



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«Η ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΤΟΥ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ Η ΠΡΟΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΥΓΕΙΑΣ»
Επιστημονικά υπεύθυνη: Κανακά-Gantenbein Χριστίνα

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Χαρτογράφηση της ενεργοποίησης της μικρογλοίας
στις περιοχές του προμετωπιαίου φλοιού,
του ιπποκάμπου και της αμυγδαλής
μετά από πρόκληση χρόνιου στρες κοινωνικής ήττας**

Συγγραφέας-ερευνήτρια

Φερλέ Βασιλική

ΑΜ 20160470

Τριμελής επιτροπή

Σταματάκης Αντώνης

Χρούσος Γεώργιος

Δαρβίρη Χριστίνα

ΑΘΗΝΑ, 2018

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ: Η έκθεση σε πρώιμες στρεσογόνες εμπειρίες επηρεάζει καθοριστικά την ανάπτυξη και τη λειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος. Όταν αυτή δε ακολουθείται από έκθεση σε χρόνιους στρεσογόνους παράγοντες κατά την ενήλικη ζωή, οι αρνητικές επιπτώσεις τους στρες ενισχύονται. Η μικρογλοία είναι μία κατηγορία κυττάρων του ανοσοποιητικού αλλά και του νευρικού συστήματος που μελετώνται ως πιθανοί διαμεσολαβητές αυτού του φαινομένου ενίσχυσης. **ΣΚΟΠΟΣ:** Στην παρούσα μελέτη διερευνήσαμε το πρότυπο ενεργοποίησης της μικρογλοίας μετά την έκθεση σε ψυχοκοινωνικό στρες μόνο κατά την νεογνική περίοδο, μόνο κατά την ενήλικη ζωή και κατά τη διαδοχική τους συνύπαρξη. **ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ:** Για το σκοπό αυτό αξιοποιήθηκαν δύο ζωικά πειραματικά μοντέλα στον επίμυ. Η νεογνική εκπαίδευση σε λαβύρινθο σχήματος T υπό συνθήκες άρνησης ή λήψης της ανταμοιβής –νεογνικό μοντέλο ήπιας αντιξοότητας– και το χρόνιο στρες κοινωνικής ήττας στους ενήλικες. Για τον χαρακτηρισμό του προτύπου ενεργοποίησης της μικρογλοίας στον εγκέφαλο, και συγκεκριμένα στις περιοχές του ιπποκάμπου, του προμετωπιαίου φλοιού και της αμυγδαλής, διενεργήθηκε: α) ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της πρωτεΐνης Iba-1 –γενικός κυτταρικός δείκτης της μικρογλοίας– ώστε να αποτιμηθεί αριθμητικά ο πληθυσμός της μικρογλοίας, και β) ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής των γονιδίων *PPAR γ* , *IL-1 β* και *TNF α* ώστε να προσδιοριστεί το ανοσολογικό προφίλ της μικρογλοίας. **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:** Η έρευνά μας έδειξε ότι η διαδοχή στρεσογόνων γεγονότων στην πρώιμη νεογνική περίοδο και μετέπειτα κατά την ενήλικη ζωή οδηγεί σε αριθμητική αύξηση του πληθυσμού της μικρογλοίας στον ιππόκαμπο και στον προμετωπιαίο φλοιό και σε αύξηση της σχετικής έκφρασης του αντιφλεγμονώδους παράγοντα *PPAR γ* στον ιππόκαμπο. **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:** Μια ήπια πρώιμη στρεσογόνος εμπειρία, ενώ από μόνη της δεν επηρεάζει τη μικρογλοία, όταν συνοδεύεται από στρες κατά την ενήλικη ζωή εμφανίζει να έχει σημαντική επίπτωση σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο. Το φαινόμενο αυτό έρχεται σε συμφωνία με την "Υπόθεση των δύο χτυπημάτων", όπου η ευαλωτότητα στο στρες κατά την ενήλικη ζωή καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από την ποιότητα των πρώιμων εμπειριών. Ένα φαινόμενο ιδιαίτερης κοινωνικής αξίας, καθώς επισημαίνει την κρισιμότητα των παιδικών χρόνων στον μακροπρόθεσμο καθορισμό της υγείας και της ποιότητας ζωής.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Μικρογλοία, Στρες, Πρώιμες στρεσογόνες εμπειρίες, Χρόνιο στρες κοινωνικής ήττας, Νευροφλεγμονή, Κατάθλιψη, Iba-1, IL-1 β , TNF α , PPAR γ .

Περιεχόμενα

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
1. Εισαγωγή	1
2. Στρες και ομοιόσταση.....	1
2.1 Ομοιόσταση.....	1
2.2. Στρες.....	2
2.3. Το σύστημα του στρες.....	4
2.3.1. Στρες και γλυκοκορτικοειδή	6
2.3.2. Στρες και κατεχολαμίνες.....	8
2.3.3. Στρες και κυτοκίνες.....	9
3. Επιγενετική	10
4. Ψυχοκοινωνικό στρες.....	11
5. Πρώιμες στρεσογόνες εμπειρίες (early life stress).....	13
5.1. Προγεννητικό στρες.....	13
5.2. Περιγεννητικό στρες	14
5.3. Μεταγεννητικό στρες τα πρώιμα παιδικά χρόνια	14
5.4. Ζωικά πειραματικά μοντέλα πρώιμων στρεσογόνων εμπειριών.....	15
5.5. Συσχέτιση πρώιμων στρεσογόνων εμπειριών και επιγενετικής	16
5.5.1. Επίδραση των πρώιμων στρεσογόνων εμπειριών στον επιγενετικό μηχανισμό	17
5.5.2. Διαγενεϊκή επιγενετική κληρονομικότητα.....	18
6. Χρόνιο στρες κοινωνικής ήττας.....	18
6.1. Συμπεριφορικές επιπτώσεις του χρόνιου στρες κοινωνικής ήττας.....	21
6.2. Φυσιολογικές επιπτώσεις του χρόνιου στρες κοινωνικής ήττας	21
6.3. Μοριακές επιπτώσεις του χρόνιου στρες κοινωνικής ήττας	21
6.4. Κυτταρικές επιπτώσεις του χρόνιου στρες κοινωνικής ήττας.....	21
7. Μικρογλοία.....	22
7.1. Μικρογλοία και ανάπτυξη.....	22
7.2. Φαινότυποι και λειτουργίες της μικρογλοίας.....	25
7.2.1. «Λανθάνουσα» κατάσταση (M0)	27
7.2.2. «Ενεργοποιημένη» κατάσταση M1/M2.....	28
7.2.3. Περιορισμοί των κατηγοριοποιήσεων	29
7.3. Αλληλεπίδραση μικρογλοίας με το μικροπεριβάλλον της.....	29

7.3.1. Μικρογλοία και νευρώνες.....	32
7.3.2. Μικρογλοία και αστροκύτταρα.....	35
7.3.3. Μικρογλοία και ολιγοδενδροκύτταρα	35
7.3.4. Μικρογλοία και νευροενδοθηλιακά κύτταρα.....	36
7.4. Στρες και μικρογλοία	39
7.4.1. Η πρωτεΐνη Iba-1.....	41
7.4.2. Περιφερικά εκκρινόμενοι παράγοντες που επιδρούν στη μικρογλοία.....	41
7.4.3. Κεντρικά εκκρινόμενοι παράγοντες και μηχανισμοί επίδρασης στη μικρογλοία.....	43
7.4.4. Αρνητικές νεογνικές εμπειρίες και μικρογλοία	45
7.4.5. Χρόνιο στρες κοινωνικής ήττας και μικρογλοία.....	46
7.5. Συσχέτιση μικρογλοίας με την κατάθλιψη.....	46
8. Κατάθλιψη	47
8.1. Επιδημιολογικά δεδομένα	48
8.2. Ιστορικά δεδομένα.....	48
8.3. Χαρακτηριστικά-Διάγνωση.....	49
8.4. Εκδήλωση.....	50
8.5. Θεραπεία	50
8.6. Παθοφυσιολογία της κατάθλιψης.....	51
8.7. Νευροβιολογικό υπόβαθρο της κατάθλιψης-κυρίαρχες θεωρίες	52
8.7.1. Η υπόθεση του νευρωνικού κυκλώματος της κατάθλιψης.....	52
8.7.2. Η υπόθεση των μονοαμινών	53
8.7.3. Η νευροτροφική υπόθεση.....	54
8.7.4. Η υπόθεση της νευροενδοκρινούς αλληλεπίδρασης	55
8.7.5. Υποθέσεις που σχετίζονται με τη μικρογλοία.....	55
8.7.6. Ενοποιημένη θεωρία.....	60
8.8. Ζωικά πειραματικά μοντέλα μελέτης της κατάθλιψης	61
B. ΣΤΟΧΟΙ.....	66
9. Στόχοι έρευνας	66
9.1. Πρωτογενείς στόχοι	67
9.2 Δευτερογενείς στόχοι.....	67
Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	68
10. Σχεδιασμός έρευνας.....	68
10.1. Πειραματόζωα	68

10.2. Νεογνική εκπαίδευση σε λαβύρινθο σχήματος T υπό συνθήκες άρνησης ανταμοιβής.....	70
10.3. Δοκιμασία Χρόνιας Κοινωνικής Ήττας (Chronic Social Defeat)	72
10.4. Προετοιμασία ιστού	73
10.5. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός Iba-1 (δείκτης μικρογλοιακών κυττάρων) ...	74
10.6. Ποσοτική καταγραφή των Iba-1 ανοσοθετικών μικρογλοιακών κυττάρων...	74
10.7. Απομόνωση RNA και ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων <i>IL-1β</i> , <i>TNF-α</i> , <i>PPAR-γ</i> με qRT-PCR	77
11. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	82
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	83
12. Επίδραση του στρες στον αριθμό των Iba-1 ανοσοθετικών μικρογλοιακών κυττάρων.....	83
12.1. Iba-1 ανοσοθετικά μικρογλοιακά κύτταρα στον ιππόκαμπο.....	84
12.1.1. Σύγκριση του αριθμού των Iba-1 ανοσοθετικών μικρογλοιακών κυττάρων στον ιππόκαμπο μεταξύ όλων των πειραματικών ομάδων	84
12.1.2. Σύγκριση του αριθμού των Iba-1 ανοσοθετικών μικρογλοιακών κυττάρων στον ιππόκαμπο ανάμεσα στις πειραματικές ομάδες που εκτέθηκαν σε στρες ως ενήλικα	85
12.1.3. Σύγκριση του αριθμού των Iba-1 ανοσοθετικών μικρογλοιακών κυττάρων στον ιππόκαμπο ανάμεσα στις DER πειραματικές ομάδες.....	86
12.1.4. Λοιπές συγκρίσεις στον ιππόκαμπο.....	86
12.2. Iba-1 ανοσοθετικά μικρογλοιακά κύτταρα στον προμετωπιαίο φλοιό.....	87
12.2.1. Σύγκριση του αριθμού των Iba-1 ανοσοθετικών μικρογλοιακών κυττάρων στον προμετωπιαίο φλοιό μεταξύ όλων των πειραματικών ομάδων	87
12.2.2. Σύγκριση του αριθμού των Iba-1 ανοσοθετικών μικρογλοιακών κυττάρων στον προμετωπιαίο φλοιό ανάμεσα στις πειραματικές ομάδες που εκτέθηκαν σε στρες ως ενήλικα	87
12.2.3. Σύγκριση του αριθμού των Iba-1 ανοσοθετικών μικρογλοιακών κυττάρων στον προμετωπιαίο φλοιό ανάμεσα στις DER πειραματικές ομάδες.....	88
12.2.4. Λοιπές συγκρίσεις στον προμετωπιαίο φλοιό	89
12.3. Iba-1 ανοσοθετικά μικρογλοιακά κύτταρα στην αμυγδαλή.....	89
12.3.1. Σύγκριση του αριθμού των Iba-1 ανοσοθετικών μικρογλοιακών κυττάρων στην αμυγδαλή μεταξύ όλων των πειραματικών ομάδων	89

13. Επίδραση της διαδοχικής έκθεσης σε στρες στη σχετική έκφραση των γονιδίων PPAR γ , IL-1 β , TNFa.....	90
13.1. Σχετική έκφραση του γονιδίου PPAR γ στις πειραματικές ομάδες που εκτέθηκαν σε στρες ως ενήλικα.....	90
13.1.1. Σχετική έκφραση του γονιδίου PPAR γ στον ιπόκαμπο στις πειραματικές ομάδες που εκτέθηκαν σε στρες ως ενήλικα.....	90
13.1.2. Σχετική έκφραση του γονιδίου PPAR γ στον προμετωπιαίο φλοιό και την αμυγδαλή στις πειραματικές ομάδες που εκτέθηκαν σε στρες ως ενήλικα	91
13.2. Σχετική έκφραση των γονιδίων IL-1 β και TNFa στις πειραματικές ομάδες που εκτέθηκαν σε στρες ως ενήλικα.....	93
14. Συγκεντρωτικός πίνακας στατιστικά σημαντικών αποτελεσμάτων.....	96
E. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	97
15. Συμπεράσματα.....	97
16. Περιορισμοί της μελέτης-Μελλοντικές προοπτικές.....	102
17. Επίλογος.....	102
ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	104

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

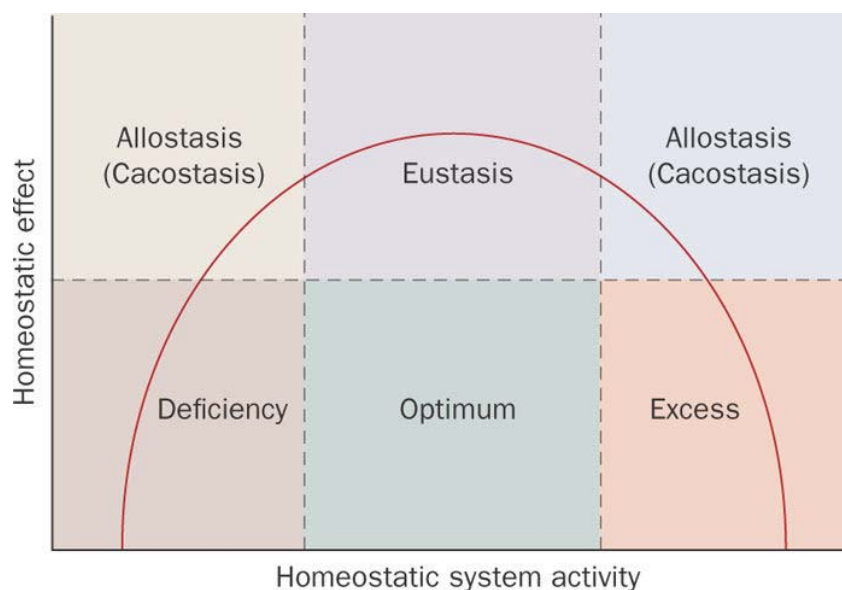
1. Εισαγωγή

Το ψυχοκοινωνικό στρες αποτελεί έναν κρίσιμο διαταράκτη τόσο της φυσιολογικής όσο και της ψυχικής ομοιόστασης του ανθρώπου. Ιδιαίτερα δε, όταν υφίσταται κατά την πρώιμη παιδική ηλικία δύναται να επηρεάσει άμεσα την αναπτυξιακή πορεία του ατόμου αλλά και μακροπρόθεσμα την ευρωστία ως ενήλικο (1–4). Έτσι η διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών μέσω των οποίων το στρες επιδρά αυτή την κρίσιμη περίοδο της ζωής συνιστά μία σημαντική ανάγκη της κοινωνίας. Η εμπλοκή της φλεγμονής –και πιο ειδικά της μικρογλοίας– στην εύρυθμη ανάπτυξη και λειτουργία του εγκεφάλου αποτελεί μία από τις πλέον σύγχρονες ερευνητικές τάσεις στην προσπάθεια της νευροβιολογικής μελέτης του στρες (5–8,8–29).

2. Στρες και ομοιόσταση

2.1 Ομοιόσταση

Ομοιόσταση ονομάζουμε την κατάσταση εσωτερικής φυσιολογικής δυναμικής ισορροπίας ενός συστήματος, που έχει ως αποτέλεσμα την εξουδετέρωση των εξωτερικών ή εσωτερικών επιδράσεων που δέχεται και την επαναφορά του συστήματος στην αρχική κατάσταση (30). Όλα τα ομοιοστατικά συστήματα χαρακτηρίζονται από μία καμπύλη δόσης-απόκρισης τύπου ανεστραμμένου U (Εικ.1).



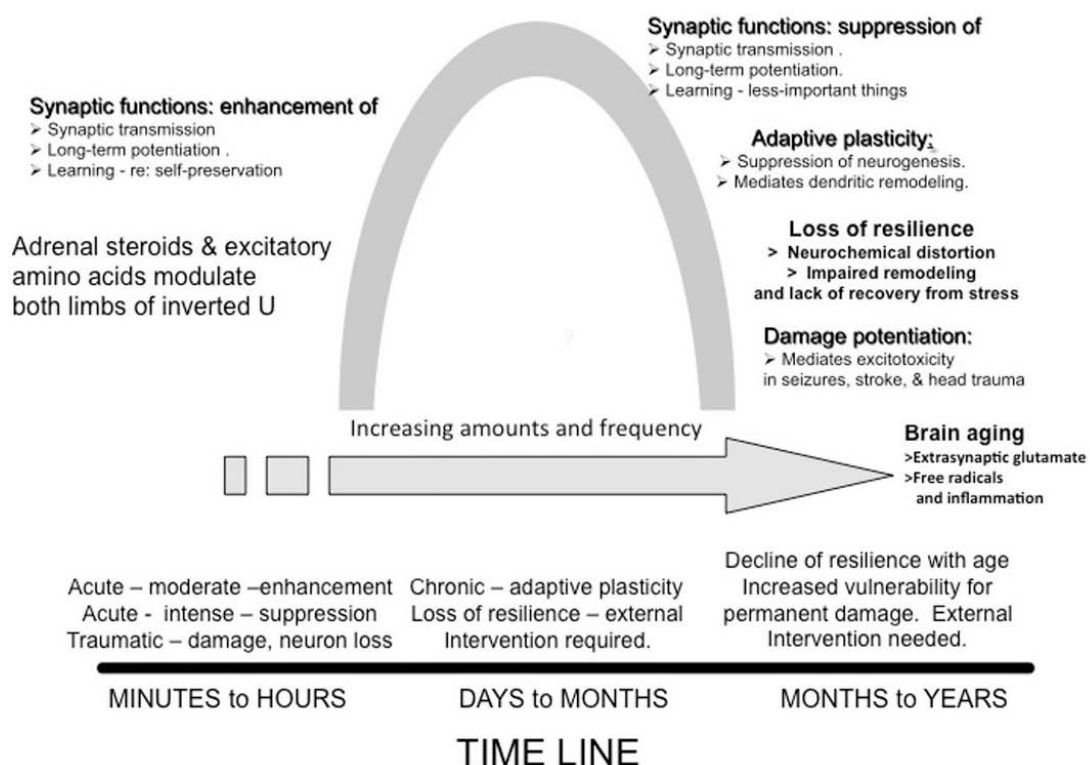
Εικόνα 1. Μοντέλο συσχέτισης της δραστηριότητας του ομοιοστατικού συστήματος και του αποτελέσματος στην ομοιόσταση του οργανισμού. Πηγή: Chrousos GP. Stress and disorders of the stress system. Nat Rev Endocrinol. 2009 Jul 1;5(7):374–81.

Στο μέσον της καμπύλης έχουμε την βέλτιστη απόκριση του συστήματος και την επίτευξη εύστασης (βασική ομοιόσταση) ή/και υπέρστασης (βελτιωμένη ομοιόσταση), ενώ στα δύο άκρα όπου η απόκριση του συστήματος αποδεικνύεται ανεπαρκής ή υπερβολική έχουμε την κατάσταση αλλόστασης (ή κακόστασης) (30).

2.2. Στρες

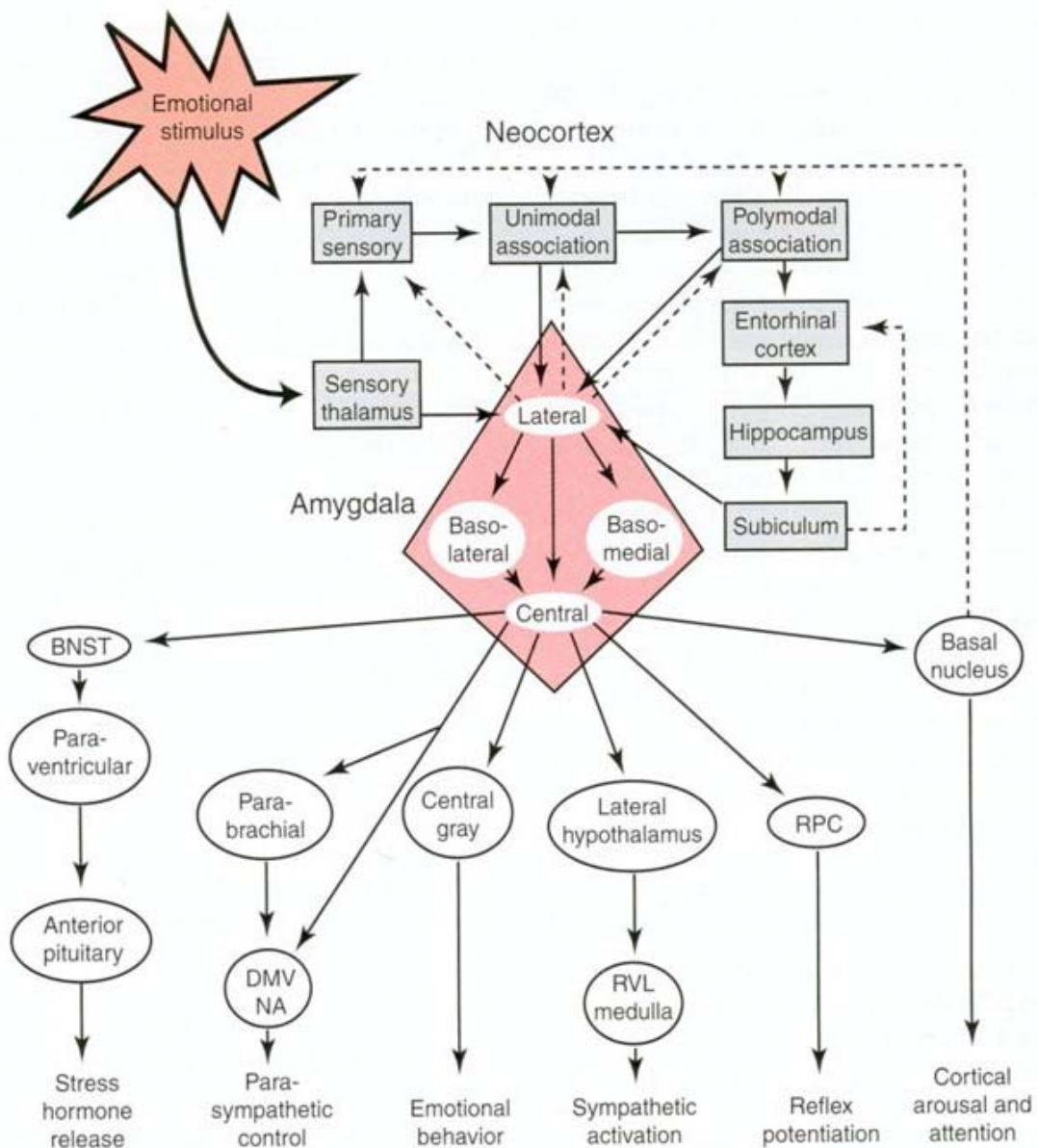
Από την αρχή της φυσικής ιστορίας όλοι οι οργανισμοί υπόκεινται διαρκώς σε εξελικτικές πιέσεις από το περιβάλλον, όπου η επιτυχής ή μη προσαρμογή τους στις πιέσεις αυτές καθορίζει την επιβίωση τους, την αναπαραγωγή, τη συνέχιση και εξέλιξη του είδους. Η ίδια η εξελικτική πίεση αποτελεί έναν στρεσογόνο παράγοντα. Έτσι το στρες αποτελεί αναπόσπαστο μέρος της φυσικής ιστορίας όλων των οργανισμών.

Στρες ονομάζουμε την κατάσταση απειλής ή αντιλαμβανόμενης απειλής της ομοιόστασης, η οποία αποκαθίσταται μέσα από ένα σύνθετο πλέγμα συμπεριφορικών και φυσιολογικών αποκρίσεων προσαρμογής του οργανισμού (30).



Εικόνα 2. Μοντέλο συσχέτισης της διάρκειας και έντασης του στρες με την επίπτωση του. Πηγή: McEwen BS, Bowles NP, Gray JD, Hill MN, Hunter RG, Karatsoreos IN, et al. Mechanisms of stress in the brain. Nat Neurosci. 2015 Oct;18(10):1353–63.

Συνεπώς, στρεσογόνους παράγοντες ή στρέσορες ονομάζουμε κάθε εξωτερικό ή εσωτερικό ερέθισμα που αποτελεί απειλή για την ομοίωση του οργανισμού. Οι στρεσογόνοι παράγοντες διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες βάσει της φύσης (ψυχολογικός, φυσικός, φυσιολογικός), της διάρκειας, της συχνότητας και της έντασης τους. Ιδιαίτερως κρίσιμη φαίνεται να είναι η διάρκεια, όπου και διακρίνουμε τους οξείς στρεσογόνους παράγοντες μικρής διάρκειας (λεπτά-ώρες) και τους χρόνιους μεγάλης διάρκειας (μήνες-χρόνια) (Εικ. 2) (31).



Εικόνα 3. Νευρωνικά μονοπάτια μέσω των οποίων ένα συναισθηματικό ερέθισμα επιδρά στο ΚΝΣ. Πηγή: LeDoux JE. Emotion: clues from the brain. Annu Rev Psychol. 1995;46:209–35. (<http://slideplayer.com/slide/7060424/>).

Η πορεία μέσω της οποίας ένας ψυχολογικός στρεσογόνος παράγοντας προκαλεί στρες διακρίνεται στα εξής στάδια: α) Έκθεση στον στρέσορα, β) Εκτίμηση των απαιτήσεων και ικανοτήτων προσαρμογής, γ) Ήπια αποτίμηση (οπότε και δεν προκαλείται στρες και η ακολουθία σταματάει εδώ) ή Ισχυρή αποτίμηση και αντιλαμβανόμενο στρες (και συνεχίζουμε στα στάδια δ και ε), δ) Αρνητικές συναισθηματικές αντιδράσεις, ε) Φυσιολογική ή συμπεριφορική απόκριση.

Αρχικός δέκτης των εξωτερικών στρεσογόνων ερεθισμάτων είναι ο θάλαμος, που είτε απευθείας είτε μέσω του πρωτοταγούς αισθητικού φλοιού ή και του ιπποκάμπου, στέλνει μήνυμα στους έξω πυρήνες της αμυγδαλής (Εικ. 3) (32). Από εκεί το σήμα μεταβιβάζεται στον κεντρικό πυρήνα της αμυγδαλής που ενεργοποιεί μια σειρά από περιοχές που συγκροτούν το δίκτυο αμυντικών αποκρίσεων, όπως η κεντρική φαιά ουσία (έλεγχος αντίδρασης «παγώματος»), ο πλευρικός υποθάλαμος και ο κοιλιακός πρόσθιος προμήκης μυελός (έλεγχος αποκρίσεων συμπαθητικού νευρικού συστήματος), ο πυρήνας της τελικής ταινίας (BNST) και ο παρακοιλιακός πυρήνας του υποθαλάμου (έλεγχος άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων) (32).

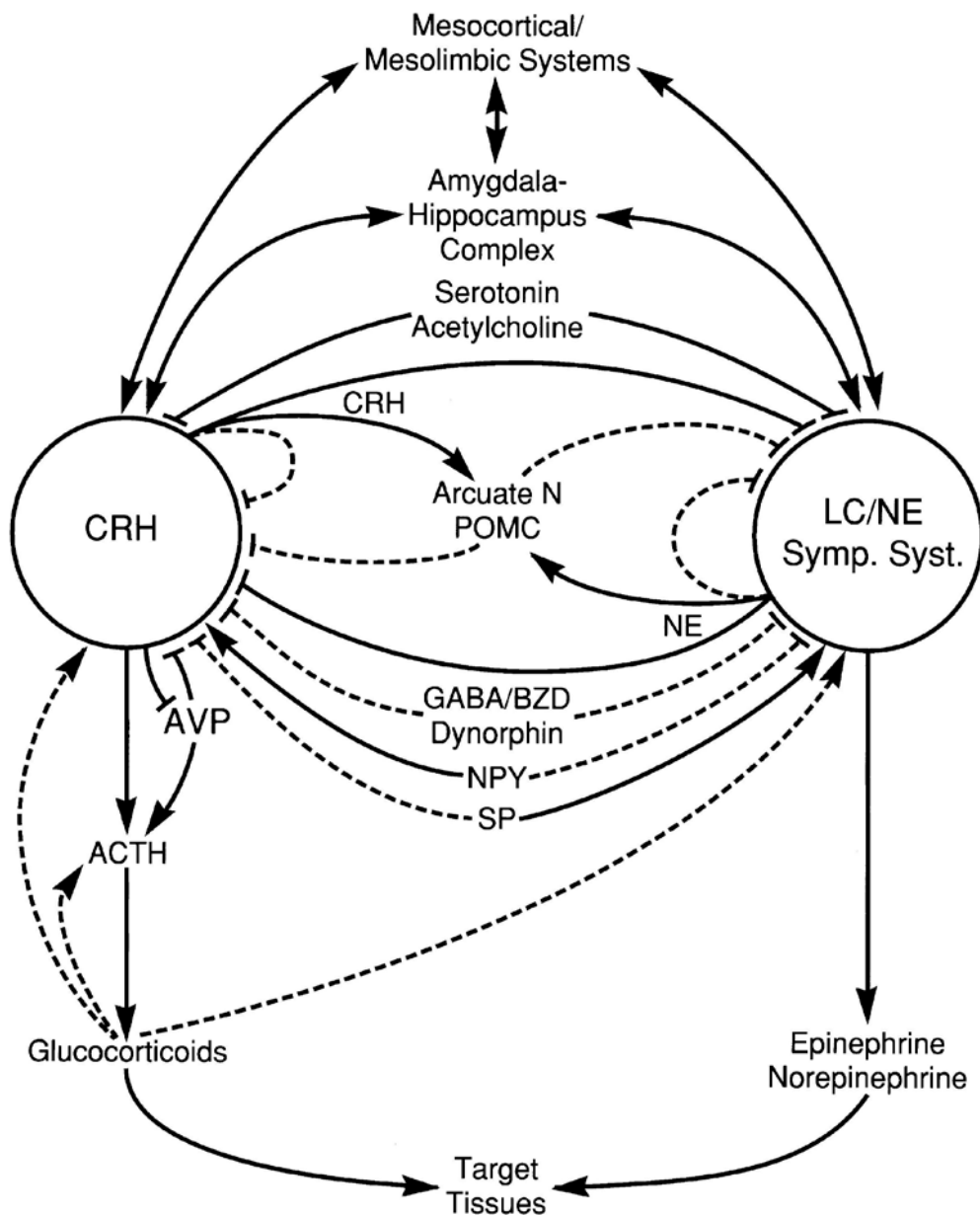
Τελεστής της φυσιολογικής απόκρισης στο στρες, είναι το σύστημα του στρες, που πρόκειται για ένα νευροενδοκρινές σύστημα, με τμήματα στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), στο περιφερικό νευρικό σύστημα και στο ενδοκρινικό (30).

2.3. Το σύστημα του στρες

Το σύστημα του στρες αποτελεί ένα ομοιοστατικό σύστημα που ενορχηστρώνει την φυσιολογική απόκριση του οργανισμού στους στρεσογόνους παράγοντες. Εξισορροπεί δηλαδή τις εξωτερικές επιδράσεις που δέχεται ο οργανισμός με στόχο τη διατήρηση της φυσιολογικής δυναμικής του ισορροπίας και σε ορισμένες περιπτώσεις τη βελτίωση αυτής μέσω της αξιοποίησης των εμπειριών.

Το σύστημα του στρες (Εικ. 4) ξεκινά από το ΚΝΣ και καταλήγει στην περιφέρεια μέσω δύο καθοδικών αξόνων, τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (ΥΥΕ ή HPA axis) και τον συμπαθητικό αδρενομελωδή άξονα (ΣΑΜ ή SAM axis) (33).

Η πορεία μέσω της οποίας ένας ψυχολογικός στρεσογόνος παράγοντας προκαλεί στρες διακρίνεται στα εξής στάδια: α) Έκθεση στον στρέσορα, β) Εκτίμηση των απαιτήσεων και ικανοτήτων προσαρμογής, γ) Ήπια αποτίμηση (οπότε και δεν προκαλείται στρες και η ακολουθία σταματάει εδώ) ή Ισχυρή αποτίμηση και αντιλαμβανόμενο στρες (και συνεχίζουμε στα στάδια δ και ε), δ) Αρνητικές συναισθηματικές αντιδράσεις, ε) Φυσιολογική ή συμπεριφορική απόκριση.



