

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

Βασική και Εφαρμοσμένη Γνωστική Επιστήμη

Διπλωματική εργασία

Η επίδραση των πρώιμων επιληπτικών κρίσεων σε συνδυασμό με περιφερηβικό στρες
στη νοητική λειτουργία και τη δομή του εγκεφάλου κατά την ενηλικίωση.

Σαλβάνου Βσιλική, Α.Μ.:13Μ14

Επιβλέποντες: Ε.Σκαλιόρα, Α. Πρωτόπαπας,Κ.Μουτούσης

Ειρήνη Σκαλιόρα

Αθανάσιος Πρωτόπαπας

Κωνσταντίνος Μουτούσης

Πρόλογος

Η παρούσα εργασία αποτελεί ένα μεγάλο κομμάτι των γνώσεων που αποκόμισα από το μεταπτυχιακό μου πρόγραμμα. Ήρθα σε επαφή με έναν άλλο κόσμο, αυτόν του εργαστηρίου, και ξαφνικά μια άλλη πραγματικότητα ξετυλίχθηκε μπροστά μου.

Καταρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμώς τη κυρία Σκαλιόρα, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το εν λόγω, συναρπαστικό αντικείμενο. Την ευχαριστώ για την υπομονή που έκανε, όντας άπειρη εγώ, να μου δείξει την εργασία στον εργαστήριο, ξεκινώντας από την αλφαβήτα. Υπήρξε άριστη καθοδηγήτρια,

εμψυχώτρια και γεμάτη κατανόηση. Είναι ειλικρινά τιμή μου που με δέχτηκε στο εργαστήριο της και που συνεργαστήκαμε. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ τον κύριο Παγκάκη για την βοήθειά του σε προγράμματα υπολογιστή, χωρίς τη συνεισφορά του, η παρούσα εργασία θα ήταν μισή. Επιπλέον, ευχαριστώ ιδιαίτερω τον κύριο Πρωτόπαπα και τον κύριο Μουτούση που δέχθηκαν να ανήκουν στη τριμελή επιτροπή αξιολόγησης της εργασίας μου.

Επίσης ευχαριστώ πολύ όλα τα μέλη του εργαστηρίου της κυρίας Σκαλιόρα, ιδιαίτερα τη Χαρούλα Πέτα, η οποία υπήρξε το άτομο που με βοήθησε να καταλάβω και ήταν δίπλα μου πάντα στις –συχνές είναι η αλήθεια- απορίες μου. Ευχαριστώ τον Παύλο Ρήγα και τον Μπάμπη Σιγάλα για το άριστο κλίμα της συνεργασίας μας και τις καθοδηγήσεις τους. Επιπλέον, ευχαριστώ τον Κωνσταντίνο Αρμάο για όλες τις συμβουλές του, καθώς και την Αλεξία Πολυσιδίδη που με υπομονή, μου δίδαξε το χειρισμό του λογισμικού καταγραφής των συμπεριφορικών δοκιμασιών. Τέλος, θα ήταν μέγιστη παράλειψη να μην ευχαριστήσω τους υπεύθυνους του τμήματος πειραματόζωων, και κυρίως τον Βαγγέλη Μπαλάφα, όπου με βοήθησε να εξοικειωθώ με τους μύες και τον χειρισμό τους.

Σας ευχαριστώ όλους θερμώς, χωρίς εσάς η παρούσα εργασία δεν θα είχε καταστεί εφικτή.

Περιεχόμενα

I.A.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A1.Γενικά περί επιληψίας

A2. Αναπτυξιακή ευαλωτότητα-κρίσιμες περίοδοι

A3. Εφηβεία

B. Πειραματόζωα και μοντέλα επιληψίας

Γ. Επιληψία

Γ1.Γενικά

Γ2.Επιληπτικές κρίσεις

Γ3.Αίτια της επιληψίας

- Γ4. Παθοφυσιολογία της επιληψίας
- Γ5. Επιπτώσεις των κρίσεων στον εγκέφαλο
- Γ6. Επιπτώσεις των κρίσεων στη συμπεριφορά

Δ. ΣΤΡΕΣ

- Δ1. Ορισμός και HPA άξονας
- Δ2. Στρες και κρίσιμοι περίοδοι
- Δ3. Επιδράσεις του στρες στη συμπεριφορά
- Δ4. Συνδυασμός επιληπτικών κρίσεων και έκθεσης σε στρες
- Δ5. Two hit model

Ε. Δομή εγκεφάλου

- Ε1. Εγκεφαλικές περιοχές
- Ε2. Κύτταρα – στόχοι

ΣΤ. Σκοπός της εργασίας

II. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Z. Πειραματόζωα και housing

Η. Επαγωγή κρίσεων

Θ. Επαγωγή στρες

- Θ1. Υπερυψωμένη πλατφόρμα
- Θ2. Κοινωνικό στρες
- Θ3. Κεκλιμένος κλωβός
- Θ4. Εξαναγκασμένη κολύμβηση
- Θ5. Αποστέρηση τροφής και νερού
- Θ6. Βρεγμένη στρωμή
- Θ7. Στρες περιορισμού

I. Πειράματα συμπεριφοράς

- I1. Κατασκευή φωλιάς
- I2. Θάψιμο βόλων
- I3. Ανοικτό πεδίο
- I4. Υπερυψωμένος λαβύρινθος
- I5. Κοινωνικότητα και προτίμηση για νέο κοινωνικό περιβάλλον
- I6. Περιστρεφόμενος κύλινδρος
- I7. Αναγνώριση νέου αντικειμένου

Κ. Ανοσοϊστοχημείες

Λ. Stereology

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μ. Συμπεριφορικά

M1.Κατασκευή φωλιάς

M2.Θάψιμο βόλων

M3.Ανοιχτό πεδίο

M4.Υπερυψωμένος λαβύρινθος

M5.Κοινωνική συμπεριφορά και προτίμηση για νέο κοινωνικό περιβάλλον

M6.Περιστρεφόμενος κύλινδρος

M7.Αναγνώριση νέου αντικειμένου

N.Αναλύσεις stereology

N1.PV κύτταρα

N2. PNNS

N3.Colocated

III.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

IV.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

I.Εισαγωγή

A1.Επιληψία

Η επιληψία είναι μια κοινή νευρολογική ασθένεια που εμφανίζεται σε ένα σημαντικό ποσοστό του πληθυσμού, με τις επιληπτικές κρίσεις να αποτελούν το πιο συχνό νευρολογικό σύμπτωμα σε μικρά παιδιά (Berg, Jallon & Preux, 2012). Μάλιστα, επιδημιολογικά δεδομένα ερευνών δείχνουν πως ο αριθμός των επιληπτικών κρίσεων είναι ιδιαίτερα αυξημένος κατά το πρώτο χρόνο της ζωής, ενώ μειώνεται δραστικά

μετά τον πέμπτο χρόνο ζωής (Józwiak et al., 2011). Ταυτόχρονα η πρόωμη έναρξη των κρίσεων, έχει συνδεθεί με γνωσιακά ελλείμματα, καθώς και με συμπεριφορικές δυσλειτουργίες όπως κοινωνική απομόνωση, μαθησιακές και μνημονικές διαταραχές (Gosh et al., 2005; Soria et al., 2012; Lugo, Swann & Anderson, 2014).

A2. Αναπτυξιακή ευαλωτότητα – Κρίσιμες Περίοδοι

Συν τοις άλλοις, είναι διαπιστωμένη η ύπαρξη των λεγόμενων «κρίσιμων περιόδων» (critical periods), ιδιαίτερα ευαίσθητων περιόδων για την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, κατά τις οποίες ο οργανισμός είναι ευάλωτος σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα λόγω σημαντικών αναπτυξιακών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα (Rice & Barone, 2000). Αξίζει να σημειωθεί εδώ πως οι κρίσιμες περίοδοι έχουν παρατηρηθεί σε πολλά είδη, από τον άνθρωπο μέχρι και τη *Drosophila melanogaster* (Barth et al., 1997). Η περίοδος της εφηβείας, είναι μια από αυτές και θεωρείται μια ιδιαίτερα κρίσιμη περίοδος καθώς ο εγκέφαλος υποβάλλεται σε αλλαγές λόγω της εμφάνισης των γοναδοτροπών ορμονών (Morrison et al., 2014).

A3. Εφηβεία

Στο σημείο αυτό καλό θα ήταν να επισημανθεί ένα στοιχείο που αξίζει τη προσοχή μας. Πολλές φορές η λέξη εφηβεία χρησιμοποιείται αντί της λέξης ενήβωση, μιας και οι δύο αυτές χρονικές περίοδοι αλληλοεπικαλύπτονται. Ως εφηβεία (adolescence) από τούδε και στο εξής εννοούμε την περίοδο κατά την οποία λαμβάνει χώρα η ωρίμανση των κοινωνικών και γνωσιακών συμπεριφορών και δεν θα πρέπει να συγχέεται με την ενήβωση (puberty) η οποία αναφέρεται στην ενεργοποίηση του hpg άξονα (υποθάλαμος- υπόφυση- γονάδα), η οποία οδηγεί στη σεξουαλική ωρίμανση (Sisk & Foster, 2004). Οι Sisk και Foster μάλιστα, προτείνουν πως η γοναδική ωρίμανση και η κοινωνικοσυμπεριφορική μεταστροφή, είναι δύο διακριτές διαδικασίες που

ελέγχονται από τον εγκέφαλο, ενώ διαθέτουν ξεχωριστούς χρονικούς και νευροβιολογικούς μηχανισμούς αλλά λαμβάνει χώρα η σύζευξή τους μέσω της αλληλεπίδρασης του νευρικού συστήματος και των γοναδών ορμονών (Sisk & Foster, 2004). Η εφηβεία, θεωρείται μια πολύ κρίσιμη περίοδος όχι μόνο λόγω των ορμονών που εμφανίζονται, αλλά και επειδή ο εγκέφαλος παρουσιάζει σημαντικές αλλαγές τόσο στη δομή όσο και στη λειτουργία. Επιπλέον παρατηρείται μια ευπλαστότητα η οποία θέτει το άτομο πιο ευάλωτο σε διανοητικές συγχύσεις, όπως είναι το στρες (Romeo & McEwen, 2006).

A4.Μοντέλο των δύο πληγμάτων

Ο Bayer και οι συνεργάτες του, διαμόρφωσαν το μοντέλο των δύο πληγμάτων (two hit model) για τη σχιζοφρένεια, προσαρμόζοντας ανάλογα τη θεωρία των δύο πληγμάτων, όπως αυτή προτάθηκε αρχικά από τον Knudson για τον καρκίνο. Το μοντέλο τους υποστηρίζει πως φέροντας ένα δυσλειτουργικό, μεταλλαγμένο, ανενεργό γονίδιο (first hit), σε συνδυασμό με ένα περιβαλλοντικό παράγοντα όπως μπορεί να είναι το στρες (second hit), μπορεί να οδηγήσει σε μεγαλύτερη ευθραυστότητα του οργανισμού ώστε να παρουσιάσει σχιζοφρένεια, μέσω της δυσλειτουργίας χρόνιων διαδικασιών οι οποίες μεταλλάσσουν τη γονιδιακή λειτουργία. Να σημειωθεί πως πρέπει να συνυπαρχούν αναγκαστικά και τα δύο αυτά πλήγματα ώστε να εκδηλωθεί η ασθένεια (Bayer et al., 1999). Το μοντέλο αυτό έχει επεταχθεί ακόμα και για τη μελέτη των επιληπτικών κρίσεων.

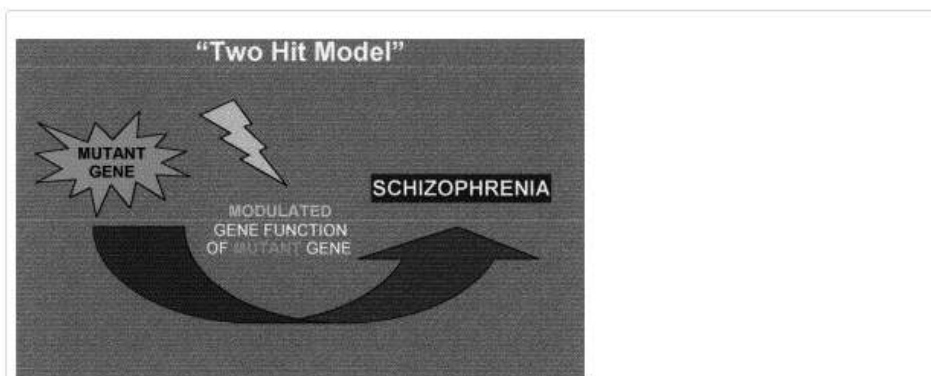


Fig. 3. "Two hit hypothesis" of schizophrenia integrates both hypothesis from above. A patient at risk would be a carrier with a mutant candidate gene, which is involved in brain development and maturation being the first hit. During fetal development and/or in adult brain a second hit (and possibly additional hits) leads to a dysfunction of chronic molecular processes by modulating the (mutant) candidate gene function. Only both hits together trigger the disease process.

(μοντελοποίηση της υπόθεσης των δύο πληγμάτων, εν προκειμένω για τη σχιζοφρένεια, ανακτήθηκε από Bayer et al., 1999)

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι εφαρμογής του μοντέλου του διπλού πλήγματος, τόσο προγεννητικά όσο και μεταγεννητικά. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες προγεννητικά, έχουν άμεση επίδραση στην ανάπτυξη του νεογνού και μπορεί να επηρεάσουν διάφορες συμπεριφορές στη μετέπειτα ζωή του (Heirichs, 2010). Ο Admadzadeh και οι συνεργάτες του, αφού ζευγάρωσαν αρουραίους, πήραν τα θηλυκά που έμειναν έγκυα και τα χώρισαν σε τρεις ομάδες: μια ομάδα control, μια ομάδα που υπέστη στρες με το πρωτόκολλο predator και μια ομάδα που υπέστη στρες περιορισμού. Το στρες έλαβε χώρα τις ημέρες 15, 16 και 17 της κύησης, καθώς από πρότερες έρευνες έχει δειχθεί πως το στρες στις συγκεκριμένες μέρες αλλοιώνει τη λειτουργία του HPA άξονα και επηρεάζει την επιληπτόμορφη δραστηριότητα (Heshmatian et al., 2010). Την 25^η μεταγεννητική μέρα, προκάλεσαν επιληπτικές κρίσεις με την έγχυση πιλοκαρπίνης, ουσία που αποτελεί χολινεργικό αγωνιστή με μουσκαρινική δράση (Cavalheiro et al., 1991; Turski et al., 1989). Οι αναλύσεις έδειξαν πως και οι δύο

ομάδες που είχαν υποστεί προγεννητικό στρες, ήταν πιο ευάλωτες στις επιληπτικές κρίσεις, είχαν αυξημένα τα επίπεδα κορτικοστερόνης στο αίμα τους ενώ ταυτόχρονα είχαν μικρότερο βάρος από την ομάδα ελέγχου (Admadzadeh et al., 2011).

Περιγεννητικός, σε μοντέλα σχιζοφρένειας, έχει χρησιμοποιηθεί επίσης το two hit model, με την έγχυση διζοκιλπίνης (MK-801), μιας ουσίας που αποτελεί μη συναγωνιστικό ανταγωνιστή των NMDA υποδοχέων, την έβδομη ημέρα μετά τη γέννηση, και τον κοινωνικό αποκλεισμό τη περίοδο μετά τον απογαλακτισμό. Να σημειωθεί εδώ πως η διζοκιλπίνη έχει βρεθεί πως προσδένεται και αναστέλλει τους σεροτονικούς και ντοπαμινικούς μεταφορείς. Τα ζώα παρουσίασαν μείωση του όγκου του ιπποκάμπου, αυξημένους σε αριθμό πυραμιδικούς νευρώνες, και αλλαγές στον αριθμό των κυττάρων που εκφράζουν τις ουσίες παρβαλβουμίνη και καλβιδίνη στον προμετωπιαίο φλοιό (Gilabert-Juan et al., 2013).

Με αυτά τα δεδομένα, είναι εύλογη η ενδεχόμενη σύνδεση των πρώιμων επιληπτικών κρίσεων με το περιεφηβικό στρες και τη χρήση του μοντέλου των δύο πληγμάτων. Στην παρούσα μελέτη, η πρώιμη επιληπτική κρίση λειτουργεί ως πρώτο πλήγμα σε μια ευαίσθητη κρίσιμη περίοδο, ενώ το στρες, όταν λαμβάνει χώρα σε μια επίσης μεταγενεστερη κρίσιμη περίοδο όπως είναι αυτή της εφηβείας, λαμβάνει το ρόλο του δεύτερου πλήγματος. Η παρούσα μελέτη, θα χρησιμοποιήσει το two hit hypothesis όπως περιγράφηκε, για να εμβαθύνει και να διαλευκάνει την επίδραση μιας πρώιμης επιληπτικής κρίσης, του περιεφηβικού στρες, αλλά και την συνδυαστική τους επίδραση, στη συμπεριφορά και τη δομή του εγκεφάλου κατά την ενηλικίωση.

B. Πειραματόζωα και ζωικά μοντέλα επιληψίας

Η επιληψία συνιστά μια από τις πιο συχνές εγκεφαλικές ασθένειες παγκοσμίως και κυρίως πλήττει μικρά παιδιά (Forsgren et al., 2005). Η αιτιολογία της μπορεί να ποικίλλει ενώ η ποικιλότητα του φαινομένου όσον αφορά τον τύπο των κρίσεων, την ηλικία που ξεκινούν, την διάρκεια των κρίσεων αλλά και την συχνότητά τους, δυσχεραίνουν κατά πολύ τη μελέτη της, καθώς πρόκειται για παράγοντες που δύσκολα μπορούν να ελεγχθούν και να σταθμιστούν ώστε οι αντίστοιχες μελέτες να έχουν ένα αξιόπιστο εύρημα. Για το λόγο αυτό η επιστημονική κοινότητα συνηθίζει να χρησιμοποιεί ζωικά μοντέλα για την επιληψία (Holmes, 2005).

Το ζωικό μοντέλο είναι ένα μη ανθρώπινο είδος, το οποίο μελετάται ενδεδειχώς για τη κατανόηση διαφόρων βιολογικών φαινομένων, με την ελπίδα πως οι τυχόν ανακαλύψεις θα μας προσφέρουν γνώση για τους εν λόγω μηχανισμούς και σε άλλα είδη (Fields & Johnston, 2005). Πρόκειται για *in vivo* μοντέλα (δηλαδή τα ζώα είναι εν ζωή) και χρησιμοποιούνται κυρίως σε έρευνες όπου η μελέτη σε ανθρώπους είναι είτε ανέφικτη, είτε μη ηθική-αντιδεοντολογική. Η πρώτη καταγεγραμμένη χρήση ζώων για ερευνητικούς σκοπούς ήταν από τον Ερασίστρατο στην Αλεξάνδερια, τον τρίτο αιώνα π.Χ.. Εντούτοις, ο άνθρωπος που επι της ουσίας καθιέρωσε τη συστηματική μελέτη ζώων ήταν ο Γαληνός από τη Πέργαμο, τον δεύτερο αιώνα μ.Χ. (Rowan & Rollin, 1983). Από τότε μέχρι σήμερα, η χρήση ζωικών μοντέλων χρησιμοποιείται ευρύτατα, για πολλές ασθένειες και παθήσεις, και συνέβαλλε αποφασιστικά στα περισσότερα επιτεύγματα της σύγχρονης ιατρικής (Lieschke & Currie, 2007).

Όσον αφορά στα μοντέλα για τις πρώιμες επιληπτικές κρίσεις (Early Life Seizures), χρησιμοποιούνται συχνά τα μοντέλα των τρωκτικών. Τα μοντέλα αυτά που χρησιμοποιούνται για να μιμηθούν τις πρώιμες επιληπτικές κρίσεις δύνανται να εμφανίσουν μεγάλη ποικιλία (Stafstrom, 2002). Αυτό είναι μεγάλο προσόν στις εν

λόγω έρευνες καθώς η κλινική εικόνα των κρίσεων είναι επίσης ετερογενής και χρειάζονται πολλά μοντέλα για να καταφέρει η επιστημονική κοινότητα να μοντελοποιήσει σωστά όλο το φάσμα των πρώιμων επιληπτικών κρίσεων. Επιπλέον, η ποικιλία των μοντέλων βοηθάει στο να ελεγχθεί κατά πόσο ισχυρά είναι τα εκάστοτε ευρήματα. Από την άλλη, η ίδια η ποικιλία των μοντέλων μπορεί να προκαλέσει διάφορες δυσκολίες, καθώς συγκρίσεις μεταξύ των μοντέλων δύναται να δείξουν διαφορές οι οποίες έγκεινται στη διαφορά μεταξύ των μοντέλων που χρησιμοποιήθηκαν, με αποτέλεσμα πιθανή μειωμένη ισχύ της έρευνας. Μάλιστα, διαφορές μεταξύ διαφόρων μοντέλων για τις πρώιμες επιληπτικές κρίσεις θα πρέπει να αναμένονται, καθώς στοιχεία του εκάστοτε μοντέλου (πχ ο τρόπος εισαγωγής των κρίσεων, το ζωικό είδος που χρησιμοποιείται και το είδος-γένος του ζώου) διαφέρουν μεταξύ τους και μπορεί να καταλήξουν σε διαφορετικά συμπεράσματα. Για παράδειγμα κάποια μοντέλα χρησιμοποιούν επαναλαμβανόμενες κρίσεις έναντι άλλων που χρησιμοποιούν μόνο μία (Bernard & Benke, 2015). Οι μεταγεννητικές μέρες 7-10 (ανάλογα το είδος) στους αρουραίους, αντιστοιχούν περίπου στη νεογνική περίοδο στους ανθρώπους (Talos et al., 2006), και κατά συνέπεια τα περισσότερα μοντέλα εισάγουν τις κρίσεις περίπου εκείνη την αναπτυξιακή περίοδο. Ένα συχνό μοντέλο πρώιμων επιληπτικών κρίσεων είναι η χρήση καϊνικού οξέος. Το καϊνικό οξύ (KA), ένα ανάλογο του γλουταμικού, εξομοιώνει τις κλινικές συνθήκες που οδηγούν στη γλουταμινεργική υπερδραστηριότητα, όπως αυτή προκαλείται από υποξία-ισχαιμία ή άλλες μεταβολικές δυσλειτουργίες (Traynelis et al., 2010). Ένα άλλο μοντέλο πρώιμων επιληπτικών κρίσεων είναι αυτό με τη χρήση flurothyl. Το flurothyl (FL), είναι ένας εισπνεόμενος ανταγωνιστής των GABA υποδοχέων (Eger et al., 2002; Gerstin et al., 2003). Συνήθως χρησιμοποιείται σε κλινικές υποθέσεις όπου διερευνουν διεγερτικές-ανασταλτικές ανισορροπίες, ενώ είθισται να γίνονται αρκετές

σύντομες επαγωγές ανα μέρα, για μερικές μέρες κατά την ανάπτυξη του ζώου (Bernard & Benke, 2015). Επίσης, ο αριθμός των κρίσεων ποικίλει κατά πολύ στις διάφορες έρευνες, κάποιες μελέτες χρησιμοποιούν λίγες κρίσεις όπως πχ έξι συνολικά (Bo et al., 2004), ενώ άλλες περισσότερες από 100 (Karnam et al., 2009). Η χρήση της πιλοκαρπίνης επίσης χρησιμοποιείται αρκετά συχνά. Η πιλοκαρπίνη είναι ένας χολινεργικός παρασυμπαθομιμητικός παράγοντας, με μουσκαρινική δράση. Χορηγείται ενδοπεριτονιακά και μερικές φορές χρησιμοποιείται μαζί με λίθιο, προκαλώντας τις πιο σοβαρές (συνεχείς και επιμήκεις χρονικά) πρώιμες επιληπτικές κρίσεις (Bernard & Benke, 2015). Η δόση ποικίλει από μελέτη σε μελέτη, καθώς υπάρχουν έρευνες που χρησιμοποιούν 60 mg/kg, ενώ άλλες αναφέρουν 380 mg/kg (dos Santos et al., 2000; Rutten et al., 2002). Επιπροσθέτως, σημαντικό μοντέλο είναι αυτό της υπερθερμίας. Το εν λόγω μοντέλο εισάγει μια εμπύρετη κρίση, τυπικά τη μεταγεννητική ημέρα 11 σε αρουραίους, αυξάνοντας τη θερμοκρασία του σώματος και του εγκεφάλου με τη χρήση ενός θερμού ρεύματος αέρα (Dube et al., 2009). Συνήθως η υπερθερμία διατηρείται για μισή ώρα, επάγοντας κρίσεις διάρκειας 20 λεπτών και μπορεί να προκαλέσει μακροπρόθεσμες μορφολογικές αλλαγές όπως η απότομη αύξηση των κοκκιωδών κυττάρων (mossy fiber sprouting) (Bender et al., 2003), ή και όχι (Chang et al., 2003). Ένα από τα συνηθέστερα μοντέλα κρίσεων είναι αυτό της γενικευμένης υποξίας. Στο συγκεκριμένο μοντέλο, οι πρώιμες επιληπτικές κρίσεις τυπικά εισάγονται τη μεταγεννητική μέρα 10 σε Long Evans αρουραίους (Talos et al., 2012). Όσο τα ζώα εκτίθενται σε σταδιακή γενικευμένη υποξία, το 95% των ζώων εμφανίζει τονικοκλονικές κρίσεις, αυτοματισμούς ακολουθούμενους από κινήσεις του κεφαλιού και των άκρων, καθώς και μυοκλονικά τινάγματα, ενώ ταυτοχρόνως το 75% έχουν ηλεκτρογραφικές ανωμαλίες που διαρκούν ένα εικοσιτετράωρο, συμπεριλαμβανομένων των κρίσεων (Bernard & Benke, 2015).

Τέλος, υπάρχει και το μοντέλο επαγωγής κρίσεων με τη χρήση πεντυλοτετραζόλης (PTZ). Το PTZ είναι μια ουσία που χρησιμοποιείται πολλές φορές ως διεγερτικό για το κυκλοφορικό και αναπνευστικό σύστημα, ενώ υψηλές δόσεις του, προκαλούν σπασμούς, με τη δράση της να εστιάζεται στο μπλοκάρισμα της λειτουργίας των GABA_A υποδοχέων (Velíšek, 2009). Το θετικό με το PTZ είναι πως προκαλεί κρίση μέσα σε 30 δευτερόλεπτα από τη στιγμή της χορήγησής της, και απομακρύνεται από τον οργανισμό εντός 24ωρου (Ferris & Tenney, 2014). Ταυτόχρονα, η επάγωγή κρίσεων με τη χρήση PTZ, είναι πολύ εύκολη στη χορήγησή της, ενώ είναι χαμηλού κόστους και υψηλής προβλεπτικότητας όσον αφορά στη κλινική δραστηριότητα, προκαλώντας οξείες κρίσεις. Εντούτοις, το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της χρήσης του PTZ είναι πως δεν προκαλεί κυτταρικό θάνατο και επιπλέον αποτελεί τη πιο κατάλληλη ουσία για το kindling, το φαινόμενο κατά το οποίο επαναλαμβανόμενες χορηγήσεις φαρμάκου, οδηγεί σε σταδιακή αύξηση της ισχύος των σπασμών (Etkecs & Arıhan, 2015). Η χρήση του είναι δοσο-εξαρτωμένη ενώ η επαγωγή μικρών ποσοτήτων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το καθορισμό των ουδών των διαφόρων σταδίων των κρίσεων (Akula et al., 2009). Γι αυτούς τους λόγους, παρόλο που η χρήση του PTZ έχει αναπτυχθεί εδώ και 60 χρόνια, εντούτοις παραμένει ένα από τα πιο δημοφιλή μοντέλα για την εύρεση αντιεπιληπτικών φαρμάκων (Löscher, 2011), και αποτέλεσε και επιλογή της παρούσας μελέτης για την επαγωγή των κρίσεων. Κι εδώ το πρωτόκολλο ποικίλει στον αριθμό των ενέσεων, το οποίο μπορεί να κυμανθεί από μια και μοναδική ένεση (Oghlakian et al, 2009) για οξεία κρίση μέχρι και για πολλές συνεχόμενες μέρες έως και οκτώ εβδομάδες για τη πρόκληση χρόνιας επιληπτικής κατάστασης (Corda et al., 1991) .

Συνοψίζοντας, γίνεται εμφανές πως -εκτός από τη ποικιλία των ζωικών μοντέλων- υπάρχουν και πολλοί τροποί επαγωγής επιληψίας ή επιληπτικών κρίσεων. Σαφώς

υπάρχουν αρκετά μοντέλα επιληψίας ακόμα, αλλά καθένα από αυτά αναζητά την απάντηση σε διαφορετικό ερώτημα, καθώς η ίδια η επιληψία είναι τόσο ποικιλόμορφη όσο οι μέθοδοι των προαναφερθέντων μοντέλων.

Γ.Επιληψία

Γ1.Γενικά

Ο όρος «επιληψία» είναι ελληνικός και προέρχεται από το ρήμα επιλαμβάνω που σημαίνει έχω στη κατοχή μου, επιτίθεμαι, αρπάζω. Οι αρχαίοι έλληνες πίστευαν πως οι ασθενείς είχαν καταληφθεί από διαμονικά πνεύματα ή τους θεούς και αναφέρονταν σε αυτήν ως «η ιερά νόσος» «σεληνιασμός» ή «ασθένεια του Ηρακλή» (Reynolds,

2000; Magiorkinis, Sidiropoulou, & Diamantis, 2010). Ιστορικά, η κατάσταση της επιληψίας είναι πολύ γνωστή από την αρχαιότητα. Η πρώτη περιγραφή επιληπτικής κρίσης παρουσιάζεται σε κείμενο γραμμένο στα Ακκαδικά, μια γλώσσα της Μεσοποταμίας, γύρω στο 2000 π.Χ. (Magiorkinis, Sidiropoulou & Diamantis, 2010). Ο Ιπποκράτης ήταν ο πρώτος που πρότεινε πως η επιληψία έχει τη βάση της στον εγκέφαλο και δεν έχει σχέση με δαιμονικές οντότητες. Αυτή η θεώρηση όμως δεν θα εξεταζόταν διεξοδικά παρά μόνο τον 18^ο αιώνα όπου η άποψη του Ιπποκράτη ξεκίνησε να διαδίδεται και να μελετάται στην Ευρώπη, και το 1870 ο Jackson εξέφρασε την άποψη πως η επιληπτική κρίση είναι το αποτέλεσμα της εκφόρτισης του νευρικού ιστού στους μύες και πως αφορά άτομα κάθε ηλικίας ενώ οι αιτίες της μπορεί να ποικίλουν (Jackson, 1870; World Health Organization, 2005). Οι ασθενείς με επιληψία στιγματίζονται κοινωνικά και επηρεάζονται και σε οικονομικό αλλά και πολιτιστικό επίπεδο (Newton & Garcia, 2012).

Η επιληψία είναι μια εγκεφαλική ασθένεια της οποίας το κύριο χαρακτηριστικό αποτελούν οι περιοδικές και απρόβλεπτες μεταβολές της φυσιολογικής λειτουργίας του εγκεφάλου (Duncan, Sander, Sisodiya & Walker, 2006). Πολλές φορές αναφέρεται ως διαταραχή, ή συχνότερα, ως σύνολο διαταραχών και όχι ως ασθένεια, προκειμένου να τονιστεί πως αποτελείται από ποικίλες φάσεις και καταστάσεις. Ο όρος «διαταραχή» εμπερικλείει νοηματικά μια λειτουργική ανισορροπία, που δεν είναι απαραίτητος διαρκείας. Από την άλλη ο όρος «ασθένεια» υπονοεί μια πιο μόνιμη κατάσταση. Το πρόβλημα έγκειται στο γεγονός πως ο όρος «διαταραχή» δεν είναι ευνόητος από το κοινό και τον μέσο αναγνώστη, με αποτέλεσμα να μειώνει τη σοβαρότητα της ασθένειας (Fisher et al., 2014). Η ίδια η ILAE (International League Against Epilepsy), εξέδωσε το 2005 ένα report, αναφερόμενη στην επιληψία ως σύνολο διαταραχών, ενώ ως προϋπόθεση για το χαρακτηρισμό της ανέφερε πως αρκεί

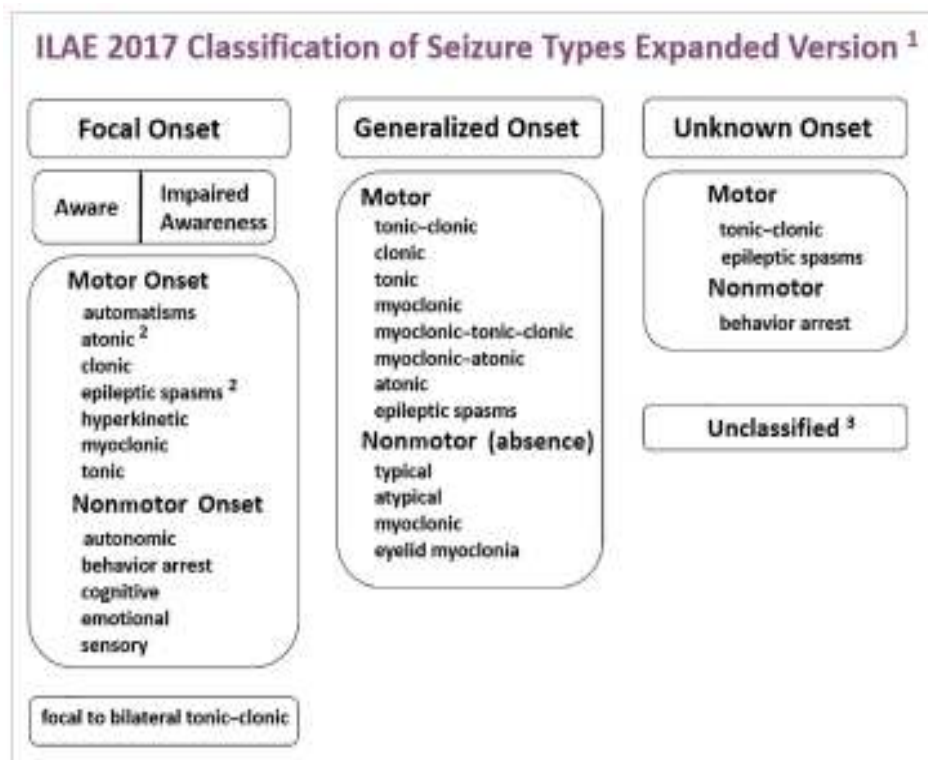
η εμφάνιση μιας και μόνο επιληπτικής κρίσης (Fisher et al., 2005). Εντούτοις, πιο πρόσφατα, και συγκεκριμένα το 2014, χρησιμοποιώντας περισσότερα δεδομένα, προέβη σε αναθεώρηση του εν λόγω report και εξέδωσε ένα νέο. Στο νέο και, μέχρι αυτή τη στιγμή που γράφονται αυτές οι γραμμές, τελικό report, η επιληψία χαρακτηρίζεται ως εγκεφαλική ασθένεια και όχι ως εγκεφαλική διαταραχή ή συνουθύλευμα διαταραχών. Επιπλέον, αναθεωρώντας το προηγούμενο ορισμό όπου αρκούσε μια και μοναδική κρίση για το χαρακτηρισμό μιας κατάστασης ως επιληψία, κατέληξε πως θα πρέπει να υπάρχουν τουλάχιστον δύο αντανακλαστικές ή ακούσιες κρίσεις, οι οποίες να έχουν χρονική απόσταση μεταξύ τους περισσότερες από 24 ώρες, ή να υπάρξει μια ακούσια κρίση και η πιθανότητα παραπάνω κρίσεων να είναι το λιγότερο στο 60% αφού έχουν προηγηθεί δύο ακούσιες κρίσεις τα τελευταία δέκα χρόνια, ή να έχει λάβει χώρα διάγνωση επιληπτικού συνδρόμου (Fisher et al., 2014). Να σημειωθεί πως τα περιστατικά επιληψίας ανέρχονται σε 50 ανα 100.000 κάθε χρόνο, και κυρίως παρουσιάζονται σε παιδιά και ηλικιωμένους (Forsgren et al., 2005). Το γεγονός αυτό καθιστά την επιληψία μια από τις πιο συχνές εγκεφαλικές ασθένειες, και κατά συνέπεια η ανάγκη για τη μελέτη της γίνεται επιτακτική.

Γ2.Επιληπτικές κρίσεις

Η κρίση ορίζεται ως «περιοδική εμφάνιση συμπτωμάτων ή/ και ενδείξεων λόγω της μη φυσιολογικής υπέρμετρης ή συγχρονισμένης νευρωνικής δραστηριότητας στον εγκέφαλο» (Fisher et al., 2005). Εντούτοις, υπάρχουν πολλά διαφορετικά είδη κρίσεων. Τα στοιχεία που απαρτίζουν την εκάστοτε κρίση, αντανακλούν τις

λειτουργίες και τις εγκεφαλικές περιοχές όπου η νευρωνική δραστηριότητα αρχικά διαταράχθηκε. Πιο συγκεκριμένα, μπορούν να παρατηρηθούν ακούσιες κινήσεις ή αντιθέτως, παύση της κίνησης, να επέλθει μείωση της νοητικής λειτουργίας, απώλεια συνείδησης ή συνδυασμός συμπτωμάτων.

Το πρώτο βήμα είναι να καθορίσουμε αν το συμβάν έχει τα χαρακτηριστικά των κρίσεων και πως δε πρόκειται για μίμηση των κρίσεων (Brodtkorb, 2013). Έπειτα, θα πρέπει να καθορίσουμε και να κάνουμε διάκριση στο είδος της κρίσης. Η διεθνής οργάνωση ενάντια της επιληψίας (International League Against Epilepsy – ILAE) δημοσίευσε πρόσφατα ένα review σχετικά με τη κατηγοριοποίηση των κρίσεων, ανάλογα με το σημείο εκκίνησης της κρίσης. Έτσι διακρίνουμε τρεις τύπους επιληψίας, αυτές που ξεκινάνε εστιασμένα σε ένα μέρος του εγκεφάλου (εστιακές), αυτές που εμπλέκουν ολόκληρο τον εγκέφαλο (γενικευμένες) και αυτές που έχουν άγνωστη εκκίνηση. Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται ένα διάγραμμα με τις κατηγορίες των επιληπτικών κρίσεων και τα στοιχεία που περιλαμβάνει η κάθε μία από αυτές.



Η βασική κατηγοριοποίηση βασίζεται σε τρία σημεία: το σημείο του εγκεφάλου από όπου ξεκινάει η κρίση, το επίπεδο συναίσθησης κατά τη διάρκεια της κρίσης, καθώς και από άλλα στοιχεία της κρίσης. Ξεκινώντας από το σημείο εκκίνησης, οι κρίσεις διακρίνονται σε εστιακές (focal seizures πλέον, έναντι του παλιότερου όρου partial seizures), οι οποίες είναι κρίσεις που ξεκινούν από μια περιοχή ή από ένα δίκτυο στο ένα ημισφαίριο του εγκεφάλου, σε γενικευμένες (generalized, οι οποίες δημιουργούνται από δίκτυα και στα δύο ημισφαίρια του εγκεφάλου), σε κρίσεις με άγνωστη εκκίνηση, καθώς και σε κρίσεις που από εστιακές, γίνονται αμφίπλευρες (focal to bilateral seizures), οι οποίες περιλαμβάνουν τις κρίσεις που ξεκινούν από ένα σημείο του εγκεφάλου και εξαπλώνονται και στα δύο ημισφαίρια, αντικαθιστώντας τον πρότερο όρο secondary generalized seizure.

Η συναίσθηση και το επίπεδό της, είναι ιδιαίτερα σημαντικός παράγοντας καθώς επηρεάζει το πόσο ασφαλές μπορεί να είναι το άτομο κατά τη διάρκεια της κρίσης. Πλέον χρησιμοποιείται ο όρος awareness (επιγνώση/συναίσθηση) αντί του πρότερου όρου consciousness (συνειδητότητα), καθώς θεωρείται πιο εύκολη η αξιολόγησή της.

Άλλο στοιχείο που χαρακτηρίζει τις κρίσεις και δύναται να τις κατηγοριοποιήσει, είναι η κίνηση, και η κινητική συμπεριφορά εν γένει. Εξ' ου και έχουμε τις εστιακές κινητικές κρίσεις (focal motor seizure), οι οποίες εμπεριέχουν κάποιο είδος κίνησης, όπως τινάγματα (twitching), τραβήγματα (jerking), άκαμπτες κινήσεις μελών του σώματος, καθώς και αυτοματισμούς (αυτόματες κινήσεις όπως το γλύψιμο των χειλιών, το τρίψιμο των χεριών κ.α). Υπάρχουν οι εστιακές μη κινητικές κρίσεις (focal non-motor seizures), κρίσεις οι οποίες έχουν άλλα συμπτώματα που εκδηλώνονται πρώτα, όπως αλλαγές των αισθήσεων και των συναισθημάτων.

Γ3. Αίτια της επιληψίας

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, η επιληπτική κρίση ορίζεται ως «περιοδική εμφάνιση συμπτωμάτων ή/ και ενδείξεων λόγω της μη φυσιολογικής υπέρμετρης ή συγχρονισμένης νευρωνικής δραστηριότητας στον εγκέφαλο» (Fisher et al., 2005), ενώ η επιληψία είναι η ασθένεια που χαρακτηρίζεται από τις επιληπτικές κρίσεις. Η αιτιολογία της μπορεί να ποικίλλει καθώς η επιληψία μπορεί να αποδοθεί σε γενετικούς παράγοντες, περιγεννητικούς, σε επίκτητους, καθώς και σε αναπτυξιακές διαταραχές (Berkovic et al., 2006). Μάλιστα, ανάλογα την αιτιολογία, η επιληψία μπορεί να διακριθεί σε τέσσερις κατηγορίες: την ιδιοπαθή επιληψία, η οποία δεν έχει κάποια νευροανατομική ανωμαλία και συνήθως οφείλεται σε γενετική προδιάθεση, ενώ ταυτόχρονα έχει συγκεκριμένο μοτίβο και χαρακτηριστικά στο

ηλεκτροεγκεφαλογράφημα. Τη συμπτωματική επιληψία, η οποία χαρακτηρίζεται από νευροπαθολογικές ανωμαλίες οι οποίες υποδεικνύουν την υποβόσκουσα ασθένεια. Η δε αιτία της μπορεί να είναι επίκτητη ή γενετική. Υπάρχει επίσης η προκαλούμενη επιληψία, της οποίας η αιτιολογία μπορεί να είναι κάποιος περιβαλλοντικός παράγοντας και δε χαρακτηρίζεται από εμφανείς νευροανατομικές ή νευροπαθολογικές ανωμαλίες. Τέλος υπάρχει και η κρυπτογενική επιληψία της οποίας τα αίτια δεν έχουν διευκρινισθεί, αλλά θεωρείται πως η αιτιολογία της είναι συμπτωματική (Rosati & Guerrini, 2014).

