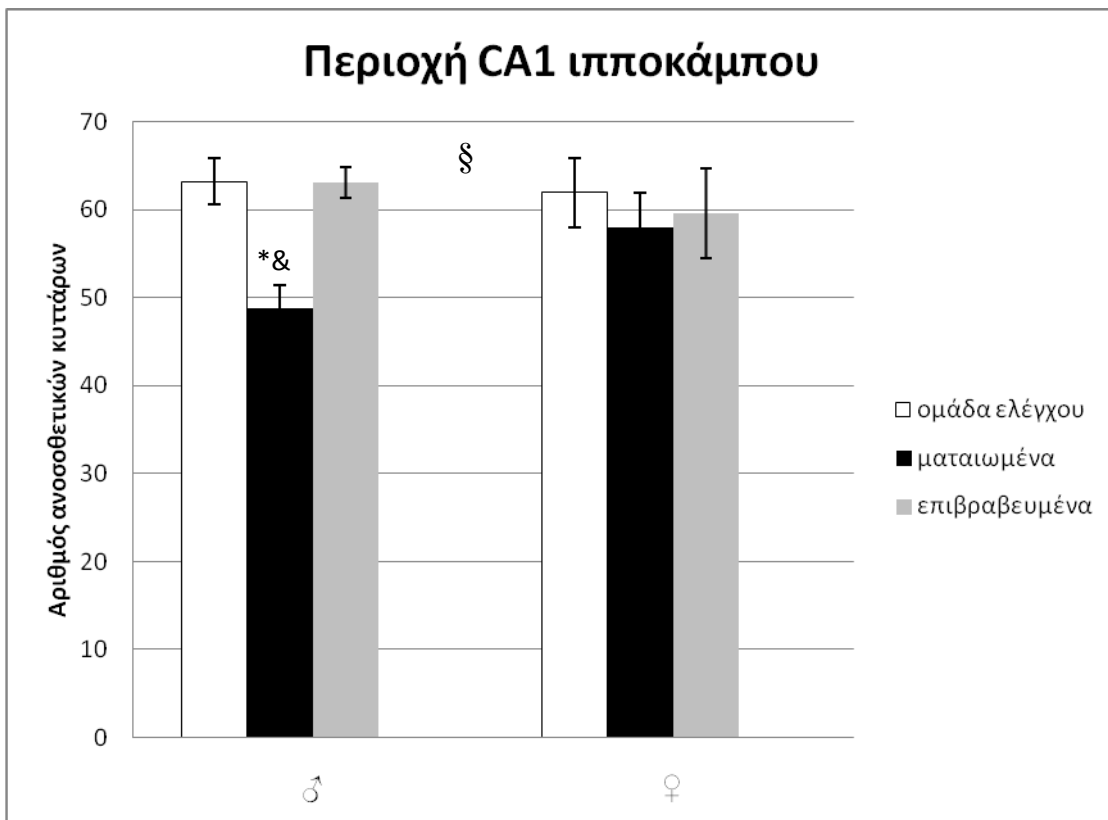
**Γράφημα 15:** Αριθμός ανοσοθετικών κυττάρων στην περιοχή του κάτω μεταιχμιακού φλοιού. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο αριθμού κυττάρων για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ενήλικα ζώα.

### Περιοχές CA1 και CA3 του ιπποκάμπου

Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα έδειξε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση της πειραματικής ομάδας και του φύλου στον αριθμό των ανοσοθετικών κυττάρων για τον  $\beta$ 1-αδρενεργικό υποδοχέα στην περιοχή CA1 του ιπποκάμπου ( $F_{5,32}=3,591$ ,  $p=0,041$ ). Περαιτέρω ανάλυση έδειξε ότι στα αρσενικά ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων στην ομάδα των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων ήταν μειωμένος σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (post hoc  $p=0,001$ ), καθώς και σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων (post hoc  $p=0,002$ ). Πάντως ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων για τον  $\beta$ 1-αδρενεργικό υποδοχέα δεν διέφερε στατιστικά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων. Αντίθετα στα θηλυκά δεν παρατηρήθηκε επίδραση της πειραματικής ομάδας στην περιοχή CA1 του ιπποκάμπου.

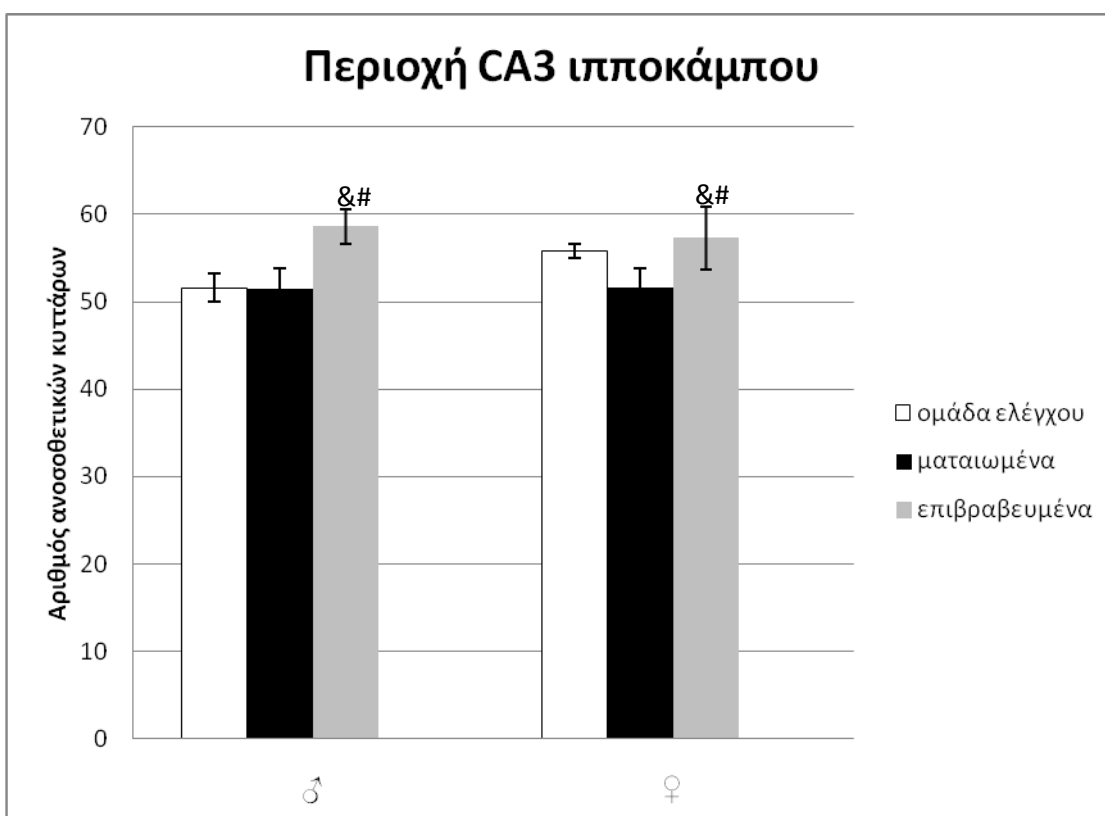


**Εικόνα 22:** Ανοσοθετικά κύτταρα για τον  $\beta 1$ -αδρενεργικό υποδοχέα στην περιοχή CA1 του ιπποκάμπου.



**Γράφημα 16:** Αριθμός ανοσοθετικών κυττάρων στην περιοχή CA1 του ιπποκάμπου. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο αριθμού κυττάρων για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ενήλικα ζώα. Στα αρσενικά ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων στην ομάδα των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων ήταν μειωμένος σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (*post hoc* \*  $p=0,001$ ) καθώς και σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων (*post hoc* &  $p=0,002$ ). Στα θηλυκά δεν παρατηρήθηκε επίδραση της πειραματικής ομάδας.

Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα έδειξε στατιστικά σημαντική επίδραση της πειραματικής ομάδας στον αριθμό των ανοσοθετικών κυττάρων για τον β1-αδρενεργικό υποδοχέα στην περιοχή CA3 του ιπποκάμπου ( $F_{5,34}=5,052$ ,  $p=0,013$ ). Στην περιοχή CA3 του ιπποκάμπου, ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων ήταν αυξημένος στην ομάδα των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (post hoc  $p=0,045$ ) καθώς και σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων (post hoc  $p=0,004$ ). Πάντως ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων για τον β1-αδρενεργικό υποδοχέα δεν διέφερε στατιστικά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων. Δεν παρατηρήθηκε επίδραση του φύλου.

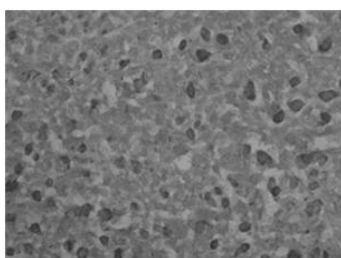


**Γράφημα 17:** Αριθμός ανοσοθετικών κυττάρων στην περιοχή CA3 του ιπποκάμπου. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο αριθμού κυττάρων για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ενήλικα ζώα. Ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων για τον β1-αδρενεργικό υποδοχέα ήταν αυξημένος στην ομάδα των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (post hoc #  $0,05 < p < 0,01$ ) καθώς και σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων (post hoc &  $p=0,004$ ).

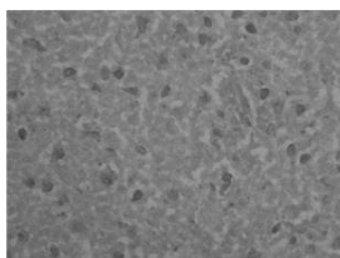


## Έξω βασικός πυρήνας αμυγδαλής

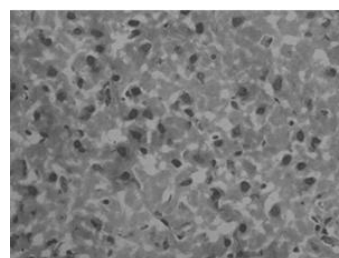
Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα έδειξε στατιστικά σημαντική επίδραση της πειραματικής ομάδας ( $F_{5,28}=5,118, p=0,014$ ) στον αριθμό των ανοσοθετικών κυττάρων για τον  $\beta 1$ -αδρενεργικό υποδοχέα στην περιοχή του έξω βασικού πυρήνα της αμυγδαλής. Πιο συγκεκριμένα, ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων ήταν μειωμένος στην ομάδα των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (post hoc  $p=0,013$ ) και σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων (post hoc  $p=0,014$ ). Πάντως ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων για τον  $\beta$ -αδρενεργικό υποδοχέα δεν διέφερε στατιστικά μεταξύ των ομάδων ελέγχου και των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων. Δεν παρατηρήθηκε επίδραση του φύλου.



**Ομάδα ελέγχου**

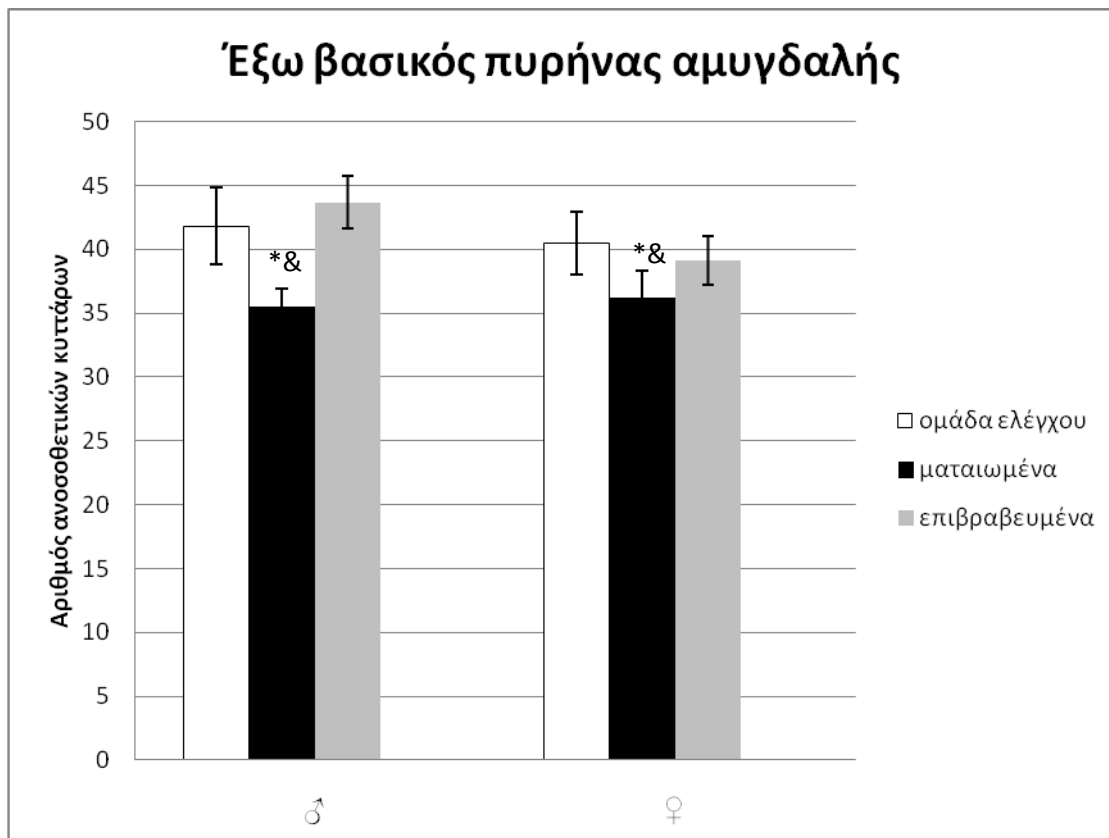


**«ματαιωμένα»**



**«επιβραβευμένα»**

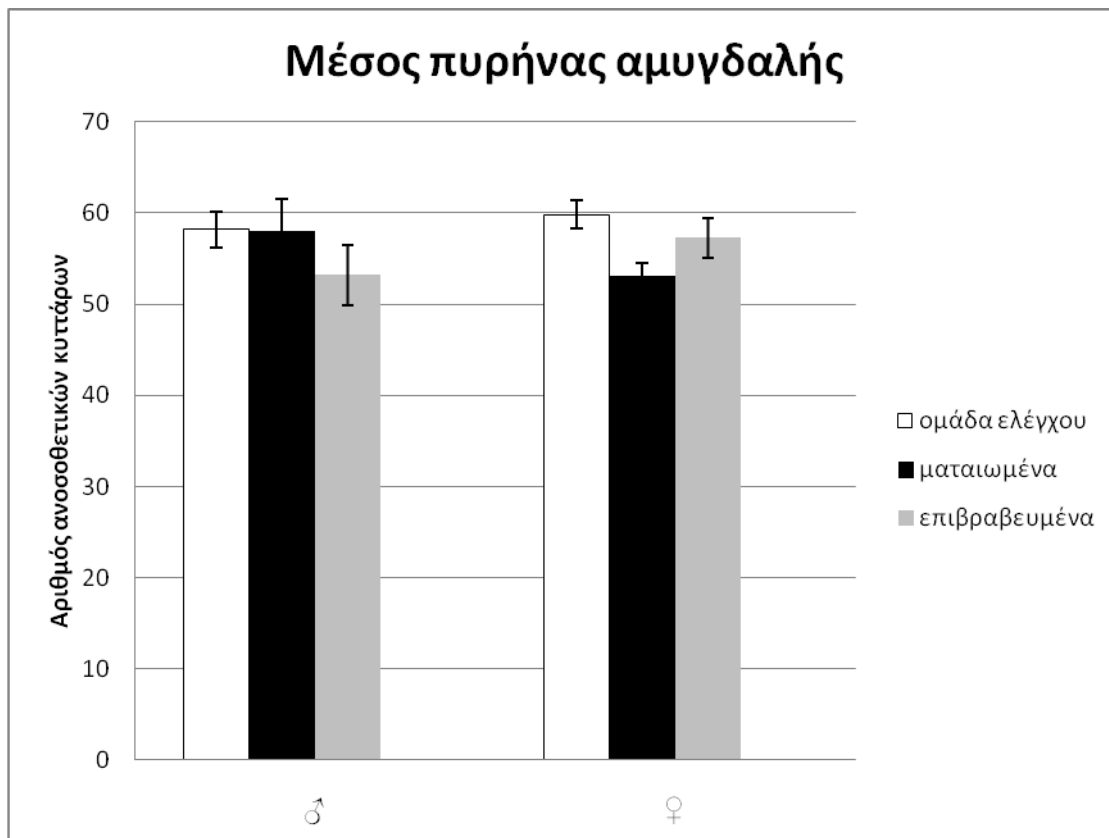
**Εικόνα 23:** Ανοσοθετικά κύτταρα για τον  $\beta 1$ -αδρενεργικό υποδοχέα στην περιοχή του έξω βασικού πυρήνα της αμυγδαλής.



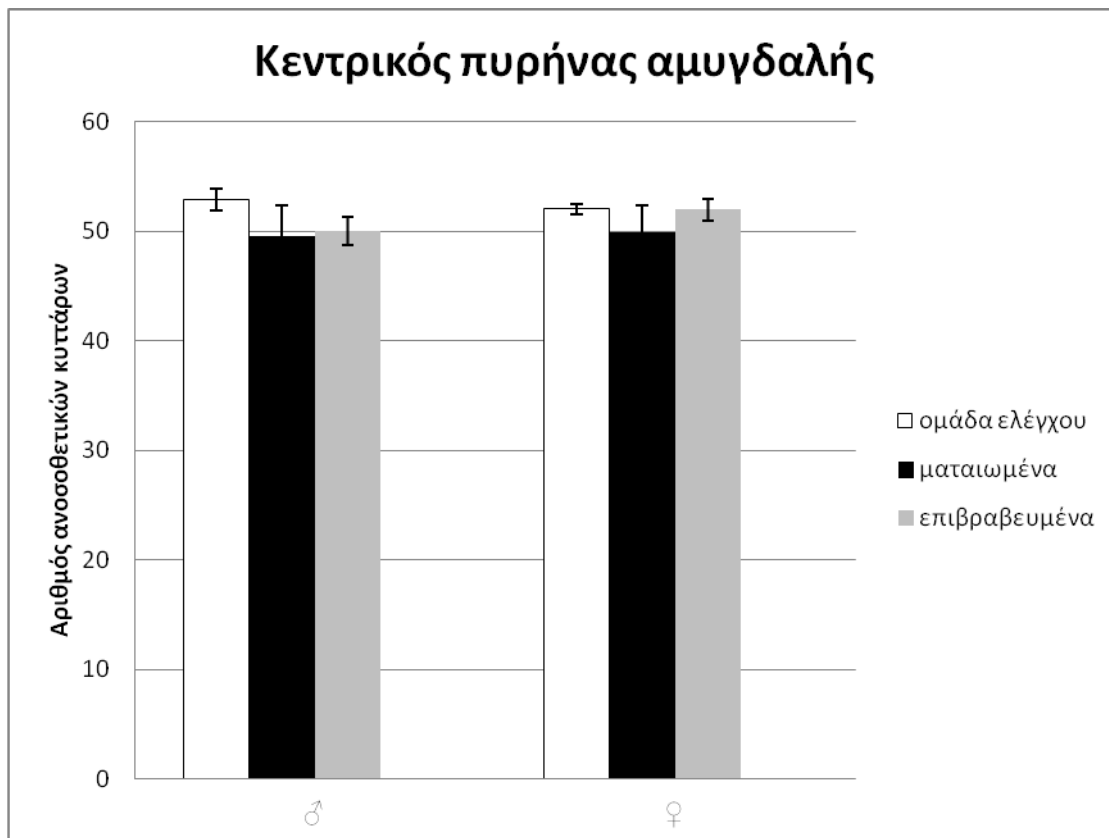
**Γράφημα 18:** Αριθμός ανοσοθετικών κυττάρων στην περιοχή του έξω βασικού πυρήνα της αμυγδαλής. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο αριθμού κυττάρων για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ενήλικα ζώα. Ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων για τον  $\beta 1$ -αδρενεργικό υποδοχέα ήταν μειωμένος στην ομάδα των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (*post hoc* \*  $0,01 < p < 0,05$ ) και σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων (*post hoc* &  $0,01 < p < 0,05$ ).

### Μέσος και κεντρικός πυρήνας αμυγδαλής

Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές επιδράσεις στον αριθμό των ανοσοθετικών κυττάρων για τον  $\beta 1$ -αδρενεργικό υποδοχέα στον μέσο και κεντρικό πυρήνα της αμυγδαλής. Ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων τόσο σε νεογνικά «ματαιωμένα» ζώα, όσο και σε «επιβραβευμένα» δεν διέφερε στατιστικά σε σχέση με τα ζώα των ομάδων ελέγχου. Δεν παρατηρήθηκε επίδραση του φύλου.



**Γράφημα 19:** Αριθμός ανοσοθετικών κυττάρων στην περιοχή του μέσου πυρήνα της αμυγδαλής. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο αριθμού κυττάρων για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ενήλικα ζώα.



**Γράφημα 20:** Αριθμός ανοσοθετικών κυττάρων στην περιοχή του κεντρικού πυρήνα της αμυγδαλής. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο αριθμού κυττάρων για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ενήλικα ζώα.

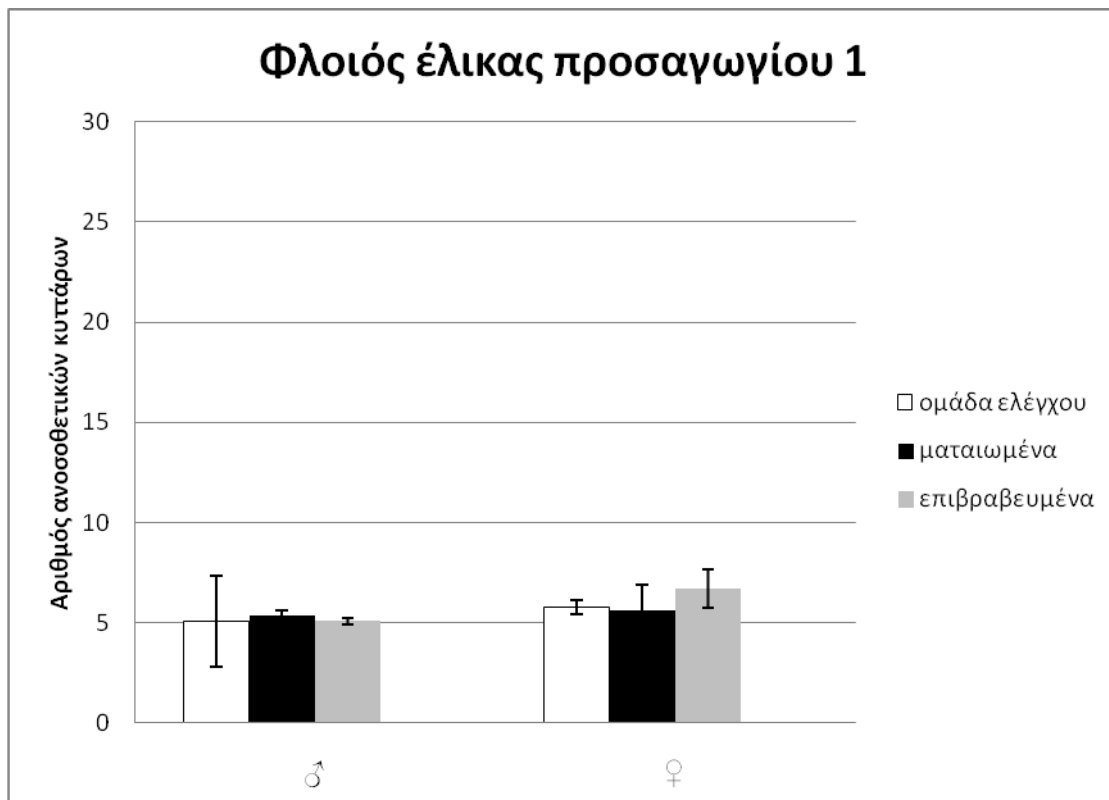
Συμπερασματικά, στον εγκέφαλο ενήλικων αρουραίων βρέθηκε ότι στις περιοχές 1 και 3 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου, στον κάτω μεταιχμιακό φλοιό, στον μέσο και στον κεντρικό πυρήνα της αμυγδαλής δεν υπήρξε επίδραση της πρώιμης εμπειρίας στον αριθμό των β1-ανοσοθετικών κυττάρων. Στις περιοχές του έξω κογχομετωπιαίου φλοιού, της CA3 και της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου και του έξω βασικού πυρήνα της αμυγδαλής ο αριθμός των β1-ανοσοθετικών κυττάρων ήταν μεγαλύτερος στα επιβραβευμένα ζώα σε σχέση με τα ματαιωμένα ζώα. Η διαφορά αυτή στην CA1 περιοχή του ιπποκάμπου παρατηρήθηκε μόνο στα αρσενικά και όχι στα θηλυκά. Επίσης στον έσω κογχομετωπιαίο φλοιό βρέθηκε ότι τα αρσενικά έχουν μεγαλύτερο αριθμό β1-ανοσοθετικών κυττάρων σε σχέση με τα θηλυκά.