Εικόνα 4. Το σύστημα του στρες. Πηγή: Chrousos GP. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. Ann N Y Acad Sci. 1998 Jun 30;851:311–35.

Στον ΥΥΕ άξονα, μετά από έκθεση σε στρες, οι μικροκυτταρικοί νευρώνες του παρακοιλιακού πυρήνα του υποθαλάμου (PVN) και οι CRH-νευρώνες του προμήκου μυελού, που μαζί αποτελούν το CRH σύστημα, εκκρίνουν κορτικοεκλυτίνη/εκλυτικός ορμόνη της κορτικοτροπίνης (CRH) και βασοπρεσίνη (AVP). Οι CRH και AVP επιδρούν στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης όπου διεγείρεται η έκκριση αδρενοκορτικοτρόπου ορμόνης (ACTH). Η ACTH μέσω της κυκλοφορίας του αίματος επιδρά στη στηλιδωτή ζώνη του φλοιού των επινεφριδίων όπου διεγείρει τη

σύνθεση και έκκριση γλυκοκορτικοειδών στην κυκλοφορία (στον άνθρωπο κύρια κορτιζόλη, ενώ στα τρωκτικά κορτικοστερόνη). Στη συνέχεια τα γλυκοκορτικοειδή επιδρούν μέσω υποδοχέων τους στα κύτταρα, ρυθμίζοντας πλειάδα GR-εξαρτώμενων γονιδίων. Επιπλέον αναστέλλουν τον ΥΥΕ άξονα, τερματίζοντας έτσι την απόκριση στο στρες, μέσω ενός κυκλώματος αρνητικής ανάδρασης.

Ο ΣΑΜ άξονας εκκινεί από τον υπομέλανα τόπο (LC) και άλλους νοραδρενεργικό ή πυρήνες της γέφυρας, που μαζί αποτελούν το σύστημα LC/NE. Μέσω απαγωγών συμπαθητικών νεύρων φτάνει στην περιφέρεια όπου νευρώνει διάφορους ιστούς. Τα νεύρα που καταλήγουν στο μυελό των επινεφριδίων διεγείρουν την έκλυση των κατεχολαμινών επινεφρίνη (E) και νορεπινεφρίνη (NE) στην κυκλοφορία, σε αναλογία 4:1, ενώ οι μεταγαγγλικές συμπαθητικές νευρικές ίνες που νευρώνουν άλλους ιστούς απελευθερώνουν απευθείας NE (αλλά και CRH, NPY, SP) που έχει όμως παρακρινή δράση.

Παράλληλα, στο τμήμα του συστήματος του στρες εντός του ΚΝΣ, οι δύο άξονες αλληλεπιδρούν τόσο μεταξύ τους όσο και με άλλα συστήματα, όπως το μεσοφλοιώδες/μεσομεταιχμιακό, το σύμπλεγμα αμυγδαλής-ιπποκάμπου, τα συστήματα σεροτονίνης, ακετυλοχολίνης, γ-αμινοβουτυρικού/βενζοδιαζεπινών (GABA/BZD), προ-οπιομελανοκορτίνης (POMC) του τοξοειδούς πυρήνα του υποθαλάμου, και τα πεπτίδια S (SP) και νευροπεπτίδιο Y (NPY) (34).

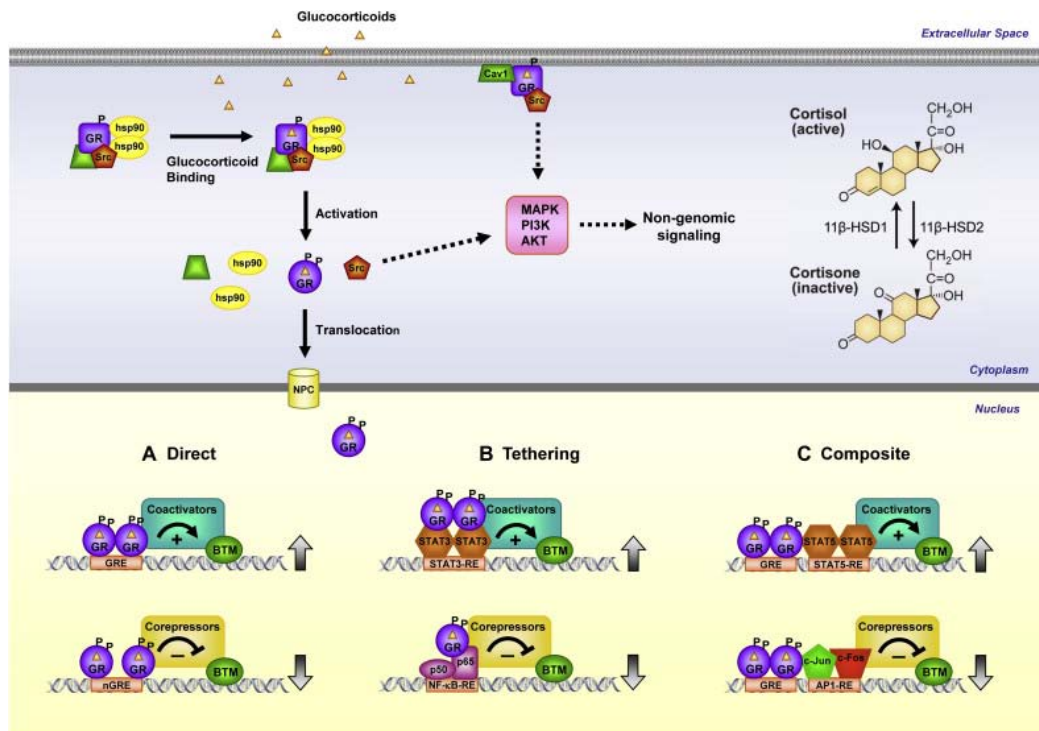
2.3.1. Στρες και γλυκοκορτικοειδή

Τα γλυκοκορτικοειδή (glucocorticoids, GCs) είναι λιπόφιλα μόρια που διαπερνούν ελεύθερα την κυτταρική μεμβράνη και οι υποδοχείς τους εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα. Οι υποδοχείς τους διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, το η MR (Mineralocorticoid receptor) οι οποίοι έχουν υψηλή συγγένεια ως προς τα γλυκοκορτικοειδή (glucocorticoids, GCs), και οι GR (Glucocorticoid receptor) χαμηλής συγγένειας. Υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών υπάρχουν σχεδόν σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού και έτσι επηρεάζουν πλειάδα φυσιολογικών λειτουργιών. Ο μηχανισμός γενωμικής δράσης των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών είναι μέσω των στοιχείων απόκρισης σε γλυκοκορτικοειδή (glucocorticoid response elements, GREs) που ελέγχουν την έκφραση πολλών γονιδίων (Εικ. 5) (35).

Σε κατάσταση ηρεμίας οι ανενεργοί GR βρίσκονται σε ολιγομερές σύμπλοκο με πρωτεΐνες όπως οι hsp90, hsp70, p23, FKBP51, FKBP52. Όταν αυτοί προσδέσουν GC και ενεργοποιηθούν, απελευθερώνονται από το σύμπλοκο και είτε μετατοπίζονται στον πυρήνα όπου επηρεάζουν άμεσα τη γονιδιακή έκφραση, είτε

έμμεσα –παραμένοντας εντός του κυτταροπλάσματος– αλληλεπιδρούν με ενδιάμεσους παράγοντες καταρακτών μεταγωγής σήματος. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων επιτυγχάνεται από τα GC η γονιδιακή ρύθμιση της μικρογλοίας, όπως και όλων των υπολοίπων κυττάρων που έχουν υποδοχείς για GC, είναι τέσσερις (35–37).

Ο πρώτος μηχανισμός (direct) είναι η άμεση πρόσδεση των ενεργοποιημένων GR ως ομοδιμερή σε περιοχές του DNA που ονομάζονται στοιχεία απόκρισης σε γλυκοκορτικοειδή (glucocorticoid response elements, GREs) μέσω δακτύλων ψευδαργύρου. Ως προσδεμένο σύμπλοκο ρυθμίζει ακολούθως τη γονιδιακή έκφραση. Η ρύθμιση συνήθως είναι θετική επάγοντας τη μεταγραφή γονιδίων, αλλά μπορεί να είναι και αρνητική, αναστέλλοντας, οπότε και τα συγκεκριμένα στοιχεία απόκρισης ονομάζονται nGRE (negativeGRE) (35–37).



Εικόνα 5. Μονοπάτια σηματοδότησης των υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών GR. Πηγή: Oakley RH, Cidlowski JA. The Biology of the Glucocorticoid Receptor: New Signaling Mechanisms in Health and Disease. J Allergy Clin Immunol. 2013 Nov;132(5):1033–44.

Ο δεύτερος μηχανισμός (tethering) εκτελείται μέσω της δέσμευσης των ενεργοποιημένων GR επάνω σε μεταγραφικούς παράγοντες (STAT, NF-κB), χωρίς οι GR να αλληλεπιδρούν άμεσα με το DNA (35–37).

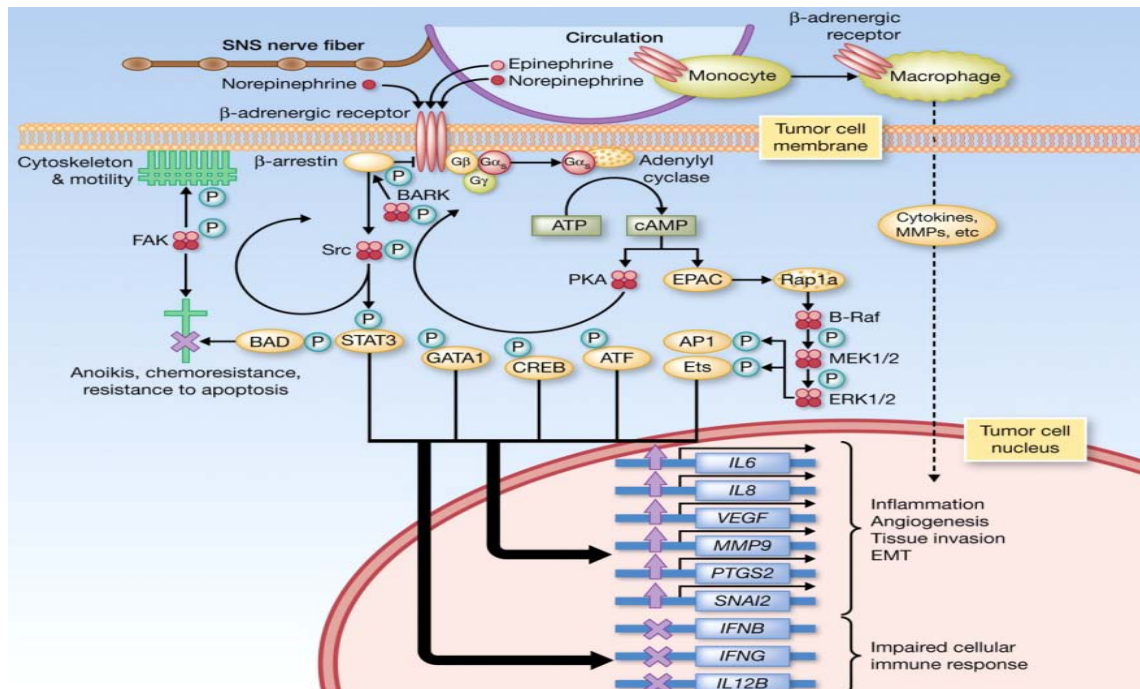
Ο τρίτος μηχανισμός (composite) είναι συνδυαστικός, με ταυτόχρονη πρόσδεση των ενεργοποιημένων GR στις περιοχές GRE και αλληλεπίδραση με τους γειτονικά προσδεδεμένους στο DNA μεταγραφικούς παράγοντες (STAT, AP1).

Όταν η αλληλεπίδραση γίνεται με μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας STAT, και στα δύο αυτά μονοπάτια, έχει ως αποτέλεσμα τη θετική γονιδιακή ρύθμιση, ενώ με πρό φλεγμο κώδικες μεταγραφικούς παράγοντες όπως οι AP1 και NF-κB έχουμε αρνητική γονιδιακή ρύθμιση. Αυτός θεωρείται ότι είναι και ο μηχανισμός της έντονα αντιφλεγμονώδους δράσης των GC (35–37).

Ο τέταρτος μηχανισμός συντελείται μη γονιδιακά (non-genomic) στο κυτταρόπλασμα, όπου οι ενεργοποιημένοι GR επηρεάζουν τη δραστηριότητα διαφόρων κινασών όπως οι PI3K, AKT, MAPKs και ρυθμίζουν έτσι τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος τους (35–38).

2.3.2. Στρες και κατεχολαμίνες

Οι κατεχολαμίνες είναι υδρόφιλα μόρια και προσδένονται στους διαμεμβρανικούς αδρενεργικούς υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων, οι οποίοι διακρίνονται σε δύο υποκατηγορίες, τους α και τους β (Εικ. 6).



Εικόνα 6. Μονοπάτια σηματοδότησης των β-αδρενεργικών υποδοχέων. Πηγή: Cole, S. W. & Sood, A. K. Molecular Pathways: Adrenergic Signaling in Cancer. *Clin. Cancer Res.* **18**, 1201–1206 (2012).

Οι β_2 -αδρενεργικοί υποδοχείς με την προσδέση της κατεχολαμίνης ενεργοποιούνται και ενεργοποιούν με τη σειρά τους την προσδεσμένη στην κυτταροπλασματική πλευρά τους G-πρωτεΐνη. Η G_{α_s} υπομονάδα απελευθερώνεται και ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση που καταλύει την έναρξη του καταρράκτη μεταγωγής σήματος του κυκλικού AMP (cAMP) (36–38). Ως αποτέλεσμα έχουμε την ενεργοποίηση διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων από την πρωτεϊνική κινάση A (PKA), όπως ο CREB, η οικογένεια GATA, και την επακόλουθη ρύθμιση της έκφρασης των εξαρτώμενων γονιδίων (38,39).

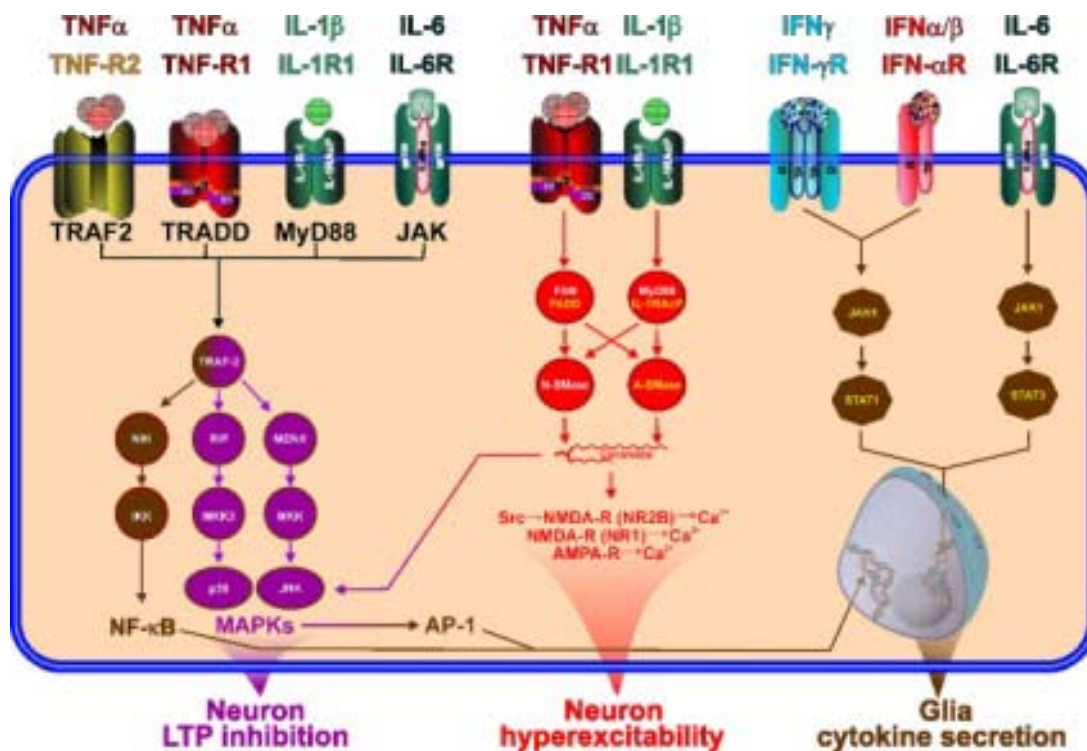
Το συγκεκριμένο μονοπάτι αναφέρεται ως κλασικό καθώς οι β_2 υποδοχείς συνδέονται παραδοσιακά με υπομονάδες G_s πρωτεϊνών, και οι α_{2A} με G_i . Παρόλαυτα φαίνεται ότι μπο ρεί να έχουμε και αντιστροφή, β_2 με G_i και α_{2A} με G_s και ενεργοποίηση των μη-κανονικών μονοπατιών τους (40).

2.3.3. Στρες και κυτοκίνες

Παρότι ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός (ΑΕΦ) δεν επιτρέπει την ελεύθερη διάχυση περιφερικά εκκρινόμενων κυτοκινών προς το ΚΝΣ, υπάρχουν διάφορα μονοπάτια που καθιστούν τελικά εφικτή την επικοινωνία του ανοσοποιητικού με το ΚΝΣ. Αυτά είναι α) μέσω υποδοχέων κυτοκινών στους νευρώνες των περικοιλιακών οργάνων (circumventricular organs) που στερούνται λειτουργικού ΑΕΦ, β) μέσω διέγερσης ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων του εγκεφάλου που επάγει την παραγωγή κυτοκινών εντός τους με τη μεσολάβηση δεύτερων αγγελιοφόρων, γ) μέσω ενεργού μεταφοράς με πρωτεΐνες μεταφορείς δια του ΑΕΦ και δ) μέσω διέγερσης προσαγωγών νεύρων που μεταφέρουν στο ΚΝΣ μήνυμα παραγωγής κυτοκινών εντός του (39). Συνολικά, η επίδραση των περιφερικών κυτοκινών πάνω στο σύστημα του στρες τείνει να είναι διεγερτική και αφορά κυρίως τις IL-1 β , IL-6, TNF α και τις πρωτεΐνες οξείας φάσης (acute phase proteins) (π.χ. C-reactive protein, CRP) (30,36,37,41). Επιπλέον έχει δειχθεί ότι σε ορισμένες περιπτώσεις μπορούν εντός του ΚΝΣ να περάσουν και T-λεμφοκύτταρα διαπερνώντας τον ΑΕΦ (41).

Οι κυτοκίνες αποτελούν μία ευρεία πλειοτροπική ομάδα εκκρινόμενων μορίων που συμμετέχουν στην επικοινωνία των κυττάρων και τη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης. Από αυτές, οι ιντερλευκίνες (ILs), οι ιντερφερόνες (IFNs) και οι παράγοντες νέκρωσης όγκου (TNFs) επιδρούν στο ΚΝΣ. Η δράση τους επιτελείται μέσω διαμεμβρανικών υποδοχέων και ακόλουθης ενεργοποίησης ενδοκυτταρικών μονοπατιών μεταγωγής σήματος, όπως το JAK/STAT και το MAPK μονοπάτι και τελικά επίδρασης στην γονιδιακή έκφραση (Εικ. 7). Το αποτέλεσμα στα νευρικά

κύτταρα είναι κυρίως μεταβολές στη διεγερσιμότητά τους, ενώ στα μικρογλοιακά και υπόλοιπα γλοιακά κύτταρα επάγεται η έκκριση κυτοκινών (42).



Εικόνα 7. Ενδοκυτταρικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος των κυτοκινών. Πηγή: McCusker, R. H. & Kelley, K. W. Immune-neural connections: How the immune system's response to infectious agents influences behavior. *J. Exp. Biol.* **216**, 84–98 (2013).

3. Επιγενετική

Επιγενετική ονομάζουμε τις δυνητικά κληρονομήσιμες και αναστρέψιμες τροποποιήσεις στην έκφραση των γονιδίων χωρίς να επηρεάζεται η ίδια η αλληλουχία του DNA (43–45). Οι επιγενετικές τροποποιήσεις είναι αναστρέψιμες και μεταβάλλουν τον φαινότυπο του κυττάρου ενώ η αλληλουχία του DNA παραμένει ακέραιη. Οι κύριοι επιγενετικοί μηχανισμοί είναι η μεθυλίωση του DNA, οι τροποποιήσεις των ιστονών και η μη-μεταγραφική σίγαση γονιδίων μέσω της δράσης ρυθμιστικών RNA (45,46).

Η επιγενετική ως όρος εισήχθη το 1942 από τον αναπτυξιακό βιολόγο Waddington για να περιγράψει το μηχανισμό μέσω του οποίου τα κύτταρα των πολυκύτταρων οργανισμών παρότι έχουν πανομοιότυπο γενετικό υλικό αναπτύσσουν διαφορετικούς φαινοτύπους, μέσω της ενεργοποίησης ή της σίγασης συγκεκριμένων

γονιδίων (44,46,47). Έτσι δημιουργείται ένα επιγενετικό πρότυπο που κληρονομείται στα αδερφά κύτταρα και διατηρείται κατά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (46).

Πέραν απ' αυτό τον κλασσικό ορισμό της επιγενετικής που εμπεριέχει την κληρονομικότητα, ανέκυψε ότι και μεταμιτωτικά κύτταρα όπως η νευρώνες εμφανίζουν επιγενετικές τροποποιήσεις που ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση ως αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης με το περιβάλλον (46). Η επιγενετική δηλαδή αποτελεί και έναν μηχανισμό μέσω του οποίου η εμπειρία αποτυπώνεται σε βιολογικό επίπεδο και μεταβάλλει την έκφραση των γονιδίων και ακολούθως την παραγωγή των πρωτεϊνών. Κατ' αυτό τον τρόπο το περιβάλλον και το “αντιλαμβανόμενο” μπορεί να επηρεάσει την φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού και να συμβάλλει στην ανάπτυξη νόσου (45). Επίσης αποτελεί έναν από τους μηχανισμούς πλαστικότητας του εγκεφάλου μέσω του οποίου ο οργανισμός προσαρμόζεται στις μεταβαλλόμενες συνθήκες του περιβάλλοντος, συμπεριλαμβανομένης της έκθεσης σε στρεσογόνους παράγοντες (31). Οι επιγενετικές επιπτώσεις τους στρες αναφέρονται από κάποιους ερευνητές και ως “μοριακή ουλή» καθώς πρόκειται για σταθερές νευρωνικές προσαρμογές σε συγκεκριμένες δομές του εγκεφάλου που επηρεάζουν μακροπρόθεσμα την συμπεριφορά (48).

4. Ψυχοκοινωνικό στρες

Τα περισσότερα θηλαστικά, όπως και ο άνθρωπος, ως εκ φύσεως κοινωνικά όντα, βρίσκονται καθημερινά σε κοινωνική αλληλεπίδραση. Έτσι αναπόφευκτα είτε έρχονται αντιμέτωπα με κοινωνικές προκλήσεις είτε τις αντιλαμβάνονται στο περιβάλλον γύρω τους είτε ανησυχούν για την επικείμενη εμφάνιση τους. Έτσι ανάλογα με το είδος, την ένταση και τη συχνότητα των προκλήσεων αυτών, αλλά και την υποκειμενικά αντιλαμβανόμενη ή μελλοντικά εκτιμώμενη ένταση τους, δύνανται να επηρεάσουν την ποιότητα ζωής και τη φυσιολογική υγεία του ατόμου (49–52). Στον άνθρωπο, οι εκφάνσεις του ψυχοκοινωνικού στρες ποικίλουν, και εμφανίζεται ως στρες τα πρώιμα παιδικά χρόνια ή στην εφηβεία, ή ως κοινωνικοοικονομική αντιξοότητα ή έντονα γεγονότα ζωής όπως ο πόλεμος και η πείνα κατά την ενήλικη ζωή (52). Συνδέεται με την εμφάνιση διαφόρων προβλημάτων υγείας, ιδιαιτέρως ψυχιατρικών, και δη της μείζονος κατάθλιψης, όπως αυτό καταγράφεται σε εκτεταμένες επιδημιολογικές μελέτες (50).

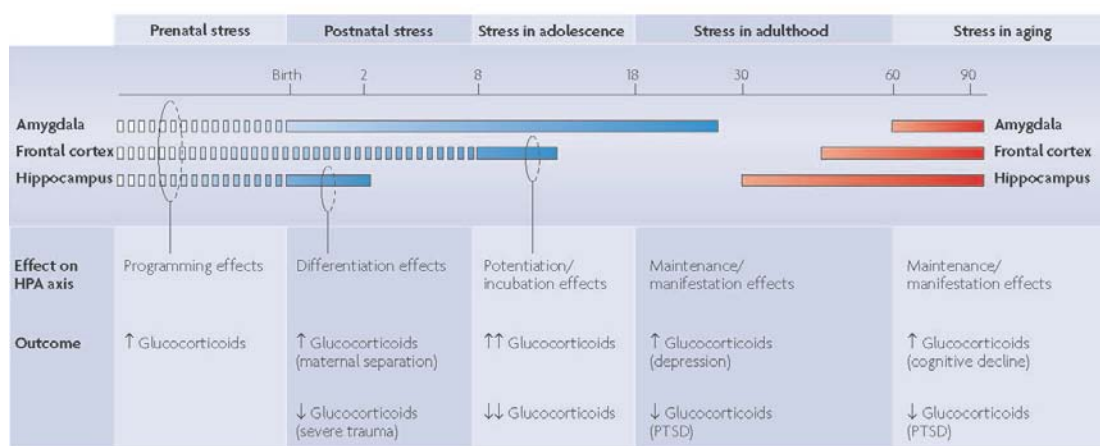
Το ψυχοκοινωνικό στρες διακρίνεται σε τρεις βασικές κατηγορίες και μελετάται στα αντίστοιχα πειραματικά ζωικά μοντέλα: α) στρες αποχωρισμού ή υπερπληθυσμού (π.χ. μοντέλο μητρικού χειρισμού ή αποστέρησης σε νεογνά και μοντέλο κοινωνικής απομόνωσης ή μοντέλο υπερπληθυσμού σε ενήλικες), β) ιεραρχικό στρες (π.χ. μοντέλο κατοίκου-εισβολέα και μοντέλο χρόνου στρες υποταγής) και γ) στρες κοινωνικής ανισορροπίας (π.χ. μοντέλο κοινωνικής αστάθειας και μοντέλο κοινωνικής αναταραχής) (Πίνακας 1) (50,51).

Ψυχοκοινωνικό στρες			
Κατηγορίες	Στρες αποχωρισμού ή υπερπληθυσμού	Ιεραρχικό στρες	Στρες κοινωνικής ανισορροπίας
Ζωικά πειραματικά μοντέλα	<ul style="list-style-type: none"> • Μοντέλο νεογνικού χειρισμού (<i>neonatal handling</i>) • Μοντέλο μητρικού αποχωρισμού σε νεογνά (<i>maternal separation</i>) • Μοντέλο μητρικής αποστέρησης σε νεογνά (<i>maternal deprivation</i>) • Μοντέλο ελλιπούς μητρικής φροντίδας σε νεογνά (<i>low licking-grooming</i>) • Μοντέλο κοινωνικής απομόνωσης σε ενήλικες (<i>social isolation</i>) • Μοντέλο υπερπληθυσμού σε ενήλικες (<i>overpopulation</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> • Μοντέλο κατοίκου-εισβολέα (<i>social defeat or resident-intruder encounters</i>) • Μοντέλο χρόνιου στρες υποταγής (<i>chronic subordination</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> • Μοντέλο κοινωνικής αστάθειας (<i>social instability</i>) • Μοντέλο κοινωνικής αναταραχής (<i>social turmoil</i>)

Πίνακας 1. Κατηγορίες ψυχοκοινωνικού στρες και παραδείγματα ζωικών πειραματικών μοντέλων. Προσαρμογή από: Slattery DA, Cryan JF. Modelling depression in animals: at the interface of reward and stress pathways. *Psychopharmacology (Berl)*. 2017 May;234(9–10):1451–65.

5. Πρώιμες στρεσογόνες εμπειρίες (early life stress)

Η περίοδος των πρώιμων εμπειριών ξεκινάει κατά τη σύλληψη και συνεχίζει μέχρι το τέλος της παιδικής ηλικίας (περίπου τα 8 έτη στον άνθρωπο) και είναι η πιο ευάλωτη περίοδος της ζωής (53,54). Στις πρώιμες στρεσογόνες εμπειρίες περιλαμβάνεται α) το προγεννητικό (prenatal), β) το περιγεννητικό (perinatal) και γ) το μεταγεννητικό στρες των πρώιμων παιδικών χρόνων (postnatal) (55). Ο βαθμός της επίδρασης του στρες την εκάστοτε χρονική περίοδο είναι ανάλογος της ταχύτητας με την οποία αναπτύσσεται η κάθε εγκεφαλική περιοχή (Εικ. 8) (54). Για το λόγο αυτό η προγεννητική περίοδος θεωρείται πάρα πολύ κρίσιμη καθώς τότε σχηματίζεται το νευρικό σύστημα. Μεταγεννητικά, ο ιππόκαμπος, η αμυγδαλή και ο προμετωπιαίος φλοιός, εμφανίζουν διαφορετικές περιόδους αυξημένης ευπάθειας, με αυτή να είναι τα 0-2 έτη για τον ιππόκαμπο, τα 0-8 έτη για την αμυγδαλή ενώ ο προμετωπιαίος φλοιός έχει μέτρια ευπάθεια που διαρκεί όμως μέχρι και τα 25 έτη (54).



Εικόνα 8. Το μοντέλο της έκθεσης σε στρες κατά τη διάρκεια της ζωής. Πηγή: Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. Nat Rev Neurosci. 2009 Jun;10(6):434–45

5.1. Προγεννητικό στρες

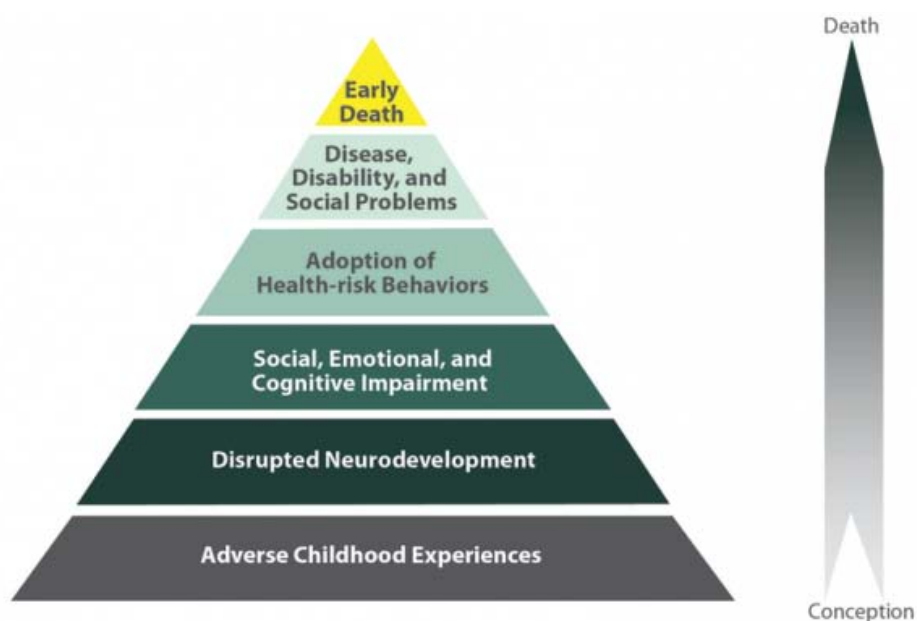
Ως προγεννητικό στρες ορίζεται η έμμεση έκθεση του εμβρύου μέσω της έκθεσης της εγκυμονούσας μητέρας σε στρεσογόνους παράγοντες, όπως κοινωνικές αντιξοότητες, κατάθλιψη, διατροφικό στρες, περιβαλλοντική μόλυνση κ.α. (56). Η άμεση επίπτωση είναι η προβληματική ανάπτυξη διαφόρων οργανικών συστημάτων του εμβρύου, με αποτέλεσμα είτε την αποβολή είτε την εμφάνιση διαταραχών στο νεογνό είτε την αύξηση της πιθανότητας να εμφανίσει κάποια νόσο κατά την βρεφική ή ενήλικη ζωή (57).

5.2. Περιγεννητικό στρες

Ως περιγεννητικό στρες ονομάζεται το στρες κατά τον τοκετό και αφορά τις πρόωρες γεννήσεις, τη γέννηση με καισαρική τομή, τις επιπλοκές κατά τον τοκετό, την απομόνωση του νεογνού μετά τον τοκετό σε θερμοκοιτίδα ή την έκθεση του σε επίπονες ιατρικές διαδικασίες για λόγους υγείας (58).