Γ4. Παθοφυσιολογία της επιληψίας

Όπως είδαμε, οι κρίσεις μπορούν να λάβουν χώρα λόγω διαφόρων αιτιών. Ο κύριος κανόνας όμως είναι πως οι κρίσεις προκαλούνται από δυσλειτουργία των μηχανισμών οι οποίοι διατηρούν σε ισορροπία τις διαδικασίες της αναστολής και της διέγερσης των νευρώνων. Υπό κανονικές συνθήκες, υπάρχουν διαδικασίες οι οποίες προφυλάσσουν τους νευρώνες από έντονη εκπόλωση, ενώ αντίστοιχα, υπάρχουν άλλες που διευκολύνουν την νευρωνική πυροδότηση. **Η δυσλειτουργία των μηχανισμών που αναστέλλουν τη πυροδότηση, ή αυτών που προωθούν την διέγερση, μπορεί να οδηγήσει σε επιληπτικές κρίσεις (Scharfman, 2007).**

Στη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ της διεγερτικής και της ανασταλτικής δραστηριότητας, σημαντικό ρόλο παίζει η συναπτική διαβίβαση. Μια αλλαγή στο ιοντικό περιβάλλον, μείωση της GABAεργικής λειτουργίας, αύξηση της νευρωνικής διέγερσης, μεταβολή των ιόντων καλίου και ασβεστίου ή αλλαγές στη συγκέντρωση των ιόντων εξωκυτταρικά, μπορεί να πυροδοτήσει εκπόλωση (Holmes & Ben-Ari, 2001). Είναι γνωστό πως το GABA (γ-αμινοβουτυρικό οξύ) και το γλουταμικό οξύ

είναι οι κύριοι νευροδιαβιβαστές για την αναστολή και τη διέγερση αντίστοιχα. Το GABA, παραγεται κυρίως σε ενδονευρώνες με μικρό άξονα και διατηρεί την ανασταλτική ιδιότητα που ισορροπεί τη νευρωνική διέγερση, ενώ όταν αυτή η ισοροπία κλονιστεί, εμφανίζονται οι κρίσεις (Treiman, 2001). Δημιουργείται στα GABAεργικά τερματικά του άξονα, μέσω της τρانشαμίνωσης του α-κετογλουταρικού σε γλουταμινικό οξύ, το οποίο στη συνέχεια αποκαρβοξυλιώνεται σε GABA. Απελευθερώνεται μετά στη σύναψη και δρα σε δύο τύπους υποδοχέων: τους GABA_A και GABA_B υποδοχείς (Treiman, 2001). Αν και το GABA αποτελεί ανασταλτικό νευροδιαβιβαστή κατά κύριο λόγο, εντούτοις στον ανώριμο εγκέφαλο οδηγεί σε εκπόλωση, λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης ιόντων χλωρίου. **Η εκπολωτική δράση του GABA, συγκερασμένη με τις ιδιότητες άλλων, τασεοελεγχόμενων ή διαβιβαστοελεγχόμενων ρευμάτων (ligand gated), είναι οι κύριοι παράγοντες που συντελούν στην αυξημένη διεγερσιμότητα του ανωριμου/νεαρου εγκεφάλου (Nardou et al., 2013).**

Γ5. Επιπτώσεις των κρίσεων στον ανώριμο εγκέφαλο

Όπως είδαμε από τα επιδημιολογικά στοιχεία, τα παιδιά αποτελούν ομάδα υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση κρίσεων, συγκριτικά με τους ενήλικες (Józwiak et al., 2011). Επίσης είδαμε πως αυτή η αυξημένη διεγερσιμότητα έχει συνδεθεί με γνωσιακά ελλείματα, με συμπεριφορικές διαταραχές αλλά και αλλαγές στη δομή του εγκεφάλου (Gosh et al., 2005; Soria et al., 2012; Lugo, Swann & Anderson, 2014). Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που βοηθούν στην αυξημένη αυτή πιθανότητα στα βρέφη: περιγεννητικές επιπλοκές, ενδοκρανιακή αιμοραγία, πυρετός, μεταβολικές διαταραχές και η περιγεννητική υποξία-ισχαιμία (Nardou et al., 2013).

Γενικότερα, έχουν χρησιμοποιηθεί πολλά ζωικά μοντέλα, ηλικίας από επτά ημερών μέχρι δεκατεσσάρων, καθώς αυτή η περίοδος αντιστοιχεί στη λειτουργική αλλά και δομική ωρίμανση του εγκεφάλου του πρώτου χρόνου στον άνθρωπο (Watson et al., 2006). Σε επίπεδο δομής του εγκεφάλου, έχει δειχθεί πως τα γνωσιακά και συμπεριφορικά ελλείματα που σχετίζονται με τις πρώιμες κρίσεις, προκύπτουν από δομικές εγκεφαλικές αλλοιώσεις οι οποίες διαταράσσουν τη συναπτική συνδεσιμότητα και τα εγκεφαλικά νευρωνικά κυκλώματα (Casanova et al., 2012). Επίσης έχει βρεθεί πως υπάρχει απώλεια νευρώνων του υποκάμπου, καθώς και απότομη αύξηση των αξόνων των κοκκιωδών κυττάρων (Mello et al., 1993), αύξηση που φαίνεται πως οφείλεται στην αυξημένη διεγερτική δραστηριότητα (Holmes & Ben-Ari, 2001). Εντούτοις, τα νεαρά ζώα είναι λιγότερο ευαίσθητα στην απώλεια νευρώνων στον υποκάμπο σε σχέση με τα ώριμα ζώα (Sankar et al., 2000). Ένας από τους λόγους που ο ανώριμος εγκέφαλος δεν χάνει μεγάλο αριθμό νευρώνων, είναι πως το γλουταμικό είναι λιγότερο τοξικό στον ανώριμο εγκέφαλο σε σχέση με τον ενήλικο. Μάλιστα, ο Marks και οι συνεργάτες του, βρήκαν πως ο βαθμός εισχώρησης ιόντων ασβεστίου στη περιοχή CA1 και η ακόλουθες κυτταρικές αλλοιώσεις, συνδέονται με την ηλικία (Marks et al., 1996). Επίσης, έχει αναφερθεί πως ασθενείς οι οποίοι είχαν σε μικρή ηλικία την έναρξη των κρίσεων, παρουσίασαν μεγαλύτερες μειώσεις σε όγκο στη φαιά ουσία (gray matter) σε όλον τον εγκέφαλο, καθώς και της λευκής ουσίας (white matter) (Weber et al., 2007). Συν τοις άλλοις, έχει βρεθεί πως οι κρίσεις σε μικρή ηλικία μειώνουν τον ρυθμό ανάπτυξης των δενδριτών στα κύτταρα της CA1, μειώνοντας τη διεγερσιμότητα και αυξάνοντας τη πιθανότητα να αναπτυχθούν ξανά κρίσεις. Εντούτοις, εμποδίζουν τη πλαστικότητα, η οποία είναι υπεύθυνη για γνωσιακές διεργασίες όπως είναι η μνήμη και η μάθηση (Nishimura et al., 2011).

Συμπερασματικά, είδαμε πως οι πρώιμες επιληπτικές κρίσεις, έχουν μακροχρόνια αποτελέσματα τόσο στα συστήματα που προωθούν τη διέγερση όσο και την αναστολή (NMDA και GABA αντιστοιχώς). Οι μακροχρόνιες αυτές αλλαγές, δύνανται να τροποποιήσουν τη λειτουργία του ανώριμου εγκεφάλου, το σχηματισμό νέων συνάψεων, οδηγώντας σε γνωσιακά ελλείμματα όσον αφορά τη μνήμη, τη μάθηση και τη συμπεριφορά.

Γ6. Επιπτώσεις των κρίσεων στη συμπεριφορά

Οι πρώιμες επιληπτικές κρίσεις, εκτός από μακροχρόνιες αλλαγές και αλλοιώσεις στον εγκέφαλο, επιφέρουν και αλλαγές και ελλείμματα σε γνωσιακές διεργασίες. Ο Holmes και οι συνεργάτες του, διεξήγαγαν μια έρευνα σε 70 αρουραίους Wistar, προκαλώντας πρώιμες επαναλαμβανόμενες κρίσεις, χρησιμοποιώντας fluoroethyl. Κάθε ζώο βίωσε πέντε κρίσεις την ημέρα για πέντε μέρες, ξεκινώντας τη μεταγεννητική μέρα P0 (την ημέρα γέννησης). Οι αναλύσεις τους περιελάμβαναν από ηλεκτροεγκεφαλογράφημα, συμπεριφορικά τεστ όπως ο υδάτινος λαβύρινθος και το τεστ ανοιχτού πεδίου, ηλεκτροφυσιολογία και stereology, μια μεθοδολογία η οποία χρησιμοποιώντας τις κατάλληλες τεχνικές, προσφέρει ποσοτικές πληροφορίες για μια τρισδιάστατη δομή, μέσω μετρήσεων που λαμβάνουν χώρα στις εικόνες του μικροσκοπίου. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα ζώα που είχαν υποστεί κρίσεις, ήταν λιγότερο ενεργητικά από τα ζώα της ομάδας ελέγχου και διένυσαν μικρότερη απόσταση. Στον υδάτινο λαβύρινθο, παρόλο που και οι δύο ομάδες έμαθαν να βρίσκουν τη κρυμμένη πλατφόρμα, εντούτοις τα ζώα που είχαν υποστεί τις κρίσεις ήταν σημαντικά πιο αργά από τα control (Holmes et al., 1998). Και τα δύο ευρήματα

δείχνουν πως οι πρώιμες επαναλαμβανόμενες κρίσεις, επηρεάζουν τη γνωσιακή λειτουργία και δημιουργούν ελλείμματα στη μάθηση.

Επιπροσθέτως, έχειδειχθεί πως οι πρώιμες επιληπτικές κρίσεις μεταβάλλουν τη κοινωνική συμπεριφορά. Συγκεκριμένα, ο Lugo και οι συνεργάτες του, εξέτασαν αν οι πρώιμες κρίσεις επηρεάζουν κοινωνικές και επαναληπτικές συμπεριφορές, και αν οδηγούν σε μαθησιακά και μνημονικά ελλείμματα. Για το λόγο αυτό, προκάλεσαν σε μύες ηλικίας οχτώ με δώδεκα ημερών (P7-11, ημέρα γέννησης η P0), επιληπτικές κρίσεις με τη χρήση fluothyl. Τα ζώα, έλαβαν τρεις κρίσεις ημερησίως για πέντε μέρες, ενώ τα συμπεριφορικά τεστ δειχθήσαν την μεταγεννητική ημέρα P60.

Χρησιμοποιήθηκε ο ανυψωμένος λαβύρινθος, το τεστ ανοιχτού πεδίου, το θάψιμο βόλων, το κοινωνικό δωμάτιο (social chamber), ο υδάτινος λαβύρινθος και άλλα. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα ζώα που είχαν υποστεί σύντομες κρίσεις τις μέρες 7-11, είχαν σημαντικά μειωμένη κοινωνική συμπεριφορά, ενώ ταυτόχρονα βρέθηκαν και ελλείμματα στη χωρική μάθηση και τη μνήμη, σε σύγκριση με τα ζώα της ομάδας ελέγχου (Lugo et al., 2014). Το αποτέλεσμα αυτό της μειωμένης κοινωνικής συμπεριφοράς, επιβεβαιώνει και ενισχύει άλλες έρευνες που είχαν παρόμοια αποτελέσματα (Bernard et al., 2013; Castelhana et al., 2013).

Ο Waltireit και η ομάδα του από την άλλη, χρησιμοποιώντας καινικό οξύ για τη πρόκληση status epilepticus τη μεταγεννητική ημέρα 7 και συνεχίζοντας ξανά τις κρίσεις την P14, σε αρουραίους, βρήκαν πως μόνο τα ζώα με προηγούμενες κρίσεις (ημέρας 7), είχαν μειωμένη κοινωνική συμπεριφορά (Waltireit et al., 2011). Η διαφορά με την έρευνα των Lugo και των συνεργατών του, είναι πως οι τελευταίοι βρήκαν πως οι κρίσεις με τη χρήση fluothyl είχαν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ελλειμμάτων στη χωρική μάθηση, τη συμπεριφορά και τη κοινωνικότητα. Οι ίδιοι οι Lugo et al, θεωρούν πως αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στο ενδεχόμενο οι

επαναλαμβανόμενες κρίσεις μπορεί να έχουν πιο σοβαρές αλλαγές στη συμπεριφορά σε σχέση με δύο μεμονωμένα επεισόδια status epilepticus, είτε λόγω διαφορών στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο των μυών σε σχέση με τον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο των αρουραίων (Waltereit et al., 2011; Lugo et al, 2014).

Στα αποτελέσματα των παραπάνω ερευνών έρχεται να προστεθεί και η μελέτη των Bo και της ομάδας του. Ειδικότερα, στη συγκεκριμένη έρευνα χρησιμοποιήθηκαν 18 αρουραίοι, οι οποίοι χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες: μια ομάδα που έλαβε μόνο μια κρίση, μια ομάδα που έλαβε επαναλαμβανόμενες κρίσεις για έξι συνεχόμενες ημέρες, και την ομάδα ελέγχου που δεν έλαβε καμία κρίση. Τη μεταγεννητική μέρα 60 με 65 τα ζώα υποβλήθηκαν στον υδάτινο λαβύρινθο, ενώ την μέρα 75, εξετάστηκε η πρωτεϊνική έκφραση κάποιων υπομονάδων των NMDA υποδοχέων (NR1, 2A, 2B, 2C, 2D) στον εγκεφαλικό φλοιό, καθώς και στον ιππόκαμπο. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η ομάδα με επαναλαμβανόμενες κρίσεις είχε σημαντικό έλλειμμα στο τεστ του υδάτινου λαβυρίνθου, σε σχέση με τα ζώα της ομάδας ελέγχου. Αντιθετως, η ομάδα με μια κρίση δεν έδειξε διαφορά από την ομάδα ελέγχου, υποδεικνύοντας πως ο αριθμός των κρίσεις είναι σημαντικός παραγοντας. Ταυτόχρονα, βρήκαν πως η μια μόνο κρίση, δεν επηρεάζει την έκφραση των NMDA υποδοχέων στον εγκεφαλικό φλοιό και στον ιππόκαμπο, αλλά τα ζώα της ομάδας με τις επαναλαμβανόμενες κρίσεις είχαν σημαντικές μακροπρόθεσμες επιδράσεις στους εν λόγω υποδοχείς (Bo et al., 2004).

Σε παρόμοιο πόρισμα κατέληξαν πρόσφατα και οι Barbosa et al, οι οποίοι μελέτησαν τη γνωσιακή λειτουργία σε ενήλικους, αρσενικούς αρουραίους στους οποίους είχαν προκαλέσει ένα επεισόδιο νεογνικού status epilepticus. Η γνωσιακή αξιολόγηση έγινε με τη χρήση δύο μοντέλων, του operant conditioning και του T λαβυρίνθου (T maze). Το operant conditioning είναι ένα τεστ το οποίο αξιολογεί τη συνειρμική μάθηση, τη

παγίωση της μνήμης και την επαναληπτική συμπεριφορά. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν πως ένα μόνο επεισόδιο νεογνικού status epilepticus, δεν αλλοιώνει τη συνειρμική μάθηση, τη μακροπρόθεσμη μνήμη της μνήμη εργασίας και την συμπεριφορική ευελιξία (Barbosa et al., 2017). Συμπληρωματικά, οι Kleen et al, δεν παρατήρησαν κάποιο έλλειμμα στη συνειρμική μάθηση μετά τη διεξαγωγή του operant conditioning task σε ζώα που υπέστησαν κρίσεις με τη χρήση flurothyl, αλλά βρήκαν μέτριο έλλειμμα στη συμπεριφορική ευελιξία (Kleen et al., 2011).

Εκτός όμως από ελλείμματα στη χωρική μνήμη και μάθηση, υπάρχουν έρευνες που έχουν βρει επιδράσεις και στα επίπεδα άγχους. Για την ακρίβεια, υπάρχουν μελέτες που έχουν βρει πως οι πρώιμες επιληπτικές κρίσεις σε τρωκτικά οδηγούν σε μακροπρόθεμα ανεβασμένα επίπεδα άγχους (Moreira et al., 2011; Müller et al., 2009). Πρόσφατα, ο Smith και οι συνεργάτες του, χρησιμοποίησαν wildtype μυες, στους οποίους προκάλεσαν μια επιληπτική κρίση με τη χορήγηση καϊνικού οξέος ενδοπεριτονιακά, τη μεταγεννητική μέρα 10, ενώ τη μέρα 60 τους υπέβαλλαν σε μια σειρά από συμπεριφορικά τεστ, ανάμεσα στα οποία ήταν η δοκιμασία ανοιχτού πεδίου, ο ανυψωμένος λαβύρινθος, το θάψιμο των βόλων, το τεστ κοινωνικού δωματίου, το τεστ αναγνώρισης νέου αντικειμένου και άλλα. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι μύες με πρώιμο status epilepticus, επέδειξαν αυξημένα επίπεδα άγχους και μειωμένη στερεοτυπική συμπεριφορά στη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου. Όσον αφορά στο τεστ ανυψωμένου λαβυρίνθου, το πειραματικό γκρουπ ξόδεψε λιγότερο χρόνο στους ανοιχτούς βραχίονες και περισσότερο χρόνο στους κλειστούς, ενώ για το χρόνο στο κέντρο, δεν υπήρχε διαφορά με την ομάδα ελέγχου. Το εύρημα αυτό συμπληρώνει αυτό του ανοιχτού πεδίου, ότι ένα πρώιμο επεισόδιο status epilepticus, οδηγεί σε μακροπρόθεσμη αύξηση της αγχώδους συμπεριφοράς. Εντούτοις, έρχεται σε αντίθεση με το προαναφερθέν εύρημα των Kleen et al και της ομάδας του

Barbarosa. Το κοινό αυτών των δύο μελετών είναι πως χρησιμοποίησαν και οι δύο το operant conditioning task, το οποίο, λαμβάνοντας υπόψη την υπόθεση πως μια μόνο κρίση πιθανόν να επιφέρει ήπιες επιδράσεις, ίσως δεν είναι αρκετά ευαίσθητο για να σημειωθεί το μικρό αυτό έλλειμμα, πιθανότητα που εγείρουν και οι ίδιοι οι Barbarosa et al.. Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα του υδάτινου λαβυρίνθου, έδειξαν πως η πειραματική ομάδα απέκτησε έλλειμμα στη χωρική μάθηση και μνήμη, καθώς τα ζώα δεν μπορούσαν να βρουν τη πλατφόρμα εύκολα. Από την άλλη πλευρά, δε βρήκαν διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων στο τεστ θαψίματος βόλων και κατά συνέπεια στην επαναληπτική συμπεριφορά, ενώ ταυτόχρονα δεν επέδειξαν διαφορά και στη κοινωνικότητα, όπως αυτή μετρήθηκε μέσω της δοκιμασίας του κοινωνικού δωματίου. Τέλος, δεν βρήκαν κάποιο μνημονικό έλλειμμα στην πειραματική ομάδα σε σχέση με αυτή του ελέγχου στο τεστ αναγνώρισης νέου αντικειμένου. Τα αποτελέσματα αυτά, δείχνουν πως **ακόμα και ένα μόνο επεισόδιο status epilepticus κατά τη νεογνική περίοδο, οδηγεί σε συγκεκριμένες μακροπρόθεσμες επιδράσεις στα επίπεδα άγχους και τη χωρική μάθηση**. Επιπλέον τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν το ήδη γνωστό πόρισμα της επιστημονικής κοινότητας πως **το άγχος είναι μια σημαντική διαταραχή που συσχετίζεται με την επιληψία** (Smith et al., 2017). Άλλωστε υπάρχουν έρευνες που έχουν δείξει πως μόλις ένα χρόνο μετά από διάγνωση επιληψίας, περίπου το 25% των ασθενών θα διαγνωστούν και με σύνδρομο αγχώδους διαταραχής (Swinkels et al., 2001).

Στον αντίποδα, υπάρχουν έρευνες που υποστηρίζουν τα αντίθετα πορίσματα. Για παράδειγμα, η μελέτη των Barry et al, δε βρήκε έλλειμμα στο τεστ του υδάτινου λαβυρίνθου σε ενήλικα ζώα έξι μηνών, τα οποία τις μεταγεννητικές μέρες P5-P14 έλαβαν 70 κρίσεις με τη χρήση flurothyl (Barry et al, 2016). Σε συμφωνία με αυτό το εύρημα, η ομάδα των Sarkisian et al, χώρισε τα ζώα σε δύο ηλικιακές ομάδες και

προκάλεσε τέσσερα επεισόδια status epilepticus. Βρήκαν πως τα ζώα που επέδειξαν έλλειμμα στη χωρική μνήμη και μάθηση στον υδάτινο λαβύρινθο ήταν αυτά που ανήκαν στην μεγαλύτερη ηλικιακή ομάδα, και πως τα μικρότερα ζώα δεν επέδειξαν κάποιο έλλειμμα, καταλήγοντας πως ο ανώριμος εγκέφαλος παρουσιάζει μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στις μακροπρόθεσμες γνωσιακές επιπτώσεις των επιληπτικών κρίσεων σε σχέση με τον ώριμο (Sarkisian et al., 1997). Οι Cornejo και η ομάδα του, βρήκαν πως μια και μόνο κρίση, επηρεάζει τη βραχύχρονη μνήμη, αλλά δεν έχει καμία επίδραση στη χωρική μάθηση, τη μνήμη αναγνώρισης ή τα επίπεδα άγχους (Cornejo et al., 2008). Συγκεκριμένα, με τη χρήση καϊνικού οξέος, προκάλεσαν κρίσεις τη μεταγεννητική μέρα P7, η οποία όπως λένε και οι ίδιοι, αποτελεί τη πιο ευαίσθητη αναπτυξιακή περίοδο, καθώς κρίσεις εκείνη τη μέρα, μιμούνται τις νεογνικές ανθρώπινες κρίσεις κλινικά, βιοχημικά και ηλεκτρογραφικά. Κατα την ενηλικίωση, τις μέρες P60-90, τα ζώα υποβλήθησαν σε συμπεριφορικές δοκιμασίες, όπως αυτή του υδάτινου λαβυρίνθου, της αναγνώρισης νέου αντικειμένου, ανοιχτού πεδίου και ανυψωμένου λαβυρίθου. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν πως μια μόνο πρόωμη επιληπτική κρίση πλήττει τη βραχύχρονη μνήμη, αλλά αφήνει ανέπαφη τη χωρική μάθηση και την ανάκληση. Τα δεδομένα του τεστ αναγνώρισης νέου αντικειμένου έδειξαν πως η μια αυτή κρίση, δε προκαλεί μνημονικά ελλείμματα στην αναγνώριση νέου αντικειμένου, όπως και δεν επηρεάζουν τα επίπεδα άγχους όπως αυτά μετρήθηκαν στον ανυψωμένο λαβύρινθο (Cornejo et al., 2008).

Συμπερασματικά μπορούμε να διαπιστώσουμε πως η πλειονότητα των μελετών υποστηρίζουν διάφορα ελλείμματα στην γνωσιακή και κοινωνική συμπεριφορά, χωρίς να λείπουν και οι μελέτες που υποστηρίζουν τον αντίποδα. Ταυτόχρονα φαίνεται να υπάρχει διαφωνία και ως προς το τρόπο που οι ομάδες παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ τους, για παράδειγμα κάποιες μελέτες υποδεικνύουν πως στο τεστ

ανοιχτού πεδίου η πειραματική ομάδα διέφερε από αυτή του ελέγχου και τα ζώα διένυσαν περισσότερη απόσταση, ενώ άλλες μελέτες υποστηρίζουν πως ναί μεν υπάρχει διαφορά, αλλά πως τα ζώα που έλαβαν πρώιμες κρίσεις διανύουν μικρότερη απόσταση στο εν λόγω τεστ, παρουσιάζοντας υποκινητικότητα. Αυτές οι διαφορές πιθανόν να οφείλονται στη πληθώρα των παραμέτρων που υπάρχουν, όπως το είδος του φαρμάκου που χρησιμοποιείται για τη κρίση, η διάρκεια τις κρίσεις, ο αριθμός των κρισεων, η ηλικία κατά την οποία γίνεται η επαγωγή, η μεθοδολογία, καθώς και η επιλογή των συμπεριφορικών δοκιμασιών.

Δ.Στρες

Δ1. Ορισμός και HPA άξονας

Το stress μπορεί να μελετηθεί κάτω από δύο πρίσματα: αυτό της ψυχολογίας και αυτό της βιολογίας. Στη ψυχολογία, το στρες ορίζεται ως το αίσθημα περιορισμού ή πίεσης (Simandan, 2010). Από βιολογικής απόψεως, ορίζεται ως η διαδικασία κατά την οποία ένα οποιοδήποτε ερέθισμα, διακόπτει την εσωτερική ισορροπία του σώματος ενός οργανισμού (φυσιολογική ομοιόσταση) (Stephens & Wand, 2012). Πληροφορίες που σχετίζονται με το στρες (ιδιοδεκτικά στοιχεία, όπως είναι ο αιματολογικός όγκος, καθώς και εξωδεκτικά στοιχεία όπως η οσμή ενός εισβολέα), μεταφέρονται στον εγκέφαλο ο οποίος στρατολογεί νευρωνικά και νευροενδοκρινικά συστήματα. Η φυσιολογική απόκριση στο στρες περιλαμβάνει αποτελεσματικό και υψηλής εξοικονόμησης σετ συστημάτων, των οποίων σκοπός είναι η διατήρηση της φυσιολογικής ακεραιότητας ακόμα και κάτω από τις πιο απαιτητικές συνθήκες (αλλόσταση). Το αυτόνομο νευρικό σύστημα προσφέρει την πιο άμεση απόκριση στην έκθεση ενός στρεσογόνου παράγοντα, μέσω της συμπαθητικής και της

παρασυμπαθητικής νεύρωσης, οι οποίες προκαλούν άμεση και γρήγορη αλλαγή στη κατάσταση της φυσιολογίας (Ulrich-Lai & Herman, 2009).

Όσον αφορά στην απόκριση στο στρες, αυτή ρυθμίζεται από τον εγκέφαλο. Ο άξονας υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια (Hypothalamus-Pituitary-Adrenal axis) είναι το κύριο σύστημα που σχετίζεται με το στρες, όντας ένα νευροενδοκρινικό σύστημα που επιστρατεύεται στη παραγωγή της κορτιζόλης, της κύριας ορμόνης του στρες, που παράγεται στα επινεφρίδια (Frodl & O'Keane, 2013). Η κορτιζόλη ανήκει στη κατηγορία των γλυκοκορτικοειδών, ουσίες που μεταβάλλουν τη λειτουργία του οργανισμού ώστε να μεταβολίσει ή να αποθηκεύσει ενέργεια για να ανταποκριθεί στις απαιτήσεις του στρεσογόνου παράγοντα (De Kloet et al., 2005). Ο ρόλος τους στη φυσιολογία του στρες είναι ιδιαίτερα σημαντικός, καθώς τα γλυκοκορτικοειδή κατέχουν κεντρική θέση στις επιβλαβείς επιδράσεις του στρες στη δομή του εγκεφάλου, κυρίως στον ιππόκαμπο, μια περιοχή με πολλούς κορτικοειδείς υποδοχείς, ευαίσθητους στα γλυκοκορτικοειδή (Mc Ewen et al., 1986). Οι επιβλαβείς αυτές επιδράσεις λαμβάνουν χώρα με τρεις τρόπους: τη νευρική ατροφία, την ικανότητα του στρες και των γλυκοκορτικοειδών να προκαλούν αναστρέψιμη βλάβη γνωσιακών διεργασιών (χωρίς τον «θάνατο» των ίδιων των νευρώνων), τη νευροτοξικότητα, δηλαδή τον θάνατο των νευρώνων, και τη νευροδιακινδύνευση (neuroendangerment), την ικανότητα δηλαδή των γλυκοκορτικοειδών να κάνει τους νευρώνες πιο ευάλωτους, μειώνοντας την ικανότητά τους να επιβιώνουν από νευρολογικές εισβολές (Sapolsky, 1996). Η κορτικοεκλυτίνη (CRH) είναι το βασικό πεπτίδιο που εμπλέκεται στην ενεργοποίηση του hpa άξονα. Απελευθερώνεται από τον παρακοιλιακό πυρήνα (paraventricular nucleus) του υποθαλάμου, ως απόκριση σε πολλά σωματικά ερεθίσματα καθώς και στο ψυχολογικό στρες (Frodl & O'Keane, 2013). Με τη σειρά της, απελευθερώνει την αδενοκορτικοτρόπο ορμόνη από την

υπόφυση, η οποία προωθεί τη σύνθεση και απελευθέρωση των γλυκοκορτικοειδών από τα επινεφρίδια (Whitnall, 1993).

Σε μη στρεσογόνες φάσεις, το CRH αλλά και η βαζοπρεσίνη (arginine-vasopressin – AVP), εκκρίνονται στη πύλη του συστήματος με κιρκάδιο, παλμικό τρόπο με συχνότητα δύο με τρία επεισόδια κάθε ώρα (Engler et al., 1989). Υπό κανονικές συνθήκες, το εύρος του ρυθμού των CRH και της AVP αυξάνεται τις πωινές ώρες, έχοντας ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκκρισης της αδενοκορικοτροπικής ορμόνης και της κορτιζόλης στη γενική κυκλοφορία. Αυτές οι διακυμάνσεις μέσα στην ημέρα, οφείλονται σε αλλαγές στο φως, το διατροφικό πρόγραμμα και τη δραστηριότητα, και διαταράσσονται από στρεσογόνους παράγοντες (Hogrocks et al., 1990).

42. Στρες και κρίσιμες περιόδους

Η εφηβεία είναι μια κρίσιμη αναπτυξιακή περίοδος, και λαμβάνει χώρα κατά τη μετάβαση από τη παιδική ηλικία έως την ενηλικίωση. Ήδη έχει αναφερθεί η διαφορά εφηβείας και ενήβωσης, οι οποίες αλληλοεπικαλύπτονται χρονικά αλλά δεν είναι συνώνυμες. Στους ανθρώπους η εφηβεία προσδιορίζεται συνήθως σε ηλικίες 12- 20 ετών, ενώ στα τρωκτικά υπολογίζεται ως οι μεταγεννητικές μέρες 28-42 (Spear, 2000). Η εφηβεία, χαρακτηρίζεται από συμπεριφορές που περιλαμβάνουν υψηλά επίπεδα ρίσκου, αυξημένη εξερευνητικότητα, κοινωνική αλληλεπίδραση και υψηλή δραστηριότητα, συμπεριφορές που έχουν ως αποτέλεσμα τη κατάκτηση των ικανοτήτων που χρειάζονται για να αντιμετωπιστεί η ενηλικίωση και η ανεξαρτησία (Spear, 2000). Το ενδιαφέρον στοιχείο είναι πως αυτές οι συμπεριφορές απαντούνται σε όλα τα είδη από τους ανθρώπους, έως και τα τρωκτικά (συμπεριφορές όπως παιχνίδι, περιποίηση γούνας) (Panksepp, 1981).

Ο εγκέφαλος κατά τη περίοδο της εφηβείας, βρίσκεται σε μια μοναδική μεταβατική κατάσταση καθώς υποβάλλεται τόσο σε προοδευτικές όσο και regressive αλλαγές, θέτοντας έτσι τη βιολογική βάση των μοναδικών αλλαγών που χαρακτηρίζουν την εφηβεία, όπως και των συμπεριφορικών αλλαγών που θα οδηγήσουν, μέσω της ωριμότητας, στην ενηλικίωση (Crews & Hodge, 2007). Μελέτες μαγνητικής τομογραφίας σε ανθρώπους, έχουν δείξει την ύπαρξη αλλαγής στον όγκο της φαιάς ουσίας, έχοντας το σχήμα ενός ανεστραμμένου «U» τη περίοδο ακριβώς πριν την εφηβεία να αυξάνεται και μετά την εφηβεία να μειώνεται (Giedd et al., 1999). Σε κυτταρικό επίπεδο, αυτές οι αλλαγές αντιστοιχούν στην αυξημένη παραγωγή αξόνων και συνάψεων κατά τις αρχές της ενήβωσης, και του γρήγορου «κλαδέματός» τους στη προχωρημένη εφηβεία (Giedd et al., 1999; Andersen et al., 2000). Πιστεύεται πως αυτή η τροποποίηση, αποτελεί τη βιολογική βάση της αναπτυξιακής πλαστικότητας όπου τα νευρωνικά δίκτυα σχηματίζονται έτσι ώστε να προσαρμόζονται στις περιβαλλοντικές ανάγκες που οδηγούν στην ώριμη ενήλικη συμπεριφορά. Αυτή η περίοδος ανασχηματισμού προφανώς κάνει τους εφήβους πιο ευάλωτους σε εξωτερικές βλάβες αλλά και σε ψυχιατρικές διαταραχές (Crews & Hodge, 2007).

Κρίσιμες περίοδοι ονομάζονται κάποια συγκεκριμένες χρονικές περίοδοι κατά την ανάπτυξη, όταν γενετικές και περιβαλλοντικές διαδικασίες αλληλεπιδρούν για να διαμορφώσουν (η και να παγιώσουν σε κάποιες περιπτώσεις) λειτουργικά χαρακτηριστικά. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις αντιστοιχούν σε δομικές αναδιοργανώσεις του εγκεφαλικού φλοιού που λαμβάνουν χώρα στα πλαίσια αυτού του συγκεκριμένου χρονικού παραθύρου (Crews & Hodge, 2007). Η φλοιική ανάπτυξη στους ανθρώπους συμβαίνει τις πρώτες τρεις δεκαετίες της ζωής, για παράδειγμα ο ανθρώπινος οπτικός φλοιός φτάνει στο ζενίθ της αυξημένης παραγωγής

συνάψεων γύρω στον τέταρτο μήνα ζωής, ενώ μετά ακολουθεί μια συναπτική μείωση, η οποία συνεχίζει μέχρι τη προσχολική ηλικία όπου και η συναπτική πυκνότητα σταθεροποιείται (Toga et al., 2006). Η πρόσδεση του γλουταμινικού στους NMDA υποδοχείς φτάνει στο ζενίθ της στις αρχές της εφηβείας, και μειώνεται σημαντικά αργότερα, με την απώλεια σχεδόν του ενός τρίτου των εν λόγω υποδοχέων τη μεταγεννητική μέρα 60 στους αρουραίους (Insel et al., 1990). Αυτή η συναπτική μείωση συνεισφέρει στην απώλεια διεγερτικών εισροών στους επικληνείς πυρήνες (NAc) και μείωση στους επικλινείς (accumbal) NMDA υποδοχείς κατά την εφηβική ωρίμανση του εγκεφάλου (Frantz & Van Hartesveldt, 1999). Να σημειωθεί εδώ πως η μακροχρόνια ενδυνάμωση, μια μετρήσιμη αύξηση της συναπτικής ισχύος και μια μορφή νευροπλαστικότητας, βρίσκεται συχνότερα στα έφηβα ποντίκια σε σχέση με τα ενήλικα, δεδομένα που υποστηρίζουν και ενισχύουν την υπόθεση πως η εφηβεία είναι μια περίοδος υψηλής ευπλαστότητας για την ανάπτυξη του μεσομεταιχμιακού εγκεφάλου (Schramm et al., 2002). Τέλος, έχειδειχθεί πως υπάρχουν σημαντικές αλλαγές προσυναπτικά και μετασυναπτικά στις GABAεργικές συνάψεις σε έφηβους πιθήκους (Lewis et al., 2004).

4.3. Μακροπρόθεσμες επιδράσεις του στρες στη συμπεριφορά

Το στρες όμως έχει επιδράσεις και στη συμπεριφορά. Έρευνες σε ανθρώπους έχουν δείξει πως το στρεσογόνο φορτίο κατά την εφηβεία, συσχετίζεται με τη μετέπειτα απαρχή διαταραχών όπως αυτές της κατάθλιψης ή/και του άγχους στην ενηλικίωση (Turner & Loyd, 2004). Αλλά και μελέτες σε αρουραίους έχουν δείξει πως το χρόνιο στρες κατά τη κρίσιμη περίοδο της εφηβείας, οδηγούν σε εγκεφαλικές αλλοιώσεις αλλά και ελλείμματα στη γνωσιακή ικανότητα στην ενηλικίωση. Συγκεκριμένα, οι

Igsor et al, χρησιμοποιώντας 156 αρουραίους, εφάρμοσαν ένα πρωτόκολλο χρόνιου περιφηβικού στρες, διάρκειας 28 ημερών, προκειμένου να διαπιστώσουν τις επιπτώσεις. Χώρισαν τα ζώα σε τρεις ομάδες: η μια έλαβε χρόνιο σωματικό στρες, η δεύτερη χρόνιο κοινωνικό στρες και η τρίτη, που αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου, απλά εξοικειώθηκε με το πειραματιστή (handled controls). Οι στρεσογόνοι παράγοντες έλαβαν χώρα τη μεταγεννητική μέρα 28, η οποία από πολλούς επιστήμονες θεωρείται η αρχή της εφηβείας (Spear, 2000). Οι σωματικοί στρεσογόνοι παράγοντες περιελάμβαναν την εξαναγκασμένη κολύμβηση (forced swimming test), το περιορισμό (restraint), έκθεση σε δυνατό θόρυβο, έκθεση στο κρύο και την έκθεση σε αιθέρα, ενώ οι κοινωνικοί περιελάμβαναν την απομόνωση, νέο περιβάλλον, συνωστισμό, αλλαγή συγκατοίκου στον κλωβό, και κατωτερότητα (ζευγάρια ζώων μετέφθησαν στον κλωβό ηλικιακά μεγαλύτερων ζώων- οχτώ μηνών). Μετά ακολούθησαν διαδικασίες όπως η στερεολογική ανάλυση για την αξιολόγηση της μορφολογίας του εγκεφάλου, ο υδάτινος λαβύρινθος Morris για την αξιολόγηση διεργασιών όπως της μάθησης και μνήμης, ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων του ιπποκάμπου για στρες και η απόκριση του hpa άξονα στο οξύ στρες. Μετά από αυτές τις αναλύσεις, τα ζώα χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, μια που ελέγχθηκε ένα εικοσιτετράωρο μετά τη τελευταία έκθεση σε στρεσογόνο παράγοντα, και μια που ελέγχθηκε μετά από τρεις εβδομάδες αποκατάστασης. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν πως το πρωτόκολλο του σωματικού στρες οδήγησε σε αναστολή της ανάπτυξης των πυραμιδικών κυττάρων στην CA1 και στα κοκκιώδη κύτταρα της οδοντωτής έλικας. Επίσης βρήκαν μείωση του όγκου του ιπποκάμπου μετά τη πάροδο τριών εβδομάδων ανάκαμψης, αλλά όχι μετά το πέρας του πρώτου εικοσιτετράωρου, δεδομένο που συγκλίνει στη μακροπρόθεσμη επίπτωση του στρεσογόνου παράγοντα. Αυτό το εύρημα μάλιστα, συσχετίστηκε με τη μειωμένη επίδοση της ομάδας που υποβλήθηκε

σε σωματικό στρες στον υδάτινο λαβύρινθο, τη δοκιμασία που αξιολογεί τη χωρική μνήμη και μάθηση. Εντούτοις, η ομάδα με το χρόνιο κοινωνικό στρες, δεν επέδειξε αντίστοιχα μνημονικό έλλειμμα (Igsor et al, 2004). Σε αντίθεση με τη τελευταία παρατήρηση, η ομάδα της Sterlemann, χρησιμοποιώντας διαφορετικό πρωτόκολλο, έκανε επαγωγή χρόνιου κοινωνικού στρες, διάρκειας επτά εβδομάδων, σε αρσενικούς επίμυες και μελέτησε τις επιπτώσεις του εν λόγω χειρισμού κατά τη πάροδο του χρόνου. Βρήκαν μειωμένη επίδοση της χωρικής μνήμης μετά από ένα χρόνο, αλλά δε βρήκαν αντίστοιχο έλλειμμα σε άλλους μνημονικούς τομείς όπως την αναγνώριση νέου αντικειμένου (Sterlemann et al., 2010). Σε παρόμοιο αποτέλεσμα κατέληξε και η McCormick, καθώς βρήκε πως το χρόνιο (15 μέρες) στρες κοινωνικής αστάθειας (social instability stress, καθημερινά μια ώρα απομόνωσης και αλλαγή του cage mate) κατά την εφηβεία, είχε ως αποτέλεσμα μνημονικό έλλειμμα στη χωρική μνήμη στην ενηλικίωση (δοκιμασία που εξαρτάται από τον υπόκαμπο), αλλά σε άλλα μνημονικά τεστ, όπου δεν εμπλέκεται η εν λόγω δομή, δε βρέθηκε διαφορά με την ομάδα ελέγχου (Mc Cormick et al., 2012). Οι Avital et al, μελετώντας τις επιδράσεις του εφηβικού στρες στην ενήλικη συμπεριφορά καθώς και στα επίπεδα της δεϋδροεπιανδροστερόνης, μιας ορμόνης της οποίας η παραγωγή γίνεται στα επινεφρίδια και αποτελεί ανταγωνιστή της κορτιζόλης, προστατεύοντας τον οργανισμό από τα υψηλά επίπεδα της τελευταίας, σε σχετικές εγκεφαλικές περιοχές. Η ποσοτική ανάλυση της επίδρασης του περιεφηβικού στρες έγινε ένα μήνα μετά την επαγωγή του και αξιολογήθηκε με τη χρήση του τεστ ανοιχτού πεδίου και του υδάτινου λαβυρίνθου, καθώς και τη συγκέντρωση της δεϋδροεπιανδροστερόνης στον υποθάλαμο και τον ενδορινικό φλοιό. Βρήκαν πως η έκθεση σε περιεφηβικό στρες αύξησε τα επίπεδα άγχους ένα μήνα μετά τον στρεσογόνο παράγοντα, ενώ στον υδάτινο λαβύρινθο το γκρούπ που είχε υποστεί στρες είχε χειρότερη επίδοση από

αυτή της ομάδας ελέγχου (Avital et al., 2006). Επίσης ο Green και οι συνεργάτες του, είχαν κάποια αποτελέσματα που συμφωνούν εν μέρει με τα παραπάνω ευρήματα. Μελετώντας τις επιδράσεις του περιφηβικού χρόνιου (16 μέρες) στρες κοινωνικής αστάθειας στην ενηλικίωση, βρήκαν πως η πειραματική ομάδα, καθυστερούσε να μπει στο κέντρο της διάταξης του τεστ του ανοιχτού πεδίου, ενώ καθυστερούσε και στη προσέγγιση ενός αντικειμένου τοποθετημένου στο κέντρο της εν λόγω διάταξης. Επίσης οι στρεσαρισμένοι μυες, όταν ένα άλλο ζώο εισερχόταν στη διάταξη, περνούσαν λιγότερο χρόνο αλληλεπιδρώντας κοινωνικά με το νεοεισελθέν ζώο, και ειδικά όταν το δεύτερο ζώο ήταν κι αυτό στρεσαρισμένο. Κατέληξαν πως το κοινωνικό στρες στην εφηβεία αυξάνει το άγχος στο ανοιχτό πεδίο, ενώ διατηρεί ανέπαφη την εξερευνητική ικανότητα, και μεταβάλλει τη κοινωνική αλληλεπίδραση στην ενηλικίωση (Green et al., 2012). Ένα άλλο περιφηβικό πρωτόκολο στρες είναι αυτό όπου το πειραματικό υποκείμενο εκθέτεται σε οσμή θηρευτή. Οι Bazak και οι συνεργάτες του, βρήκαν πως μετά την έκθεση στον εν λόγω στρεσογόνο παράγοντα κατά την εφηβεία, είχε επίδραση στην αγχώδη συμπεριφορά όταν το ζώο εξετάστηκε κατά την ενηλικίωση, μέσω του υπερυψωμένου λαβυρίνθου (Bazak et al., 2009). Από την άλλη πλευρά έρευνες όπως αυτή των De Lima, υποστηρίζουν πως το περιφηβικό στρες αυξάνει τη κινητική δραστηριότητα, τη συναισθηματική διέγερση και την εγρήγορση, με ταυτόχρονη μείωση του άγχους, ενώ φάνηκε και επίδραση στη μνήμη αναγνώρισης, καταλήγοντας πως φαινότυποι συμπεριφοράς που σχετίζονται με συναισθηματική διέγερση, προκύπτουν μετά τη διακοπή του στρεσογόνου παράγοντα και διατηρούνται μέχρι την ενηλικίωση, προκαλώντας μακροχρόνιες αλλαγές στον hpa άξονα (De Lima et al, 2017).