### **4.3 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ $\alpha$ 2Α-ΑΔΡΕΝΕΡΓΙΚΟ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΣΕ ΕΝΗΛΙΚΟΥΣ ΕΠΪΜΥΣ**

Στα γραφήματα 21 έως 28 παρουσιάζεται ο αριθμός των θετικών κυττάρων για τον  $\alpha$ 2-αδρενεργικό υποδοχέα ανά οπτικό πεδίο κατά τον ανοσοϊστοχημικό έλεγχο διαφόρων περιοχών του εγκεφάλου ενήλικων επίμυων και των έξι πειραματικών ομάδων (αρσενικοί μάρτυρες, θηλυκοί μάρτυρες, αρσενικά υπό ματαίωση, θηλυκά υπό ματαίωση, αρσενικά υπό ανταμοιβή, θηλυκά υπό ανταμοιβή). Μεταξύ του αριστερού και του δεξιού ημισφαιρίου του εγκεφάλου των επίμυων δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στον αριθμό των ανοσοθετικών κυττάρων, οπότε παρουσιάζεται ο μέσος όρος τους.

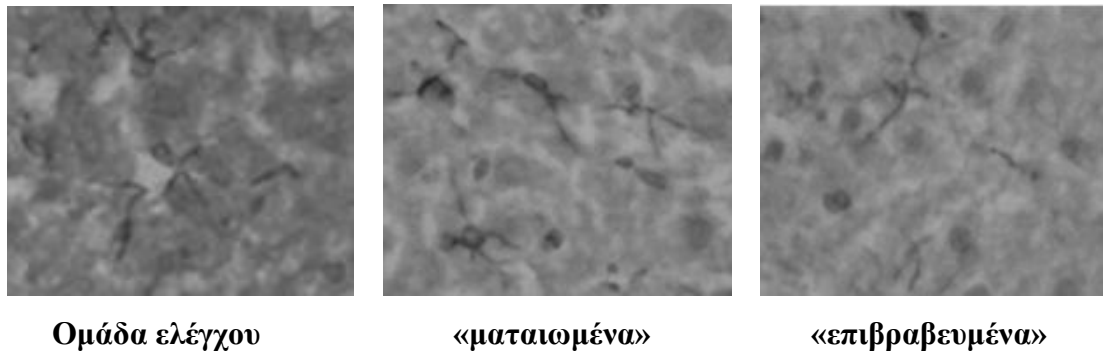
#### **Φλοιός έλικας προσαγωγίου, περιοχές 1 και 3**

Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές επιδράσεις στον αριθμό των ανοσοθετικών κυττάρων για τον  $\alpha$ 2-αδρενεργικό υποδοχέα στην περιοχή 1 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου. Ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων τόσο σε νεογνικά «ματαιωμένα» ζώα, όσο και σε «επιβραβευμένα» δεν διέφερε στατιστικά σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ζώων.

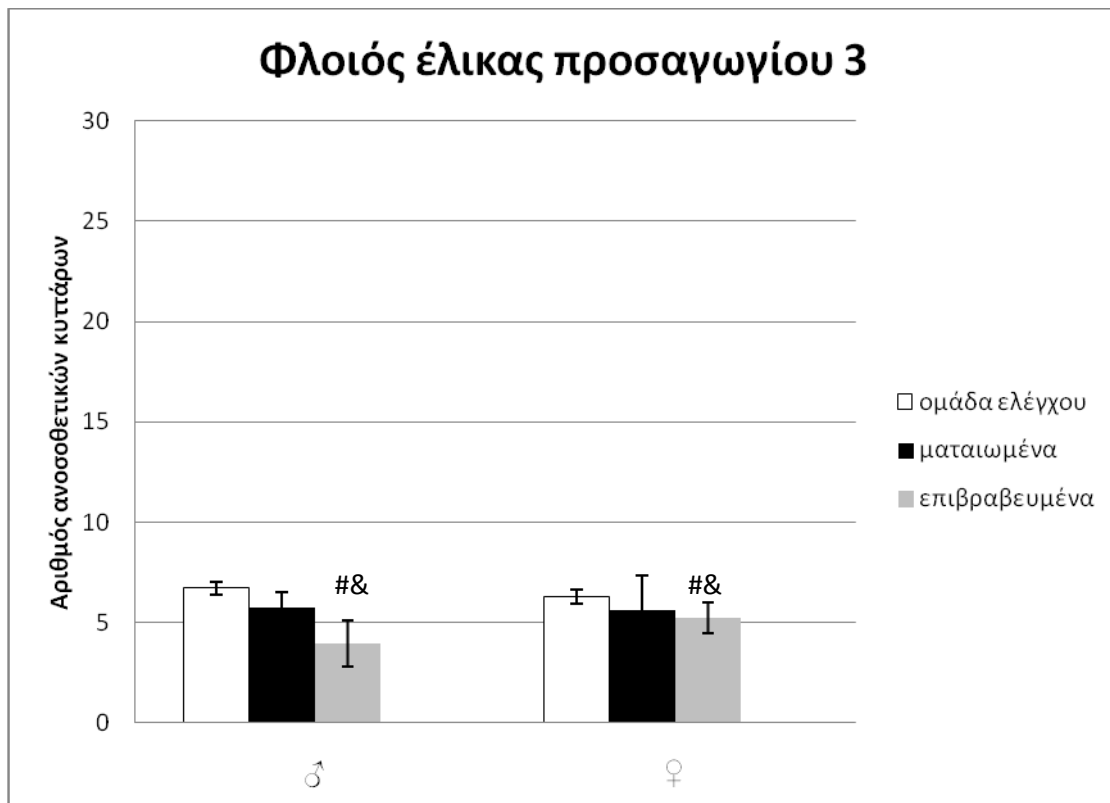


**Γράφημα 21:** Αριθμός  $\alpha_2$ -ανοσοθετικών κυττάρων στην περιοχή 1 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο αριθμού κυττάρων για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ενήλικα ζώα.

Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα έδειξε στατιστικά σημαντική επίδραση της πειραματικής ομάδας ( $F_{5,22}=5,493$ ,  $p=0,014$ ) στον αριθμό των ανοσοθετικών κυττάρων για τον  $\alpha_2$ -αδρενεργικό υποδοχέα στην περιοχή 3 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου. Πιο συγκεκριμένα, ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων ήταν μειωμένος στην ομάδα των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων (post hoc  $p=0,022$ ) καθώς και σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (post hoc  $p=0,006$ ). Πάντως ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων για τον  $\alpha_2$ -αδρενεργικό υποδοχέα δεν διέφερε στατιστικά μεταξύ των ομάδων ελέγχου και των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων. Δεν παρατηρήθηκε επίδραση του φύλου.



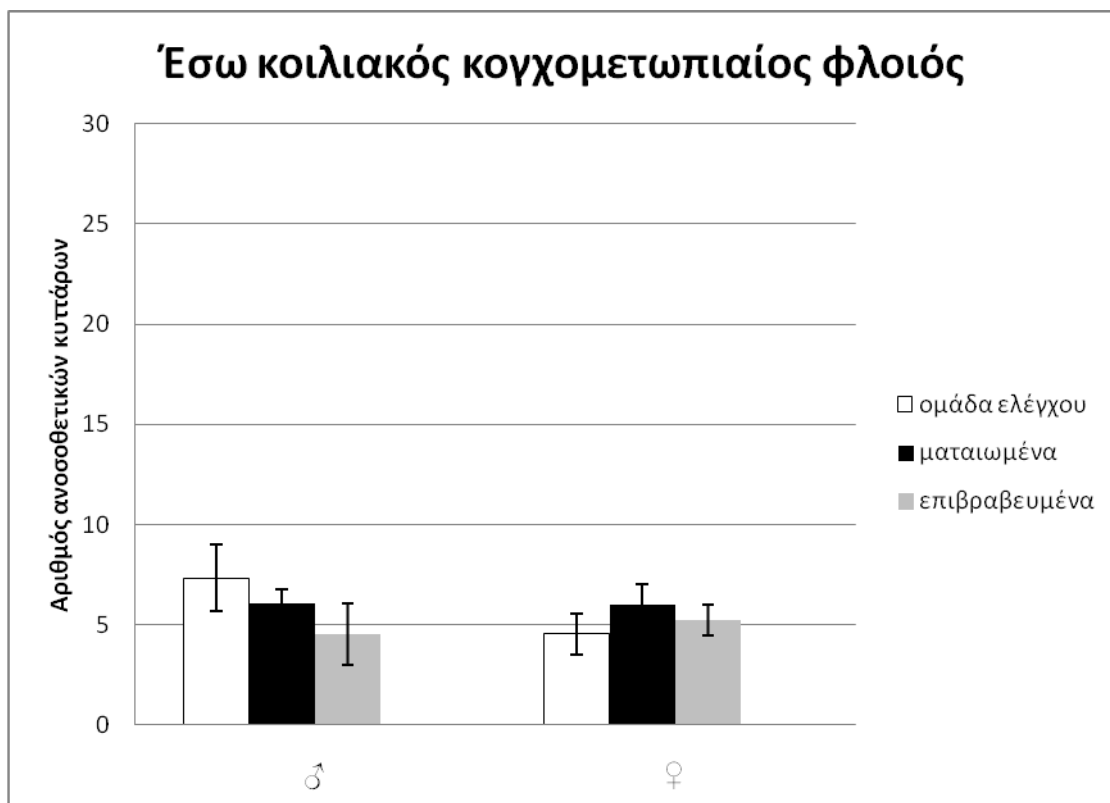
**Εικόνα 24:** Ανοσοθετικά κύτταρα για τον α2-αδρενεργικό υποδοχέα στην περιοχή 3 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου.



**Γράφημα 22:** Αριθμός α2-ανοσοθετικών κυττάρων στην περιοχή 3 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο αριθμού κυττάρων για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ενήλικα ζώα. Ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων ήταν μειωμένος στην ομάδα των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων (*post hoc* &  $0,01 < p < 0,05$ ) καθώς σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (*post hoc* #  $p = 0,006$ ). Ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων ήταν μειωμένος στην ομάδα των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων.

## Έσω κοιλιακός κορχομετωπιαίος φλοιός

Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα δεν έδειξε στατιστικά σημαντική επίδραση της πειραματικής ομάδας στον αριθμό των ανοσοθετικών κυττάρων για τον α2-αδρενεργικό υποδοχέα στην περιοχή του έσω κοιλιακού κορχομετωπιαίου φλοιού. Ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων τόσο σε νεογνικά «ματαιωμένα» ζώα, όσο και σε «επιβραβευμένα» δεν διέφερε στατιστικά σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ζώων.

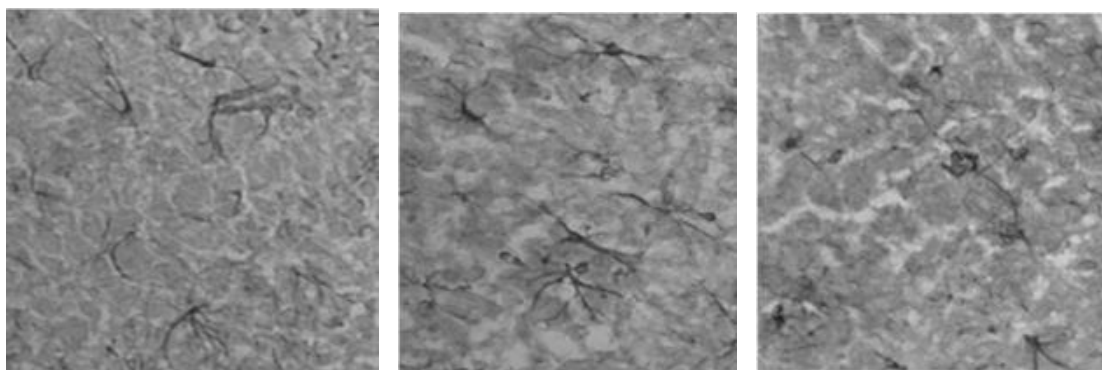


**Γράφημα 23:** Αριθμός α2-ανοσοθετικών κυττάρων στην περιοχή του έσω κοιλιακού κορχομετωπιαίου φλοιού. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο αριθμού κυττάρων για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ενήλικα ζώα.



## Περιοχές CA1 και CA3 του ιπποκάμπου

Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα έδειξε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση της πειραματικής ομάδας και του φύλου ( $F_{2,17}=3,694$ ,  $p=0,05$ ) στον αριθμό των ανοσοθετικών κυττάρων για τον  $\alpha_2$ -αδρενεργικό υποδοχέα στην περιοχή CA1 του ιπποκάμπου ( $\xi$   $p=0,05$ ). Περαιτέρω ανάλυση έδειξε ότι στα αρσενικά, ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων στην ομάδα των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων ήταν αυξημένος σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (post hoc  $p=0,003$ ), καθώς και σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων (post hoc  $p=0,024$ ). Πάντως ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων για τον  $\alpha_2$ -αδρενεργικό υποδοχέα δεν διέφερε στατιστικά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων. Αντίθετα στα θηλυκά δεν παρατηρήθηκε επίδραση της πειραματικής ομάδας στον αριθμό των  $\alpha_2$ -ανοσοθετικών κυττάρων στην περιοχή CA1 του ιπποκάμπου.

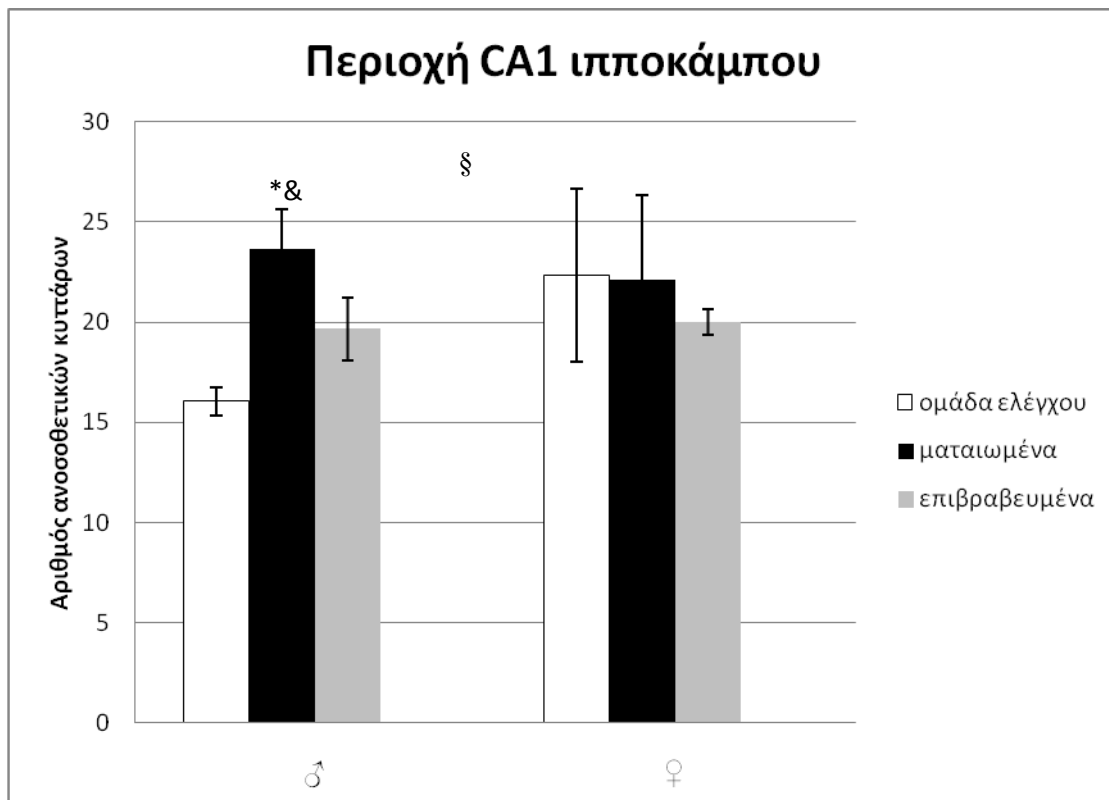


Ομάδα ελέγχου

«ματαιωμένα»

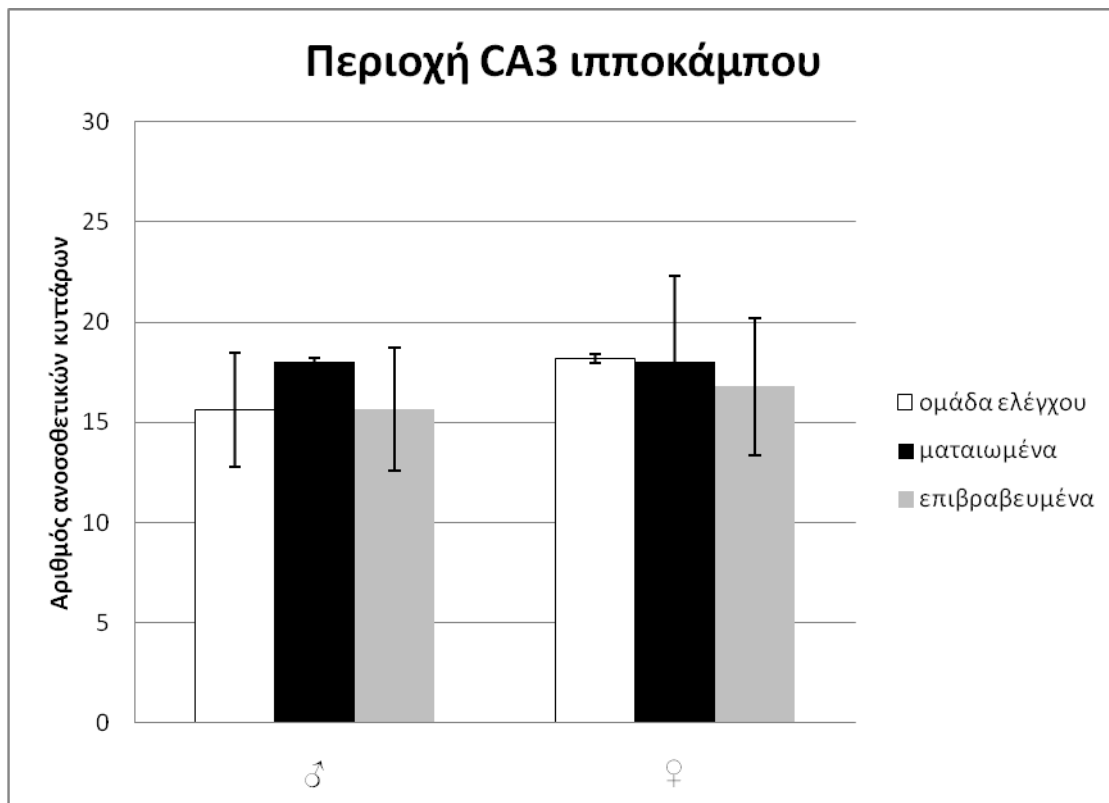
«επιβραβευμένα»

**Εικόνα 25:** Ανοσοθετικά κύτταρα για τον  $\alpha_2$ -αδρενεργικό υποδοχέα στην περιοχή CA1 του ιπποκάμπου σε αρσενικά ζώα.



**Γράφημα 24:** Αριθμός α2-ανοδοθετικών κυττάρων στην περιοχή CA1 του ιπποκάμπου. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο αριθμού κυττάρων για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ενήλικα ζώα. Στα αρσενικά, ο αριθμός των ανοδοθετικών κυττάρων στην ομάδα των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων ήταν αυξημένος σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (*post hoc* \*  $p=0,003$ ) καθώς και σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων (*post hoc* &  $0,01 < p < 0,05$ ). Στα θηλυκά δεν παρατηρήθηκε επίδραση της πειραματικής ομάδας.

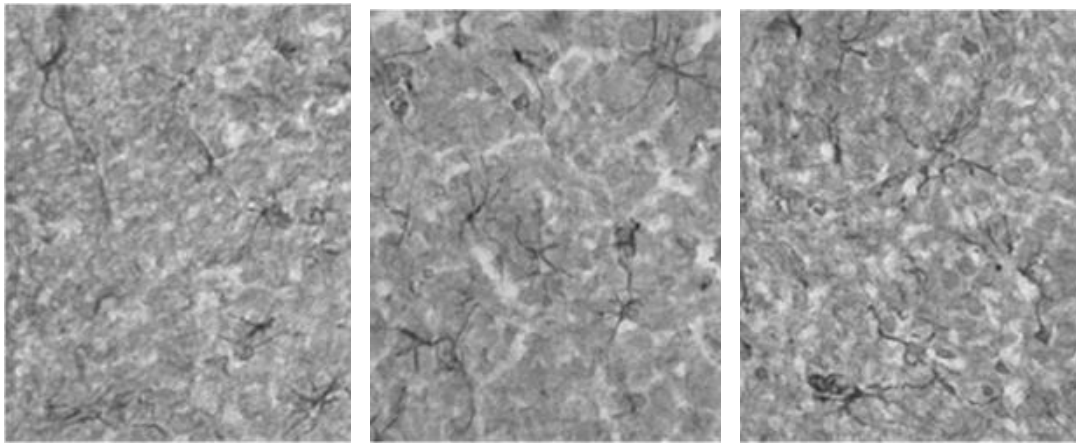
Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές επιδράσεις στον αριθμό των ανοδοθετικών κυττάρων για τον α2-αδρενεργικό υποδοχέα στην περιοχή 3 του ιπποκάμπου. Ο αριθμός των ανοδοθετικών κυττάρων τόσο σε νεογνικά «ματαιωμένα» ζώα, όσο και σε «επιβραβευμένα» δεν διέφερε στατιστικά σε σχέση με τα ζώα των ομάδων ελέγχου. Δεν παρατηρήθηκε επίδραση του φύλου.



**Γράφημα 25:** Αριθμός α2-ανοσοθετικών κυττάρων στην περιοχή CA3 του ιπποκάμπου. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο αριθμού κυττάρων για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ενήλικα ζώα.

### Έξω βασικός πυρήνας αμυγδαλής

Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα έδειξε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση της πειραματικής ομάδας και του φύλου στον αριθμό των ανοσοθετικών κυττάρων για τον α2-αδρενεργικό υποδοχέα στην περιοχή του έξω βασικού πυρήνα της αμυγδαλής ( $F_{5,17}=57,70, p=0,009$ ). Περαιτέρω ανάλυση έδειξε ότι στα αρσενικά ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων στην ομάδα των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων ήταν αυξημένος σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (post hoc  $p=0,017$ ), καθώς και σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων (post hoc  $p=0,039$ ). Πάντως ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων για τον α2-αδρενεργικό υποδοχέα δεν διέφερε στατιστικά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων. Αντίθετα στα θηλυκά δεν παρατηρήθηκε επίδραση της πειραματικής ομάδας στον αριθμό των α2-ανοσοθετικών κυττάρων στην περιοχή του έξω βασικού πυρήνα της αμυγδαλής.