5.3. Μεταγεννητικό στρες τα πρώιμα παιδικά χρόνια

Οι κύριοι τύποι του στρες μετά τη γέννηση είναι η φυσική, σεξουαλική ή συναισθηματική κακοποίηση και η παραμέληση (59). Φυσική κακοποίηση είναι η σωματική βία όπως το χτύπημα, το κλότσημα, το τράνταγμα, το κάψιμο του παιδιού κ.ά. Σεξουαλική κακοποίηση είναι συμμετοχή ή η έκθεση σε πράξεις με σεξουαλικό περιεχόμενο. Η συναισθηματική κακοποίηση περιλαμβάνει συμπεριφορές που πλήττουν την αυτοπεποίθηση και την αξιοπρέπεια του παιδιού, όπως βρίσιμο, υποτίμηση, απόρριψη, συναισθηματική απροσφορότητα, εκφοβισμός κ.ά. Παραμέληση έχουμε όταν δεν καλύπτονται όλες οι βασικές φυσικές και συναισθηματικές ανάγκες του παιδιού, όπως η προσωπική φροντίδα, η διατροφή, η στέγαση, η ένδυση, η εκπαίδευση, η ιατρική περίθαλψη κ.ά. (59). Η "Πυραμίδα των δυσμενών πρώιμων εμπειριών" (Adverse Childhood Experiences Pyramid) της μελέτης "CDC-Kaiser Permanente Adverse Childhood Experiences" περιγράφει σχηματικά τις επιπτώσεις των πρώιμων στρεσογόνων εμπειριών στην υγεία και την ευεξία του παιδιού (Εικ. 9) (60).



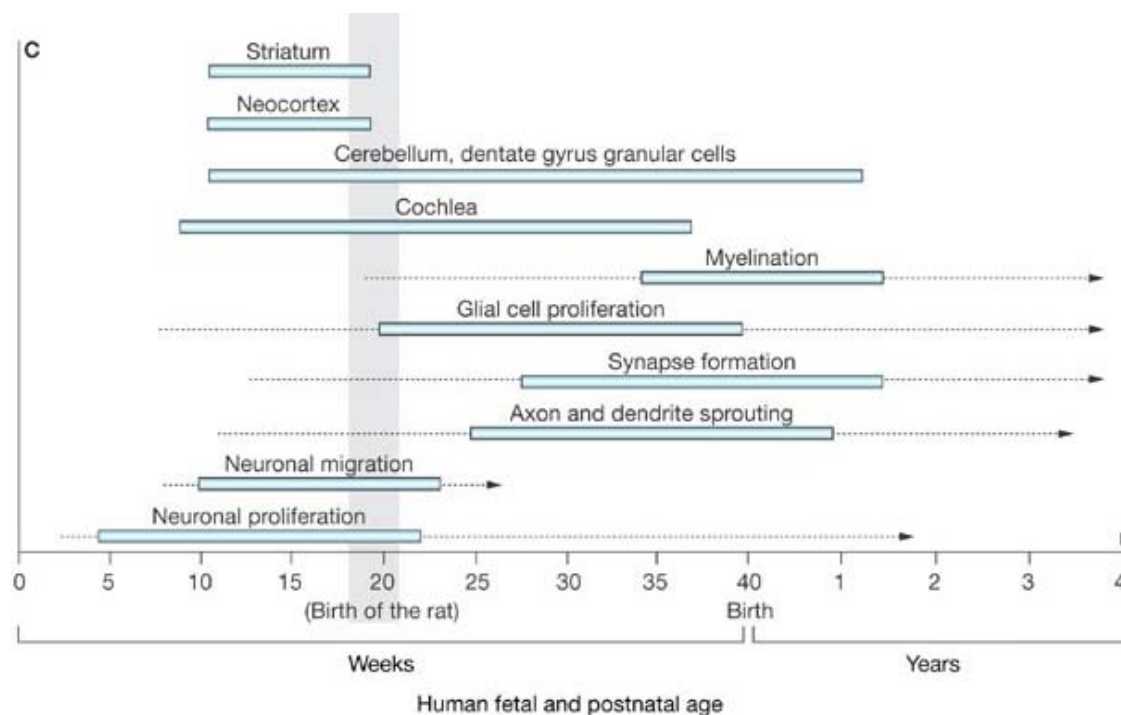
Εικόνα 9. Η "Πυραμίδα των δυσμενών πρώιμων εμπειριών" (Adverse Childhood Experiences Pyramid). Πηγή: About the CDC-Kaiser ACE Study [Internet]. [cited 2017 Jul 9]. Available from: <https://www.cdc.gov/violenceprevention/acestudy/about.html>

Πέραν των έντονων στρεσογόνων γεγονότων, η ποιότητα και ο τύπος δεσμού γονέα και παιδιού ή το γονεϊκό μοντέλο διαπαιδαγώγησης φαίνεται να επηρεάζουν την ανάπτυξη του εγκεφάλου (46,61).

Δυσλειτουργικές καταστάσεις που έχουν συνδεθεί με τις πρώιμες στρεσογόνες εμπειρίες είναι η επιθετικότητα και η αυτοκτονικότητα (62), η μείζονα καταθλιπτική διαταραχή, η διαταραχή μετατραυματικού στρες, η σχιζοφρένεια, οι διαταραχές προσωπικότητας, οι εθισμοί, η παχυσαρκία, ο διαβήτης, η επιληψία, τα καρδιαγγειακά κ.ά. (46). Έτσι οι ΠΣΕ επηρεάζουν εκτός από το ίδιο το άτομο, την οικογένεια αλλά και την κοινωνία συνολικά (63).

5.4. Ζωικά πειραματικά μοντέλα πρώιμων στρεσογόνων εμπειριών

Τα τρωκτικά αποτελούν το βασικό πειραματόζωο για παρεμβατικές μελέτες μεταγεννητικών πρώιμων στρεσογόνων εμπειριών. Η περίοδος που συνήθως γίνεται η έκθεση σε στρες είναι οι πρώτες 2 εβδομάδες μετά τη γέννα (Εικ. 10) (46,64). Η περίοδος αυτή στα τρωκτικά αποτελεί την υποαποκριτική στο στρες περίοδο (stress hyporesponsive period, SHRP), όπου ο ΥΥΕ άξονας υπολειπεται και η έκκριση GCs είναι ιδιαίτερος χαμηλή για την προστασία του αναπτυσσόμενου εγκεφάλου (54). Έτσι η πρόκληση στρες την εν λόγω χρονική περίοδο και η αύξηση των GCs έχει δυσμενείς επιπτώσεις.



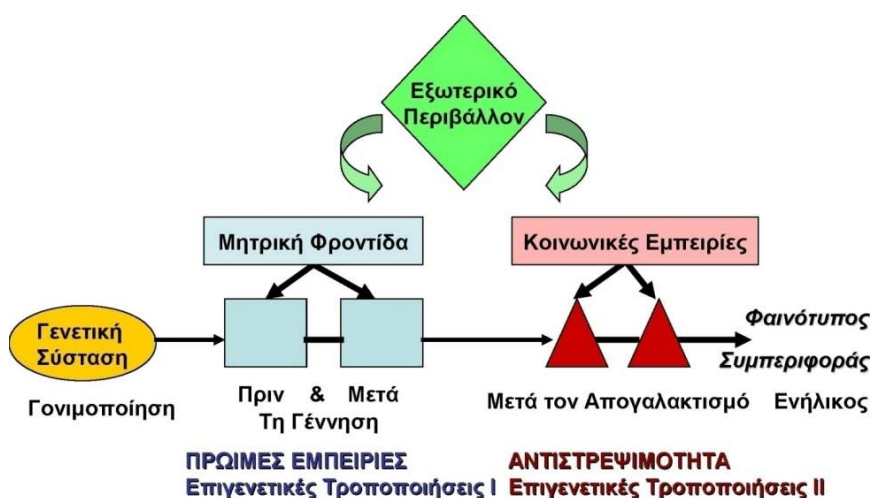
Εικόνα 10. Χρονικά όρια των διαφόρων νευροαναπτυξιακών σταδίων στον άνθρωπο και τον αρουραίο. Πηγή: Bernal J. Thyroid hormone receptors in brain development and function. Nat Rev Endocrinol. 2007 Mar;3(3):249–59.

Οι τύποι στρες που χρησιμοποιούνται στα πειράματα πρώιμων στρεσογόνων εμπειριών είναι ο νεογνικός χειρισμός (neonatal handling), ο μητρικός αποχωρισμός (maternal separation), η μητρική αποστέρηση (maternal deprivation) και η ελλιπής μητρική φροντίδα (low licking-grooming) (46). Οι ΠΣΕ φαίνεται να οδηγούν σε αλλαγές στη συμπεριφορά του τρωκτικού ως νεογνό αλλά και ως ενήλικο. Κάποιες από τις παρατηρούμενες επιπτώσεις είναι η υπεραντιδραστικότητα του άξονα ΥΥΕ, η εμφάνιση αγχώδους και καταθλιπτικόμορφου φαινοτύπου, η αυξημένη κατανάλωση ναρκωτικών, το αδύναμο ανοσοποιητικό σύστημα και το αλλαγμένο πρότυπο παραγωγής μονοαμινών (46).

5.5. Συσχέτιση πρώιμων στρεσογόνων εμπειριών και επιγενετικής

Ένας απ' τους μηχανισμούς μέσω των οποίων οι ΠΣΕ ασκούν την επίδραση τους στον οργανισμό είναι η επιγενετική. Η επίδραση αυτή δεν είναι πάντα αρνητική, μιας και μπορεί να αποβεί ευεργετική για τον οργανισμό, βοηθώντας τον να αναπτύξει ανθεκτικότητα, να αποκτήσει δηλαδή τα απαραίτητα εφόδια ώστε να αντιμετωπίσει με μεγαλύτερη επιτυχία μελλοντικές προκλήσεις του περιβάλλοντος (65).

Ένδειξη της επιγενετικής επίδρασης του στρες είναι το γεγονός ότι η απομάκρυνση του στρέσορα δεν οδηγεί πάντα στην επαναφορά του οργανισμού στην αρχική “αθώα” κατάσταση, αλλά σε μία νέα, όπου η έκθεση σε ένα νέο στρέσορα θα οδηγήσει σε μια νέα μοναδική απόκριση (66). Δηλαδή, η πρότερη έκθεση σε στρες έχει αντίκτυπο και στην μελλοντική απόκριση του οργανισμού (67). Οι επιγενετικές τροποποιήσεις είναι συχνά αντιστρεψίμες μέσω θετικών κοινωνικών εμπειριών μετά τον απογαλακτισμό (Εικ. 11) (68).



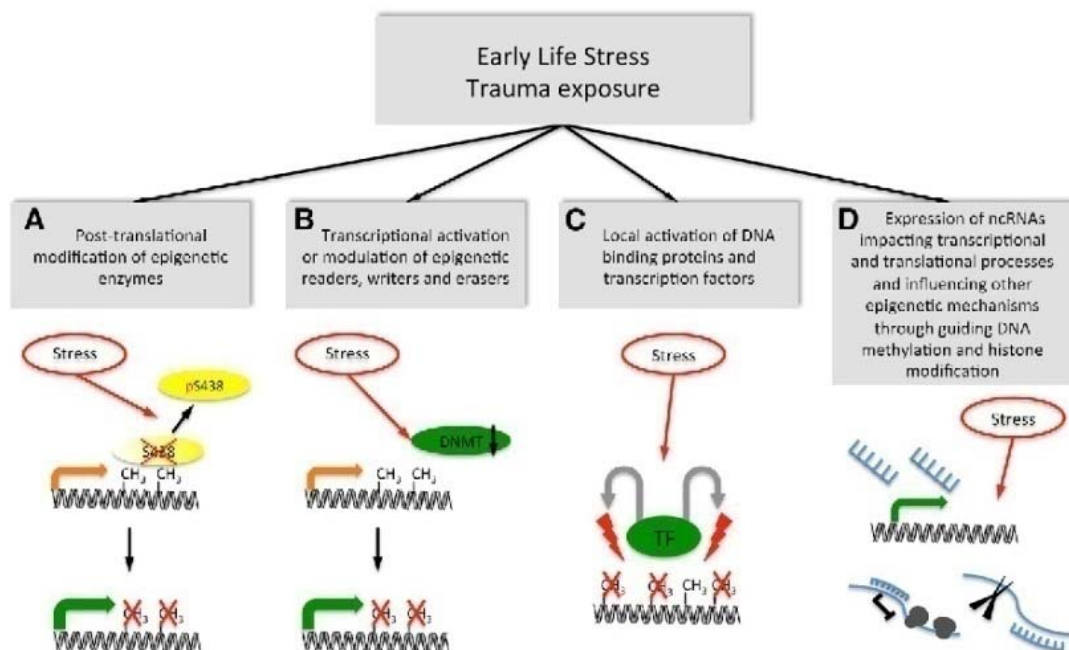
Εικόνα 11. Δυναμική αντιστρεψιμότητα των επιγενετικών τροποποιήσεων. Πηγή: Σταματάκης Α. (2017). Μάθημα 6-Πρώιμες εμπειρίες.pdf. ΠΜΣ «Η Επιστήμη του Στρες και η Προαγωγή της Υγείας»

Οι περιοχές του εγκεφάλου που είναι πιο ευάλωτες σε τέτοιες επιδράσεις είναι τα στοιχεία του άξονα ΥΥΕ, ο ιππόκαμπος, η αμυγδαλή και ο προμετωπιαίος φλοιός (52).

5.5.1. Επιδράση των πρώιμων στρεσογόνων εμπειριών στον επιγενετικό μηχανισμό

Οι ΠΣΕ επιδρούν σε διάφορα επίπεδα του επιγενετικού μηχανισμού (Εικ. 12) (69):

- Άμεση τροποποίηση της ενεργότητας των επιγενετικών ενζύμων (epigenetic readers, writers and erasers) όπως μείωση της ενεργότητας της αποακετυλάσης των ιστονών (HDAC), το οποίο οδηγεί σε υπερακετυλίωση ιστονών (70) και μείωση των επιπέδων της DNA-μέθυλ-τρανσφεράσης (DNMT) και υπερμεθυλίωση γονιδίων (71).
- Μεταμεταγραφική τροποποίηση επιγενετικών τροποποιητών (epigenetic readers and writers) όπως ο MeCP2 (methyl CpG binding protein) που ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων προσδένοντας μεθυλιωμένο DNA ως απόκριση στη νευρωνική δραστηριότητα.
- Ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων που επηρεάζουν το επιγενετικό προφίλ
- Τροποποίηση της έκφρασης μικρών μη κωδικών RNA



Εικόνα 12. Επιγενετικές επιδράσεις των ΠΣΕ. α) Μεταμεταγραφική τροποποίηση επιγενετικών τροποποιητών (MeCP2), β) Άμεση τροποποίηση της ενεργότητας των επιγενετικών ενζύμων (HDAC, DNMT), γ) Ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων που επηρεάζουν το επιγενετικό προφίλ, δ) Τροποποίηση της έκφρασης μικρών μη κωδικών RNA. Πηγή: Klengel T, Binder EB. Epigenetics of Stress-Related Psychiatric Disorders and Gene × Environment Interactions. *Neuron*. 2015 Jun 17;86(6):1343–57.

Κατά αυτόν τον τρόπο επηρεάζεται η έκφραση πλειάδας γονιδίων, εκ των οποίων τα πιο σημαντικά όσον αφορά τις ΠΣΕ περιγράφονται παρακάτω (Εικ. 13) (46).

Table 1 Summarized effects of ELS on DNA methylation of specific genes

Gene	Brain region	Epigenetic marker	References
<i>Nr3c1</i>	Hippocampus	↑DNA methylation	Weaver <i>et al.</i> (2004); McGowan <i>et al.</i> (2009)
<i>Avp</i>	PVN	↓DNA methylation	Murgatroyd <i>et al.</i> (2009)
	Hippocampus	↑DNA methylation	Kember <i>et al.</i> (2012)
<i>Pomc</i>	Pituitary	↓DNA methylation	Wu <i>et al.</i> (2014)
<i>Bdnf</i>	PFC	↑DNA methylation	Roth <i>et al.</i> (2009)
<i>GAD1</i>	Hippocampus	↑DNA methylation	Zhang <i>et al.</i> (2010)
<i>Grm1</i>	Hippocampus	↑DNA methylation	Bagot <i>et al.</i> (2012)

ELS, early-life stress; PFC, prefrontal cortex; PVN, paraventricular nucleus.

Εικόνα 13. Συνολική επίπτωση των ΠΣΕ στην μεθυλίωση του DNA συγκεκριμένων γονιδίων. Πηγή: Lewis CR, Olive MF. Early life stress interactions with the epigenome: potential mechanisms driving vulnerability towards psychiatric illness. *Behav Pharmacol.* 2014 Sep;25(5 0 6):341–51.

5.5.2. Διαγενεϊκή επιγενετική κληρονομικότητα

Στη διαγενεϊκή επιγενετική κληρονομικότητα περιλαμβάνονται δύο φαινόμενα. Το ένα αφορά την μη μεντελική «κληρονόμιση» συμπεριφορών ή ψυχολογικών-συναισθηματικών φαινοτύπων, μέσω της αλληλεπίδρασης της μητέρας και του βρέφους (46,52,72). Το δεύτερο φαινόμενο αφορά την κλασσική κληρονόμιση επιγενετικών στοιχείων μέσω των γαμετών των γονέων. Παρότι έως πρόσφατα θεωρείτο ότι το επιγενετικό αποτύπωμα έσβηγε πλήρως κατά τον σχηματισμό του ζυγωτού, τα σύγχρονα δεδομένα υποστηρίζουν ότι υπάρχουν μηχανισμοί διατήρησης (46,52,72).

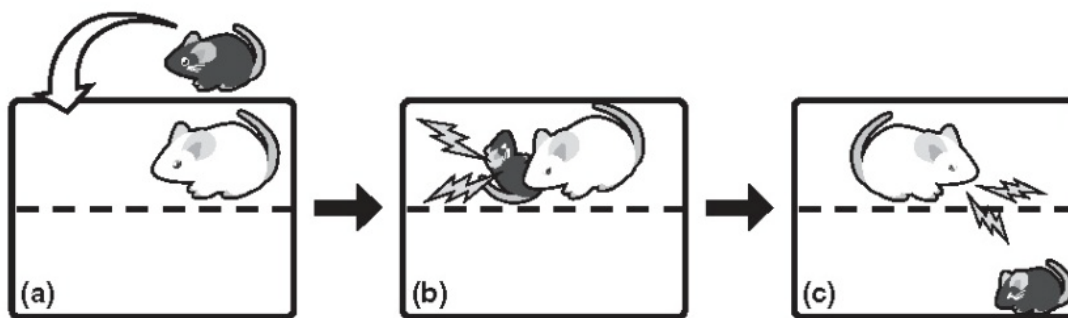
6. Χρόνιο στρες κοινωνικής ήττας

Το μοντέλο του χρόνιου στρες κοινωνικής ήττας (που αναφέρεται και ως "τεστ εισβολέα-κατοίκου" ή ως δοκιμασία "επαναλαμβανόμενης κοινωνικής ήττας" (Repeated Social Defeat)), μαζί με το μοκέλο του χρόνου απρόβλεπτου στρες, θεωρούνται τα πλέον κατάλληλα για τη μελέτη της κατάθλιψης, σε αντίθεση με μοντέλα πιο άμεσων και σύντομων στρεσογόνων επιδράσεων, όπως το τεστ αιώρησης από την ουρά (tail suspension) ή η δοκιμασία εξαναγκαστικής κολύμβησης (forced swim) κ.α. (49,73,74). Το χρόνιο στρες κοινωνικής ήττας χρησιμοποιεί την πρόκληση κοινωνικής συμπλοκής μεταξύ μελών του ίδιου είδους για να επάγει

συναισθηματικό και ψυχολογικό στρες (74). Ανήκει στην κατηγορία του περιβαλλοντικού στρες και χαρακτηρίζεται από σχεδιαστική, φαινοτυπική και προβλεπτική εγκυρότητα. Ισχυρό πλεονέκτημα του είναι το ηθολογικό και οικολογικό του κύρος καθώς προκαλεί συνεχές συναισθηματικό στρες χωρίς το ζώο να εξοικειώνεται (74). Επιπλέον αναπαριστά σε ικανοποιητικό βαθμό τους ανθρώπινους κοινωνικούς παράγοντες κινδύνου, σε υψηλότερη βέβαια ένταση. Μειονεκτεί ως προς την έκβαση του, αφού οι επιπτώσεις του δεν συνδέονται αποκλειστικά με μία μόνο συγκεκριμένη διαταραχή (73). Ανάλογη εγκυρότητα έχει και το μοντέλο της μητρικής αποστέρησης που γίνεται σε νεογνά (75).

Το μοντέλο αναπτύχθηκε το 1979 από τον Miczek αρχικά στον αρουραίο (76), αλλά με τα χρόνια επεκτάθηκε και χρησιμοποιείται και σε άλλα ζώα, όπως στα ποντίκια (77), στα χάμστερ (78), στους χοίρους (79), στα zebra fish (80), στη *Drosophila* (81) και στον γρύλο (82). Επιπλέον έχουν αναπτυχθεί παραλλαγές για ανήλικα και θηλυκά ζώα (49).

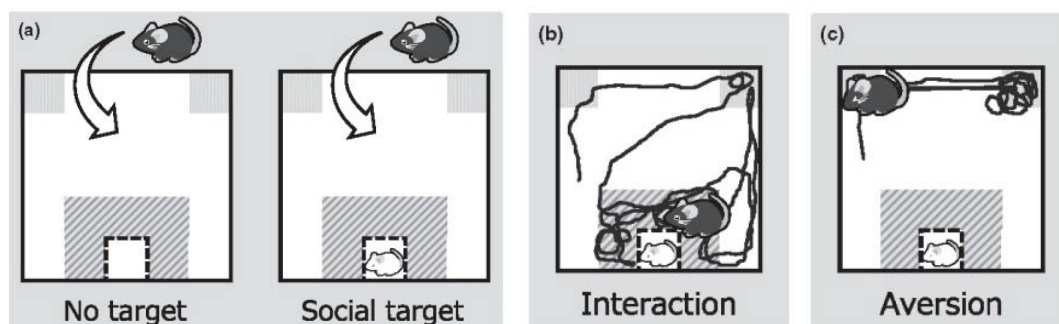
Συνοπτικά (για λεπτομέρειες βλ. Μέθοδος), το μοντέλο του χρόνιου στρες κοινωνικής ήττας περιλαμβάνει την υποβολή ενός τρωκτικού (εισβολέας, intruder) σε επαναλαμβανόμενα συμβάντα κοινωνικής υποταγής που προκαλούνται από ένα άλλο κυριαρχικό και επιθετικό ζώο (κάτοικος, resident) (Εικ. 14).



Εικόνα 14. Σχηματική περιγραφή του μοντέλου χρόνιου στρες κοινωνικής ήττας στον ποντικό. Toyoda A. Social defeat models in animal science: What we have learned from rodent models. *Anim Sci J Nihon Chikusan Gakkaiho*. 2017 Jul;88(7):944–52.

Οδηγεί άμεσα στην εμφάνιση καταθλιπτικόμορφου φαινοτύπου, με κύριο χαρακτηριστικό την κοινωνική απόσυρση, την ανηδονία, τις διατροφικές διαταραχές κ.α. (49,73,83). Τα φαινόμενα αυτά αναστρέφονται με τη χορήγηση αντικαταθλιπτικών φαρμάκων (49,73).

Η κοινωνική απόσυρση ελέγχεται με το τεστ κοινωνικής αλληλεπίδρασης (social interaction test) (Εικ. 15), όπου καταγράφεται ο χρόνος που περνάει ο –ελεύθερος να περιηγηθεί– "εισβολέας" σε κοινωνική αλληλεπίδραση με τον –περιορισμένο κάτω από συρμάτινο κλωβό– "κάτοικο".



Εικόνα 15. Σχηματική περιγραφή του τεστ κοινωνικής αλληλεπίδρασης στον ποντικό (social interaction test). Toyoda A. Social defeat models in animal science: What we have learned from rodent models. Anim Sci J Nihon Chikusan Gakkaiho. 2017 Jul;88(7):944–52.

Παράλληλα εμφανίζονται επιπτώσεις στη φυσιολογία του "εισβολέα", όπως η εμφάνιση μεταβολικού συνδρόμου στα ποντίκια με αύξηση βάρους και αντίσταση στην ινσουλίνη και τη λεπτίνη (84). Καταστάσεις που αναλογούν στην απορρύθμιση της ομοιόστασης που παρατηρείται στον άνθρωπο.

Επιπλέον, το μοντέλο αυτό είναι πρόσφορο για τη μελέτη του φαινομένου της "ανθεκτικότητας", καθώς ένα ποσοστό των υποκειμένων που υπόκεινται σε χρόνια στρες κοινωνική ήττας δεν εμφανίζει συμπεριφορική ή φυσιολογική έκπτωση, αλλά τουναντίον αυξημένη ανοχή και βελτιωμένη αντίδραση σε κάποια επόμενη έκθεση σε στρες (50,73,85).

Πειραματικοί δείκτες του κοινωνικού στρες μπορεί να είναι άμεσα παρατηρούμενα στοιχεία που συνθέτουν την αλληλεπίδραση του "κατοίκου" με τον "εισβολέα" ή έμμεσες μεταβλητές. Άμεσες είναι κυρίως συστατικά της μαχητικότητας του ζώου, όπως η επιθετικότητα (πλευρική επίθεση, κινήγι, στάση επάνω από το άλλο ζώο) ή η αμυντικότητα (προσπάθεια διαφυγής, ευθυτενής όρθια στάση, ύπτια στάση) (51). Οι έμμεσες μπορεί να είναι συμπεριφορικές, π.χ. εκδηλώσεις γενικότερης επιθετικής ή αμυντικής στάσης, ή φυσιολογικές όπως η μεταβολή της δραστηριότητας του άξονα ΥΥΕ και αλλαγές στα επίπεδα κορτιζόλης (51).

6.1. Συμπεριφορικές επιπτώσεις του χρόνιου στρες κοινωνικής ήττας

Οι επιπτώσεις του χρόνιου στρες κοινωνικής ήττας στο επίπεδο της συμπεριφοράς αφορούν αλλαγές: α) στην επιθετική ή υποτακτική τάση, β) στη συνολική δραστηριότητα του ζώου (κινητική και εξερευνητική δραστηριότητα), γ) στα επίπεδα άγχους, δ) στην οικειοθελή κατανάλωση αιθανόλης και στην αυτοχορήγηση ναρκωτικών ουσιών, ε) στην σεξουαλική συμπεριφορά (διάθεση για συνουσία, μαρκάρισμα της περιοχής, ωορρηξία), στ) στην κοινωνική συμπεριφορά (συνολική κοινωνική αλληλεπίδραση, προτίμηση αλληλεπίδρασης με οικεία/ανοίκια ζώα, ανταγωνιστική συμπεριφορά), η) στη μνήμη και μάθηση και θ) εμφάνιση ανηδονίας (51,74). Συγκεκριμένα η αναστροφή της ανηδονίας με τη χορήγηση αντικαταθλιπτικών είναι που προσδίδει προβλεπτική εγκυρότητα στο συγκεκριμένο μοντέλο όσον αφορά την κατάθλιψη (74).

6.2. Φυσιολογικές επιπτώσεις του χρόνιου στρες κοινωνικής ήττας

Αμέσως μετά την συμπλοκή των ζώων, ο "εισβολέας" εμφανίζει σημάδια έντονου στρες που παραμένουν για ώρες, όπως αυξημένη κυκλοφορία γλυκοκορτικοειδών, ταχυκαρδία και υπερθερμία. Αρκετές μέρες μετά τη συμπλοκή ή και περισσότερο παρατηρούνται αυξημένος καρδιακός παλμός, αυξημένη αρτηριακή πίεση, αυξημένα επίπεδα αδρενοκορτικοτρόπου ορμόνης (ACTH) και γλυκοκορτικοειδών, αλλαγές στον ρυθμό των ημερήσιων μεταβολών της θερμοκρασίας σώματος, αναστολή της ανάπτυξης και ευαισθησία στο στρες (74).

6.3. Μοριακές επιπτώσεις του χρόνιου στρες κοινωνικής ήττας

Η πρωταρχική μοριακή επίπτωση του χρόνιου στρες κοινωνικής ήττας, παραμένει και εδώ η κορτιζόλη, μέσω της επίδρασης που έχει το στρες στον άξονα ΥΥΕ. Επιπλέον επηρεάζονται τα συστήματα της σεροτονίνης, της νορεπινεφρίνης, της ντοπαμίνης, του γλουταμικού, του γ-αμινοβουτυρικού, και τα εξωθλαμικά κυκλώματα του παράγοντα έκλυσης κορτικοτροπίνης (CRF) και της βασοπρεσσίνης (51).

6.4. Κυτταρικές επιπτώσεις του χρόνιου στρες κοινωνικής ήττας

Σε επίπεδο μορφολογίας παρατηρείται μειωμένος όγκος του ιπποκάμπου και του μέσου προμετωπιαίου φλοιού (medial prefrontal cortex) (74). Σε επίπεδο συναπτικής συνδεσιμότητας έχουν παρατηρηθεί δενδριτικές αλλαγές στον επικλινή πυρήνα (NAc) συνοδευόμενες από αύξηση του αναστολέα IκB του σηματοδοτικού μονοπατιού της κινάσης κB (86). Τέλος έχουν παρατηρηθεί και αλλαγές στους νευρώνες κυρίως στον ιππόκαμπο, και συγκεκριμένα στην μορφολογία των δενδριτών, στη νευρογένεση και στην επιβίωσή τους (51).

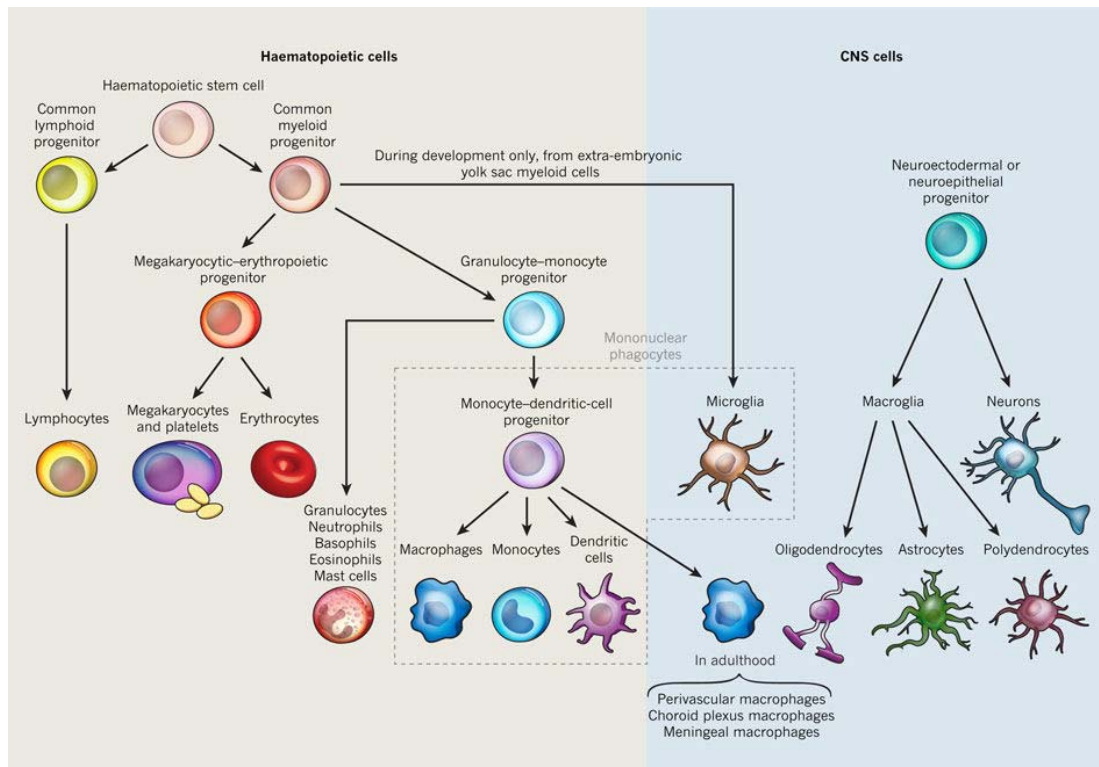
7. Μικρογλοία

Η μικρογλοία αποτελεί ένα ομοιοστατικό σύστημα που συνίσταται από το σύνολο των μικρογλοιακών κυττάρων (87). Αρχικά χαρακτηρίστηκε από τον Del Rio-Hortega περίπου το 1920 ως το κατοικόν πλήθος μακροφάγων του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) που ασκεί την ανοσολογική του επιτήρηση (87,88). Αυτός ο στενός χαρακτηρισμός έχει ξεπεραστεί, καθώς το εύρος των λειτουργιών της φαίνεται να είναι πολύ μεγαλύτερο. Εκτός από τη ρύθμιση και συμμετοχή σε νευροανοσολογικά μονοπάτια, στη νευροφλεγμονή και στη φαγοκυττάρωση παθογόνων ή νεκρών κυττάρων, συμμετέχει σε ποικίλες άλλες διαδικασίες (41). Κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια βοηθά στη μετανάστευση των νευρώνων και στον σωστό σχηματισμό των νευρωνικών δικτύων και των συνάψεων. Καθ' όλη τη ζωή επιτηρεί και συμμετέχει έμμεσα ή άμεσα σε λειτουργίες όπως η νευρογένεση, η συναπτική πλαστικότητα, η συνδεσιμότητα των νευρωνικών δικτύων, η ρύθμιση τροφικών και αγγειογενετικών παραγόντων, ο μεταβολισμός αμινοξέων, η απόπτωση, η ανακύκλωση των νευροδιαβιβαστών, η διατήρηση της ιοντικής ισορροπίας και του pH(41,87). Έτσι επηρεάζει σημαντικές εγκεφαλικές λειτουργίες όπως η μνήμη, η μάθηση και η διάθεση και έχει εμπλακεί στην παθογένεση νευροαναπτυξιακών, νευροεκφυλιστικών και νευροψυχιατρικών διαταραχών (41,87).