Συνοψίζοντας, προκύπτει πως η επαγωγή περιφηβικού στρες, παρολο που επηρεάζεται απο πολλούς παράγοντες, όπως η ηλικία επαγωγής, το είδος του στρες, η

χρονική του διάρκεια, η ηλικία αξιολόγησης, εντούτοις, μπορεί να επιφέρει μακροπρόθεσμες επιπτώσεις στη συμπεριφορά, χωρίς να απουσιάζουν και οι ερευνητές που υποστηρίζουν πως ορισμένες μνήμονικές διεργασίες, όπως η αναγνώριση νέου αντικειμένου μένουν ανέπαφα.

Δ4. Συνδυασμός επιληπτικών κρίσεων και έκθεσης σε στρες

Εκτος από την επίδραση αυτή καθαυτή του στρες στον οργανισμό, οι στρεσογόνοι παράγοντες δρουν επιταχυντικά ως προς τις κρίσεις σε ασθενείς με επιληψία (Haut et al., 2003; Swinkels et al., 1998). Ο παράγων που επιταχύνει την επιληψία ορίζεται ως οποιοσδήποτε ενδογενής ή περιβαλλοντικός παράγοντας που προωθεί την εμφάνιση των επιληπτικών κρίσεων (Frucht et al., 2000). Παράδειγμα ενδογενών επιταχυντικών παραγόντων αποτελεί το συναισθηματικό στρες (Temkin & Davis, 1984). Οι τελευταίοι, μελέτησαν τις επιδράσεις των σημαντικών γεγονότων της ζωής, των καθημερινών ταλαιπωριών, και των επιπέδων του στρες και αν αυτά αυξάνουν ή μειώνουν τις πιθανότητες εμφάνισης κρίσεων, και η μελέτη διήρκεσε τρεις μήνες. Βρήκαν πως τα υψηλά επίπεδα στρες και τα στρεσογόνα γεγονότα συσχετίστηκαν με την εμφάνιση συχνότερων κρίσεων στους περισσότερους συμμετέχοντες (Temkin & Davis, 1984).

Η μελέτη των Frucht και των συνεργατών του έδειξε πως οι συμμετέχοντες, ανέφεραν το στρες ως νούμερο ένα προωθητικό παράγοντα για την εμφάνιση των κρίσεων, με ποσοστό 30%. Οι ασθενείς με επιληψία κροταφικού λοβού ήταν πιθανότερο να αναγνωρίσουν το στρες (σε ποσοστό 46%) ως προωθητικό παράγοντα, ενώ εκείνοι με κρυπτογενετική γενικευμένη επιληψία σε ποσοστό 15%. Στατιστικά σημαντική βρέθηκε η ηλικία, με τους ασθενείς που ανέφεραν το στρες ως προωθητικό παράγοντα να είναι

μεγαλύτεροι έναντι των ασθενών που δεν την ανέφεραν, ενώ επίσης σημαντικό βρέθηκε το φύλο, με τις γυναίκες να το αναφέρουν περισσότερο σε σχέση με τους άντρες (Frucht et al., 2000).

Βιοχημικώς, υπάρχουν ενδείξεις πως η κορτιζόλη παίζει ρόλο στον έλεγχο των κρίσεων. Επίσης έμμεσες ενδείξεις για τον ρόλο που παίζουν οι ορμόνες του στρες στον έλεγχο της επιληψίας, έρχονται από μελέτες που δείχνουν πως οι διαταραχές της διάθεσης, οι οποίες στους περισσότερους ασθενείς συνοδεύονται από υπερδραστηριότητα του hpa άξονα, μπορεί να προδιαθέτουν στην ανάπτυξη ή/και στην εξέλιξη της επιληψίας. Η κορτιζόλη και άλλες ορμόνες του στρες επίσης παίζουν ρόλο και στη παιδιατρική επιληψία, όπως για παράδειγμα στους παιδικούς σπασμούς και σε μη επιληπτικές κρίσεις σε παιδιά. Ο έλεγχος των γλυκοκορτικοειδών έχει δειχθεί πως είναι αποτελεσματικός στη διαχείριση των παιδιατρικών κρίσεων. Έρευνες με τη χρήση επιληπτικών ζωικών μοντέλων έχουν δείξει τη σημασία του στρες για την επιληψία και την επιληπτογένεση. Εντούτοις, μια επισκόπηση της αντίστοιχης βιβλιογραφίας δείχνει πως τα αποτελέσματα δεν είναι συνεπή (Joëls, 2009).

Η χορήγηση κορτικοεκλυτίνης (CRH) έχει βρεθεί επανειλημένως πως επάγει κρίσεις. Οι επιδράσεις της κορτικοεκλυτίνης στη δραστηριότητα των κρίσεων μεγιστοποιήθηκαν όταν η χορήγηση της ουσίας συνδυάστηκε με μερικές μέρες προθεραπείας με το συνθετικό γλυκοκορτικοειδές δεξαμεθαζόνη. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να εξηγηθεί από τις κυτταρικές διεγερτικές επιδράσεις της κορτικοεκλυτίνης στον ιππόκαμπο. Επιπλέον όλες οι μελέτες συμφωνούν πως η δεοξυκορτικοστερόνη μέσω των μεταβολιτών της, έχει αντισπασμωδικές ιδιότητες σε νεαρά ζώα. Η τεταυδροξυκορτικοστερόνη προωθεί την αντισπασμωδική δραστηριότητα μέσω της τονικής αναστολής στην οδοντωτή έλικα. Όσον αφορά στη κορτικοστερόνη, έχει

αναφερθεί πως μια και μόνο χορήγηση, οδηγεί σε αυξημένη δραστηριότητα στη CA1 και CA3, ενώ προωθεί τη παγίωση της σχετικής με το στρεσογόνο παράγοντα πληροφορίας. Επιπλέον, έχει μελετηθεί και το ενδογενές στρες, δηλαδή το στρες που δεν προκαλείται από τη απευθείας χορήγηση των αντίστοιχων ορμονών, αλλά από την επαγωγή ενός μεμονωμένου, οξέος παράγοντα στρες, που προκαλεί την έκκριση των εν λόγω ορμονών ενδογενώς στον οργανισμό, μοντέλο που μιμείται επακριβώς τη κατάσταση του ασθενή με επιληψία, μια αρκετά στρεσογόνα κατάσταση.

Αντίστοιχες μελέτες βρήκαν πιο ήπιους σπασμούς και αυξημένο κατώφλι των κρίσεων, ακριβώς μετά από το στρες κολύμβησης. Το συγκεκριμένο έργο (forced swimming task) θεωρείται πως καταστέλλει τη δραστηριότητα των κρίσεων μέσω της ενίσχυσης της GABAεργικής αναστολής στην οδοντωτή έλικα. Συμπληρωματικά, στις μελέτες για τις επιδράσεις ενός και μοναδικού στρεσογόνου ερεθίσματος, έρχονται να προστεθούν και αυτές που εξέτεσαν την επίδραση των μακροπρόθεσμων διαταραχών του συστήματος του στρες. Το χρόνια στρες γενικά, προδιαθέτει ένα ρίσκο για την ακεραιότητα των κυττάρων του ιπποκάμπου και τη λειτουργία ούτως.

Αντίστοιχα, μακροπρόθεσμες παρεκλίσεις του συστήματος χειροτερεύουν το αποτέλεσμα σε μοντέλα επιληψία- επιληπτογένεσης. Για παράδειγμα, η παρατεταμένη κοινωνική απομόνωση στην ενηλικίωση βρέθηκε πως αυξάνει την ευαισθησία των κρίσεων και χαμηλώνει την ουδό πυροδότησής τους. Με παρόμοιο τρόπο, το περιγεννητικό στρες έχει δείχθει πως χειροτερεύει τη κατάσταση της επιληψίας στη παιδική ηλικία, και επιμένει ακόμα και στην ενηλικίωση. Μια σημαντική δηλαδή έκθεση σε στρεσογόνο ερέθισμα αυτή την ιδιαίτερα ευαίσθητη και εύθραυστη περίοδο, οδηγεί σε υπερδραστηριότητα του hpa άξονα στην ενηλικίωση, οπότε ένα ιστορικό περιγεννητικού στρες μπορεί να οδηγήσει σε έκκριση

περισσότερων ορμονών που σχετίζονται με το στρες, όταν στην ενηλικίωση βιώσει στρεσογόνες καταστάσεις (Joëls, 2009).

Συμπερασματικά, υπάρχει συμφωνία μεταξύ των ερευνητών πως το πρώιμο στρες, ή το χρόνιο ήπιο στρες στην ενηλικίωση, επιδρά στην επιληψία και την επιληπτογένεση. Οι περισσότερες μελέτες έχουν δείξει πως οι προαναφερθείσες συνθήκες αυξάνουν το ρυθμό πυροδότησης και/ή επιδεινώνουν τη νευροεκφυλιστική διαδικασία, ενώ μειώνουν την ουδό των κρίσεων (Frucht et al., 200; Joëls, 1999).

45. Two hit hypothesis

Το μοντέλο δύο πληγμάτων είναι μια θεωρία που σχηματίστηκε από τον Knudson το 1971, και προτείνει πως ο καρκίνος είναι αποτέλεσμα αθροιστικών μεταλλάξεων στο DNA. Συγκεκριμένα, μελετώντας 48 περιπτώσεις ρετινοβλαστώματος, πρότεινε πως η δεύτερη μετάλλαξη παράγει ένα μέσο όρο από τρία ρετινοβλαστώματα σε κάθε ασθενή, κληρονομώντας τους τη πρώτη μετάλλαξη. Ενδιαφέρον στοιχείο αποτελεί η παρατήρησή του πως τα δεδομένα ακολουθούν τη κατά Poisson κατανομή, στην οποία ο μέσος όρος των όγκων, m , που προκλήθηκαν από τη μεταφορά του γονιδίου, μπορεί να υπολογιστεί (Knudson, 1971). Το μοντέλο των δύο πληγμάτων βρίσκει εφαρμογή σε διάφορες συνθήκες και ασθένειες όπως αυτή της σχιζοφρένειας, όπου οι Bayer et al, πήραν την υπόθεση του Knudson και την προσαρμοσαν στο μοντέλο της σχιζοφρένειας (Bayer et al., 1999), της νόσου Alzheimer, αλλά και της επιληψίας. Για παράδειγμα έχειδειχθεί πως η εγκεφαλική βλάβη (Traumatic Brain Injury) αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την ανάπτυξη επιληψίας σε ανθρώπους. Χρησιμοποιώντας μοντέλο φλοιικής δυσπλασίας (Cortical Dysplasia) σε αρουραίους ως πρώτο πλήγμα και τη TBI ως δεύτερο, βρέθηκε πως η παρουσία μιας προεπιληπτικής παθολογίας,

αυξάνει την ανάπτυξη της επιληψίας μετά την εγκεφαλική βλάβη (Nemes et al., 2016). Από τότε μέχρι σήμερα, η εν λόγω υπόθεση έχει βρει πολλές εφαρμογές σε μοντέλα σχιζοφρένειας (Feigenson et al., 2014), αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου (Bordin et al., 2003) αλλά και επιληψίας (Hoffmann et al., 2004; Love, 2005).

Συγκεκριμένα, η Hoffmann και η ομάδα της, χώρισε τους αρουραίους της σε τέσσερις ομάδες: μια ομάδα στην οποία προκάλεσαν status epilepticus (με χλωριούχο λίθιο) τη μεταγεννητική μέρα 11, με 25 ακολουθούμενες κρίσεις (flurothyl) από τη μέρα 12 έως 16, μια δεύτερη ομάδα στην οποία προκάλεσαν SE (status epilepticus) τη μεταγεννητική μέρα 11, μια τρίτη ομάδα η οποία δέχτηκε “ψεύτικο” (sham) SE (χορηγήθηκε saline διάλυμα, αντί χλωριούχου λιθίου) ακολουθούμενο από 25 κρίσεις (flurothyl) τις μέρες 12-16, και μια τέταρτη ομάδα η οποία δέχτηκε ένα ψεύτικο SE, το οποίο δεν ακολούθησαν άλλες κρίσεις. Την μεταγεννητική μέρα 30, όλα τα ζώα δοκιμάστηκαν στον υδάτινο λαβύρινθο για έξι μέρες, ενώ μετά θυσιάστηκαν και έγινε η εξαγωγή των εγκεφάλων τους, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε ανοσοϊστοχημεία. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν πως οι αρουραίοι που είχαν υποστεί και SE και μετέπειτα κρίσεις, παρουσίασαν ελλείμματα στη δοκιμασία της οπτικής χωρικής μάθησης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα που είχε υποστεί ένα και μόνο SE, αλλά το έλλειμμα αυτό δε συνοδεύτηκε από ιστολογικές αλλοιώσεις. Το περίεργο είναι πως δεν βρήκαν διαφορές μεταξύ των αρουραίων που έλαβαν επαναλαμβανόμενες πρώιμες κρίσεις με flurothyl και των αρουραίων της ομάδας ελέγχου, καθώς προηγούμενες μελέτες της ίδιας ομάδας είχαν βρει πως οι επαναλαμβανόμενες πρώιμες κρίσεις οδηγούν σε γνωσιακά ελλείμματα και απότομη αύξηση των βρυωδών ινών στην CA3, γεγονός που η ίδια η ομάδα δικαιολογεί λόγω της χρήσης διαφορετικού strain (Sprague Dawley, έναντι Long Evans) (Hoffmann et al., 2004).

Επίσης, ο Scantlebury και οι συνεργάτες του, μελέτησαν κρίσεις προκαλούμενες από υπερθερμία σε νεαρούς αρουραίους οι οποίοι είχαν ήδη υποστεί εγκεφαλική βλάβη. Προκάλεσαν τη βλάβη στο φλοιό που καλύπτει το ραχιαίο τμήμα του ιπποκάμπου στη μεταγεννητική μέρα 1, και προκάλεσαν τις κρίσεις μετά από εννέα μέρες. Μετά τη πάροδο δύο μηνών το 36% των ζώων (4 από 11) επέδειξε επαναλαμβανόμενες συμπεριφορικές κρίσεις, που χαρακτηρίζονταν από «παγώματα» (freezing) και γνέψιμο του κεφαλιού (head nodding). Για τη καταγραφή, λήφθηκαν ηλεκτροεγκεφαλογραφήματα τη P168, ενώ ένα ηλεκτρόδιο τοποθετήθηκε πλαγιοβασικώς (basolateral) στη δεξιά αμυγδαλή. Μετά από μια περίοδο δυόμιση εβδομάδων για την ανάρρωση των ζώων, καταγράφηκαν ηλεκτροεγκεφαλογραφήματα διάρκειας 20 min καθημερινώς για 4-5 μέρες με το ψηφιακό λογισμικό Poly-View, το οποίο είχε τοποθετηθεί σε μηχάνημα καταγραφής της φυσιολογίας. Τα ζώα που έλαβαν μόνο βλάβη και τα ζώα στην ομάδα ελέγχου, είχαν φυσιολογικά ηλεκτροεγκεφαλογραφήματα. Έπειτα, μελετώντας τη συνδυαστική επίδραση της βλάβης και των κρίσεων στη μνήμη και τη μάθηση (υδάτινος λαβύρινθος), βρήκαν πως η ομάδα που είχε υποστεί και τις δύο διαδικασίες, παρουσίασε μέτριο γνωσιακό έλλειμμα, αλλά όχι απώλεια των νευρώνων του ιπποκάμπου (Scantlebury et al., 2005).

E. Εγκέφαλος

E1. Εγκεφαλικές Περιοχές προς εξέταση

E1.1) Φλοιός του προσαγωγίου (Cg1)

Ο πρόσθιος φλοιός του προσαγωγίου, σχηματίζει μια μεγάλη περιοχή κοντά στο corpus callosum η οποία θεωρείται εκτελεστική περιοχή. Έχει πολλές συνδέσεις στο

κινητικό σύστημα, αλλά από τη στιγμή που αυτές οι συνδέσεις ξεκινούν από διάφορα μέρη του πρόσθιου φλοιού του προσαγωγίου, και μιας και λειτουργικές μελέτες έχουν δείξει πως αυτές οι υποπεριοχές δεν έχουν ομοιόμορφη επίδραση στην εγκεφαλική λειτουργία, η ACC υποδιαιρείται σε περιοχές που είναι υπεύθυνες για το συναίσθημα και τη νόηση (Devinsky et al., 1995), αλλά και για οπτικοχωρικές λειτουργίες (Vogt et al., 1995). Συγκεκριμένα, οι υποπεριοχές αυτές που σχετίζονται με το συναίσθημα αφορούν στις περιοχές 25, 33 και εν μέρει τη περιοχή 24 κατά Brodmann, και έχει συνδέσεις με την αμυγδαλή και τη περιυδραγωγό ουσία (periaqueductal grey), ενώ άλλα μέρη του συνδέονται με τους κινητικούς πυρήνες. Εκτός από τις ρυθμίσεις του αυτόνομου συστήματος και τις ενδοκρινικές λειτουργίες, εμπλέκεται και στην εξαρτημένη συναισθηματική μάθηση, στην απόδοση συναισθηματικού σθένους (valence) σε εσωτερικά και εξωτερικά ερεθίσματα, και τις αλληλεπιδράσεις μητέρας και παιδιού. Οι νοητικές περιοχές περιλαμβάνουν τις οπίσθιες περιοχές 24 και 32, τις προσαγωγίες κινητικές περιοχές στην προσαγωγή αύλακα και τον φλοιό που σχετίζεται με την αίσθηση του πόνου (noniceptive cortex, αλγοαισθητικός φλοιός) (Devinsky et al., 1995). Η περιοχή ολόκληρη του προσαγωγίου αποτελεί σημαντική δομή του μεταιχμιακού συστήματος και έχει προβολές στον θάλαμο και τα βασικά γάγγλια, ενώ θεωρείται η σημαντικότερη δομή του λιμβικού συστήματος, βάση της θεώρησης του Broca για το «μεγάλο μεταιχμιακό λοβό», (νευρωνικά δίκτυα για τις συναισθηματικές εμπειρίες -Papez δίκτυο), και της θεώρησης του Maclean για το ρόλο της στην οικογένεια και τη κοινωνική αλληλεπίδραση (Vogt et al., 1992).

E1 u) Πρωτοταγής κινητικός φλοιός (M1)

Ο πρωτοταγής κινητικός φλοιός βρίσκεται στο εμπρόσθιο τμήμα της προκεντρικής αύλακας, ενώ βασικός του ρόλος είναι ο έλεγχος των κινήσεων (Tomasino & Gremese, 2016). Εντούτοις, εδώ και χρόνια, έχει δειχθεί μέσα από μελέτες, πως ο

ρόλος του κινητικού φλοιού δε περιορίζεται στον κινητικό έλεγχο του σώματος, αλλά εκτείνεται και σε οπτικοκινητικές διεργασίες και τη νοητική απεικόνιση. Επίσης έχει δειχθεί πως ενεργοποιείται κατά τη διάρκεια της μνημονικής ανάκλησης αισθητικών πληροφοριών, έυρημα που υπονοεί πως ο M1 εμπλέκεται σε μνημονικές διαδικασίες. Επίσης φάνεται πως παίζει ρόλο σε ανώτερες γνωσιακές λειτουργίες καθώς και σε συναισθηματικές διαδικασίες, ενώ φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ αισθητικοκινητικής ενεργοποίησης και αισθηματικής επεξεργασίας (Leute et al., 2017).

Υπάρχουν ενδείξεις πως ο ρόλος του κινητικού φλοιού δε περιορίζεται μόνο στην ακούσια κίνηση, αλλά εμπλέκεται και σε ανώτερες κινητικές λειτουργίες. Οι Karni et al αναφέρουν πως η επίδοση σε διάφορες δοκιμασίες μπορεί να βελτιωθεί μέσω της εξάσκησης και της εμπειρίας (Karni et al., 1998). Η ομάδα του Aizawa προτείνει πως μια λειτουργική επαναδιοργάνωση των αναπαραστάσεων του αισθητικού και του κινητικού φλοιού έχει παρατηρηθεί σε διάφορα ζωικά μοντέλα για τη πλαστικότητα (Aizawa et al., 1991). Αυτές οι αναπαραστασιακές αλλαγές φαίνεται να λαμβάνουν χώρα όχι μόνο ως απόκριση σε βλάβες στο κινητικό μονοπάτι αλλά και ως αποτέλεσμα της εξάσκησης και της εμπειρίας (Karni et al., 1998). Η μελέτη τους έδειξε πως ο εγκέφαλος των θηλαστικών είναι ένα δυναμικό όργανο, με την ικανότητα να προσαρμόζεται τόσο δομικά, όσο και λειτουργικά προκειμένου να ανταπεξέλθει στις εκάστοτε απαιτήσεις συν τω χρόνω. Αυτή η πλαστικότητα έχει βρεθεί στον εγκεφαλικό φλοιό, όπου η συμπεριφορική εκμάθηση προκαλεί αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων, τη σύνθεση των πρωτεϊνών και τη δομή των νευρώνων (Kleim et al., 1996; Hyden & Lange, 1983, Kleim et al., 2002). Μελέτη του 2002, έδειξε πως η συναπτογένεση που προκαλείται από τη μάθηση και η λειτουργική αναδιοργάνωση, συμπίπτει στο χώρο σε περιοχές του φλοιού που ρυθμίζουν τη

συμπεριφορά της μάθησης. Επιπλέον, έδειξε την ύπαρξη αλλαγών στα φλοιικά κυκλώματα μέσω της δημιουργίας συνάψεων, ενώ βρήκαν πως η λειτουργική αναδιοργάνωση του κινητικού φλοιού που αντιστοιχεί στα άκρα, λαμβάνει χώρα όταν οι κινήσεις των άκρων αναπτύσσονται και γίνονται επιδέξιες, και όχι απλά ως απόκριση σε αυξημένη τους χρήση (Kleim et al., 2002).

E1 ι) Σωματαιοσθητικός φλοιός (S1BF)

Ο S1BF είναι μια περιοχή του σωματαιοσθητικού φλοιού των τρωκτικών, η οποία ενδείκνυται για τη μελέτη της επεξεργασίας αισθητικών πληροφοριών, την οργάνωση των κυκλωμάτων και τη φλοιική πλαστικότητα (Fox, 2002; Brecht, 2007; Diamond et al., 2008). Ο S1BF (barrel cortex) επεξεργάζεται κυρίως απτικά ερεθίσματα από το πρόσωπο και κυρίως από τα μουστάκια του τρωκτικού, και προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα για τη μελέτη της πλαστικότητας. Παρουσιάζει μια δομή κατά στήλες (columnar structure) που είναι εύκολο να οριστεί τόσο λειτουργικά όσο και να παρατηρηθεί οπτικά μέσω του ανοσοϊστοχημικού φθορισμού (Fox, 2002). Μια στήλη στον S1BF αποτελείται από περίπου δέκα τμήματα: δύο μονοπάτια για εισερχόμενες πληροφορίες από τον θάλαμο, ένα αισθητικό- λεμνισικό, και ένα αισθητικοκινητικό παραλεμνισιακό. Αυτά τα μονοπάτια, οδηγούν σε περίπου επτά outputs, καθένα από τα οποία έχουν διακριτά χωροχρονικά χαρακτηριστικά ως προς την απόκριση (Brecht, 2002). Να σημειωθεί πως ο S1BF αποτελεί τη πρώτη περιοχή στην οποία προκλήθηκαν οι γάμμα ταλαντώσεις μέσω της οπτογενετικής ενεργοποίησης των PV+ κυττάρων, των κυττάρων δηλαδή που εκφράζουν τη πρωτεϊνη παρβαλβουμίνη (Vinck et al., 2015).

E2. Κύτταρικοί πληθυσμοί

E2. i) PV κύτταρα

Η παρβαλβουμίνη είναι μια πρωτεΐνη που προσδένεται στο ασβέστιο (Caillard et al., 2000), είναι διάσπαρτη στο κεντρικό νευρικό σύστημα και στον εγκέφαλο, και παίζει ρόλο στη φυσιολογία του, απομονώνοντας το ενδοκυτταρικό ασβέστιο (Uesugi et al., 1992). Στον φλοιό των αρουραίων, η παρβαλβουμίνη φαίνεται να υπάρχει σε όλους τους GABAεργικούς, ανασταλτικούς ενδονευρώνες καθώς και στον πρωταρχικό οπτικό φλοιό των πιθήκων (Hendry et al., 1989), ενώ έχει συνδεθεί και με τους ενδοκρινείς αδένες (Endo et al., 1985).

Χρησιμοποιείται σαν μοριακός δείκτης για διάφορους τύπους νευρώνων (Heizmann & Braun, 1992), στα οποία η παρουσία της παρβαλβουμίνης προσδίδει υψηλή φυσιολογική δραστηριότητα και ρυθμούς πυροδότησης (Heizmann & Berchtold, 1987). Στον εγκέφαλο των θηλαστικών, βρίσκεται αποκλειστικά σε υποπληθυσμούς GABAεργικών και τοπικού δικτύου νευρώνων, ενώ ανοσοϊστοχημικές μελέτες έχουν δείξει πως αυτός ο υποπληθυσμός αποτελείται κυρίως από τα basket και τα chandellier κύτταρα (De Lecea & Soriano, 1995). Η ανοσοϊστοχημεία για τη παρβαλβουμίνη, βάφει τα σώματα, τους δενδρίτες και τους άξονες συγκεκριμένων κυττάρων με τέτοιο τρόπο ώστε τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των ανοσοαποκρινόμενων νευρώνων, μπορούν να παρατηρηθούν και να ταυτοποιηθούν, ενώ η πλειονότητα των PV+ κυττάρων είναι μη πυραμιδικοί νευρώνες (De Felipe, 1997).

Η συσχέτισή της τόσο με τους GABAεργικούς νευρώνες, όσο και με τους ενδοκρινείς αδένες, είναι σημαντική για τη μελέτη των κρίσεων αλλά και της επίδρασης του στρες.

E2. ii) Περινευρωνικά δίκτυα

Τα περινευρωνικά δίκτυα (PNNs), είναι μια εξειδικευμένη μορφή εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (extracellular matrix), και πρωτοπεριγράφηκαν από τον Golgi και τον Cajal (Morawski et al., 2004). Συντίθενται από αρκετά μόρια, μεταξύ των οποίων βρίσκεται το υαλουρονικό, η τενασκίνη R και πρωτεΐνες. Τα περινευρωνικά δίκτυα φαίνεται να παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της πλαστικότητας. Στα τρωκτικά, σχηματίζονται γύρω από τους νευρώνες μετά τις πρώτες 3-5 εβδομάδες της ανάπτυξης (Carulli et al., 2006).

Πέρα από το ρόλο τους στη πλαστικότητα, έχει προταθεί και ο πολυϊοντικός τους χαρακτήρας. Οι γλυκοζαμινογλυκανικές αλυσίδες των περινευρωνικών δικτύων προσδίδουν υψηλή τάση στις δομές στο μικροπεριβάλλον των νευρώνων που μπορεί να εμπλέκεται στην ιοντική ομοιόσταση. Μπορούν δυνητικά να λειτουργούν ως ενδιάμεσο σύστημα για σχετικά ιόντα όπως το ασβέστιο και το νάτριο, γύρω από υψηλής δραστηριότητας νευρώνες. Εντούτοις, αυτή η πολυϊοντική δράση, μπορεί να αλληλεπιδρά με ιόντα που εμπλέκονται στο οξειδωτικό στρες, όπως είναι ο σίδηρος (Morawski et al., 2004). Έχει δείχθει πως στο Alzheimer, οι περιοχές που είχαν μεγάλο αριθμό Pnns, είναι λιγότερο προσβεβλημένες από νευροϊνιδική εκφύλιση (Brückner et al., 1999). Πιθανολογείται λοιπόν η μείωση ή η εξουδετέρωση των βλαβερών συνεπειών του στρες στο νευρωνικό μικροπεριβάλλον, προστατεύοντας τους νευρώνες.

E2 iii) Συνεντοπισμένα κύτταρα (Colocalized)

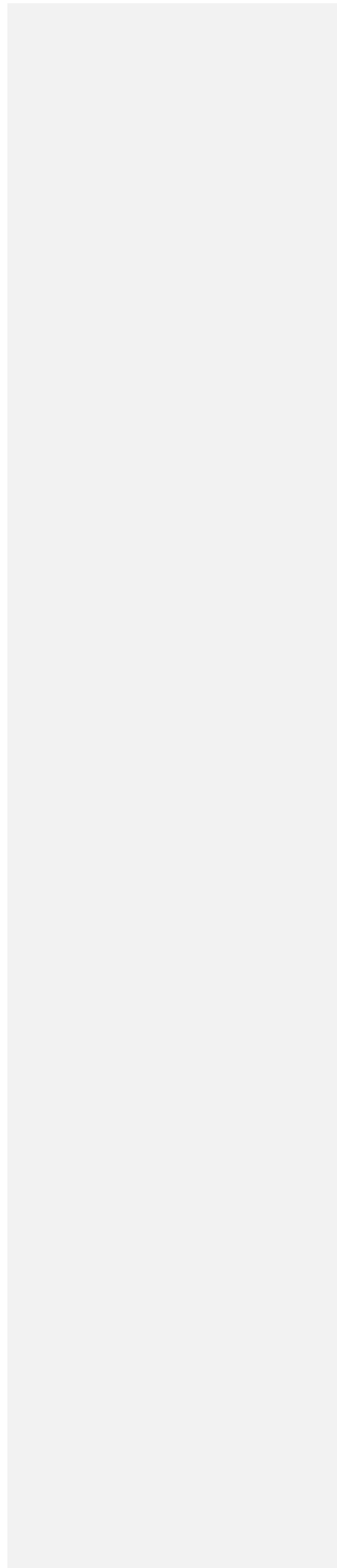
Colocalization (συντοπισμός) λέγεται το φαινόμενο κατά το οποίο δύο ανοσοσημασμένα αντισώματα αλληλοεπικαλύπτονται στο χώρο (Dunn et al., 2011). Καθένα από αυτά εκπέμπει σε διαφορετικό μήκος κύματος και έτσι μπορεί να

καταστεί εμφανές αν δύο διαφορετικοί στόχοι βρίσκονται στο ίδιο σημείο. Ο συλλογισμός πίσω από τον λόγο για τον οποίο μελετάμε τον συντοπισμό έχει να κάνει με τη συσχέτιση, καθώς μια στατιστική σχέση μεταξύ των δύο φθοριόντων στόχων, μπορεί να υποδεικνύει βιολογική συσχέτιση. Στον νεοφλοιό, τα PV+ κύτταρα ωρομάζουν παράλληλα με τη συνάθροιση των PNNs στο τέλος της μεταγεννητικής ανάπτυξης, όταν η κρίσιμη περίοδος πλησιάζει στο τέλος της (Ye & Miao., 2013). Ταυτόχρονα, τα PV+ κύτταρα θεωρούνται ως ρυθμιστές της ευπλαστότητας τόσο κατά τη περίοδο της ανάπτυξης, όσο και στην ενηλικίωση (Donato et al., 2013). Από την άλλη πλευρά, τα PNNs πιθανώς να υποστηρίζουν την υψηλή δραστηριότητα των PV+ κυττάρων μέσω της ιοντικής ρύθμισης, καθώς και μέσω του ρόλου τους στην πλαστικότητα (Lensjø et al., 2017). Τα PNNs λοιπόν δύναται να εμποδίζουν τη πλαστικότητα είτε έμμεσα μέσω της επίδρασής τους στα PV+ κύτταρα, είτε με πιο άμεσο τρόπο, λειτουργώντας ως δομικός φραγμός που αναστέλει τη συναπτική αναδιοργάνωση. Ταυτόχρονα έχει δειχθεί πως η αφαίρεση των PNNs ανζυματικά σε ενήλικα ζώα. Αυξάνει την πλαστικότητα σε μερικές εγκεφαλικές περιοχές όπως ο υπόκαμπος (Hylin et al., 2013) και στην αμυγδαλή (Gogolla et al 2009). Λαμβάνοντας υπόψη μας αυτές τις μελέτες, είναι δόκιμο να υποστηρίξουμε πως η λειτουργία των PNNs είναι συνδεδεμένη με αυτή των PV+ κυττάρων. Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί πως το μετρήσιμο colocalization και η πραγματική του τιμή μπορεί να διαφέρουν, κυρίως λόγω ποιότητας εικόνας, καθώς θα πρέπει να είναι αρκετά υψηλής ποιότητας και ευκρίνειας. Κοινώς όσο η ποιότητα των εικόνων ανεβαίνει, η colocalized μέτρηση προσεγγίζει περισσότερο την πραγματική τιμή (Adler et al., 2008).

ΣΤ. Σκοπός αυτής της εργασίας

Εξετάζοντας τη πρότερη βιβλιογραφία, η συγκεκριμένη έρευνα έχει σκοπό να μελετήσει τις επιδράσεις των πρώιμων επιληπτικών κρίσεων σε σύζευξη με περιφηβικό στρες, τόσο στη συμπεριφορά, όσο και στη κυτατροαρχιτεκτονική του εγκεφάλου. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν μυες, οι οποίοι χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες ζώων: μια που έλαβε μια κρίση και έκθεση σε πρωτόκολο στρες, μια που έλαβε μόνο μια κρίση, μια που εκτέθηκε στο πρωτόκολο του στρες, και μια που αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου. Για την επαγωγή κρίσης επιλέχθηκε η ουσία πεντυλοτετραζόλη (PTZ) λόγω των πλεονεκτημάτων που προσφέρει και τα οποία αναλύθηκαν πρωτύτερα, ενώ η χορήγησή της έγινε μια φορά, ενδοπεριτονιακώς, τη μεταγεννητική μέρα P24. Στη συνέχεια, στην εφηβεία (P33-50), ακολούθησε η επαγωγή στρες, ακολουθώντας ένα πρωτόκολο που περιελάμβανε στρεσογόνα ερεθίσματα όπως κλωβό σε κλίση, στρες περιορισμού, εξαναγκασμένη κολύμβηση, κοινωνικό στρες, υπερυψωμένη πλατφόρμα, αποστέρηση τροφής και νερού για ένα βράδυ και βρεγμένη στρωμνή. Όταν τα ζώα έφτασαν στην ενηλικίωση, εξετάστηκαν σε συμπεριφορικά τεστ όπως η δημιουργία φωλιάς, το ανοιχτό πεδίο, το θάμνο βόλων, ο υπερυψωμένος λαβύρινθος, ο περιστρεφόμενος κύλινδρος, η κοινωνικότητα και η προτίμηση για νέο κοινωνικό περιβάλλον και η δοκιμασία αναγώρισης αντικειμένου.

Για τη μελέτη της δομής του εγκεφάλου, χρησιμοποιήθηκαν εγκέφαλοι που ανήκαν σε αυτές τις ομάδες, με τη μόνη διαφορά πως είχαν λάβει πολλαπλές ενέσεις (4), σε ακόμα πιο πρώιμη ηλικία (10-15 do). Οι εγκέφαλοι αυτοί υποβλήθηκαν σε ανοσοϊστοχημεία, και μελετήθηκαν οι περιοχές cgl, M1 και S1BF, ως προς τους νευρώνες που εκφράζουν τη παρβαλβουμίνη, τα περινευρωνικά δίκτυα αλλά και την αλληλοεπικάλυψή τους στον χώρο (colocalized), μέσω του προγράμματος stereology.



II. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Z. Ζώα

Για το εν λόγω πείραμα, χρησιμοποιήθηκαν 32 αρσενικοί επίμυες τύπου C57BL/6J (wildtype). Θηλυκά ζώα αποκλείστηκαν από το πείραμα για να εξασφαλιστεί πως το στρες που θα προκληθεί θα είναι λόγω του πρωτοκόλου και όχι λόγω του ορμονικού τους κύκλου. Ως ημέρα γέννησης ορίστηκε η μεταγεννητική ημέρα P0, ενώ ο απογαλακτισμός έλαβε χώρα τη μέρα P27. Όλα τα ζώα στεγάζονταν στο Ιδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ) και διέμεναν σε κλωβούς από πολυσουλφόνιο, διαστάσεων 365x207x185. Αντί για πριονίδι, οι κλωβοί περιείχαν στρωμή τύπου corncob. Η θερμοκρασία της εγκατάστασης ήταν σταθερή στους 25 βαθμούς κελσίου (± 2), ενώ η υγρασία της ατμόσφαιρας ήταν επίσης σταθερή στο 55% (± 10). Οι συνθήκες φωτισμού ήταν σταθερές με 12 ώρες φωτός και 12 ώρες σκότους. Τα ζώα είχαν έλευθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό (ad libitum). Όλες οι διαδικασίες, τόσο του πειράματος όσο και του απλού χειρισμού, έλαβαν χώρα σύμφωνα με τον οδηγό για τη φροντίδα και τη χρήση πειραματικών ζώων (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals - Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals Institute for Laboratory Animal Research Division on Earth and Life Studies) (National Research Council, 2010).

H.Επαγωγή κρίσεων

Στο πρώτο μέρος σκοπός μας ήταν να μελετήσουμε την επίδραση μιας πρώιμης επιληπτικής κρίσης στη συμπεριφορά των ενήλικών ζώων. Για το λόγο αυτό έγινε χρήση της ουσίας πεντυλεντετραζόλης (PTZ), ουσία που αποτελεί ανταγωνιστή στον GABA_A υποδοχέων, και η οποία χορηγήθηκε ενδοπεριτονιακώς. Τα ζώα που

συμμετείχαν συνολικά στο πείραμα ήταν 32 και χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες: μια ομάδα έλαβε επιληπτική κρίση με PTZ και πρωτόκολο στρες (N=8), μια ομάδα που έλαβε μόνο μια επιληπτική κρίση, χωρίς να υποστεί το πρωτόκολο στρες (N=8), μια ομάδα που έλαβε μόνο στρες (N=7), και μια ομάδα που αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου και δεν υπέστη καμία πειραματική διαδικασία.

Η επαγωγή της κρίσης συνέβη τη μεταγεννητική μέρα P24 και προκειμένου να θεωρηθεί πως το ζώο μπήκε σε επιληπτική κρίση, λάβαμε σαν κριτήριο το άρθρο των Lüttjohann et al., 2009, που περιγράφει τα στάδια των κρίσεων. Για να θεωρήσουμε πως ένα ζώο υπέστη επιληπτική κρίση, έπρεπε να μπει στο στάδιο 6 και να παραμείνει για 15 λεπτά. Για την επαγωγή των κρίσεων χρησιμοποιήθηκε πυκνό διάλυμα PTZ (10mg/ml), ενώ στα control ζώα έγιναν ενέσεις με φυσιολογικό ορό και αριθμό ενέσεων ίσο με αυτών των ζώων που έλαβαν PTZ. Σε περιπτώσεις που δεν έλαβε χώρα κάποια κρίση, εντός 15 λεπτών από τη χορήγηση PTZ, χορηγήθηκε συμπληρωματική δόση, με πιο αραιό διάλυμα, πυκνότητας 2mg/ml. Η δόση που χορηγήθηκε ήταν ανάλογη του βάρους του ζώου, με αντιστοιχία 90mg/kg. Πριν τη χορήγηση των κρίσεων, κάθε ζώο ζυγίστηκε και μαρκαρίστηκε ώστε να γνωρίζουμε σε ποιά ομάδα ανήκει. Μετά την πάροδο της κρίσης, κάθε ζώο παρέμεινε σε κλωβό από plexiglass μέχρι να ηρεμήσει, για περίπου 40 min.

Θ.Επαγωγή στρες

Για την επαγωγή στρες, χρησιμοποιήθηκε ένα πρωτόκολο το οποίο αποτελούνταν από επτά στρεσογόνους παράγοντες, οι οποίοι εισήχθησαν σειριακώς, κατά τις μεταγεννητικές ημέρες 33- 50. Οι περισσότεροι παράγοντες διεξήχθησαν χωρίς ημερήσια κενά, με εξαίρεση να αποτελεί το κοινωνικό άγχος το οποίο έλαβε χώρα τη P34, τη P36, τη P43 και τη P50. Όλες οι στρεσογόνες διαδικασίες, διεξήχθησαν σε

σταθερή θερμοκρασία (23 βαθμοί κελσίου), κατά το 12ωρο που τα ζώα βρίσκονταν σε φως, εκτός δύο δοκιμασιών όπου έλαβαν χώρα κατά τη περίοδο της νύχτας. Τα επίπεδα φωτισμού ήταν επίσης σταθερά. Τα ζώα που δεν επρόκειτο να υποστούν το πρωτόκολο του στρες, υπόκειντο σε ελαφρύ χειρισμό εκ μέρους του πειραματιστή (handling), διάρκειας λίγων δευτερολέπτων, όπου το ζώο αφήνονταν να εξερευνηήσει τη παλάμη του πειραματιστή.

Το πρώτο στεσογόνο ερέθισμα ήταν αυτό της ανυψωμένης πλατφόρμας (elevated platform), τη μεταγεννητική ημέρα P33, ενώ η διαδικασία είχε διάρκεια 25 λεπτά. Η πλατφόρμα αποτελούνταν από μια ορθογώνια κατασκευή από MDF, με διαστάσεις 10x10, και ύψος 85cm. Η διαδικασία περιελάμβανε τη τοποθέτηση του ζώου στο κέντρο, ενώ αφήθηκε ελεύθερο να εξερευνηήσει (Avital & Richter-Levin, 2005). Μετά το πέρας της δοκιμασίας για κάθε ζώο, η πλατφόρμα καθαριζόταν με αντισηπτικό με ποσοστό 70% αιθανόλης προκειμένου να τοποθετηθεί το επόμενο ζώο.

Το δεύτερο στρεσογόνο ερέθισμα, ήταν αυτό του κοινωνικού στρες (social stress, resident-intruder paradigm), το οποίο έλαβε χώρα σε τέσσερις μέρες, ενώ υπήρχαν κενές μέρες μεταξύ τους (P34- P36- P43- P50). Στη συγκεκριμένη δοκιμασία, χρησιμοποιήθηκαν ως residents αρσενικά ποντίκια, ηλικίας 7 μηνών. Πριν τη δοκιμασία, οι residents, είχαν τοποθετηθεί στους κλωβούς τους με θηλυκά ζώα, για μια εβδομάδα πριν τη δοκιμασία, ώστε να αυξηθεί το αίτημα κατοχής του χώρου (territoriality) και ταυτόχρονα να αποφευχθεί η κοινωνική απομόνωση, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη ευζωία και διαφορετική κοινωνική συμπεριφορά. Μισή ώρα πριν την έναρξη της δοκιμασίας αφήσαμε τον resident μόνο στον κλωβό, απομακρύνοντας τα θηλυκά και τυχόν pups που υπήρχαν. Κάθε ζώο που ανήκε στη πειραματική ομάδα εισερχόταν στον κλωβό με τον resident και καθόταν για 10 min (Koolhaas et al., 2013). Το συγκεκριμένο στρεσογόνο ερέθισμα βασίζεται στο άγχος

και στο στρες που θα νιώσει ο πειραματικός μυς σε απόκριση της επιθετικής συμπεριφοράς που θα λάβει από τον resident, καθώς ο πρώτος εισβάλλει στην περιοχή του τελευταίου.