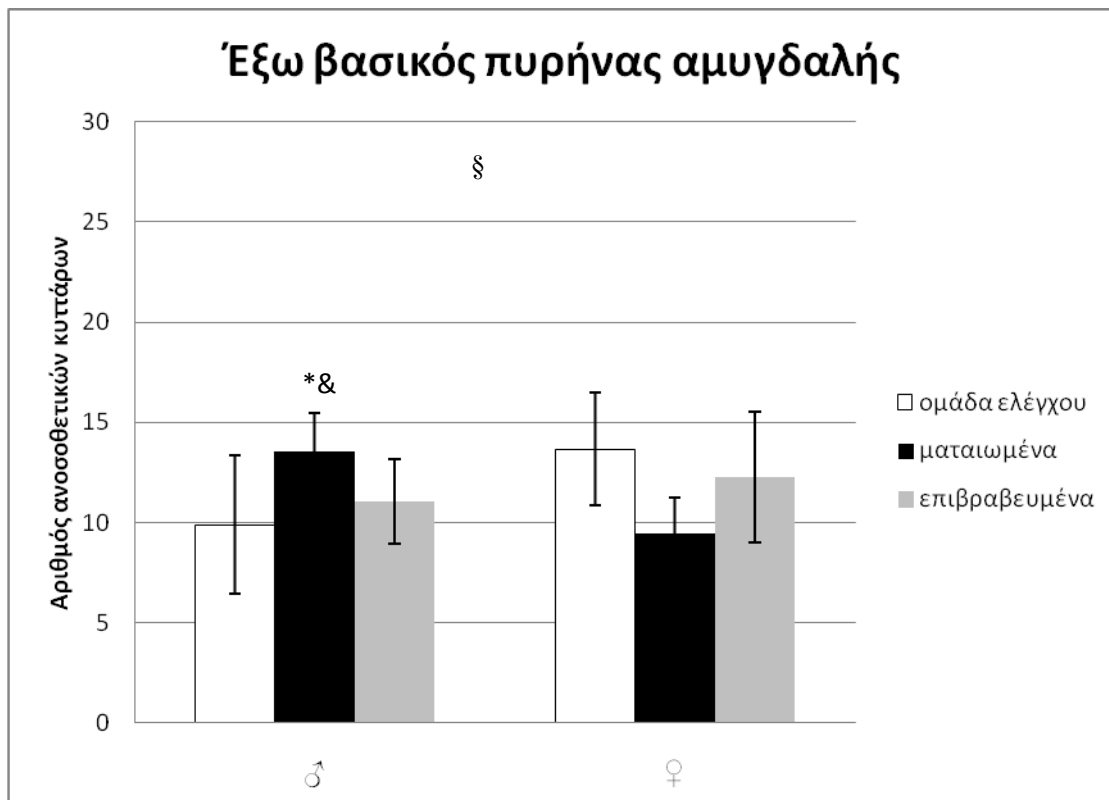


**Ομάδα ελέγχου**

**«ματαιωμένα»**

**«επιβραβευμένα»**

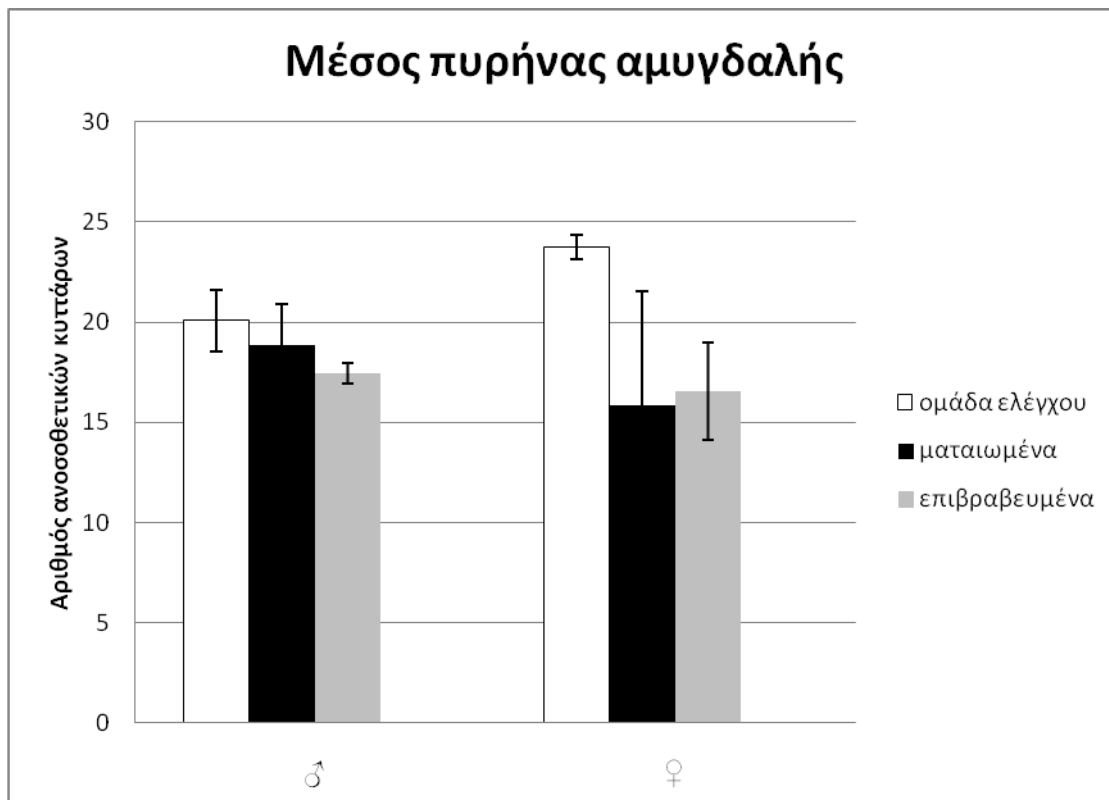
***Εικόνα 26:** Ανοσοθετικά κύτταρα για τον  $\alpha_2$ -αδρενεργικό υποδοχέα στην περιοχή του έξω βασικού πυρήνα της αμυγδαλής σε αρσενικά ζώα.*



**Γράφημα 26:** Αριθμός α2-ανοσοθετικών κυττάρων στην περιοχή του έξω βασικού πυρήνα της αμυγδαλής. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο αριθμού κυττάρων για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ενήλικα ζώα. Στα αρσενικά ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων στην ομάδα των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων ήταν αυξημένος σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (*post hoc* \*  $0,01 < p < 0,05$ ) καθώς και, σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων (*post hoc* &  $0,01 < p < 0,05$ ). Στα θηλυκά δεν παρατηρήθηκε επίδραση της πειραματικής ομάδας.

### Μέσος πυρήνας αμυγδαλής

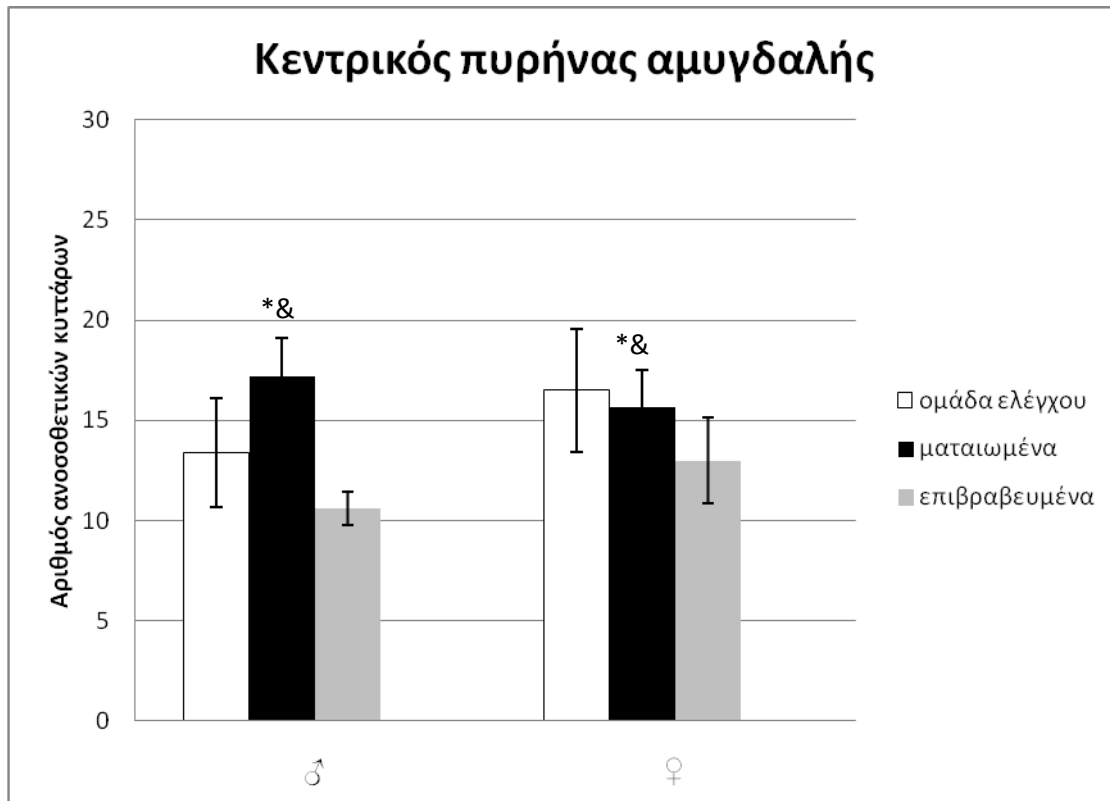
Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές επιδράσεις στον αριθμό των ανοσοθετικών κυττάρων για τον α2-αδρενεργικό υποδοχέα στην περιοχή του μέσου πυρήνα της αμυγδαλής. Ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων τόσο σε νεογνικά «ματαιωμένα» ζώα, όσο και σε «επιβραβευμένα» δεν διέφερε στατιστικά σε σχέση με τα ζώα των ομάδων ελέγχου. Δεν παρατηρήθηκε επίδραση του φύλου.



**Γράφημα 27:** Αριθμός α2-ανοσοθετικών κυττάρων στην περιοχή του μέσου πυρήνα της αμυγδαλής. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο αριθμού κυττάρων για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ενήλικα ζώα.

### Κεντρικός πυρήνας αμυγδαλής

Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα έδειξε στατιστικά σημαντική επίδραση της πειραματικής ομάδας ( $F_{5,17}=12,128$ ,  $p=0,001$ ) στον αριθμό των ανοσοθετικών κυττάρων για τον α2-αδρενεργικό υποδοχέα στην περιοχή του κεντρικού πυρήνα της αμυγδαλής. Πιο συγκεκριμένα, ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων ήταν αυξημένος στην ομάδα των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων ( $\text{post hoc } p<0,001$ ) καθώς και σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου ( $\text{post hoc } p=0,006$ ). Πάντως ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων για τον α2-αδρενεργικό υποδοχέα δεν διέφερε στατιστικά μεταξύ των ομάδων ελέγχου και των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων. Δεν παρατηρήθηκε επίδραση του φύλου.

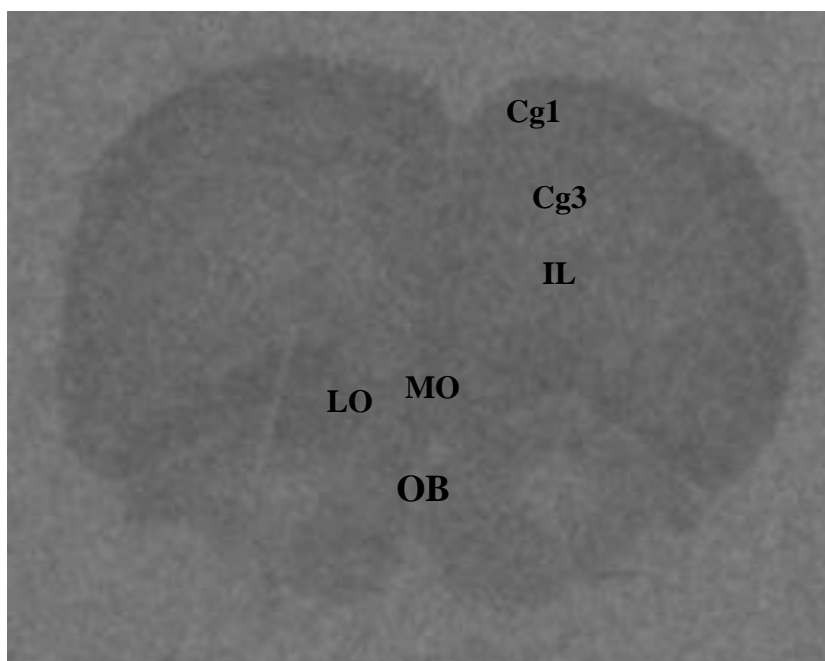


**Γράφημα 28:** Αριθμός α2-ανοσοθετικών κυττάρων στην περιοχή του κεντρικού πυρήνα της αμυγδαλής. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο αριθμού κυττάρων για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ενήλικα ζώα. Ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων ήταν αυξημένος στην ομάδα των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων (*post hoc* &  $p < 0,001$ ) καθώς και σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (*post hoc* \*  $p = 0,006$ ).

Συμπερασματικά, στον εγκέφαλο ενήλικων αρουραίων βρέθηκε ότι στις περιοχές 1 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου, στον έσω κορχομετωπιαίο φλοιό, στη CA3 περιοχή του ιπποκάμπου και στον μέσο πυρήνα της αμυγδαλής η πρόιμη εμπειρία δεν επηρέασε τον αριθμό των α2-ανοσοθετικών κυττάρων. Αντίθετα στην περιοχή 3 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου, στην περιοχή CA1 του ιπποκάμπου και στον κεντρικό και έξω βασικό πυρήνα της αμυγδαλής τα ματαιωμένα ζώα είχαν μεγαλύτερο αριθμό α2-ανοσοθετικών κυττάρων σε σχέση με τα επιβραβευμένα ζώα. Η διαφορά αυτή στην περιοχή CA1 του ιπποκάμπου και έξω βασικό πυρήνα της αμυγδαλής παρατηρήθηκε μόνο στα αρσενικά ζώα και όχι στα θηλυκά.

#### 4.4 IN VITRO ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΡΑΔΙΟΣΗΜΑΣΜΕΝΟΥ ΔΕΣΜΕΥΤΗ ΓΙΑ ΤΟΝ Β1-ΑΔΡΕΝΕΡΓΙΚΟ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΣΕ ΕΠΙΜΥΣ 13<sup>ης</sup> ΜΕΤΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ ΗΜΕΡΑΣ

Στα γραφήματα 29 έως 37 παρουσιάζεται η ποσότητα της λειτουργικής πρωτεΐνης του β1-αδρενεργικού υποδοχέα όπως προσδιορίζεται από την in vitro πρόσδεση ραδιοσημασμένου ανιχνευτή στις διάφορες περιοχές του εγκεφάλου επίμυων 13<sup>ης</sup> μεταγεννητικής ημέρας και των έξι πειραματικών ομάδων (αρσενικοί μάρτυρες, θηλυκοί μάρτυρες, αρσενικά υπό ματαίωση, θηλυκά υπό ματαίωση, αρσενικά υπό ανταμοιβή, θηλυκά υπό ανταμοιβή). Μεταξύ του αριστερού και του δεξιού ημισφαιρίου του εγκεφάλου των επίμυων δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, οπότε παρουσιάζεται ο μέσος όρος τους.

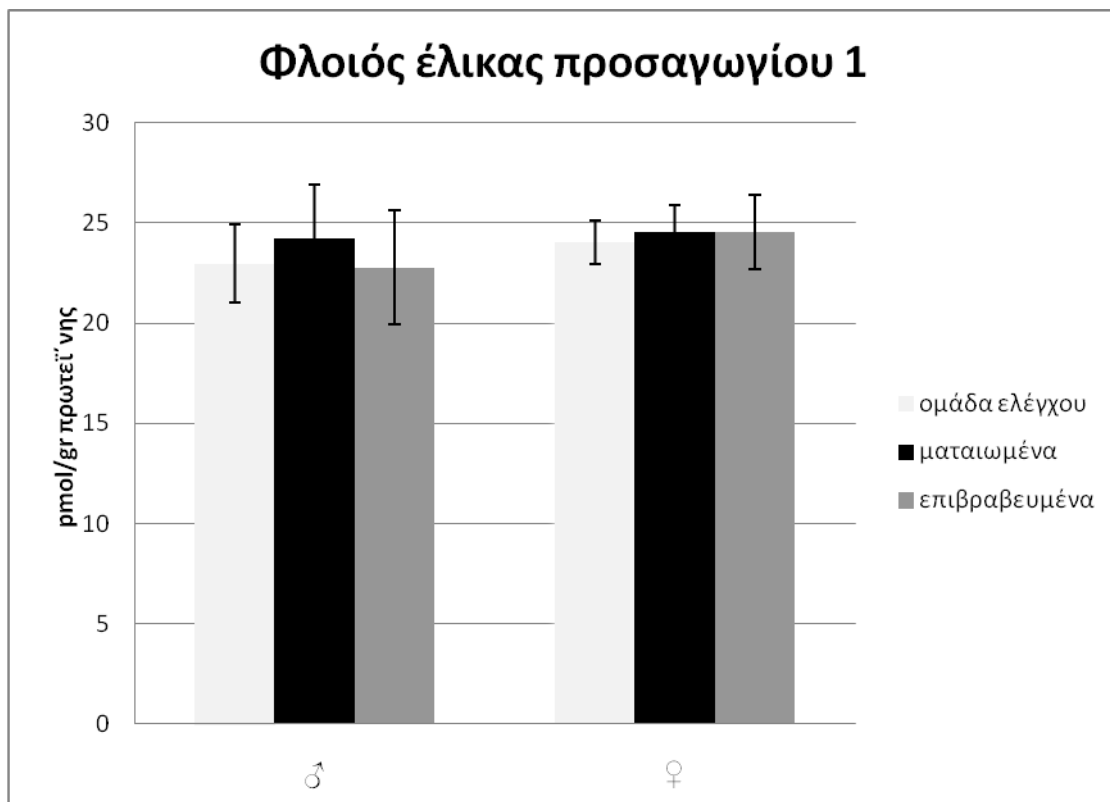


**Εικόνα 27:** Τομές εγκεφάλου σε επίπεδο προμετωπιαίου φλοιού. Cg1:περιοχή 1 φλοιού έλικας προσαγωγίου, Cg3:περιοχή 3 φλοιού έλικας προσαγωγίου, IL:κάτω μεταιχμιακός φλοιός, LO:έξω κογχομετωπιαίος φλοιός, MO:έσω κογχομετωπιαίος φλοιός, OB: οσφρητικός βολβός.

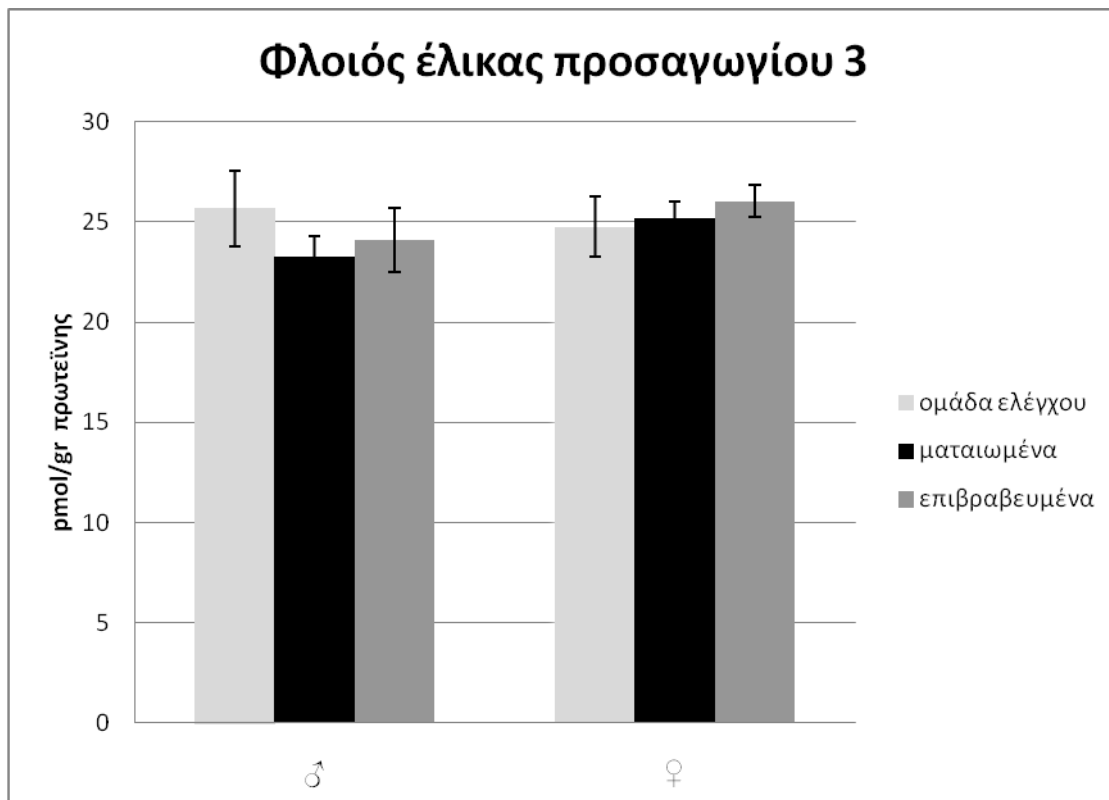


### Φλοιός έλικας προσαγωγίου, περιοχές 1 και 3

Και στις δύο αυτές περιοχές η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές επιδράσεις στην ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα στην περιοχή 1 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου. Η ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα τόσο σε νεογνικά «ματαιωμένα» ζώα, όσο και σε «επιβραβευμένα» δεν διέφερε στατιστικά σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ζώων.



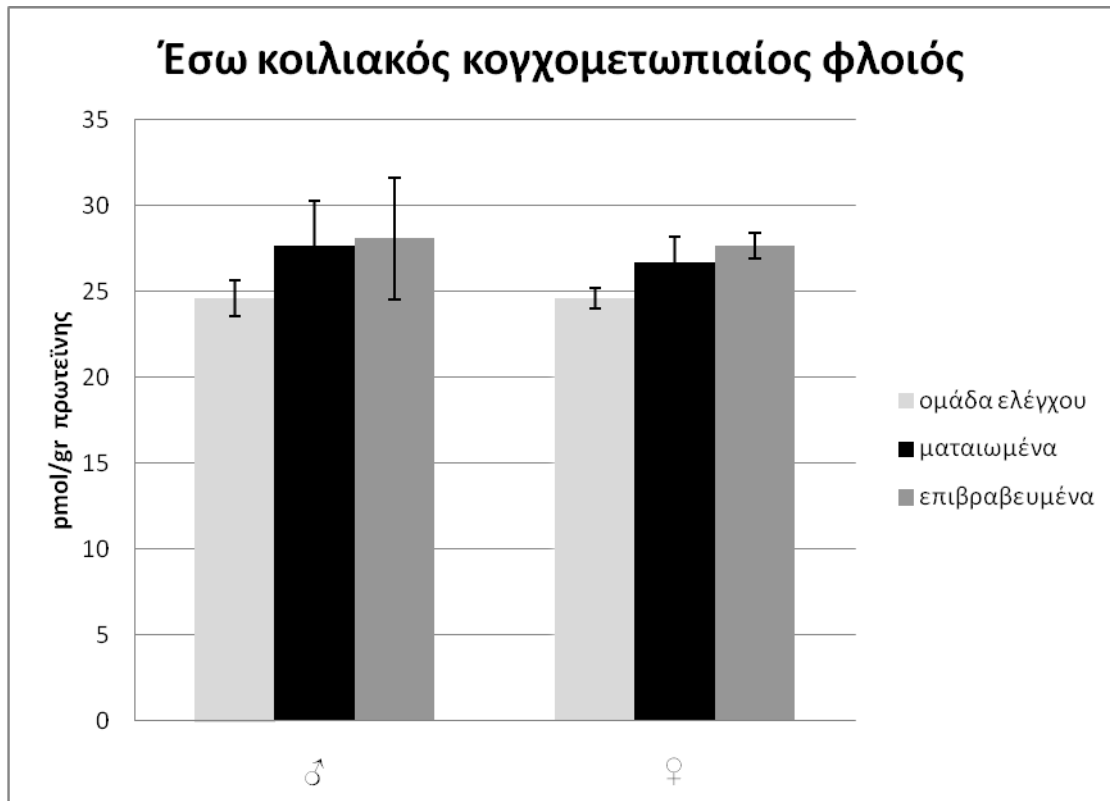
**Γράφημα 29:** Ποσότητα πρωτεΐνης β1-αδρενεργικού υποδοχέα στην περιοχή 1 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο ποσότητας πρωτεΐνης για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ζώα 13<sup>ης</sup> μεταγεννητικής ημέρας.