Ως ομάδα κυττάρων κατηγοριοποιείται παράλληλα και στο νευρικό και στο ανοσοποιητικό σύστημα (5,89–91). Αποτελεί υποομάδα των γλοιακών κυττάρων, μαζί με τη μακρογλοία, δηλαδή τα ολιγοδενδροκύτταρα, τα αστροκύτταρα και τα επενδυματικά κύτταρα, που μαζί με τους νευρώνες σχηματίζουν το ΚΝΣ. Αντιπροσωπεύει το 5-10% των συνολικών κυττάρων του ΚΝΣ, ενώ όλα τα γλοιακά μαζί αντιπροσωπεύουν το 90% (87,88). Η διασπορά της διαφέρει ανάμεσα στις εγκεφαλικές περιοχές και ανάμεσα στα διαφορετικά είδη, με τους ποντικούς π.χ. να έχουν περισσότερη μικρογλοία στην φαιά ουσία, ενώ ο άνθρωπος περισσότερη στη λευκή ουσία (87,92).

7.1. Μικρογλοία και ανάπτυξη

Τα πρόδρομα μικρογλοιακά κύτταρα προέρχονται από τα αρχέγονα πρόδρομα μυελοειδή κύτταρα του περιφερικού μεσοδέρματος του εμβρυικού σάκου, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα κύτταρα του ΚΝΣ που προέρχονται από τη νευροεπιθηλιακή σειρά του νευροεξωδέρματος (Εικ. 16) (90,91,93–95).

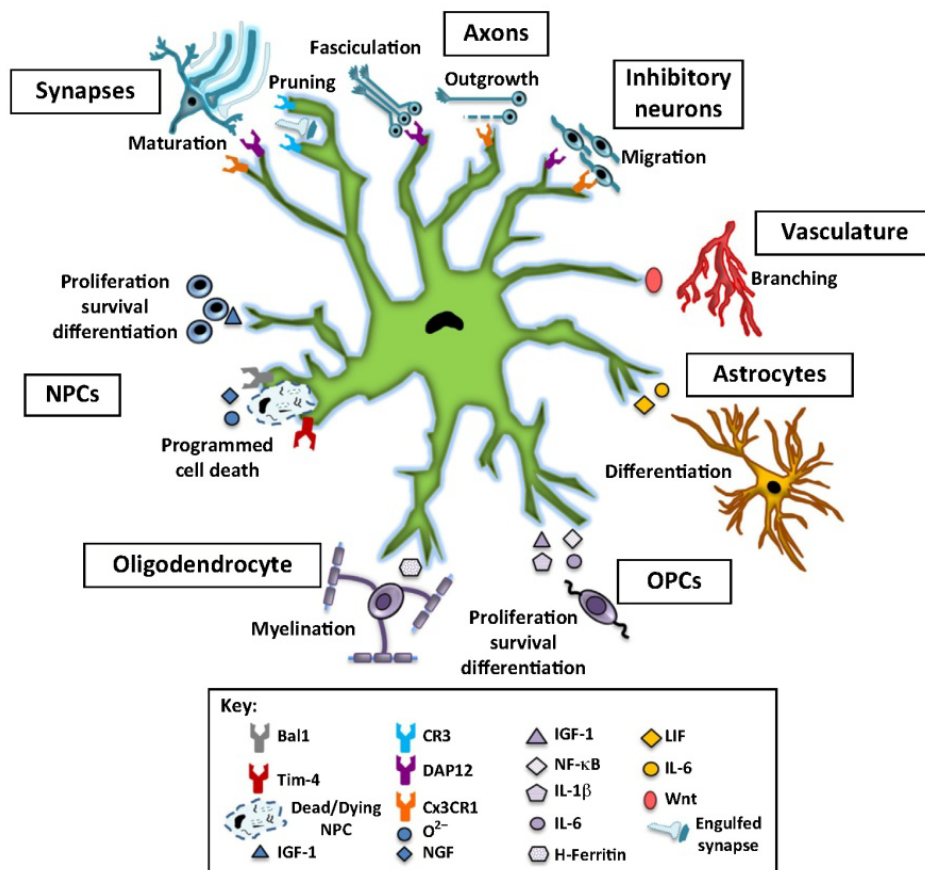


Εικόνα 16. Αναπτυξιακή προέλευση των μικρογλοιακών κυττάρων. Πηγή: Ransohoff RM, Cardona AE. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. Nature. 2010 Nov 11;468(7321):253–62.

Η μικρογλοία στα τρωκτικά εμφανίζεται περίπου την εμβρυονική ημέρα 7.5 (E7.5) και μεταναστεύει στο εμβρυικό ΚΝΣ στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης, μεταξύ της E8.5 και E9.5 (87,88,91,94,96). Η μετανάστευση γίνεται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος του εμβρυικού αγγειακού συστήματος και κρίσιμο ρόλο παίζουν οι μεταγραφικοί παράγοντες RUNX1 (Runt-related transcription factor 1) και PU.1 (87).

Εκεί διαχέεται σε όλες τις περιοχές του εγκεφάλου, παίρνει θέση, και από εκεί και πέρα αναγεννάται καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής. Έτσι ξεκινά τη δράση της πριν την πλήρη διαφοροποίηση των υπολοίπων κυττάρων του ΚΝΣ, παίζοντας κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση αναπτυξιακών διαδικασιών όπως η αρχιτεκτονική διαρρύθμιση (αριθμός και χωροταξική τοποθέτηση των υπολοίπων κυττάρων του ΚΝΣ), η μυελίνωση, ο σχηματισμός και το ραφινάρισμα των νευρωνικών δικτύων (88). Πιο συγκεκριμένα, η μικρογλοία φαίνεται να επηρεάζει τόσο τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, όσο και την επιβίωση των αναπτυσσόμενων νευρώνων. Επάγει τη διαφοροποίηση και παρέχει τροφική υποστήριξη στα αναπτυσσόμενα αστροκύτταρα, ολιγοδενδροκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα του εγκεφαλοαγγειακού δικτύου.

Ρυθμίζει τον σχηματισμό των νευρωνικών δικτύων μέσω της δραστηριο-εξαρτώμενης (activity-dependent) αναδιάταξης και ωρίμανσης των συνάψεων (88). Επιβεβαίωση αυτών των ιδιοτήτων της μικρογλοίας αποτελεί το γεγονός ότι η φαρμακολογική ή γενετική καταστολή της προκαλεί συμπεριφορικές αλλαγές σε πειραματικά μοντέλα ζώων, ενώ παράλληλα στον άνθρωπο μεταλλάξεις σε μικρογλοιακά γονίδια έχουν βρεθεί να σχετίζονται με νευρολογικές ασθένειες και με αυξημένη ευπάθεια σε νευροψυχιατρικές νόσους. Οι επιδράσεις αυτές φαίνεται να ασκούνται μέσω ποικίλων εκκρινόμενων παραγόντων όπως οι ιντερλευκίνες IL-1 β και IL-6, οι αυξητικοί παράγοντες IGF-1 (insulin-like growth factor 1) και NGF (nerve growth factor), ο LIF (leukaemia inhibitory factor), ο μεταγραφικός παράγοντας NF- κ B (nuclear factor-kappaB) ή μέσω υποδοχέων όπως οι Bal1, Tim-4, CR3, DAP12, Cx3CR1 (Εικ. 17) (88).



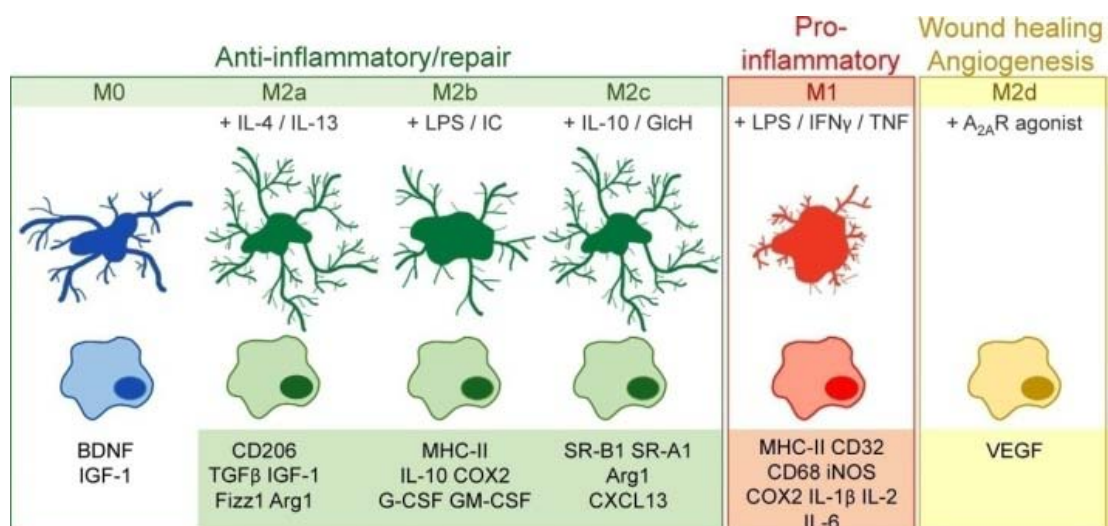
Εικόνα 17. Λειτουργίες της μικρογλοίας κατά την ανάπτυξη του ΚΝΣ. (Συνοτμήσεις: CR3 (complement receptor 3), DAP12 (DNAX-activation protein 12), IGF (insulin-like growth factor 1), IL (interleukin), LIF (leukaemia inhibitory factor), NF- κ B (nuclear factor-kappaB), NGF (nerve growth factor), NPC (neural precursor cell), OPC (oligodendrocyte precursor cell). Πηγή: Frost JL, Schafer DP. Microglia: Architects of the Developing Nervous System. Trends Cell Biol. 2016 Aug 1;26(8):587–97.

7.2. Φαινότυποι και λειτουργίες της μικρογλοίας

Η μικρογλοία είναι το κύριο σύστημα εντός του ΚΝΣ που είναι υπεύθυνο για την διατήρηση της ομοιόστασης του και της ανοσολογικής του επιτήρησης (87). Τα κύτταρα της λειτουργούν ως σύστημα και όχι ως μεμονωμένες οντότητες. Σχηματίζεται δηλαδή ένα δίκτυο σύνθετων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κυττάρων της μικρογλοίας και των υπολοίπων κυττάρων του ΚΝΣ (87). Επιπλέον αποτελεί ένα ανομοιόμορφο σύστημα: Την κάθε στιγμή, το κάθε μικρογλοιακό κύτταρο μπορεί να βρίσκεται σε τελείως διαφορετική κατάσταση σε σχέση με τα υπόλοιπα και να επιτελεί διαφορετική λειτουργία, θετική ή αρνητική για τον οργανισμό (87). Έτσι, σε συμφωνία με την ανοσοποιητική της προέλευση και τη συγγένεια της με τα μακροφάγα, ανάλογα με τα ερεθίσματα που δέχεται εμφανίζει διαφορετικούς φαινοτύπους (87).

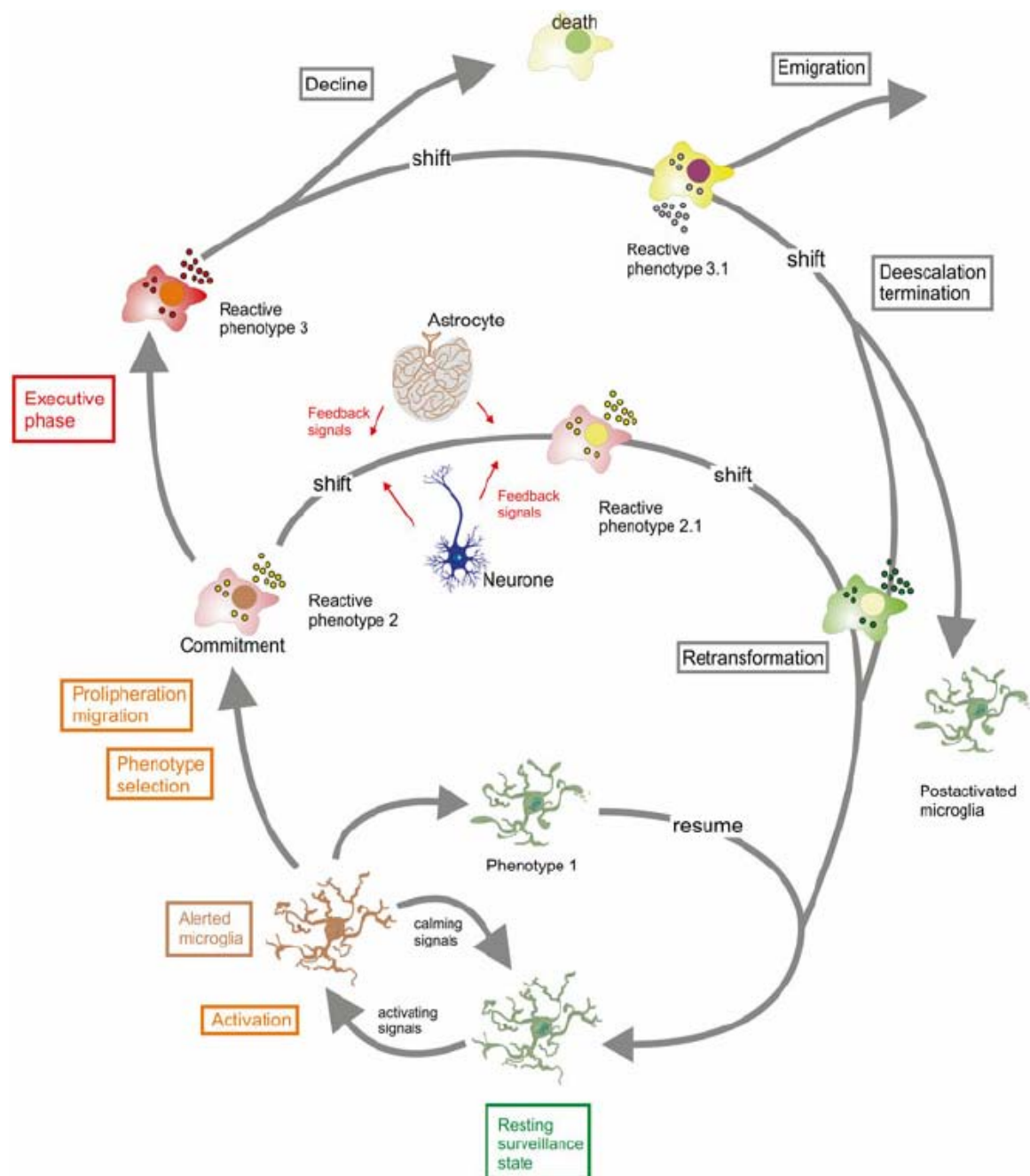
Μέχρι πρόσφατα θεωρείτο ότι ο φαινότυπος της μικρογλοίας βρίσκεται σε δύο καταστάσεις: α) στην «αδρανή» ή «λανθάνουσα» κατάσταση ("quiescent" or "resting" state) «διακλαδωμένης» μορφής (ramified) ή β) στην «ενεργοποιημένη» κατάσταση ("activated" state) «αμοιβαδοειδούς» μορφής (87,90).

Αυτή η διάκριση θεωρείται πλέον υπεραπλουστευμένη και εν μέρη εσφαλμένη, αν και χρησιμοποιείται ευρέως στη βιβλιογραφία, καθώς έχουν αναγνωριστεί 6 διαφορετικοί φαινότυποι έως τώρα, σε επίπεδο μορφολογίας και δραστηριότητας (M0, M1, M2a, M2b, M2c, M2d) (Εικ. 18) (97).



Εικόνα 18. Φαινότυποι (καταστάσεις πόλωσης) της μικρογλοίας. Πηγή: Franco R, Fernández-Suárez D. Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. Prog Neurobiol. 2015 Aug 1;131(Supplement C):65–86

Επιπλέον οι όροι «λανθάνουσα» και «ενεργοποιημένη», θεωρούνται ατυχείς, καθώς η μικρογλοία δεν παύει ποτέ να έχει ενεργό ρόλο μια και στην «λανθάνουσα» κατάσταση επιτελεί την επιτήρηση του ΚΝΣ. Έτσι πιο δόκιμη φαίνεται να είναι διάκριση μεταξύ προφλεγμονώδους και αντιφλεγμονώδους φαινοτύπου (97).



Εικόνα 19. Φαινοτυπικό φάσμα της ενεργοποίησης της μικρογλοίας. Πηγή: Verkhatsky A, Noda M. General Physiology and Pathophysiology of Microglia. In: Neuroinflammation and Neurodegeneration Springer, New York, NY; 2014 [cited 2018 May 23]. p. 47–60.

Τέλος, η ίδια η διάκριση ξεχωριστών καταστάσεων θα πρέπει να χρησιμοποιείται με επίγνωση του γεγονότος, ότι δεν έχουμε να κάνουμε με αυστηρή μετάπτωση μεταξύ της μίας ή της άλλης κατάστασης, αλλά περισσότερο με ένα φαινοτυπικό φάσμα μες στο οποίο "κινείται" (Εικ. 19) (87,97,98). Για λόγους σύμπτωσης με το μεγαλύτερο μέρος της βιβλιογραφίας θα χρησιμοποιήσουμε την παραδοσιακή αδρή κατάταξη.

7.2.1. «Λανθάνουσα» κατάσταση (M0)

Η «λανθάνουσα» ή «διακλαδωμένη» μικρογλοία, που ονομάζεται και M0, δεν είναι αδρανής, αλλά συμμετέχει στη διατήρηση της ομοιόστασης του ΚΝΣ. Οι απολήξεις της, με μήκος τουλάχιστον δύο φορές τη διάμετρο του σώματος, εμφανίζουν έντονη κινητικότητα και επιτηρούν με απολύτως ενεργό τρόπο το μικροπεριβάλλον της (87,97). Οι απολήξεις της επιμηκύνονται, βραχύνουν ή δημιουργούνται *de novo* διαρκώς και ελέγχουν τις οποιοσδήποτε διαταράξεις της ομοιόστασης. Έτσι προστατεύουν και επιδιορθώνουν αλλοιώσεις του εγκεφάλου μέσω της συμμετοχής σε λειτουργίες όπως η οργάνωση των συνάψεων, ο έλεγχος της διεγερσιμότητας των νευρώνων, το καθάρισμα άχρηστων υλικών με φαγοκύτωση και η τροφική υποστήριξη (87).

Η έκκριση παραγόντων από την M0 μικρογλοία είναι σχετικά περιορισμένη σε σχέση με την «ενεργοποιημένη». Παρολαυτά εκκρίνονται νευροτροφικοί παράγοντες, όπως οι IGF-1 (insulin-like growth factor-1), BDNF (brain-derived neurotrophic factor), NGF (nerve growth factor), TGFβ (Transforming growth factor beta) (87). Επιπλέον εκφράζονται υψηλά ποσοστά microRNA-124, αλλά χαμηλά ποσοστά CD46, MHC-II (major histocompatibility complex-II) και CD11b (87).

Σε έναν φυσιολογικό υγιή εγκέφαλο, η μικρογλοία παραμένει στη «λανθάνουσα» κατάσταση εξαιτίας παραγόντων που εκκρίνονται από τους νευρώνες και άλλα κύτταρα. Τέτοιοι παράγοντες είναι ο CX3CL1 (neuron-derived fractalkine) που εκκρίνεται από τους νευρώνες και προσδένεται στους υποδοχείς CX3CR1 της μικρογλοίας, οι νευρωνικές μεμβρανικές πρωτεΐνες CD47, CD200, CD22 που αλληλεπιδρούν με τους μικρογλοιακούς υποδοχείς CD172, CD200R, CD45 αντίστοιχα και αναστολείς της ανοσολογικής απόκρισης που εκκρίνονται από νευρώνες, αστροκύτταρα ή άλλα μικρογλοιακά κύτταρα (π.χ. νευροτροφίνες, αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες, προσταγλανδίνες) (87).

Στην «λανθάνουσα» κατάσταση κατηγοριοποιείται κάποιες φορές και ο φαινότυπος M2c, που χαρακτηρίζεται από έντονη έκκριση της αντιφλεγμονώδους

ιντερλευκίνης 10 (IL-10) και άλλων εξωκυτταρικών παραγόντων (87). Εδώ έχει συμπεριληφθεί στην "ενεργοποιημένη" κατάσταση.

7.2.2. «Ενεργοποιημένη» κατάσταση M1/M2

Η "ενεργοποιημένη" μικρογλοία μπορεί να έχει ευεργετική ή καταστροφική επίδραση στο ΚΝΣ. Διακρίνεται σε δύο βασικές κατηγορίες, τη M1 ή "κλασσικά ενεργοποιημένη" και τη M2 ή "εναλλακτικά ενεργοποιημένη". Το πρόσημο ή η ένταση της ενεργοποίησης εξαρτάται από το είδος, την ένταση και τη διάρκεια του ερεθίσματος αλλά και από παράγοντες στο άμεσο μικροπεριβάλλον της (87).

Με τον όρο ενεργοποίηση εννοούμε την υιοθέτηση ενός προφλεγμονώδους ή αντιφλεγμονώδους προφίλ με έκκριση των αντιστοίχων παραγόντων, ταχεία και ενορχηστρωμένη συγκέντρωση σε συγκεκριμένες περιοχές, πολλαπλασιασμό και μορφολογική μετατόπιση προς μία πιο διακλαδωμένη ή αμοιβαδοειδή μορφή, με αλλαγές στο σχήμα σώματος, στη διάμετρο και το μήκος των απολήξεων μέσω έντονης αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού (87,90).

7.2.2.1. M1: "κλασσικά ενεργοποιημένη" μικρογλοία

Η "κλασσικά ενεργοποιημένη" M1 μικρογλοία είναι προφλεγμονώδης και εκκρίνει διαμεσολαβητές της φλεγμονής, όπως προφλεγμονώδεις κυτοκίνες και χυμοκίνες, ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS), MMP-9 (superoxide anion matrix metalloproteinase) κ.α. (87). Συνιστά την έμφυτη ανοσία του ΚΝΣ. Επάγεται από παράγοντες όπως ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS), η ιντερφερόνη-γ (IFN-γ) και βακτηριακά ή κυτταρικά αντιγόνα με συγκεκριμένα μοριακά πρότυπα που συνδέονται με παθογόνα. PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) ή ιστική βλάβη, DAMPs (damage-associated molecular patterns): τα αντιγόνα αυτά παρουσιάζονται από παθογόνα ή απελευθερώνονται από κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη ή πεθαίνουν. Μορφολογικά χαρακτηρίζεται από σχετικά ισομετρικό αμοιβαδοειδές σχήμα που τη διευκολύνει στο σχηματισμό φαγοσωμάτων (87).

7.2.2.1. M2: "εναλλακτικά ενεργοποιημένη" μικρογλοία

Η "εναλλακτικά ενεργοποιημένη" M2 μικρογλοία θεωρείται ο προστατευτικός φαινότυπος. Είναι κατά κύριο λόγο αντιφλεγμονώδης, εκκρίνει αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες (IL-4, IL-10, IL-13, TGF-β) και αργινάση-1 (Arg1) και διακρίνεται στους επιμέρους υποτύπους M2a, M2b, M2c (87,99). Έχει πιο μακρόστενο σχήμα σε σχέση με τη M1 και εμφανίζει πιο έντονη διακλάδωση από τη M0 (87).

Ο φαινότυπος M2a συμμετέχει στην επιδιόρθωση και την ανάπλαση του νευρικού ιστού, δρα πιο μακροπρόθεσμα και επάγεται από παρασιτικά παραπροϊόντα ή αντίστοιχους παράγοντες όπως οι IL-3 και IL-4 (87,99).

Ο M2b συμμετέχει στην ανοσολογική ρύθμιση, επάγεται από αντιφλεγμονώδεις παράγοντες όπως τα γλυκοκορτικοειδή, η IL-10 και ο TGF- β και δέχεται σήματα μέσω των υποδοχέων TLR (toll-like receptors) (87,99).

Ο M2c είναι φαινότυπος απενεργοποίησης, συμμετέχει δηλαδή στην καταστολή της φλεγμονής και άλλων λειτουργιών (87,99).

7.2.3. Περιορισμοί των κατηγοριοποιήσεων

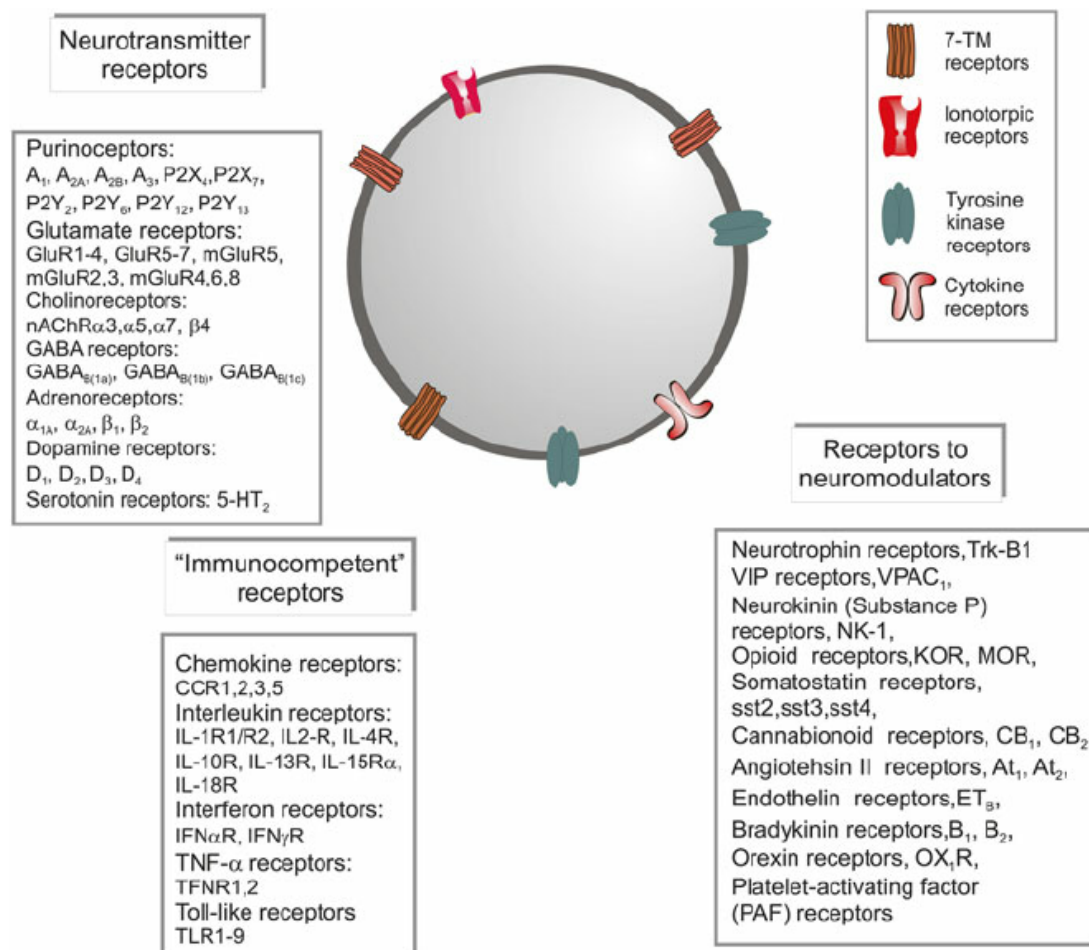
Ακόμη δεν είναι απολύτως σαφές το ακριβές πρότυπο με το οποίο ενεργοποιείται ο κάθε φαινότυπος και πώς ακριβώς αλληλεπιδρούν μεταξύ τους ή κι αν ακόμη την ίδια στιγμή ένα κύτταρο μπορεί να υιοθετεί δύο φαινοτύπους παράλληλα (ιδιαίτερα όσον αφορά τον M1 και M2a τύπο) (87). Επίσης σε *in vitro* πειράματα σε ανθρώπινα κύτταρα φαίνεται οι M2 φαινότυποι να μην επάγονται τόσο εύκολα όσο στα πειραματόζωα. Κάτι που θα πρέπει να έχουμε υπόψη κατά την αναγωγή των συμπερασμάτων μας στον άνθρωπο (87).

7.3. Αλληλεπίδραση μικρογλοίας με το μικροπεριβάλλον της

Όπως αναφέραμε η μικρογλοία αλληλεπιδρά με όλα τα υπόλοιπα κύτταρα του ΚΝΣ, δηλαδή τους νευρώνες, τα αστροκύτταρα, τα ολιγοδενδροκύτταρα και τα επενδυματικά κύτταρα. Έτσι ρυθμίζονται λειτουργίες όπως η μετανάστευση των πρόδρομων νευρικών κυττάρων κατά την ανάπτυξη, οι μεταβολές της συναπτικής διαβίβασης και της νευροπλαστικότητας, η μυελίνωση, η ρύθμιση του μικροπεριβάλλοντος μέσω της διατήρησης της ισορροπίας νευροδιαβιβαστών, ιόντων και νερού, η ρύθμιση της αιματικής ροής και η απόδοσης ενέργειας, η διατήρηση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και η ενίσχυση της κυτταρικής ανοσίας (41,87).

Βασικός παράγοντας επίδρασης της μικρογλοίας στα υπόλοιπα κύτταρα του ΚΝΣ είναι οι προφλεγμονώδεις (κυρίως IL-1 β και ο TNF α) και αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες που εκκρίνει. Οι προφλεγμονώδεις επάγουν την κυτταροτοξική της δράση, την απελευθέρωση πρωτεολυτικών ενζύμων και τη σύνθεση προσταγλανδινών και σηματοδοτούν δεύτερα μονοπάτια για τη σύνθεση και την έκκριση επιπλέον κυτοκινών που οδηγούν στην εμφάνιση νευρο φλεγμονής και στην αύξηση του θερμορυθμιστικού σημείου (41). Επιπλέον επάγουν την έκκριση μορίων προσκόλλησης, που προσδένονται στο επιθήλιο των αγγείων του εγκεφάλου και διευκολύνουν την είσοδο λευκοκυττάρων. Σε αυτή τη διαδικασία συμμετέχουν και

εκκρινόμενες χυμοκίνες, όπως η IL-8 ή οι MCPs (monocyte chemotactic proteins) (π.χ. CCL2, CCL7, CCL8, CCL12, CCL13) που προσελκύουν μακροφάγα και άλλα λευκοκύτταρα στο ΚΝΣ (41).



Εικόνα 20. Υποδοχείς που εκφράζονται από τη μικρογλοία. Πηγή: Verkhratsky A, Noda M. General Physiology and Pathophysiology of Microglia. In: Neuroinflammation and Neurodegeneration [Internet]. Springer, New York, NY; 2014 [cited 2018 May 23]. p. 47–60. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4939-1071-7_3.

Η μικρογλοία εκφράζει ένα πλήθος υποδοχέων στη μεμβράνη της και πολλές πρωτεΐνες μεταφορείς και ιοντικά κανάλια (37,98). Στην εικόνα 20 φαίνονται κάποιοι από αυτούς και στον πίνακα 2 αναφέρονται ονομαστικά. Στο επόμενο κεφάλαιο αναφέρονται αναλυτικά οι πιο σημαντικοί παράγοντες.