Ο τρίτος στρεσογόνος παράγοντας ήταν αυτός του κλωβού σε κλίση, τη P35. Ο κλωβός με την ομάδα του στρες τοποθετήθηκε σε κλίση περίπου 23 μοιρών, ενώ η θέση του νερού βρισκόταν στη κάτω μεριά. Η δοκιμασία διήρκησε 2 ώρες και τα ζώα είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό (ad libitum).

Τέταρτο στη σειρά, στρεσογόνο ερέθισμα ήταν αυτό της εξαναγκασμένης κολύμβησης (forced swimming task), τη P37. Χρησιμοποιήθηκε ένας ακρυλικός κύλινδρος, ύψους 47 cm και διαμέτρου 19cm, ο οποίος γέμισε με νερό θερμοκρασίας 23 βαθμών κελσίου περίπου, ενώ το νερό έφτανε σε ύψος τα 30cm. Κάθε ζώο αφέθηκε ελεύθερα να κολυμπήσει για ένα διάστημα 10min. Στο τέλος της δοκιμασίας, ο μυς στεγνώνονταν και τοποθετούνταν σε κλωβό ο οποίος είχε τοποθετηθεί σε μια θερμοφόρα με σκοπό το ζώο να στεγνώσει και να ζεσταθεί.

Έπειτα, ως στρεσογόνο ερέθισμα, ακολούθησε η αποστέρηση τροφής και νερού, τα οποία αφαιρέθηκαν από το κλουβί το απόγευμα (16.30) και τοποθετήθηκαν ξανά στη θέση τους το πρωί της επόμενης μέρας (17 ώρες), τη μεταγεννητική μέρα P37.

Μετά, σειρά είχε το στρεσογόνο ερέθισμα της βρεγμένης στρωμνής (wet bedding material) καθολη τη διάρκεια της νύχτας. Συγκεκριμένα, προστέθηκαν 350ml νερού στην υπάρχουσα στρωμνή του κλωβού με τα ζώα που υπόκειντο στο πρωτόκολο του στρες, ενώ υπήρχε ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό. Η στρωμνή άλλαξε την επόμενη μέρα το πρωί, μετά τη πάροδο 17 ωρών.

Τέλος, έλαβε χώρα το στρες περιορισμού (restraint), τη μεταγεννητική μέρα P41.

Ήταν μεν ο τελευταίος στρεσογόνος παράγοντας που εφαρμόστηκε, αλλά θα ήταν

δόκιμο να θυμίσουμε πως το στρες κοινωνικότητας, έλαβε τέλος τη P50. Κατά την εν λόγω εφαρμογή στρες, κάθε ζώο τοποθετήθηκε σε έναν ακρυλικό κυλίνδρο, ο οποίος διέθετε οπές προκειμένου το ζώο να έχει πρόσβαση σε επαρκή αέρα, και παρέμεινε σε αυτόν για 30min.

Ακολουθεί μια σύνοψη των στρεσογόνων παραγόντων που εφαρμόστηκαν, καθώς και οι μέρες στις οποίες αυτοί έλαβαν χώρα, σε μοεφή πίνακα.

Στρεσογόνος παράγοντας	Μεταγεννητική μέρα εφαρμογής
Ανυψωμένη πλατφόρμα	P.33
Κοινωνικό άγχος	P. 34- P.36- P.43- P.50
Κεκλιμένος κλωβός	P.35
Εξαναγκασμένη κολύμβηση	P.37
Αποστέρηση τροφής και νερού	P.37
Βρεγμένη στρωμή	P.39
Στρες περιορισμού	P.40

1.Πειράματα συμπεριφοράς

Τα ζώα έλαβαν μια ενδοπεριτονική ένεση PTZ τη P24, ενώ μετά, κατά τη διάρκεια της εφηβείας τους, υποβλήθηκαν στο πρωτόκολο στρες που περιγράφηκε πριν λίγο. Στη συνέχεια, αφέθηκαν να μεγαλώσουν και όταν έφτασαν στην ενηλικίωση (P96-P113), υποβλήθηκαν σε μια σειρά από τεστ, προκειμένου να διαπιστωθούν οι κοινωνικές τους δεξιότητες, η ικανότητά τους να εξερευνούν, το άγχος τους, και γνωσιακές διεργασίες όπως αυτές της μνήμης και της μάθησης. Τα συμπεριφορικά

αυτά τεστ περιελάμβαναν τη κατασκευή φωλιάς (nesting), το θάψιμο των βόλων (marble burying), τη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (openfield), τον υπερυψωμένο λαβύρινθο (elevated plus maze- EPM), τη κοινωνικότητα (sociability), τον περιστρεφόμενο κύλινδρο (rotarod) και την αναγνώριση νέου αντικειμένου (Novel Object Recognition- NORT). Επιπλέον αξιολογήθηκαν και τα νευρολογικά αντανακλαστικά των ζώων.

Όλες οι συμπεριφορικές διαδικασίες διεξήχθησαν σε σταθερή θερμοκρασία, υγρασία και φωτισμό όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα. Εξάιρεση αποτέλεσε η δοκιμασία κατασκευής φωλιάς (nesting) η οποία έλαβε χώρα κατά τη περίοδο σκότους. Πριν τη διεξαγωγή των δοκιμασιών, τα ζώα υποβάλλονταν για λίγες μέρες σε μια διαδικασία εξοικείωσης με τον πειραματιστή, προκειμένου να αποφευχθεί το ενδεχόμενο άγχος της επαφής τους, και για να μην επάρχουν οι αντίστοιχες επιπτώσεις στα αποτελέσματα. Η εν λόγω διαδικασία, περιελάμβανε ήπιο χειρισμό (handling), κατά τον οποίο το ζώο αφηνόταν στη παλάμη του πειραματιστή για μερικά δευτερόλεπτα, ελεύθερο να εξερευνήσει και να οσμιστεί. Τέλος, να σημειωθεί πως πριν τη διεξαγωγή κάθε δοκιμασίας, τα ζώα αφήνονταν για μισή ώρα στο χώρο όπου θα λάμβανε χώρα η δοκιμασία, έτσι ώστε να εξοικειωθούν με τον χώρο (habituation) και να αποβάλλουν τυχόν άγχος το οποίο θα προέκυπτε από την αλλαγή περιβάλλοντος.

1.1.Κατασκευή φωλιάς (nesting)

Η εν λόγω δοκιμασία, έλαβε χώρα τη P96, κατά τη διάρκεια της νύχτας. Κάθε ζώο μεταφέρθηκε σε ξεχωριστό κλωβό και μια ώρα πριν την έναρξη της σκοτεινής περιόδου, τοποθετήθηκαν πέντε κομμάτια πεπιεμένου βαμβακιού (nestlets), διαστάσεων 4X5cm, και συνολικού βάρους 2gr. Το ζώο αφέθηκε να αλληλεπιδράσει

με το υλικό φωλεασμού και να δημιουργήσει τη φωλιά του. Την επόμενη μέρα, αξιολογήθηκε η ικανότητα κατασκευής φωλιάς μέσω της αξιολόγησης της ίδιας της φωλιάς ενώ μετρήθηκε και το υλικό που είχε παραμείνει ακέραιο και ανεπηρέαστο από το ζώο (ζύγισμα).

Για την αξιολόγηση της φωλιάς, χρησιμοποιήθηκε το άρθρο των Hess et al (Hess et al., 2008), ενώ η αξιολόγηση έγινε από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές, «τυφλούς» στη βαθμολογία του άλλου, καθώς η κρίση του καθενός μπορεί να είναι υποκειμενική. Σύμφωνα με το εν λόγω άρθρο η βαθμολογία γίνεται ως εξής: όταν το υλικό φωλεασμού δεν έχει κινηθεί, δεν υπάρχουν σημάδια αλληλεπίδρασης με το ζώο, παίρνει βαθμολογία 0 (undisturbed). Αν φαίνεται πως έχει υπάρξει αλληλεπίδραση (μάσημα, να έχει σκορπιτσει γύρω γύρω στον κλωβό κλπ) αλλά δεν έχει δημιουργηθεί φωλιά, δίνεται ο αριθμός 1 (disturbed). Σε περίπτωση επίπεδης φωλιάς, δηλαδή σε περίπτωση όπου το υλικό φωλεασμού έχει μαζευτεί σε ένα σημείο του κλωβού, με ξεκάθαρη καμπύλη στο εσωτερικό ή ανάμεσα στο υλικό και το τοίχωμα του κλωβού, ή με μισοτελειωμένα ή και καθόλου τοιχώματα, δίνεται ο βαθμός 2 (flat nest). Από εκεί και πέρα, δίνεται επιπλέον βαθμός της τάξεως του 0.25 για κάθε παραπάνω στοιχείο. Δηλαδή, αν σε μια επίπεδη φωλιά με μια πλευρά που είναι λιγότερη από το ήμισυ μιας σφαίρας, παίρνει βαθμολογία 2.25. Σε μια επίπεδη φωλιά με δύο πλευρές που είναι λιγότερες από το ήμισυ μιας σφαίρας, δίνεται ο βαθμός 2.50, ενώ σε φωλιά με τρεις πλευρές μικρότερες από το ήμισυ μιας σφαίρας, δίνεται ο βαθμός 2.75. Στη περίπτωση που το υλικό φωλεασμού έχει μαζευτεί με τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματίζει φωλιά, με ευδιάκριτα τείχη που σχηματίζουν κύπελο με τρόπο ώστε τα τείχη δεν φτάνουν το πιο πλατύ σημείο μιας νοητής σφαίρας, δίνεται ο βαθμός 3. Από εκεί και πέρα, δίνεται επιπλέον βαθμός της τάξεως του 0.25 για κάθε πλευρά που έχει ύψος ίσο με το μισό μιας σφαίρας (μια πλευρά

+0.25, δύο πλευρές +0.50, τρεις πλευρές +0.75. Για φωλιά με σχήμα ημιτελούς θόλου (incomplete dome), δηλαδή όταν το υλικό έχει σχηματίσει φωλιά στη μια πλευρά του κλωβού, με τείχη που φτάνουν το ήμισυ μιας νοητής σφαίρας η οποία χωράει μέσα στη φωλιά, παίρνει το βαθμό 4. Επιλέον, όπως και πριν, προστίθεται 0.25 βαθμός για κάθε πλευρά που είναι υψηλότερη από το ήμισυ μιας σφαίρας. Τέλος, η άριστη βαθμολογία 5 δίνεται στις περιπτώσεις όπου το υλικό έχει σχηματίσει έναν ολοκληρωμένο θόλο (complete dome), με τείχη που έχουν περικλείσει τη φωλιά και μια μικρή έξοδο στη κορυφή ή στο πλάι της φωλιάς (Hess et al., 2008).

Στη συγκεκριμένη δοκιμασία αξιολογείται η ικανότητα κατασκευής φωλιάς.

Σύμφωνα με το άρθρο των Hess και της ομάδας του, η κατασκευή φωλιάς αποτελεί μια συμπεριφορά απαραίτητη για την επιβίωση του ζώου, και είναι ένα εγγενές χαρακτηριστικό, καθώς απαντάται τόσο στα θηλυκά εγκυμονούντα ζώα, όσο και στα αρσενικά, αλλά και τα θηλυκά που δεν βρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης.

Σημειώνουν παράλληλα πως τα θηλυκά εγκυμονούντα, φτιάχνουν τις πιο πολύπλοκες φωλιές. Η κατασκευή φωλιάς δίνει καταφύγιο στα ζώα από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, καθώς και από αρπακτικά, αλλά ταυτόχρονα λειτουργεί και ως αντιμετώπιση ακραίων θερμοκρασιών (Hess et al., 2008).

1.2.Θάψιμο βόλων (marble burying)

Την επόμενη μέρα, έλαβε χώρα η δοκιμασία θαψίματος βόλων (marble burying).

Κατά τη διάρκεια αυτής της δοκιμασίας, ο κλωβός καλύφθηκε με στρωμή πάχους 3,5 cm, ενώ η επιφάνειά της λειάνθηκε ώστε να είναι επίπεδη. Μέσα στον κλωβό τοποθετήθηκαν 21 βόλοι, με διάμετρο 21mm και σε διάταξη 3x7με 4 cm απόσταση μεταξύ τους. Αφου τοποθετήθηκε το κάθε ζώο μέσα στο κλωβό, αυτός καλύφθηκε με διάφανη, παλστική μεμβράνη ώστε να αποφευχθεί η έξοδος του ζώου από αυτόν, και

αφέθηκε ελεύθερος για 25 min. Η όλη διαδικασία βιντεοσκοπήθηκε με τη κατάλληλα κάμερα και τα δεδομένα αναλύθηκαν με τη χρήση του λογισμικού της Ethovision (Ethovision XT8.5 specialised video tracking software). Στο τέλος της διαδικασίας, μετρήθηκαν οι βόλοι που θεωρήσαμε πως ήταν θαμμένοι (το λιγότερο καλυμμένοι κατά τα 2/3 τους με στρωμνή (Deacon, 2006). Εκτός του αριθμού των βόλων που θάφτηκαν, μετρήθηκε και η απόσταση που διανύθηκε από το κάθε ζώο.

Η συμπεριφορά θαψίματος βόλων, συνιστά μια επαναλαμβανόμενη και αυθόρμητη συμπεριφορά σε όλα τα ερεθίσματα. Η εν λόγω δοκιμασία χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση τόσο του άγχους όσο και της επαναληπτικής συμπεριφοράς (Thomas et al., 2009).

I.3.Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (Openfield)

Η δοκιμασία ανοιχτού πεδίου, είναι ένα τεστ το οποίο αξιολογεί τη αγχώδη συμπεριφορά των τρωκτικών, την εξερευνητικότητα, καθώς και την κινητικότητα. Για τη συγκεκριμένη δοκιμασία, έγινε χρήση ενός ακρυλικού κουτιού, με διαφανή τοιχώματα και διαστάσεων 40x40x40. Σε αυτό το κουτί, αφέθηκε κάθε ζώο, ελεύθερο, να εξερευνήσει. Η διαδικασία κράτησε μια ώρα. Σε κάθε λήξη, η διάταξη καθαριζόταν με διάλυμα με περιεκτικότητα 70% αιθανόλης ώστε να φύγει η οσμή του προηγούμενου ζώου. Για την αξιολόγηση, μετρήθηκε η διανυόμενη απόσταση και ο αριθμός των ανορθώσεων (rearings), μετρήσεις οι οποίες βιντεοσκοπήθηκαν και αναλύθηκαν μετέπειτα με τη χρήση του Ethovision XT. Συγκεκριμένα οι μετρήσεις αφορούσαν τη συνολική διανυόμενη απόσταση, μέτρηση που σχετίζεται με τη κινητική δραστηριότητα, την αλλαγή στην απόσταση που διανύεται ανά 15min μέτρηση που αφορά στην εξοικείωση-habituation), τον αριθμό των ανορθώσεων μέτρηση που σχετίζεται με την εξερευνητική ικανότητα, και το

χρόνο που δαπάνησε το ζώο στο κέντρο της διάταξης (σε έναν οροθετημένο χώρο 20x20) που εκφράζει τα επίπεδα άγχους (Gould et al., 2009).

Εξέταση νευρολογικών χαρακτηριστικών

Κατά την εξέταση των νευρολογικών χαρακτηριστικών και της συνολικής υγείας των ζώων, μετρήθηκε το σωματικό βάρος, και εξετάστηκαν τα αντανακλαστικά των ματιών, των μουστακιών και των αυτιών. Αυτό έγινε με τη χρήση μιας αποστειρωμένης μπατονέτας η οποία πλησίασε τα προαναφερθέντα όργανα. Επίσης εξετάστηκε η ικανότητά τους στην έκταση των άκρων (πρόσθια και οπίσθια) όταν το ζώο πλησίαζε σε πλέγμα κλωβού. Τέλος αξιολογήθηκε η εμφάνιση της γούνας τους καθώς και το βάδισμά τους.

1.4. Υπερυψωμένος λαβύρινθος (Elevated Plus Maze-EPM)

Την επόμενη μέρα διεξήχθη η δοκιμασία του υπερυψωμένου λαβυρίνθου (elevated plus maze). Για τη συγκεκριμένη δοκιμασία, έγινε χρήση μιας κατασκευής σε σχήμα σταυρού, ύψους 50cm, η οποία αποτελείται από τέσσερις βραχίονες, πλάτους 6cm και μήκους 65cm: οι δύο είναι «ανοιχτοί», με τοιχώματα ύψους 0.5cm, ενώ οι άλλοι δύο είναι «κλειστοί», με τοιχώματα ύψους 14cm. Αυτοί οι δύο βραχίονες, ενώνονται σε σχήμα σταυρού και σχηματίζουν έτσι ένα μικρό κεντρικό τετράγωνο 6x6cm. Κατά την έναρξη της δοκιμασίας, κάθε ζώο τοποθετήθηκε στο κεντρικό τετράγωνο, με το κεφάλι του να βλέπει προς τον ένα ανοιστό βραχίονα, και στη συνέχεια αφέθηκε ελεύθερος να εξερευνήσει για 5min. Ο καθαρισμός της διάταξης μετά τη κάθε χρήση γινόταν με διάλυμα 70% αιθανόλης.

Η όλη διαδικασία βιντεοσκοπήθηκε και αναλύθηκε με τη χρήση του λογισμικού της Ethovision (Ethovision XT8.5). Οι αναλύσεις και οι μετρήσεις περιελάμβαναν τον αριθμό εισόδων του ζώου στους ανοιχτούς και κλειστούς βραχίονες καθώς και ο

χρόνος που δαπανήθηκε στον καθ'ένα από αυτούς, ενώ υπολογίστηκε και το ποσοτό του αντίστοιχου χρόνου που δαπανήθηκε στους κλειστούς βραχίονες, εκφραζόμενο ως ο επί τοις εκατό λόγος της διαφοράς του χρόνου που δαπανήθηκε στους ανοιχτούς από τον χρόνο που δαπανήθηκε στους κλειστούς ως προς το άθροισμά τους. Για να θεωρηθεί είσοδος, το ζώο έπρεπε να έχει τοποθετήσει και τα τέσσερα άκρα του εντός του βραχίονα.

Να σημειωθεί εδώ πως τα τρωκτικά προτιμούν να περνούν περισσότερο χρόνο στους κλειστούς βραχίονες σε σχέση με τους ανοιχτούς. Σε αντίστοιχη μελέτη έχει βρεθεί πως ο χρόνος των ζώων στους ανοιχτούς βραχίονες συνδέεται με αγχώδη συμπεριφορά των ζώων («παγώματα», ακινησία κλπ) καθώς και με μεγαλύτερη συγκέντρωση κορτικοστερόνης (Pellow et al., 1985). Κατά συνέπεια, όταν ο χρόνος που περνάει στους ανοιχτούς βραχίονες είναι μεγαλύτερος, είναι δείγμα άγχους.

I.5. Κοινωνικότητα και προτίμηση για νέο κοινωνικό περιβάλλον (Sociability – Social Novelty)

Η επόμενη δοκιμασία ήταν αυτή της κοινωνικότητας και της προτίμησης για νέο κοινωνικό περιβάλλον. Για τη διεξαγωγή της εν λόγω δοκιμασίας, έγινε χρήση μιας διάταξης, που αποτελούταν από ένα ξύλινο κουτί, το οποίο διαιρούνταν σε τρία «δωμάτια». Κάθε δωμάτιο είχε διαστάσεις 37x20x22, και επικοινωνούσαν από δύο ανοίγματα «πόρτες», διάστασης 10x10. Τα εν λόγω ανοίγματα αρχικά καλύπτονταν από χαρτόνια της ανάλογης διάστασης, τα οποία απομακρύνονταν με την τοποθέτηση του ζώου στο μεσαίο δωμάτιο και την έναρξη του τεστ. Η δοκιμασία αποτελούνταν από τρία trials, διάρκειας 10 λεπτών το καθένα. Το πρώτο δεκάλεπτο συνιστούσε το trial της εξοικείωσης (habituation) και μελετήθηκαν ο αριθμός των εισόδων στο

αριστερό και το δεξί δωμάτιο προκειμένου να επιβεβαιωθεί πως δεν υπάρχει κάποια προτίμηση για ένα από τα δύο, καθώς και ο χρόνος που δαπανάται στο καθ'ένα από αυτά.

Κατά το δεύτερο trial, το ζώο τοποθετήθηκε ξανά στο μεσαίο δωμάτιο, με κλειστές τις «πόρτες», οι οποίες αφαιρέθηκαν με την έναρξη του trial. Πριν την έναρξη, στα δύο πλευρικά δωμάτια, τοποθετήθηκε από ένας μικρός, κυκλικός κλωβός από πλέγμα. Στον έναν κλωβό τοποθετήθηκε ένας CD1 μυς, άγνωστος στον πειραματικό μυ, καθώς δεν είχαν αλληλεπιδράσει ποτέ νωρίτερα, ενώ ο άλλος κλωβός, στο άλλο πλευρικό δωμάτιο, έμεινε κενός. Με την έναρξη του trial, αφαιρέθηκαν οι χαρτονένιες πόρτες και ο μυς αφέθηκε ελεύθερος για 10 min. Οι μετρήσεις περιλάμβαναν τον αριθμό των εισόδων στο αριστερό και το δεξί δωμάτιο (τα δωμάτια που περιείχαν τους μικρότερους κλωβούς), ο χρόνος που δαπανήθηκε στο καθ'ένα από αυτά, καθώς και ο χρόνος που πέρασε το κάθε ζώο οσφραϊνόμενο είτε τον άδειο κλωβό είτε τον κλωβό με τον άγνωστο μυ (sniffings). Για την όσφρηση θεωρήθηκε πως απόσταση μικρότερη από περίπου 2cm από τον στόχο, ήταν αποδεκτή (Moy et al., 2007). Η τοποθέτηση του αγνώστου ζώου στο αριστερό ή στο δεξί δωμάτιο εναλλασσόταν μεταξύ των σταδίων και των ζώων υπό εξέταση, ενώ η παρατήρηση της συμπεριφοράς της όσφρησης έγινε από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές προκειμένου να αποφευχθεί το στοιχείο της υποκειμενικότητας.

Στο τρίτο και τελευταίο trial, το ζώο ξεκινάει πάλι τη δοκιμασία από το μεσαίο δωμάτιο. Στα πλευρικά δωμάτια έχουν μείνει ο κλωβός με τον μυ που πριν λίγο είχε αλληλεπιδράσει, αλλά στο δωμάτιο που είχε τον άδειο κλωβό, σε αυτό το trial περιέχει έναν νέο, άγνωστο CD1 μυ. Και πάλι, με την έναρξη της διαδικασίας, οι πόρτες αφαιρούνται και το ζώο αφήνεται να αλληλεπιδράσει και να εξερευνήσει για 10min. Για την αξιολόγηση της προτίμησης του ζώου για νέο κοινωνικό περιβάλλον,

μετρήθηκε ο χρόνος που δαπανήθηκε σε καθ'ένα από αυτά τα δωμάτια, καθώς και ο χρόνος που δαπάνησε το ζώο οσφραϊνόμενο τον κλωβό με τον μυ που γνώρισε νωρίτερα (familiar animal) και τον κλωβό με τον νέο, άγνωστο μυ (novel animal). Και πάλι η αξιολόγηση της όσφρησης έγινε από δύο παρατηρητές, ενώ η όλη διαδικασία βιντεοσκοπήθηκε και αναλύθηκε με τη χρήση του λογισμικού της Ethovision (Ethovision XT8.5). Και σε αυτό το στάδιο η τοποθέτηση του νέου και του οικείου ζώου στα δωμάτια, εναλλασσόταν μεταξύ των trials και των πειραματοζώων.

1.6.Περιστρεφόμενος κύλινδρος (Rotarod)

Ο περιστρεφόμενος κύλινδρος (UGO BASILE) αποτελεί μια δοκιμασία προκειμένου να αξιολογηθεί ο κινητικός συντονισμός και η ισορροπία του υπό εξέταση ζώου (Shiotsuki et al., 2010). Ο μυς τοποθετείται στον εν λόγω κύλινδρο και διατηρεί την ισορροπία του βαδίζοντας πάνω του, όσο αυτός αυξάνει ταχύτητα.

Σε πρώτη φάση πραγματοποιήθηκε ένα trial εξοικείωσης του ζώου με τη πειραματική διάταξη, κατά την οποία δεν λήφθηκαν μετρήσεις. Στην εν λόγω φάση ο κύλινδρος είχε σταθερή ταχύτητα 4rpm (revolutions/min), και σε περίπτωση πτώσης, το ζώο επανατοποθετήθηκε στη διάταξη. Το πρώτο trial εξοικείωσης ακολούθησαν άλλα τρία πειραματικά trials, διάρκειας 5min το καθ'ένα, τα οποία διεξήχθησαν με 45 min απόσταση μεταξύ τους. Σε κάθε trial, η ταχύτητα του κυλίνδρου αυξανόταν, με τελική ταχύτητα τα 40rpm. Η μέτρηση περιελάμβανε τον υπολογισμό της χρονικής διάρκειας από τη τοποθέτηση του μυός στη διάταξη, μέχρι την πτώση του, μέτρηση από την οποία προέκυψε ο μέσος όρος των τριών trials για κάθε ζώο.

1.7.Αναγνώριση νέου αντικειμένου (Novel Object Recognition Task-NORT)

Για τη δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου, έγινε χρήση ενός διάφανου, ακρυλικού κλωβού, διαστάσεων 40x40x40, πανομοιότυπου με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε στη δοκιμασία του ανοιχτού πεδίου. Το πρωτόκολλο της εν λόγω δοκιμασίας, περιλαμβάνει δύο trials, διάρκειας 10 λεπτών έκαστο, επί τρεις συνεχόμενες ημέρες, με κενό δέκα λεπτών μεταξύ τους.

Η πρώτη ημέρα της δοκιμασίας, έχει σκοπό να εξοικειωθεί το υπό εξέταση ζώο με τον χώρο, ώστε να τον γνωρίζει και να μην αναλωθεί τις επόμενες ημέρες με την εξερεύνηση του χώρου, αλλά να έχει εστιασμένη τη προσοχή του στη δοκιμασία αναγνώρισης (Comejo et al., 2008). Για την εξοικείωση, το ζώο αφήνεται στο κέντρο του κλωβού, ελεύθερο να εξηρευνήσει για 10 λεπτά. Οι μετρήσεις αφορούν τη διανυόμενη απόσταση, καθώς και το χρόνο που περνά το ζώο στο κέντρο του κλωβού.

Τη δεύτερη μέρα της δοκιμασίας, δύο πανομοιότυπα, άσπρα αντικείμενα τοποθετήθηκαν στον κλωβό του πειράματος (αλατιέρες). Η απόσταση μεταξύ τους ήταν ίση, καθώς και η απόσταση τους από τα τοιχώματα. Το ζώο τοποθετήθηκε στο κέντρο του κλωβού έτσι ώστε το κεφάλι του να είναι στραμμένο προς προς αναγνώριση αντικείμενα, και αφέθηκε ελεύθερος για ένα διάστημα 10 λεπτών. Προς αποφυγήν τυχούσας προτίμησης του ζώου προς ένα από τα δύο πανομοιότυπα αντικείμενα ή τάσης φόβου για το νέο, μετρήθηκε ο χρόνος που σπατάλησε το ζώο οσφραϊνόμενος και το αριστερό και το δεξί αντικείμενο κατά το πρώτο trial της δεύτερης μέρας (απόσταση μικρότερη από 2cm από το αντικείμενο). Και σε αυτή τη περίπτωση η μέτρηση έγινε από δύο διαφορετικούς παρατηρητές.

Η τρίτη και τελευταία μέρα της δοκιμασίας, επίσης περιελάμβανε δύο δεκάλεπτα trials, με κενό δέκα λεπτών μεταξύ τους. Στο πρώτο trial, ακολουθήθηκε η ίδια

διαδικασία με τη προηγούμενη μέρα, παρουσιάζοντας στον υπό εξέταση μυ τα ίδια, πανομοιότυπα, άοσμα αντικείμενα. Όλες οι παράμετροι ήταν ίδιες (χρόνος του ζώου στη διάταξη, η απόσταση των αντικειμένων μεταξύ τους αλλά και από τα τοιχώματα του κλωβού, το είδος των μετρήσεων). Στο δεύτερο trial, το ένα αντικείμενο (αλατιέρα) αντικαταστάθηκε από ένα άλλο επίσης άοσμο αντικείμενο, προμοίου μεγέθους (κουτί εβαπορέ). Μετρήθηκε ο χρόνος που πέρασε το κάθε ζώο με το γνωστό από τη προηγούμενη μέρα και trial αντικείμενο (familiar object) καθώς και με το νέο αντικείμενο (novel object). Η τοποθέτηση του νέου αντικείμενου στα δεξιά ή στα αριστερά του κλωβού εναλλασσόταν μεταξύ των trials. Τέλος υπολογίστηκε ο δείκτης διάκρισης για κάθε ζώο ($100 \times (\text{χρόνος όσφρησης νέου αντικειμένου} - \text{χρόνος όσφρησης γνωστού αντικειμένου}) / (\text{χρόνος όσφρησης νέου αντικειμένου} + \text{χρόνος όσφρησης γνωστού αντικειμένου})$).

Σαν αποτέλεσμα, αναμένεται πως το υπό εξέταση ζώο όταν θα έχει μπροστά του ένα οικείο και ένα άγνωστο-νέο αντικείμενο, θα περάσει περισσότερο χρόνο με το νέο-άγνωστο, παρά με το οικείο. Αυτή η προτίμηση για το νέο αντικείμενο, δείχνει πως η παρουσίαση του οικείου αντικειμένου, υπάρχει ήδη στη μνήμη του ζώου (Antunes & Biala, 2012).

Κ.Ανοσοϊστοχημείες

Για τη μελέτη της δομής του εγκεφάλου, οι προς υπό εξέταση εγκεφαλοι υποβλήθηκαν σε ένα πενθήμερο πρωτόκολο ανοσοϊστοχημείας, προκειμένου να μελετηθούν οι νευρώνες που εκφράζουν την παρβαλβουμίνη και οι σχηματισμοί των περινευρωνικών δικτύων, αλλά και ο συνεντοπισμός τους στο χώρο (colocalized). Οι εγκεφαλοι που χρησιμοποιήθηκαν για την εν λόγω διαδικασία, προέρχονταν από ζώα που είχαν λάβει πολλαπλές ενέσεις PTZ ενδοπεριτονιακώς, τις μεταγεννητικές μέρες

P10-15, ενώ υποβλήθησαν και στο προαναφερθέν πρωτόκολο στρες. Ο συνολικός τους αριθμός ήταν 16, τέσσερις είχαν λάβει και κρίσεις και είχαν υποβληθεί και σε πρωτόκολο στρες, τέσσερις είχαν λάβει μόνο κρίσεις, τέσσερις μόνο στρες και τέσσερις αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου, καθώς δεν είχαν λάβει τίποτα από τα δύο.

Μετά την εξαγωγή τους, οι εγκέφαλοι είχαν διατηρηθεί σε tubes με PFA 4% (παραφορμαλδεύδη) για 18 με 24 ώρες σε ψυγείο θερμοκρασίας 4 βαθμών Κελσίου και εν συνεχεία είχαν φυλαχτεί σε tubes με PBS 1x (Phosphate Buffer Saline, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών).

Όταν ήρθε η ώρα για τις ανοσοϊστοχημείες, οι εγκέφαλοι τοποθετήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης και μπήκαν σε tubes με PBS, προκειμένου έπειτα να γίνουν οι τομές με τη χρήση του vibratome. Η συγκεκριμένη διαδικασία προσφέρει την ελάχιστη καταστροφή του ιστού, και αυτός είναι ο λόγος που επιλέχθηκε (Shim, 2011). Στη συνέχεια, τα blocks της αγαρόζης με τους εγκέφαλους μέσα, κόπηκαν στο vibratome (LEICA VT1000 S), σε τομές πάχους 50μm η κάθε μία, από τις οποίες έγινε επιλογή ανά έξι (βήμα). Η επιλογή του vibratome έγινε λόγω διαφόρων πλεονεκτημάτων: είναι αρκετά πιο εύκολο να κοπεί η τομή με ένα ξυράφι, παρά με άλλους τρόπους. Επίσης με το vibratome υπάρχει λιγότερη φθορά του ιστού σε σχέση με τεχνικές όπως ο κρυοστάτης, ενώ ταυτόχρονα δεν χρειάζονται οι αντίστοιχες προστατευτικές διαδικασίες (Gibb & Kolb, 1998). Η πρώτη τομή ορίστηκε αυτή που αντιστοιχεί στην εικόνα 12 του άτλαντα (Paxinos, 2013), από την οποία ξεκινάει η περιοχή του πρωταρχικού φλοιού του προσαγωγίου (Cingulate Cortex- CG1) καθώς και ο πρωταρχικός κινητικός φλοιός (Motor Cortex- M1), ενώ ως τελευταία τομή ορίστηκε αυτή η οποία αντιστοιχεί στην εικόνα 55-60 του άτλαντα, και είναι το επίπεδο στο οποίο τελειώνει ο σωματισθητικός φλοιός (Somatosensory Barrel Cortex- S1BF).

Μετά τη λήψη των τομών, με βήμα έξι όπως αναφέρθηκε, οι τομές τοποθετήθηκαν σε πλάκα 24well (24well plate), καθ' ένα από τα οποία περιείχε PBS. Οι τομές αυτές υποβλήθησαν σε πενθήμερο πρωτόκολο ανοσοϊστοχημείας. Η ανοσοϊστοχημεία είναι μια τεχνική που αποτελεί συγκερασμό της βιοχημείας και της ανοσοβιολογίας με την ιστολογία-κυτταρολογία. Κατά τη διαδικασία της, ένα ανοσοσεσημασμένο αντίσωμα (αντίσωμα συνδεδεμένα με φθορίζουσες ουσίες) προσδένεται σε ένα αντιγόνο που αποτελεί τον στόχο, με αποτέλεσμα την οπτικοποίηση του συμπλέγματος που δημιουργείται (Κουτραφούρη & Λιβανίου). Στη δική μας περίπτωση, το πρωτόκολο αποτελούνταν από τη χρήση τόσο πρωτογενών, όσο και δευτερογενών αντισωμάτων, τα οποία προσδένονται στα πρώτα. Τη πρώτη μέρα, χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα PV25 (PV25 Rabbit anti Parvalbumin- Swant) , το οποίο προσδένεται στη πρωτεΐνη παρβαλβουμίνη, ενώ τη δεύτερη μέρα, χρησιμοποιήθηκε το Cy3 (Cy3 AP Donkey Anti rabbit IgG (H+L)- Jackson), το οποίο είναι φθορίζον και προσδένεται στο πρώτο, έχοντας ως αποτέλεσμα το κόκκινο χρώμα. Τη Τρίτη μέρα, χρησιμοποιήθηκε το πρωτογενές αντίσωμα της λεκτίνης (VVA – Biotinylated Lectin –Vectrolabs), το οποίο βάφει τα περινευρωνικά δίκτυα, ενώ τη τέταρτη μέρα, έγινε χρήση του δευτερογενούς αντισώματος Alexa (Alexa 647 Streptavidin – Conjugated), το οποίο προσδένεται πάνω στο πρώτο, και βάφει με πράσινο χρώμα τους στόχους. Τη τελευταία μέρα, χρησιμοποιήθηκε το DAPI (4',6- diamidino – 2-phenylindole), φθορίζον αντίσωμα που προσδένεται και βάφει τους πυρήνες των κυττάρων.

Η διαδικασία: Τη πρώτη μέρα, αφού κόπηκαν οι τομές, έγινε πλύση τους σε PBX (PBS + 0.5% Triton X) για δέκα λεπτά (1ml/section). Το Triton αποτελεί ένα είδος «απορρυπαντικού» το οποίο τρυπάει τη κυτταρική μεμβράνη. Το PV25 αντίσωμα διαλύθηκε σε blocking solution (PBT, 2mg/ml BSA + 1.5% goat serum), και μοιράστηκε με τη βοήθεια μιας πιπέτας σε κάθε τομή-well (600μl/well), και αφέθηκε

για όλο το βράδυ σε ένα rocker με ταχύτητα 10rpm, σε περιβάλλον θερμοκρασίας 4 βαθμών Κελσίου. Τη δεύτερη μέρα έγιναν πέντε πλύσεις των τομών με blocking solution (μία πλύση ανα ώρα, για πέντε ώρες) (700μl/well), ενώ μετά, ακολούθησε η διάλυση του Cy3 σε blocking solution, και η εισχώρησή του στις τομές. Αφέθηκε όλο το βράδυ στο cold room, πάνω στο rocker. Τη τρίτη μέρα, έγιναν τέσσερις πλύσεις στις τομές, ανά μισή ώρα, με blocking solution (700μl/well), μια πλύση με PVP (PBS-T 0.05% +2gr PVP powder) στην ίδια ποσότητα, και η διάλυση του VVA σε PVP solution. Αφέθηκε στο rocker, στο cold room, overnight. Τη τέταρτη μέρα, έγιναν πέντε πλύσεις ανα μισάωρο, με PBS-T 0.05%, και μετά ακολούθησε η διάλυση του Alexa σε PVP solution και η ολονύχτια τοποθέτησή του, στο rocker του cold room. Τέλος, τη πέμπτη μέρα, έγιναν πέντε πλύσεις των τομών, ανα μισάωρο, με PBST-0.05%, ενώ μετά ακολούθησαν δύο πλύσεις, ανά τέταρτο, σε PBT (PBS + 0.1% Triton -X). Έπειτα, διαλύθηκε το DAPI σε απιονισμένο νερό (DH₂O) και εφαρμόστηκε για δέκα λεπτά στις τομές (500μl/well), ενώ ακολούθησαν δύο πεντάλεπτες πλύσεις σε PBS (1ml/well). Τέλος οι τομές τοποθετήθηκαν σε πλακάκια (vectashield hardset- coverslip), προκειμένου να μελετηθούν και να φωτογραφηθούν στα μικροσκόπια. Στη τοποθέτηση, έγινε χρήση του mowiol, ενός υδρόφιλου πολυμερούς, που χρησιμοποιείται ως ένα είδος κόλλας μεταξύ του slide και του coverslip.

Α.Stereology

Stereology (στερεολογία) ονομάζεται η τεχνική που συσχετίζει μια δομή που διαθέτει τρεις διαστάσεις, με τις εικόνες της εν λόγω δομής, οι οποίες είναι αναγκαστικά δύο διαστάσεων. Το stereology χρησιμοποιείται κυρίως σε εικόνες μικροσκοπίου

(συμβατικό ή συνεστιακό). Οι μέθοδοι που το διέπουν ενδείκνυνται κυρίως για μακροσκοπικό επίπεδο, αλλά χρησιμοποιούνται και σε μεγαλύτερα, όπως η μελέτη της διασποράς των άστρων στο σύμπαν (Russ & Dehoff, 2012).

Η διαδικασία αυτή, διέπεται από μερικούς κανόνες. Ένας από αυτούς είναι ο κλασματικός κανόνας (fractionator principle), ο οποίος είναι και ο πιο βασικός. Σύμφωνα με αυτόν τον κανόνα, αν κάποιος πάρει ένα τυχαίο δείγμα από έναν πληθυσμό, τότε ο αντικειμενικός (unbiased) υπολογισμός του εν λόγω πληθυσμού είναι η μέτρηση του δείγματος δια το κλάσμα, ως ακολούθως:

$$\hat{X} = \frac{x}{f}$$

Όπου x είναι η ποσότητα που μας ενδιαφέρει, το x caret είναι ο υπολογισμός του X , το x είναι η μέτρηση του δείγματος, και το f είναι το κλάσμα του δείγματος.

Συνήθως τον αριθμό του κλάσματος τον επιλέγει ο ερευνητής και κυμαίνεται από 0 έως 1. Αν επιλεγθεί το 0, δεν θα γίνει καμία δειγματοληψία, ενώ αν επιλεγθεί το 1, όλος ο πληθυσμός θα αποτελέσει το δείγμα. Θα πρέπει να γίνει πολύ ξεκάθαρο, πως ο υπολογισμός που προκύπτει από τον εν λόγω κανόνα, αποτελεί σίγουρο και αντικειμενικό υπολογισμό, λόγω της χρήσης Συστημικής Τυχαίας Δειγματοληψίας (Systemic Random Sampling- SRS). Επίσης θα πρέπει να διευκρινιστεί πως ανάλογα το κλάσμα και τον αριθμό στον οποίο θα «σπάσει» ο πληθυσμός, ο τελικός υπολογισμός μπορεί να πλησιάζει ή και όχι στον αληθινό αριθμό. Όσο μεγαλύτερος είναι αυτός ο αριθμός, όσο πιο κοντά είναι στη συνολική υπό μέτρηση περιοχή, τόσο πιο κοντά θα είναι και ο υπολογισμός στην αληθινή απάντηση. Αν όχι, τόσο θα απέχει ακι το αποτέλεσμα. Το ζήτημα δεν είναι να βρεθεί ο ακριβής αριθμός. Στη περίπτωση που μετράμε κύτταρα, η όλη διαδικασία, το να μετρηθούν όλα τα κύτταρα σε όλο το ROI, είναι μια διαδικασία πολύ δύσκολη και υπερβολικά χρονοβόρα,

αλλά θα πρέπει να γίνει αν η υπόθεσή μας στηρίζεται και χρειάζεται τον ακριβή αριθμό κυττάρων. Εμείς που ψάχνουμε διαφορές και αλλαγές στον αριθμό των κυττάρων μεταξύ των συνθηκών μας, ενδείκνυται να χρησιμοποιήσουμε μικρό αριθμό fraction, σύμφωνα με τη στατιστική πάντα, καθώς το αποτέλεσμα θα είναι αρκετά ακριβές και αξιόπιστο ώστε να απαντήσει στην υπόθεσή μας.

Ένα σημαντικό στοιχείο της εν λόγω μεθόδου είναι η συστηματική τυχαία δειγματοληψία (SRS). Αυτή μπορεί να εφαρμοστεί τόσο σε διαδοχικές τομές, όσο και σε μια περιοχή που μας ενδιαφέρει (ROI) και αποτελεί έναν αποτελεσματικό τρόπο να επιλέξουμε δειγματικά τμήματα της περιοχής. Το stereo investigator, το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για τις εν λόγω στερεολογικές μετρήσεις, χρησιμοποιεί το SRS για να αποκτήσει αντιπροσωπευτικό δείγμα του ιστού. Το σύστημα επιλέγει ένα τυχαίο τμήμα ως εκκίνηση μέσα στο ROI και μετά κατευθύνει τον χ και ψ άξονα με καθορισμένο, σταθερό βήμα στα επόμενα sample sites, τα οποία είναι ίσα κατανομημένα στη περιοχή που μας ενδιαφέρει.