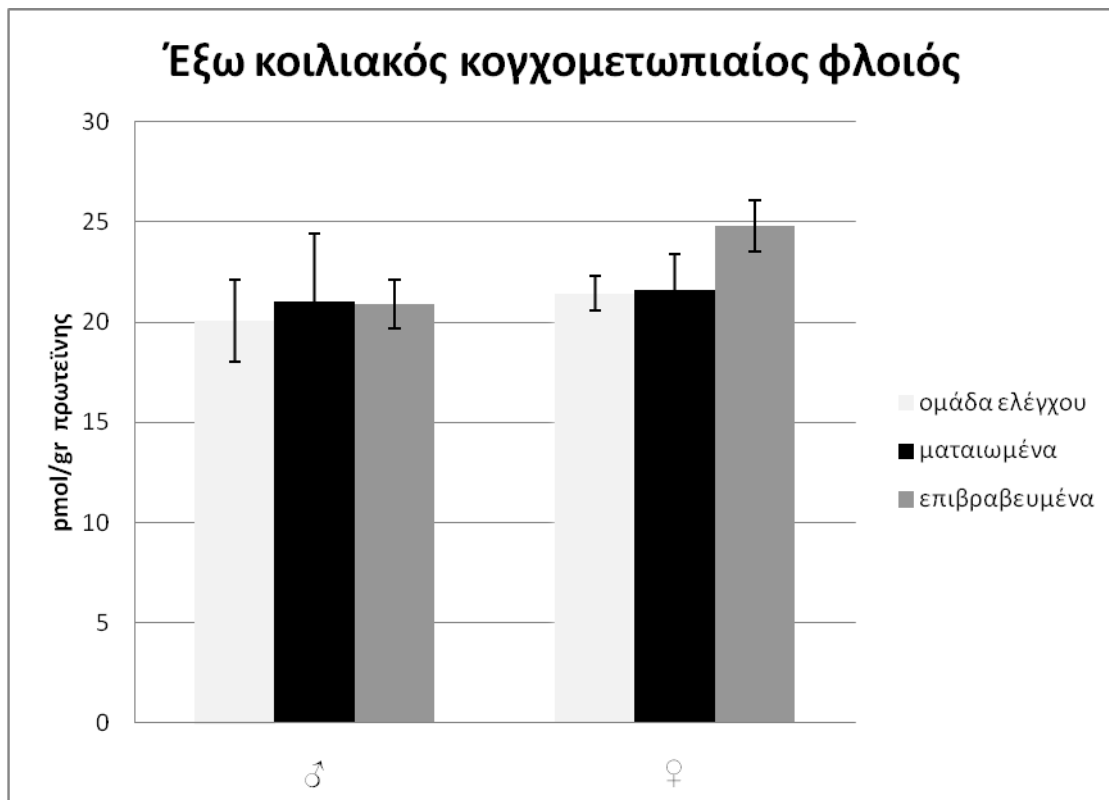
**Γράφημα 30:** Ποσότητα πρωτεΐνης β1-αδρενεργικού υποδοχέα στην περιοχή 3 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο ποσότητας πρωτεΐνης για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ζώα 13<sup>ης</sup> μεταγεννητικής ημέρας.

### Έσω και έξω κοιλιακός κορχομετωπιαίος φλοιός

Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές επιδράσεις στην ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα στις περιοχές του έσω ή έξω κοιλιακού κορχομετωπιαίου φλοιού. Η ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα τόσο σε νεογνικά «ματαιωμένα» ζώα, όσο και σε «επιβραβευμένα» δεν διέφερε στατιστικά σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ζώων.



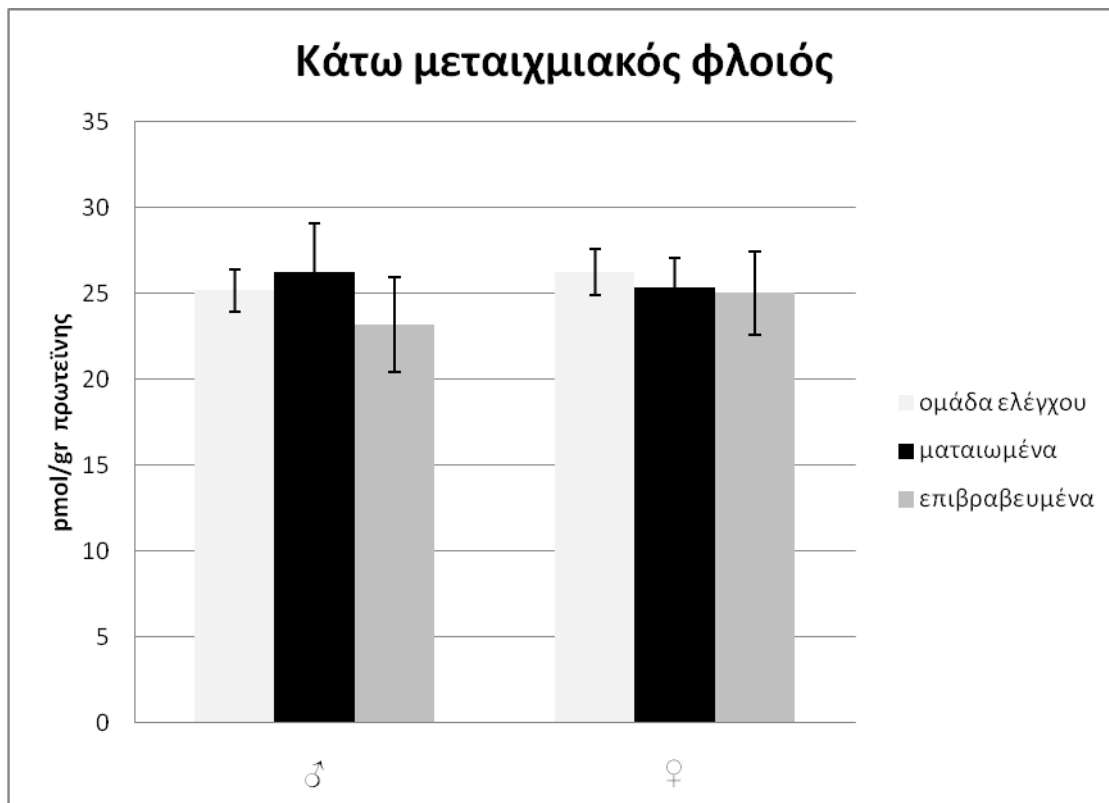
**Γράφημα 31:** Ποσότητα πρωτεΐνης β1-αδρενεργικού υποδοχέα στην περιοχή του έσω κοιλιακού κογχομετωπιαίου φλοιού. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο ποσότητας πρωτεΐνης για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ζώα 13<sup>ης</sup> μεταγεννητικής ημέρας.



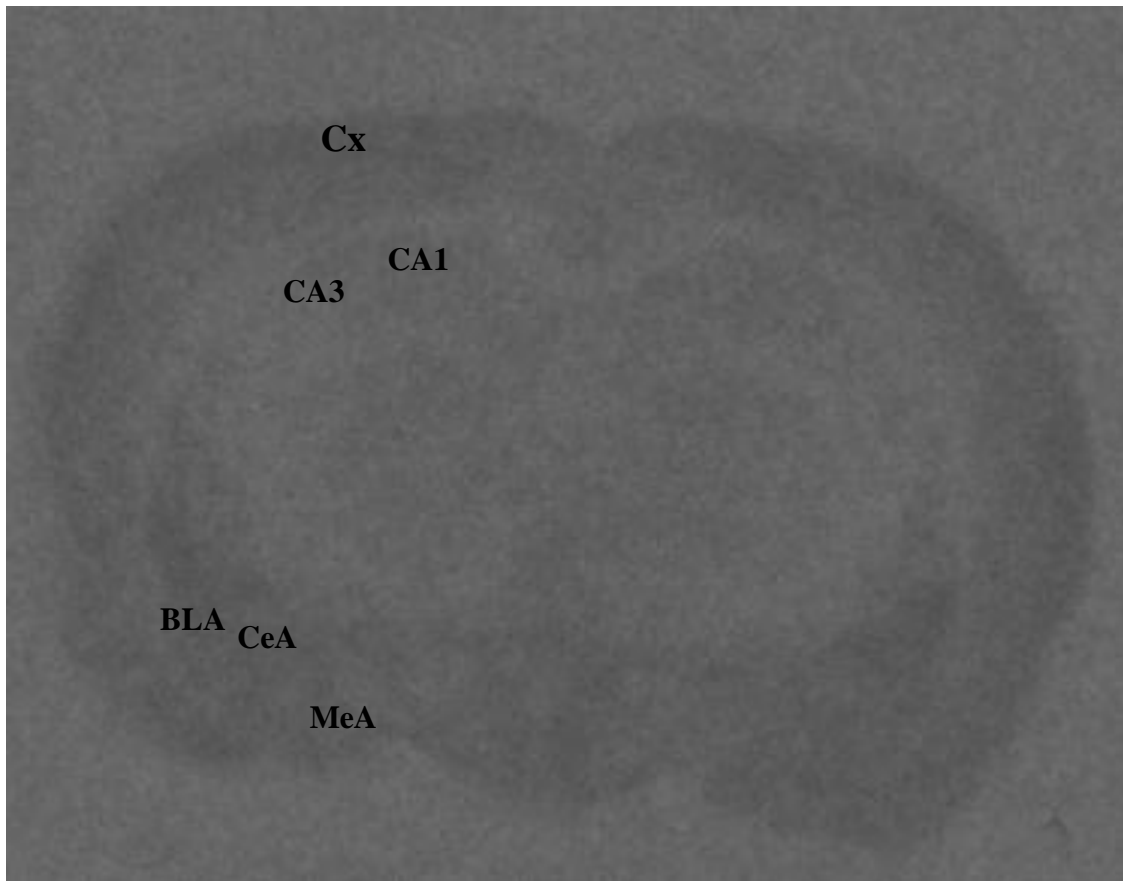
**Γράφημα 32:** Ποσότητα πρωτεΐνης β1-αδρενεργικού υποδοχέα στην περιοχή του έξω κοιλιακού κορχομετωπιαίου φλοιού. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο ποσότητας πρωτεΐνης για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ζώα 13<sup>ης</sup> μεταγεννητικής ημέρας.

### Κάτω μεταιχμιακός φλοιός

Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές επιδράσεις στην ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα στην περιοχή του κάτω μεταιχμιακού φλοιού. Η ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα τόσο σε νεογνικά «ματαιωμένα» ζώα, όσο και σε «επιβραβευμένα» δεν διέφερε στατιστικά σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ζώων.



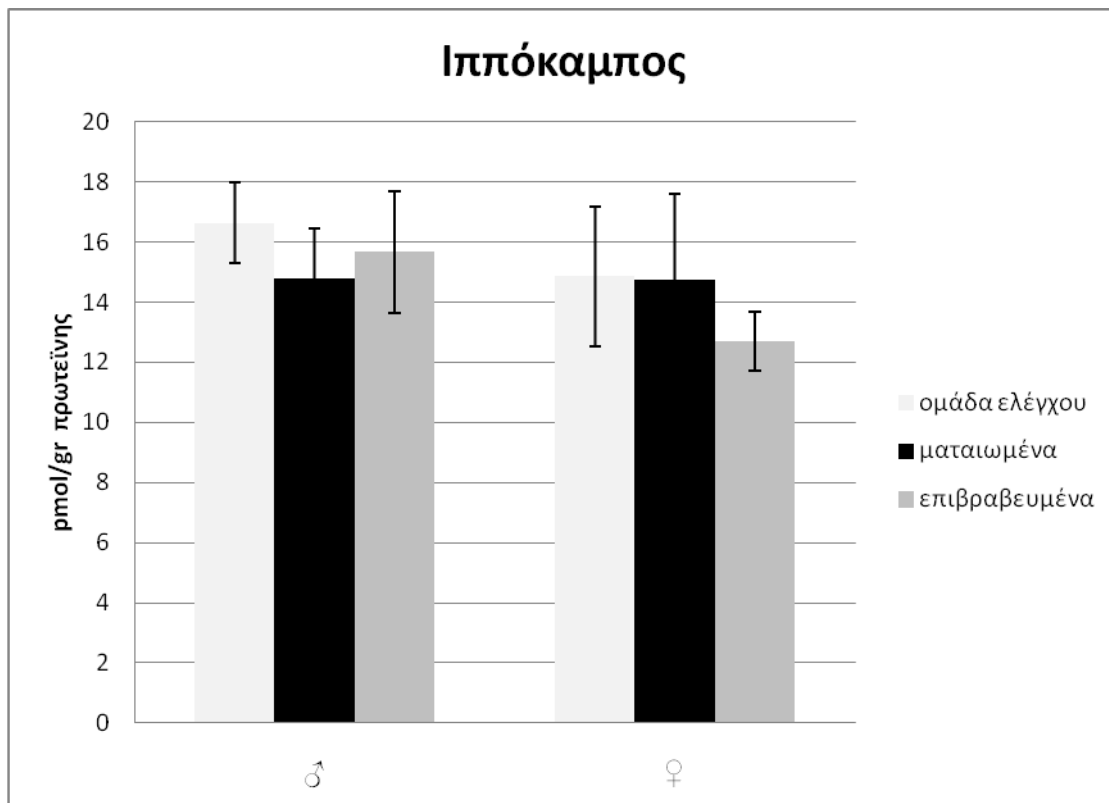
**Γράφημα 33:** Ποσότητα πρωτεΐνης β1-αδρενεργικού υποδοχέα στην περιοχή του κάτω μεταιχμιακού φλοιού. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο ποσότητας πρωτεΐνης για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ζώα 13<sup>ης</sup> μεταγεννητικής ημέρας.



*Εικόνα 28: Τομές εγκεφάλου σε επίπεδο ιπποκάμπου και αμυγδαλής. BLA:έξω βασικός πυρήνας αμυγδαλής, CA1: περιοχή CA1 ιπποκάμπου, CA3:περιοχή CA3 ιπποκάμπου, CeA:κεντρικός πυρήνας αμυγδαλής, Cx: φλοιός, MeA:μέσος πυρήνας αμυγδαλής.*

### **Περιοχή ιπποκάμπου**

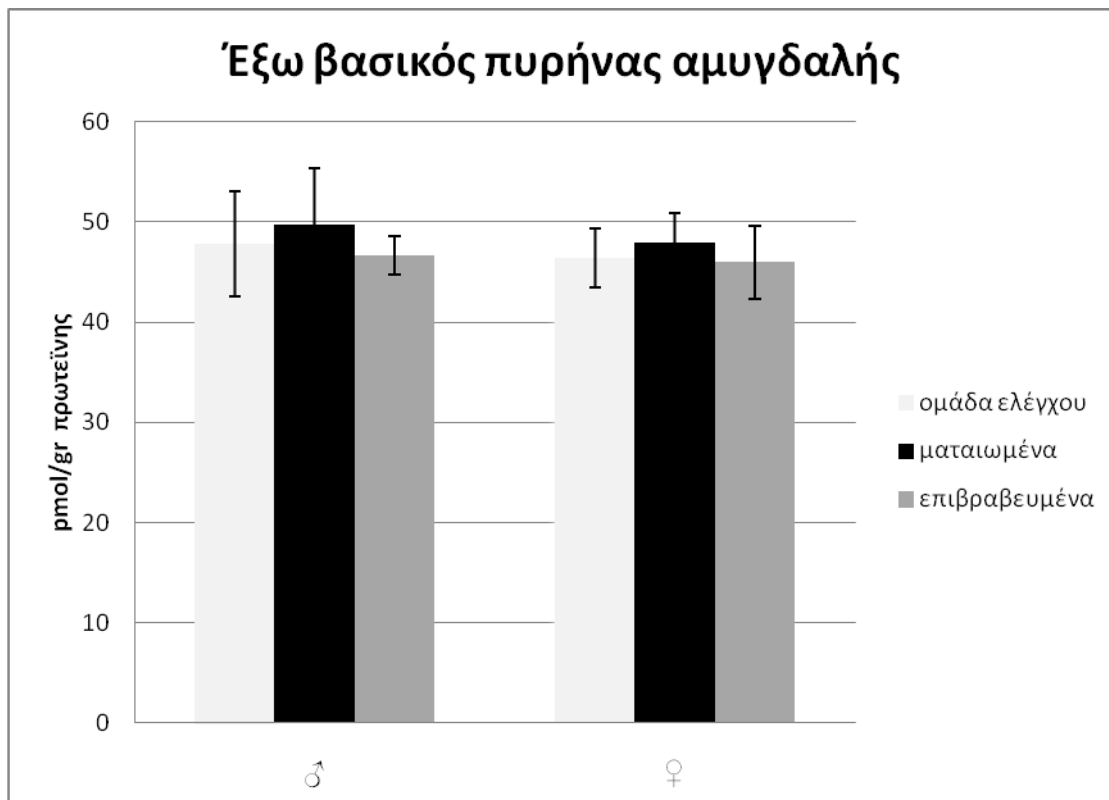
Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές επιδράσεις στην ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα στην περιοχή του ιπποκάμπου. Η ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα τόσο σε νεογνικά «ματαιωμένα» ζώα, όσο και σε «επιβραβευμένα» δεν διέφερε στατιστικά σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ζώων.



**Γράφημα 34:** Ποσότητα πρωτεΐνης β1-αδρενεργικού υποδοχέα στην περιοχή του ιπποκάμπου. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο ποσότητας πρωτεΐνης για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ζώα 13<sup>ης</sup> μεταγεννητικής ημέρας.

### Έξω βασικός πυρήνας αμυγδαλής

Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές επιδράσεις στην ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα στην περιοχή του έξω βασικού πυρήνα της αμυγδαλής. Η ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα τόσο σε νεογνικά «ματαιωμένα» ζώα, όσο και σε «επιβραβευμένα» δεν διέφερε στατιστικά σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ζώων.

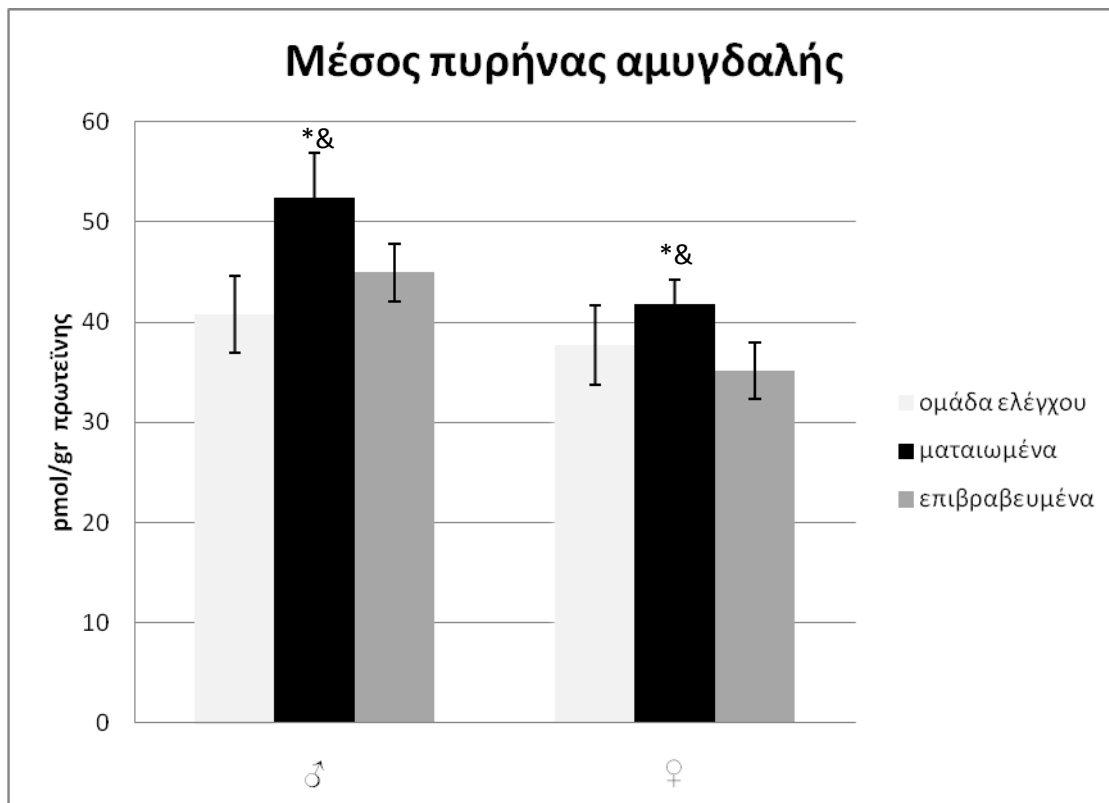


**Γράφημα 35:** Ποσότητα πρωτεΐνης β1-αδρενεργικού υποδοχέα στην περιοχή του έξω βασικού πυρήνα της αμυγδαλής. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο ποσότητας πρωτεΐνης για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ζώα 13<sup>ης</sup> μεταγεννητικής ημέρας.

### Μέσος πυρήνας αμυγδαλής

Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα έδειξε στατιστικά σημαντική επίδραση της πειραματικής ομάδας ( $F_{5,31}=3,771$ ,  $p=0,036$ ) στην ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα στην περιοχή του μέσου πυρήνα της αμυγδαλής. Πιο συγκεκριμένα, η ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα ήταν αυξημένη στην ομάδα των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων (post hoc  $p=0,046$ ) καθώς και σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (post hoc  $p=0,033$ ). Η ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα δεν διέφερε στατιστικά μεταξύ των ομάδων ελέγχου και των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε επίδραση του φύλου.



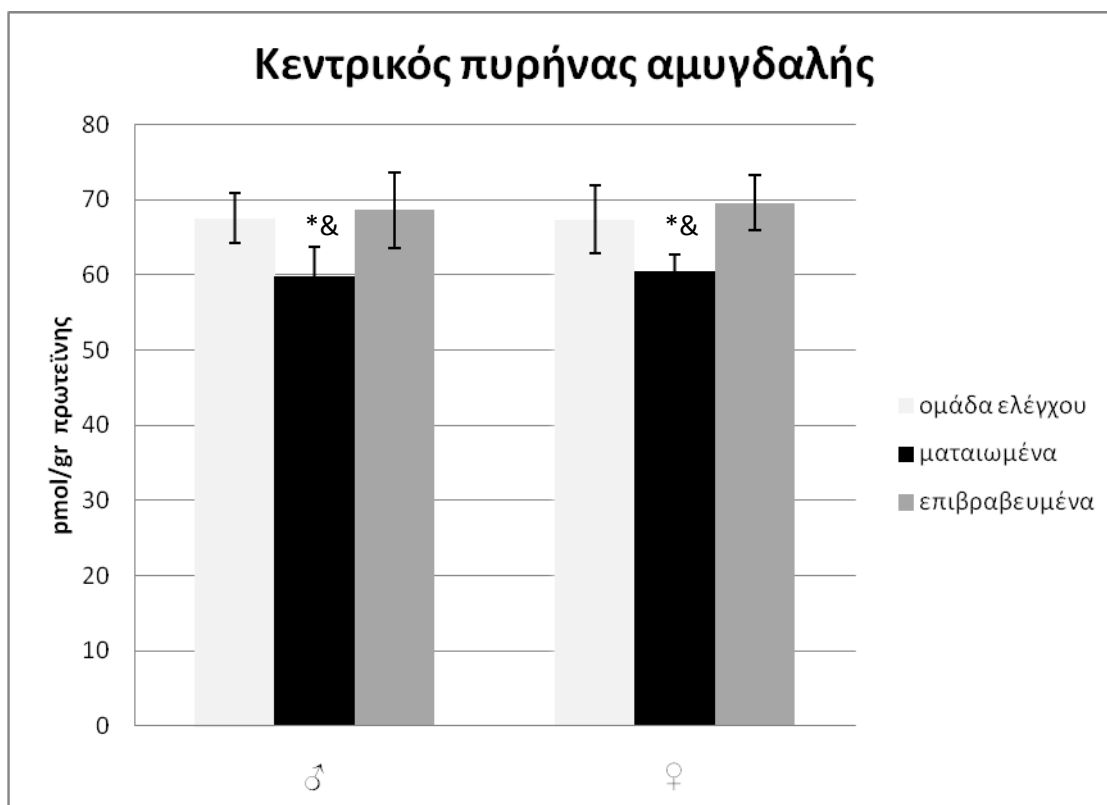


**Γράφημα 36:** Ποσότητα πρωτεΐνης β1-αδρενεργικού υποδοχέα στην περιοχή του μέσου πυρήνα της αμυγδαλής. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο ποσότητας πρωτεΐνης για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ζώα 13<sup>ης</sup> μεταγεννητικής ημέρας. Η ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα ήταν αυξημένη στην ομάδα των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων (*post hoc* &  $0,01 < p < 0,05$ ) και σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (*post hoc* \*  $0,01 < p < 0,05$ ).

### Κεντρικός πυρήνας αμυγδαλής

Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα έδειξε στατιστικά σημαντική επίδραση της πειραματικής ομάδας ( $F_{5,32}=3,545$ ,  $p=0,043$ ) στην ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα στην περιοχή του κεντρικού πυρήνα της αμυγδαλής. Πιο συγκεκριμένα, η ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα ήταν μειωμένη στην ομάδα των «ματαιωμένων» ζώων σε σχέση με τις ομάδες των νεογνικά «επιβραβευμένων» καθώς και των ζώων ελέγχου (*post hoc*  $p=0,017$  και *post hoc*  $p=0,045$  αντίστοιχα). Η ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα δεν διέφερε

στατιστικά μεταξύ των ομάδων ελέγχου και των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε επίδραση του φύλου.



**Γράφημα 37:** Ποσότητα πρωτεΐνης β1-αδρενεργικού υποδοχέα στην περιοχή του μέσου πυρήνα της αμυγδαλής. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο ποσότητας πρωτεΐνης για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ζώα 13<sup>ης</sup> μεταγεννητικής ημέρας. Η ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα ήταν μειωμένη στην ομάδα των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων σε σχέση με τις ομάδες των νεογνικά «επιβραβευμένων» και ζώων ελέγχου. (post hoc &, \* 0,01p<0,05).