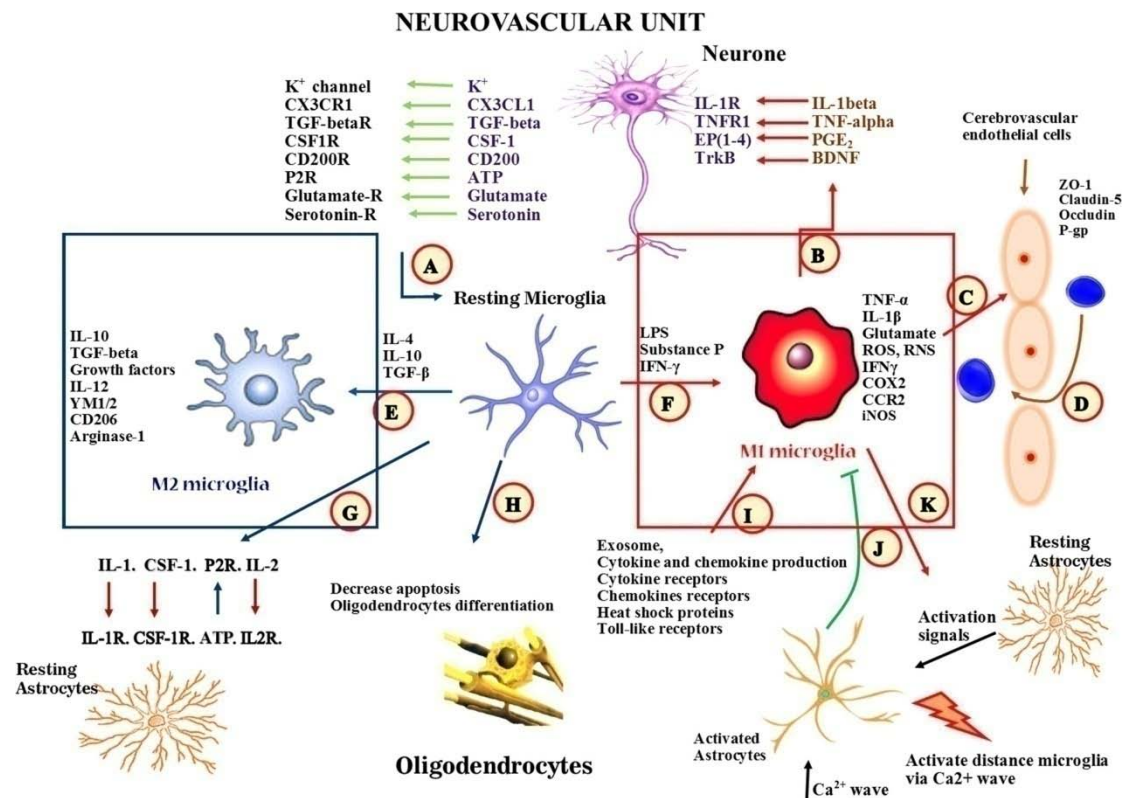
Πίνακας 2. Φορείς αλληλεπίδρασης της μικρογλοίας με το μικροπεριβάλλον της (37).

Αλληλεπίδραση μικρογλοίας με το μικροπεριβάλλον				
Υποδοχείς στη μικρογλοία				
Υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων	Υποδοχείς κυτοκινών και χυμοκινών	Υποδοχείς νευροορμονών και νευροτροποποιητών	Υποδοχείς νευροδιαβιβαστών	Λοιπά συστήματα υποδοχέων
<ul style="list-style-type: none"> Toll-like receptors 	<ul style="list-style-type: none"> Υποδοχείς χυμοκινών Υποδοχείς ιντερλευκινών 	<ul style="list-style-type: none"> Υποδοχείς PAF Υποδοχείς βραδυκινίνης Υποδοχείς ισταμίνης Υποδοχείς ενδοθηλίνης Υποδοχείς κανναβινοειδών Υποδοχείς ανγκιοτενσίνης II Υποδοχείς σωματοστατίνης Υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών και μεταλοκορτικοειδών Υποδοχείς οπιοειδών Υποδοχείς νευροκινίνης (substance P) Υποδοχείς VIP (vasoactive intestinal polypeptide) Υποδοχείς νευροτροφινών 	<ul style="list-style-type: none"> Πουρινεργικοί υποδοχείς Υποδοχείς γλουταμικού Υποδοχείς GABA Χολινεργικοί υποδοχείς Αδρενεργικοί υποδοχείς Ντοπαμινεργικοί υποδοχείς 	<ul style="list-style-type: none"> Υποδοχείς ασβεστίου Υποδοχείς λευκοτριενίου Υποδοχείς Notch Υποδοχείς συμπληρώματος Υποδοχείς θρομβίνης Υποδοχείς παράγοντα ενεργοποίησης μακροφάγων (Macrophage Colony-Stimulating factor receptors) Υποδοχείς επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF receptors) Υποδοχείς CD200 Υποδοχείς λυσοφωσφατιδικού οξέως Υποδοχείς πεπτιδίων φορμυλίου (formyl peptide receptors) Υποδοχείς Sigma
Μεταφορείς και κανάλια ιόντων στη μικρογλοία				
Κανάλια ιόντων		Κυτταροπλασματικοί μεταφορείς		
<ul style="list-style-type: none"> Κανάλια νατρίου Κανάλια ασβεστίου Κανάλια καλίου Κανάλια ανιόντων Κανάλια πρωτονίων Aquaporins Connexons 		<ul style="list-style-type: none"> Xc μεταφορείς Μεταφορείς γλουταμικού Μεταφορείς γλυκόζης Μεταφορείς μονοκαρβοξυλικού Μεταφορείς πρόσδεσης ATP Μεταφορείς ανιόντων Cl⁻ Μεταφορείς δικαρβονικού Αντλία ιόντων H/K Αντλία πρωτονίων 		

Προσαρμογή από: Kettenmann H, Hanisch U-K, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev.* 2011 Apr;91(2):461–553.

7.3.1. Μικρογλοία και νευρώνες

Η μικρογλοία αλληλεπιδρά αμφίδρομα με τους νευρώνες (Εικ. 22) (87). Η κύρια επίδραση της αφορά το κλάδεμα (pruning) των περιττών συνάψεων. Αυτή η λειτουργία είναι ιδιαίτερος κρίσιμη κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια αλλά και στην ενήλικη νευρογένεση, καθώς οι νεαροί νευρώνες έχουν αρχικά περίσσεια συναπτικών συνδέσεων και το κλάδεμα είναι απαραίτητο για τον σωστό σχηματισμό ενός λειτουργικού νευρωνικού δικτύου (87). Διάφοροι υποδοχείς και παράγοντες διαμεσολαβούν αυτή τη λειτουργία:

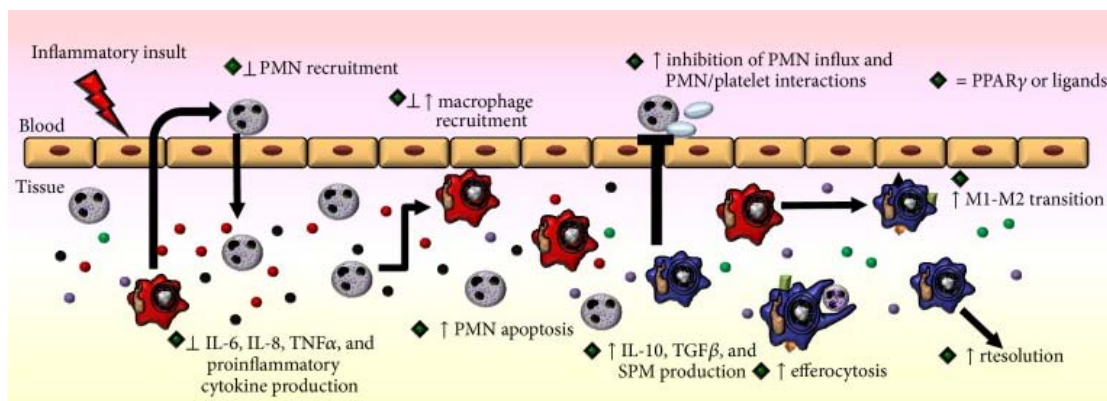


Εικόνα 22. Σχηματική αναπαράσταση της συνθετης αλληλεπίδρασης μεταξύ της μικρογλοίας και άλλων κυττάρων του μικροπεριβάλλοντος της, νευρώνες, αστροκύτταρα, ολιγοδενδροκύτταρα, νευροενδοθηλιακά κύτταρα. Πηγή: Kabba JA, Xu Y, Christian H, Ruan W, Chenai K, Xiang Y, et al. Microglia: Housekeeper of the Central Nervous System. Cell Mol Neurobiol. 2017 May 22;

- **Πουρινεργικοί υποδοχείς** (υποδοχείς ATP/ADP, P2Y₁₂/adenosine A_{2A}): Οι πουρινεργικοί είναι δραστηριο-εξαρτώμενοι υποδοχείς καθώς προσδέονται ATP και ADP. Εντοπίζονται στη μεμβράνη της μικρογλοίας και ενεργοποιούνται λόγω

δραστηριότητας των παρακείμενων νευρώνων ή σε περίπτωση τραύματος του νευρικού ιστού (40).

- Υποδοχέας CX3CR1** (CX3C chemokine receptor 1 ή fractalkine receptor ή G-protein coupled receptor 13, GPR13): Ο υποδοχέας CX3CR1 εκφράζεται αποκλειστικά από τη μικρογλοία. Ενεργοποιείται από τη χυμοκίνη **CX3CL1** (ή αλλιώς φρακταλκίνη) που εκκρίνεται και από τους νευρώνες. Η αλληλεπίδραση CX3CR1-CX3CL1 κυρίως καταστέλλει τη μικρογλοία και επάγει την "λανθάνουσα" μορφή. Διαμεσολαβεί το συναπτικό κλάδεμα και μηχανισμούς επιβίωσης των νευρώνων. Η ευεργετική της επίδραση αποδεικνύεται πειραματικά καθώς η εξωγενής χορήγηση CX3CL1 έχει νευροπροστατευτική δράση. Επιπλέον η διαλυτή φρακταλκίνη sFKN που εκκρίνεται από γλουταμικούς νευρώνες υπό συνθήκες στρες ενισχύει την δυνατότητα της μικρογλοίας να απομακρύνει άχρηστα υλικά (87).
- Υποδοχείς PPAR γ** (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) ή **NR1C3** (nuclear receptor subfamily 1, group C, member 3): Οι πυρηνικοί υποδοχείς PPAR γ ρυθμίζουν την αποθήκευση των λιπαρών οξέων και τον μεταβολισμό της γλυκόζης. Η αντιφλεγμονώδης κυτοκίνη IL-4 επάγει την ενεργοποίηση των μικρογλοιακών PPAR γ , επάγοντας τον νευροπροστατευτικό φαινότυπο της μικρογλοίας και την εκκαθάριση των αποπτωτικών νευρώνων (87). Επιπλέον φαίνεται ότι η ενεργοποίηση των PPAR γ αναστέλει την έκκριση προφλεγμονοδών παραγόντων από τη μικρογλοία, όπως ο TNF α , IL-12, CCL2, NO και παράλληλα επάγει τη λύση της φλεγμονής (Εικ. 21) (100,101).



Εικόνα 21. PPAR γ και η λύση της φλεγμονής. Πηγή: Croasdell A, Duffney PF, Kim N, Lacy SH, Sime PJ, Phipps RP. PPAR γ and the Innate Immune System Mediate the Resolution of Inflammation. PPAR Res. 2015;2015:549691..

- **Υποδοχέας CSF1R** (colony-stimulating factor receptor): Ο υποδοχέας CSF1R εκφράζεται καθολικά στη μικρογλοία. Ενεργοποιείται από τη IL-34 που εκκρίνεται από νευρώνες σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου. Η αλληλεπίδραση CSF1R - IL-34 ενισχύει την επιβίωση της μικρογλοίας (87).
- **Υποδοχείς IL-4:** Η μικρογλοία εμφανίζει υποδοχείς IL-4 που ενεργοποιούνται από νευρώνες με βλάβη και επάγουν την μετάπτωση της μικρογλοίας στον αντιφλεγμονώδη φαινότυπο M2 (87).
- **Προφλεγμονώδεις παράγοντες ενεργοποίησης της μικρογλοίας:** Οι προφλεγμονώδεις παράγοντες επάγουν στη μικρογλοία τη δυνατότητα να προκαλέσει άμεσα κυτταρικό θάνατο στους νευρώνες και να είναι ο κύριος διαμεσολαβητής της φλεγμονής εντός του ΚΝΣ. Αναγνωρίζει και φαγοκυτταρώνει παθογόνα και αλλά βλαβερά ή άχρηστα κυτταρικά υλικά, όπως οι πλάκες Αβ στη νόσο Αλτσχάιμερ (87).
- **ΑΤΡ:** Ακολούθως η απελευθέρωση ΑΤΡ από τα αποπίπτωντα κύτταρα επάγει την περαιτέρω ενεργοποίηση της. Η παρατεταμένη ενεργοποίηση δύναται να καταστεί καταστροφική και η νευροπροστατευτική δράση της μικρογλοίας να μετατραπεί σε νευροεκφυλιστική (87).
- **Εκκρινόμενοι προφλεγμονώδεις παράγοντες της μικρογλοίας που επιδρούν στους νευρώνες:**
 - Η εκκρινόμενη **IL-1b** επάγει την έκφραση του COX-2, που προκαλεί την έκφραση πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου και νευρωνικό θάνατο (87).
 - Εκκρινόμενα οξειδωτικά ένζυμα, όπως η **NOX** (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase) και **iNOS** (Inducible nitric oxide synthase) επάγουν την παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου ROS και νιτρικό οξείδιο NO στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες οδηγώντας τους σε κυτταρικό θάνατο (87).
 - Η εκκρινόμενη **IL-6** και **TNF-α** ενισχύουν τον νευρωνικό θάνατο (87).
- **Εκκρινόμενοι αντιφλεγμονώδεις και νευροτροφικοί παράγοντες:** Η μικρογλοία έμμεσα δύναται να ενισχύσει των επιβίωση, την επιδιόρθωση και την αναδόμηση των νευρώνων μέσω έκκρισης αντιφλεγμονοδών και νευροτροφικών παραγόντων.

7.3.2. Μικρογλοία και αστροκύτταρα

Τα αστροκύτταρα και η μικρογλοία σχετίζονται αμφίδρομα και συμμετέχουν μαζί στις ανοσολογικές αποκρίσεις στο ΚΝΣ (αστρογλοίωση/μικρογλοίωση) (Εικ. 22). Καθώς τα αστροκύτταρα φέρουν μεμβρανικούς υποδοχείς σχεδόν για όλους τους νευροδιαβιβαστές, αλληλεπιδρώντας με τη μικρογλοία της επιτρέπουν να αντλεί έμμεσα νευροδιαβιβαστικές πληροφορίες και να ρυθμίζει με τη σειρά της τη συναπτική διαβίβαση (87).

- **TGF-b και Galectin-1:** Μέσω των παραγόντων TGF-b και Galectin-1, τα αστροκύτταρα αναστέλλουν την ενεργοποίηση της μικρογλοίας, και κατ' επέκταση την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών, άλλων μορίων όπως TNF- α , ROS, NO και μορίων που εμπλέκονται στην ανοσολογική παρουσίαση των αντιγόνων (87).
- **IL-1:** Η IL-1 που εκκρίνεται από τη μικρογλοία επιδρά στα αστροκύτταρα (87).
- **Πουρινεργικοί υποδοχείς:** Η μικρογλοία εκφράζει έντονα πουρινεργικούς υποδοχείς. Έτσι ενεργοποιείται από το ATP που απελευθερώνουν τα αστροκύτταρα σε περίπτωση τραύματος (87).
- **Κύματα Ca^{2+} :** Τα κύματα Ca^{2+} των αστροκυττάρων κατά τη συναπτική διαβίβαση φτάνουν και στη μικρογλοία και την επηρεάζουν (87).

7.3.3. Μικρογλοία και ολιγοδενδροκύτταρα

Η σχέση της μικρογλοίας με τα ολιγοδενδροκύτταρα χαρακτηρίζεται ως μία εύθραυστη ισορροπία (Εικ. 22). Από τη μία είναι απαραίτητη για τη γέννηση και την επιδιόρθωση των ολιγοδενδροκυττάρων και παράλληλα εν δυνάμει καταστροφική στην μυελινοτική δράση τους. Απ' την αντίστροφη πλευρά τα ολιγοδενδροκύτταρα ρυθμίζουν την ενεργοποίηση της μικρογλοίας μέσω εκκρινόμενων παραγόντων όπως οι κυτοκίνες και χυμοκινών (87,102).

- **proNGF (pro-nerve growth factor):** Η μικρογλοία παράγει proNGF που οδηγεί τα ολιγοδενδροκύτταρα σε απόπτωση σε καταστάσεις τραυματισμού της σπονδυλικής στήλης (87).
- **Προφλεγμονώδεις παράγοντες:** Η μικρογλοία εκκρίνει διάφορους προφλεγμονώδεις παράγοντες (IL-1, IL-2, IL-3, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TNF- α , ROS, λυμφοτοξίνη) που αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των πρόδρομων ολιγοδενδροκυττάρων (oligodendrocyte progenitor cells, OPC) και επάγουν την απόπτωση τους (87,102).

- **iNOS/NOX:** Η αυξημένη παραγωγή iNOS από τη μικρογλοία και η ενεργοποίηση του ενζύμου NOX (superoxide-generating NADPH oxidase) συμπράτουν στην παραγωγή peroxynitrite (ελεύθερη ρίζα υπεροξυνιτρικού ιόντος) που είναι κυτταροτοξικό για τα πρόδρομα ολιγοδενδροκύτταρα (87,102).
- **IGF-2 (insulin-like growth factor 2):** Μέσω της έκκρισης IGF-2 η μικρογλοία υποστηρίζει την επιβίωση των ολιγοδενδροκυττάρων (87).
- **Εξωσώματα:** Τα ολιγοδενδροκύτταρα φαίνεται να επικοινωνούν με τη μικρογλοία μέσω εκκρινόμενων εξωσωμάτων που περιέχουν TNF-R1 και κυτοκίνες (87,102).

7.3.4. Μικρογλοία και νευροενδοθηλιακά κύτταρα

Τα νευροενδοθηλιακά κύτταρα συνεργάζονται σταθερά με τη μικρογλοία (Εικ. 22). Κατά πρώτον για τον σχηματισμό της νευροαγγειακής μονάδας (neurovascular unit), που ελέγχει την εγκεφαλική αιματική ροή και τη θρέψη του εγκεφάλου. Κατά δεύτερον για τη διατήρηση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, όπου η μικρογλοία μέσω των IL-1b, TNF-a και iNOS ρυθμίζει τη διαπερατότητα του και την είσοδο ή όχι μυελοειδών κυττάρων της περιφέρειας. Επιπλέον η μικρογλοία φαίνεται να συμμετέχει και στην αγγειογένεση, δηλαδή στον σχηματισμό νέων αγγείων μέσω εκβλάστησης τριχοειδών από το προϋπάρχον αγγειακό δίκτυο (87).

- **Υποδοχέας CD200R:** Ο υποδοχέας CD200R εκφράζεται από τη μικρογλοία και ενεργοποιείται από τους επιφανειακούς παράγοντες CD200 των νευροεπιθηλιακών κυττάρων και των νευρώνων. Η ενεργοποίηση του επάγει την αναστολή της ανοσολογικής απόκρισης από τη μικρογλοία (87).
- **Υποδοχέας TNFR:** Ο υποδοχέας TNFR εκφράζεται από τα νευροεπιθηλιακά και τα μικρογλοιακά κύτταρα. Ενεργοποιείται από τον TNF-a που απελευθερώνεται είτε από τη μικρογλοία (π.χ. φλεγμονή, ισχαιμία, νευροεκφυλιστικές νόσοι κ.ά.) είτε από άλλους παράγοντες. Η ενεργοποίηση του TNFR οδηγεί στην μείωση των επιπέδων της οκλουδίνης (occludin) των νευροεπιθηλιακών κυττάρων και στην χαλάρωση των στενοσυνδέσμων (tight junctions) και παράλληλα στην απελευθέρωση ROS από τη μικρογλοία. Το αποτέλεσμα είναι η αύξηση της διαπερατότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (87).
- **MMP-3 (Matrix metalloproteases-3):** Οι μεταλλοπρωτεάσες MMP-3 εκφράζονται από νευροεπιθηλιακά κύτταρα μετά από τραυματισμό της

σπονδυλικής στήλης και επάγουν την ενεργοποίηση της μικρογλοίας και τη φλεγμονώδη απόκρισή της (87).

- **Παράγοντες αγγειογένεσης (Stat3, ephrin-A3, ephrin-A4):** Ο παράγοντας Stat3 εκφράζεται από την μικρογλοία μετά από ισχαιμία, ρυθμίζει τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των νευροεπιθηλιακών κυττάρων και ενισχύει την αγγειογένεση. Οι παράγοντες αγγειογένεσης ephrin-A3 και ephrin-A4 έχει φανεί επίσης να εκκρίνονται από μικρογλοιακά κύτταρα (87).

Στον πίνακα 3 αναφέρονται συνοπτικά οι παραπάνω παράγοντες της μικρογλοίας και η δράση τους

Πίνακας 3. Σύνοψη των κύριων αλληλεπιδράσεων τις μικρογλοίας με το μικροπεριβάλλον.

		προσδέτης	δράση
Κύριοι παράγοντες που διαμεσολαβούν την αλληλεπίδραση μικρογλοίας και νευρώνων			
Υποδοχείς Μικρογλοίας	Πουρινεργικοί υποδοχείς (P2Y ₁₂ /adenosine A _{2A})	ATP/ADP	Ενεργοποίηση μικρογλοίας
	Υποδοχέας χυμοκίνης CX3CR1	χυμοκίνη CX3CL1	Καταστολή μικρογλοίας
	Υποδοχέας CSF1R	IL-34	Προστασία μικρογλοίας
	Υποδοχείς IL-4:		αντιφλεγμονώδη φαινότυπο M2
	υποδοχείς PPARγ		απομάκρυνση των αποπτωτικών νευρώνων
Εκκρινόμενοι παράγοντες από τη Μικρογλοία	Εκκρινόμενοι προφλεγμονώδεις παράγοντες	IL-1b IL-6 TNF-α NOX iNOS	Νευρωνικός θάνατος
	Εκκρινόμενοι Αντιφλεγμονώδεις και νευροτροφικοί παράγοντες		επιβίωση, επιδιόρθωση και αναδόμηση των νευρώνων
Νευρωνικοί παράγοντες που επιδρούν στη μικρογλοία	Προφλεγμονώδεις παράγοντες +		Ενεργοποίηση μικρογλοίας
	ATP		Ενεργοποίηση μικρογλοίας

		προσδέτης	δράση
Κύριοι παράγοντες που διαμεσολαβούν την αλληλεπίδραση μικρογλοίας και αστροκυττάρων			
Υποδοχείς Μικρογλοίας	Πουρινεργικοί υποδοχείς (P2Y ₁₂ /adenosine A _{2A})	ATP/ADP	Ενεργοποίηση μικρογλοίας
Μικρογλοιακές Προφλεγμονώδεις κυτοκίνες	IL-1		?
Αστρογλοιακοί παράγοντες που επιδρούν στη μικρογλοία	TGF-β και Galectin-1		Αναστολή μικρογλοίας
Κύματα Ca ²⁺			?
Κύριοι παράγοντες που διαμεσολαβούν την αλληλεπίδραση μικρογλοίας και ολιγοδενδροκυττάρων			
Μικρογλοιακές παράγοντες	proNGF		Απόπτωση ολιγοδενδροκυττάρων
	Προφλεγμονώδεις παράγοντες (IL-1, IL-2, IL-3, IFN- α, IFN- β, IFN- c, TNF-α, ROS, λυμφοτοξίνη)		Αναστολή + απόπτωση των πρόδρομων ολιγοδενδροκυττάρων (oligodendrocyte progenitor cells, OPC)
	iNOS/NOX		Κυτοτοξικότητα ολιγοδενδροκυττάρων
	IGF-2		επιβίωση των ολιγοδενδροκυττάρων
ολιγοδενδροκυττάρων	Εξωσώματα	TNF-R1	?
Μικρογλοία και νευροενδοθηλιακά κύτταρα			
Υποδοχείς Μικρογλοίας	Υποδοχέας CD200R	CD200	Αναστολή μικρογλοίας
Υποδοχείς Μικρογλοίας και ενδοθηλιακών κυττάρων	Υποδοχέας TNFR	TNF-α	?
Μικρογλοιακές παράγοντες	Παράγοντες αγγειογένεσης (Stat3, ephrin-A3, ephrin-A4):		πολλαπλασιασμός των νευροεπιθηλιακών κυττάρων και ενίσχυση αγγειογένεσης
νευροενδοθηλιακά κύτταρα	MMP-3 (Matrix metalloproteases-3):		ενεργοποίηση της μικρογλοίας και φλεγμονώδη

7.4. Στρες και μικρογλοία

Το στρες επιδρά στη μικρογλοία άμεσα ή έμμεσα και έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση της εντός το υ φάσματος των φαινοτύπων της, με τις αντίστοιχες μεταβολές στην ενεργότητα, στην συγκέντρωση και στο πλήθος των μικρογλοιακών κυττάρων μέσω πολλαπλασιασμού, εξασθένησης ή γήρανσης. Ακολουθώς επηρεάζονται φυσιολογικές λειτουργίες του ΚΝΣ όπως η ανάπτυξη και η νευρογένεση, η νευροπλαστικότητα, η αναδόμηση του εξωκυττάρου χώρου, η νευροδιαβίβαση, η επιτήρηση της λειτουργικότητας των συνάψεων και η φαγοκύτωση συναπτικών αποβλήτων (5,41,89,90,103).

Στον πίνακα 4 βλέπουμε συνοπτικά πώς επιδρά το στρες στις διάφορες εγκεφαλικές περιοχές με μέτρο τον βαθμό ενεργοποίησης της μικρογλοίας σύμφωνα με τη συστηματική ανασκόπηση των Calcia et. al. (5).

Table 3 Effect of stress on microglial activity as measured by Iba-1

Brain region	Stressor	Effect on Iba-1	Species	References
Amygdala	Repeated social defeat	↑↑↑	Mouse	Wohleb et al. (2011, 2012)
	Chronic restraint	→	Rat	Tynan et al. (2010)
Hippocampus	Repeated social defeat, varying unpredictable stress, prenatal stress	↑↑↑	Rat, mouse	Bian et al. (2012), Wohleb et al. (2011, 2012), Ślusarczyk et al. (2015)
	Chronic restraint, prenatal stress	↑↑	Rat, gerbil, mouse	Tynan et al. (2010), Park et al. (2011), Yoo et al. (2011), ^a Diz-Chaves et al. (2012, 2013)
	Varying unpredictable stress, occlusal disharmony, foot shock	↑	Rat, adult/peripubertal mouse	Brevet et al. (2010), Kojo et al. (2010), Giovanoli et al. (2013), Kreisel et al. (2014)
	Chronic varying unpredictable stress	↓	Rat, mouse	Kreisel et al. (2014)
Nucleus accumbens	Social isolation	↑↑↑	Rat	Schiavone et al. (2009)
	Chronic restraint	↑↑	Rat	Tynan et al. (2010)
Paraventricular nucleus	Repeated Social Defeat	↑↑↑	Mouse	Wohleb et al. (2011, 2012)
	Chronic restraint, chronic varying unpredictable stress	→	Rat	Tynan et al. (2010) and Kopp et al. (2013)
Prefrontal cortex	Repeated social defeat, varying unpredictable stress	↑↑↑	Mouse	Bian et al. (2012), Wohleb et al. (2011, 2012)
	Prenatal stress	↑↑	Rat	Ślusarczyk et al. (2015)
	Social isolation, chronic restraint, varying unpredictable stress	↑	Rat, mouse	Schiavone et al. (2009), Tynan et al. (2010), Hinwood et al. (2012, 2013), Couch et al. (2013), Kopp et al. (2013)
	Varying unpredictable stress	→	rat, mouse	Giovanoli et al. (2013), Kopp et al. (2013), Kreisel et al. (2014)
Ventral tegmental area	Chronic restraint	→	Rat	Tynan et al. (2010)

Πίνακας 4. Επίδραση του στρες στις διάφορες εγκεφαλικές περιοχές σύμφωνα με τον βαθμό ενεργοποίησης της μικρογλοίας. (Συντομεύσεις: no significant change (→), > 5 % decrease (↓), 5–30 % increase (↑), 30 –70 % increase (↑↑) and >70 % increase (↑↑↑)). Πηγή: Calcia MA, Bonsall DR, Bloomfield PS, Selvaraj S, Barichello T, Howes OD. Stress and neuroinflammation: a systematic review of the effects of stress on microglia and the implications for mental illness. *Psychopharmacology (Berl)*. 2016 May;233(9):1637–50.

Οι περιοχές που έχουν μελετηθεί σε σχέση με τη μικρογλοία, το ψυχοκοινωνικό στρες και τις νευροψυχιατρικές διαταραχές είναι κυρίως ο υπόκαμπος, η αμυγδαλή και ο προμετωπιαίος φλοιός, που ανήκουν στο μεταιχμιακό σύστημα και ελέγχουν τη διάθεση (mood) και τη συγκίνηση (emotion) ή και το συναίσθημα (feeling) στον άνθρωπο. Λιγότερες μελέτες περιλαμβάνουν και άλλες περιοχές του μεταιχμιακού και του κυκλώματος της ανταμοιβής, όπως ο επικληνής πυρήνας (nucleus accumbens, NAc) και η κοιλιακή καλυπτρική περιοχή (ventral tegmental area, VTA) ή ο παρακοιλιακός πυρήνας του υποθαλάμου (paraventricular nucleus, PVN) ως σημείο έναρξης του άξονα του στρες (5).

Η επίδραση του στρες στα κύτταρα της μικρογλοίας συνοδεύεται από αλλαγές του μοριακού της προφίλ, κυρίως όσον αφορά τα επιφανειακά της αντιγόνα και τις εκκρινόμενες κυτοκίνες. Οι πιο κοινοί μοριακοί παράγοντες/δείκτες μικρογλοίας φαίνονται στον πίνακα 5 (5). Από αυτούς η πρωτεΐνη Iba-1 (ionised calcium binding adaptor molecule 1) είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη για τον προσδιορισμό της μικρογλοίας καθώς εκφράζεται από όλους τους φαινοτύπους (5).

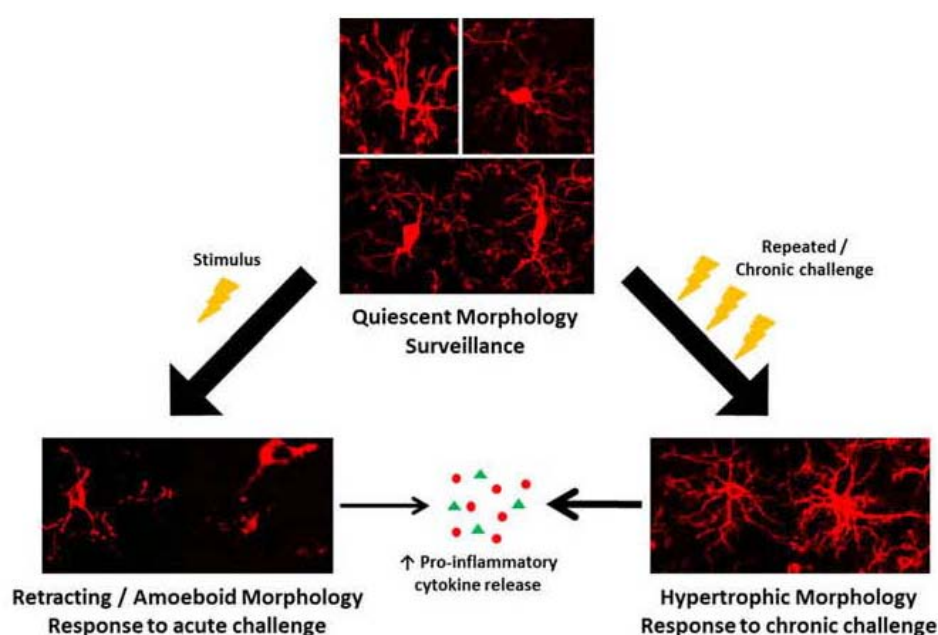
Table 1 Common surface antigen markers of microglia and other centrally active immune cells

Marker	Function	Microglial significance
CD68	Involved in phagocytosis (Ramprasad et al. 1996)	Localised to monocytes and neutrophils (Saito et al. 1991)
CD11b (complement receptor 3)	Regulates leukocyte adhesion and migration to mediate inflammatory response (Meerschaert and Furie 1995)	Expressed in neutrophils, monocytes, natural killer cells, specific lymphocytes (Arnaout 1990)
Ionised calcium binding adapter molecule 1 (Iba-1)	Role in membrane ruffling and phagocytosis (Ohsawa et al. 2000)	Expressed centrally by microglia and infiltrating macrophage (Wohleb et al. 2013, Ito et al. 1998)
CD45	Modulates activation and proliferation of inflammatory cell types (Huntington and Tarlinton 2004)	CD45 _{low} —quiescent microglia CD45 _{high} —peripheral monocytes (Denker et al. 2007)
IL-1 β , TNF- α , IL-6	Pro-inflammatory cytokines	Released by stimulated neutrophils and monocytes (Konsman et al. 2002)
MHC-II	Role in antigen presentation to T cells (St Pierre and Watts 1991)	Expressed centrally by stimulated microglia and macrophage (Aloisi 2001; Xu and Ling 1994)
CCL2/MCP-1	Triggers microglial proliferation and recruits other pro-inflammatory cells (Hinojosa et al. 2011)	Produced by stimulated microglia and expressed in high levels by infiltrating macrophage (Selenica et al. 2013)
CX3CR1 (fractalkine receptor)	Role in leukocyte migration and adhesion (Imai et al. 1997)	CCR2 _{low} /CX3CR1 _{high} —microglia CCR2 _{high} /CX3CR1 _{low} —monocytes (Mizutani et al. 2012)

Πίνακας 5. Μικρογλοιακοί μοριακοί δείκτες. Πηγή: Calcia MA, Bonsall DR, Bloomfield PS, Selvaraj S, Barichello T, Howes OD. Stress and neuroinflammation: a systematic review of the effects of stress on microglia and the implications for mental illness. *Psychopharmacology* (Berl). 2016 May;233(9):1637–50.