Επίσης, μεγάλη σημασία έχει η οπτική κλασματοποίηση (Optical Fractionator), η οποία έχει ιδιαίτερη θέση στο πρόγραμμα. Ο κανόνας της οπτικής κλασματοποίησης χρησιμοποιείται για να υπολογίσει το συνολικό αριθμό από ένα στοιχείο σε οποιονδήποτε τρισδιάστατο όγκο, ανεξαρτήτως του σχήματός του, και ενδείκνυται για τη ποσοτικοποίηση κυττάρων, συνάψεων και άλλων διακριτών στοιχείων του ιστού. Ταυτόχρονα έχει το πλεονέκτημα πως δεν επηρεάζει το είδος της τομής και ο προσανατολισμός της. Έτσι, η μέτρηση των κυττάρων είναι αντικειμενική καθώς δεν επηρεάζεται από το μέγεθος, το σχήμα, το χωρικό προσανατολισμό και τη χωρική κατανομή των υπό εξέταση κυττάρων.

Συμπερασματικά, η μεθοδολογία του stereology αποτελεί έναν αντικειμενικό και αξιόπιστο τρόπο ώστε να ποσοτικοποιήσουμε τον αριθμό των κυττάρων σε τρισδιάστατο ιστό και σημαντικό εργαλείο για την απόρριψη ή επιβεβαίωση της πειραματικής μας υπόθεσης.

Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση των δεδομένων, χρησιμοποιήθηκε το SPSS 22 (IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.). Σε περιπτώσεις που τα δεδομένα δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή (Shapiro Wilk < .05), χρησιμοποιήθηκε ένα εργαλείο το οποίο ιεραρχεί και μετασχηματίζει τα δεδομένα (Aligned Rank Transform – ARTool) ώστε να μπορέσει να καταστεί δυνατή η χρήση παραμετρικών κριτηρίων, καθώς τα κριτήρια Kruskal-Wallis και Friedman μπορούν να αναλύσουν μόνο ένα παράγοντα και δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης. Το ARTool, για κάθε επίδραση ή αλληλεπίδραση, ιεραρχεί τα δεδομένα με τέτοιο τρόπο που δεν λαμβάνεται υπόψη καμία επίδραση παρα μόνο αυτή που μας ενδιαφέρει, και καταλήγει σε νέα μεταβλητή Y aligned, Αυτές οι μεταβλητές ταξινομούνται και προκύπτουν οι μεταβλητές Y art, οι οποίες αφορούν μόνο την επίδραση ή αλληλεπίδραση για την οποία ταξινομήθηκε η Y κάθε φορά (Wobbrock et al).

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

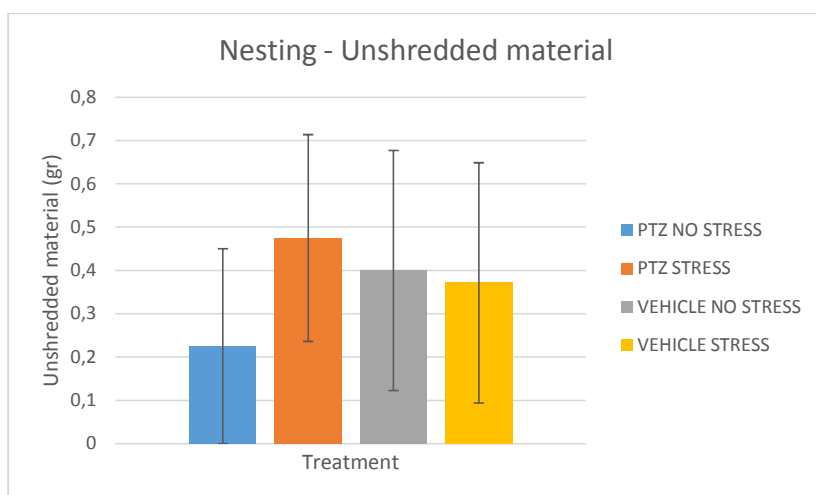
M. Συμπεριφορικά πειράματα

M1.Κατασκευή φωλιάς (Nesting)

Για το τεστ της κατασκευής φωλιάς, ως μια αυθόρμητη επαναλαμβανόμενη συμπεριφορά, εξετάστηκε η ποιότητα της φωλιάς, όπως αναλύθηκε παραπάνω, καθώς και η ποσότητα του υλικού φωλεασμού (nestlets) που έμεινε ανέπαφο από την επίδραση του ζώου (σε γραμμάρια).

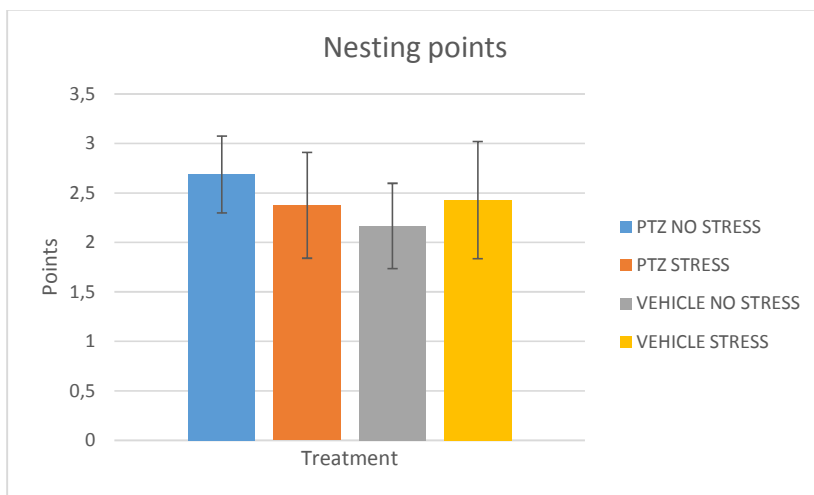
i) Η διπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης, δεν έδειξε στατιστική σημαντικότητα της αλληλεπίδρασης φάρμακο x στρες [$F(1,28) = .025$, $p = .876$, $\eta_p^2 = .001$], ούτε της επίδρασης του φαρμάκου [$F(1,28) = .546$, $p = .466$, $\eta_p^2 = .019$] αλλά ούτε και του στρες [$F(1,28) = 2.658$, $p = .114$, $\eta_p^2 = .087$] όσον αφορά το ανέπαφο υλικό φωλεασμού.

Ανέπαφο υλικό



ii) Όσον αφορά στη βαθμολογία της φωλιάς, η διπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης δεν βρέθηκε στατιστικώς σημαντική αλληλεπίδραση των ανεξάρτητων μεταβλητών φάρμακο x στρες [$F(1,28) = ,349$, $p = ,560$, $\eta_p^2 = 0,12$]. Η επίδραση του στρες [$F(1,28) = ,003$, $p = ,959$] επίσης δεν ήταν σημαντική καθώς ούτε και του φαρμάκου [$F(1,28) = ,433$, $p = ,635$]. Παρακάτω εμφανίζεται το ανάλογο γράφημα.

Βαθμολογία φωλιάς



Συμπερασματικά φαίνεται πως ούτε το στρες, ούτε το φάρμακο, αλλά ούτε και ο συνδυασμός των δύο, επηρεάζουν με οποιονδήποτε τρόπο τη αυθόρμητη συμπεριφορά της κατασκευής φωλιάς.

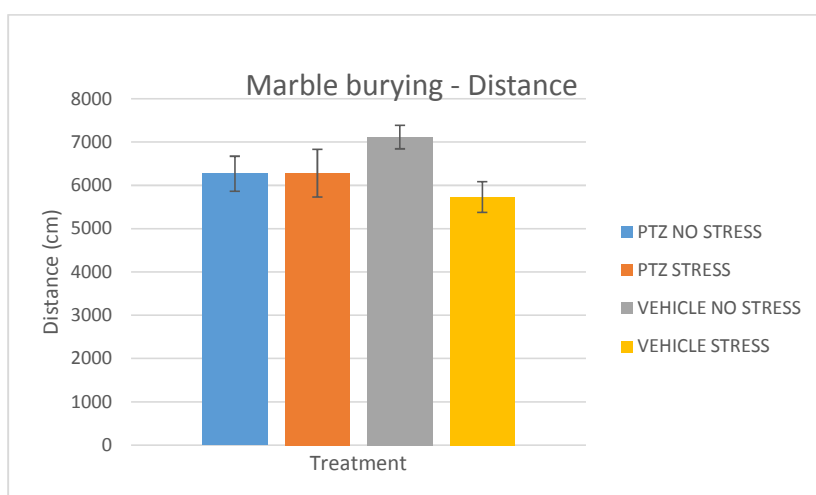
M2. Θάψιμο βόλων (marble burying)

Κατά τη δοκιμασία θαψίματος βόλων, ως αυθόρμητη επαναλαμβανόμενη συμπεριφορά, μελετήθηκαν το ποσοστό των βόλων που είχαν θαφτεί (κατά τα 2/3 το

ελάχιστο), αλλά και η συνολική διανύμενη απόσταση, προκειμένου να εξασφαλιστεί ότι η όποια διαφορά στο θάψιμο, δεν οφείλεται σε διαφορά συνολικής κινητικότητας.

i) Για την απόσταση, η διπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης έδειξε μη στατιστική σημαντική διαφορά για τους παράγοντες φάρμακο x στρες $F(1,28)=2,947$, $p=0.97$, $\eta_p^2=0.095$. Δεν βρέθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά ούτε της επίδραση του στρες στη συνολική διανύμενη απόσταση [$F(1,28)=2,839$, $p=.103$, $\eta_p^2=0.092$] αλλά ούτε του φαρμάκου [$F(1,28)=0.130$, $p=0,721$, $\eta_p^2=0.005$]. Δεν φάνηκε λοιπόν να επηρεάζει ούτε η κρίση, ούτε το στρες αλλά ούτε και ο συγκερασμός τους, την κινητικότητα.

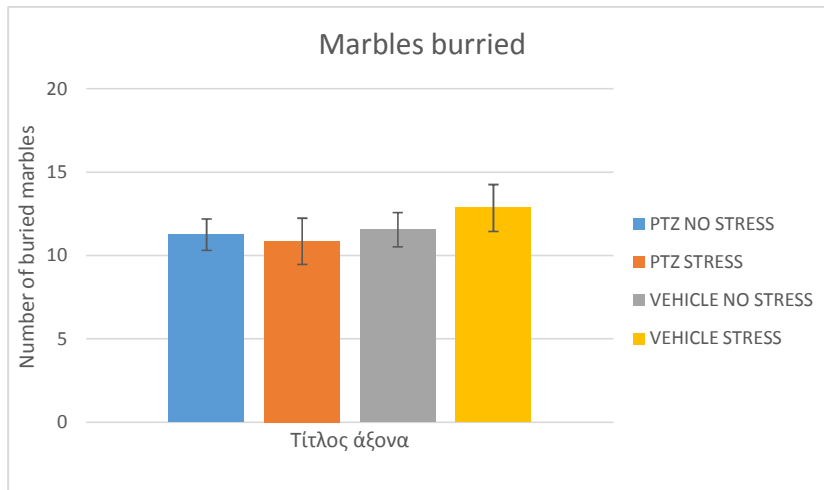
Διανύμενη απόσταση



ii) Όσον αφορά τον αριθμό των θαμμένων βόλων, πάλι δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά. Συγκεκριμένα, η διπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης έδειξε πως δεν υπήρχε στατιστική σημαντικότητα της επίδρασης του φαρμάκου x στρες [$F(1,28)=.243$, $p=.626$, $\eta_p^2=.009$], ούτε της επίδρασης του φαρμάκου [$F(1,28)=$

.561, $p = .460$, $\eta_p^2 = .020$], αλλά ούτε και του στρες [$F(1,28) = 4.038$, $p = .555$, $\eta_p^2 = .013$].

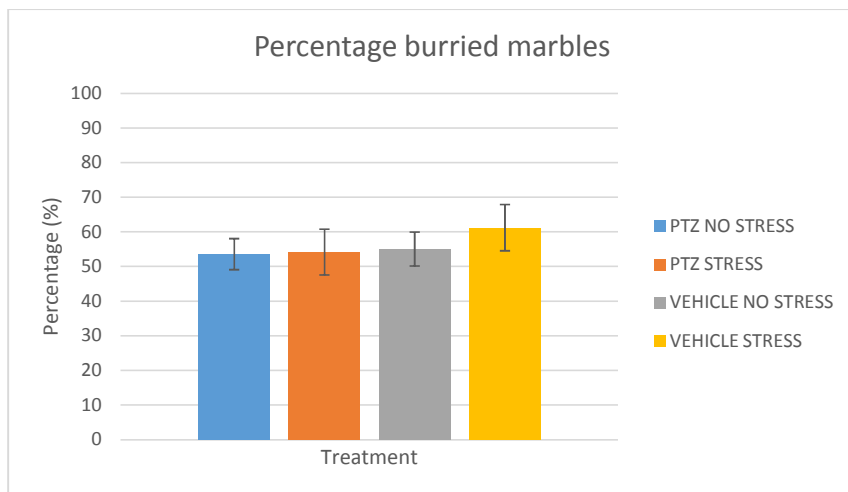
Αριθμός βόλων



iii) Στον υπολογισμό του ποσοστού των θαμμένων βόλων, η διπαραγοντική ανάλυση διακύμασης δεν έδειξε να υπάρχει επίδραση του φαρμάκου [$F(1,28) = .561$, $p = .460$], ούτε του στρες [$F(1,28) = .357$, $p = .555$], ούτε ο συνδυασμός τους [$F(1,28) = .243$, $p = .626$]. Σε αυτό το σημείο, είναι δόκιμο να υπενθυμίσουμε πως θαμμένος βόλος θεωρήθηκε κάθε βόλος που είχε θαφτεί τουλάχιστον κατά τα 2/3 του.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν πως η αυθόρμητη συμπεριφορά του θαμίματος των βόλων, δεν επηρεάζεται ούτε από μια πρόιμη επιληπτική κρίση, ούτε από την επαγωγή περιεφηβικού στρες, αλλά ούτε και από το συνδυασμό τους.

Ποσοστό θαμμένων βόλων



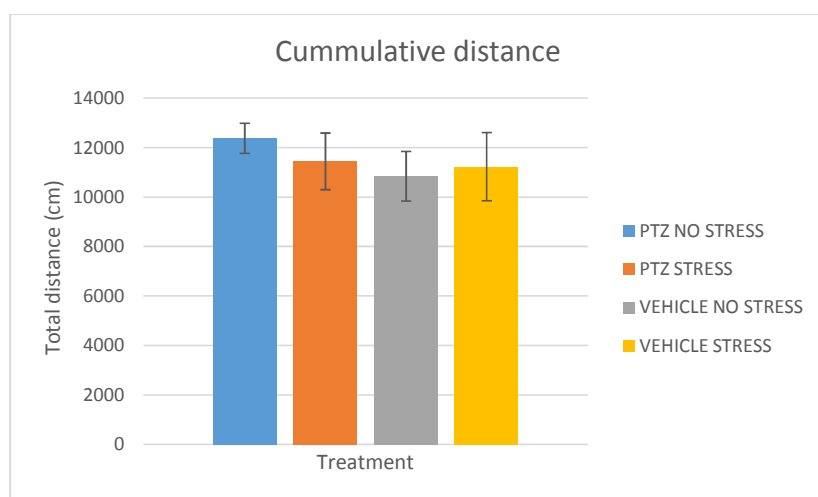
M3. Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (Openfield)

Για τη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου, οι μετρήσεις που έγιναν αφορούσαν τη συνολική διανυόμενη απόσταση, την απόσταση που διανύθηκε ανά 15 λεπτά ώστε να αξιολογηθεί η εξοικείωση σε νέο περιβαλλον, ο συνολικός αριθμός των ανορθώσεων (rearings), η αλλαγή αυτού του αριθμού ανά τέταρτο καθώς και ο συνολικός χρόνος που δαπάνησε ο μυς στη κεντρική περιοχή της διάταξης.

ι) Συνολική διανυόμενη απόσταση: Στην εξέταση της συνολικής διανυόμενης απόστασης, ως δείκτης κινητικότητας, η διπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης, δεν έδειξε πουθενά στατιστικώς σημαντική διαφορά. Συγκεκριμένα, η επίδραση φάρμακό x στρες στην απόσταση ήταν $[F(1,28)= .391, p= .537, \eta_p^2= .014]$, η επίδραση του στρες $[F(1,28)= .066, p= .799, \eta_p^2= .002]$ και η επίδραση του φαρμάκου $[F(1,28)= .691, p= .413, \eta_p^2= .024]$. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει πως ούτε η επαγωγή κρίσης,

ούτε το στρες, αλλά ούτε και ο συνδυασμός τους, δεν επιφέρουν αλλαγές στη κινητική συμπεριφορά, και δεν προκαλούν τίποτα, ούτε υπερκινητικότητα, ούτε υποκινητικότητα.

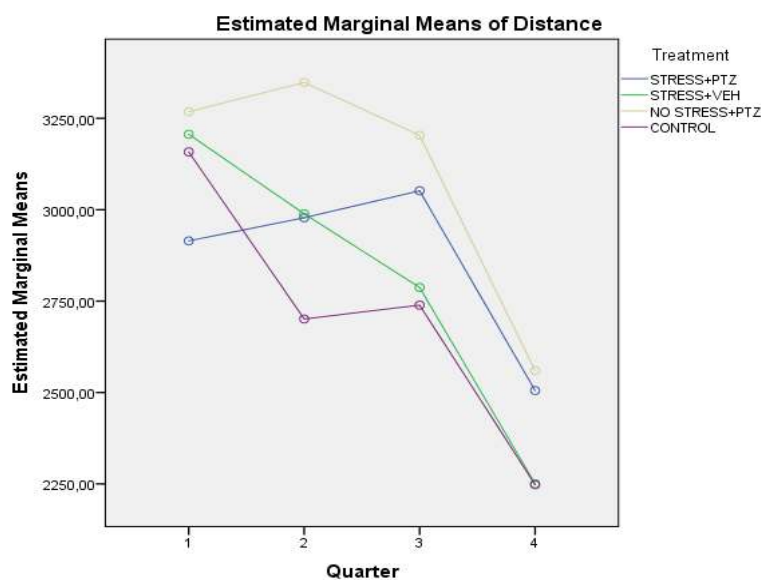
Συνολική διανυόμενη απόσταση



ii) Απόσταση άνα 15 λεπτο: Λόγω της εξέτασης άνα 15 λεπτο, προκειμένου να μελετηθεί η εξοικείωση, εφαρμόστηκε διπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης επαναλαμβανόμενων μετρήσεων (two-way repeated measures ANOVA) η οποία έδειξε στατιστικά μη σημαντική την επίδραση 15 λεπτο x φάρμακο x στρες [$F(3,26) = .769, p = .514$], ούτε την επίδραση του φαρμάκου [$F(1,28) = .691, p = .413$], ούτε του στρες [$F(1,28) = .066, p = .799$], αλλά ούτε και την αλληλεπίδρασή τους [$F(1,28) = .391, p = .537$]. Επίσης, δεν ήταν σημαντική η αλληλεπίδραση 15 λεπτο x φάρμακο [$F(3,84) = 1.979, p = .123$], ούτε η αλληλεπίδραση 15 λεπτο x στρες [$F(3,84) = .150, p = .930$], αλλά ούτε η τριπλή αλληλεπίδραση 15 λεπτο x φάρμακο x στρες [$F(3,84) = .769, p = .514$]. Βρέθηκε όμως στατιστικά σημαντική η επίδραση του 15 λεπτο [$F(3,$

84)= 19.578, $p = .000$]. Στις συγκρίσεις μεταξύ των 15 λεπτών, βρέθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ πρώτου και τετάρτου 15 λεπτού ($p = .000$), δευτέρου και τέταρτου ($p = .000$), καθώς και τρίτου με τέταρτο ($p = .000$). Δηλαδή, όλα τα ζώα στο τέλος παρουσίασαν μείωση στη διανυόμενη απόσταση στο τελευταίο 15 λεπτό σε σύγκριση με τα άλλα τρία, γεγονός που υποδεικνύει πως εξοικειώθηκαν με το περιβάλλον.

Απόσταση ανα 15 λεπτό

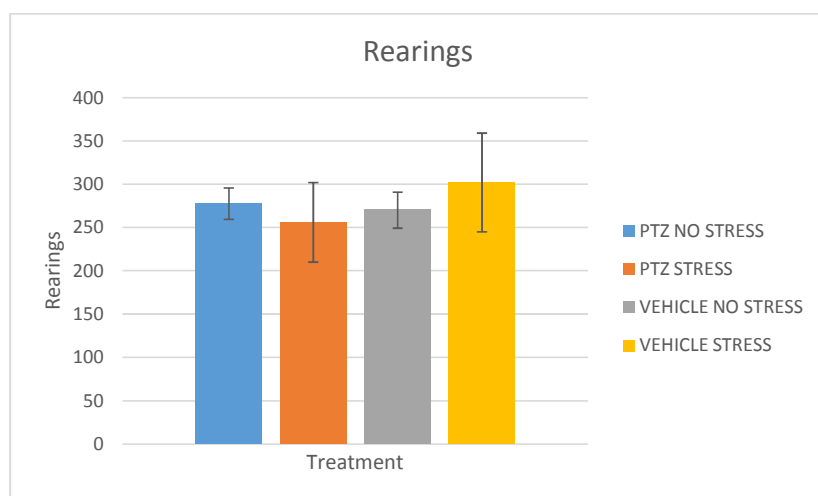


iii) Αριθμός ανορθώσεων (Rearings)

Για τον συνολικό αριθμό ανορθώσεων, κατά τη διπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης, δε βρέθηκε στατιστική σημαντικότητα, ούτε του φαρμάκου [$F(1,30) = 1.109, p = .302$], ούτε του στρες [$F(1,30) = .147, p = .704$], ούτε η αλληλεπίδρασή τους [$F(1,30) = 1.587, p = .219$]. Δηλαδή ο μέσος όρος των ανορθώσεων, δε διέφερε

ανάμεσα στις ομάδες, ανεξαρτήτως χειρισμού. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει πως η εξερευνητική δραστηριότητα, δεν επηρρεάστηκε ούτε από την επαγωγή της κρίσης, ούτε από την επαγωγή του στρες, αλλά ούτε και από τον συνδυασμό τους, και ούτε αυξήθηκε, αλλά ούτε και μειώθηκε.

Αριθμός (συχνότητα) ανορθώσεων

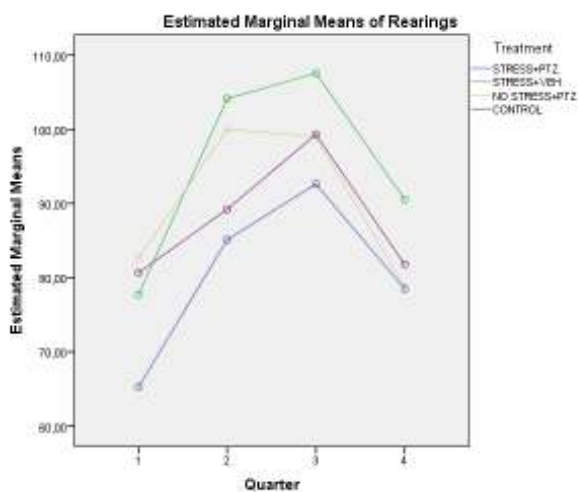


iv) Rearings ανα 15 λεπτο

Στην διπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης επαναλαμβανομένων μετρήσεων, δε βρέθηκε σημαντική διαφορά της επίδρασης 15 λεπτο x φάρμακο x στρες [$F(3,28) = .575, p = .633$], ούτε η επίδραση 15 λεπτο x φάρμακο [$F(3,84) = .093, p = .964$], ούτε η επίδραση 15 λεπτο x στρες [$F(3,84) = 1.118, p = .346$], ούτε η επίδραση του φαρμάκου [$F(1,28) = .283, p = .599$], ούτε του στρες [$F(1,28) = .011, p = .917$], ούτε ο συνδυασμός τους [$F(1,28) = .530, p = .473$]. Η μόνη επίδραση που ήταν σημαντική, ήταν αυτή του 15 λεπτου [$F(3,84) = 12.996, p = .000$]. Στις συγκρίσεις μεταξύ των 15 λεπτων, βρέθηκε διαφορά μεταξύ πρώτου και δευτέρου 15 λεπτου ($p = .000$), πρώτου και

τρίτου ($p=.000$), και τρίτου με τέταρτου ($p=.000$). Δηλαδή όλα τα ζώα, ανεξαρτήτως του treatment που είχαν λάβει, παρουσίασαν αυξημένη εξερευνητικότητα συγκρίνοντας τον αριθμό ανορθώσεων του πρώτου και του δεύτερου 15 λεπτού, του πρώτου και του τρίτου, ενώ παρουσίασαν μειωμένη εξερευνητική δραστηριότητα σύγκριση τρίτο με τέταρτο 15 λεπτο.

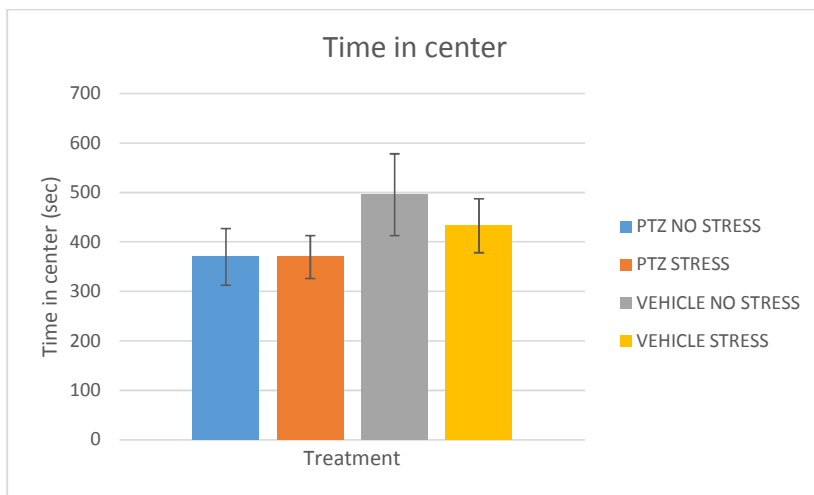
Ανορθώσεις ανά 15 λεπτο



ν) Χρόνος στο κεντρικό σημείο

Τέλος, όσον αφορά το συνολικό χρόνο που δαπανήθηκε στο κεντρικό σημείο της διάταξης, ως δείκτης αγχώδους συμπεριφοράς, δεν βρέθηκε στατιστική σημαντικότητα της επίδρασης φάρμακο x στρες [$F(1,31)=.239$, $p=.629$], ούτε του φαρμάκου [$F(1,31)=2.190$, $p=.150$], ούτε του στρες [$F(1,31)=.245$, $p=.625$]. Το αποτέλεσμα αυτό δηλώνει πως δεν υπήρξε επίδραση της πρώιμης κρίσης, ούτε του στρες, αλλά ούτε και του συνδυασμού τους στην εμφάνιση αγχώδους συμπεριφοράς, καθώς όλα τα ζώα παρουσίασαν παρόμοια επίπεδα άγχους.

Χρόνος στο κεντρικό σημείο



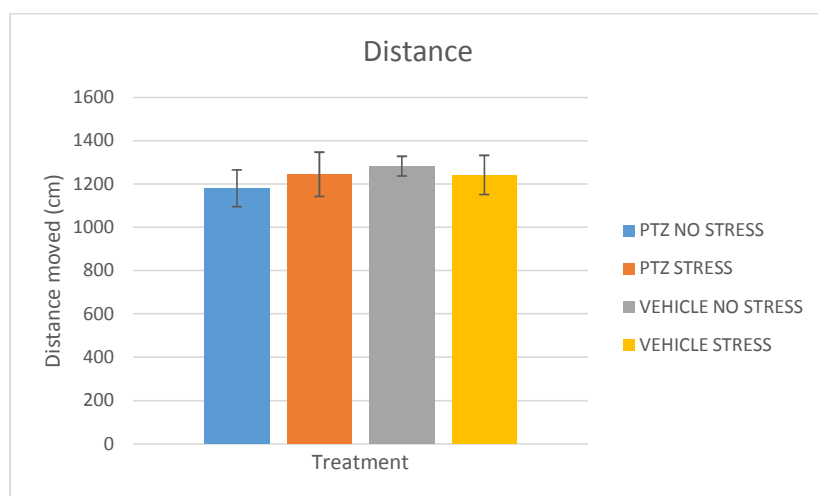
M.4. Υπερυψωμένος λαβύρινθος (Elevated Plus Maze)

Για το τεστ του υπερυψωμένου λαβυρίνθου, μελετήθηκε η συνολική διανυόμενη απόσταση, ο χρόνος που πέρασε το ζώο στους ανοιχούς βραχίονες, στους κλειστούς, καθώς και ο αριθμός εισόδων σε κάθε είδος βραχίονα.

i) Η επίδραση φάρμακο x στρες στη συνολική διανυόμενη απόσταση, δεν ήταν στατιστικά σημαντική [$F(1,31) = .417, p = .524, \eta_p^2 = .015$]. Σε ξεχωριστό επίπεδο, ούτε η επίδραση του φαρμάκου [$F(1,28) = .369, p = .548, \eta_p^2 = .013$] ούτε η επίδραση του στρες ήταν σημαντικές [$F(1,28) = .021, p = .886, \eta_p^2 = .001$]. Δηλαδή δεν

παρουσιάστηκε καμία διαφορά μεταξύ των ομάδων και όλα τα ζώα διένυσαν κατά μέσο όρο παρόμοια απόσταση, εύρημα που έρχεται σε συμφωνία με τις αντίστοιχες μετρήσεις τόσο της διαδικασίας του ανοιχτού πεδίου, αλλά και της δοκιμασίας θαψίματος βόλων.

Απόσταση



ii) Όσον αφορά στο χρόνο που πέρασαν τα ζώα στους κλειστούς και στους ανοιχτούς βραχίονες, δεν βρέθηκε στατιστική σημαντικότητα του φαρμάκου x στρες [$F(1,28) = .196, p = .661$], ούτε του φαρμάκου [$F(1,28) = .828, p = .371$], ούτε του στρες [$F(1,28) = .592, p = .448$]. Τέλος, ούτε η επίδραση του βραχίονα x φάρμακο x στρες ήταν σημαντική [$F(1,28) = .836, p = .368$], ούτε η βραχίονας x φάρμακο [$F(1,28) = 1.072, p = .309$], ούτε η βραχίονας x στρες [$F(1,28) = .066, p = .800$]. Ήταν όμως σημαντική η επίδραση του βραχίονα [$F(1,28) = 800.261, p = .00$]. Δηλαδή, προέκυψε πως όλοι οι μύες, ανεξαρτήτως του group στον οποίο ανήκαν, σπατάλησαν

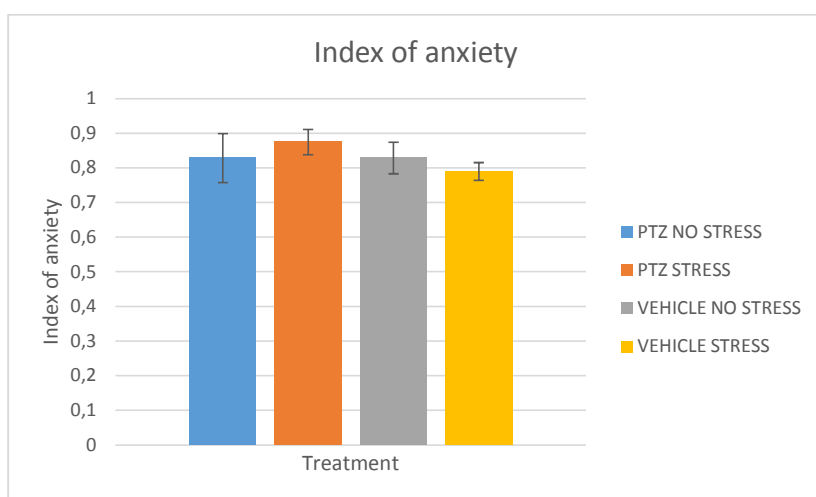
περισσότερο χρόνο στους κλειστούς βραχίονες σε σύγκριση με τους ανοιχτούς, μια συμπεριφορά που ήταν αναμενόμενη και δεν απέκλινε από τη φυσιολογική.

iii) Όσον αφορά τον αριθμό εισόδων που πραγματοποίησαν τα ζώα στους ανοιχτούς και κλειστούς βραχίονες, δε βρέθηκε στατιστική σημαντικότητα της επίδρασης βραχίονας x φάρμακο x στρες (αν και οριακά) [$F(1,28)= 4.002, p= .055$], ούτε η επίδραση βραχίονας x φάρμακο [$F(1, 28)= .011, p= .918$], ούτε βραχίονας x στρες [$F(1,28)= .911, p= .348$], ούτε η επίδραση του φαρμάκου [$F(1,28)= .681, p= .416$], ούτε ο συνδυασμός φάρμακο x στρες [$F(1,28)= .002, p= .963$]. Βρέθηκε όμως σημαντική η επίδραση του βραχίονα [$F(1,28)= 102.672, p=.000$], καθώς και η επίδραση του στρες [$F(1,28)= 4.397, p= .045$], αν και οριακά. Με βάση τα παραπάνω, όλοι οι μύες, ανεξαρτήτως του χειρισμού που είχαν δεχθεί, εισέρχονταν πιο συχνά στους κλειστούς βραχίονες σε σχέση με τους ανοιχτούς, ενώ τα ζώα που είχαν υποστεί το πρωτόκολο του στρες, είχαν αυξημένο αριθμό εισόδων σε σχέση με τα ζώα που δεν είχαν υποστεί αυτό το πρωτόκολο.

iv) Επίσης, υπολογίζοντας και αναλύοντας το ποσοστό χρόνου που δαπανήθηκε από τα ζώα στους κλειστούς βραχίονες, δε βρέθηκε στατιστικώς σημαντική ούτε η επίδραση του φαρμάκου [$F(1, 31)= 1.162, p= .290$], ούτε του στρες [$F(1,31)= .204, p= .655$], αλλά ούτε και η επίδραση φάρμακο x στρες [$F(1,31)= .687, p= .414$]. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει πως όλα τα ζώα παρουσίασαν παρόμοια αγγώδη συμπεριφορά, η οποία δεν επηρεάστηκε ούτε από την επαγωγή της κρίσης, ούτε από την επαγωγή του στρες, αλλά ούτε και από το συνδυασμό τους.

ν) Τέλος υπολογίστηκε ο δείκτης αγχώδους συμπεριφοράς όπως αυτός περιγράφεται από την εξίσωση: (χρόνος στους κλειστούς βραχίονες- χρόνος στους ανοιχτούς)/ (χρόνος στους κλειστούς βραχίονες + χρόνος στους ανοιχτούς βραχίονες).

Δείκτης αγχώδους συμπεριφοράς



M5.Sociability and social novelty

Κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας για κοινωνική συμπεριφορά, εξετάστηκαν η διανύμενη απόσταση, ο αριθμός εισόδων στο αριστερό και το δεξί δωμάτιο, ο χρόνος που διαπνήθηκε σε καθ'ένα από αυτά, ο χρόνος που πέρασε ο μυς οσφραϊνόμενος το αντικείμενο και τον άγνωστο μυ, καθώς και ο χρόνος που πέρασε οσφραϊνόμενος τον οικείο και τον νέο μη οικείο μυ.

ι) Αρχικά, μετρήθηκε και αναλύθηκε ο χρόνος που δαπάνησε το υπό εξέταση ζώο στο αριστερό και δεξί δωμάτιο, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι δεν υπήρχε καποια ενδογενής προτιμηση στον ένα από τους δυο χωρους. Η ανάλυση δεν έδειξε καμία

Μορφοποιήθηκε: Ελληνικά

Μορφοποιήθηκε: Ελληνικά

Μορφοποιήθηκε: Ελληνικά

Μορφοποιήθηκε: Ελληνικά

Μορφοποιήθηκε: Ελληνικά

στατιστικώς σημαντική αλληλεπίδραση, ούτε για δωμάτιο x φάρμακο x στρες [$F(1,28)= .685, p= .415$], ούτε για δωμάτιο x στρες [$F(1,28)= .101, p= .752$], ούτε για αλληλεπίδραση δωμάτιο x φάρμακο [$F(1,28)= .026, p= .874$]. Επίσης δεν ήταν σημαντική η επίδραση του φαρμάκου [$F(1,28)= .965, p= .334$], ούτε του στρες [$F(1,28)= .470, p= .499$], αλλά ούτε και η συνδυαστική τους επίδραση φάρμακο x στρες [$F(1,28)= .470, p= .499$]. Δηλαδή καμία ομάδα δεν επέδειξε κάποια προτίμηση είτε προς το αριστερό είτε προς το δεξί δωμάτιο.

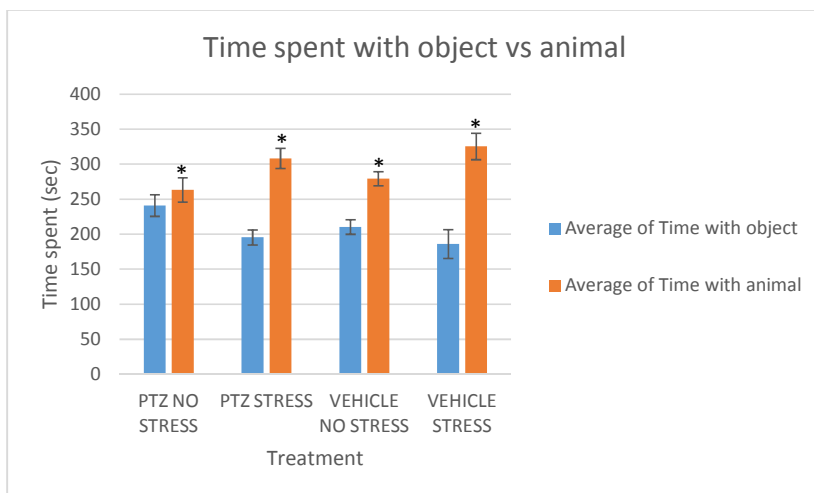
ii) Όσον αφορά τον αριθμό εισόδων στο αριστερό και στο δεξί δωμάτιο, οι οποίες μελετήθηκαν για τον ίδιο λόγο, βρέθηκε στατιστικά σημαντική η αλληλεπίδραση δωμάτιο x στρες [$F(1,28)= 5.594, p= .025$], ενώ καμία άλλη αλληλεπίδραση δεν ήταν σημαντική, ούτε η αλληλεπίδραση δωμάτιο x φάρμακο [$F(1,28)= .477, p= .496$], ούτε η τριπλή δωμάτιο x φάρμακο x στρες [$F(1,28)= .365, p= .555$]. Επίσης δεν ήταν σημαντική ούτε η επίδραση του φαρμάκου [$F(1,28)= .153, p= .699$], ούτε του στρες [$F(1,28)= .915, p= .347$], ούτε ο συνδυασμός τους [$F(1,28)= .227, p= .638$].

Συμπερασματικά, τα ζώα που είχαν υποστεί το πρωτόκολο στρες, είχαν ελαφρώς αυξημένο αριθμό εισόδων στο δεξί δωμάτιο σε σχέση με τα ζώα που αποτελούσαν την ομάδα control ως προς το στρες (μέσος όρος διαφοράς: 3,870).

iii) Για το δεύτερο trial, στο οποίο μελετάται η προτίμηση του μυός για κοινωνικότητα (νέο CD1 ζώο) έναντι ενός άψυχου αντικειμένου (άδειος κλωβός), μελετήθηκε ο χρόνος που δαπάνησε ο πειραματικός μυς σε κάθε δωμάτιο, καθώς και ο χρόνος που πέρασε ο μυς οσφραινόμενος είτε τον άδειο κλωβό, είτε τον νέο μυ. Η στατιστική ανάλυση για τον χρόνο που πέρασε ο μυς σε κάθε δωμάτιο, η ανάλυση του οποίου δείχνει τη τάση του ζώου για κοινωνικότητα, έδειξε στατιστική σημαντικότητα του δωματίου [$F(1,28)= 39.717, p= .000$], καθώς και της

αλληλεπίδρασης δωμάτιο x στρες [$F(1,28)= 8.734, p= .006$]. Δεν βρέθηκε σημαντικότητα ούτε της αλληλεπίδρασης δωμάτιο x φάρμακο [$F(1,28)= 1.808, p= .190$], ούτε της τριπλής αλληλεπίδρασης δωμάτιο x στρες x φάρμακο [$F(1,28)= .137, p= .714$]. Επίσης, δεν βρέθηκε σημαντική η επίδραση του φαρμάκου [$F(1,28)= .094, p= .762$], ούτε του στρες [$F(1,28)= .879, p= .356$, αλλά ούτε και ο συνδυασμός φάρμακο x στρες [$F(1,28)= .982, p= .330$]. Όλα τα ζώα δηλαδή, ανεξάρτητα από το χειρισμό που είχαν δεχθεί, προτίμησαν το δωμάτιο όπου υπήρχε το νέο ζώο, έναντι του δωματίου με τον άδειο κλωβό, όπως είναι η φυσιολογική συμπεριφορά των ποντικών, ενώ τα ζώα που είχαν υποστεί το περιφερηβικό πρωτόκολλο του στρες, πέρασαν κατά μέσο όρο λιγότερο χρόνο στο δωμάτιο με το αντικείμενο σε σχέση με τα control ως προς το στρες ζώα, και περισσότερο στο δωμάτιο με τον μυ.