Συμπερασματικά, η μέθοδος in vitro πρόσδεσης ραδιοσημασμένου δεσμευτή δεν αποκάλυψε διαφορές ως προς την ποσότητα της λειτουργικής πρωτεΐνης του β1-αδρενεργικού υποδοχέα μεταξύ των πειραματικών ομάδων στις περιοχές 1 και 3 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου, στον έσω και έξω κογχομετωπιαίο φλοιό, στον κάτω μεταχιακό φλοιό, στις περιοχές CA1 και CA3 του ιπποκάμπου και στον έξω βασικό πυρήνα της αμυγδαλής του εγκέφαλου αρουραίων 13<sup>ης</sup> μεταγεννητικής ημέρας. Μόνο

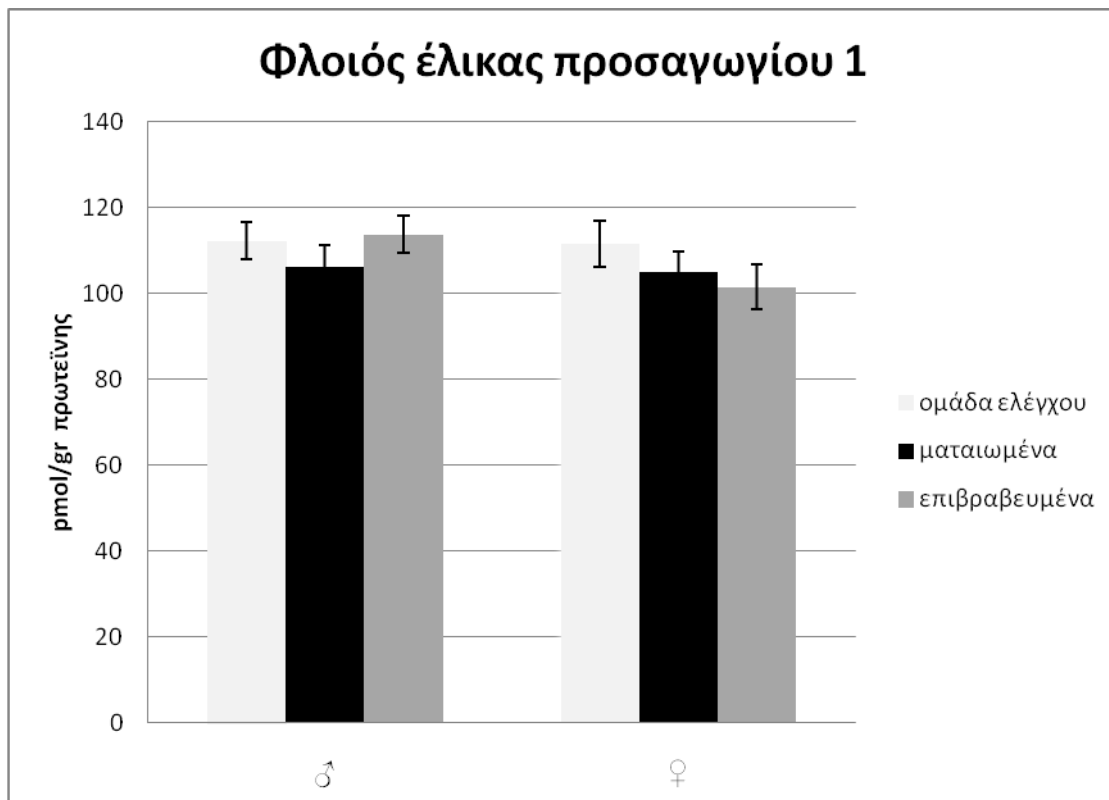
στον μέσο πυρήνα της αμυγδαλής βρέθηκε ότι τα ματαιωμένα ζώα είχαν μεγαλύτερη ποσότητα λειτουργικής πρωτεΐνης β1-αδρενεργικού υποδοχέα σε σχέση με τα ζώα ελέγχου και τα επιβραβευμένα ζώα, αποτελέσματα που συμφωνούν με αυτά της ανοσοισοχημείας.

#### **4.5 IN VITRO ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΡΑΔΙΟΣΗΜΑΣΜΕΝΟΥ ΔΕΣΜΕΥΤΗ ΓΙΑ ΤΟΝ Β1-ΑΔΡΕΝΕΡΓΙΚΟ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΣΕ ΕΝΗΛΙΚΟΥΣ ΕΠΙΜΥΣ**

Στα γραφήματα 38 έως 47 παρουσιάζεται η ποσότητα της πρωτεΐνης του β1-αδρενεργικού υποδοχέα όπως προσδιορίζεται από την in vitro πρόσδεση ραδιοσημασμένου ανιχνευτή στις διάφορες περιοχές του εγκεφάλου ενήλικων επίμυων και των έξι πειραματικών ομάδων (αρσενικοί μάρτυρες, θηλυκοί μάρτυρες, αρσενικά υπό ματαίωση, θηλυκά υπό ματαίωση, αρσενικά υπό ανταμοιβή, θηλυκά υπό ανταμοιβή). Μεταξύ του αριστερού και του δεξιού ημισφαιρίου του εγκεφάλου των επίμυων δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, οπότε παρουσιάζεται ο μέσος όρος τους.

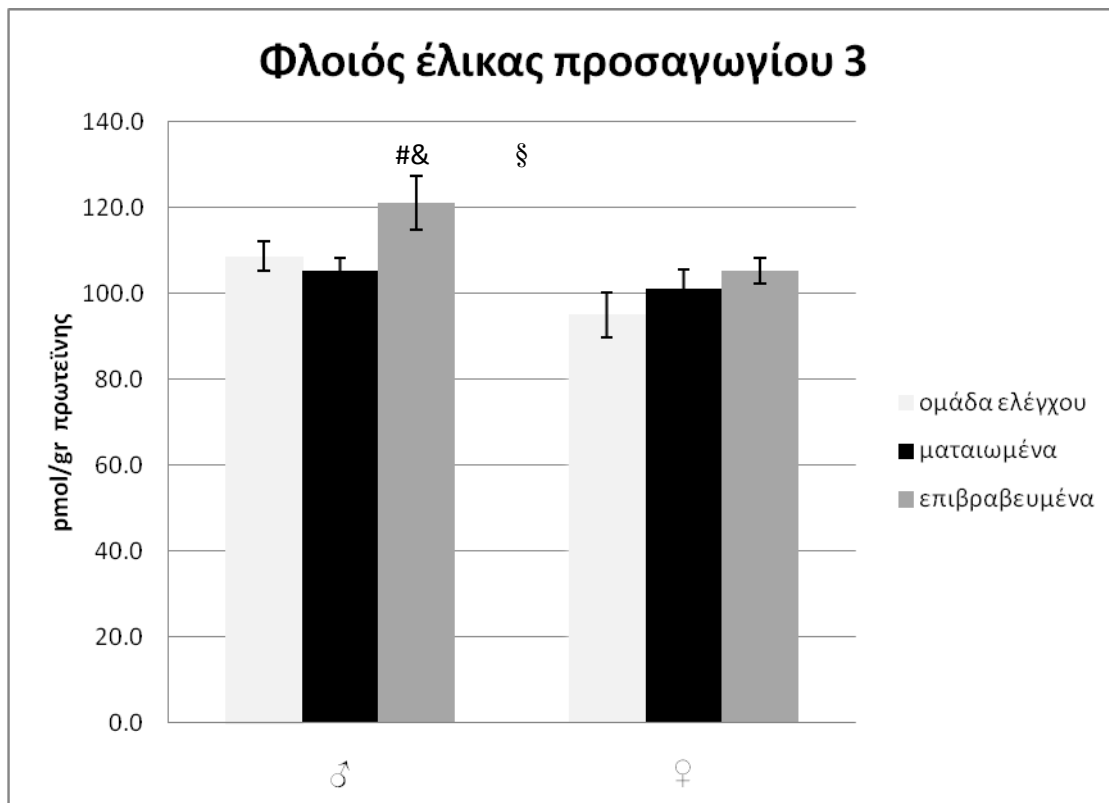
#### **Φλοιός έλικας προσαγωγίου, περιοχές 1 και 3**

Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές επιδράσεις στην ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα στην περιοχή 1 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου. Η ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα τόσο σε νεογνικά «ματαιωμένα» ζώα, όσο και σε «επιβραβευμένα» δεν διέφερε στατιστικά σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ζώων.



**Γράφημα 38:** Ποσότητα πρωτεΐνης β1-αδρενεργικού υποδοχέα στην περιοχή 1 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο ποσότητας πρωτεΐνης για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ενήλικα ζώα.

Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα έδειξε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση της πειραματικής ομάδας και του φύλου στην ποσότητα της πρωτεΐνης στην περιοχή 3 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου ( $F_{5,29}=0,896$  §,  $p=0,001$ ). Περαιτέρω ανάλυση έδειξε ότι στα αρσενικά η ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα ήταν αυξημένη στην ομάδα των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων τόσο σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων (post hoc  $p=0,039$ ) όσο και σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (post hoc  $p=0,05$ ). Η ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα δεν διέφερε στατιστικά μεταξύ των ομάδων ελέγχου και των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων. Αντίθετα στα θηλυκά δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική επίδραση της πειραματικής ομάδας στα επίπεδα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα στην περιοχή 3 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου.

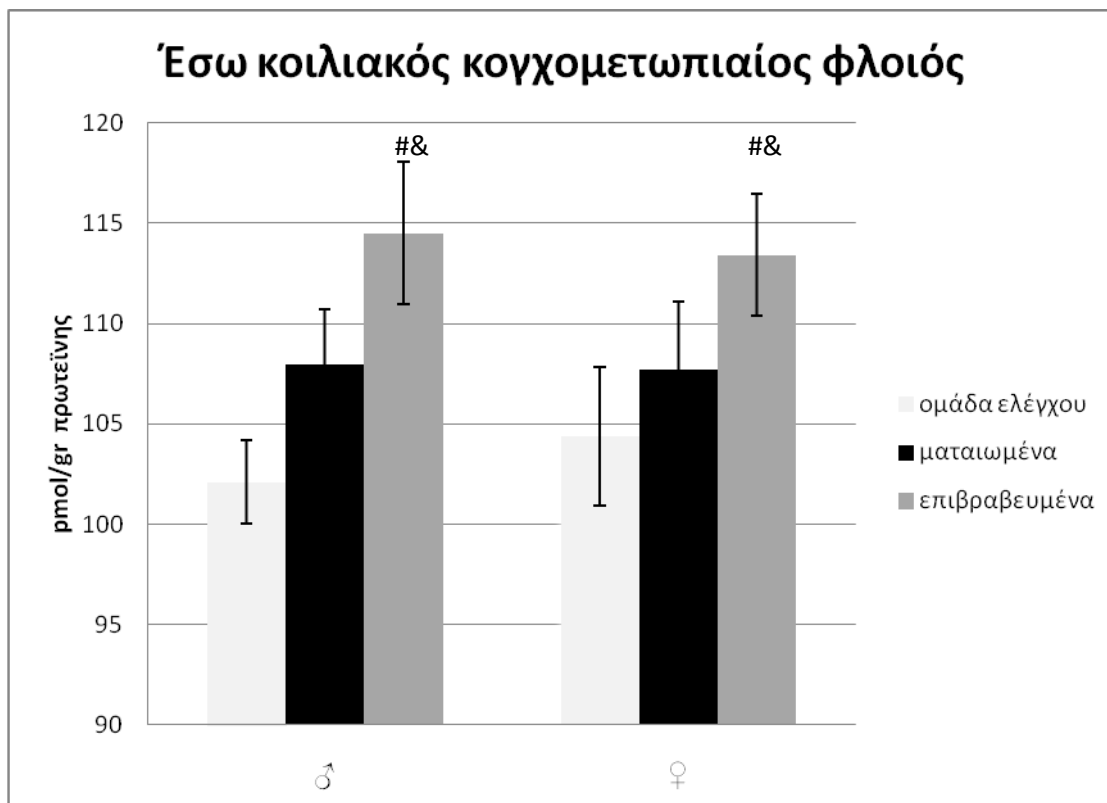


**Γράφημα 39:** Ποσότητα πρωτεΐνης β1-αδρενεργικού υποδοχέα στην περιοχή 3 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο ποσότητας πρωτεΐνης για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ενήλικα ζώα. Στα αρσενικά η ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα ήταν αυξημένη στην ομάδα των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων τόσο σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων (*post hoc* &  $0,01 < p < 0,05$ ) όσο και σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (*post hoc* #  $p=0,05$ ). Στα θηλυκά δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική επίδραση της πειραματικής ομάδας στα επίπεδα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα στην περιοχή 3 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου.

#### Έσω κοιλιακός κορχομετωπιαίος φλοιός

Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα έδειξε στατιστικά σημαντική επίδραση της πειραματικής ομάδας ( $F_{5,29}=7,184$ ,  $p=0,004$ ) στην ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα στην περιοχή του έσω κοιλιακού κορχομετωπιαίου φλοιού. Πιο συγκεκριμένα, η ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα ήταν αυξημένη στην ομάδα των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων

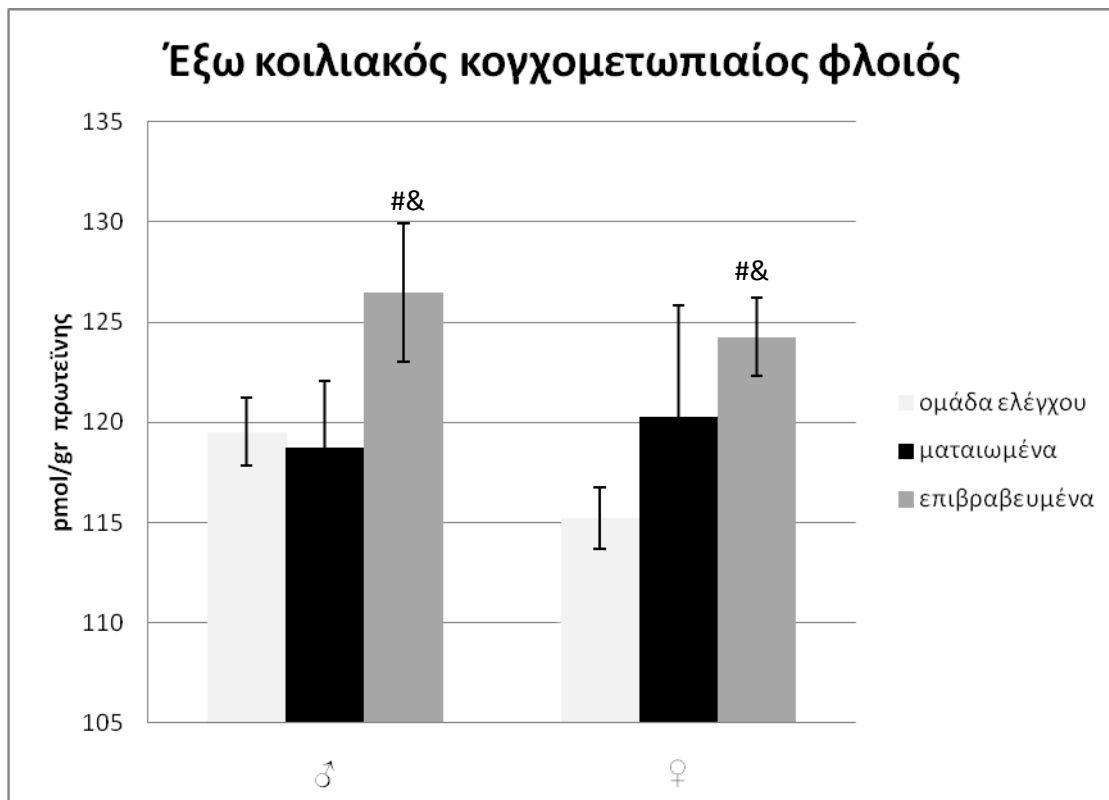
(post hoc  $p=0,037$ ) καθώς και σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (post hoc  $p=0,001$ ). Η ποσότητα του  $\beta 1$ -αδρενεργικού υποδοχέα δεν διέφερε στατιστικά μεταξύ των ομάδων ελέγχου και των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων. Δεν παρατηρήθηκε επίδραση του φύλου.



**Γράφημα 40:** Ποσότητα πρωτεΐνης  $\beta 1$ -αδρενεργικού υποδοχέα στην περιοχή του έσω κοιλιακού κογχομετωπιαίου φλοιού. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο ποσότητας πρωτεΐνης για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ενήλικα ζώα. Η ποσότητα του  $\beta 1$ -αδρενεργικού υποδοχέα ήταν αυξημένη στην ομάδα των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων ( $post\ hoc\ \&\ 0,01 < p < 0,05$ ) καθώς και σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου ( $post\ hoc\ \#\ p=0,001$ ).

### **Έξω κοιλιακός κορχομετωπιαίος φλοιός**

Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα έδειξε στατιστικά σημαντική επίδραση της πειραματικής ομάδας ( $F_{5,27}=3,046$ ,  $p=0,068$ ) στην ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα στην περιοχή του έξω κοιλιακού κορχομετωπιαίου φλοιού. Πιο συγκεκριμένα, η ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα ήταν αυξημένη στην ομάδα των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων τόσο σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων (post hoc  $p=0,039$ ) όσο και σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (post hoc  $p=0,032$ ). Η ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα δεν διέφερε στατιστικά μεταξύ των ομάδων ελέγχου και των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε επίδραση του φύλου.

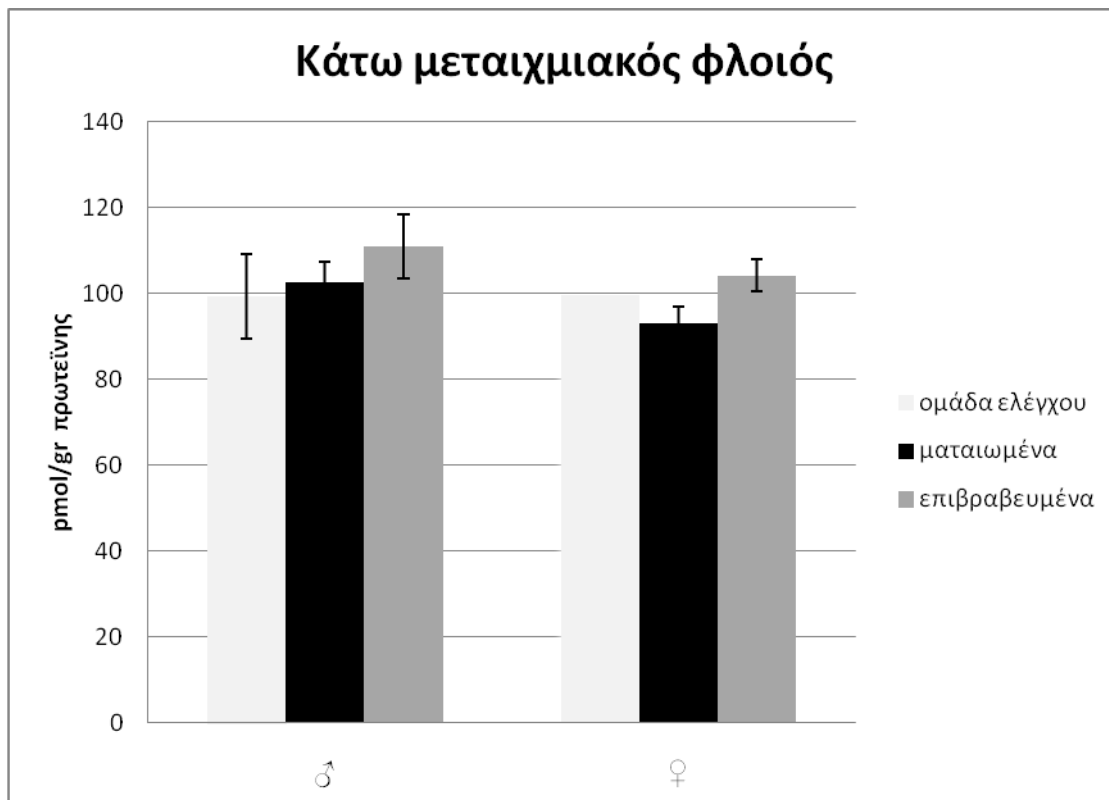


**Γράφημα 41:** Ποσότητα πρωτεΐνης β1-αδρενεργικού υποδοχέα στην περιοχή του έξω κοιλιακού κογχομετωπιαίου φλοιού. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο ποσότητας πρωτεΐνης για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ενήλικα ζώα. Η ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα ήταν αυξημένη στην ομάδα των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων τόσο σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων (*post hoc* &  $0,01 < p < 0,05$ ) όσο και σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (*post hoc* #  $0,01 < p < 0,05$ ).

### Κάτω μεταιχμιακός φλοιός

Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές επιδράσεις στην ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα στην περιοχή του κάτω μεταιχμιακού φλοιού. Η ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα τόσο σε νεογνικά «ματαιωμένα» ζώα, όσο και σε «επιβραβευμένα» δεν διέφερε στατιστικά σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ζώων.

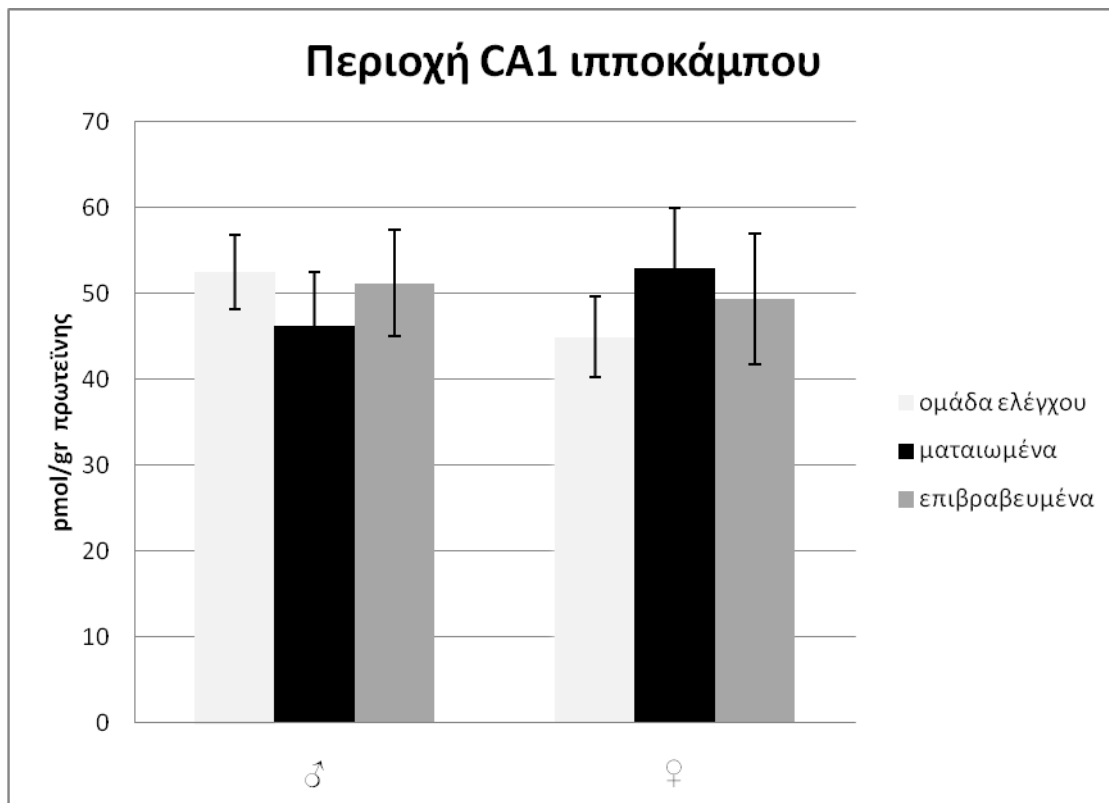




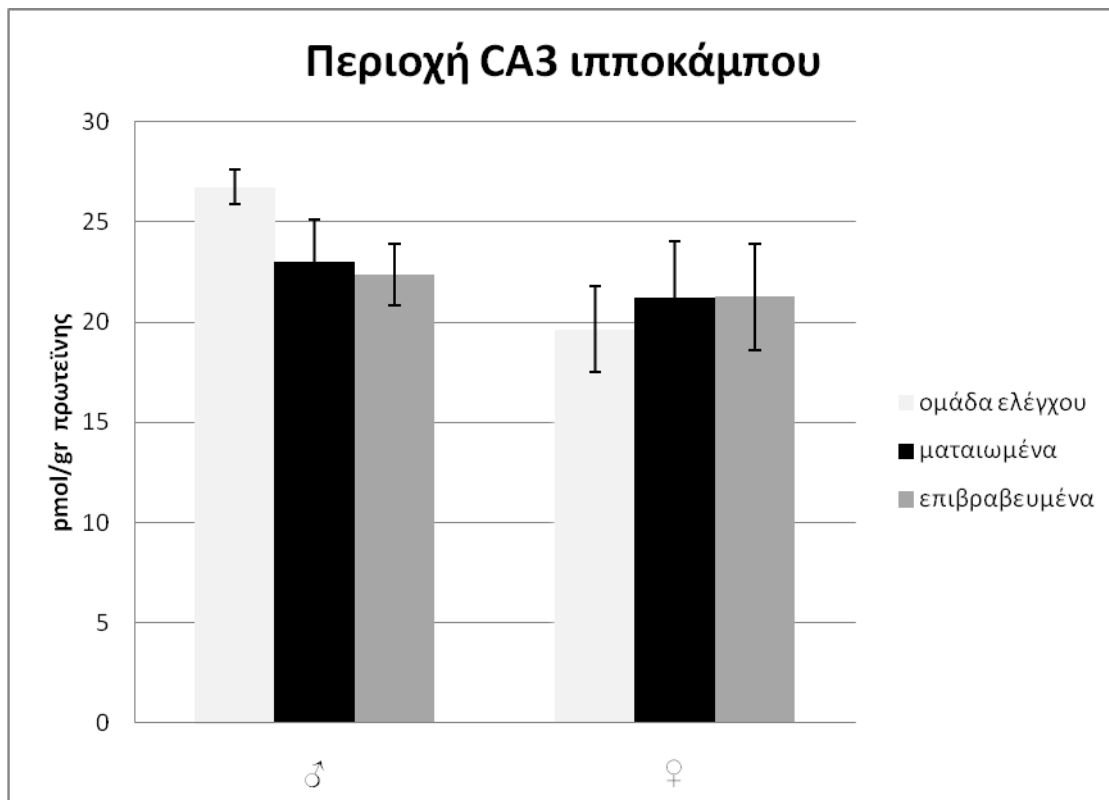
**Γράφημα 42:** Ποσότητα πρωτεΐνης β1-αδρενεργικού υποδοχέα στην περιοχή του κάτω μεταιχμιακού φλοιού. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο ποσότητας πρωτεΐνης για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ενήλικα ζώα.