7.4.1. Η πρωτεΐνη Iba-1

Η πρωτεΐνη Iba-1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1), γνωστή και ως AIF-1 (Allograft inflammatory factor 1), είναι ένας προσδέτης ιονισμένου ασβεστίου και η λειτουργία της είναι να "πακετάρει" την ακτίνη σε δεσμίδες (actin-bundling). Κατ' αυτό τον τρόπο συμμετέχει στην κινητικότητα της κυτταρικής μεμβράνης, φαινόμενο που συνοδεύει τη δραστηριότητα της μικρογλοίας σε όλους τους φαινοτύπους (5,104). Η Iba-1 εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό και συνεχώς, αποτελώντας έτσι έναν πολύ καλό μοριακό δείκτη για την ανίχνευση των μικρογλοιακών κυττάρων και για την ανάλυση της μορφολογίας τους (Εικ. 23) (5).

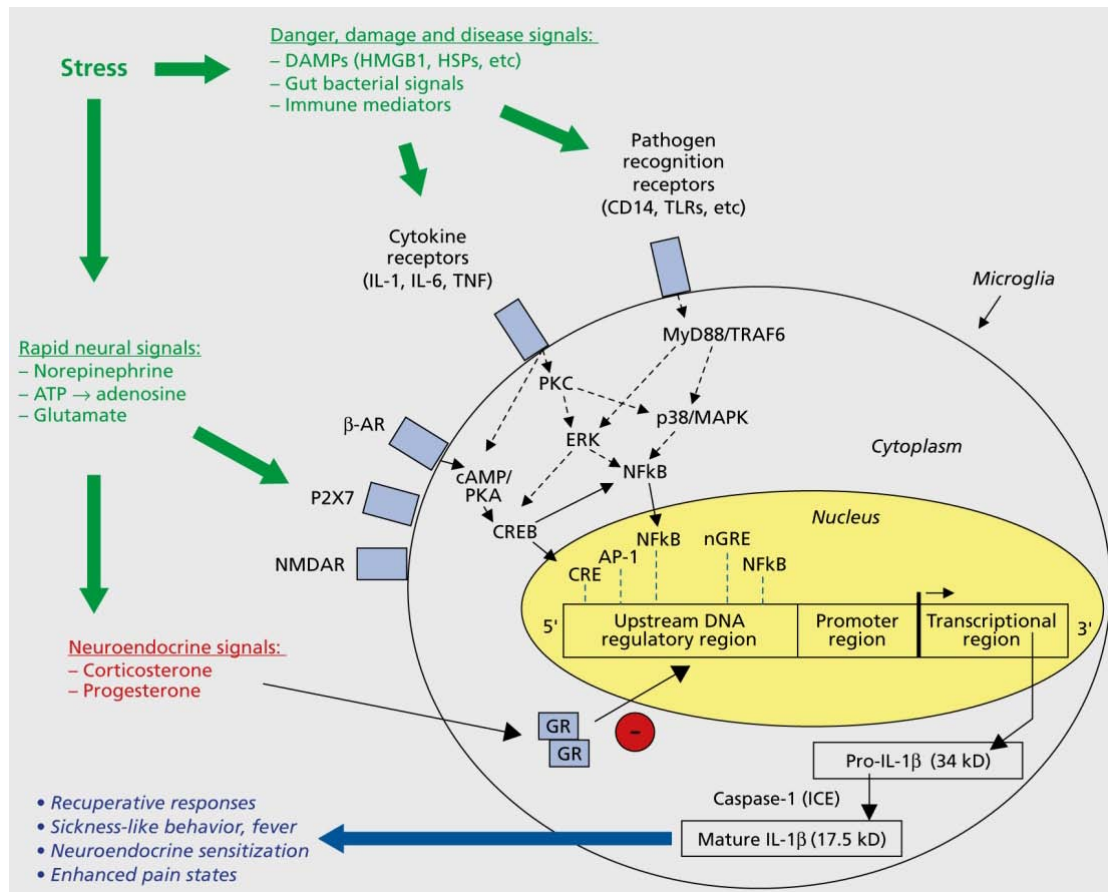


Εικόνα 23. Φωτογραφίες μικρογλοίας με συνεστιακό μικροσκόπιο μετά από επώαση έναντι αντισώματος Iba-1. Πηγή: Calcia MA, Bonsall DR, Bloomfield PS, Selvaraj S, Barichello T, Howes OD. Stress and neuroinflammation: a systematic review of the effects of stress on microglia and the implications for mental illness. *Psychopharmacology (Berl)*. 2016 May;233(9):1637–50.

7.4.2. Περιφερικά εκκρινόμενοι παράγοντες που επιδρούν στη μικρογλοία

Η πιο κλασική οδός επίδρασης του στρες στη μικρογλοία είναι μέσω της ενεργοποίησης του άξονα ΥΥΕ και των περιφερικά εκκρινόμενων γλυκοκορτικοειδών, με εμπλοκή υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών (GR, MR) (90,105–107). Επιπλέον μέσω του ΣΑΜ άξονα και της νορεπινεφρίνης (β-αδρενεργικοί υποδοχείς) και μέσω του άξονα ανοσοποιητικό-εγκέφαλος και των κυτοκινών (90,108).

Άλλη πιθανολογούμενη οδός είναι ο άξονας εντέρου-εγκεφάλου μέσω της μικροβιοκοινότητας (microbiota) του εντέρου πιθανώς με αύξηση της διαπερατότητας του εντερικού επιθηλίου και μετανάστευση των εντερικών βακτηρίων ή των προϊόντων τους στη βλέννα και ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού (90,109).



Εικόνα 24. Μόρια σηματοδότησης που συμμετέχουν στη νευροφλεγμονή. Deak T, Kudinova A, Lovelock DF, Gibb BE, Hennessy MB. A multispecies approach for understanding neuroimmune mechanisms of stress. Dialogues Clin Neurosci. 2017;19(1):37–53. (36)

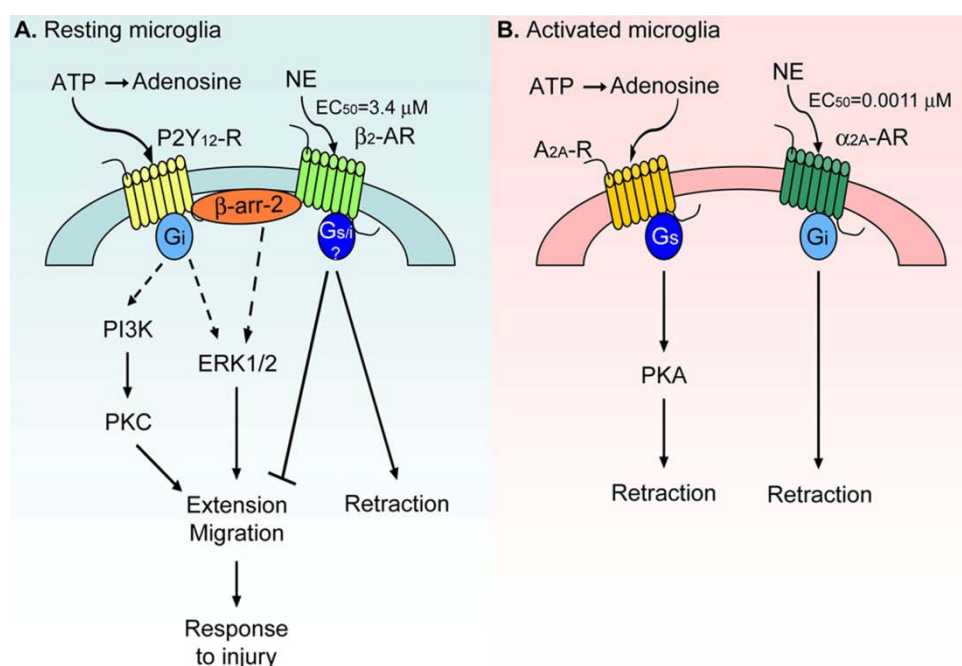
7.4.2.1. Γλυκοκορτικοειδή, άξονας ΥΥΕ και μικρογλοία

Η μικρογλοία εκφράζει υποδοχείς στεροειδών ορμονών (GR, MR, ERα) με κυρίαρχη την έκφραση των GR (Εικ. 24) (36,37,110) και έτσι τα γλυκοκορτικοειδή επιδρούν απευθείας επάνω στον μεταγραφικό της μηχανισμό. Υποδοχείς GR και MR εκφράζουν και τα νευρικά κύτταρα και έτσι έχουμε και έμμεση επίδραση των γλυκοκορτικοειδών μέσω μεταβολής της ομοιόστασης του εγκεφάλου και δεύτερων μηνυμάτων (5). Συγκεκριμένα κυρίως ενισχύουν την έκφραση των TLR υποδοχέων και την έκκριση προφλεγμονοδών κυτοκινών (111). Βέβαια, η μακρόχρονη έκθεση σε

στρες προκαλεί απευαισθητοποίηση, μειώνοντας τον αριθμό ή τη λειτουργικότητα των υποδοχέων GR (112,113).

7.4.2.2. Κατεχολαμίνες, άξονας ΣΑΜ και μικρογλοία

Η μικρογλοία εκφράζει αδρενεργικούς υποδοχείς κυρίως β_2 στη "λανθάνουσα" μορφή και α_{2A} στην "ενεργοποιημένη" σε συνθήκες φλεγμονής (δηλ. στη μορφή M1) (40). Η ΝΕ προκαλεί την απόσυρση των προεκβολών της μικρογλοίας και φαίνεται να έχει κυρίως αντιφλεγμονώδη δράση (40). Οι β_2 και α_{2A} αδρενεργικοί υποδοχείς, μαζί με τους πουρινεργικούς $P2Y_{12}$ είναι το δεύτερο ζευγάρι Gi/Gs-συνδεόμενων υποδοχέων που ελέγχουν τον φαινότυπο της μικρογλοίας και λειτουργούν ανεξάρτητα αλλά και συνεργιστικά (Εικ. 25) (40).



Εικόνα 25. Ρύθμιστικοί μηχανισμοί της κινητικότητας της μικρογλοίας από τους αδρενεργικούς και πουρινεργικούς υποδοχείς Πηγή: Gyoneva S, Traynelis SF. Norepinephrine modulates the motility of resting and activated microglia via different adrenergic receptors. J Biol Chem. 2013 May 24;288(21):15291–302.

7.4.3. Κεντρικά εκκρινόμενοι παράγοντες και μηχανισμοί επίδρασης στη μικρογλοία

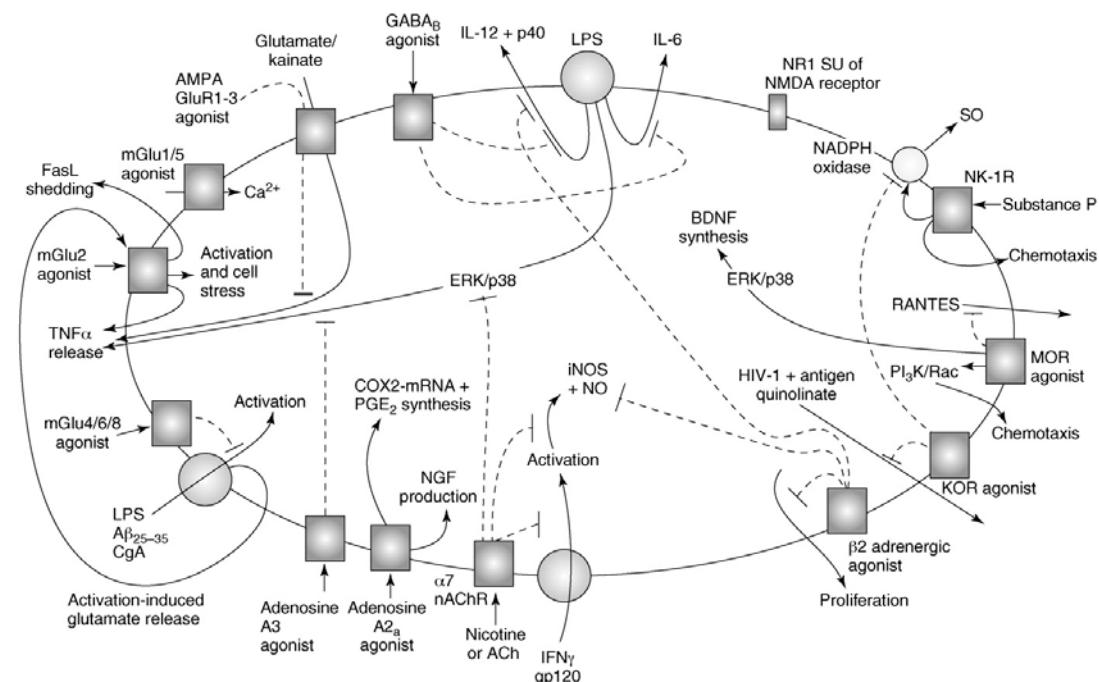
Κεντρικά, απευθείας δηλαδή εντός του ΚΝΣ, οι κύριοι εκκρινόμενοι παράγοντες που επιδρούν στη μικρογλοία είναι οι αλαρμίνες, πρωτεΐνες που εμφανίζουν μοριακά πρότυπα σχετιζόμενα με καταστροφή (damage associated molecular patterns, DAMPs) και πρωτεΐνες που περιέχουν μοριακά πρότυπα σχετιζόμενα με παθογόνα (pathogens associated molecular patterns, PAMPs), που προσδένονται σε υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (pattern recognition receptors, PRRs) (41,90). Επίσης στη

μικρογλοία επιδρούν και heat-shock πρωτεΐνες, όπως η HSP70 που προσδένεται στους μικρογλοιακούς TLR4 υποδοχείς (90).

Οι παράγοντες αυτοί ενεργοποιούν τη μικρογλοία και οδηγούν σε ταχύτατο πολλαπλασιασμό της και έκφραση επιφανειακών παραγόντων MHC (major histocompatibility complex) τύπου I και II, υποδοχείς διαφόρων κυτοκινών, υποδοχείς TLR (toll-like receptors), υποδοχείς NLR (Nod-like receptors) και αντιγόνα T-λεμφοκυττάρων (41). Έτσι εκκινεί η νευροανοσολογική απόκριση. Σε περίπτωση τραύματος ή ασθένειας η μικρογλοία μπορεί να ενεργοποιηθεί και μέσω αλληλεπίδρασης με μακροφάγα που έχουν καταφέρει να διεισδύσουν στο ΚΝΣ (41). Επιπλέον, ενεργοποίηση της προκαλεί η προφλεγμονώδης κυτοκίνη IL-1 που παράγεται στον εγκέφαλο (90,114) και διάφοροι νευροδιαβιβαστές (90,115). Από τους νευροδιαβιβαστές κυρίως ενέχονται το γλουταμικό η νορεπινεφρίνη και η σεροτονίνη που επιδρούν μέσω υπόδοχών στην επιφάνεια της μικρογλοίας (90).

7.4.3.1. Επίδραση των νευροδιαβιβαστών στη μικρογλοία

Αναφέρονται οι πιο σημαντικές επιδράσεις των νευροδιαβιβαστών στην μικρογλοία (Εικ. 26) (115):



TRENDS in Neurosciences

Εικόνα 26. Συνοπτική σχηματική αναπαράσταση της επίδραση διαφόρων νευροδιαβιβαστών στη μικρογλοία. Πηγή: Pocock JM, Kettenmann H. Neurotransmitter receptors on microglia. Trends Neurosci. 2007 Oct;30(10):527–35.

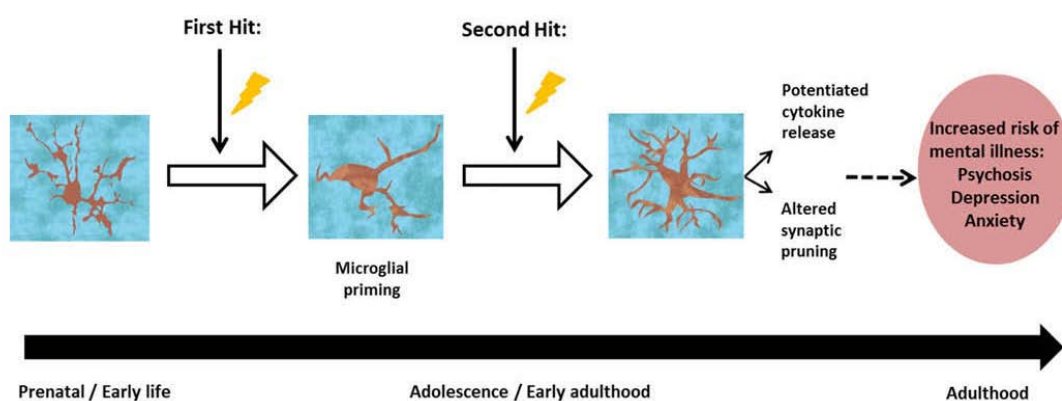
- Το γλουταμικό επιδρά μέσω δύο τύπων υπο δόχων. Η ενεργοποίηση των ιονοτροπικών γλουταμικών υποδοχών (ionotropic glutamate receptors, iGluRs)

ρυθμίζει την έκκριση του TNFα από τη μικρογλοία. Η ενεργοποίηση των μεταβολοτρόπων γλουταμικών υποδοχέων (metabotropic glutamate receptors, mGluRs) επάγουν τον νευροπροστατευτικό (ομάδα III mGluRs) φαινότυπο της μικρογλοίας ή τον νευροτοξικό (ομάδα II mGluRs) με έκκριση TNFα και FasL.

- Το γ-αμινοβουτυρικό, μέσω των GABA_B υποδοχέων, ρυθμίζει την έκκριση των IL-6 και IL-12 από τη μικρογλοία.
- Το ATP, μέσω των πουρινεργικών υποδοχέων P2X και P2Y, ελέγχει την μετανάστευση της μικρογλοίας και την έκκριση κυτοκινών όπως ο TNFα.
- Η αδρεναλίνη, η ντοπαμίνη και η ακετυλοχολίνη έχουν αντιφλεγμονώδη επίδραση στη μικρογλοία.
- Οι υποδοχείς των καναβινοειδών επάγουν τον νευροπροστατευτικό φαινότυπο της μικρογλοίας

7.4.4. Αρνητικές νεογνικές εμπειρίες και μικρογλοία

Οι αρνητικές νεογνικές εμπειρίες επηρεάζουν τον οργανισμό τη στιγμή της έκθεσης, αλλά έχουν και μακροπρόθεσμες επιπτώσεις προκαλώντας αλλαγές που επιδρούν στα πρότυπα απόκρισης συστημάτων, όπως το νευρικό, το ανοσοποιητικό και το ενδοκρινικό, κατά την ενήλικη ζωή (46,116,117). Αυτό το φαινόμενο είναι το υπόβαθρο της "Υπόθεσης των δύο χτυπημάτων" (Two-hit hypothesis) όπου η πρώτη έκθεση σε στρες αυξάνει την ευαισθησία του οργανισμού σε μία επόμενη έκθεση (priming), οδηγώντας τελικά σε αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης κάποιας ψυχιατρικής διαταραχής (Εικ. 27) (5,118,119).



Εικόνα 27. Σχηματική αναπαράσταση της υπόθεσης των «δύο χτυπημάτων». Πηγή: Calcia MA, Bonsall DR, Bloomfield PS, Selvaraj S, Barichello T, Howes OD. Stress and neuroinflammation: a systematic review of the effects of stress on microglia and the implications for mental illness. *Psychopharmacology (Berl)*. 2016 May;233(9):1637–50. (5)

Έχει δειχθεί ότι οι αρνητικές νεογονικές εμπειρίες μπορούν να προκαλέσουν μόνιμη αύξηση στον αριθμό, στα επίπεδα ενεργοποίησης και την κινητικότητα της μικρογλοίας στον ενήλικο εγκέφαλο και υποστηρίζεται ότι μέσω επιγενετικών μηχανισμών αυξάνεται μακροπρόθεσμα η αντιδραστικότητα της (46,120–124).

7.4.5. Χρόνιο στρες κοινωνικής ήττας και μικρογλοία

Το ζωικό μοντέλο του χρόνιου στρες κοινωνικής ήττας (chronic social defeat stress, CSDS) είναι το κυρίαρχο μοντέλο για την εκτίμηση της επίπτωσης του ψυχοκοινωνικού στρες στους ενήλικες και τη μελέτη προδιαθεσικών παραγόντων για την εμφάνιση ψυχιατρικών διαταραχών (50). Οι μελέτες που έχουν διερευνήσει τη συσχέτιση αυτού του τύπου στρες με την ομοιόσταση της μικρογλοίας δείχνουν ότι το CSDS συνδέεται με αυξημένα επίπεδα ενεργοποίησης της μικρογλοίας και με ένα προφλεγμονώδες προφίλ του ΚΝΣ που αποδίδεται στη δράση της μικρογλοίας (5). Επίσης τα ζώα που εμφανίζουν φαινότυπο "ανθεκτικότητας" (resilience) στο συγκεκριμένο πειραματικό μοντέλο δεν παρουσιάζουν αλλαγές στη μικρογλοία ή καταθλιπτική συμπεριφορά (5).

7.5. Συσχέτιση μικρογλοίας με την κατάθλιψη

Όπως είδαμε το στρες επηρεάζει με διάφορο υ τρόπους τη μικρογλοία και προς διάφορες κατευθύνσεις. Σε κάθε περίπτωση αποτελεί ένα ερέθισμα που προσλαμβάνεται από τη μικρογλοία, επηρεάζει ενδοκυτταρικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος και οδηγεί σε επιγενετικές ή μεταγραφικές αλλαγές. Έτσι επηρεάζει με τη σειρά της τα υπόλοιπα κύτταρα του ΚΝΣ, νευρικά και γλοιακά, και διαδικασίες όπως η νευροπλαστικότητα, η νευρογένεση, η νευροδιαβίβαση και η μυελίνωση. Μέσω αυτών των παρεμβάσεων επηρεάζονται λειτουργίες όπως η θρέψη, η μάθηση/μνήμη, η λήψη αποφάσεων, η διάθεση, το συναίσθημα, συμβάλλοντας στην αυξημένη ευπάθεια ή την εμφάνιση κατάθλιψης και άλλων νευροψυχιατρικών διαταραχών (41,89,90,103). Η επίδραση αυτή μπορεί να είναι παροδική ή μόνιμη, ανάλογα με τη χρονιότητα του στρεσογόνου παράγοντα (90). Υπάρχουν διάφορες υποθέσεις για το ποιος είναι ο ακριβής μηχανισμός συσχέτισης της μικρογλοίας με την κατάθλιψη: η υπόθεση της νευροφλεγμονής, η υπόθεση του φλεγμονοσώματος, η υπόθεση της περιφερικής ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού, η υπόθεση της μειωμένης ανοσίας, η υπόθεση της μεταβολής του μεταβολισμού της τρυπτοφάνης στον εγκέφαλο, η υπόθεση της μεταβολής των επιπέδων των νευροτροφινών BDNF και GDNF, η υπόθεση της μεταβολής της νευρογένεσης στον ιππόκαμπο (41). Προς το παρόν δεν έχει επικρατήσει μία υπόθεση και πιθανώς η κάθε μία να αντιστοιχεί σε μία

διαφορετική μορφή εκδήλωσης των διαφόρων διαταραχών που περιλαμβάνονται στον ορισμό της κατάθλιψης. Οι υποθέσεις περιγράφονται αναλυτικά στο κεφάλαιο 8.

8. Κατάθλιψη

Η κατάθλιψη είναι μια πολυπαραγοντική και ετερογενής νοσολογική οντότητα γι' αυτό και έχει προταθεί να χαρακτηρίζεται ως σύνδρομο. Πρωτογενώς επηρεάζει τη διάθεση και το συναίσθημα και δευτερογενώς συνολικά την υγεία καθώς διαταράσσει συνολικά την ομοιόσταση του οργανισμού και βασικές λειτουργίες όπως οι αυτόνομες, η νευροενδοκρινική ρύθμιση, η ανοσολογική απόκριση, ο μεταβολισμός, ο ύπνος, η όρεξη κ.ά. (125). Το κύριο χαρακτηριστικό της είναι η "καταθλιπτική διάθεση" που περιλαμβάνει ανηδονία, μειωμένη κινητοποίηση, απελπισία, αεργία, ευερεθιστότητα, δυσκολία συγκέντρωσης, διαταραχές του ύπνου και της όρεξης, γνωστικές διαταραχές και αυτοκτονικότητα (126). Το στρες αποτελεί έναν ισχυρό παράγοντα κινδύνου για την εκδήλωση της. Έτσι καθώς ο σύγχρονος τρόπος ζωής χαρακτηρίζεται από έντονο στρες, η κατάθλιψη είναι πλέον από τις πιο ραγδαία εξαπλωνόμενες νόσους (126).

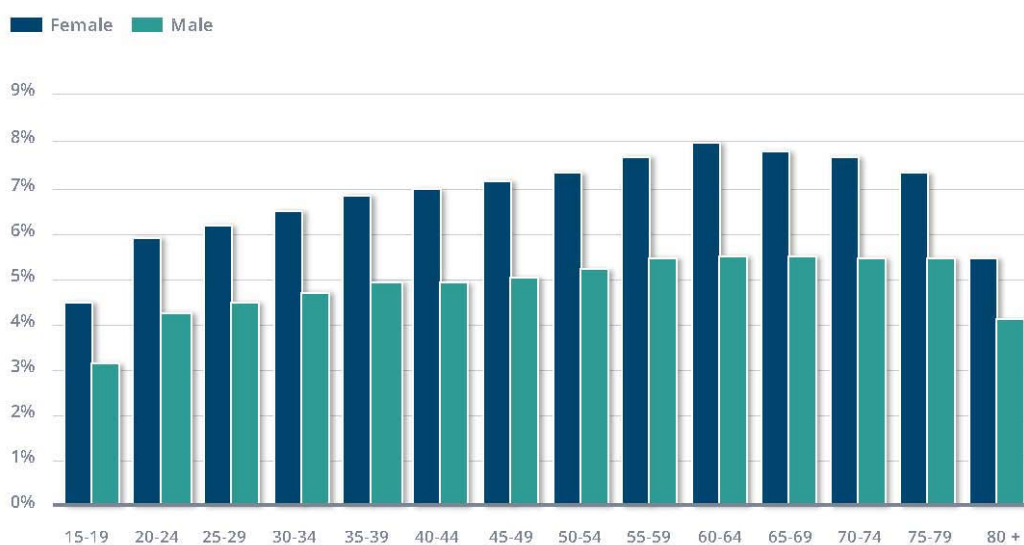
Διάφορες υποθέσεις προσπαθούν να εξηγήσουν τον παθοφυσιολογικό μηχανισμό της, ενσωματώνοντας περιβαλλοντικούς, ενδοκρινικούς, ανοσολογικούς, μεταβολικούς, κυτταρικούς, μοριακούς και επιγενετικούς παράγοντες. Έτσι, παρότι η γνώση γύρω απ' την κατάθλιψη ολοένα και αυξάνεται, τα κενά που ακόμη υπάρχουν είναι τεράστια. Βασικός λόγος είναι η μεγάλη συμπτωματολογική ετερογένεια της συγκεκριμένης νοσολογικής οντότητας, καθώς και η τεχνολογική αδυναμία για την άμεση μελέτη του ανθρώπινου εγκεφάλου. Τα ζωικά μοντέλα αποτελούν ένα σημαντικό εργαλείο, αλλά υπάρχουν και ανυπέρβλητες δυσκολίες καθώς ο εγκέφαλος έχει κάνει εξελικτικό άλμα μεταξύ του ανθρώπου και των άλλων θηλαστικών. Ιδιαίτερα δε όσον αφορά τη μελέτη της κατάθλιψης, όπου η διάθεση και το συναίσθημα παίζουν κυρίαρχο ρόλο, και με τον προμετωπιαίο φλοιό να είναι κομβικό σημείο, τα αποτελέσματα από πειράματα σε ζώα πρέπει πάντα να ερμηνεύονται προσεκτικά και η αναγωγή στον άνθρωπο να γίνεται πάντα με επιφύλαξη. Επιπλέον η ίδια η πολυσύνθετη και ενιαία φύση του εγκεφάλου μας υπενθυμίζει ότι σύνθετες λειτουργίες όπως η συμπεριφορά και η σκέψη μπορούν μεν να κατακερματισθούν προς διευκόλυνση της μελέτης τους, αλλά θα πρέπει πάντα στο τέλος να ανασυντίθενται μαζί με τις υπάρχουσες γνώσεις, ώστε να ερμηνευθούν τόσο σύνθετα φαινόμενα όπως το συναίσθημα και η συμπεριφορά.

8.1. Επιδημιολογικά δεδομένα

Η κατάθλιψη ανήκει στις πιο κοινές ψυχιατρικές νόσους, μαζί με τις αγχώδεις διαταραχές, καθώς περισσότερα από 300 εκατομμύρια άτομα, δηλαδή το 4,4% του παγκόσμιου πληθυσμού (ΠΟΥ, 2015) πάσχει από αυτή. Επιπλέον τα ποσοστά αυτά προβλέπεται να αυξηθούν τα επόμενα χρόνια με την κατάθλιψη να γίνεται κυρίαρχη αιτία ανικανότητας παγκοσμίως (προς το παρόν είναι στην τέταρτη θέση) και μέχρι το 2030 ο κύριος παράγοντας του συνολικού παγκόσμιου φορτίου ασθένειας, κάτι που ήδη ισχύει για τις γυναίκες (127–129) .

Η συχνότητα της κατάθλιψης στον πληθυσμό εμφανίζει φυλετικό διμορφισμό και στις γυναίκες εμφανώς μεγαλύτερη σε σχέση με τους άνδρες (Εικ. 28) (130). Επίσης η κατάθλιψη συνοδεύεται από άλλα έντονα κοινωνικά φαινόμενα που έχουν και αυτά επίπτωση, όπως ο στιγματισμός και η άρνηση αποδοχής της από τον ίδιο τον ασθενή ή και από τον κοινωνικό του περίγυρο.

Global prevalence of depressive disorders, by age and sex (%)



Εικόνα 28. Συχνότητα εμφάνισης κατάθλιψης στα δύο φύλα. Πηγή: Global Burden of Disease Study 2015 (<http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool>).

8.2. Ιστορικά δεδομένα

Η κατάθλιψη ως φαινόμενο είχε περιγραφεί ήδη από την αρχαιότητα. Ο Ιπποκράτης το 400 π.Χ. χρησιμοποίησε τον όρο “μελαγχολία” για να την περιγράψει (131). Για

πάρα πολλά χρόνια είχε διατηρηθεί αυτός ο ορισμός και χαρακτηριζόταν ως μια λειτουργική διαταραχή καθώς απουσίαζε οποιαδήποτε γνώση για την οργανική της υπόσταση. Τον 20^ο αιώνα άρχισε να εισάγεται ο όρος κατάθλιψη, και εγκαθιδρύθηκε τη δεκαετία του '80 ως μία νόσος με βιολογικό υπόβαθρο, με την ανακάλυψη των πρώτων αντικαταθλιπτικών φαρμάκων (132).

8.3. Χαρακτηριστικά-Διάγνωση

Η κατάθλιψη αποτελεί μία σύνθετη νοσολογική οντότητα που περιλαμβάνει ένα εύρος ετερογενών καταθλιπτικών διαταραχών. Η διάγνωση της γίνεται αποκλειστικά με βάση τη συμπτωματολογία, απουσία έγκυρων βιοδεικτών (131). Σύμφωνα με το Διαγνωστικό και Στατιστικό Εγχειρίδιο των Ψυχικών Διαταραχών DSM-5 (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edition) (2013) της Αμερικανικής Ψυχιατρικής Εταιρείας, ο επίσημος ορισμός της είναι “Καταθλιπτικές διαταραχές”, όπου περιλαμβάνονται οι (133):

1. Διασπαστική διαταραχή λόγω δυσρυθμισμένης διάθεσης,
2. Μείζονα καταθλιπτική διαταραχή,
3. Εμμένουσα καταθλιπτική διαταραχή (Δυσθυμία),
4. Προεμμηνορυσιακή δυσφορική διαταραχή,
5. Προκαλούμενη από ουσίες/φάρμακα καταθλιπτική διαταραχή,
6. Καταθλιπτική διαταραχή οφειλόμενη σε άλλες παθολογικές καταστάσεις,
7. Απροσδιόριστη καταθλιπτική διαταραχή.

Κοινό σημείο όλων των καταθλιπτικών διαταραχών είναι η θλίψη, το αίσθημα κενού και η ευερεθιστότητα, παράλληλα με σωματικές και γνωστικές διαταραχές που επηρεάζουν και παρεμποδίζουν σημαντικά τη λειτουργικότητα του ατόμου. Άλλα συμπτώματα που είναι αρκετά συχνά είναι η παραίτηση, η ανηδονία, το αίσθημα ενοχής, η έλλειψη αυτοπεποίθησης, η διαταραχές του ύπνου και της όρεξης, η κόπωση και η αδυναμία συγκέντρωσης (128). Η διάκριση μεταξύ των διαταραχών αφορά κυρίως τη διάρκεια, τη συχνότητα και την ένταση των συμπτωμάτων ή την θεωρούμενη αιτιολογία.