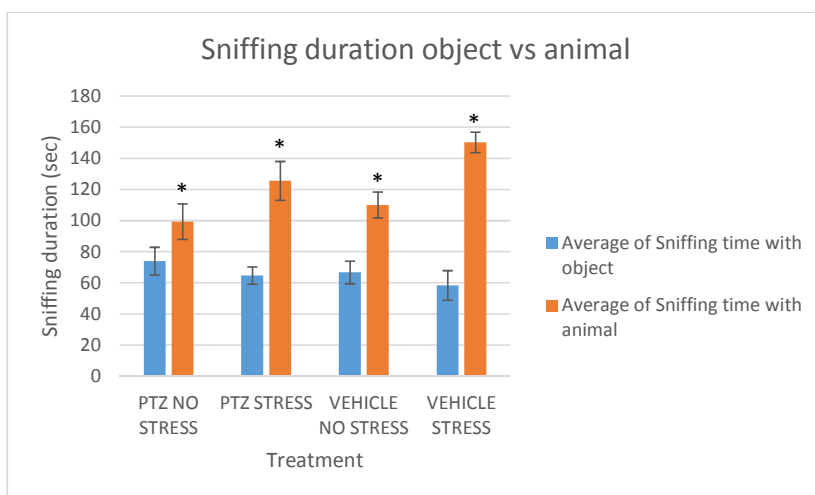
Χρόνος που δαπανήθηκε στο δωμάτιο με το αντικείμενο και το άγνωστο ζώο



iv) Όσον αφορά το χρόνο της όσφρησης για τον άδειο κλωβό και τον μυ, μέτρηση η οποία δείχνει και πάλι τη τάση για κοινωνικότητα, η στατιστική ανάλυση έδειξε πως

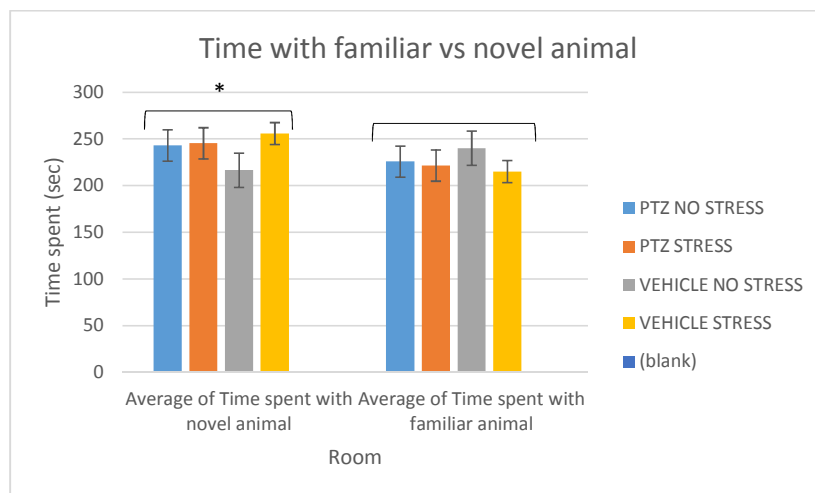
υπήρχε σημαντική διαφορά της επίδρασης του δωματίου [F(1,28)= 90.566, p= .000], της αλληλεπίδρασης δωμάτιο x φάρμακο [F(1,28)= 4.446, p= .044], καθώς και της αλληλεπίδρασης δωμάτιο x στρες [F(1,28)= 13.008, p= .001]. Αντιθέτως, δεν βρέθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά της αλληλεπίδρασης δωμάτιο x φάρμακο x στρες [F(1,28)= .315, p= .579], ενώ ούτε η επίδραση του φαρμάκου ήταν σημαντική [F(1,28)= .610, p= .441], ούτε του στρες [F(1,28)= 3.036, p= .092], αλλά ούτε και η συνδυαστική τους επίδραση [F(1,28)= .281, p= .600]. Συμπερασματικά, όλα τα ζώα διέθεσαν περισσότερο χρόνο οσφραϊνόμενα τον μυ έναντι του άδειου κλωβού, ενώ οι μύες που είχαν υποστεί το πρωτόκολο στρες, πέρασαν περισσότερο χρόνο οσφραϊνόμενοι τον μυ έναντι αυτών που δεν είχαν υποστεί στρες [Mean difference (I-J)= 33.151]. Τα ζώα που αποτέλεσαν την ομάδα control ως προς το φάρμακο είχαν επίσης αυξημένο χρόνο όσφρησης προς τον μυ σε σχέση με τα PTZ ζώα [Mean difference (I-J)= 17.723]. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν πως το στρες επέδρασε στη κοινωνική συμπεριφορά, οδηγώντας σε αυξημένη κοινωνικότητα, ενώ αντιθέτως η επαγωγή της κρίσης, επέδρασε αρνητικά, μειώνοντάς την.

Χρόνος όσφρησης αντικειμένου και αγνώστου μύος



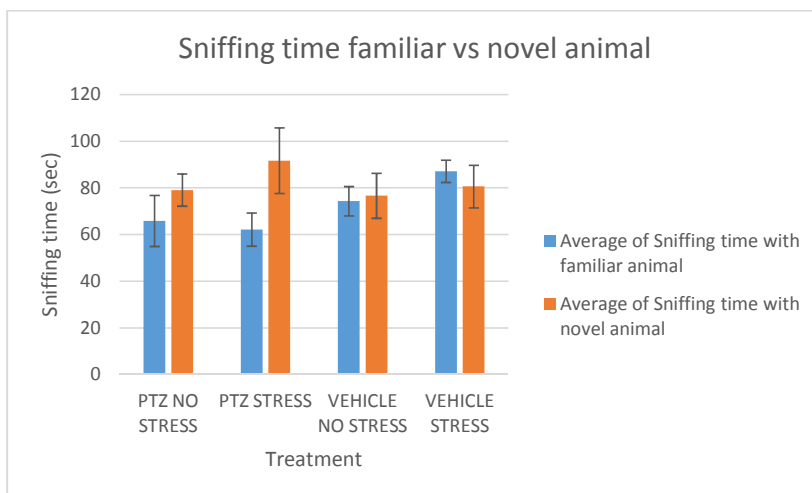
ν) Τέλος, στο τρίτο trial, μελετώντας το χρόνο που δαπανήθηκε από τον πειραματικό μυ στο δωμάτιο με τον οικείο πλέον μυ είτε στο δωμάτιο με τον άγνωστο μυ, η στατιστική ανάλυση έδειξε πως μόνο η επίδραση του δωματίου ήταν σημαντική [F(1,28)= 677.031, p= .000], αποτέλεσμα που δείχνει πως όλοι οι μύες, ανεξαρτήτως χειρισμού, πέρασαν περισσότερο χρόνο στο δωμάτιο με τον νέο μυ έναντι του ήδη γνωστού, δείχνοντας έτσι τη προτίμησή τους για το νέο κοινωνικό περιβάλλον. Καμία άλλη επίδραση δεν ήταν σημαντική, ούτε η αλληλεπίδραση δωμάτιο x φάρμακο [F(1,28)= .106, p= .748], ούτε η αλληλεπίδραση δωμάτιο x στρες [F(1,28)= 1.500, p= .231], αλλά ούτε και η τριπλή δωμάτιο x φάρμακο x στρες [F(1,28)= 1.477, p= .234]. Επίσης δε βρέθηκε στατιστική σημαντικότητα του φαρμάκου [F(1,28)= .461, p= .503], ούτε του στρες [F(1,28)= 1.720], αλλά ούτε και η αλληλεπίδραση φάρμακο x στρες [F(1,28)= 1.062, p= .312]. Ούτε η επαγωγή στρες, ούτε η επαγωγή κρίσης αλλά ούτε και ο συνδυασμός τους είχε επίδραση στη προτίμηση νέου κοινωνικού περιβάλλοντος.

Χρόνος με οικείο και άγνωστο μυ



vi) Τέλος, όσον αφορά τον χρόνο που διήρκεσε η συμπεριφορά όσφρησης προς τον άγνωστο και τον οικείο μυ, δε βρέθηκε στατιστικώς καμία σημαντική επίδραση, ούτε η επίδραση του δωματίου [$F(1,28)=2,391, p= .133$], ούτε η αλληλεπίδραση δωμάτιο x φάρμακο [$F(1,28)= 3,540, p= .070$], ούτε το δωμάτιο x στρες [$F(1,28)= .087, p= .770$], ούτε το δωμάτιο x στρες x φάρμακο [$F(1,28)= 1,008, p= .324$]. Ταυτόχρονα, εξετάζοντας τις κύριες επιδράσεις, δεν φάνηκε να είναι σημαντική ούτε η επίδραση του φαρμάκου [$F(1,28)= .550, p= .464$], ούτε του στρες [$F(1,28)= .911, p= .348$], αλλά ούτε και η αλληλεπίδρασή τους [$F(1,28)= .087, p= .770$]. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν πως ούτε η επαγωγή της πρώιμης κρίσης, ούτε η επαγωγή του περιφερηβικού στρες, αλλά ούτε και ο συνδυασμός τους, δεν είχε επίδραση στη προτίμηση για νέο κοινωνικό περιβάλλον, καθώς όλοι οι μύες, ανεξαρτήτως της ομάδας στην οποίαν ανήκαν, πέρασαν κατά μέσο όρο παρόμοιο χρόνο οσφραϊνόμενοι τόσο τον οικείο, όσο και τον άγνωστο νέο μυ.

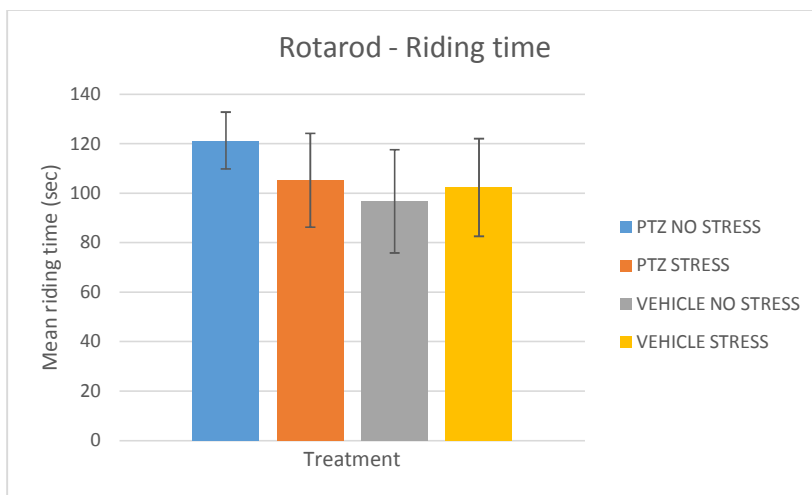
Χρόνος όσφρησης οικείου και αγνώστου μύος



M6.Περιστρεφόμενος κύλινδρος (Rotarod)

Στο πείραμα του περιστρεφόμενου κυλίνδρου, προκειμένου να αξιολογηθεί ο κινητικός συντονισμός, υπολογίστηκε ο μέσος χρόνος των trials, που έκανε κάθε ζώο να πέσει από τον κύλινδρο. Η διπλή ανάλυση διακύμανσης, δεν έδειξε καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά ούτε του στρες [$F(1,31) = .081, p = .778$], ούτε του φαρμάκου [$F(1,31) = .559, p = .461$], αλλά ούτε η αλληλεπίδρασή τους. Δηλαδή όλες οι ομάδες είχαν παρόμοιο μέσο χρόνο παραμονής πάνω στον κύλινδρο και δεν διέφεραν.

Χρόνος στον περιστρεφόμενο κύλινδρο



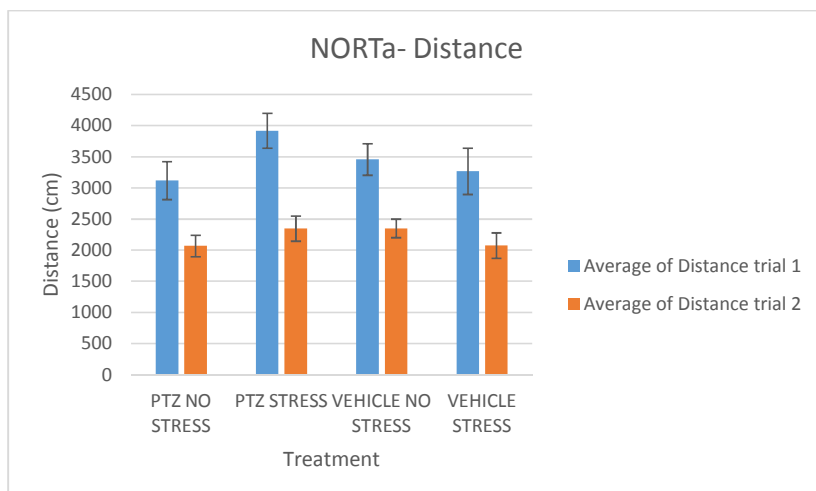
M7.Novel Object Recognition Task (NORT)

Για τη δοκιμάσια αναγνώρισης νέου αντικειμένου αναλύθηκαν: για τη πρώτη μέρα η διανυόμενη απόσταση και στα δύο trial, για τη δεύτερη μέρα ο χρόνος που πέρασε ο μυσ οσφραϊνόμενος το αριστερό και το δεξί αντικείμενο και στα δύο trial, ενώ για τη τρίτη μέρα ο χρόνος που πέρασε ο μυσ οσφραϊνόμενος τα δύο ίδια αντικείμενα

(πρώτο trial), αλλά και ο χρόνος που πέρασε οσφραϊνόμενος το οικείο και το άγνωστο αντικείμενο (δεύτερο trial).

a) Πρώτη μέρα: Η πρώτη μέρα, περιελάμβανε δύο trials, διάρκειας 10 min το καθ'ένα, τα οποία είχαν σκοπό να εξοικειώσουν τον πειραματικό μυ με τη διάταξη, και να εξαλειφθεί η επίδραση του αγνώστου χώρου στις μετέπειτα μετρήσεις. Για το λόγο αυτό, εξετάστηκε η απόσταση που διανύθηκε και στα δύο trial, καθώς μειωμένη δαπανούμενη απόσταση υποδεικνύει ότι έλαβε χώρα η εξοικείωση, η οποία αποτελεί και μορφή άδηλης μάθησης.

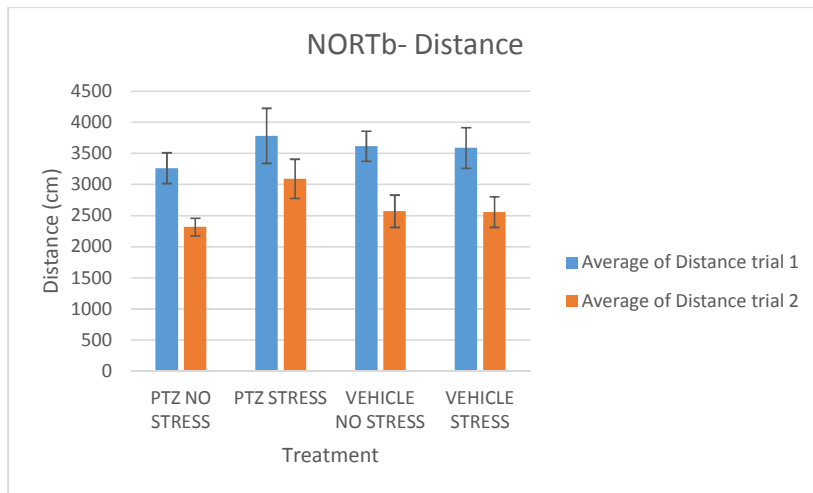
Η ανάλυση της δαπανούμενης απόστασης, έδειξε σημαντική την επίδραση του trial [$F(1,28)= 187.524, p= .000$]. Πέραν αυτού του αποτελέσματος, δε βρέθηκε καμία άλλη σημαντική αλληλεπίδραση, ούτε του trial x φάρμακο [$F(1,28)= .798, p= .379$], ούτε του trial x στρες [$F(1,28)= 2.882, p= .101$], αλλά ούτε και η τριπλή αλληλεπίδραση trial x φάρμακο x στρες [$F(1,28)= 1.489, p= .233$]. Επίσης, δεν βρέθηκε στατιστική σημαντικότητα ούτε του φαρμάκου [$F(1,28)= .127, p= .724$], ούτε του στρες [$F(1,28)= .521, p= .476$], αλλά ούτε και η αλληλεπίδρασή τους φάρμακο x στρες [$F(1,28)= 3.329, p= .079$]. Συμπερασματικά, όλες οι ομάδες, δένυσαν περισσότερη απόσταση το πρώτο trial έναντι του δευτέρου, δίχως έτσι να αποκλίνουν από τη φυσιολογική συμπεριφορά.



b) Δεύτερη μέρα:

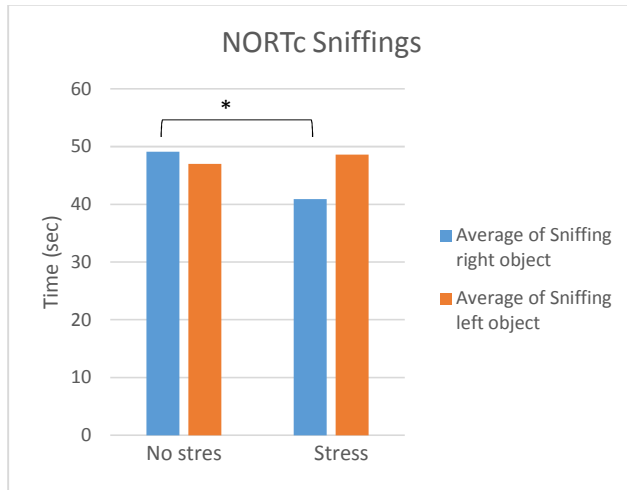
i) Όσον αφορά τη διανυόμενη απόσταση για τη δεύτερη μέρα, μέτρηση που αποτελεί δείκτη της εξοικείωσης και συνεπώς άδηλης μάθησης, η μόνη στατιστική σημαντικότητα σημειώθηκε στο trial [$F(1,28)= 62.864, p= .000$]. Όλες οι ομάδες δηλαδή διένυσαν περισσότερη απόσταση κατά το πρώτο trial σε σχέση με το δεύτερο, παρουσιάζοντας έτσι μια τάση εξοικείωσης με τον χώρο. Καμία άλλη αλληλεπίδραση δεν ήταν σημαντική, ούτε του trial x φάρμακο [$F(1,28)= .875, p= .358$], ούτε η trial x στρες [$F(1,28)= .332, p= .569$], αλλά ούτε και η τριπλή trial x φάρμακο x στρες [$F(1,28)= .269, p= .608$]. Επιπλέον δε βρέθηκε σημαντικότητα του φαρμάκου [$F(1,28)= .013, p= .909$], ούτε του στρες [$F(1,28)= 1.406, p= .246$], αλλά ούτε και της αλληλεπίδρασης φάρμακο x στρες [$F(1,28)= 1.600, p=.216$].

Απόσταση



ii) Για το χρόνο που διήρκεσε η συμπεριφορά όσφρησης στο πρώτο trial, κατά το οποίο παρουσιάστηκαν τα δύο ίδια αντικείμενα, μέτρηση η οποία μας δείχνει αν υπάρχει κάποια προτίμηση από το ζώο για το αριστερό ή δεξί αντικείμενο, δε βρέθηκε στατιστική σημαντικότητα της επίδρασης του αντικειμένου [$F(1,28)= 1.471$, $p= .235$], ούτε της αλληλεπίδρασης αντικείμενο x φάρμακο [$F(1,28)= .138$, $p= .713$], ούτε της τριπλής αλληλεπίδρασης αντικείμενο x φάρμακο x ες [$F(1,28)= .071$, $p= .792$]. Η μόνη στατιστικώς σημαντική διαφορά βρέθηκε στην αλληλεπίδραση αντικείμενο x στρες [$F(1,28)= 4.587$, $p= .041$], δεδομένο που δείχνει πως τα ζώα που είχαν υποστεί το πρωτόκολο στρες παρουσίασαν μειωμένη συμπεριφορά όσφρησης στο δεξί αντικείμενο σε σχέση με τα ζώα που αποτελούσαν την ομάδα control ως προς το στρες. Ταυτόχρονα, δε φάνηκε κάποια επίδραση του φαρμάκου [$F(1,28)= .188$, $p= .668$], ούτε του στρες [$F(1,28)= .843$, $p= .366$], αλλά ούτε και η αλληλεπίδρασή τους [$F(1,28)= .022$, $p= .883$].

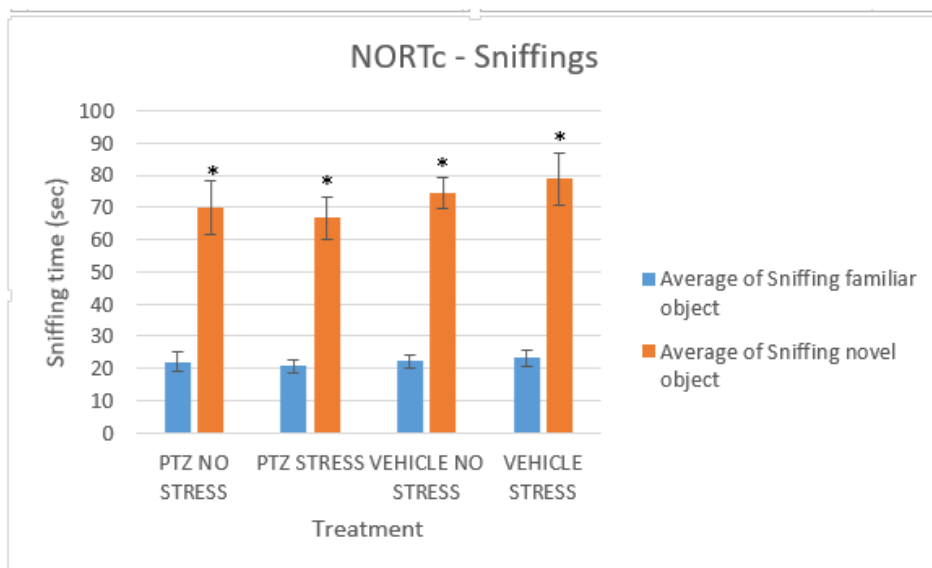
Χρόνος όσφρησης



c) Τρίτη μέρα:

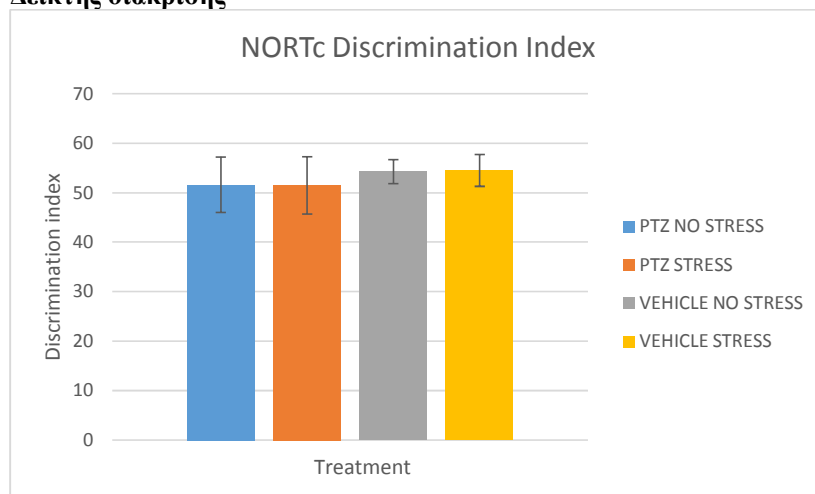
i) Για το πρώτο trial, κατα το οποίο τα ζώα εκτέθηκαν στα δυο ίδια αντικείμενα, δε βρέθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στην διάρκεια όσφρησης των 2 αντικειμενων. Συγκεκριμένα δεν φάνηκε να υπάρχει επίδραση του αντικειμένου [$F(1,28)= .048, p= .828$], ούτε αλληλεπίδραση του αντικειμένου x φάρμακο [$F(1,28)= .444, p= .511$], ούτε αντικείμενο x στρες [$F(1,28)= .113, p= .740$], αλλά ούτε και η τριπλή αλληλεπίδραση αντικείμενο x φάρμακο x στρες [$F(1,28)= .801, p= .378$]. Επιπλέον καμιά μεμονωμένη επίδραση δε φάνηκε σημαντική, ούτε του φαρμάκου [$F(1,28)= .001, p= .974$], ούτε του στρες [$F(1,28)= .197, p= .661$], αλλά ούτε και ο συνδυασμός τους [$F(1,28)= .591, p= .449$]. Δηλαδή όλα τα ζώα, πέρασαν παρόμοιο χρόνο οσφραϊνόμενα και τα δύο αντικείμενα και αυτή η συμπεριφορά δεν επηρεάστηκε ούτε από την επαγωγή κρίσης, ούτε από το στρες, αλλά κι ούτε από τον συνδυασμό τους.

ii) Για το δεύτερο trial, όπου εξετάστηκε ο χρόνος όσφρησης του μυός προς το οικείο και το μη οικείο αντικείμενο, η ανάλυση έδειξε πως υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά του αντικειμένου [$F(1,28)= 234.760$, $p= .000$], δεδομένο το οποίο δείχνει πως όλα τα ζώα, ανεξαρτήτως χειρισμού, πέρασαν περισσότερο χρόνο όσφραίνόμενοι το άγνωστο αντικείμενο έναντι του οικείου. Να σημειωθεί πως καμία άλλη αλληλεπίδραση δεν ήταν σημαντική, ούτε η αντικείμενο x φάρμακο [$F(1,28)= 1.160$, $p= .291$], ούτε η αντικείμενο x στρες [$F(1,28)= .012$, $p= .913$], αλλά ούτε και η τριπλή αντικείμενο x φάρμακο x στρες [$F(1,28)= .146$, $p= .705$]. Επιπλέον, καμία μεμονωμένη επίδραση δεν βρέθηκε σημαντική, ούτε αυτή του φαρμάκου [$F(1,28)= 1.431$, $p=.242$], ούτε αυτή του στρες [$F(1,28)= .003$, $p= .960$], αλλά ούτε και η αλληλεπίδραση φάρμακο x στρες [$F(1,28)= .359$, $p= .554$]. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει πως όλα τα ζώα αναγνώρισαν το οικείο αντικείμενο και πως ούτε το στρες, ούτε η κρίση, αλλά ούτε και ο συγκερασμός τους, δεν επέφεραν ελλείμματα στη μνημονική ικανότητα των ζώων.



iii) Τέλος, υπολογίστηκε ο επί τοις εκατό δείκτης διάκρισης του οικείου από το άγνωστο αντικείμενο, δείκτης που δείχνει την ικανότητα του ζώου να διακρίνει τα δύο αντικείμενα. Ο δείκτης αυτός υπολογίστηκε ως $100 \times (\text{χρόνος όσφρησης νέου αντικειμένου} - \text{χρόνος όσφρησης οικείου αντικειμένου}) / (\text{χρόνος όσφρησης νέου αντικειμένου} + \text{χρόνος όσφρησης οικείου αντικειμένου})$. Στη στατιστική ανάλυση δε βρέθηκε κάποια σημαντική διαφορά ούτε του φαρμάκου [$F(1,31) = .346, p = .561$], ούτε του στρες [$F(1,31) = .173, p = .681$], αλλά ούτε και ο συνδυασμός τους φάρμακο x στρες [$F(1,31) = .054, p = .818$]. Δηλαδή όλα τα ζώα παρουσίασαν την ίδια ικανότητα διάκρισης του νέου αντικειμένου, ικανότητα η οποία δεν επηρεάστηκε ούτε από τη κρίση, ούτε από το στρες, αλλά ούτε και από το συγκερασμό τους.

Δείκτης διάκρισης



Συμπεριφορά	Τεστ	Επίδραση κρίσης	Επίδραση στρες	Συνδυαστικά
Αυθόρμητη συμπεριφορά	Nesting	-	-	-
	Marble burying	-	-	-
Εξοικείωση	<u>Openfield</u>	-	-	-
	NORT	-	-	-
Κινητικότητα & Εξερευνητικότητα	Marble burying	-	-	-
	<u>Openfield</u>	-	-	-
	EPM	-	↑	-
	NORT	-	-	-
Κοινωνική αλληλεπίδραση	Sociability & Social novelty	-	↑	-
Αγχώδης συμπεριφορά	<u>Openfield</u>	-	-	-
	EPM	-	-	-
Μνήμη	NORT	-	-	-

Στη συνέχεια, θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα των ανοσοϊστοχημικών μελετών που είχαν σκοπό να εξετάσουν τις επιδράσεις των πρώιμων επιληπτικών κρίσεων και του περιεφηβικού στρες, στη δομή του εγκεφάλου των ενήλικων πλεόν ζώων.

Τα ζώα των οποίων οι εγκέφαλοι χρησιμοποιήθηκαν για τις εν λόγω ανοσοϊστοχημείες, είχαν υποστεί το ίδιο πρωτόκολο στρες, κατά τη περίοδο της εφηβείας, όπως και τα ζώα που μελετήσαμε συμπεριφορικά. Εντούτοις, δεν είχαν λάβει μια και μόνο ένεση PTZ τη P24, αλλά επαναλαμβανόμενες, τις μέρες P10-15. Δηλαδή το πρωτόκολο επαγωγής επιληψίας, διέφερε και ως προς τον αριθμό των επιληπτικών κρίσεων, αλλά και ως προς το αναπτυξιακό στάδιο κατά το οποίο αυτές έλαβαν χώρα.

Κάναμε αυτήν την επιλογή καθώς η βιβλιογραφία δίδεται. Από τη μια πλευρά, υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν πως μετά από μια παρατεταμένη κρίση, ζώα μικρά σε ηλικία (μικρότερα των δύο εβδομάδων) έχουν ελάχιστη ως καθόλου κυτταρική απώλεια στη περιοχή του υποκάμπου (Tremblay et al., 1984; Cilio et al., 2003). Ταυτόχρονα, έχει δειχθεί πως επαναλαμβανόμενες πρώιμες επιληπτικές κρίσεις δύνανται να επιφέρουν συναπτική αναδιοργάνωση (Sogawa et al., 2001; Holmes et al., 1998). Ειδικότερα, έχει προταθεί πως η επαγωγή κρίσεων οδηγεί σε αύξηση του αριθμού των κοκκιωδών κυττάρων, ενώ η αύξηση φαίνεται να είναι region specific, δηλαδή λαμβάνει χώρα μόνο σε συγκεκριμένες περιοχές (Holmes et al., 1998). Στον αντίποδα, υπάρχουν μελέτες όπως αυτή των Mc Cabe et al οι οποίες υποστηρίζουν το αντίθετο, ότι δηλαδή οι πρώιμες επαναλαμβανόμενες κρίσεις επιφέρουν μείωση του αριθμού των εν λόγω κυττάρων (Mc Cabe et al., 2001).

Ταυτόχρονα, τα γλυκοκορτικοειδή που εκκρίνονται ως απόκριση σε στρεσογόνους παράγοντες, φαίνεται πως προκαλούν επιβλαβείς επιδράσεις στον εγκέφαλο, οδηγώντας σε νευρική ατροφία, νευροτοξικότητα, ενώ καθιστά τους νευρώνες πιο εύθραυστους (Sapolsky, 1996). Ενώ υπάρχει βιβλιογραφία για τη συνδυαστική επίδραση πρώιμων επαναλαμβανόμενων κρίσεων και επαγωγή στρες στη δομή του εγκεφάλου, με ευρήματα

που δίστανται μεν, εντούτοις, όλες αφορούν τον ιππόκαμπο και την αμυγδαλή. Από όσο γνωρίζουμε, δεν έχει μελετηθεί ο φλοιός κάτω από τις προαναφερθείσες συνθήκες, και αυτός ήταν ο λόγος που επιλέξαμε αυτή τη μεθοδολογία. Έγινε ήδη αναφορά στα ROIs που επιλέξαμε, τα οποία είναι ο φλοιός του προσαγωγίου, ο πρωτοταγής κινητικός φλοιός, καθώς και ο σωματαιοσθητικός. Η επιλογή του φλοιού του προσαγωγίου έγινε κυρίως λόγω του ρόλου του στη μάθηση και τη μνήμη, υποθέτωντας πως ίσως να υπάρχει συσχέτιση της εν λόγω περιοχής με τη μεταβολή του αριθμού των Pν κυττάρων αλλά και των PNNs, καθώς τα τελευταία παίζουν ρόλο στη πλαστικότητα, την οποία εμποδίζουν, ενώ πολύ συχνά σχηματίζονται γύρω από τα πρώτα. Η πρωτεΐνη παρβαλβουμίνη από την άλλη, βρίσκεται σε όλους τους GABAεργικούς νευρώνες, και λόγω αυτής της σύνδεσης, εικάζεται πως τα κύτταρα που την εκφράζουν, επηρεάζονται από τις επιληπτικές κρίσεις. Επιπλέον, τόσο ο κινητικός αλλά και ο σωματαιοσθητικός φλοιός, σχετίζονται με τις κρίσεις, συνεπώς είναι εύλογη η επιλογή τους.

N.Αποτελέσματα stereology

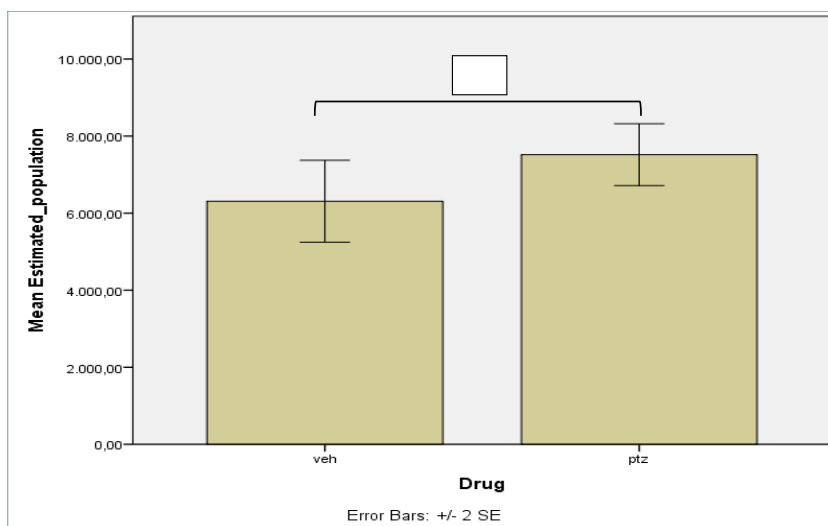
Σε αυτό το κεφάλαιο, θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα σχετικά με τον αριθμό των PV κυττάρων, των περινευρωνικών δικτυών (PNNs), καθώς για τον συνεντοπισμό των δυο δεικτών, για τη κάθε εγκεφαλική περιοχή που εξετάστηκε.

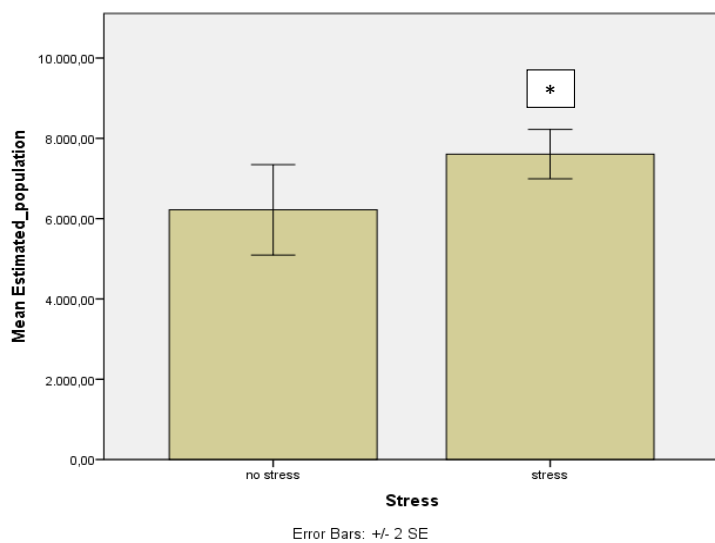
N1. Κύτταρα που εκφράζουν την παρβαλβουμίνη (PV+)

N1.1 Φλοιός του προσαγωγίου - CG1

Η διπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης έδειξε στατιστική σημαντικότητα τόσο στο στρες [$F(1,12)= 6.909, p=.022$], όσο και στο φάρμακο [$F(1,12)= 5.243, p= .041$]. Η αλληλεπίδραση φάρμακο x στρες δεν ήταν στατιστικώς σημαντική [$F(1,12)= 3.419, p= .089$].

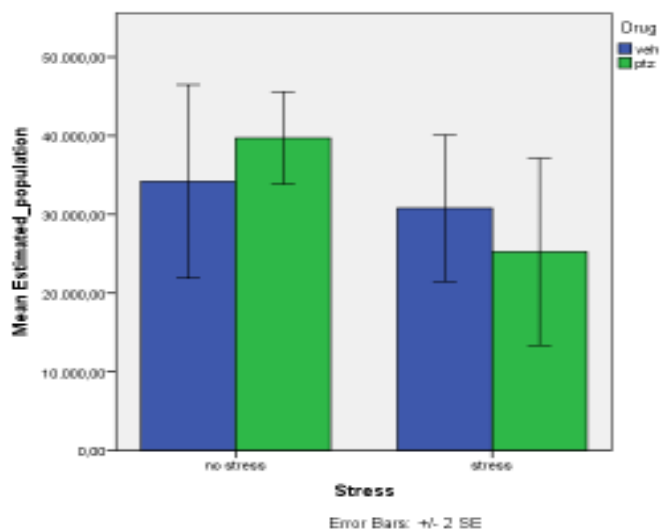
Δηλαδή τα ζώα που δεν έλαβαν ούτε φάρμακο ούτε στρες, είχαν σημαντικά λιγότερο αριθμό κυττάρων που εκφράζουν την παρβαλουμίνη σε σύγκριση με τα ζώα που έλαβαν και φάρμακο και στρες, αλλά και με τα ζώα που δεν είχαν λάβει φάρμακο, αλλά είχαν υποστεί στρες. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν πως οι επαναλαμβανόμενες πρώιμες επιληπτικές κρίσεις κατά τις μεταγεννητικές μέρες P10-15, προκαλούν αύξηση των Pn+ κυττάρων, ποσοστό που υπολογίστηκε στο 16,52%. Επίσης, η επαγωγή στρες κατά τη διάρκεια της κρίσιμης περιόδου της εφηβείας, είχε επίδραση στον αριθμό των PV+ κυττάρων, προκαλώντας τους αύξηση κατά 15,78%. Η συνδυαστική τους επίδραση, των επαναλαμβανόμενων, πρώιμων κρίσεων και του περιεφηβικού στρες, δεν επέφερε αλλαγές στον αριθμό των εν λόγω κυττάρων.





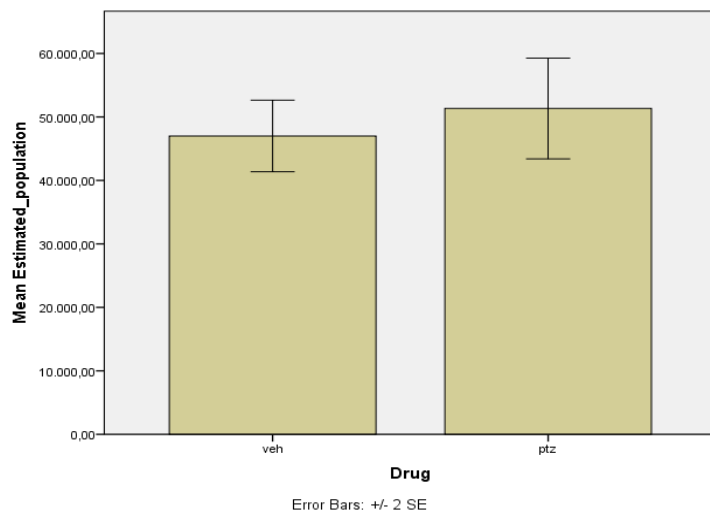
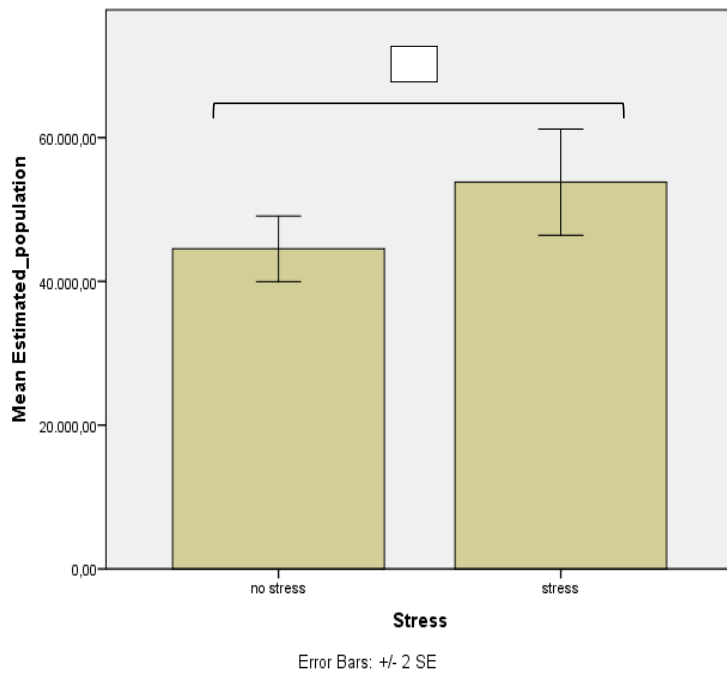
N1.ii.Πρωτοταγής κινητικός φλοιός (M1)

Αντίθετα με τον φλοιό του προσαγωγίου, η διπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης δεν έδειξε διαφορές ανάμεσα στις τέσσερις πειραματικές ομάδες στον πρωτοταγή κινητικό φλοιό - M1. Συγκεκριμένα, η ανάλυση έδειξε πως ούτε το φάρμακο [$F(1,15) = .036, p = .854$] ήταν σημαντικό, ούτε το στρες [$F(1,15) = 3.096, p = .104$], αλλά ούτε η αλληλεπίδρασή τους ήταν σημαντική [$F(1,15) = 1.184, p = .298$]. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι ούτε το στρες μεμονωμένα, ούτε οι πρώιμες επιληπτικές κρίσεις από μόνες τους, αλλά ούτε και ο συνδυασμός τους επηρεάζουν τον αριθμό των PV+ κυττάρων στην εν λόγω εγκεφαλική περιοχή.



N1.iii.S1BF

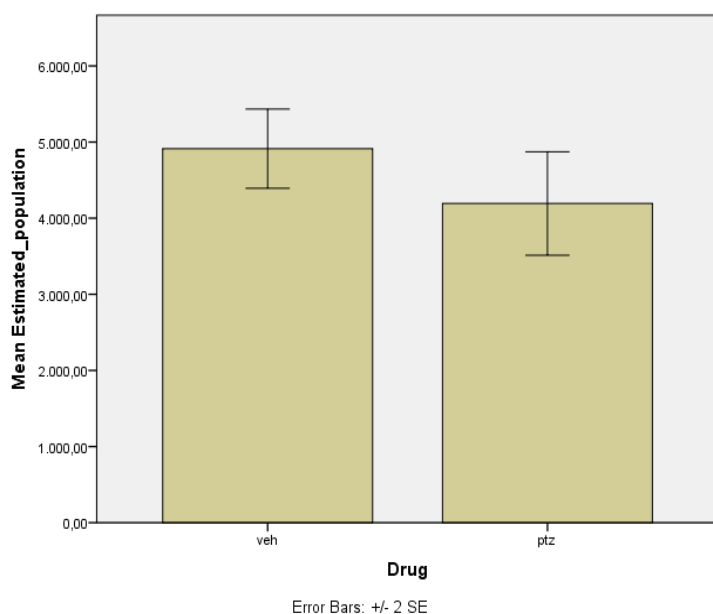
Η διπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης, έδειξε στατιστικώς σημαντική επίδραση του στρες [$F(1,12) = 5.390, p = .039$], σε αντίθεση με αυτή του φαρμάκου που δεν ήταν σημαντική [$F(1,12) = 1.179, p = .299$]. Ταυτόχρονα, δε βρέθηκε σημαντική η αλληλεπίδραση φάρμακο x στρες [$F(1,15) = 3.140, p = .090$]. Δηλαδή τα ζώα που είχαν υποστεί στρες, είχαν κατα 18,84% αυξημένο αριθμό κυττάρων, έναντι αυτών που δεν είχαν λάβει. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν πως η επαγωγή περιεφηβικού στρες οδηγεί σε αύξηση των PV+ κυττάρων στο σωματισθητικό φλοιό, ενώ οι πρώιμες επιληπτικές κρίσεις δεν τα επηρεάζουν. Ο δε συνδυασμός των δυο, δεν προκαλεί περαιτέρω μεταβολή στην εν λόγω περιοχή.