### Περιοχές CA1 και CA3 του ιπποκάμπου

Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές επιδράσεις στην ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα στην περιοχή CA1 ή CA3 του ιπποκάμπου. Η ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα τόσο σε νεογνικά «ματαιωμένα» ζώα, όσο και σε «επιβραβευμένα» δεν διέφερε στατιστικά σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ζώων.



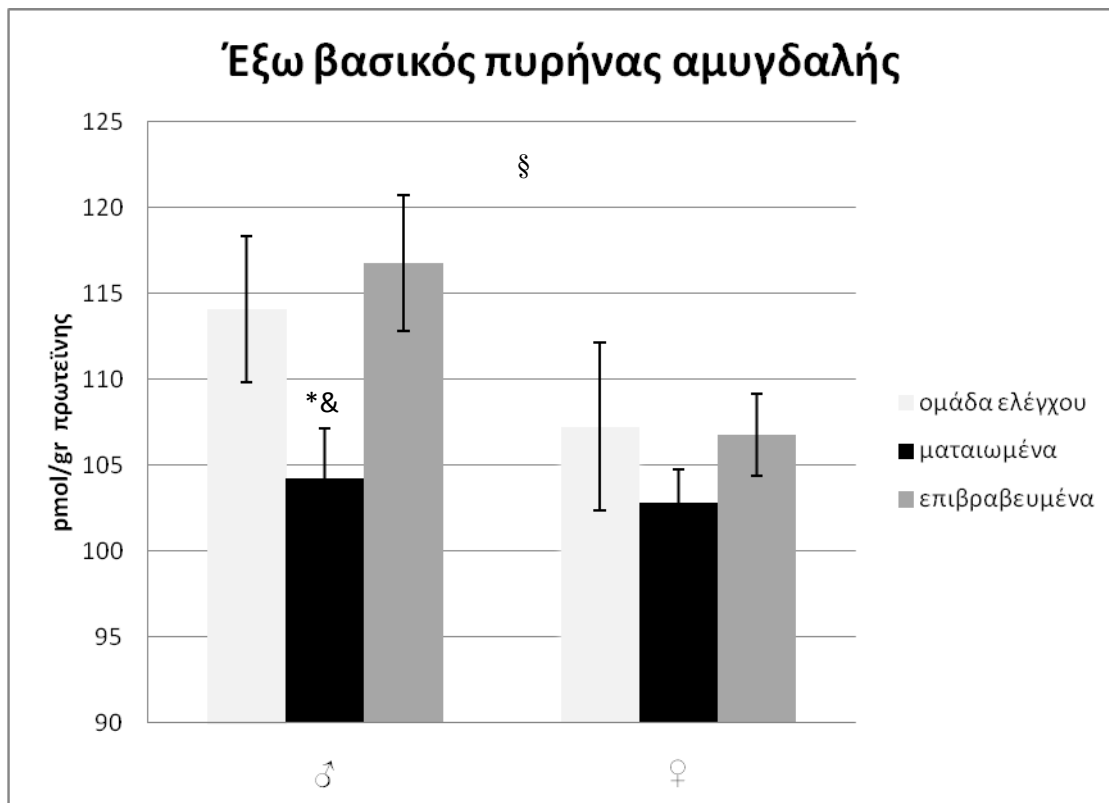
**Γράφημα 43:** Ποσότητα πρωτεΐνης β1-αδρενεργικού υποδοχέα στην περιοχή CA1 του ιπποκάμπου. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο ποσότητας πρωτεΐνης για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ενήλικα ζώα.



**Γράφημα 44:** Ποσότητα πρωτεΐνης β1-αδρενεργικού υποδοχέα στην περιοχή CA3 του ιπποκάμπου. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο ποσότητας πρωτεΐνης για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ενήλικα ζώα.

### Έξω βασικός πυρήνας αμυγδαλής

Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα έδειξε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση του φύλου και της πειραματικής ομάδας στην ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα στην περιοχή του έξω βασικού πυρήνα της αμυγδαλής ( $F_{5,31}=1,051$ ,  $\xi p=0,021$ ). Περαιτέρω ανάλυση έδειξε ότι στα αρσενικά η ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα ήταν μειωμένη στην ομάδα των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων τόσο σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων (post hoc  $p=0,039$ ) όσο και σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (post hoc  $p=0,031$ ). Επίσης η ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα δεν διέφερε στατιστικά μεταξύ των ομάδων ελέγχου και των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων. Αντίθετα στα θηλυκά δεν παρατηρήθηκε επίδραση της πειραματικής ομάδας στα επίπεδα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα στην περιοχή του έξω βασικού πυρήνα της αμυγδαλής.

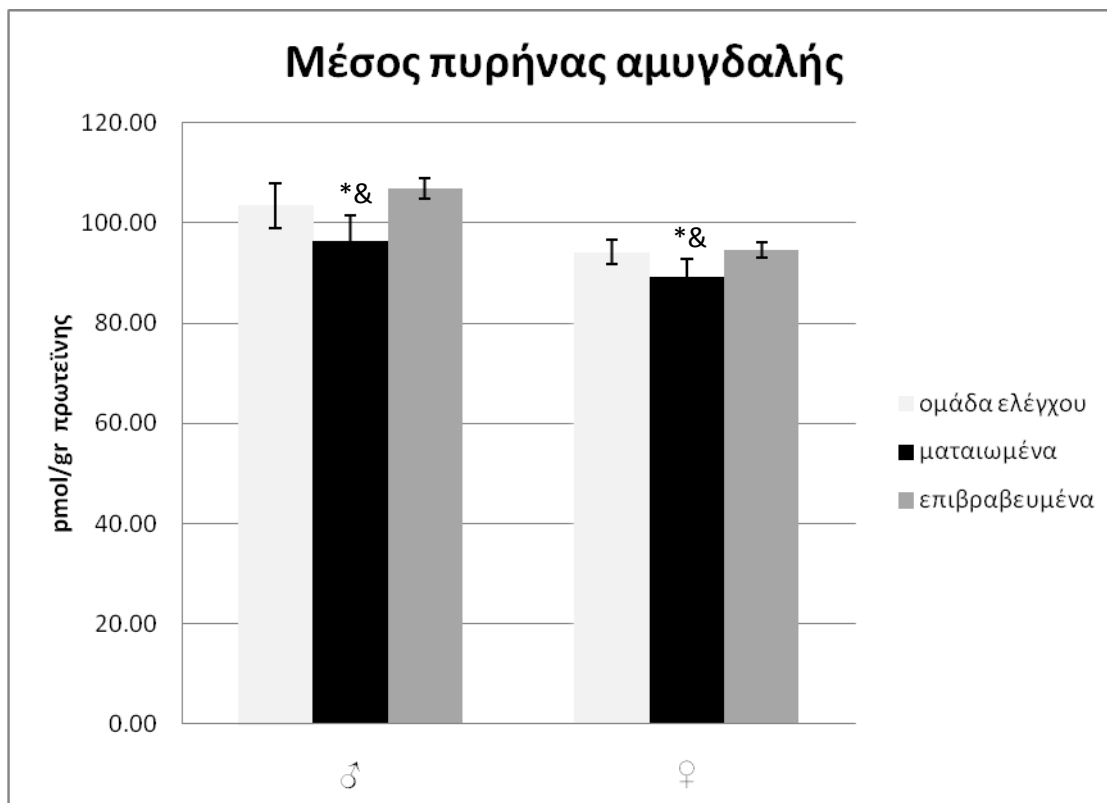


**Γράφημα 45:** Ποσότητα πρωτεΐνης β1-αδρενεργικού υποδοχέα στην περιοχή του έξω βασικού πυρήνα της αμυγδαλής. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο ποσότητας πρωτεΐνης για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ενήλικα ζώα. Στα αρσενικά η ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα ήταν μειωμένη στην ομάδα των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων τόσο σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων (*post hoc* &  $0,01 < p < 0,05$ ) όσο και σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (*post hoc* \*  $0,01 < p < 0,05$ ). Στα θηλυκά δεν παρατηρήθηκε επίδραση της πειραματικής ομάδας στα επίπεδα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα.

### Μέσος πυρήνας αμυγδαλής

Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα έδειξε στατιστικά σημαντική επίδραση της πειραματικής ομάδας ( $F_{5,31}=4,208$ ,  $p=0,026$ ) στην ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα στην περιοχή του μέσου πυρήνα της αμυγδαλής. Πιο συγκεκριμένα, η ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα ήταν μειωμένη στην ομάδα των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων τόσο σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων (*post hoc*  $p=0,01$ ) όσο και σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (*post hoc*  $p=0,027$ ). Η ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα δεν διέφερε στατιστικά μεταξύ των ομάδων

ελέγχου και των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων. Δεν παρατηρήθηκε επίδραση του φύλου.

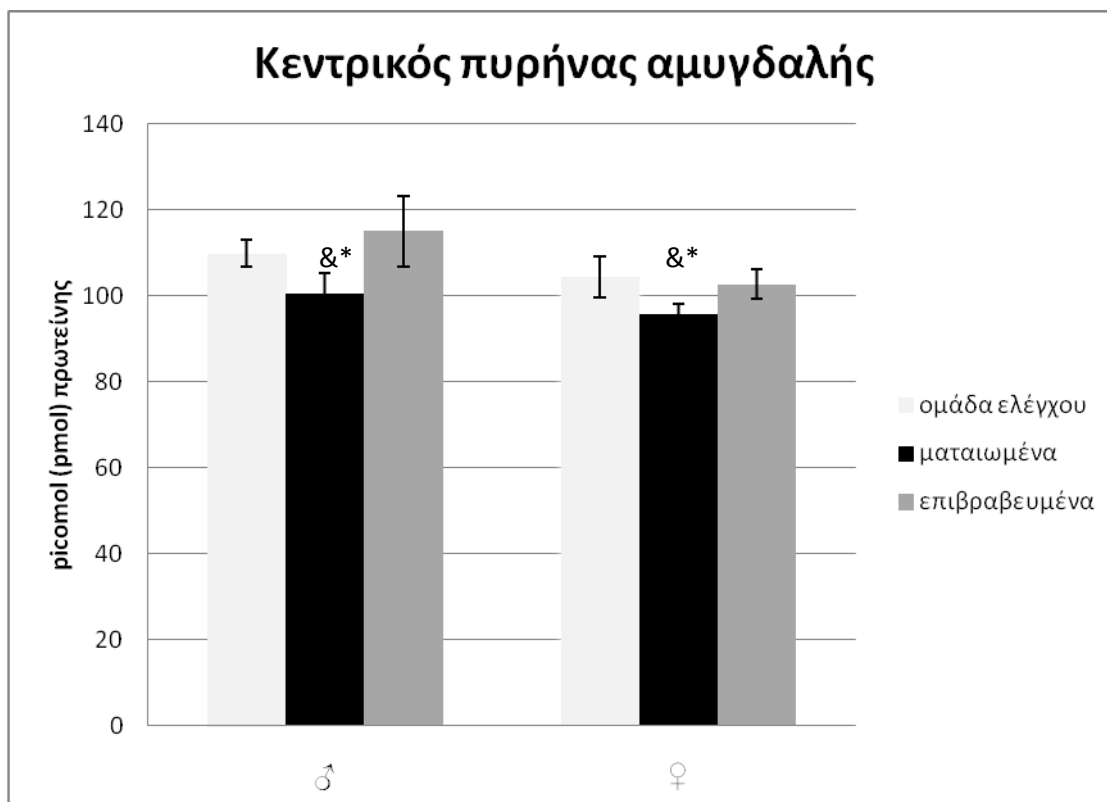


**Γράφημα 46:** Ποσότητα πρωτεΐνης β1-αδρενεργικού υποδοχέα στην περιοχή του μέσου πυρήνα της αμυγδαλής. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο ποσότητας πρωτεΐνης για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ενήλικα ζώα. Η ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα ήταν μειωμένη στην ομάδα των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων τόσο σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων (*post hoc* &  $p=0,01$ ) όσο και σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (*post hoc* \*  $0,01 < p < 0,05$ ).

### Κεντρικός πυρήνας αμυγδαλής

Η ανάλυση διακύμανσης διπλής κατεύθυνσης με ανεξάρτητες μεταβλητές το φύλο και την πειραματική ομάδα έδειξε στατιστικά σημαντική επίδραση της πειραματικής ομάδας ( $F_{5,31}=3,940$ ,  $p=0,032$ ) στην ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα στην περιοχή του κεντρικού πυρήνα της αμυγδαλής. Πιο συγκεκριμένα, η ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα ήταν μειωμένη στην ομάδα των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων τόσο σε σχέση

με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων (post hoc  $p=0,02$ ) όσο και σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (post hoc  $p=0,037$ ). Η ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα δεν διέφερε στατιστικά μεταξύ των ομάδων ελέγχου και των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων. Δεν παρατηρήθηκε επίδραση του φύλου.



**Γράφημα 47:** Ποσότητα πρωτεΐνης β1-αδρενεργικού υποδοχέα στην περιοχή του κεντρικού πυρήνα της αμυγδαλής. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο ποσότητας πρωτεΐνης για κάθε πειραματική ομάδα  $\pm$  SEM για αρσενικά και θηλυκά ενήλικα ζώα. Η ποσότητα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα ήταν μειωμένη στην ομάδα των νεογνικά «ματαιωμένων» ζώων τόσο σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα των νεογνικά «επιβραβευμένων» ζώων (post hoc &  $0,01 < p < 0,05$ ) όσο και σε σχέση με τα ζώα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (post hoc \*  $0,01 < p < 0,05$ ).

Συμπερασματικά, στον ενήλικο εγκέφαλο του αρουραίου η μέθοδος *in vitro* πρόσδεσης ραδιοσημασμένου δεσμευτή δεν αποκάλυψε διαφορές ως προς την ποσότητα της λειτουργικής πρωτεΐνης του β1-αδρενεργικού υποδοχέα μεταξύ των πειραματικών ομάδων στις περιοχές 1 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου, στον κάτω μεταιχμιακό φλοιό και στις περιοχές CA1 και CA3 του ιπποκάμπου του εγκεφάλου ενήλικων αρουραίων. Αντίθετα, στις περιοχές 3 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου, στον έσω και έξω κογχομετωπιαίο φλοιό, στον έξω βασικό, μέσο και κεντρικό πυρήνα της αμυγδαλής βρέθηκε ότι η συγκέντρωση του β1-αδρενεργικού υποδοχέα ήταν μεγαλύτερη στα επιβραβευμένα ζώα σε σχέση με τα ματαιωμένα. Τα αποτελέσματα αυτά όσον αφορά τον έξω κογχομετωπιαίο φλοιό και τον έξω βασικό πυρήνα της αμυγδαλής είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημείας. Στην περιοχή 3 της έλικας του προσαγωγίου και στον έξω βασικό πυρήνα της αμυγδαλής, η διαφορά μεταξύ των πειραματικών ομάδων με τα επιβραβευμένα να έχουν υψηλότερα επίπεδα β1-αδρενεργικών υποδοχέων παρατηρήθηκε μόνο στα αρσενικά ζώα κι όχι στα θηλυκά.

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Είναι κοινώς αποδεκτό και υποστηρίζεται από ένα μεγάλο εύρος ερευνών ότι η έκθεση σε πρώιμο στρες, τόσο προγεννητικά (Glover et al 1997) όσο και μεταγεννητικά (Pollak et al 2010), μπορεί να επιδράσει στις συναισθηματικές και γνωστικές ικανότητες του ατόμου κατά την ενήλικη ζωή (Lupien et al 2009). Μελέτες σε επίμυες έχουν δείξει ότι οι αλλαγές αυτές μπορούν να επηρεάσουν και να μεταβάλλουν τον προγραμματισμό των νευροενδοκρινικών συστημάτων των ζώων, όπως για παράδειγμα τον άξονα ΥΥΕ (υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων) (Meagher et al 2010). Οι αλλαγές αυτές μπορεί να υφίστανται κατά τις πρώτες μέρες ζωής, ωστόσο διατηρούνται και εκδηλώνονται και κατά την ενήλικη ζωή των ζώων (Craft et al 2006). Για το λόγο αυτό, υπάρχει τεράστιο ενδιαφέρον για τη μελέτη της επίδρασης των πρώιμων εμπειριών στον εγκέφαλο των νεαρών επίμυων αλλά και των μηχανισμών που συμμετέχουν για τη διατήρηση αυτών των αλλαγών στην ενήλικη ζωή τους και κατά πόσο αυτά τα ευρήματα μπορούν να συσχετιστούν και με την ανθρώπινη φυσιολογία και συμπεριφορά.

Στην παρούσα εργασία, στόχος ήταν η μελέτη των αδρενεργικών υποδοχέων ( $\beta 1$  και  $\alpha 2$ ) στον εγκέφαλο νεογνών και ενήλικων επίμυων μετά την εκπαίδευση των νεαρών επίμυων σε λαβύρινθο σχήματος "T". Η εκπαίδευση σε λαβύρινθο σχήματος «T» (Panagiotaropoulos et al., 2009), αν και αναπτύχθηκε με αρχικό στόχο τον έλεγχο της χωρικής μάθησης στους επίμυες, στην παρούσα μελέτη θα μπορούσε η δοκιμασία αυτή να ειδωθεί ως ένα ήπιο στρες κατά την πρώιμη ηλικία. Μπορούμε να θεωρήσουμε ότι η εμπειρία στην οποία εκτέθηκαν τα νεογνά της μίας πειραματικής ομάδας κατά την οποία εκπαιδεύτηκαν υπό συνεχόμενη ενίσχυση αποτελεί μια περιβαλλοντική πρόκληση, χωρίς να είναι στρεσογόνο. Αντίθετα η άλλη πειραματική ομάδα, που εκπαιδεύτηκε υπό συνεχόμενη ματαίωση, εκτέθηκε σε μία στρεσογόνο εμπειρία, προκαλούμενη από την παρεμπόδιση της μητρικής επαφής κατά την διάρκεια της εκπαίδευσης. (Panagiotaropoulos et al., 2009).

Αξίζει να σημειωθεί ότι στη νεογνική ηλικία η επαφή με τη μητέρα κατέχει εξέχουσα σημασία για την επιβίωση και την ομαλή ανάπτυξη του εγκεφάλου του οργανισμού και συγκαταλέγεται σε αυτή την ομάδα των ερεθισμάτων ανταμοιβής που καλούνται πρωτογενείς ενισχυτές (Rolls 2004). Έτσι, η όλη εμπειρία επαφής με τη μητέρα ή η αποστέρησή της προκαλεί τη γέννηση συναισθηματικών αποκρίσεων από τα νεογνά. Σύμφωνα με αυτό, τα συναισθήματα μπορούν να προσδιοριστούν ως αποκρίσεις που προκαλούνται από την επίδραση ερεθισμάτων ανταμοιβής ή τιμωρίας. Η απογοήτευση (ή ματαίωση) μπορεί να προκύψει από την παράλειψη μιας αναμενόμενης ανταμοιβής ή τον



τερματισμό μιας ανταμοιβής (Rolls 2000). Η γαλουχία και η μητρική φροντίδα (licking and grooming) παρέχει θετικά, ενισχυτικά ερεθίσματα, ενώ η άρνηση της μητρικής επαφής επιδρά ως αρνητικό, ματαιωτικό ερέθισμα (Li et al 1992).

Τα αποτελέσματα ερευνών του εργαστηρίου που αφορούν τη συμπεριφορά των νεογνών κατά την εκπαίδευσή τους στο λαβύρινθο σχήματος T, κατά τις μεταγεννητικές ημέρες 10-13, δείχνουν ότι ναι μεν τα νεογνά της πειραματικής ομάδας που έχουν εκπαιδευθεί υπό συνεχή μη ενίσχυση (**ματαιωμένα**) μαθαίνουν τη διαδρομή προσέγγισης της μητέρας, βελτιώνοντας το χρόνο εύρεσης της εισόδου του κλουβιού της από μέρα σε μέρα, όμως αυτή η μάθηση είναι λιγότερο αποτελεσματική σε σχέση με τα ζώα που έχουν εκπαιδευθεί υπό συνεχή ενίσχυση (**επιβραβευμένα**). Έτσι, παρόλο που δεν ενισχύονται, τα ζώα υπό συνεχή μη ενίσχυση, καταφέρνουν να μάθουν τη θέση της μητέρας, κάτι όμως που δε φαίνεται να μπορούν να εκφράσουν κατά τη δοκιμασία της μνήμης (Panagiotaropoulos 2009). Αναλύσεις του εργαστηρίου σε επίπεδο νευροδιαβιβαστών σε ενήλικα ζώα, έχουν δείξει ότι τα επιβραβευμένα ζώα έχουν αυξημένη νοραδρεναλίνη σε σχέση με τα ματαιωμένα και τα ζώα ελέγχου στον προμετωπιαίο φλοιό, τον ιππόκαμπο και την αμυγδαλή.

Προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος των αδρενεργικών υποδοχέων στις επιπτώσεις των πρώιμων εμπειριών του μοντέλου μας ως προς τη λειτουργία του προμετωπιαίου, του ιπποκάμπου και της αμυγδαλής, επιλέχθηκε να μελετηθεί ανοσοϊστοχημικά η εντόπιση και τα επίπεδα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα σε νεογνά και ενήλικα ζώα, του α2-αδρενεργικού υποδοχέα σε ενήλικα ζώα καθώς και να προσδιοριστούν τα επίπεδα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα σε νεογνά και ενήλικα ζώα με τη μέθοδο της *in vitro* πρόσδεσης ραδιοσημασμένου δεσμευτή. Για το λόγο αυτό, μετρήθηκαν ποσοτικά τα ανοσοθετικά κύτταρα για κάθε υποδοχέα σε κάθε περιοχή του εγκεφάλου και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα του β1-αδρενεργικού υποδοχέα σε pmol/gr πρωτεΐνης σε κάθε περιοχή του εγκεφάλου.