Ειδικά όσον αφορά τη μείζονα καταθλιπτική διαταραχή, που έχει μελετηθεί πιο εκτενώς, διακρίνονται δύο υποκατηγορίες, η μελαγχολική κατάθλιψη και η άτυπη κατάθλιψη. Η μελαγχολική χαρακτηρίζεται από υπερδιέγερση, άγχος και υπερλειτουργία του συστήματος του στρες. Συνδέεται με εμφάνιση υπερκορτιζολαιμίας, καταστολή του αναπαραγωγικού και του αυξητικού συστήματος, αϋπνία, ανορεξία, ανηδονία. Επίσης η καταθλιπτική διάθεση είναι πιο

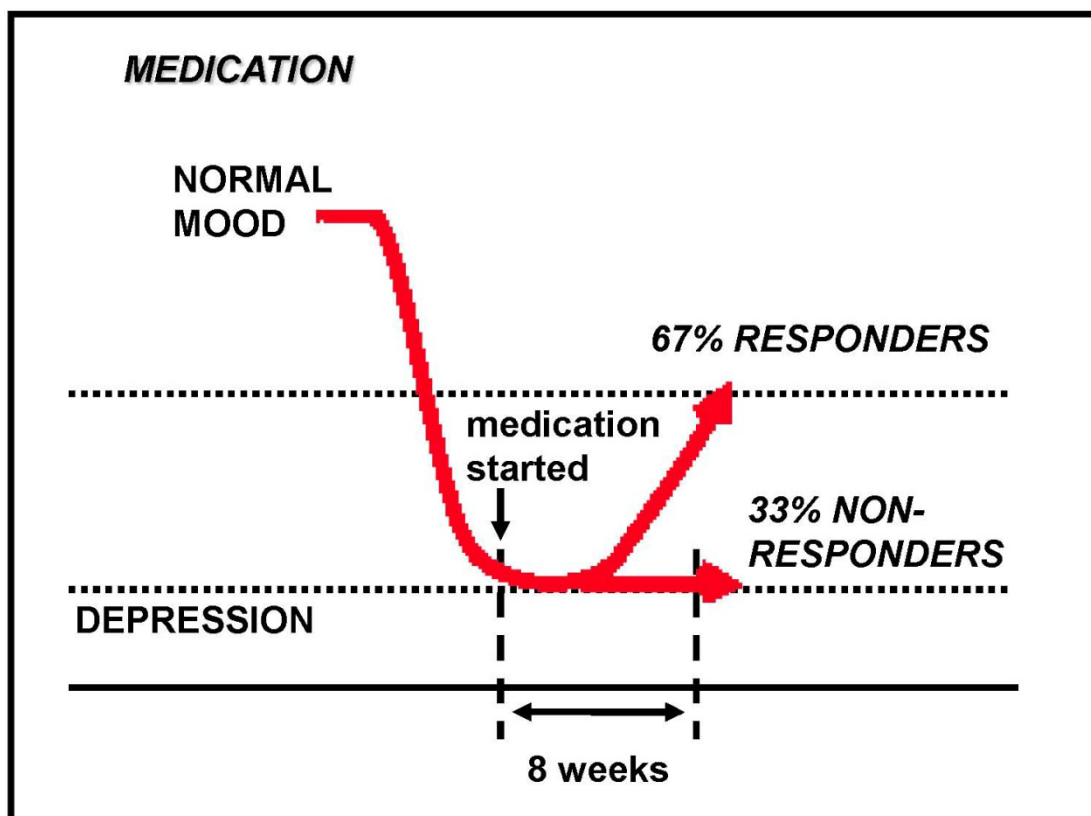
βαριά το πρωί και βελτιώνεται κατά τη διάρκεια της μέρας. Η άτυπη κατάθλιψη χαρακτηρίζεται κυρίως από έντονο αίσθημα κενού και αποσύνδεσης, γνωστική και νοητική κόπωση, υπολειτουργία του συστήματος του στρες με εμφάνιση λήθαργου, υπνηλίας, υπερφαγίας, αύξησης βάρους και αύξησης του καταθλιπτικού συναισθήματος καθώς περνάει η μέρα (125).

8.4. Εκδήλωση

Η κατάθλιψη μπορεί να εμφανιστεί και ως ένα μεμονωμένο επεισόδιο στη ζωή του ατόμου, αλλά συνήθως πρόκειται για μία χρόνια νόσο, με επανειλημμένα επεισόδια που παραλύει το άτομο και το καθιστά μη λειτουργικό σε όλες τις εκφάνσεις της καθημερινότητας (128). Στη βαριά της μορφή μπορεί να οδηγήσει ακόμη και στο θάνατο άμεσα μέσω της αυτοκτονίας ή έμμεσα μέσω υιοθέτησης αυτοκαταστροφικών και επικίνδυνων συμπεριφορών. Σε κάθε περίπτωση η ίδια η κατάθλιψη αποτελεί χρόνιο στρεσογόνο παράγοντα που επιβαρύνει το άτομο σχηματίζοντας έτσι έναν βρόγχο θετικής ανατροφοδότησης και επιδείνωσης των συμπτωμάτων.

8.5. Θεραπεία

Οι διάφορες καταθλιπτικές διαταραχές μπορούν να χαρακτηριστούν ως ήπιες, μέτριες ή βαριές μορφές. Στις ήπιες μορφές μπορεί να υπάρξει ίαση και χωρίς φαρμακευτική αγωγή. Στις περιπτώσεις της μέτριας ή βαριάς μορφής συνίσταται εξειδικευμένη ψυχοθεραπευτική παρέμβαση και μπορεί να θεωρηθεί απαραίτητη και η φαρμακευτική αγωγή. Τα κύρια αντικαταθλιπτικά που χρησιμοποιούνται είναι οι εκλεκτικοί αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης (SSRIs), οι εκλεκτικοί αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης και νορεπινεφρίνης (SSNRIs) και τα τρικυκλικά (TCAs). Τα TCAs ονομάζονται πρώτης γενιάς και είναι τα πρώτα που χρησιμοποιήθηκαν, ενώ τα SSRIs και SSNRIs δεύτερης και ανακαλύφθηκαν μεταγενέστερα. Άλλα φάρμακα που χρησιμοποιούνται πιο σπάνια είναι οι α -blockers, οι αναστολείς της μονοαμινικής οξειδάσης (MAO), οι εκλεκτικοί αναστολείς επαναπρόσληψης νορεπινεφρίνης, οι εκλεκτικοί αναστολείς επαναπρόσληψης νορεπινεφρίνης και ντοπαμίνης, οι αγωνιστές του υποδοχέα της μελατονίνης και οι ανταγωνιστές του υποδοχέα 5-HT_{2C} της σεροτονίνης (134). Η αποτελεσματικότητα των αντικαταθλιπτικών φαίνεται να είναι ανεπαρκής καθώς μόνο ένα 33% ανταποκρίνεται πραγματικά στη θεραπεία, ένα 33% εμφανίζει το φαινόμενο placebo και ένα 33% δεν έχει καμία ανταπόκριση (Εικ. 29) (128,135).



Εικόνα 29. Απόκριση στην αντικαταθλιπτική θεραπεία. Πηγή: Andrade C. Stahl's Essential Psychopharmacology: Neuroscientific Basis and Practical Applications. Mens Sana Monogr. 2010;8(1):146–50.

8.6. Παθοφυσιολογία της κατάθλιψης

Η κατάθλιψη θεωρείται ιδιοπαθής νόσος, καθώς η αιτιολογία της δεν είναι αποσαφηνισμένη. Γι' αυτό και προς το παρόν μπορούμε να αναφερόμαστε μόνο σε παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με την εμφάνιση της και όχι για αιτιολογικούς. Οι παράγοντες κινδύνου μπορεί να είναι εξωτερικοί και εσωτερικοί. Εξωτερικοί είναι παράγοντες όπως το στρες, η έλλειψη υποστηρικτικού περιβάλλοντος, τα οικογενειακά προβλήματα, το χαμηλό κοινωνικοοικονομικό επίπεδο, η χαμηλή μόρφωση, η χρήση ναρκωτικών ουσιών ή άλλων φαρμάκων (41). Οι εσωτερικοί είναι ουσιαστικά οι βιολογικοί παράγοντες και αφορούν τη γενετική προδιάθεση, τις επιγενετικές αλλαγές και τις ανατομικές και φυσιολογικές διαταραχές του ΚΝΣ.

Η γενετική προδιάθεση, ενώ έχει μελετηθεί εκτενώς και παίζει σαφώς ρόλο, δεν φαίνεται να είναι απολύτως καθοριστική. Η αλληλεπίδραση του ατόμου με το περιβάλλον και τελικά η αλληλεπίδραση κοινωνικών, ψυχολογικών και βιολογικών παραγόντων είναι αυτή που θα καθορίσει την τελική έκβαση. Πάνω σε αυτή τη βάση

βέβαια, η γενετική προδιάθεση μπορεί να θεωρηθεί ότι πέραν της άμεσης επίδρασης που έχει, περιορίζει τις δυνατότητες του ατόμου να προσαρμοστεί στο δυσμενές περιβάλλον και τελικά το οδηγεί στην υιοθέτηση συμπεριφορών που δεν είναι ευνοϊκές για το ίδιο (136).

Οι κύριες φυσιολογικές διαταραχές που έχουν βρεθεί σε άτομα με κατάθλιψη αφορούν α) τα επίπεδα νευροδιαβιβαστών όπως η σεροτοίνη, η νορεπινεφρίνη, η ντοπαμίνη, το γ-αμινοβουτυρικό (GABA), το γλουταμικό, η ακετυλοχολίνη, β) τον νευροτροφικό παράγοντα BDNF, γ) το νευροπεπτίδιο P (Substance P. SP), δ) τους υποδοχείς κανναβινοειδών CB1, ε) την υπο- ή υπερ- λειτουργία του άξονα ΥΥΕ και αντιστοίχως τα επίπεδα των εκκρινόμενων γλυκοκορτικοειδών και στ) το ανοσολογικό προφίλ (κυτοκίνες και άλλοι παράγοντες της φλεγμονής) (41,109).

Στις ανατομικές αλλοιώσεις που συνδέονται με την κατάθλιψη έχουμε α) τον μειωμένο όγκο των εγκεφαλικών λοβών, κυρίως του προμετωπιαίου και του κροταφικού, β) τον μειωμένο όγκο ιπποκάμπου και γ) τον αυξημένο όγκο των κοιλιών (41).

Σε κυτταρικό επίπεδο έχουμε α) σημαντική απώλεια και μείωση του μεγέθους των GABAεργικών νευρώνων στον ινιακό λοβό, στον προμετωπιαίο φλοιό και στο μεταχιακό σύστημα, β) μεταβολές στον αριθμό, την πυκνότητα και το μέγεθος των γλοιακών κυττάρων (41).

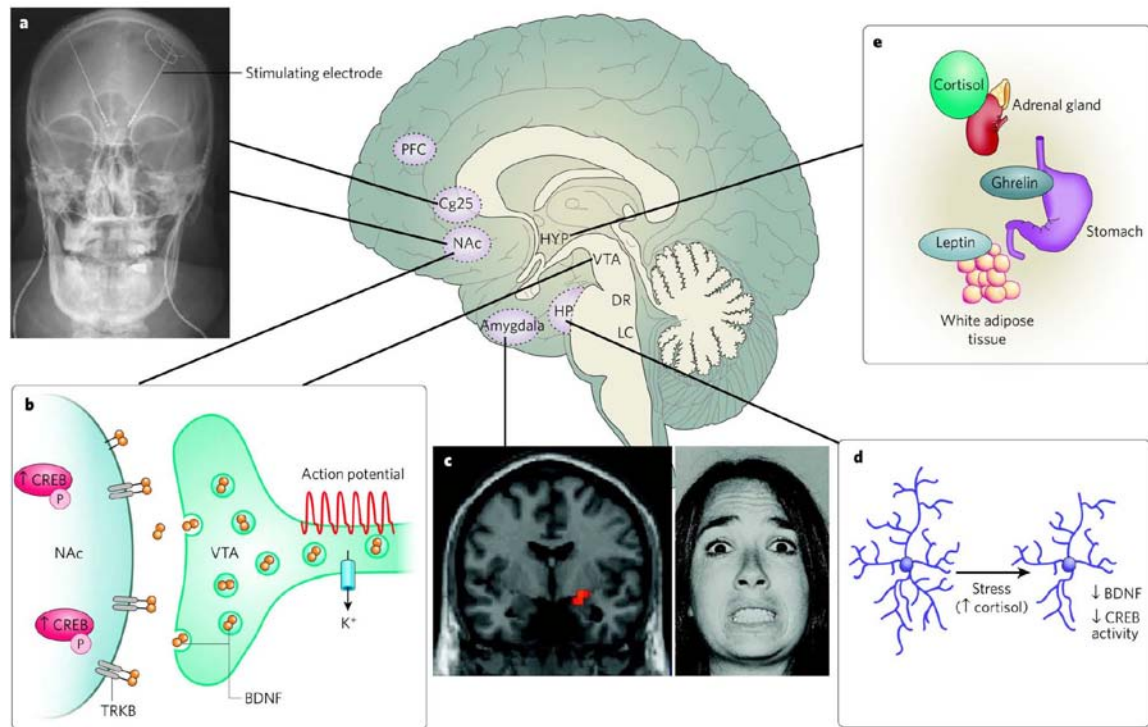
8.7. Νευροβιολογικό υπόβαθρο της κατάθλιψης-κυρίαρχες θεωρίες

Οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί της κατάθλιψης δεν έχουν ακόμη αποδειχθεί, οπότε έχουν προταθεί διάφορες θεωρίες που προσπαθούν να ερμηνεύσουν νευροβιολογικά την εμφανιζόμενη συμπτωματολογία. Κάποιες από τις κυρίαρχες θεωρίες είναι: α) Η υπόθεση του νευρωνικού κυκλώματος της κατάθλιψης, β) Η υπόθεση των μονοαμινών, γ) Η νευροτροφική υπόθεση, δ) Η υπόθεση της νευροενδοκρινούς αλληλεπίδρασης, ε) Η υπόθεση των κυτοκινών και του οξειδωτικού στρες, στ) Οι υποθέσεις που σχετίζονται με τη μικρογλοία : βλ. παρακάτω) Τέλος έχει προταθεί η "Ενοποιημένη θεωρία" που συνδυάζει όλες τις παραπάνω. Παρακάτω περιγράφονται συνοπτικά κάποιες απ' αυτές.

8.7.1. Η υπόθεση του νευρωνικού κυκλώματος της κατάθλιψης

Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία η κατάθλιψη απορρέει από τη διαταραχή της λειτουργικής σύνδεσης και ισορροπίας μεταξύ των περιοχών και των κυκλωμάτων του εγκεφάλου που ρυθμίζουν το συναίσθημα, την ανταμοιβή και τις εκτελεστικές λειτουργίες (Εικ.30) (131,137–139). Τα κύρια ευρήματα που το επιβεβαιώνουν είναι

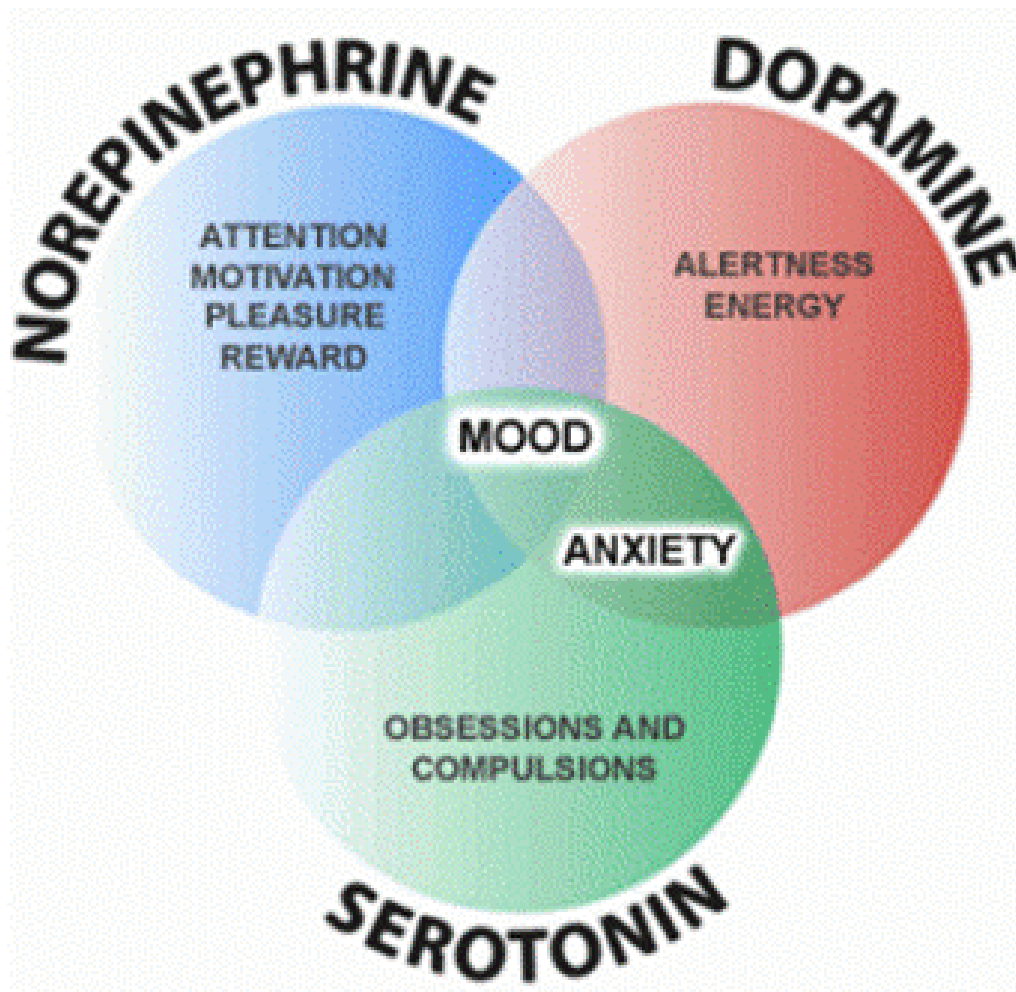
η μείωση του όγκου της φαιάς ουσίας και της πυκνότητας της γλοίας στον προμετωπιαίο φλοιό και τον ιππόκαμπο, που συνδέονται με το αίσθημα ενοχής και αναξιότητας, και η υπερτροφία της αμυγδαλής που σχετίζεται με αισθήματα δυσφορίας, φόβου και άγχους. Επιπλέον στις περιοχές του κυκλώματος της κατάθλιψης που εμφανίζουν αλλοιώσεις ανήκει και ο επικλινής πυρήνας, ο VTA, ο πρόσθιος φλοιός προσαγωγίου και οι πυρήνες ραφής (140–142).



Εικόνα 30. Το νευρωνικό κύκλωμα της κατάθλιψης. Πηγή: Krishnan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression. Nature. 2008 Oct 16;455(7215):894–902.

8.7.2. Η υπόθεση των μονοαμινών

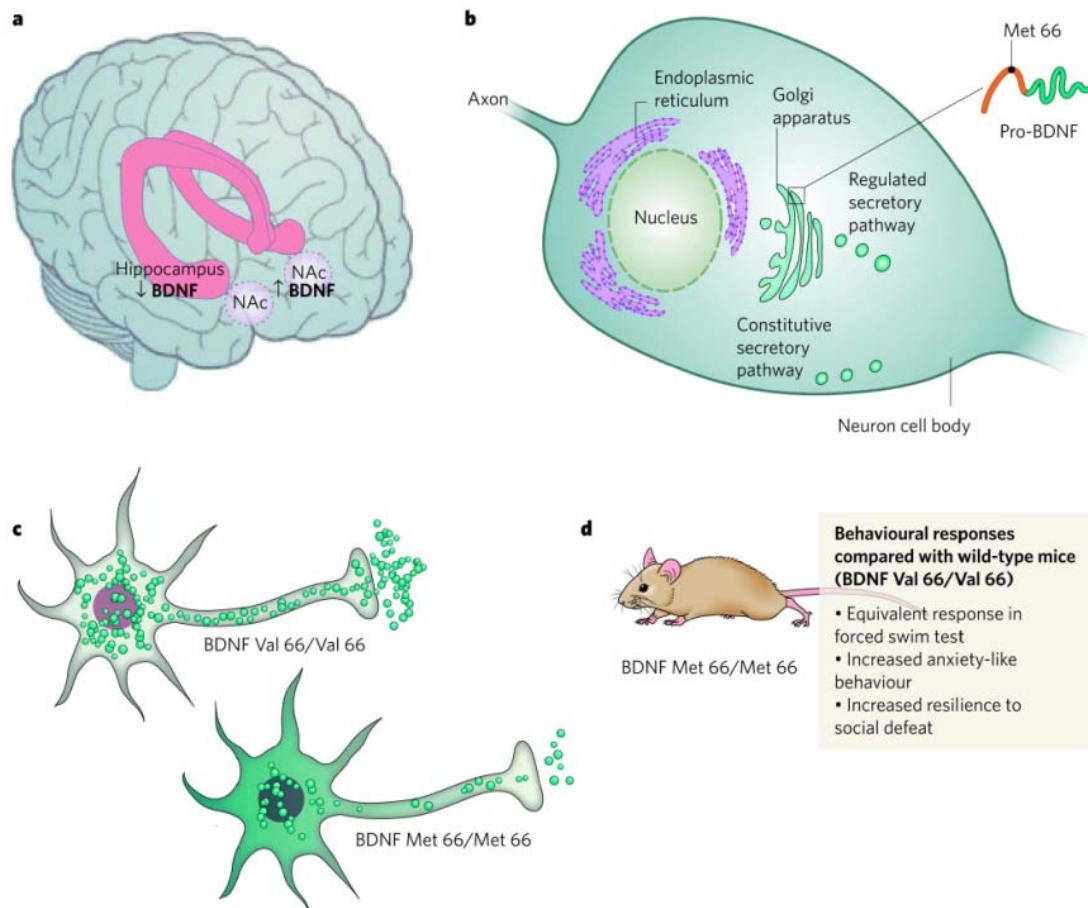
Η θεωρία αυτή υποστηρίζει ότι η κατάθλιψη απορρέει από τα μειωμένα επίπεδα των μονοαμινικών νευροδιαβιβαστών στον εγκέφαλο (Εικ. 31) (139,143–145). Στις μονοαμίνες περιλαμβάνονται η σεροτονίνη, η ντοπαμίνη, η νορεπινεφρίνη (και η επινεφρίνη). Η σεροτονίνη συνδέεται με το άγχος, τις εμμονές και τους ψυχαναγκασμούς. Η ντοπαμίνη με την προσοχή, την κινητοποίηση, τον ύπνο, την ευχαρίστηση και την ανταμοιβή. Και η νορεπινεφρίνη με την εγρήγορση, την ζωντάνια, την κόπωση, την απάθεια καθώς και με γνωστικές λειτουργίες.



Εικόνα 31. Η υπόθεση των μονοαμινών. Πηγή: <http://www.psychologywizard.net/biological-explanation-ao1-ao21.html>

8.7.3. Η νευροτροφική υπόθεση

Εδώ υποστηρίζεται ότι η μειωμένη διαθεσιμότητα νευροτροφικών παραγόντων περιορίζει την νευρογένεση στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου αλλά και την νευρωνική πλαστικότητα σε ολόκληρο τον εγκέφαλο (Εικ. 32) (139,146). Οι μελέτες που έχουν γίνει αφορούν κυρίως τον BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor). Η χρήση αντικαταθλιπτικών έχει σχετιστεί με αύξηση του BDNF και θεωρείται ότι έτσι αυξάνεται το δυναμικό της νευρογένεσης οπότε και τα κυκλώματα του ιπποκάμπου εμφανίζουν βελτιωμένη ικανότητα προσαρμογής και μάθησης στην εμφάνιση νέων εμπειριών.



Εικόνα 32. BDNF και κατάθλιψη. Πηγή: Krishan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression. Nature. 2008 Oct 16;455(7215):894–902.

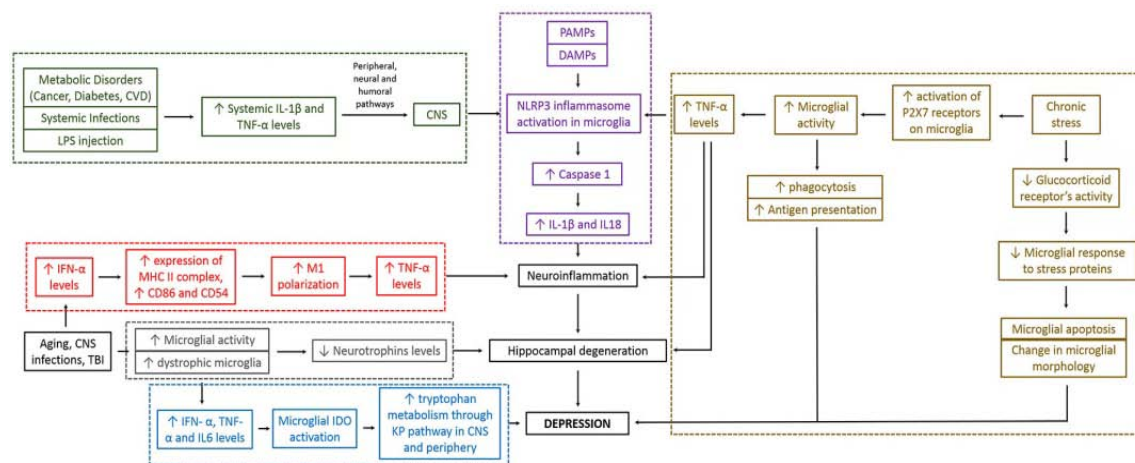
8.7.4. Η υπόθεση της νευροενδοκρινούς αλληλεπίδρασης

Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση τα καταθλιπτικά συμπτώματα είναι απόρροια της αλλαγής των επιπέδων των γλυκοκορτικοειδών, με τη μελαγχολική κατάθλιψη να συνδέεται με υπερκορτιζολαιμία, ενώ η άτυπη κατάθλιψη με υποκορτιζολαιμία (147).

8.7.5. Υποθέσεις που σχετίζονται με τη μικρογλοία

Όπως αναφέραμε οι υποθέσεις για το ποιο μοριακό μονοπάτι συνδέει τη μικρογλοία με την κατάθλιψη είναι πολλές και διασταυρώνονται μεταξύ τους (41). Κεντρικό σημείο επαφής φαίνεται να είναι η νευροφλεγμονή ή/και ο εκφυλισμός του ιπποκάμπου. Οι κυρίαρχες υποθέσεις παρουσιάζονται σχηματικά στην εικόνα 33, και είναι οι εξής: α) η υπόθεση της νευροφλεγμονής, β) η υπόθεση του φλεγμονοσώματος, γ) η υπόθεση της περιφερικής ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού, δ) η υπόθεση της μειωμένης ανοσίας, ε) η υπόθεση της τροποποίησης του μεταβολισμού της τρυπτοφάνης στον εγκέφαλο, στ) η υπόθεση της

μεταβολής των επιπέδων των νευροτροφινών BDNF και GDNF, ζ) η υπόθεση της μειωμένης της νευρογένεσης στον ιπόκαμπο. Συνοπτικά περιγράφονται παρακάτω.



Εικόνα 33. Σχηματική αναπαράσταση των διαφόρων υποθέσεων για την εμφάνιση κατάθλιψης που εμπλέκουν τη μικρογλοία και πως συγκλίνουν και αλληλοσυνδέονται. Όπως φαίνεται στο σχήμα, η μικρογλοία μπορεί να προκαλέσει κατάθλιψη μέσω διαφόρων μοριακών οδών. Αυτές οι μηχανιστικές οδοί σχηματίζουν ένα σύνθετο πλέγμα αλληλεπιδράσεων. [Κόκκινο: Μονοπάτι νευροφλεγμονής, Γκρι: Μονοπάτι νευροτροφινών και μειωμένης νευρογένεσης στον ιπόκαμπο, Μπλε: Μονοπάτι διαταραγμένου μεταβολισμού της τρυπτοφάνης, Πράσινο: Μονοπάτι περιφερικής ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού, Καφέ: Μονοπάτι ψυχολογικού/χρόνιου στρες και μειωμένης ανοσίας, Μοβ: Μονοπάτι φλεγμονοσώματος, Μαύρο: Σημεία σύγκλισης/ταύτισης των άλλων μονοπατιών]. (Συντομώσεις: IFN, interferon; TNF, tumor necrosis factor; IL, interleukin; P2X7, two-transmembrane ATP-gated ionotropic purinoreceptor; CVD, cardiovascular disease; LPS, lipopolysaccharide; PAMPs, pathogen-associated molecular patterns; DAMPs, damage-associated molecular patterns; CNS, central nervous system; TBI, traumatic brain injury; IDO, indoleamine 2, 3-dioxygenase enzyme; KP, kynurenine pathway) Πηγή: Singhal G, Baune BT. Microglia: An Interface between the Loss of Neuroplasticity and Depression. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:270.

8.7.5.1. Η υπόθεση της νευροφλεγμονής

Η υπόθεση της νευροφλεγμονής υποστηρίζει ότι δυσμενή ερεθίσματα, όπως το ψυχολογικό στρες, η γήρανση, οι μεταβολικές διαταραχές, οι εγκεφαλικοί τραυματισμοί ή οι λοιμώξεις, επάγουν την ενεργοποίηση της μικρογλοίας, την πόλωση της προς τον προφλεγμονώδη φαινότυπο M1 και την υπερέκφραση προφλεγμονωδών κυτοκινών. Αυτό οδηγεί στην ανάπτυξη νευροφλεγμονής στο ΚΝΣ

και στη διατάραξη της ομοιόστασης και των εγκεφαλικών λειτουργιών (41). Το αποτέλεσμα είναι η εμφάνιση μειωμένης διάθεσης, αϋπνίας, κόπωσης και διαταραχών της όρεξης (41,148).

Ερευνητικά δεδομένα που στηρίζουν αυτήν την υπόθεση είναι α) η ανίχνευση υψηλών επιπέδων των προφλεγμονωδών κυτοκινών TNF-a, IL-1b, IL-6 στο αίμα ασθενών διαγνωσμένων με κατάθλιψη (41,149), β) η αύξηση των επιπέδων νευρογένεσης και η βελτίωση των καταθλιπτικών συμπτωμάτων με τη χορήγηση μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων, όπως το Indomethacin και Ibuprofen, γ) η αναστολή του πολλαπλασιασμού και της ενεργοποίησης της μικρογλοίας, η μείωση των επιπέδων των προφλεγμονωδών κυτοκινών και η βελτίωση των καταθλιπτικών συμπτωμάτων με τη χορήγηση αντικαταθλιπτικών φαρμάκων, όπως η ιμιπραμίνη και η μινοκυκλίνη (41).

8.7.5.2. Η υπόθεση του φλεγμονοσώματος

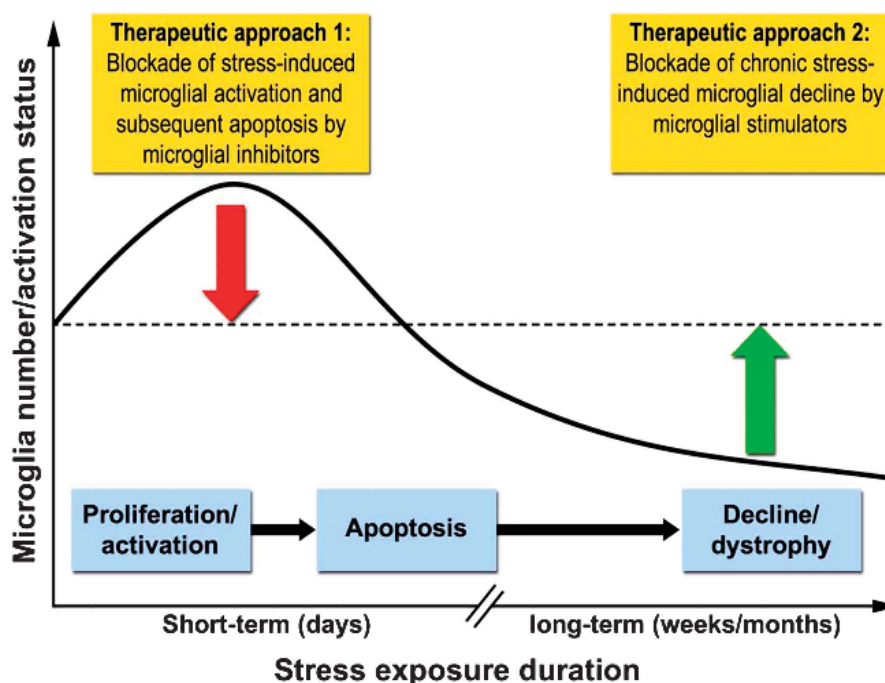
Η υπόθεση του φλεγμονοσώματος, υποστηρίζει ότι η μικρογλοία παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των φλεγμονοσωμάτων (41). Τα φλεγμονοσώματα είναι κυτταροπλασματικά σύμπλοκα πρωτεϊνών που όταν συγκροτούνται ενεργοποιούνται από PAMPs and DAMPs και εντείνουν την ενεργοποίηση των προφλεγμονωδών κασπασών, ιδιαίτερα της κασπάσης 1. Η κασπάση 1 μετατρέπει τις κυτοκίνες IL-1b, IL-18 και IL-33 στην ενεργή τους μορφή, εντείνοντας έτσι τη νευροφλεγμονή. Η μικρογλία συμμετέχει α) μέσω των PRR (pattern recognition receptor) υποδοχέων της, TLR και NLR, προσδένοντας PAMPs and DAMPs και β) μέσω των πουρινεργικών υποδοχέων P2X7 που ενεργοποιούνται από το στρες και ενεργοποιούν με τη σειρά τους κυρίως το φλεγμονόσωμα NLRP3. Ερευνητικά δεδομένα που υποστηρίζουν αυτή την υπόθεση είναι ότι το αντικαταθλιπτικό φλουοξετίνη και η χρυσοφανόλη βελτιώνουν τα καταθλιπτικά συμπτώματα αναστέλλοντας το φλεγμονόσωμα NLRP3 (41).