N2. Περινευρωνικά δίκτυα (PNS)

N2.i. Φλοιός του προσαγωγίου (CG1)

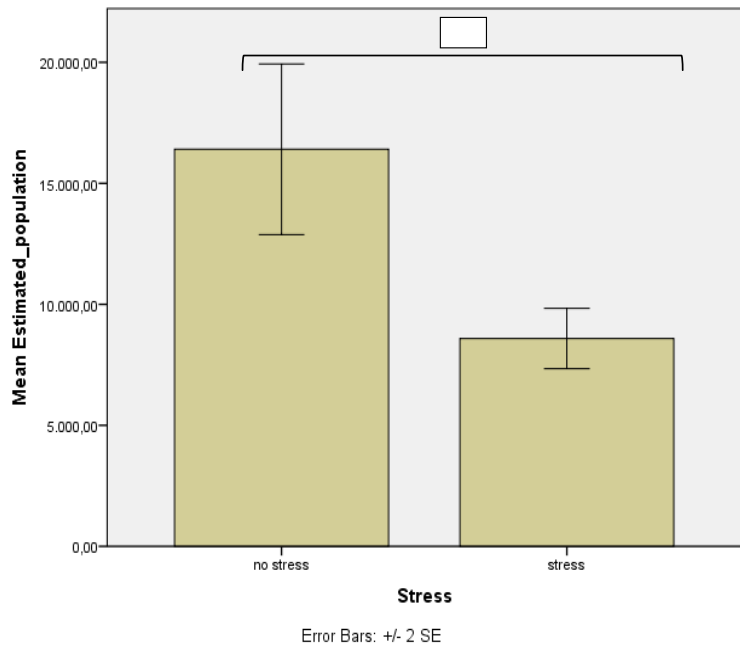
Η διπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης, δεν έδειξε στατιστική σημαντικότητα ούτε του στρες [$F(1,12)=3.251, p=.097$], ούτε του φαρμάκου [$F(1,12)= 3.104, p= .104$], αλλά ούτε και της αλληλεπίδρασής τους [$F(1,12)= .059, p=.812$]. Δηλαδή, ούτε το στρες μεμονωμένα, ούτε το PTZ μεμονωμένα, αλλά ούτε και ο συνδυασμός τους δεν επηρέασαν τον αριθμό των PV κυττάρων.

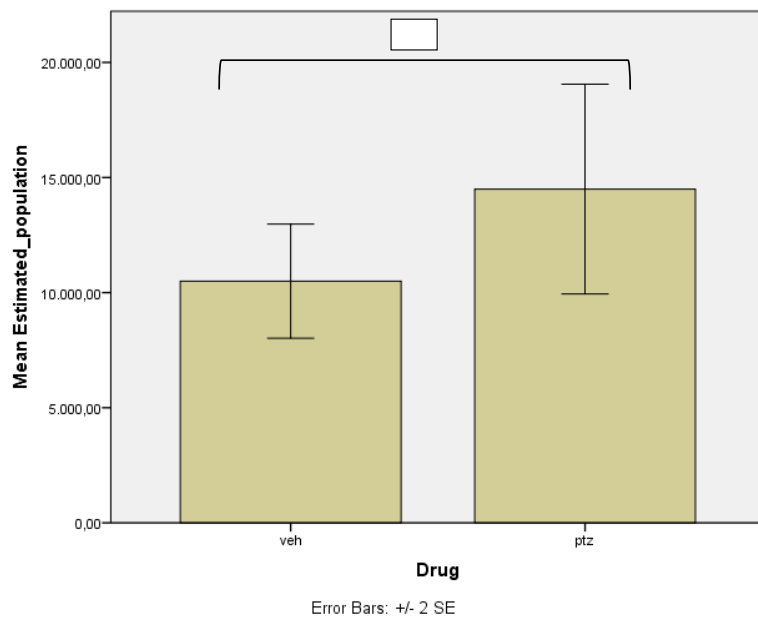


2.2.Πρωτοταγής κινητικός φλοιός (M1)

Η διπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης, έδειξε στατιστική σημαντικότητα του φαρμάκου [$F(1, 15)= 7.447, p= .018$], καθώς και του στρες [$F(1,15)= 28,504, p= .000$]. Αντίθετα, η αλληλεπίδραση stress x φάρμακο δεν ήταν σημαντική [$F(1,15)= 3,350, p=.092$]. Δηλαδή υπήρξε διαφορά μεταξύ των stress και no stress [Mean difference (I-J)= 17824,5541, $p= .000$] αλλά και μεταξύ των ptz και vehicle [Mean difference (I-J)= 13999,4941, $p= .018$]. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει πως και η επαγωγή πρώιμων επαναλαμβανόμενων κρίσεων μεμονωμένα προκάλεσε αύξηση των κυττάρων κατά 49,80%. Ταυτόχρονα, η επαγωγή στρες

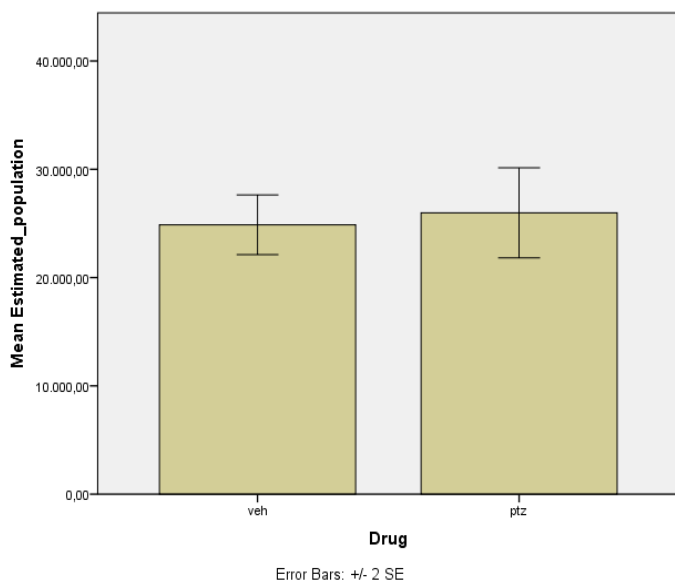
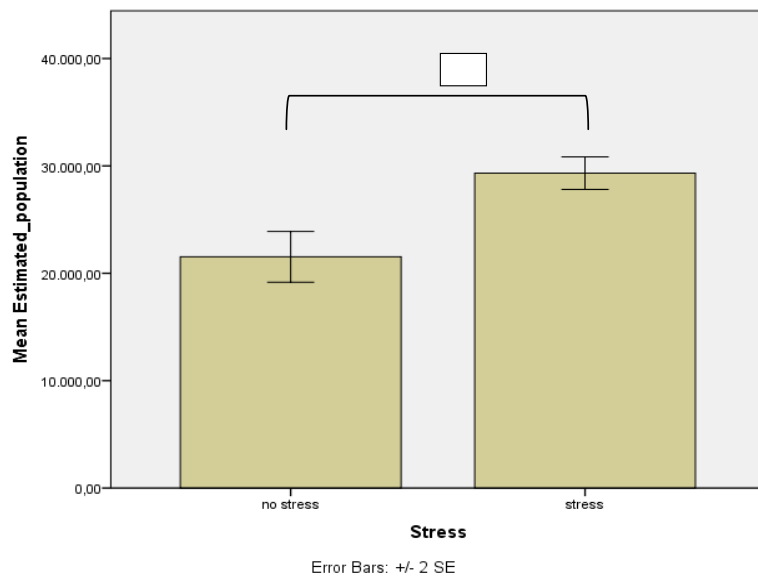
κατά τη περίοδο της εφηβείας είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των PNNs στον πρωτοταγή κινητικό φλοιό σε σύγκριση με τα no stress ζώα κατά 28,22%. Ο συνδυασμός τους, δεν απέφερε κάποια αλλαγή στον αριθμό των PNNs.





N2iii.Σωματισθητικός φλοιός (S1BF)

Η διπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης δεν έδειξε πουθενά στατιστική σημαντικότητα, παρά μόνο του στρες [$F(1,15) = 29.197, p = .000$]. Δε βρέθηκε σημαντική η επίδραση του φαρμάκου [$F(1,15) = .590, p = .457$], αλλά ούτε και η αλληλεπίδρασης φάρμακο x στρες [$F(1,15) = .657, p = .433$]. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει πως το περιφερηβικό στρες αύξησε επηρρέασε τον αριθμό των PNNs, αυξάνοντας τον σε ποσοστό που υπολογίστηκε στο 30,91%. Από την άλλη πλευρά, το φάρμακο, δεν φάνηκε να έχει καμία επίδραση στον αριθμό των PNNs, ενώ το ίδιο παρατηρήθηκε και για το συνδυασμό φάρμακο με στρες.



N3. Συνεντοπισμος PV+ και PNNs

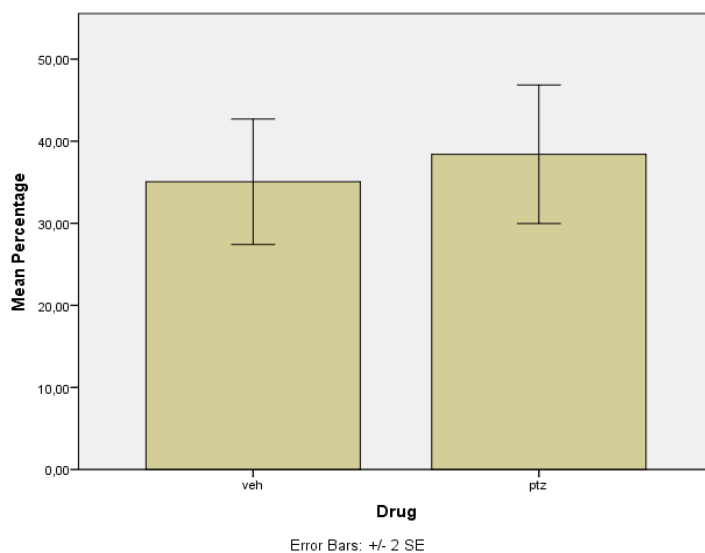
Τέλος υπολογίστηκε το ποσοστό των PV+ κυττάρων που συνεκφραζουν PNNs (colocalized).

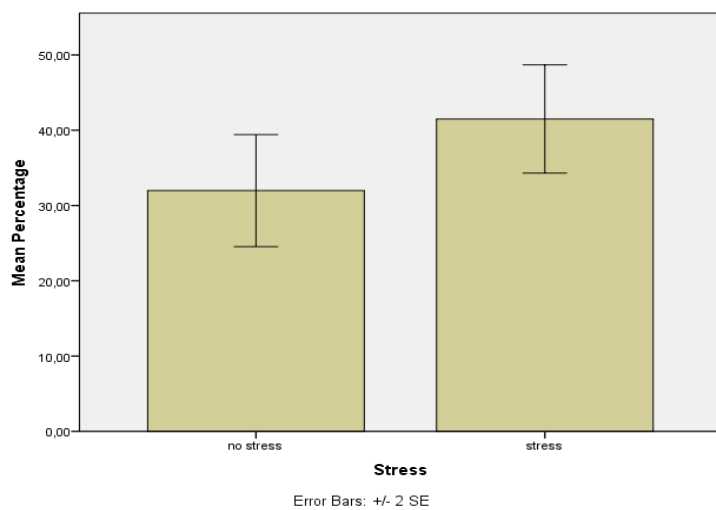
N3i. Ποσοστό colocalized PNNs σε PV+ κύτταρα

Σε καμία περιοχή από αυτές που εξετάζουμε δε βρέθηκε στατιστική σημαντικότητα στο ποσοστό επί τοις εκατό που συνεντοπίζονταν τα PNNs με τα PV+ κύτταρα, ούτε του στρες, ούτε του φαρμάκου, αλλά και ούτε της αλληλεπίδρασής τους. Εντούτοις, θα ακολουθήσουν κανονικά οι αναλύσεις ως είθισται.

N3ii. Φλοιός του προσαγωγίου

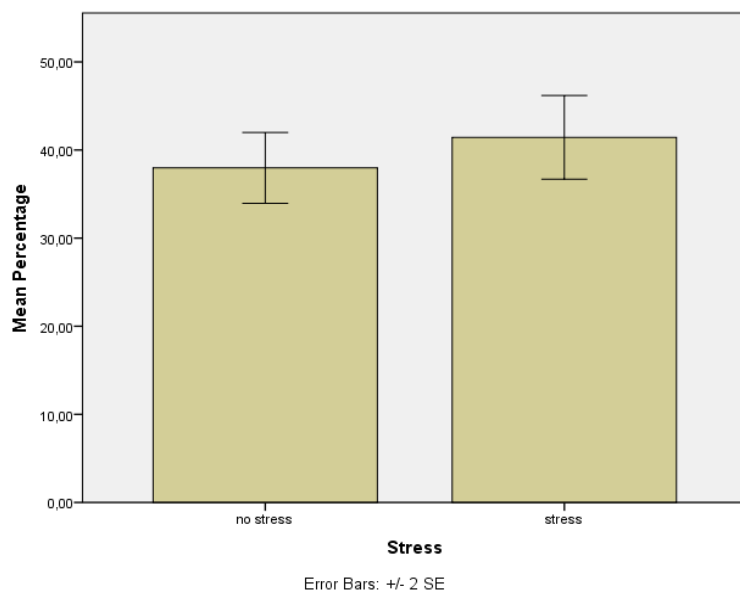
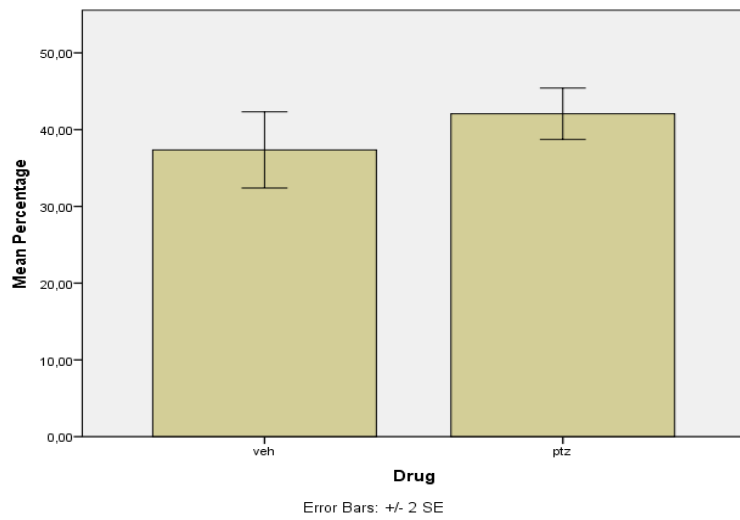
Η διπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης, στο ποσοστό των colocalized έδειξε πως δεν υπήρχε επίδραση του φαρμάκου [$F(1,15)= .439, p= .520$], ούτε του στρες [$F(1,15)= 3.542, p= .084$], αλλά ούτε η αλληλεπίδρασή τους ήταν σημαντική [$F(1,15)= 2.021, p= .164$]. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει πως ούτε η επαγωγή πρώιμων κρίσεων μεμονωμένα, ούτε και το περιεφηβικό στρες μόνο του, αλλά ούτε και ο συνδυασμός τους, δεν προκάλεσαν αλλαγές στο ποσοστό των συνεντοπισμένων PNNs και PV+ κυττάρων.





N3ii.Πρωτοταγής κινητικός φλοιός (M1)

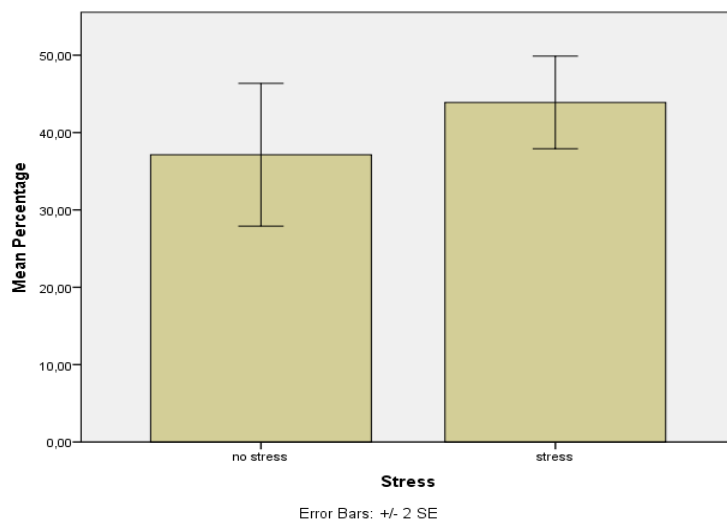
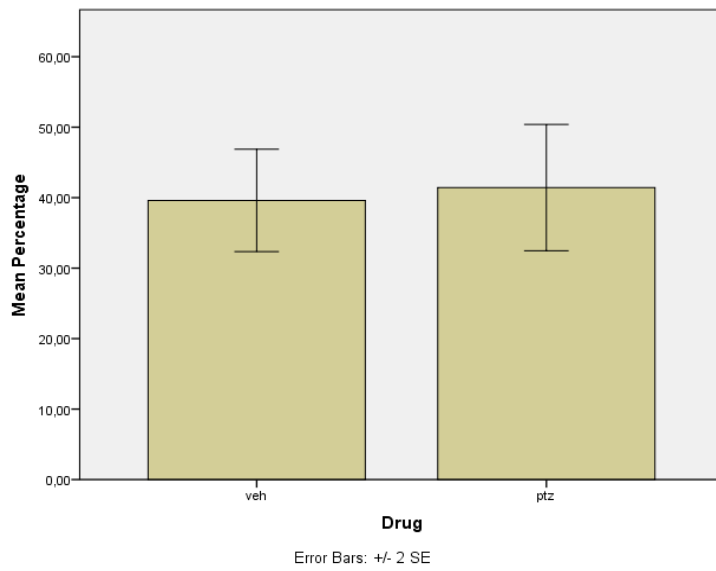
Ούτε στο κινητικό φλοιό υπήρξε κάποια σημαντική επίδραση. Συγκεκριμένα, η διπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης, δεν έδειξε στατιστική σημαντικότητα της επίδρασης του φαρμάκου [$F(1,15) = 2.356$, $p = .151$], ούτε του στρες [$F(1,15) = 1.271$, $p = .282$], αλλά ούτε και ο συνδυασμός τους [$F(1,15) = .011$, $p = .919$]. Και σε αυτή τη περιοχή λοιπόν, ούτε ο παράγοντας των κρίσεων από μόνος του, αλλά ούτε και ο παράγοντας του στρες από μόνος του, δεν επέδρασε στο ποσοστό των συνεντοπισμένων PNNs πάνω σε PV+ κύτταρα. Επίσης, ο συνδυασμός των προαναφερθέντων παραγόντων δεν είχε κάποια επίδραση στο εν λόγω ποσοστό.



N3iii.Σωματισθητικός φλοιός (S1BF)

Κι εδώ δεν υπήρξε στατιστική σημαντικότητα κανενός παράγοντα. Η διπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης δεν έδειξε σημαντικότητα του φαρμάκου [F(1,15)= .101, p= .757], ούτε του στρες [F(1,15)= 1.385, p= .262] αλλά ούτε και η επίδραση του φαρμάκου x στρες

[F(1,15)= .736, $p = .408$]. Δηλαδή ούτε το φάρμακο , ούτε το στρες αλλά ούτε και ο συνδυασμός τους δεν επέφεραν αλλαγές στο ποσοστό των συνεντοπισμένων PNNs και PV+ κυττάρων.



Παρακάτω συνοψίζονται τα αποτελέσματα του stereology σε μορφή πίνακα:

Για τα PV κύτταρα

PV+cells	Stress	Seizures	Combined
CG1	αυξηση 15,78%	αυξηση 16,52%	-
M1	-	-	-
SiBF	αυξηση 18,84%	-	-

Για τα PNNs

PNNs	Stress	Seizures	Combined
CG1	-	-	-
M1	μειωση 28,22%	αυξηση 49,80%	-
SiBF	αυξηση 30,91%	-	-

III. Συζήτηση

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι επιληπτικές κρίσεις επηρεάζουν ένα σημαντικό ποσοστό του πληθυσμού, και αν και η εμφάνισή τους μπορεί να λάβει χώρα σε όλες τις ηλικίες, εντούτοις υπάρχει υψηλότερο ποσοστό πιθανότητας να εμφανιστεί κατά το πρώτο έτος ζωής, ενώ μετά τα πέντε έτη, οι πιθανότητες μειώνονται σημαντικά

(Holmes & Ben-Ari, 1998; Józwiak et al., 2011). Επίσης, έχει δειχθεί πως οι πρώιμες επιληπτικές κρίσεις επηρεάζουν τόσο τη δομή του εγκεφάλου, αλλά και τη συμπεριφορά, επηρεάζοντας τη κοινωνικότητα, αυξάνοντας τις αγχώδεις συμπεριφορές, αλλά και τις γνωσιακές λειτουργίες, δημιουργώντας μνημονικά και μαθησιακά ελλείμματα (Waltereit et al., 2011; Bernard et al., 2013; Lugo et al., 2014).

Ταυτόχρονα τονίστηκε η σημασία των κρίσιμων περιόδων και την αυξημένη ευάλωτοτητα ενός οργανισμού σε διάφορα ερεθίσματα, όπως το στρες, κατά τη διάρκεια της εν λόγω περιόδου, οδηγώντας σε αλλοιώσεις στη δομή του εγκεφάλου αλλά και σε γνωσιακές λειτουργίες και κυρίως στη χωρική μνήμη όπως αυτή μελετάται μέσω του υδάτινου λαβυρίνθου κατά Morris (Igsor et al., 2004; Sterlemann et al., 2010; Mc Cormick et al., 2012). Εντούτοις, η βιβλιογραφία δεν είναι ξεκάθαρη, καθώς υπάρχουν αντικρουόμενα πορίσματα διαφόρων μελετών.

Τέλος, έγινε αναφορά στη συνδυαστική επίδραση των κρίσεων και του στρες καθώς και στο μοντέλο των δύο πλήγμάτων. Σύμφωνα με το τελευταίο, η έκθεση σε ένα στρεσογόνο ερέθισμα σε κάποια κρίσιμη περίοδο της ανάπτυξης μπορεί να λάβει το ρόλο του δευτέρου πλήγματος και αυξάνει τις πιθανότητες εμφάνισης ψυχιατρικών διαταραχών, όταν υπάρχει η αντίστοιχη γενετική προδιάθεση. Εντούτοις, ελλείπει γενετικής προδιάθεσης, ένα περιβαλλοντικό ερέθισμα μπορεί να καταστήσει το άτομο πιο επιρρεπές και ευάλωτο σε ένα δεύτερο πλήγμα, όπως είναι αυτό του στρες (Bayer et al., 1999).

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να μελετήσει τις συνδυαστικές επιδράσεις μιας η επαναλαμβανομένων πρώιμης επιληπτικής κρίσης και του περιεφηβικού στρες, στη συμπεριφορά και τη δομή του εγκεφάλου κατά την ενηλικίωση, καθώς δεν υπάρχουν

μελέτες που να έχουν εξετάσει το συγκεκριμένο ερώτημα. Τα αποτελέσματα μας δεν υποστηρίζουν την συνδυαστική επιδράση των δύο αυτών παραγόντων, καθώς πουθενά δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση του περιφερειακού στρες και των πρώιμων επιληπτικών κρίσεων, τόσο στα συμπεριφορικά τεστ, όσο και στη μελέτη της δομής του εγκεφάλου. Εντούτοις, υπήρξαν κάποιες μεμονωμένες επιδράσεις (main effects) τόσο των κρίσεων, όσο και του στρες, δεδομένο αρκετά σημαντικό καθώς αποδεικνύει πως τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν λειτούργησαν και είχαν αποτέλεσμα.

Για την αξιολόγηση της συμπεριφοράς και των γνωσιακών λειτουργιών, χρησιμοποιήσαμε κάποιες σταθμισμένες δοκιμασίες όπως αυτή της κατασκευής φωλιάς (η οποία μελετά τις αυθόρμητες συμπεριφορές), το θάψιμο των βόλων (επίσης αυθόρμητη και επαναλαμβανόμενη συμπεριφορά), τη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (αγχώδης συμπεριφορά, εξερευνητικότητα), τη δοκιμασία υπερυψωμένου λαβυρίνθου (αγχώδης συμπεριφορά), τη δοκιμασία κοινωνικότητας και προτίμησης νέου κοινωνικού περιβάλλοντος, και τη δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου (μνήμη αναγνώρισης).

Για την αξιολόγηση των αυθόρμητων συμπεριφορών, βρήκαμε πως ούτε το στρες, ούτε οι κρίσεις αλλά ούτε και ο συνδυασμός τους επηρεάζουν τις αυθόρμητες συμπεριφορές, όπως αυτές μετρήθηκαν μέσω της δοκιμασίας κατασκευής φωλιάς και του θάψιματος των βόλων. Δυστυχώς, από όσο γνωρίζουμε, δεν υπάρχει κάποια μελέτη που να αξιολογεί την ικανότητα δημιουργίας φωλιάς με παρόμοιες με τις δικές μας παραμέτρους. οι πιο σχετικές προηγούμενες μελέτες είχαν διαφορετικά ερωτήματα. Εντούτοις, υπάρχει η μελέτη των Yamada et al, κατά την οποία χρησιμοποιήθηκαν ενήλικοι θηλυκοί μύες, 12 εβδομάδων, του ίδιου strain με τους δικούς μας (εμείς χρησιμοποιήσαμε αρσενικά). Διεξήγαγαν τη δοκιμασία του nesting,

αν και η βαθμολόγηση της φωλιάς, έγινε με διαφορετικά κριτήρια, ενώ ακολούθησε η χρήση του στρες περιορισμού (restraint), το οποίο εφήρμοσαν για 30 λεπτά. Έπειτα, η επιστημονική ομάδα διέλυσε τη φωλιά και οι πειραματικοί μύες κλήθηκαν να τη ξαναφτιάξουν. Τα αποτελέσματα τους έδειξαν πως η επαγωγή του στρες επηρέασε τη συμπεριφορά των ζώων στην επανακατασκευή φωλιάς, εύρημα που έρχεται σε αντίθεση με το δικό μας (Yamada et al., 2002). Εντούτοις, δεν είναι δυνατή η σύγκριση αυτών των αποτελεσμάτων με τα δικά μας, καθώς το στρες εφαρμόστηκε σε ενήλικα ζώα, ενώ εμείς το εφαρμόσαμε σε έφηβα. Επίσης, η δοκιμασία του nesting στη μελέτη των Yamada, έλαβε χώρα αμέσως μετά την επαγωγή του στρες, και κατά συνέπεια σκοπό είχαν να μελετήσουν τις άμεσες επιδράσεις του στρες και όχι τις μακροχρόνιες όπως είχαμε εμείς ως στόχο. Συνεπώς το εν λόγω εύρημα, δεν μπορεί να συγκριθεί με το δικό μας.

Ταυτόχρονα, η διαδικασία θαψίματος των βόλων αποτελεί δείκτη τόσο αυθόρμητης, όσο και επαναλαμβανόμενης συμπεριφοράς. Τα δικά μας αποτελέσματα στην εν λόγω δοκιμασία, δεν έδειξαν κάποια διαφορά μεταξύ των ομάδων σε κανένα είδος των μετρήσεων που κάναμε. Συγκεκριμένα, όσον αφορά τον αριθμό των θαμμένων βόλων, δε βρέθηκε επίδραση ούτε της πρώιμης επιληπτικής κρίσης, ούτε του περιεφηβικού στρες, αλλά ούτε και του συνδυασμού τους. Το ίδιο εύρημα, δηλαδή η απουσία επίδρασης όλων των παραγόντων, παρουσιάστηκε και στον υπολογισμό του ποσοστού των θαμμένων βόλων, καθώς όλα τα ζώα, ανεξαρτήτως της ομάδας στην οποία ανήκαν, έθαψαν παρόμοιο ποσοστό βόλων. Εν συμφωνία με τα δικά μας αποτελέσματα, οι Lugo et al, χρησιμοποιώντας ένα πρωτόκολο πολλαπλών κρίσεων με τη χρήση Flurothyl τις μέρες 7-11, χορηγούμενης σε μύες ίδιου strain με τους δικούς μας, και κάνοντας χρήση της δοκιμασίας θαψίματος βόλων για την αξιολόγηση της αυθόρμητης και στερεοτυπικής συμπεριφοράς τη P60, δε

διαπίστωσαν διαφορά μεταξύ των ομάδων τους, εύρημα που υποστηρίζει τα δικά μας δεδομένα, παρ' όλες τις διαφορές στην επιληπτογόνο ουσία που χρησιμοποιήθηκε, την αναπτυξιακή περίοδο και τον αριθμό των κρίσεων που επάχθηκαν (Lugo et al., 2014).

Όσον αφορά στη κινητικότητα, τα αποτελέσματα της δοκιμασία τους ανοιχτού πεδίου καθώς και του υπερυψωμένου λαβυρίνθου, αναλύοντας τις μετρήσεις της διανυόμενης απόστασης, έδειξαν πως η κινητικότητα δεν επηρεάστηκε ούτε από την επαγωγή κρίσης, ούτε από την επαγωγή στρες αλλά ούτε από τον συγκερασμό τους. Εντούτοις, στο τεστ υπερυψωμένου λαβυρίνθου, βρήκαμε πως το στρες αυξάνει τον αριθμό εισόδων και στους δύο βραχίονες. Σε αυτό το πεδίο, δεν υπάρχει συμφωνία μεταξύ των ερευνών, καθώς υπάρχουν κάποιες που αναφέρουν είτε υπερκινητικότητα (Lugo et al, 2014; dos Santos et al., 2000), αλλά και άλλες που αναφέρουν υποκινητικότητα (Castelhano et al., 2015). Εμείς δε βρήκαμε κάποια διαφορά μεταξύ των ομάδων PTZ και control όσον αφορά τη κινητικότητα, κάτι που επίσης έχει αναφερθεί πολλάκις βιβλιογραφικά (Waltereit et al., 2011; Cognato et al., 2010; Karnam et al., 2009). Αυτή η ασυμφωνία στη βιβλιογραφία, πιθανότατα να έγκειται σε διαφορές στα πρωτόκολλα, τα strains των ζώων, την ηλικιακή περίοδο, αλλά και την ουσία που χρησιμοποιήθηκε για την επαγωγή των κρίσεων

Όσον αφορά στην εξερευνητική δραστηριότητα, τα αποτελέσματα μας έδειξαν πως ούτε η επαγωγή κρίσης, ούτε η επαγωγή στρες, αλλά ούτε και ο συνδυασμός τους επηρέασε την εν λόγω δραστηριότητα, όπως αυτή μετρήθηκε στη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου μετρώντας τον αριθμό των ανορθώσεων. Εντούτοις υπάρχουν μελέτες όπως αυτή των Fan et al., τα ευρήματα των οποίων υποστηρίζουν πως το χρόνιο ήπιο στρες, οδηγεί σε μείωση των rearings και σε αύξηση του χρόνου παραμονής στη κεντρική περιοχή της διάταξης του ανοιχτού πεδίου, δείχνοντας τη μείωση της εξερευνητικής δραστηριότητας και αύξηση της αγκώδους συμπεριφοράς

αντίστοιχα (Fan et al., 2011). Συγκεκριμένα, καθώς υπάρχουν έρευνες που υποστηρίζουν πως το στρες δεν έχει καμία επίδραση στην εξερευνητική δραστηριότητα (Weathington et al., 2012), ενώ άλλες υποστηρίζουν πως το στρες προκαλεί υποκινητικότητα, με υποβόσκοντα λόγο την αυξημένη αγχώδη συμπεριφορά (Avital & Richter-Levin, 2005). Σε αυτό το πεδίο, οι μελέτες που κάνουν επαγωγή κρίσεων επίσης δίστανται, καθώς υπάρχουν μερικές που αναφέρουν υποκινητικότητα (Koh, 2005) ενώ άλλες αναφέρουν υπερκινητικότητα (Kubona, 2004). Αξιοσημείωτη συνεισφορά στη βιβλιογραφία αποτελεί η μελέτη των Kubona et al, οι οποίοι στη μελέτη τους βρήκαν πως αυτή η διαφοροποίηση μπορεί να οφείλεται στη διαφορετική ηλικία, καθώς για ζώα που έλαβαν κρίσεις τη P12 βρήκαν μειωμένη κινητικότητα και εξερευνητική δραστηριότητα, ενώ στα ζώα που έλαβαν κρίσεις τη P25, βρήκαν το αντίθετο: υπερκινητικότητα και αυξημένη εξερεύνηση. Ο αριθμός των ανορθώσεων, αποτελώντας δείκτη για τη μελέτη της εξερευνητικής συμπεριφοράς, δεν επηρεάστηκε από κανένα παράγοντα στη μελέτη μας, αν και πάλι στη βιβλιογραφία υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν τόσο την αύξησή της όταν τα ζώα έχουν υποστεί στρες στη κρίσιμη περίοδο της εφηβείας, όσο και τη μείωσή της. Όλες αυτές οι διαφορές, είναι πιθανό να οφείλονται σε διαφορετικά πρωτόκολα στρες, σε διαφορές των δοκιμασιών, την ηλικία του ζώου αλλά και στο ίδιο το είδος του ζώου που εκάστοτε χρησιμοποιείται.

Σε αυτό το σημείο, αξίζει να αναφερθεί πως όλα τα ζώα επέδειξαν εξοικείωση (habituation) με το νέο περιβάλλον, καθώς υπήρξε σταδιακή μείωση της διανυόμενης απόστασης στην δοκιμασία ανοιχτού πεδίου. Η εξοικείωση, αποτελεί μια μορφή πολύ απλής μη συνειρμικής μάθησης, στην οποία ο όγκος των αποκρίσεων σε ένα ερέθισμα μειώνεται όταν η έκθεση αυτή επαναλαμβάνεται (Thomson & Spencer, 1966).

Για τη μελέτη της αγχώδους συμπεριφοράς, πέραν από τη μέτρηση του χρόνου που τα ζώα δαπάνησαν στο κεντρικό σημείο της διάταξης του τεστ του ανοιχτού πεδίου, χρησιμοποιήθηκαν μετρήσεις και από τη δοκιμασία της υπερυψωμένης πλατφόρμας, δοκιμασία που αποτελεί τον κατεξοχήν δείκτη αγχώδους συμπεριφοράς και στηρίζεται στη φυσική προτίμηση των μυών για κλειστούς και σκοτεινούς χώρους. Η αγχώδης συμπεριφορά αξιολογείται τόσο από το χρόνο παραμονής σε κάθε βραχίονα, αλλά και στον αριθμό των εισόδων στην οποία προβαίνει το κάθε ζώο. Στη δική μας μελέτη βρέθηκε στατιστικώς σημαντικός ο βραχίονας, αποτέλεσμα που δείχνει ότι όλα τα ζώα προτίμησαν να περάσουν περισσότερο χρόνο στους κλειστούς βραχίονες σε σχέση με τους ανοιχτούς, συμπεριφορά που ήταν αναμενόμενη και δεν απέκλινε από τη φυσιολογική. Όσον αφορά τον αριθμό εισόδων σε κάθε είδος βραχίονα, εκτός από τον ίδιο το βραχίονα, βρέθηκε σημαντική και η επίδραση του στρες, υπονοώντας πως οι μύες που είχαν υποστεί το πρωτόκολο του περιεφηβικού στρες, είχαν μεγαλύτερο αριθμό εισόδων σε σχέση με τους control προς το στρες μύες. Ενώ έρευνες όπως αυτή των Weathington et al (2012), των Schmidt et al (2010) και των Cohen et al (2007) αναφέρουν πως το περιεφηβικό στρες συνδέεται με αυξημένη αγχώδη συμπεριφορά στην ενηλικίωση, στον αντίποδα, δε λείπουν και οι έρευνες που υποστηρίζουν ακριβώς το αντίθετο, πως το περιεφηβικό στρες μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη αγχώδη συμπεριφορά, όπως αυτή του Wilkin (2012) και των Mc Cormick et al (2008). Και σε αυτό το πεδίο, είναι εμφανές πως οι διαφορές στα πρωτόκολα επαγωγής και στα είδη των πειραματικών ζώων, πιθανότατα είναι η αιτία αυτής της ασυμφωνίας.

Επιπλέον, στη μελέτη μας, εξερευνήσαμε τις επιπτώσεις της πρώιμης κρίσης και του περιεφηβικού στρες αλλά και του συνδυασμού τους στη κοινωνικότητα και τη προτίμηση για νέο κοινωνικό περιβάλλον, όπως αυτό υπολογίζεται από τις

αντίστοιχες δοκιμασίες. Τα δεδομένα σας έδειξαν μια τάση για αύξηση της κοινωνικότητας λόγω της επαγωγής στρες. Βιβλιογραφικά είναι αρκετά διαδεμένη η άποψη πως το περιφερηβικό στρες δύναται να επηρεάσει μακροπρόθεσμα τη κοινωνική συμπεριφορά, αλλά οι περισσότερες μελέτες αναφέρουν μείωση κοινωνικότητας και όχι αύξηση (Weathington et al., 2012; Green & Mc Cormick, 2013). Τα αποτελέσματα μας, που έρχονται σε σύγκρουση με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, μπορεί να έγκειται στο γεγονός πως εμείς εφαρμόσαμε ένα πρωτόκολο που περιελάμβανε κατά κύριο λόγο σωματικούς στρεσογόνους παράγοντες (υπερυψωμένη πλατφόρμα, κεκλιμένος κλωβός, εξαναγκασμένη κολύμβηση, βρεγμένη στρωμνή, αποστέρηση τροφής και νερού, στρες περιορισμού) και μόνο έναν ψυχοκοινωνικό (κοινωνικό στρες με το resident intruder paradigm), ενώ οι πραναφερθείσες έρευνες εστιάζουν στο ψυχοκοινωνικό στρες.

Τέλος, όσον αφορά στη μνημονική ικανότητα, όλες οι ομάδες, ανεξαρτήτως του χειρισμού που είχαν υποστεί, ήταν σε θέση να αναγνωρίσουν το νέο αντικείμενο έναντι του οικείου, και δεν παρουσιάστηκε μνημονικό έλλειμμα. Η βιβλιογραφία βρίθει από μελέτες που υποστηρίζουν μνημονικό έλλειμμα μετά από πρώιμες επιληπτικές κρίσεις (Stafstorm et al., 1993; Holmes et al., 1988; Kubova et al., 2004 Cilio et al., 2003), αλλά αυτό το έλλειμμα αφορά τη χωρική μνήμη όπως αυτή εξετάζεται από τον υδάτινο λαβύρινθο κατά Morris, και όχι τη μνήμη ανάκλησης η οποία εξετάζεται μέσω του Novel Object Recognition Task. Εντούτοις, τα δικά μας αποτελέσματα και η έλλειψη μνημονικού ελλείμματος, υποστηρίζεται από τη μελέτη των Cornejo et al (Cornejo et al., 2008), παρ'όλο που χρησιμοποίησαν καινικό οξύ αντί ptz που χρησιμοποίησαμε εμείς, και που η κρίση έλαβε χώρα τη P7, ενώ εμείς εισηγάγαμε τη κρίση τη P24. Επίσης οι Mc Cormick et al (Mc Cormick et al., 2012)

έδειξαν πως ψυχοκοινωνικό, περιφερηβικό στρες, δεν επιφέρει έλλειμα στη μνήμη αναγνώρισης αντικειμένου.

Τέλος, προκειμένου να εξεταστούν οι επιδράσεις των κρίσεων και του περιφερηβικού στρες αλλά και ο συνδυασμός τους, στη δομή του εγκεφάλου των ενήλικων μυών, διεξήχθησαν ανοσοϊστοχημείες σε εγκεφάλους που είχαν λάβει πολλαπλές ενέσεις PTZ σε μια μικρή αναπτυξιακή περίοδο (10-15 days old). Αυτό έγινε αφενός γιατί έχει δειχθεί πως η ηλικία συνδέεται με τις δομικές εγκεφαλικές αλλαγές. Οι Sankar et al, βρήκαν πως τα νερά ζώα είναι λιγότερο ευαίσθητα στην απώλεια νευρώνων στον ιππόκαμπο σε σχέση με την ώριμη ηλικία (Sankar et al., 2000). Επίσης υπάρχει βιβλιογραφία πως επαναλαμβανόμενες κρίσεις σε πρώιμη ηλικία δύνανται να επιφέρουν συναπτική αναδιοργάνωση (Holmes et al., 1988; Huang et al, 2002) και αύξηση των κοκκιωδών κυττάρων στην οδοντωτή έλικα αλλά και στη στιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων. Από την άλλη, υπάρχουν μελέτες όπως αυτή των Mc Cabe et al, οι οποίες υποστηρίζουν πως επαναλαμβανόμενες, πρώιμες κρίσεις επιφέρουν μείωση του αριθμού των κοκκιωδών κυττάρων, ενώ η πανομοιότυπη επαγωγή κρίσεων σε ενήλικα ζώα επιφέρουν το αντίθετο αποτέλεσμα, αυξάνοντας τη νευρογένεση (Mc Cabe et al., 2001).

Από την άλλη πλευρά, εξετάζοντας την επίδραση του στρες στη δομή του εγκεφάλου, 21 μέρες επαγωγής κορτικοστερόνης (ή εναλλακτικά 21 μέρες έκθεσης σε στρες περιορισμού καθημερινά για έξι ώρες) , επιφέρει επαναδιοργάνωση των ακραίων δενδριτών των πυραμιδικών νευρώνων της CA3 περιοχής του εγκεφάλου, μειώνοντά τους τόσο το μήκος, όσο και τον αριθμό των διακλαδώσεων (Mc Ewen & Sapolsky, 1995). Ο ιππόκαμπος είναι μια περιοχή που αναπτύσσεται κατά τη διάρκεια της εφηβείας και γι αυτό αποτελεί δομή στόχο για πολλές μελέτες. Εντούτοις, ο πρωμετωπιαίος φλοιός και η αμυγδαλή συνεχίζουν επίσης να αναπτύσσονται στην

εφηβεία και παρουσιάζουν μορφολογικές αλλαγές που οφείλονται στην επαγωγή στρες. Οι Eiland et al, χορηγώντας κορτικοστερόνη για 6 ώρες κατά τις P20-41 σε αρουραίους, βρήκαν πως η πειραματική ομάδα επέδειξε σημαντικά μειωμένη δενδριτική πολυπλοκότητα στους πυραμιδικούς νευρώνες ενώ οι νευρώνες στη βασοπλαγική αμυγδαλή παρουσίασε αυξημένη πολυπλοκότητα (Eiland et al., 2012).

Από μια επισκόπηση της βιβλιογραφίας, δεν υπάρχει αντίστοιχη μελέτη που να μελετά πρώιμες, επαναλαμβανόμενες κρίσεις και περιεφηβικό στρες στη δομή του εγκεφάλου των περιοχών που εξετάζουμε. Τα δικά μας αποτελέσματα, έδειξαν πως και οι κρίσεις αλλά και το στρες μεμονωμένα, αύξησαν τον αριθμό των PV+ κυττάρων στο φλοιού του προσαγωγίου. Παρόμοια αύξηση υπήρξε και στο σωματισθητικό φλοιό, αλλά μόνο λόγω της επίδρασης του στρες. Αυτή η αύξηση έρχεται σε αντίθεση με το εύρημα των Harte et al, οι οποίοι, χρησιμοποιώντας κοινωνικούς στρεσογόνους παράγοντες, βρήκαν μείωση των PV+ κυττάρων στον ιππόκαμπο. Εντούτοις, αυτή διαφορά μπορεί να οφείλεται στο ότι στο δικό μας πρωτόκολο επικατούσε το σωματικό στρες. Η αύξηση όμως των PV+ κυττάρων λόγω της επίδρασης κρίσεων, στη CA1, αναφέρεται και στην έρευνα των Yi et al, οι οποίοι εισήγαγαν κρίσεις με χρήση πιλοκαρπίνης σε C57BL/6 μύες όπως οι δικοί μας (Yi et al., 2015).