Η επιλογή των συγκεκριμένων υποδοχέων δεν ήταν τυχαία. Αντίθετα, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι οι α2-αδρενεργικοί υποδοχείς και συγκεκριμένα ο α2A (που μελετήθηκαν), είναι ο πιο κοινός υπότυπος στον προμετωπιαίο φλοιό και γενικά σε όλες τις περιοχές του εγκεφάλου (Aoki et al., 1994, 1998a) καθώς και ότι ο β1 υπότυπος βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σχέση με άλλους β υπότυπους στις ίδιες εγκεφαλικές περιοχές (Rainbow et al., 1984, Nicholas et al., 1993, Summers et al., 1995). Επίσης μελέτες νευροψυχιατρικής αναφέρουν τη χορήγηση β1-ανταγωνιστών (Chaturvedi, 1985) και α2-αγωνιστών (Arnsten and Goldman-Rakic, 1985) ως θεραπεία στις

αντιδράσεις του άγχους. Γενικά ισχύει ότι οι αδρενεργικοί νευρώνες του εγκεφάλου εμπλέκονται σε μια σωρεία συμπεριφορών όπως η προσοχή, ο ύπνος, η εγρήγορση, η μάθηση, η μνήμη, το άγχος και η διάθεση, που επηρεάζονται από τις πρώιμες εμπειρίες. Οι β1-αδρενεργικοί υποδοχείς συνδέονται λειτουργικά με G πρωτεΐνες (Gs) με αποτέλεσμα να αυξηθεί η δραστηριότητα της αδενυλικής κυκλάσης και ως εκ τούτου η συγκέντρωση του κυκλικού AMP (cAMP) και επακόλουθα η δραστηριότητα της PKA που φωσφορυλιώνει πρωτεΐνες. Οι α2-αδρενεργικοί υποδοχείς από την άλλη, συνδέονται λειτουργικά με ανασταλτικές G πρωτεΐνες (Gi/Go) απενεργοποιώντας την αδενυλική κυκλάση με αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων του cAMP και τη μείωση της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών από την PKA (Limbird, 1988). Επίσης, οι α2 υποδοχείς συνδέονται λειτουργικά και ενεργοποιούν ανασταλτικά κανάλια  $K^+$  (Aantaa et al., 1995).

Τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημείας για τους β1-αδρενεργικούς υποδοχείς σε αρουραίους 13<sup>ης</sup> μεταγεννητικής ημέρας έδειξαν ότι τα ζώα που είχαν υποστεί ματαίωση είχαν περισσότερα β1-ανοσοθετικά κύτταρα στον προμετωπιαίο φλοιό σε σχέση με τα ζώα ελέγχου και τα ζώα που είχαν υποστεί ενίσχυση. Τα χαμηλά επίπεδα των β1 αδρενεργικών υποδοχέων στα επιβραβευμένα ζώα μπορεί να οφείλονται στην αυξημένη τους νοραδρεναλίνη, καθόσον είναι γνωστό ότι οι β αδρενεργικοί υποδοχείς εμφανίζουν μειорύθμιση (downregulation) από τους αγωνιστές τους (Beer et al., 1987; Erdtsieck-Ernste et al., 1993).

Η αυξημένη νοραδρεναλίνη πιθανόν να σχετίζεται με την καλύτερη μάθηση που επεδείκνυαν τα ζώα της ομάδας αυτής (Panagiotaropoulos 2009). Αντίθετα στην περιοχή του ιπποκάμπου δεν παρατηρήθηκε επίδραση της πειραματικής ομάδας στον αριθμό των β1-ανοσοθετικών κυττάρων. Το τελευταίο αποτέλεσμα συμφωνεί με αυτό των Kusaka και συνεργατών (2004) οι οποίοι χρησιμοποιώντας ένα άλλο μοντέλο πρώιμης εμπειρίας - 1h μητρικής αποστέρησης καθημερινά την περίοδο μεταξύ 2<sup>ης</sup>-22<sup>ης</sup> μεταγεννητικής ημέρας - αναφέρουν ότι δεν υπήρχε επίπτωση στον αριθμό των θετικών για τους β αδρενεργικούς υποδοχείς κυττάρων στην περιοχή του ιπποκάμπου.

Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημείας για τους β1-αδρενεργικούς υποδοχείς στον εγκέφαλο των νεογνών, σε ενήλικους αρουραίους βρέθηκε ότι τα ζώα που ως νεογνά είχαν υποστεί ενίσχυση εμφάνισαν περισσότερα β1-ανοσοθετικά κύτταρα σε σχέση με τα ζώα που είχαν υποστεί ματαίωση, στην περιοχή του προμετωπιαίου, του ιπποκάμπου και της αμυγδαλής. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων στο νεογνικό και ενήλικο εγκέφαλο μπορεί εκ πρώτης όψεως να εγείρει ερωτήματα. Προσεκτική εξέταση όμως των επιπέδων των β1 αδρενεργικών υποδοχέων δείχνει ότι στα ζώα που είχαν

υποστεί ματαίωση ο νεογνικός και ο ενήλικος εγκέφαλος περιείχαν περίπου τα ίδια επίπεδα, γεγονός που υποδηλώνει μία πρόωρη ωρίμανση του συστήματος των β1 αδρενεργικών υποδοχέων στον εγκέφαλο των ζώων αυτών. Αντίθετα στα επιβραβευμένα ζώα τα επίπεδα των β αδρενεργικών υποδοχέων (όπως αναφέρθηκε παραπάνω) ήταν χαμηλά κατά την νεογνική ζωή και τα επίπεδά τους αυξήθηκαν μέχρι να φτάσουν αυτά των ενηλίκων αργότερα. Η όψιμη αυτή ωρίμανση των β αδρενεργικών υποδοχέων φαίνεται ότι επέτρεψε την επίτευξη υψηλότερων επιπέδων των υποδοχέων αυτών.

Η θεώρηση των δικών μας αποτελεσμάτων στα πλαίσια της υπάρχουσας βιβλιογραφίας έδειξε ότι σε συμφωνία με τα δικά μας αποτελέσματα, ο Baamonde και οι συνεργάτες του (1999) βρήκαν ότι ενήλικα ζώα που είχαν υποστεί νεογνικό χειρισμό, μια πρόωμη εμπειρία που θεωρείται θετική, είχαν αυξημένο αριθμό β1-αδρενεργικών υποδοχέων στον προμετωπιαίο φλοιό αλλά όχι στον ιππόκαμπο. Μια άλλη όμως ομάδα έχει δείξει ότι ο νεογνικός χειρισμός για 3 λεπτά καθημερινά (5<sup>η</sup>-20<sup>η</sup> μεταγεννητική ημέρα) δεν επηρεάζει τον αριθμό των β1-αδρενεργικών υποδοχέων στον προμετωπιαίο φλοιό και τον ιππόκαμπο (Hilakivi-Clarke et al., 1991). Επίσης έχειδειχθεί ότι η μητρική αποστέρηση για 4,5h καθημερινά τις τρεις πρώτες εβδομάδες της ζωής δεν επηρεάζει τον αριθμό των β1-αδρενεργικών υποδοχέων στον ενήλικο εγκέφαλο (Ogawa et al., 1984). Αντίθετα, η διαβίωση σε απομόνωση κατά την περίοδο μετά τη γαλουχία και ως την ενηλικίωση (κοινωνική αποστέρηση κατά την ανάπτυξη) έχειδειχθεί ότι προκαλεί αύξηση στη νοραδρενεργική εννεύρωση τμημάτων του προμετωπιαίου φλοιού (Kuramochi and Nakamura, 2009).

Γενικότερα φαίνεται πως υπάρχει αυξημένος νοραδρενεργικός τόνος στα ενήλικα ζώα που έχουν υποστεί ενίσχυση ως νεογνά, αφού, όπως ήδη έχει αναφερθεί, εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα νοραδρεναλίνης και στις τρεις εγκεφαλικές περιοχές που μελετήθηκαν καθώς και υψηλότερο αριθμό β1-ανοσοθετικών κυττάρων. Πιθανότατα αυτό να σχετίζεται με την εμπειρία της ανταμοιβής που αυτά βίωσαν ως νεογνά. Αξίζει όμως να αναφερθεί ότι τα ζώα αυτά δεν εμφανίζουν υπεραντίδραση στο στρες γενικά, αλλά ειδική αύξηση στην απαντητικότητα του νοραδρενεργικού συστήματος. Ο ΥΥΕ άξονας τους δεν είναι υπερλειτουργικός, όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα του εργαστηρίου μας, που δείχνουν ότι μετά από στρες, είτε εξαναγκασμένης κολύμβησης (Diamantopoulou et al., 2012), είτε μετά από κλασσική εξάρτηση φόβου (Diamantopoulou, Raftogianni et al., submitted), τα ζώα που ως νεογνά είχαν εκτεθεί στην ενίσχυση δεν εμφάνισαν υψηλά επίπεδα κορτικοστερόνης.

Τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημείας για τους  $\alpha 2$ -αδρενεργικούς υποδοχείς σε ενήλικους αρουραίους έδειξαν ότι τα ζώα που ως νεογνά είχαν υποστεί ματαίωση εμφάνισαν μεγαλύτερο αριθμό  $\alpha 2$ -ανοσοθετικών κυττάρων σε σχέση με τα ζώα που είχαν υποστεί ενίσχυση στην περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού, του ιπποκάμπου και της αμυγδαλής. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με προηγούμενα ευρήματα που εργαστηρίου:

Αυξημένα επίπεδα  $\alpha 2$  αδρενεργικών υποδοχέων στο προμετωπιαίο φλοιό έχουν συσχετισθεί με μειωμένη λειτουργικότητα της περιοχής αυτής (Bari et al., 2011). Όντως, τα ζώα που είχαν υποστεί ματαίωση εμφάνισαν χειρότερη επίδοση στη συμπεριφορική δοκιμασία ASST, που εξαρτάται από τη λειτουργία του προμετωπιαίου φλοιού. Επίσης, έχει βρεθεί ότι τα ζώα που είχαν υποστεί ματαίωση είχαν χαμηλότερα επίπεδα ντοπαμίνης στον προμετωπιαίο φλοιό σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου και τα ζώα που είχαν υποστεί ενίσχυση (Stamatakis et al., 2011), αποτέλεσμα που υποδηλώνει υπολειτουργία του προμετωπιαίου, καθόσον η ντοπαμίνη είναι ο κατεξοχήν νευροδιαβιβαστής ρύθμισης της λειτουργίας του προμετωπιαίου φλοιού (Everitt et al., 2000). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι  $\alpha 2$  υποδοχείς ελέγχουν στον προμετωπιαίο φλοιό τα επίπεδα ντοπαμίνης στη σύναψη, καθώς εντοπίζονται στις προσυναπτικές ντοπαμινεργικές απολήξεις ( $\alpha 2$  ετεροϋποδοχείς) και παρεμποδίζουν την απελευθέρωση της (Lähdesmäki et al., 2003).

Στον ιππόκαμπο ο μεγαλύτερος αριθμός  $\alpha 2$ -ανοσοθετικών κυττάρων στα ζώα που είχαν υποστεί ματαίωση συμφωνεί με προηγούμενη παρατήρηση που έδειξε ότι τα ζώα αυτά μετά από έκθεση στον υδάτινο λαβύρινθο τύπου Morris εμφάνισαν αυξημένη ενεργοποίηση ειδικά της περιοχής του ιπποκάμπου καθώς και ανώτερη επίδοση στη δοκιμασία αυτή της χωρικής μνήμης που ελέγχεται από τον ιππόκαμπο (Diamantopoulou et al., 2011). Είναι γνωστό ότι η νοραδρεναλίνη έχει ευεργετική επίδραση στην χωρική μνήμη μέσω της δράσης της στους  $\alpha 2$ -αδρενεργικούς υποδοχείς (Arnsten and Goldman-Rakic, 1985).

Τέλος, στην αμυγδαλή ο μεγαλύτερος αριθμός  $\alpha 2$ -ανοσοθετικών κυττάρων στα ζώα που είχαν υποστεί ματαίωση είναι πιθανόν να σχετίζεται με την μικρότερη συμπεριφορική αντίδραση «παγώματος» (freezing) που εμφανίζουν τα ζώα αυτά μετά από κλασική εξάρτηση φόβου, καθόσον έχει δειχθεί ότι οι  $\alpha 2$  αδρενεργικοί υποδοχείς παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της συμπεριφοράς του «παγώματος»: Χορήγηση  $\alpha 2$ -αδρενεργικών αγωνιστών (ταυτόχρονα με  $\beta 1$ -αδρενεργικούς ανταγωνιστές) οδηγεί σε λιγότερα «παγώματα»/ακινήσιες μετά το ερέθισμα φόβου σε σχέση με τα ζώα ελέγχου (Qu et al., 2008).

Η τεχνική της *in vitro* πρόσδεσης ραδιοσημασμένου δεσμευτή επιβεβαίωσε σε γενικές γραμμές τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημείας για τους β1-αδρενεργικούς υποδοχείς σε αρουραίους  $13^{H5}$  μεταγεννητικής ημέρας και σε ενήλικους αρουραίους. Οι όποιες διαφορές παρατηρήθηκαν μπορούν να αποδοθούν στη διαφορετική ευαισθησία των δυο μεθόδων. Η ανοσοϊστοχημεία είναι μια ενισχυτική μέθοδος λόγω της χρήσης δυο αντισωμάτων, διαλύματος Αβιδίνης-Βιοτίνης και της ανοσοϊστοχημικής χρώσης DAB. Πρέπει όμως να επισημανθεί ότι στην ανοσοϊστοχημεία ανιχνεύεται η πρωτεΐνη του υποδοχέα, ανεξάρτητα από του αν είναι λειτουργική ή όχι. Αντίθετα, στην *in vitro* πρόσδεση ραδιοσημασμένου δεσμευτή προσδιορίζονται μόνο οι λειτουργικοί υποδοχείς, όσοι δηλαδή έχουν τη σωστή στερεοδιαμόρφωση και θέση στη κυτταρική μεμβράνη.

Αξίζει να επισημανθεί ότι στην CA1 περιοχή του ιπποκάμπου και στο έξω βασικό πυρήνα της αμυγδαλής των ενήλικών ζώων η επίδραση της πρώιμης εμπειρίας τόσο στους β1 όσο και στους α2 αδρενεργικούς υποδοχείς παρατηρήθηκε μόνο στα αρσενικά και όχι στα θηλυκά. Παρόμοια ευρήματα που δείχνουν ότι τα αρσενικά νεογνά είναι πιο ευαίσθητα σε τροποποιήσεις της μητρικής συμπεριφοράς αναφέρονται στην βιβλιογραφία (Slotten et al, 2006; Wells, 1976) .

Πιστεύεται δε ότι αυτή η αυξημένη ευαισθησία των αρσενικών νεογνών προκύπτει από το γεγονός ότι στα τρωκτικά η μητέρα παρέχει περισσότερη φροντίδα στους αρσενικούς απογόνους της, λόγω των φερομονών που αυτά εκκρίνουν υπό τον έλεγχο της τεστοστερόνης (Moore and Morelli, 1979)

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι μία πρώιμη εμπειρία που εμπεριέχει ανταμοιβή μέσω της επαφής με τη μητέρα έχει μακρόχρονες επιπτώσεις και οδηγεί σε αυξημένο νοραδρενεργικό τόνο στον εγκέφαλο του επίμου. Αντίθετα, μία στρεσογόνος πρώιμη εμπειρία που εμπεριέχει ματαίωση λόγω παρεμπόδισης της επαφής με τη μητέρα, οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα α2 αδρενεργικών υποδοχέων στον προμετωπιαίο φλοιό, στον ιππόκαμπο και την αμυγδαλή, που συνεπάγονται μειωμένη λειτουργικότητα του προμετωπιαίου, καλύτερη χωρική μνήμη (που ελέγχεται από τον ιππόκαμπο) και μειωμένη αντίδραση «παγώματος» ως απάντηση σε ερέθισμα φόβου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### ΟΙ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΙΑΣ ΠΡΩΙΜΗΣ ΕΜΠΕΙΡΙΑΣ ΣΤΟ ΝΟΡΑΔΡΕΝΕΡΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΟΥ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ ΤΟΥ ΕΠΙΜΥ

ΜΕΛΙΣΣΑ ΠΕΛΑΓΙΑ

Οι πρώιμες εμπειρίες θεωρούνται κύριοι παράγοντες στη διαμόρφωση της συμπεριφοράς και της λειτουργίας του εγκεφάλου των ενηλίκων. Τα αρνητικά γεγονότα που μπορεί να βιώσει το νεογνό έχουν σημαντικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη αρκετών περιοχών του εγκεφάλου, όπως ο προμετωπιαίος φλοιός, ο ιππόκαμπος και η αμυγδαλή, δημιουργώντας στα άτομα αυτά μια προδιάθεση για μη προσαρμοστικές ή και ψυχοπαθολογικές συμπεριφορές. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε το ζωικό μοντέλο νεογνικής εκπαίδευσης σε λαβύρινθο σχήματος T υπό συνθήκες ανταμοιβής (επαφή με τη μητέρα) ή ματαιώσης της συγκεκριμένης ανταμοιβής, προκειμένου να μελετήσουμε τις επαγόμενες από τις δύο αυτές νεογνικές εμπειρίες, τροποποιήσεις στην ποιοτική και ποσοτική κατανομή των  $\beta 1$  και  $\alpha 2A$ -αδρενεργικών υποδοχέων σε ζώα  $13^{ns}$  μεταγεννητικής ημέρας και σε ενήλικα ζώα. Προσδιορίστηκε ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων για τους δυο τύπους αδρενεργικών υποδοχέων με τη μέθοδο του ανοσοϊστοχημικού εντοπισμού και η ποσότητα της λειτουργικής πρωτεΐνης του  $\beta 1$ -αδρενεργικού υποδοχέα με τη μέθοδο της *in vitro* πρόσδεσης ραδιοσημασμένου δεσμευτή.

Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι τα ματαιωμένα ζώα  $13^{ns}$  μεταγεννητικής ημέρας είχαν μεγαλύτερο αριθμό  $\beta 1$ -ανοσοθετικών κυττάρων στις περιοχές 1 και 3 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου, στον έσω και έξω κογχομετωπιαίο φλοιό, στον κάτω μεταχιακό φλοιό και στο μέσο πυρήνα της αμυγδαλής σε σχέση με τα επιβραβευμένα ζώα. Αντίθετα στις περιοχές CA1 και CA3 του ιπποκάμπου και στον έξω βασικό και κεντρικό πυρήνα της αμυγδαλής δεν παρατηρήθηκε επίδραση της πειραματικής ομάδας στον αριθμό των  $\beta 1$ -ανοσοθετικών κυττάρων.

Στον εγκέφαλο ενηλίκων αρουραίων βρέθηκε ότι στις περιοχές 1 και 3 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου, στον κάτω μεταχιακό φλοιό, στον μέσο και στον κεντρικό πυρήνα της αμυγδαλής δεν υπήρξε επίδραση της πρώιμης εμπειρίας στον αριθμό των  $\beta 1$ -ανοσοθετικών κυττάρων. Στις περιοχές του έξω κογχομετωπιαίου φλοιού, της CA3 και της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου και του έξω βασικού πυρήνα της αμυγδαλής ο αριθμός των  $\beta 1$ -ανοσοθετικών κυττάρων ήταν μεγαλύτερος στα επιβραβευμένα σε σχέση με τα

ματαιωμένα ζώα. Η διαφορά αυτή στην CA1 περιοχή του ιπποκάμπου παρατηρήθηκε μόνο στα αρσενικά και όχι στα θηλυκά. Επίσης στον έσω κογχομετωπιαίο φλοιό βρέθηκε ότι τα αρσενικά έχουν μεγαλύτερο αριθμό β1-ανοσοθετικών κυττάρων σε σχέση με τα θηλυκά.

Η τεχνική της *in vitro* πρόσδεσης ραδιοσημασμένου δεσμευτή επιβεβαίωσε σε γενικές γραμμές τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημείας για τους β1-αδρενεργικούς υποδοχείς σε αρουραίους 13<sup>ης</sup> μεταγεννητικής ημέρας και σε ενήλικους αρουραίους. Οι όποιες διαφορές παρατηρήθηκαν μπορούν να αποδοθούν στη διαφορετική ευαισθησία των δυο μεθόδων.

Στον εγκέφαλο ενήλικων αρουραίων βρέθηκε ότι στις περιοχές 1 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου, στον έσω κογχομετωπιαίο φλοιό, στη CA3 περιοχή του ιπποκάμπου και στον μέσο πυρήνα της αμυγδαλής η πρώιμη εμπειρία δεν επηρέασε τον αριθμό των α2-ανοσοθετικών κυττάρων. Αντίθετα στην περιοχή 3 του φλοιού της έλικας του προσαγωγίου, στην περιοχή CA1 του ιπποκάμπου και στον κεντρικό και έξω βασικό πυρήνα της αμυγδαλής τα ματαιωμένα ζώα είχαν μεγαλύτερο αριθμό α2-ανοσοθετικών κυττάρων σε σχέση με τα επιβραβευμένα. Η διαφορά αυτή στην περιοχή CA1 του ιπποκάμπου και έξω βασικό πυρήνα της αμυγδαλής παρατηρήθηκε μόνο στα αρσενικά ζώα και όχι στα θηλυκά.

Φαίνεται ότι η συγκεκριμένη νεογνική εμπειρία της εκπαίδευσης υπό συνεχόμενη ανταμοιβή ή ματαίωση έχει μακροπρόθεσμες επιπτώσεις στον προμετωπιαίο φλοιό, στον ιπποκάμπο και την αμυγδαλή σε μοριακό και λειτουργικό επίπεδο, υποστηρίζοντας την άποψη ότι οι πρώιμες εμπειρίες μπορούν να προγραμματίσουν με πολύ ειδικό τρόπο τη λειτουργία του εγκεφάλου των ενηλίκων και επομένως και τη συμπεριφορά τους.

## ABSTRACT

### THE EFFECT OF EARLY EXPERIENCE IN NORADRENERGIC SYSTEM OF RAT'S BRAIN

MELISSA PELAGIA

Early life experiences are considered as major determinants of brain function and adult behavior.. Adverse events have a profound impact on the development of brain areas such as the prefrontal cortex, the hippocampus and the amygdala and predispose individuals for maladaptive reactions and even psychopathology. We utilized the animal model of neonatal training in a T-maze, under conditions of reward through maternal contact or denial of this expected reward (DER), to investigate the effect of this neonatal experience in inducing quantitative and qualitative changes in beta-1 and alpha-2A adrenergic receptors in the neonatal and in the adult brain. We estimated immunohistochemically the levels beta-1 and alpha-2A positive cells. By in vitro binding, we estimated the amount of functional protein of beta-1 adrenergic receptor.

Neonatal DER rats had higher number of beta-1 immunopositive cells in the cingulate cortex, area 1 and 3, in the ventrolateral orbitofrontal cortex, in the medial orbitofrontal cortex, in the infralimbic cortex and in the medial nucleus of the amygdala. In contrast, in the areas CA1 and CA3 of the hippocampus and in the basolateral and central nucleus of the amygdala, there was no effect of the early life experience on the number of immunopositive cells.

Adult DER rats had lower number of beta-1 immunopositive cells in the ventrolateral orbitofrontal cortex, in the areas CA1 and CA3 of the hippocampus and in the basolateral nucleus of amygdala. There was no effect of the early experience in the cingulate cortex, the medial orbitofrontal, the infralimbic cortex and in the medial and central nucleus of amygdala. The effect in the CA1 area was only observed in males, while in the medial orbitofrontal cortex the males had higher number of beta-1 immunopositive cells compared to the females.

The technique of in vitro binding generally confirmed the results of immunohistochemistry. Any differences could be attributed to the different sensitivities of the two methods.



Adults DER rats had higher number of a2A-immunopositive cells in the cingulate cortex, area 3, in the CA1 area of the hippocampus and in the central and basolateral nucleus of the amygdala. The effect of the early experience in the CA1 and basolateral nucleus was observed only in males. On the other hand, in the cingulate cortex area 1, in the medial orbitofrontal cortex, area CA3 of the hippocampus and in the medial nucleus of the amygdala there was no effect of the early experience on the number of a2A-immunopositive cells.

Our findings suggest that the neonatal experience of learning under conditions of either receipt or denial of the expected reward of maternal contact had long-term effects on the prefrontal cortex, on the hippocampus and on the amygdala at the molecular and functional levels, supporting the concept that early-life experiences can program adult brain function and thus behavior in an experience-specific way.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Aantaa R, Marjamäki A, Scheinin M, 1995. Molecular pharmacology of alpha 2-adrenoceptor subtypes. *Annals of Medicine* 27(4), 439-49.

Aghajanian F., 1978. Tolerance of locus coeruleus neurons of morphine and suppression of withdrawal response by clonidine. *Nature* 267, 186-188.

Ainsworth D, 1969. Object relations, dependency, and attachment: a theoretical review of the infant-mother relationship. *Child Development* 40, 969-1025.

Amsel D, 1992. Frustration theory: An analysis of dispositional learning and memory. New York: Cambridge University Press 112, 396-399.

Anisman H, Zacharko M, 1990. Multiple neurochemical and behavioral consequences of stressors: Implications for depression. *Pharmacology and Therapeutics* 46, 119–136.