Όσον αφορά στα περινευρωνικά δίκτυα, βρήκαμε μείωση τους λόγω της επαγωγής του στρες και αύξησή τους λόγω των κρίσεων, στο κινητικό φλοιό, ενώ υπήρχε και αύξηση στον S1BF λόγω του στρες. Τα PNNs που βρέθηκαν αυξημένα στο σωματισθητικό φλοιό, ταιριάζουν με την αύξηση των PV+ κυττάρων καθώς όντως, τα PNNs βρίσκονται κυρίως γύρω από υψηλής πυροδότησης GABAεργικούς ενδονευρώνες που εκφράζουν την παρβαλβουμίνη (Dityatev et al., 2007).

Ταυτόχρονα έχει βρεθεί πως αποτελούν προστασία ενάντια στο στρες (Cabungscal et al., 2013).

Σωρευτικά, τα αποτελέσματα μας δείχνουν πως πρώιμες επαναλαμβανόμενες κρίσεις μπορούν να επιφέρουν δομικές αλλαγές στον εγκέφαλο, οι οποίες εμμένουν μακροπρόθεσμα μέχρι την ενηλικίωση. Αυτές οι αλλαγές, παρατηρήθηκαν μόνο σε κάποιες περιοχές, δείχνοντας πως οι επιδράσεις των κρίσεων εξειδικεύονται ανατομικά στον εγκέφαλο, σε συγκεκριμένες περιοχές. Το στρες φάνηκε να έχει και αυτό επίδραση, είτε αυξάνοντας τον αριθμό των κυττάρων στόχων είτε μειώνοντας τον (PNNs στον M1). Η συνδυαστική επίδραση των επιληπτικών κρίσεων με το στρες, δεν είχε καμία επίδραση στον αριθμό ούτε των PV+, αλλά ούτε και στον αριθμό των PNNs. Εντούτοις, αφενός λόγω της έλλειψης επαρκούς βιβλιογραφίας για τις συγκεκριμένες περιοχές και του μικρού δείγματος (συνολικά 16 εγκέφαλοι, με τέσσερις εγκεφάλους σε κάθε ομάδα), αφετέρου λόγω της χαμηλής ποιότητας κάποιων ανοσοϊστοχημιών, είναι δύσκολο να εξάγουμε κάποιο ασφαλές συμπέρασμα.

Συνοψίζοντας, και λαμβάνοντας υπόψη το κεντρικό μας ερώτημα όπως αυτό εκφράζεται με την υπόθεση των δύο πλήγμάτων, μπορούμε να πούμε πως οι πρώιμες επιληπτικές κρίσεις, το πρώτο πλήγμα δηλαδή, δεν αύξησαν την ευαλωτότητα του οργανισμού στην εμφάνιση της επίδρασης του δευτέρου πλήγματος, την επαγωγή στρες. Δηλαδή οι κρίσεις, δεν αύξησαν την επίδραση του στρες, και δεν τις έκαναν πιο ισχυρές. Εντούτοις, το συγκεκριμένο μοντέλο έχει επιβεβαιωθεί πολλές φορές, και έχει εφαρμογή σε διάφορες ασθένειες και δεν μπορούμε να το απορρίψουμε και να αμφισβητήσουμε την ύπαρξή του. Αυτό που μπορούμε να πούμε, είναι πως δεν έχει ισχύ κάτω από τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες, δηλαδή στο συγκεκριμένο strain μύων, με τη χρήση της συγκεκριμένης ουσίας, τις συγκεκριμένες

μεταγεννητικές μέρες, ακολουθώντας το συγκεκριμένο πρωτόκολο επαγωγής στρες. Πιθανότατα ένα πιο έντονο πρωτόκολο στρες σε συνδυασμό με πολλαπλές κρίσεις σε πιο μικρή ηλικιακή περίοδο να είχε επιφέρει τη συνδυαστική επίδραση. Επίσης, η επαγωγή περισσότερων ψυχοκοινωνικών στρεσογόνων παραγόντων να παίζει σημαντικό ρόλο, καθώς στο πρωτόκολο που ακολουθήσαμε, περιλάβαμε μόνο έναν, αυτό του εισβολέα (resident intruder paradigm). Τα ηλεκτροσόκ είναι ένας πολύ ισχυρός στρεσογόνος παράγοντας, και θα μπορούσαμε να τα είχαμε συμπεριλάβει εντούτοις, θέλαμε να αποφύγουμε σε πρώτη φάση την εφαρμογή ενός πιο έντονου πρωτοκόλου στρες αφενός γιατί θέλαμε να αποφύγουμε την εμφάνιση του ceiling effect, κατά το επίπεδο του οποίου, η ανεξάρτητη μεταβλητή, παύει να έχει επίδραση στην εξαρτημένη, αφετέρου θέλαμε να μελετήσουμε και τη συνδυαστική επίδραση των κρίσεων και του στρες.

Μελλοντικές έρευνες θα μπορούσαν να εστιάσουν σε διαφορετική ηλικιακή περίοδο όσον αφορά την επαγωγή του στρες, η οποία θα μπορούσε να γίνει περιγεννητικώς (εμβρυακή μέρα E15 έως τη μεταγεννητική μέρα P1) καθώς η συγκεκριμένη περίοδος είναι ιδιαίτερα κρίσιμη και ευάλωτη για τη περαιτέρω ανάπτυξη. Ταυτόχρονα, θα πρέπει να εξεταστεί το ενδεχόμενο επαγωγής κρίσεων με κάποια άλλη μέθοδο, όπως αυτή της χρήσης πιλοκαρπίνης ή fluothyl, κρατώντας όμως όλα τα υπόλοιπα στοιχεία της μελέτης αναλλοίωτα, έτσι ώστε η σύγκριση να αφορά μόνο την επιληπτογόνο ουσία και να βεβαιωθούμε ποιό πρωτόκολο είναι το πιο ορθό προς χρήση. Εντούτοις, λαμβάνοντας υπόψη την πρότερη βιβλιογραφία, η μελλοντική έρευνα θα πρέπει ίσως να εστιάσει στο στρες και όχι τόσο στην επαγωγή μιας και μόνο κρίσης, καθώς μελέτες όπως αυτή των Bo et al, των Barbarosa et al, αλλά και η δική μας, δείχνουν πως μια και μόνο κρίση, δεν επιφέρει αλλαγές στη συμπεριφορά κατά την ενηλικίωση (Bo et al., 2004; Barbarosa et al., 2017), και κατά συνέπεια, πως

τα όποια ελλείμματα παρατηρούνται στην ενηλικίωση, αποτελούν επίδραση του στρες καθεαυτού.

Βιβλιογραφία

- Ahmadzadeh, R., Saboory, E., Roshan-Milani, S., & Pilehvarian, A. A. (2011). Predator and restraint stress during gestation facilitates pilocarpine-induced seizures in prepubertal rats. *Developmental psychobiology*, 53(8), 806-812.
- Aizawa, H., Inase, M., Mushiake, H., Shima, K., & Tanji, J. (1991). Reorganization of activity in the supplementary motor area associated with motor learning and functional recovery. *Experimental Brain Research*, 84(3), 668-671.
- Akula, K. K., Dhir, A., & Kulkarni, S. K. (2009). Effect of various antiepileptic drugs in a pentylenetetrazol-induced seizure model in mice. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*, 31(7), 423-432.
- Al-Mufti, Fawaz, and Jan Claassen. "Neurocritical care: status epilepticus review." *Critical care clinics* 30.4 (2014): 751-764.
- Andersen, S. L., Thompson, A. T., Rutstein, M., Hostetter, J. C., & Teicher, M. H. (2000). Dopamine receptor pruning in prefrontal cortex during the periadolescent period in rats. *Synapse*, 37(2), 167-169.
- Antunes, M., & Biala, G. (2012). The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive processing*, 13(2), 93-110.

Avital, A., & Richter-Levin, G. (2005). Exposure to juvenile stress exacerbates the behavioural consequences of exposure to stress in the adult rat. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 8(2), 163-173.

Avital, A., Ram, E., Maayan, R., Weizman, A., & Richter-Levin, G. (2006). Effects of early-life stress on behavior and neurosteroid levels in the rat hypothalamus and entorhinal cortex. *Brain research bulletin*, 68(6), 419-424.

Barbosa, G. H., Batista, S. P., dos Santos, P. B., Thomaz, C. R., Scorza, F. A., & Cysneiros, R. M. (2017). Single neonatal status epilepticus does not impair cognitive function in rats. *Epilepsy & Behavior*.

Barry, J. M., Tian, C., Spinella, A., Page, M., & Holmes, G. L. (2016). Spatial cognition following early-life seizures in rats: Performance deficits are dependent on task demands. *Epilepsy & Behavior*, 60, 1-6.

Barth, M., Hirsch, H. V., Meinertzhagen, I. A., & Heisenberg, M. (1997). Experience-dependent developmental plasticity in the optic lobe of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Neuroscience*, 17(4), 1493-1504.

Bayer, T. A., Falkai, P., & Maier, W. (1999). Genetic and non-genetic vulnerability factors in schizophrenia: the basis of the “two hit hypothesis”. *Journal of psychiatric research*, 33(6), 543-548.

Bazak, N., Kozlovsky, N., Kaplan, Z., Matar, M., Golan, H., Zohar, J., ... & Cohen, H. (2009). Pre-pubertal stress exposure affects adult behavioral response in association with changes in circulating corticosterone and brain-derived neurotrophic factor. *Psychoneuroendocrinology*, 34(6), 844-858.

Bazil, C. W., & Walczak, T. S. (1997). Effects of sleep and sleep stage on epileptic and nonepileptic seizures. *Epilepsia*, *38*(1), 56-62.

Ben-Ari, Y., Cherubini, E., Corradetti, R., & Gaiarsa, J. L. (1989). Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *The Journal of physiology*, *416*(1), 303-325.

Bender, R. A., Dubé, C., Gonzalez-Vega, R., Mina, E. W., & Baram, T. Z. (2003). Mossy fiber plasticity and enhanced hippocampal excitability, without hippocampal cell loss or altered neurogenesis, in an animal model of prolonged febrile seizures. *Hippocampus*, *13*(3), 399-412.

Berg, A. T., Jallon, P., & Preux, P. M. (2012). The epidemiology of seizure disorders in infancy and childhood: definitions and classifications. *Handbook of clinical neurology*, *111*, 391-398.

Berkovic, S. F., Mulley, J. C., Scheffer, I. E., & Petrou, S. (2006). Human epilepsies: interaction of genetic and acquired factors. *Trends in neurosciences*, *29*(7), 391-397.

Bernard, P. B., Castano, A. M., O'Leary, H., Simpson, K., Browning, M. D., & Benke, T. A. (2013). Phosphorylation of FMRP and alterations of FMRP complex underlie enhanced mLTD in adult rats triggered by early life seizures. *Neurobiology of disease*, *59*, 1-17.

Bernard, P. B., & Benke, T. A. (2015). Early life seizures: evidence for chronic deficits linked to autism and intellectual disability across species and models. *Experimental neurology*, *263*, 72-78.

Bo, T., Jiang, Y., Cao, H., Wang, J., & Wu, X. (2004). Long-term effects of seizures in neonatal rats on spatial learning ability and N-methyl-D-aspartate receptor expression in the brain. *Developmental brain research*, 152(2), 137-142.

Bordin, G., Boldorini, R., & Meroni, P. L. (2003). The two hit hypothesis in the antiphospholipid syndrome: acute ischaemic heart involvement after valvular replacement despite anticoagulation in a patient with secondary APS. *Lupus*, 12(11), 851-853.

Brecht, M. (2007). Barrel cortex and whisker-mediated behaviors. *Current opinion in neurobiology*, 17(4), 408-416.

Brodtkorb E. Common imitators of epilepsy. *Acta Neurol Scand Suppl.* 2013;196:5–10. doi: 10.1111/ane.12043.

Brückner, G., Hausen, D., Härtig, W., Drlicek, M., Arendt, T., & Brauer, K. (1999). Cortical areas abundant in extracellular matrix chondroitin sulphate proteoglycans are less affected by cytoskeletal changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 92(3), 791-805.

Caillard, O., Moreno, H., Schwaller, B., Llano, I., Celio, M. R., & Marty, A. (2000). Role of the calcium-binding protein parvalbumin in short-term synaptic plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(24), 13372-13377.

Carulli, D., Rhodes, K. E., Brown, D. J., Bonnert, T. P., Pollack, S. J., Oliver, K., ... & Fawcett, J. W. (2006). Composition of perineuronal nets in the adult rat cerebellum and the cellular origin of their components. *Journal of Comparative Neurology*, 494(4), 559-577.

- Casanova, J. R., Nishimura, M., Owens, J. W., & Swann, J. W. (2012). Impact of seizures on developing dendrites: implications for intellectual developmental disabilities. *Epilepsia*, *53*(s1), 116-124.
- Castelhano, A. S. S., Cassane, G. D. S. T., Scorza, F. A., & Cysneiros, R. M. (2013). Altered anxiety-related and abnormal social behaviors in rats exposed to early life seizures. *Frontiers in behavioral neuroscience*, *7*.
- Cavalheiro, E. A., Leite, J. P., Bortolotto, Z. A., Turski, W. A., Ikonomidou, C., & Turski, L. (1991). Long-Term Effects of Pilocarpine in Rats: Structural Damage of the Brain Triggers Kindling and Spontaneous I Recurrent Seizures. *Epilepsia*, *32*(6), 778-782.
- Chang, W. P., & Shyu, B. C. (2013). Anterior cingulate epilepsy: mechanisms and modulation. *Frontiers in integrative neuroscience*, *7*.
- Chang, Y. C., Huang, A. M., Kuo, Y. M., Wang, S. T., Chang, Y. Y., & Huang, C. C. (2003). Febrile seizures impair memory and cAMP response-element binding protein activation. *Annals of neurology*, *54*(6), 706-718.
- Cornejo, B. J., Mesches, M. H., & Benke, T. A. (2008). A single early-life seizure impairs short-term memory but does not alter spatial learning, recognition memory, or anxiety. *Epilepsy & Behavior*, *13*(4), 585-592.
- Corda, M. G., Orlandi, M., Lecca, D., Carboni, G., Frau, V., & Giorgi, O. (1991). Pentylentetrazol-induced kindling in rats: effect of GABA function inhibitors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *40*(2), 329-333.

Crews, F., He, J., & Hodge, C. (2007). Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *86*(2), 189-199.

Deacon, R. M. (2006). Burrowing in rodents: a sensitive method for detecting behavioral dysfunction. *Nature protocols*, *1*(1), 118.

DeFelipe, J. (1997). Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. *Journal of chemical neuroanatomy*, *14*(1), 1-19.

De Kloet, E. R., Joëls, M., & Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature reviews. Neuroscience*, *6*(6), 463.

De Lima, A. P. N., Sandini, T. M., Reis-Silva, T. M., & Massoco, C. O. (2017). Long-lasting monoaminergic and behavioral dysfunctions in a mice model of socio-environmental stress during adolescence. *Behavioural brain research*, *317*, 132-140.

De Lecea, L., & Soriano, E. (1995). Developmental expression of parvalbumin mRNA in the cerebral cortex and hippocampus of the rat. *Molecular Brain Research*, *32*(1), 1-13.

Devinsky, O., Morrell, M. J., & Vogt, B. A. (1995). Contributions of anterior cingulate cortex to behaviour. *Brain*, *118*(1), 279-306.

Diamond, M. E., Von Heimendahl, M., Knutsen, P. M., Kleinfeld, D., & Ahissar, E. (2008). 'Where'and'what'in the whisker sensorimotor system. *Nature reviews Neuroscience*, 9(8), 601.

Dos Santos, N. F., Arida, R. M., Trindade Filho, E. M., Priel, M. R., & Cavalheiro, E. A. (2000). Epileptogenesis in immature rats following recurrent status epilepticus. *Brain research reviews*, 32(1), 269-276.

Dubé, C. M., Brewster, A. L., & Baram, T. Z. (2009). Febrile seizures: mechanisms and relationship to epilepsy. *Brain and Development*, 31(5), 366-371.

Duncan JS, Sander JW, Sisodiya SM, Walker MC. Adult epilepsy. *Lancet*. 2006; 367:1087–1100. [PubMed: 16581409]

Eger, E. I., Gong, D., Xing, Y., Raines, D. E., & Flood, P. (2002). Acetylcholine receptors and thresholds for convulsions from flurothyl and 1, 2-dichlorohexafluorocyclobutane. *Anesthesia & Analgesia*, 95(6), 1611-1615.

Endo, T., Takazawa, K., & Onaya, T. (1985). Parvalbumin exists in rat endocrine glands. *Endocrinology*, 117(2), 527-531.

Engler, D., Pham, T., Fullerton, M. J., Ooi, G., Funder, J. W., & Clarke, I. J. (1989). Studies of the secretion of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin into the hypophysial-portal circulation of the conscious sheep. *Neuroendocrinology*, 49(4), 367-381.

Erkeç, Ö. E., & ARIHAN, O. (2015). Pentylentetrazole Kindling Epilepsy Model. *Epilepsi: Journal of the Turkish Epilepsi Society*, 21(1).

Fan, S. J., Jiang, H., Yang, L. J., Liu, X., Song, J., & Pan, F. (2011). Effects of adrenergic agents on stress-induced brain microstructural and immunochemical changes in adult male Wistar rats. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 193(5), 418-424.

Feigenson, K. A., Kusnecov, A. W., & Silverstein, S. M. (2014). Inflammation and the two-hit hypothesis of schizophrenia. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 38, 72-93.

Ferris, C. F. & Tenney, J. (2014). Functional Magnetic Resonance Imaging in Epilepsy: Methods and Applications Using Awake Animals. *Neuronal Networks in Brain Function, CNS Disorders, and Therapeutics*, (pp. 37-54). Academic Press.

Fields, S., & Johnston, M. (2005). Whither model organism research?. *Science*, 307(5717), 1885-1886.

Fisher, R. S., Cross, J. H., D'Souza, C., French, J. A., Haut, S. R., Higurashi, N., ... & Peltola, J. (2017). Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types. *Epilepsia*.

Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., ... & Hesdorffer, D. C. (2014). ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55(4), 475-482.

Fisher, R. S., Boas, W. V. E., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., & Engel, J. (2005). Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International

League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 46(4), 470-472.

Forsgren, L., Beghi, E., Oun, A., & Sillanpää, M. (2005). The epidemiology of epilepsy in Europe—a systematic review. *European Journal of Neurology*, 12(4), 245-253.

Fox, G. B., Curzon, P., & Decker, M. W. (2001). The behavioral assessment of sensorimotor processes in the mouse: acoustic startle, locomotor activity, rotarod, and beam walking. *Methods of behavior analysis in neuroscience (Buccafusco JJ, ed)*, 28-48.

Fox, K. (2002). Anatomical pathways and molecular mechanisms for plasticity in the barrel cortex. *Neuroscience*, 111(4), 799-814.

Frantz, K., & Van Hartesveldt, C. (1999). Locomotion elicited by MK801 in developing and adult rats: temporal, environmental, and gender effects. *European journal of pharmacology*, 369(2), 145-157.

Frodl, T., & O'Keane, V. (2013). How does the brain deal with cumulative stress? A review with focus on developmental stress, HPA axis function and hippocampal structure in humans. *Neurobiology of disease*, 52, 24-37.

Frucht, M. M., Quigg, M., Schwaner, C., & Fountain, N. B. (2000). Distribution of seizure precipitants among epilepsy syndromes. *Epilepsia*, 41(12), 1534-1539.

Gerstin, K. M., Gong, D. H., Abdallah, M., Winegar, B. D., Eger, E. I., & Gray, A. T. (2003). Mutation of KCNK5 or Kir3. 2 potassium channels in mice does not change minimum alveolar anesthetic concentration. *Anesthesia & Analgesia*, *96*(5), 1345-1349.

Gentsch, C., Lichtsteiner, M., & Feer, H. (1987). Open field and elevated plus-maze: a behavioural comparison between spontaneously hypertensive (SHR) and Wistar-Kyoto (WKY) rats and the effects of chlordiazepoxide. *Behavioural brain research*, *25*(2), 101-107.

Gibb, R., & Kolb, B. (1998). A method for vibratome sectioning of Golgi-Cox stained whole rat brain. *Journal of neuroscience methods*, *79*(1), 1-4.

Giedd, J. N., Blumenthal, J., Jeffries, N. O., Castellanos, F. X., Liu, H., Zijdenbos, A., ... & Rapoport, J. L. (1999). Brain development during childhood and adolescence: a longitudinal MRI study. *Nature neuroscience*, *2*(10), 861-863.

Gilbert-Juan, J., Belles, M., Saez, A. R., Carceller, H., Zamarbide-Fores, S., Moltó, M. D., & Nacher, J. (2013). A “double hit” murine model for schizophrenia shows alterations in the structure and neurochemistry of the medial prefrontal cortex and the hippocampus. *Neurobiology of disease*, *59*, 126-140.

Goh S, Kwiatkowski DJ, Dorer DJ, Thiele EA. Infantile spasms and intellectual outcomes in children with tuberous sclerosis complex. *Neurology* 2005; 65 (2) 235-238

Gould, T. D., Dao, D. T., & Kovacsics, C. E. (2009). The open field test. *Mood and anxiety related phenotypes in mice: Characterization using behavioral tests*, 1-20.

- Green, M. R., Barnes, B., & McCormick, C. M. (2013). Social instability stress in adolescence increases anxiety and reduces social interactions in adulthood in male Long-Evans rats. *Developmental psychobiology*, *55*(8), 849-859.
- Haut, S. R., Vouyiouklis, M., & Shinnar, S. (2003). Stress and epilepsy: a patient perception survey. *Epilepsy & Behavior*, *4*(5), 511-514.
- Heinrichs, S. C. (2010). Neurobehavioral consequences of stressor exposure in rodent models of epilepsy. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *34*(5), 808-815.
- Heizmann, C. W., & Braun, K. (1992). Changes in Ca²⁺-binding proteins in human neurodegenerative disorders. *Trends in neurosciences*, *15*(7), 259-264.
- Heizmann, C. W., & Berchtold, M. W. (1987). Expression of parvalbumin and other Ca²⁺-binding proteins in normal and tumor cells: a topical review. *Cell calcium*, *8*(1), 1-41.
- Hendry, S. H. C., Jones, E. G., Emson, P. C., Lawson, D. E. M., Heizmann, C. W., & Streit, P. (1989). Two classes of cortical GABA neurons defined by differential calcium binding protein immunoreactivities. *Experimental Brain Research*, *76*(2), 467-472.
- Heshmatian, B., Roshan-Milani, S., & Saboory, E. (2010). Prenatal acute stress attenuated epileptiform activities in neonate mice. *Yakhteh Med J*, *12*(1).
- Hess, S. E., Rohr, S., Dufour, B. D., Gaskill, B. N., Pajor, E. A., & Garner, J. P. (2008). Home improvement: C57BL/6J mice given more naturalistic nesting materials build better nests. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, *47*(6), 25-31.

Hoffmann, A. F., Zhao, Q., & Holmes, G. L. (2004). Cognitive impairment following status epilepticus and recurrent seizures during early development: support for the “two-hit hypothesis”. *Epilepsy & Behavior*, 5(6), 873-877.

Holmes, G. L., & Ben-Ari, Y. (2001). The neurobiology and consequences of epilepsy in the developing brain. *Pediatric research*, 49(3), 320-325.

Holmes, G. L., Gairsa, J. L., Chevassus-Au-Louis, N., & Ben-Ari, Y. (1998). Consequences of neonatal seizures in the rat: morphological and behavioral effects. *Annals of neurology*, 44(6), 845-857.

Horrocks, P. M., Jones, A. F., Ratcliffe, W. A., Holder, G., White, A., Holder, R., ... & London, D. R. (1990). Patterns of ACTH and cortisol pulsatility over twenty-four hours in normal males and females. *Clinical endocrinology*, 32(1), 127-134.

Hydén, H., & Lange, P. W. (1983). Modification of membrane-bound proteins of the hippocampus and entorhinal cortex by change in behavior in rats. *Journal of neuroscience research*, 9(1), 37-46.

IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.

Isgor, C., Kabbaj, M., Akil, H., & Watson, S. J. (2004). Delayed effects of chronic variable stress during peripubertal-juvenile period on hippocampal morphology and on cognitive and stress axis functions in rats. *Hippocampus*, *14*(5), 636-648.

Insel, T. R., Miller, L. P., & Gelhard, R. E. (1990). The ontogeny of excitatory amino acid receptors in rat forebrain—I. N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *Neuroscience*, *35*(1), 31-43.

Isaeva, E., Isaev, D., Savrasova, A., Khazipov, R., & Holmes, G. L. (2010). Recurrent neonatal seizures result in long-term increases in neuronal network excitability in the rat neocortex. *European Journal of Neuroscience*, *31*(8), 1446-1455.

Jackson JH. (1870) A study of convulsions. Transactions of the Saint Andrews Graduate Association 3:162–204.

Joëls, M. (2009). Stress, the hippocampus, and epilepsy. *Epilepsia*, *50*(4), 586-597.

Józwiak S, Kotulska K, Domańska-Pakieła D , et al. Antiepileptic treatment before the onset of seizures reduces epilepsy severity and risk of mental retardation in infants with tuberous sclerosis complex. *Eur J Paediatr Neurol* 2011; 15 (5) 424-431

Karnam, H. B., Zhou, J. L., Huang, L. T., Zhao, Q., Shatskikh, T., & Holmes, G. L. (2009). Early life seizures cause long-standing impairment of the hippocampal map. *Experimental neurology*, *217*(2), 378-387.

Karni, A., Meyer, G., Rey-Hipolito, C., Jezzard, P., Adams, M. M., Turner, R., & Ungerleider, L. G. (1998). The acquisition of skilled motor performance: fast and

slow experience-driven changes in primary motor cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(3), 861-868.

Kleen JK, Sesque A, Wu EX, Miller FA, Hernan AE, Holmes GL, et al. Early-life seizures produce lasting alterations in the structure and function of the prefrontal cortex. *Epilepsy Behav* 2011;22:214–9

Kleim, J. A., Lussnig, E., Schwarz, E. R., Comery, T. A., & Greenough, W. T. (1996). Synaptogenesis and Fos expression in the motor cortex of the adult rat after motor skill learning. *Journal of Neuroscience*, 16(14), 4529-4535.

Kleim, J. A., Barbay, S., Cooper, N. R., Hogg, T. M., Reidel, C. N., Remple, M. S., & Nudo, R. J. (2002). Motor learning-dependent synaptogenesis is localized to functionally reorganized motor cortex. *Neurobiology of learning and memory*, 77(1), 63-77.

Knudson, A. G. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(4), 820-823.

Koolhaas, J. M., Coppens, C. M., de Boer, S. F., Buwalda, B., Meerlo, P., & Timmermans, P. J. (2013). The resident-intruder paradigm: a standardized test for aggression, violence and social stress. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (77).

Leite, J., Carvalho, S., Battistella, L. R., Caumo, W., & Fregni, F. (2017). The Role of Primary Motor Cortex as a Marker and Modulator of Pain Control and Emotional-Affective Processing. *Frontiers in human neuroscience*, 11.

Levin, B., & Duchowny, M. (1991). Childhood obsessive-compulsive disorder and cingulate epilepsy. *Biological psychiatry*, 30(10), 1049-1055.

Lewis, D. A., Cruz, D., Eggen, S., & Erickson, S. (2004). Postnatal development of prefrontal inhibitory circuits and the pathophysiology of cognitive dysfunction in schizophrenia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1021(1), 64-76.

Lieschke, G. J., & Currie, P. D. (2007). Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature reviews. Genetics*, 8(5), 353.

Löscher, W. (2011). Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure*, 20(5), 359-368.

Love, R. (2005). Two hit hypothesis for temporal lobe epilepsy. *The Lancet Neurology*, 4(8), 458.

Lugo, J. N., Swann, J. W., & Anderson, A. E. (2014). Early-life seizures result in deficits in social behavior and learning. *Experimental neurology*, 256, 74-80.

Lüttjohann, A., Fabene, P. F., & van Luijckelaar, G. (2009). A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiology & behavior*, 98(5), 579-586.

Magiorkinis, E., Sidiropoulou, K., & Diamantis, A. (2010). Hallmarks in the history of epilepsy: epilepsy in antiquity. *Epilepsy & Behavior*, 17(1), 103-108.

Marks, J. D., Friedman, J. E., & Haddad, G. G. (1996). Vulnerability of CA1 neurons to glutamate is developmentally regulated. *Developmental brain research*, 97(2), 194-206.

McCormick, C. M., Thomas, C. M., Sheridan, C. S., Nixon, F., Flynn, J. A., & Mathews, I. Z. (2012). Social instability stress in adolescent male rats alters

hippocampal neurogenesis and produces deficits in spatial location memory in adulthood. *Hippocampus*, 22(6), 1300-1312.

McEWEN, B. S., De Kloet, E. R., & Rostene, W. (1986). Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. *Physiological Reviews*, 66(4), 1121-1188.

McLean, H. A., Caillard, O., Khazipov, R., Ben-Ari, Y., & Gaiarsa, J. L. (1996). Spontaneous release of GABA activates GABAB receptors and controls network activity in the neonatal rat hippocampus. *Journal of Neurophysiology*, 76(2), 1036-1046.

Meidenbauer, J. J., Mantis, J. G., & Seyfried, T. N. (2011). The EL mouse: a natural model of autism and epilepsy. *Epilepsia*, 52(2), 347-357.

Mello, L. E., Cavalheiro, E. A., Tan, A. M., Kupfer, W. R., Pretorius, J. K., Babb, T. L., & Finch, D. M. (1993). Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia*, 34(6), 985-995.

Morawski, M., Brückner, M. K., Riederer, P., Brückner, G., & Arendt, T. (2004). Perineuronal nets potentially protect against oxidative stress. *Experimental neurology*, 188(2), 309-315.

Moreira, J. D., de Siqueira, L. V., Lague, V. M., Porciúncula, L. O., Vinadé, L., & Souza, D. O. (2011). Short-term alterations in hippocampal glutamate transport system caused by one-single neonatal seizure episode: implications on behavioral performance in adulthood. *Neurochemistry international*, 59(2), 217-222

Morrison, K. E., Rodgers, A. B., Morgan, C. P., & Bale, T. L. (2014).

Epigenetic mechanisms in pubertal brain maturation. *Neuroscience*, 264, 17-24.

Moshé, S. L. (1981). The effects of age on the kindling phenomenon. *Developmental psychobiology*, 14(1), 75-81.

Moy, S. S., Nadler, J. J., Young, N. B., Perez, A., Holloway, L. P., Barbaro, R. P., ... & Magnuson, T. R. (2007). Mouse behavioral tasks relevant to autism: phenotypes of 10 inbred strains. *Behavioural brain research*, 176(1), 4-20.

Müller, C. J., Gröticke, I., Bankstahl, M., & Löscher, W. (2009). Behavioral and cognitive alterations, spontaneous seizures, and neuropathology developing after a pilocarpine-induced status epilepticus in C57BL/6 mice. *Experimental neurology*, 219(1), 284-297.

Nardou, R., Ferrari, D. C., & Ben-Ari, Y. (2013, August). Mechanisms and effects of seizures in the immature brain. In *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* (Vol. 18, No. 4, pp. 175-184). WB Saunders.

National Research Council. (2010). *Guide for the care and use of laboratory animals*. National Academies Press.

Nemes, A., Najm, I. M., Gale, J. T., Ying, Z., Johnson, M., & Gonzalez-Martinez, J. (2016). Underlying Cortical Dysplasia as Risk Factor for Traumatic Epilepsy: An Animal Study. *Journal of neurotrauma*, 33(20), 1883-1891.

- Newton, C. R., & Garcia, H. H. (2012). Epilepsy in poor regions of the world. *The Lancet*, 380(9848), 1193-1201.
- Nishimura, M., Gu, X., & Swann, J. W. (2011). Seizures in early life suppress hippocampal dendrite growth while impairing spatial learning. *Neurobiology of disease*, 44(2), 205-214.
- Oghlakian, R. O., Tilelli, C. Q., Hiremath, G. K., Alexopoulos, A. V., & Najm, I. M. (2009). Single injection of a low dose of pentylenetetrazole leads to epileptogenesis in an animal model of cortical dysplasia. *Epilepsia*, 50(4), 801-810.
- Panksepp, J. (1981). The ontogeny of play in rats. *Developmental psychobiology*, 14(4), 327-332.
- Paxinos, G. (2013). *Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of neuroscience methods*, 14(3), 149-167.
- Reynolds, E. H. (2000). The ILAE/IBE/WHO global campaign against epilepsy: bringing epilepsy "out of the shadows". *Epilepsy & Behavior*, 1(4), S3-S8.
- Rice, D., & Barone Jr, S. (2000). Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environmental health perspectives*, 108(Suppl 3), 511.
- Romeo, R. D., & McEWEN, B. S. (2006). Stress and the adolescent

brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1094(1), 202-214.

Rosati, A., & Guerrini, R. (2014). What Causes Epilepsy?. *Epilepsy*, 15-27.

Rowan, A. N., & Rollin, B. E. (1983). Animal research—for and against: a philosophical, social, and historical perspective. *Perspectives in biology and medicine*, 27(1), 1-17.

Russ, J. C., & Dehoff, R. T. (2012). *Practical stereology*. Springer Science & Business Media.

Rutten, A., Van Albada, M., Silveira, D. C., Cha, B. H., Liu, X., Hu, Y. N., ... & Holmes, G. L. (2002). Memory impairment following status epilepticus in immature rats: time-course and environmental effects. *European Journal of Neuroscience*, 16(3), 501-513.

Sapolsky, R. M. (1996). Stress, glucocorticoids, and damage to the nervous system: the current state of confusion. *Stress*, 1(1), 1-19.

Sankar, R., Shin, D., Mazarati, A. M., Liu, H., Katsumori, H., Lezama, R., & Wasterlain, C. G. (2000). Epileptogenesis after status epilepticus reflects age-and model-dependent plasticity. *Annals of neurology*, 48(4), 580-589.

Sarkisian, M. R., Tandon, P., Liu, Z., Yang, Y., Hori, A., Holmes, G. L., & Stafstrom, C. E. (1997). Multiple Kainic Acid Seizures in the Immature and Adult Brain: Ictal Manifestations and Long-Term Effects on Learning and

Memory. *Epilepsia*, 38(11), 1157-1166.

Scantlebury, M. H., Gibbs, S. A., Foadjo, B., Lema, P., Psarropoulou, C., & Carmant, L. (2005). Febrile seizures in the predisposed brain: a new model of temporal lobe epilepsy. *Annals of neurology*, 58(1), 41-49.

Scharfman, H. E. (2007). The neurobiology of epilepsy. *Current neurology and neuroscience reports*, 7(4), 348-354.

Schramm, N. L., Egli, R. E., & Winder, D. G. (2002). LTP in the mouse nucleus accumbens is developmentally regulated. *Synapse*, 45(4), 213-219.

Shim, K. (2011). Vibratome sectioning for enhanced preservation of the cytoarchitecture of the mammalian organ of Corti. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (52).

Shiotsuki, H., Yoshimi, K., Shimo, Y., Funayama, M., Takamatsu, Y., Ikeda, K., ... & Hattori, N. (2010). A rotarod test for evaluation of motor skill learning. *Journal of neuroscience methods*, 189(2), 180-185.

Simandan, D. (2010). On how much one can take: relocating exploitation and exclusion within the broader framework of allostatic load theory. *Health & place*, 16(6), 1291-1293.

Sisk, C. L., & Foster, D. L. (2004). The neural basis of puberty and adolescence. *Nature neuroscience*, 7(10), 1040-1047.

Smith, G., Ahmed, N., Arbuckle, E., & Lugo, J. N. (2017). Early-life status epilepticus induces long-term deficits in anxiety and spatial learning in mice. *International Journal of Epilepsy*.

Soria C, Escolano S, El Sabbagh S , et al. Behavioral problems, cognitive difficulties and quality of life in children with epilepsy: an analysis of parental concerns. *Child Neuropsychol* 2012; 18 (3) 209-227

Spear, L. P. (2000). The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 24(4), 417-463.

Stafstrom, C. E. (2002). Assessing the behavioral and cognitive effects of seizures on the developing brain. *Progress in brain research*, 135, 377-390.

Stephens, M. A. C., & Wand, G. (2012). Stress and the HPA axis: role of glucocorticoids in alcohol dependence. *Alcohol research: current reviews*, 34(4), 468.

Sterlemann, V., Rammes, G., Wolf, M., Liebl, C., Ganea, K., Müller, M. B., & Schmidt, M. V. (2010). Chronic social stress during adolescence induces cognitive impairment in aged mice. *Hippocampus*, 20(4), 540-549.

Swinkels, W. A. M., Engelsman, M., Kasteleijn-Nolst Trenité, D. G. A., Baal, M. G., Haan, G. D., & Oosting, J. (1998). Influence of an evacuation in February 1995 in The Netherlands on the seizure frequency in patients with epilepsy: a controlled study. *Epilepsia*, 39(11), 1203-1207.

- Swinkels, W. A. M., Kuyk, J., De Graaf, E. H., Van Dyck, R., & Spinhoven, P. H. (2001). Prevalence of psychopathology in Dutch epilepsy inpatients: a comparative study. *Epilepsy & Behavior*, 2(5), 441-447.
- Talos, D. M., Fishman, R. E., Park, H., Folkerth, R. D., Follett, P. L., Volpe, J. J., & Jensen, F. E. (2006). Developmental regulation of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor subunit expression in forebrain and relationship to regional susceptibility to hypoxic/ischemic injury. I. Rodent cerebral white matter and cortex. *Journal of comparative neurology*, 497(1), 42-60.
- Talos, D. M., Sun, H., Zhou, X., Fitzgerald, E. C., Jackson, M. C., Klein, P. M., ... & Jensen, F. E. (2012). The interaction between early life epilepsy and autistic-like behavioral consequences: a role for the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. *PLoS one*, 7(5), e35885.
- Temkin, N. R., & Davis, G. R. (1984). Stress as a risk factor for seizures among adults with epilepsy. *Epilepsia*, 25(4), 450-456.
- Thomas, A., Burant, A., Bui, N., Graham, D., Yuva-Paylor, L. A., & Paylor, R. (2009). Marble burying reflects a repetitive and perseverative behavior more than novelty-induced anxiety. *Psychopharmacology*, 204(2), 361-373.
- Thompson, R. F., & Spencer, W. A. (1966). Habituation: a model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychological review*, 73(1), 16.
- Toga, A. W., Thompson, P. M., & Sowell, E. R. (2006). Mapping brain maturation. *Focus*.

Tomasino, B., & Gremese, M. (2016). The cognitive side of M1. *Frontiers in human neuroscience, 10*.

Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., ... & Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological reviews, 62*(3), 405-496.

Treiman, D. M. (2001). GABAergic mechanisms in epilepsy. *Epilepsia, 42*(s3), 8-12.

Tremblay, E., Nitecka, L., Berger, M. L., & Ben-Ari, Y. (1984). Maturation of kainic acid seizure-brain damage syndrome in the rat. I. Clinical, electrographic and metabolic observations. *Neuroscience, 13*(4), 1051-1072.

Turner, R. J., & Lloyd, D. A. (2004). Stress Burden and the Lifetime Incidence of Psychiatric Disorder in Young Adults: Racial and Ethnic Contrasts. *Archives of general psychiatry, 61*(5), 481-488.

Turski, L., Ikonomidou, C., Turski, W. A., Bortolotto, Z. A., & Cavalheiro, E. A. (1989). Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. *Synapse, 3*(2), 154-171.

Uesugi, R., Yamada, M., Mizuguchi, M., Baimbridge, K. G., & Kim, S. U. (1992). Calbindin D-28k and parvalbumin immunohistochemistry in developing rat retina. *Experimental eye research, 54*(4), 491-499.

Ulrich-Lai, Y. M., & Herman, J. P. (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature reviews. Neuroscience, 10*(6), 397.

Velišek, L. MODELS| Models of Generalized Seizures in Freely Moving Animals.

Vinck, M., Bos, J. J., Van Mourik-Donga, L. A., Oplaat, K. T., Klein, G. A., Jackson, J. C., ... & Pennartz, C. M. (2015). Cell-type and state-dependent synchronization among rodent somatosensory, visual, perirhinal cortex, and hippocampus CA1. *Frontiers in systems neuroscience*, *9*.

Vogt, B. A., Finch, D. M., & Olson, C. R. (1992). Functional heterogeneity in cingulate cortex: the anterior executive and posterior evaluative regions. *Cerebral cortex*, *2*(6), 435-443.

Vogt, B. A., Nimchinsky, E. A., Vogt, L. J., & Hof, P. R. (1995). Human cingulate cortex: surface features, flat maps, and cytoarchitecture. *Journal of Comparative Neurology*, *359*(3), 490-506.

Waltereit, R., Japs, B., Schneider, M., de Vries, P. J., & Bartsch, D. (2011). Epilepsy and Tsc2 haploinsufficiency lead to autistic-like social deficit behaviors in rats. *Behavior genetics*, *41*(3), 364-372.

Watson, R. E., DeSesso, J. M., Hurtt, M. E., & Cappon, G. D. (2006). Postnatal growth and morphological development of the brain: a species comparison. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, *77*(5), 471-484.

Weber, B., Luders, E., Faber, J., Richter, S., Quesada, C. M., Urbach, H., ... & Helmstaedter, C. (2007). Distinct regional atrophy in the corpus callosum of patients with temporal lobe epilepsy. *Brain*, *130*(12), 3149-3154.

Whitnall, M. H. (1993). Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. *Progress in neurobiology*, *40*(5), 573-629.

Wobbrock, J. O., Findlater, L., Gergle, D., Higgins, J. J., & Kay, M. ARTool ARTool.

World Health Organization. (2005). *Atlas: epilepsy care in the world, 2005*. World Health Organization.

Zhao, D., Leung, L. S., Boon, F., & Cain, D. P. (1994). Persistent physiological effects caused by a single pentylenetetrazol induced seizure in neonatal rats. *Developmental brain research*, 80(1), 190-198.

Κουτραφούρη, Β. & Λιβανίου, Ε. In vitro ανοσοδιάγνωση ασθενειών. Εργαστήριο ανοσοπεπτιδικής Χημείας ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος».

Adler, J., Pagakis, S. N., & Parmryd, I. (2008). Replicate-based noise corrected correlation for accurate measurements of colocalization. *Journal of microscopy*, 230(1), 121-133.

Donato, F., Rompani, S. B., & Caroni, P. (2013). Parvalbumin-expressing basket-cell network plasticity induced by experience regulates adult learning. *Nature*, 504(7479), 272.

Dunn, K. W., Kamocka, M. M., & McDonald, J. H. (2011). A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 300(4), C723-C742.

Gogolla, N., Caroni, P., Lüthi, A., & Herry, C. (2009). Perineuronal nets protect fear memories from erasure. *Science*, 325(5945), 1258-1261.

Hylín, M. J., Orsi, S. A., Moore, A. N., & Dash, P. K. (2013). Disruption of the perineuronal net in the hippocampus or medial prefrontal cortex impairs fear conditioning. *Learning & Memory*, 20(5), 267-273.

Lensjø, K. K., Christensen, A. C., Tennøe, S., Fyhn, M., & Hafting, T. (2017). Differential Expression and Cell-Type Specificity of Perineuronal Nets in Hippocampus, Medial Entorhinal Cortex, and Visual Cortex Examined in the Rat and Mouse. *eNeuro*, 4(3), ENEURO-0379.

Ye, Q., & Miao, Q. L. (2013). Experience-dependent development of perineuronal nets and chondroitin sulfate proteoglycan receptors in mouse visual cortex. *Matrix Biology*, 32(6), 352-363.