Antelman M, Levine J, Gershon S, 2000. Time-dependent sensitization: the odyssey of a scientific heresy from the laboratory to the door of the clinic. *Molecular Psychiatry* 5, 350–356.

Aoki C, Go CG, Venkatesan C, Kurose H, 1994. Perikaryal and synaptic localization of alpha-2A-adrenergic receptor-like immunoreactivity. *Brain Research* 650, 181–204.

Aoki C, Venkatesan C, Go CG, Forman R, Kurose H, 1998a. Cellular and subcellular sites for noradrenergic action in the monkey dorsolateral prefrontal cortex as revealed by the immunocytochemical localization of noradrenergic receptors and axons. *Cerebral Cortex* 8, 269–277.

Arnsten F, Goldman-Rakic S, 1985. Alpha 2-adrenergic mechanisms in prefrontal cortex associated with cognitive decline in aged nonhuman primates. *Science* 230, 1273-1276.

Aston-Jones G, Bloom E, 1981a. Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *The Journal of Neuroscience* 1, 876-886.

Aston-Jones G, Bloom E, 1981b. Norepinephrine--containing locus coeruleus neurons in behaving rats exhibit pronounced responses to non-noxious environmental stimuli. *The Journal of Neuroscience* 1, 887-900.

Aston-Jones G, 1985. Behavioral functions of locus coeruleus derived from cellular attributes. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 13, 118-126.

Aston-Jones G, Rajkowski J, Kubiak P, Alexinsky T, 1994. Locus coeruleus neurons in monkey are selectively activated by attended cues in a vigilance task. *The Journal of Neuroscience* 14, 4467-4480.

Baamonde C, Lumberras A, Martinez-Cue C, Vallina F, Garcia-Calatayud S, Florez J, Dierssen M, 1999. Short-term effects of postnatal manipulation on central beta-adrenoceptor transmission. *Stress* 2, 147-162.

Bari A, Mar C, Theobald E, Elands A, Oganya C, Eagle M, Robbins W, 2011. Prefrontal and monoaminergic contributions to stop-signal task performance in rats. *Journal of Neuroscience* 31(25), 9254-63.

Barnett A, Burn J, 1967. Early stimulation and maternal behaviour. *Nature* 213, 150-152.

Basic Neurochemistry, 1999. Molecular, Cellular and Medical Aspects. 6th edition. Chapter 12, Catecholamines 220-221.

Beer M, Hacker S, Poat J, Stahl M, 1987. Independent regulation of  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-adrenoceptors. *British Journal of Pharmacology* 92, 827-834.

Berger-Sweeney J, Hohmann F, 1997. Behavioral consequences of abnormal cortical development: insights into developmental disabilities. *Behavioral Brain Research* 86, 121-142.

Berridge W, Arnsten T, Foote L, 1993. Noradrenergic modulation of cognitive function : Clinical implications of anatomical, electrophysiological and behavioural studies in animal models. *Psychological Medicine* 23, 557-564.

Berridge W, Waterhouse D, 2003. The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Research Reviews* 42, 33-84.

Bowlby J, 1965. *Attachment*. New York: Basic Books

Brown S, Begg D, Gravenstein S, Schaefer A., Wyatt J, Bresnahan M, Babulas P, Susser S, 2004. Serologic evidence of prenatal influenza in the etiology of schizophrenia. *Archives of General Psychiatry* 61, 774–780.

Bruinink A, Lichtensteiger W, 1984. b-Adrenergic binding sites in fetal rat brain. *Journal of Neurochemistry* 43, 578–581.

Bylund B, 1992. Subtypes of  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -adrenergic receptor. *FASEB Journal* 6, 832–839.

Bylund B, Eikenberg C, Hieble P, 1994. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacology Review* 46, 121-136.

Chandramohan Y, Droste K, Reul Johannes M, 2007. Novelty stress induces phospho acetylation of histone H3 in rat dentate gyrus granule neurons through coincident signalling via the N-methyl-D-aspartate receptor and the glucocorticoid receptor: relevance for c-fos induction. *Journal of Neurochemistry* 101, 815-828.

Charney S, 2003. Neuroanatomical circuits modulating fear and anxiety behaviors. *Acta Psychiatrica Scandinavica Supplementum*. 417, 38-50.

Cherezov V, Rosenbaum M, Hanson A, Rasmussen G, Thian S, Kobilka S, Choi J, Kuhn P, Weis I, Kobilka K, Stevens C, 2007. High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* 318, 1258-1265.

Coyle T, Axelrod J, 1972. Tyrosine hydroxylase in rat brain: developmental characteristics. *Journal of Neurochemistry* 19, 1117–1123.

Coyle T, Henry D, 1973. Catecholamines in fetal and newborn rat brain. *Journal of Neurochemistry* 21, 61–67.

Denenberg H, 1963. Early experience and emotional development. *Scientific American* 208,138-146.

Craft K, Zhang N, Glasper R, Hurn D, Devries C, 2006. Neonatal factors influence adult stroke outcome. *Psychoneuroendocrinology* 31, 601-613.

De Kloet R, Sutanto W, van de Berg T, Carey P, van Haarst D, Hornsby D, Meijer C, Rots Y, Oitzl S, 1993b. Brain mineralocorticoid receptor diversity: functional implications. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 47, 183-190.

De Kloet R, Vreugdenhil E, Oitzl S, Joels M, 1998. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocrine Reviews* 19, 269-301.

Dent W, Okimoto K, Smith S, Levine S, 2000. Stress-induced alterations in corticotropin-releasing hormone and vasopressin gene expression in the paraventricular nucleus during ontogeny. *Neuroendocrinology* 71, 333-342.

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

Erdtsieck-Ernste W, Feenstra P, Boer J, 1991. Pre- and postnatal developmental changes of adrenoceptor subtypes in rat brain. *Journal of Neurochemistry* 57, 897–903.

Erdtsieck-Ernste EBHW, Feenstra MGP, Botterblom MHA, Boer GJ, 1993. Developmental changes in ratbrain monoamine metabolism and  $\beta$ -adrenoceptor subtypes after chronic prenatal exposure topropranolol. *Neurochemistry* 22, 589–598.

Evans M, Arriza L, 1989. A molecular framework for the actions of glucocorticoid hormones in the nervous system. *Neuron* 2, 1105-1112.

Everitt J, Robbins W, 2000. Second-order schedules of drug reinforcement in rats and monkeys: measurement of reinforcing efficacy and drug-seeking behavior. *Psychopharmacology* 153, 12–30.

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

Foote L, Aston-Jones S, 1995. Pharmacology and physiology of central noradrenergic systems. *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. Raven Press; New York: 1995. p. 334-345.

Garner B, Wood J, Pantelis C, van den Buuse M, 2007. Early maternal deprivation reduces prepulse inhibition and impairs spatial learning ability in adulthood: no further effect of post-pubertal chronic corticosterone treatment. *Behavioural Brain Research* 176, 323-332.

Glavin B, Tanaka M, Tsuda A, Kohno Y, Hoaki Y, Nagasaki N, 1983. Regional rat brain noradrenaline turnover in response to restraint stress. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 19, 287-290.

Glavin B, 1985. Stress and brain noradrenaline: A review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 9, 233–243.

Glover V, 1997. Maternal stress or anxiety in pregnancy and emotional development of the child. *The British Journal of Psychiatry* 171, 105–106.

Gold M., Jones P., Sawchenko E., Kapatos G., 1977. Paraventricular area : Critical focus of a longitudinal neurocircuitry mediating food intake. *Physiology and Behavior* 118, 1111-1119.

Gonzalez A, Lovic V, Ward R, Wainwright E, Fleming S, 2001. Intergenerational effects of complete maternal deprivation and replacement stimulation on maternal behavior and emotionality in female rats. *Developmental Psychobiology* 38,11-32.

Greenbough T, 1975. Experiential modification of the developing brain. *American Scientist* 63, 37– 46.

Happe K, Bylund B, Murrin C, 1999. Alpha-2 adrenergic receptor functional coupling to G proteins in rat brain during postnatal development. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 288, 134–1142.

Happe K, Coulter L, Gerety E, Sanders D, O'Rourke M, Bylund B, Murrin C, 2004. Alpha-2adrenergic receptor development in rat CNS: an autoradiographic study. *Neuroscience* 123, 167–178.

Harden K, Wolfe B, Sporn R, Perkins P, Molinoff B, 1977. Ontogeny of b-adrenergic receptors in rat cerebral cortex. *Brain Research* 125, 99–108.

Harlow F, Harlow K, 1965. The effect of rearing conditions on behavior. *International Journal of Psychiatry* 1, 43-51.

Hein L, Kobilka K, 1997. Adrenergic receptors - From molecular structure to in vivo function. *Trends in Cardiovascular Medicine* 7, 137–145.

Hellriegel T, Marone M, Wong N, D'mello P, 1994. Circadian differences in central noradrenergic and plasma corticosterone responses of rats to physical immobilization stress. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 19, 113–130.

Hermes J, Zurmohle U, Schlingensiepen R, Brysch W, Schlingensiepen H, 1994. Developmental expression of the transcription factor zif268 in rat brain. *Neuroscience Letters* 165, 171–174.

Hilakivi-Clarke A, Turkka J, Lister G, Linnoila M, 1991. Effects of early postnatal handling on brain beta-adrenoceptors and behaviour in tests related to stress. *Brain Research* 541, 286-292.

Ida Y, Tanaka M, Tsuda A, Kohno Y, Hoaki Y, Iimori K, Nagasaki N, 1984.. Recovery of stress-induced increases in noradrenaline turnover is delayed in specific brain regions of old rats. *Life Sciences* 34, 2357–2363.

Irwin J, Ahluwalia P, Anisman H, 1986. Sensitization of norepinephrine activity following acute and chronic footshock. *Brain Research* 376, 98–103.

Jia G, Liu Y, Lepore F, Ptito M, Cynader M, 1994. Development and regulation of alpha adrenoceptors in kitten visual cortex. *Neuroscience* 63, 179–190.

Jones S, Gauger L, Davis N, Slotkin A, Bartolme V, 1985. Postnatal development of brain alpha1-adrenergic receptors: in vitro autoradiography with [125I]HEAT in normal rats and rats treated with alpha-difluoromethylornithine, a specific, irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase. *Neuroscience* 15,1195–1202.

Kable W, Murrin C, Bylund B, 2000. In vivo gene modification elucidates subtype-specific functions of  $\alpha_2$ -adrenergic receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 293, 1–7.

Kusaka K, Morinobu S, Kawano K, Yamayaki S, 2004. Effect of Neonatal Isolation on the Noradrenergic Transduction System in the Rat Hippocampal Slice. *Synapse* 54, 223–232.

Lackovic Z, Jakupcevic M, Bunarevic A, Damjanov I, Relja M, Kostovic I, 1988. Serotonin and norepinephrine in the spinal cord of man. *Brain Research* 443, 199–203.

Lähdesmäki J, Sallinen J, MacDonald E, Sirviö J, Scheinin M, 2003. Alpha2-adrenergic drug effects on brain monoamines, locomotion, and body temperature are largely abolished in mice lacking the alpha2A-adrenoceptor subtype. *Neuropharmacology*. 44(7), 882-92.



Latsari M, Dori I, Antonopoulos J, Chiotelli M, Dinopoulos A, 2002. Noradrenergic innervation of the developing and mature visual and motor cortex of the rat brain: a light and electron microscopic immunocytochemical analysis. *Journal of Comparative Neurology* 445, 145–158.

Lauder M, Bloom E, 1974. Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus, raphe nuclei and substantia nigra of the rat. I. Cell differentiation. *Journal of Comparative Neurology* 155, 469–481.

Leh S, Petrides M, Strafella A, 2010. The neural circuitry of executive functions in healthy subjects and Parkinson's disease. *Neuropsychopharmacology* 35, 70–85.

Leibowitz F, 1978. Paraventricular nucleus : A primary site mediating adrenergic stimulation of feeding and drinking. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 8, 163-175.

Leibowitz F, 1986. Brain monoamines and peptides : role in the control of eating behavior. *Fed Proc Journal*, 45, 1396-1403.

Leon M, 1992. The neurobiology of filial learning. *Annual Review of Psychology* 43,377-398.

Levine S, 1957. Infantile experience and resistance to physiological stress. *Science* 126, 405-6.

Levine S, Lewis W, 1959. Infantile experience and the maturation of the pituitary adrenal axis. *Science* 126, 1347.

Levine G, 1962. Anxiety about illness: psychological and social bases. *Journal of Health and Human Behavior* 3, 30-34.

Levy F, Melo I, Galef G, Madden M, Fleming S, 2003. Complete maternal deprivation affects social, but not spatial, learning in adult rats. *Developmental Psychobiology* 43, 177-91.

Levitt P, Rakic P, 1972. The time of genesis, embryonic origin and differentiation of the brain stem monoamine neurons in the rhesus monkey. *Developmental Brain Research* 4, 35–57.

Limbird E, 1988. Receptors linked to inhibition of adenylate cyclase:additional signaling mechanisms. *FASEB Journal* 2, 2686-2695.

Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, 1997. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 277, 1659-1662.

Liu D, Diorio J, Day C, Francis D, Meaney J, 2000. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nature Neuroscience* 3, 799-806.

Lloyd C, 1980. Life events and depressive disorder reviewed. II. Events as precipitating factors. *Archives of General Psychiatry* 37, 541–548.

Lupien J, McEwen S, Gunnar R, Heim C, 2009. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nature Reviews Neuroscience* 10, 434–445.

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, 667-80.

Maldonado R., Stinus L., Gold H., and Koob F., 1992. Role of different brain structures in the expression of the physical morphine-withdrawal syndrome. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 261, 669-677.

McCarley W., and Massaquoi G., 1986. A limit cycle reciprocal interaction model of the REM sleep oscillator system. *American Journal of Physiology* 215, R1011.

McIntosh J, Anisman H, Merali Z, 1999. Short-and long-period of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects. *Brain Research Reviews* 113, 91–106.

Meagher W, Sieve N, Johnson R, 2010. Neonatal maternal separation alters immune, endocrine and behavioral responses to acute Theiler' virus infection in adult mice. *Behavior Genetics* 40, 233-249.

Meaney J, 2001. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annual Review of Neuroscience* 24, 1161-1192.

Mednick A, Machon A, Huttunen O, Bonett D, 1988. Adult schizophrenia following prenatal exposure to an influenza epidemic. *Archives of General Psychiatry* 45, 189–192.

Meerlo P, Horvath M, Nagy M, Bohus B, Koohaas M, 1999. The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity. *Journal of Neuroendocrinology* 11, 925–933.

Miller T, Stromland K, Ventura L, Johansson M, Bandim M, Gillberg C, 2005. Autism associated with conditions characterized by developmental errors in early embryogenesis: A mini review. *International Journal of Developmental Neuroscience* 23, 201–219.

Moore L, Morelli A, 1979. Mother rats interact differently with male and female offspring. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 93, 677-684.

Morris J, Dausse P, Devynck A, Meyer P, 1980. Ontogeny of  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$ -adrenoceptors in rat brain. *Brain Research* 190, 268–271.

Murrin Charles L, Sanders J, Bylund D, 2007. Comparison of the Maturation of the Adrenergic and Serotonergic Neurotransmitter Systems in the Brain: Implications for Differential Drug Effects on Juveniles and Adults. *Biochemical Pharmacology* 73, 1225–1236.

Nakamura S, Kimura F, Sakaguchi T, 1987. Postnatal development of electrical activity in the locus coeruleus. *Journal of Neurophysiology* 58, 510–524.

Nakagawa R, Tanaka M, Kohno Y, Noda Y, Nagasaki N, 1981. Regional responses of rat brain noradrenergic neurones to acute intense stress. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 14, 729–732.

Nicholas P, Pieribone A, Hokfelt T, 1993. Cellular localization of messenger RNA for beta-1 and beta-2 adrenergic receptors in rat brain: an in situ hybridization study. *Neuroscience* 56, 1023–1039.

Nisenbaum L, Zigmond M, Sved A, Abercrombie E, 1991. Prior exposure to chronic stress results in enhanced synthesis and release of hippocampal norepinephrine in response to a novel stressor. *Journal of Neuroscience* 11, 1478–1484.

Ogawa T, Mikuni M, Muneoka K, Mori J, Takahashi K, 1994. Periodic maternal deprivation alters stress response in adult offspring: potentiates the negative feedback regulation of restraint stress-induced adrenocortical response and reduces the frequencies of open field-induced behaviours. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 49, 961-967.

Pacak K, Palkovits M, Kvetnansky R, Fukuhara K, Armando Kopin I, Goldstein D, 1993. Effects of single or repeated immobilization on release of norepinephrine and its metabolites in the central nucleus of the amygdala in conscious rats. *Neuroendocrinology*. 57, 626–633.

Pacak K, Armando I, Fukuhara K, Kvetnansky R, Palkovits M, Kopin I, Goldstein D, 1992. Noradrenergic activation in the paraventricular nucleus during acute and chronic immobilization stress in rats: an in vivo microdialysis study. *Brain Research* 589, 91–96.

Panagitaropoulos T, Diamantopoulou A, Stamatakis A, Dimitropoulou M, Stylianopoulou F, 2009. Learning of a T-maze by rats when contact with the mother is either permitted or denied. *Neurobiology of Learning and Memory* 91, 2-12.

Pechtel P, Pizzagalli A, 2011. Effects of early life stress on cognitive and affective function: an integrated review of human literature. *Psychopharmacology* 214, 55-70.

Pittman N, Minneman P, Molinoff B, 1980. Ontogeny of b1- and b2-adrenergic receptors in rat cerebellum and cerebral cortex. *Brain Research* 188, 357–368.

Pollak D, Nelson A, Schlaak F, Roeber J, Wewerka S, Wiik L, 2010. Neurodevelopmental effects of early deprivation in postinstitutionalized children. *Child Development* 81, 224–236.

Qu L, Guo N, Bao-Ming Li, 2008. b1- and b2-Adrenoceptors in Basolateral Nucleus of Amygdala and their Roles in Consolidation of Fear Memory in Rats. *Hippocampus* 18, 1131–1139.

Rainbow C, Parsons B, Wolfe B, 1984. Quantitative autoradiography of beta1- and beta2-adrenergic receptors in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81, 1585–1589.

Redmond E., 1987. Studies of the nucleus coeruleus in monkeys and hypotheses of neuropsychopharmacology. In *Psychopharmacology : The third generation of progress*, 967-975. Raven Press, New York.

Revello G, Gerna G, 2004. Pathogenesis and prenatal diagnosis of human cytomegalovirus infection. *Journal of Clinical Virology* 29, 71–83.

Rho M, Storey W, 2001. Molecular ontogeny of major neurotransmitter receptor systems in the mammalian central nervous system: norepinephrine, dopamine, serotonin, acetylcholine, and glycine. *Journal of Child Neurology* 16, 271–280.

Rosenfeld P. Suchecki D, Levine S, 1992. Multifactorial regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during development. *Neuroscience Biobehavioral Reviews* 16, 553-68.

Roth A, Mefford M, Barchas D, 1982. Epinephrine, norepinephrine, serotonin levels in various regions of rat brain. Differential effects of acute and chronic stress on regional brain amines. *Brain Research* 239, 417-424.

Roth L, Sweatt D, 2011. Annual Research Review: Epigenetic mechanisms and environmental shaping of the brain during sensitive periods of development. *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 52, 398-408.

Sanders D, Happe K, Bylund B, Murrin C, 2005. Development of the norepinephrine transporter in the rat CNS. *Neuroscience* 130, 107–117.

Sara J, 2009. The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nature Reviews Neuroscience* 10, 211-223.

Schlumpf M, Bruinink A, Lichtensteiger W, Cortes R, Palacios M, Pazos A, 1987. Beta-adrenergic binding sites in fetal rat central nervous system and pineal gland: their relation to other receptor sites. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 10, 422–435.

Shimizu T, Tanaka M, Yokoo H, Gondoh Y, Mizoguchi K, Matzugiuchi N, Tsuda A, 1994. Differential changes in rat brain noradrenaline turnover produced by continuous and intermittent restraint stress. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 49, 905–909.

Slotkin A, Kudlacz M, Lappi E, Tayyeb I, Seidler J, 1990. Fetal terbutaline exposure causes selective postnatal increases in cerebellar  $\alpha$ -adrenergic receptor binding. *Life Sciences* 47, 2051–2057.

Slotten A, Kalinichev M, Hagan J, Marsden A, Fone C, 2006. Long-lasting changes in behavioural and neuroendocrine indices in the rat following neonatal maternal separation: gender-dependent effects. *Brain Research* 1097, 123-132.

Stamatakis A, Manatos V, Diamantopoulou A, Stylianopoulou F. Effects of neonatal T-maze learning under conditions of reward or denial of expected reward on prefrontal cortex function. 43rd European Brain and Behaviour Society Meeting, Seville, September, 9-12/2011.

Stanley G, Schwartz D., Hernandez L., Hoebel G., and Leibowitz F., 1989. Patterns of extracellular norepinephrine in the paraventricular hypothalamus : relationship to circadian rhythm and deprivation-induced eating behavior. *Life Sciences* 45, 275-282.

Stone E, Freedman L, Morgano L, 1987. Brain and adrenal tyrosine hydroxylase activity after chronic footshock stress. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 9, 551–553.

Summers J, Papaioannou M, Harris S, Evans A, 1995. Expression of beta 3-adrenoceptor mRNA in rat brain. *British Journal of Pharmacology* 116, 2547–2548.

Szyf M, Weaver C, Champagne A, Diorio J, Meaney J, 2005. Maternal programming of steroid receptor expression and phenotype through DNA methylation in the rat. *Frontiers in Neuroendocrinology* 26, 139-62.

Tanaka M, Kohno Y, Nakagawa R, Ida Y, Takeda S, Nagasaki N, 1982. Time-related differences in noradrenaline turnover in rat brain regions by stress. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 16, 315–319.

Thrivikraman V, Nemeroff B, Plotsky M, 2000. Sensitivity to glucocorticoid-mediated fast-feedback regulation of the hypothalamic- pituitary- adrenal axis is dependent upon stressor specific neurocircuitry. *Brain Research* 870, 87-101.

Tirelli E, Laviola G, Adriani W, 2003. Ontogenesis of behavioral sensitization and conditioned place preference induced by psychostimulants in laboratory rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 27, 163–178.

Venkatesan C, Song Z, Go G, Kurose H, Aoki C, 1996. Cellular and subcellular distribution of  $\alpha_2A$ -adrenergic receptors in the visual cortex of neonatal and adult rats. *Journal of Comparative Neurology* 365, 79–95.

Verney C, 1999. Distribution of the catecholaminergic neurons in the central nervous system of human embryos and fetuses. *Microscopy Research and Technique* 46, 24–47.

Vinogradova S, 2001. Hippocampus as a comparator: Role of the two input and two output systems of the hippocampus in selection and registration of information. *Hippocampus* 11, 578-598.

Weiss M, Glazer I, Pohorecky A, Brick J, 1975. Effects of chronic exposure to stressors on avoidance-escape behavior and on brain norepinephrine. *Psychosomatic Medicine* 37, 522– 534.

Weiss M, Goodman A, Losito G, Corrigan S, 1981. Behavioral depression produced by an uncontrollable stressor: Relationship to norepinephrine, dopamine, and serotonin levels in various regions of rat brain. *Brain Research Reviews* 3, 167–205.

Weiss M, Simson G, 1986. Depression in an animal model: Focus on the locus coeruleus. *Antidepress. And Rec. Funct., Ciba Foundation Symposium* 123, 191–215.

Weininger O, 1954. Physiological damage under emotional stress as a function of early experience. *Science* 119, 285-286.

Wellman J, Davies T, Morien A, and McMahan L, 1993. Modulation of feeding by hypothalamic paraventricular nucleus  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  adrenergic receptors. *Life Sciences* 53, 669-679.

Wells A, 1976. Sex differences in response to early handling in the rat. *Journal of Psychosomatic Research* 20, 259-266.

Winzer-Serhan H, Raymon K, Broide S, Chen Y, Leslie M, 1997. Expression of  $\alpha 2$  adrenoceptors during rat brain development - I.  $\alpha 2A$  messenger RNA expression. *Neuroscience* 76, 241–260.

Winzer-Serhan H, Leslie M, 1997.  $\alpha 2B$  Adrenoceptor mRNA expression during rat brain development. *Developmental Brain Research* 100, 90–100.



Winzer-Serhan H, Raymon K, Broide S, Chen Y, Leslie M, 1997. Expression of  $\alpha_2$  adrenoceptors during rat brain development - II.  $\alpha_2C$  messenger RNA expression and [ $^3H$ ]rauwolscine binding. *Neuroscience* 76, 261–272.

*Παναγής, 2002. Νευροεπιστήμη της συμπεροφοράς. Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης.*