8.7.5.3. Η υπόθεση της περιφερικής ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού

Η υπόθεση της περιφερικής ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού υποστηρίζει ότι τα αυξημένα επίπεδα προφλεγμονωδών κυτοκινών και πρωτεϊνών οξείας φάσης στην περιφέρεια και στο ΚΝΣ στην περίπτωση χρόνιων φλεγμονωδών νόσων (καρκίνος, διαβήτης, οστεοαρθρίτιδα) ή χρόνιου στρες ενεργοποιούν τη μικρογλοία και οδηγούν στην εμφάνιση καταθλιπτικών συμπτωμάτων (41,136).

8.7.5.4. Η υπόθεση της μειωμένης ανοσίας μετά από χρόνια στρες

Η υπόθεση της μειωμένης ανοσίας μετά από χρόνια στρες (π.χ. μοντέλο χρόνιο υαπρόβλεπτο ήπιο στρες) υποστηρίζει ότι ενώ το οξύ στρες ενεργοποιεί τη μικρογλοία, το χρόνια οδηγεί στη σταδιακή εξάντληση-γήρανση της και τελικά στον αποπτωτικό θάνατό της (Εικ. 34). Έτσι η ανοσία του ΚΝΣ μειώνεται καθώς έχουμε ελάττωση του αριθμού των μικρογλοιακών κυττάρων, δυστροφία και μείωση των εκφραζόμενων πρωτεϊνικών παραγόντων (41,103). Μία ερμηνεία για αυτό το φαινόμενο είναι η αρνητική ρύθμιση των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών που προκαλεί η χρόνια έντονη έκκριση γλυκοκορτικοειδών και των α - και β -αδρενεργικών υποδοχέων από την νορεπινεφρίνη (41).



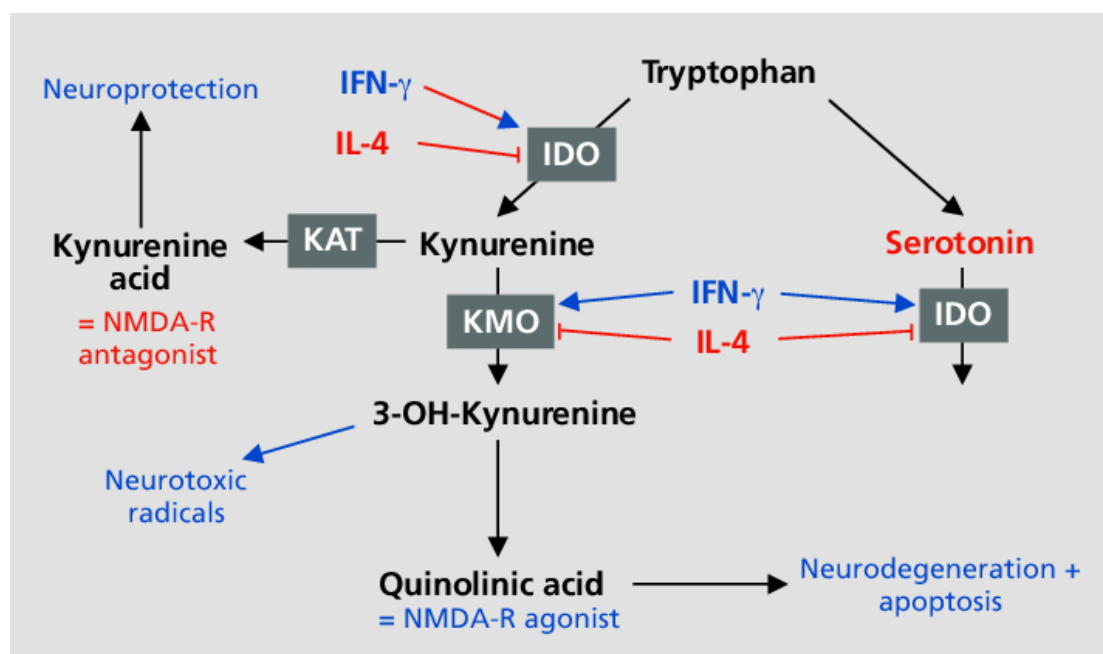
Εικόνα 34. Αλλαγές στη μικρογλοία σε σχέση με τη χρονιότητα του στρες. Πηγή: Kreisel T, Frank MG, Licht T, Reshef R, Ben-Menachem-Zidon O, Baratta MV, et al. Dynamic microglial alterations underlie stress-induced depressive-like behavior and suppressed neurogenesis. Mol Psychiatry. 2014 Jun;19(6):699–709.

Αυτή η επίδραση του χρόνιου στρες φαίνεται να εξαρτάται από την εγκεφαλική περιοχή και από άλλους παράγοντες, καθώς αρκετά πειράματα που μελετούν τον ιππόκαμπο, την αμυγδαλή, τον προμετωπιαίο φλοιό ή τον επικλινή πυρήνα δείχνουν ότι το χρόνια στρες οδηγεί σε ενεργοποίηση της μικρογλοίας και σε υπερδιακλαδισμένο φαινότυπο (41,150).

Ερευνητικά δεδομένα που υποστηρίζουν αυτήν την υπόθεση είναι ότι η χρόνια χορήγηση του αντικαταθλιπτικού βενλαφαξίνη (venlafaxine) επανέφερε τη φυσιολογική μορφολογία της μικρογλοίας και βελτίωσε τα καταθλιπτικά συμπτώματα (41,150), και ότι η χορήγηση μινουκυκλίνης και ιμιπραμίνης κατά την έκθεση σε χρόνια στρες, απέτρεψε την απόπτωση της και τη μορφολογική έκπτωση της μικρογλοίας και την εμφάνιση καταθλιπτικών συμπτωμάτων (41,103).

8.7.5.5. Η υπόθεση της τροποποίησης του μεταβολισμού της τρυπτοφάνης στον εγκέφαλο

Η υπόθεση της τροποποίησης του μεταβολισμού της τρυπτοφάνης στον εγκέφαλο υποστηρίζει ότι το στρες ή η φλεγμονή, μέσω προφλεγμονωδών κυτοκινών (π.χ. IL-6, TNFα, IFN-γ) ή βακτηριακών και ιικών πρωτεϊνών κ.ά., προκαλεί την ενεργοποίηση του ενζύμου IDO (indoleamine 2, 3-dioxygenase) της μικρογλοίας και την έναρξη του μονοπατιού της κινουρενίνης (kynurenine pathway, KP). Έτσι διαταράσσεται η μεταφορά και ο μεταβολισμός της τρυπτοφάνης στον εγκέφαλο και επηρεάζεται η παραγωγή της σεροτονίνης και η παραγωγή κυνολινικού οξέως (αγωνιστής των γλουταμινικών NMDA υποδοχέων) και κινουρενικού οξέως (ανταγωνιστής των γλουταμινικών NMDA υποδοχέων) (Εικ. 35) (41,151).



Εικόνα 35. Νευροανοσολογικές αλληλεπιδράσεις των ενδιάμεσων μεταβολιτών του μονοπατιού της κινουρενίνης. Πηγή: Müller N, Myint A-M, Schwarz MJ. The impact of neuroimmune dysregulation on neuroprotection and neurotoxicity in psychiatric disorders--relation to drug treatment. Dialogues Clin Neurosci. 2009;11(3):319–32.

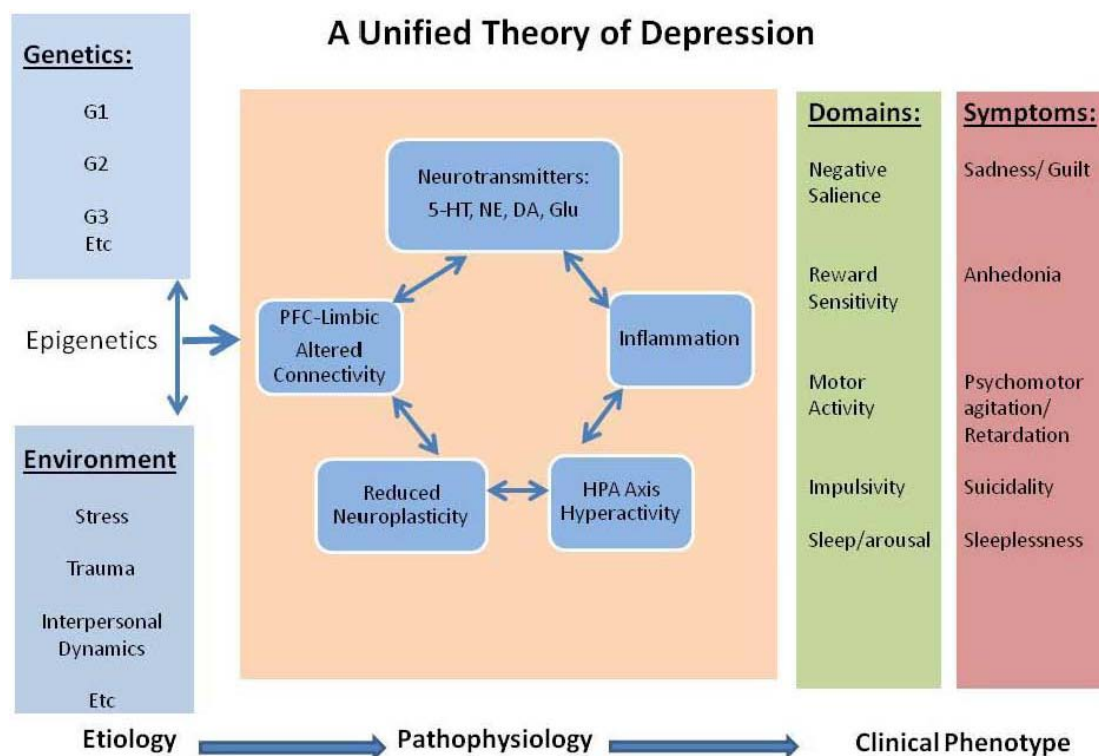
8.7.5.6. *Η υπόθεση της μεταβολής των επιπέδων των νευροτροφινών BDNF και GDNF*
 Η υπόθεση της μεταβολής των επιπέδων των νευροτροφινών υποστηρίζει ότι η γήρανση της μικρογλοίας, ο δυστροφικός φαινότυπος ή η μείωση του πληθυσμού της οδηγεί στη μειωμένη παραγωγή των νευροτροφινών BDNF και GDNF και ακολούθως σε ελάττωση της νευρογένεσης στον ιππόκαμπο, της διακλάδωσης των δενδριτικών απολήξεων και της νευροπλαστικότητας συνολικά. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την έναρξη ή επιδείνωση των καταθλιπτικών συμπτωμάτων (41).

8.7.5.7. *Η υπόθεση της μειωμένης νευρογένεσης στον ιππόκαμπο*

Η υπόθεση της μειωμένης της νευρογένεσης στον ιππόκαμπο υποστηρίζει ότι η ενεργοποίηση της μικρογλοίας υπό συνθήκες στρες ή φλεγμονής καταστέλλει τη νευρογένεση και την επιβίωση των νεογέννητων νευρώνων στον ιππόκαμπο μέσω διαφόρων εκκρινόμενων παραγόντων (41).

8.7.6. Ενοποιημένη θεωρία

Η θεωρία αυτή ουσιαστικά υποστηρίζει ότι κατά περίπτωση μπορεί να ισχύει οποιαδήποτε από τις προαναφερθείσες υποθέσεις και ότι μόνο η σύνθεσή τους μπορεί να δώσει μια ολοκληρωμένη ερμηνεία για το σύνδρομο της κατάθλιψης (Εικ.36) (139).



Εικόνα 36. Η ενοποιημένη θεωρία της κατάθλιψης. Πηγή: Dean J, Keshavan M. The neurobiology of depression: An integrated view. Asian J Psychiatry. 2017 Jun;27:101–11.

8.8. Ζωικά πειραματικά μοντέλα μελέτης της κατάθλιψης

Ως ζωικό πειραματικό μοντέλο μίας ασθένειας ορίζεται ο πειραματικός σχεδιασμός όπου τα συμμετέχοντα πειραματόζωα α) εμφανίζουν σημαντική ομοιότητα σε ανατομικό, φυσιολογικό ή συμπεριφορικό επίπεδο με την ανθρώπινη κατάσταση, β) ομοιάζουν ως προς τους εκλυτικούς παράγοντες ή γ) ως προς την απόκριση σε θεραπευτικές παρεμβάσεις.

Τα ζωικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται ερευνητικά στη μελέτη της κατάθλιψης είναι μοντέλα έκθεσης σε στρες, με πιο ισχυρή εγκυρότητα να υπάρχει όταν το στρες είναι χρόνιο ή χωρίς δυνατότητα διαφυγής(125).

8.8.1. Στοιχεία εγκυρότητας των ζωικών πειραματικών μοντέλων

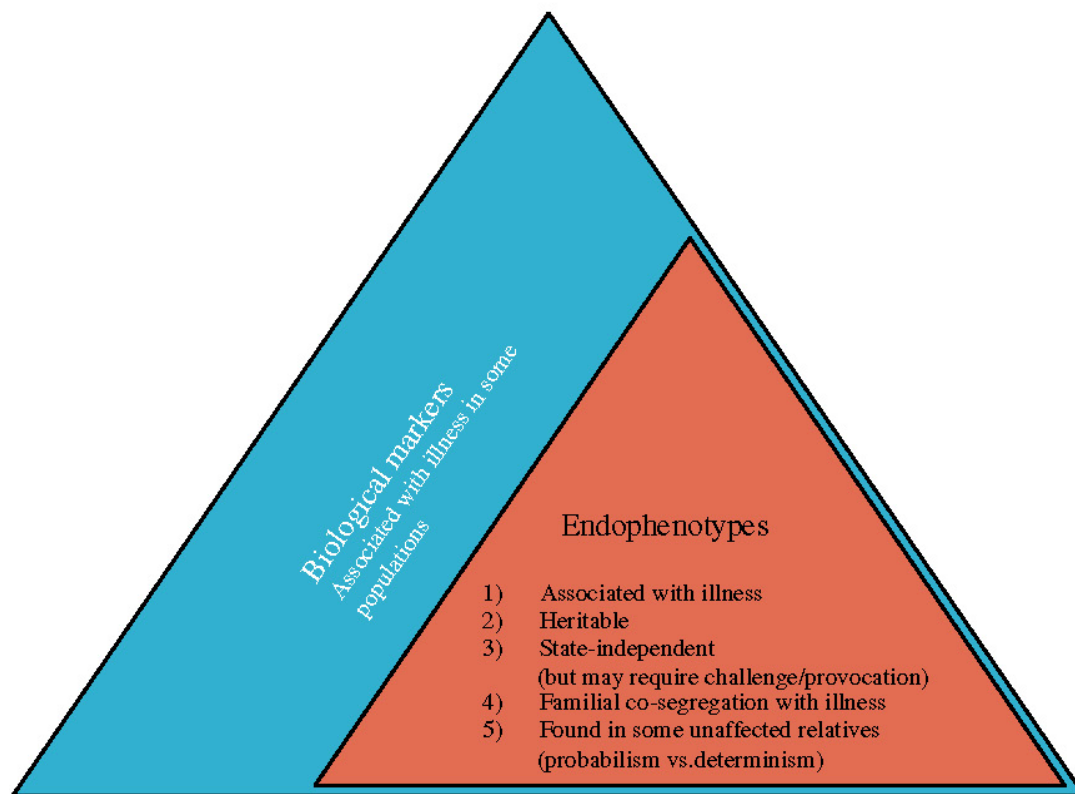
Τα στοιχεία από τα οποία αξιολογείται η εγκυρότητα ενός μοντέλου είναι: α) η αιτιολογική εγκυρότητα (Construct or etiologic validity), β) η φαινοτυπική εγκυρότητα (Face validity) και γ) η προγνωστική εγκυρότητα (Predictive or pharmacological validity) (73,136,152).

- Η αιτιολογική εγκυρότητα αφορά την ομοιότητα του μοντέλου με τον παθογενετικό μηχανισμό της ασθένειας· απαντάει δηλαδή στο ερώτημα εάν ο μηχανισμός που μελετάμε είναι ο ίδιος που προκαλεί την ασθένεια στον άνθρωπο (73,136,152).
- Η φαινοτυπική εγκυρότητα αφορά το κατά πόσον το μοντέλο αναπαραγάγει επιτυχώς τα ανατομικά, βιοχημικά, παθολογικά ή συμπεριφορικά στοιχεία της ανθρώπινης ασθένειας που μελετάται. Απαντάει δηλαδή στο ερώτημα αν το αποτέλεσμα-φαινότυπος των ζώων του μοντέλου μοιάζει ή αναλογεί σε αυτόν του ανθρώπου (73,136,152).
- Η προγνωστική εγκυρότητα αφορά το κατά πόσον η απόκριση των ζώων του μοντέλου σε φαρμακευτική παρέμβαση θα είναι ίδια με την απόκριση του ανθρώπου. Απαντά δηλαδή στο ερώτημα εάν η απόκριση του ζώου μπορεί να προβλέψει την απόκριση του ανθρώπου στη μελετώμενη θεραπευτική παρέμβαση (73,136,152).

8.8.2. Ενδοφαινότυποι κοινοί μεταξύ ανθρώπων και ζωικών πειραματικών μοντέλων κατάθλιψης

Ενδοφαινότυπους ονομάζουμε στην νευροψυχιατρική τα διακριτά και ποσοτικοποιήσιμα στοιχεία τα οποία συνιστούν το ψυχιατρικό σύνδρομο και αφορούν από γονίδια μέχρι τη συμπεριφορά (153). Συνεπώς μπορεί να είναι γενετικά,

βιοχημικά, ενδοκρινολογικά, νευροανατομικά, γνωστικά ή νευροψυχολογικά χαρακτηριστικά.



Εικόνα 37. Σχέση βιοδεικτών και ενδοφαινότυπων στις νευροψυχιατρικές διαταραχές. Πηγή: Gould TD, Gottesman II. Psychiatric endophenotypes and the development of valid animal models. *Genes Brain Behav.* 2006 Mar;5(2):113–9.

Τα χαρακτηριστικά ενός ενδοφαινότυπου είναι ότι (Εικ. 37) (153):

1. Σχετίζεται με το ψυχιατρικό σύνδρομο στον ανθρώπινο πληθυσμό
2. Είναι κληρονομήσιμος
3. Διατηρείται στον ασθενή ακόμη και όταν δεν είναι σε κρίση, αλλά μπορεί να επαχθεί η εμφάνιση του με τη χρήση κάποιας δοκιμασίας (π.χ. κρίση πανικού)
4. Η συχνότητα της έντασης του και της εμφάνισης της νόσου συγκλίνουν
5. Όταν μελετώνται συγγενείς ασθενών βρίσκεται σε μεγαλύτερη συχνότητα σε αυτούς σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό

Στην περίπτωση της κατάθλιψης οι ενδοφαινότυποι που αξιοποιούνται στα ζωικά της μοντέλα περιγράφονται στον πίνακα 6 (73,136,152).

Πίνακας 6. Καταθλιπτικόμορφοι ενδοφαινότυποι στα τρωκτικά

Καταθλιπτικόμορφοι ενδοφαινότυποι στα τρωκτικά	
Τύπος	Περιγραφή
Ανηδονία	Αδυναμία απόλαυσης των εμπειριών
Διαταραχές της όρεξης	Μείωση ή αύξηση της προσλαμβανόμενης τροφής με αντίστοιχη μείωση ή αύξηση του βάρους
Διαταραχές του ύπνου	Μείωση ή αύξηση των συνολικών ωρών ύπνου μέσα στην ημέρα ή απόκλιση από το φυσιολογικό πρότυπο ύπνου (διακεκομμένος ύπνος, ύπνος κατά τη διάρκεια της ημέρας)
Απελπισία (Behavioral despair)	Τάση παράδοσης μπροστά σε προκλήσεις. Απουσία προσπάθειας ή γρήγορη απόσυρση από την προσπάθεια
Αγχώδεις συμπεριφορές	Αυξημένος φόβος στο νεοτερισμό, δειλία, μειωμένη εξερευνητικότητα

Endophenotypes Common to Humans and Animal Models of Depression

Anhedonia
Anhedonia, defined as the inability to experience pleasure, is evaluated in rodents using the sucrose-preference test and the intracranial self-stimulation test.

Appetite and sleep dysregulation
Changes in appetite can be easily assessed in experimental animals by quantifying food intake and body weight, while sleep abnormalities can be measured using electroencephalographic recordings.

Behavioral despair
Behavioral despair is the tendency of an individual to view their circumstances as immutable and to cease trying to control the outcome. It can be screened for in animals using the tail suspension test and the forced swim test.




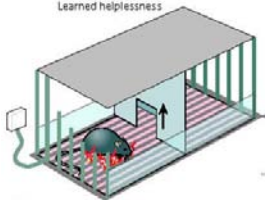

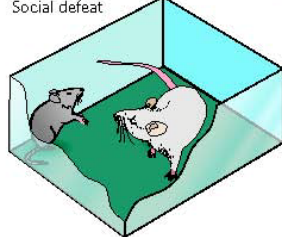

Anxiety-related behaviors
It assesses the tendency of an animal to explore brightly lit, novel environments. The open field test consists of a circular open field with walls. It can be evaluated using: the light/dark box, elevated plus maze, elevated zero maze, e.t.c.

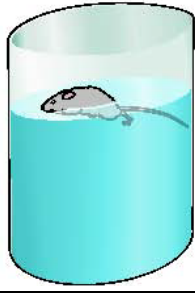
Πηγή: mazeengineers.com/animal-models-of-depression

8.8.3. Ζωικά πειραματικά μοντέλα μελέτης της κατάθλιψης

Τα ζωικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται στη μελέτη της κατάθλιψης διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: Σε αυτά που χρησιμοποιούνται για την επαγωγή καταθλιπτικόμορφου φαινοτύπου και σε αυτά που χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση του. Συνοπτικά περιγράφονται στον πίνακα 7 (73,136,152).

Πίνακας 7. Ζωικά πειραματικά μοντέλα μελέτης της κατάθλιψης

Ζωικά πειραματικά μοντέλα για τη μελέτη της κατάθλιψης			
Μοντέλα πρόκλησης καταθλιπτικόμορφου φαινότυπου στα τρωκτικά			
Μοντέλο	Σύντομη περιγραφή	Σχόλια	Είδος στρες
Μητρικός αποχωρισμός/ αποστέρηση (Maternal Separation/ Deprivation) 	Απομάκρυνση του νεογνού από τη μητέρα για μικρότερα ή μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, πριν τον απογαλακτισμό (Μεταγεννητική ημέρα 21)	Αλλαγή της αντιδραστικότητας του ζώου στο στρες και αύξηση της ευαλωτότητας του σε επόμενη έκθεση κατά την ενήλικη ζωή	Συναισθηματικό (οξύ ή χρόνιο)
Περιβάλλον διαμονής (Home environment) 	Αλλαγές στο περιβάλλον διαμονής που αφορούν το μέγεθος και το υπόστρωμα του κλουβιού, ο εμπλουτισμός του περιβάλλοντος, η πρόσβαση σε άσκηση, η παρουσία ή όχι και το πλήθος των "συγκατοίκων".	Αλλαγή των φυσιολογικών επιπέδων στρες του ζώου (basal stress levels) και της ευαλωτότητας του σε επόμενη έκθεση	Περιβαλλοντικό / Συναισθηματικό
Οξύ στρες (Acute stress) 	Μία μόνο φορά έκθεση σε έντονο στρες. Learned helplessness 		Σωματικό
Χρόνιο στρες (Chronic stress) 	Επαναλαμβανόμενη έκθεση σε ήπιο ή μέτριας έντασης στρες για μεγάλο χρονικό διάστημα. Social defeat 	Το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο μοντέλο για πρόκληση καταθλιπτικόμορφου φαινότυπου	Συναισθηματικό/ Σωματικό
Γενετικοί παράγοντες (Genetic factors)	Knock-out γονιδίων που ενοχοποιούνται για την εμφάνιση κατάθλιψης.		

Μοντέλα μέτρησης/εκτίμησης του καταθλιπτικούμορφου φαινοτύπου στα τρωκτικά			
Μοντέλο	Περιγραφή	Ερμηνεία	Εγκυρότητα
Δοκιμασία εξαναγκασμένη κολύμβησης (Forced Swim Test) 	<p>Το πειραματόζωο τοποθετείται εντός κυλίνδρου με νερό σε θερμοκρασία δωματίου. Αφήνεται για 2 λεπτά να εξοικειωθεί, και στη συνέχεια επί 4 λεπτά καταγράφεται ο χρόνος ακινησίας (immobility), οι προσπάθειες εξόδου (struggling) και οι φορές αφόδευση.</p>	<p>Υψηλός χρόνος ακινησίας θεωρείται ότι αντιπροσωπεύει "συμπεριφορική απελπισία"</p>	<p>Προγνωστική</p>
Δοκιμασία νεοτερικότητας και καταστολής της λήψης τροφής (Novelty-Suppressed Feeding)	<p>Μετά από περίοδο περιορισμένης πρόσληψης τροφής, το ζώο τοποθετείται σε ένα νέο περιβάλλον (πειραματική διάταξη) και ένα κομμάτι τροφής τοποθετείται στο μέσον της πειραματικής διάταξης. Καταμετράται ο χρόνος που θα κάνει μέχρι να ξεκινήσει να τρώει την τροφή.</p>	<p>Υψηλός χρόνος μέχρι την έναρξη κατανάλωσης της τροφής θεωρείται ότι αντιπροσωπεύει υψηλά επίπεδα στρες</p>	<p>Φαινοτυπική Προγνωστική</p>
Δοκιμασία προτίμησης σουκρόζης (Sucrose Preference Test)	<p>Στο πειραματόζωο παρέχεται η δυνατότητα να πιεί απλό νερό ή νερό που περιέχει σουκρόζη. Καταμετράται η ποσότητα που ήπια από το κάθε υγρό.</p>	<p>Χαμηλή κατανάλωση νερού με σουκρόζη θεωρείται ότι αντιπροσωπεύει ένα ανηδονικό ζώο.</p>	<p>Αιτιολογική Φαινοτυπική Προγνωστική</p>
Δοκιμασία αιώρησης από την ουρά (Tail Suspension Test)	<p>Το πειραματόζωο (μυς) κρεμάται ανάποδα από την ουρά από μία σταθερή δοκό. Καταμετράται ο χρόνος ακινησίας σε αντίθεση με το χρόνο προσπάθειας να απελευθερωθεί.</p>	<p>Υψηλός χρόνος ακινησίας σε σχέση με το χρόνο προσπάθειας να απελευθερωθεί θεωρείται ότι αντιπροσωπεύει "συμπεριφορική απελπισία"</p>	<p>Προγνωστική</p>

Πηγή: mazeengineers.com/depression-testing-in-rodents. Φωτογραφίες: mazeengineers.com/depression-testing-in-rodents, Krishnan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression. Nature. 2008 Oct 16;455(7215):894–902,

B. ΣΤΟΧΟΙ

9. Στόχοι έρευνας

Την τελευταία δεκαετία σημαντικό μέρος των μελετών που ασχολούνται με την επίδραση του στρες στον οργανισμό αφορούν τη διερεύνηση της αλληλεπίδρασης νευρικού και ανοσοποιητικού συστήματος εντός του ΚΝΣ, με κύριο διαμεσολαβητή τα κύτταρα της μικρογλοίας. Το πεδίο αυτό εκτός από νέο, με αρκετά αδιερεύνητα στοιχεία και πλούσιες δυνατότητες σχεδιασμού πειραμάτων, φαίνεται να έρχεται να συμπληρώσει με έναν κρίσιμο τρόπο το σύνθετο πλέγμα των οδών που συνδέουν το περιβάλλον και τις εμπειρίες με τις επιδράσεις στο ΚΝΣ όπως αυτές καταγράφονται σε μοριακό επίπεδο. Ιδιαίτερος δε, όταν η αξιοποίηση της γνώσης αυτής γίνεται προς την αποκρυπτογράφηση και κατανόηση της νευροβιολογίας των ψυχικών διαταραχών και νόσων· ένα δεύτερο πεδίο με πλήθος αναπάντητων ερωτημάτων.

Πάνω σε αυτή τη βάση της προσφορότητας για νεοτερισμό και του συντονισμού με τις πλέον σύγχρονες τάσεις στην επιστήμη του στρες, επιλέχθηκε να χαρτογραφηθεί το πρότυπο ενεργοποίησης της μικρογλοίας στις τρεις πιο κομβικές περιοχές που εμπλέκονται στον μηχανισμό επίδρασης του ψυχολογικού στρες στην παθοφυσιολογία της κατάθλιψης. Οι περιοχές αυτές είναι το εσωτερικό τμήμα (hilus) της οδοντωτής έλικας (dentate gyrus, DG) του ιπποκάμπου, ο κεντρικός πυρήνας της αμυγδαλής (central amygdaloid nucleus, Ce) και ο έσω κογχομετωπιαίος φλοιός του προμετωπιαίου φλοιού (medial orbital cortex, MO).

Ως φορείς στρες χρησιμοποιήθηκαν δύο στρεσογόνοι παράγοντες σημαντικού κοινωνικού ενδιαφέροντος. Στα ενήλικα ζώα χρησιμοποιήθηκε το χρόνιο στρες κοινωνικής ήττας. Στα νεογνά χρησιμοποιήθηκε ένα μοντέλο πρώιμων μεταγεννητικών στρεγονόνων εμπειριών το οποίο βασίζεται στην παρεμπόδιση της ανταμοιβής μέσω της μητρικής επαφής (Denial of Expected Reward, DER-Μοντέλο νεογνικής παραμέλησης) (Για την αναλυτική περιγραφή του βλ. κεφ. 1 02.) Η δοκιμασία αυτή, φαίνεται να επιδρά ως ένα γεγονός ήπιας συναισθηματικής αντιξοότητας και να επηρεάζει διάφορα νευροδιαβιβαστικά συστήματα του εγκεφάλου, όπως το ντοπαμινεργικό και το σεροτονινεργικό σύστημα (154–156). Σε προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριο μας τα πειραματόζωα που εκπαιδεύτηκαν με συνεχόμενη ματαίωση (DER), ως νεογνά είχαν αυξημένη πυκνότητα μικρογλοιακών κυττάρων, στην περιοχή του έσω κογχομετωπιαίου/υπομεταιχμιακού φλοιού (MO/IL) (157) και ως ενήλικα εμφάνιζαν ανηδονία (μειωμένη προτίμηση για διάλυμα

σουκρόζης), ένα από τα κυρίαρχα συμπτώματα της κατάθλιψης στον άνθρωπο. Επίσης εφαρμόστηκε και το αντίστροφο αυτού του μοπέλο η εμπειρία RER (receiving the expected reward) όπου τα νεογνά είχαν λήψη ανταμοιβής.

Τα μοντέλα αυτά εφαρμόστηκαν το καθένα σε ξεχωριστά ζώα αλλά και συνδυαστικά, ώστε να μελετηθεί η αυτόνομη επίδραση τους στη μικρογλοία αλλά να ελεγχθεί και η "Υπόθεση των δύο χτυπημάτων" ("Two-hit hypothesis").

Συνεπώς σχεδιάστηκαν έξι ομάδες ζώων, τα ενήλικα ζώα που ως νεογνά είχαν εκτεθεί στην εμπειρία της νεογνικής παραμέλησης χωρίς λήψη ανταμοιβής, με λήψη ανταμοιβής και οι μάρτυρες είτε α) υπό βασικές συνθήκες είτε β) μετά από έκθεση σε χρόνιο στρες κοινωνικής ήττας κατά την ενήλικη ζωή.

9.1. Πρωτογενείς στόχοι

Οι πρωτογενείς στόχοι της μελέτης αυτής ήταν καταρχήν η καταγραφή της σχέσης της έκθεσης σε στρες στα πρώιμα μεταγεννητικά στάδια με μεταβολές στο πλήθος των ενεργοποιημένων κυττάρων μικρογλοίας, όπως αποτυπώνεται μέσω της εφαρμογής της μεθόδου του ανοσοφθορισμού με χρήση του μικρογλοιακού πρωτεϊνικού δείκτη Iba-1 και παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού. Κατά δεύτερον ήταν ο έλεγχος της "Υπόθεσης των δύο χτυπημάτων", μέσω της σύγκρισης του πλήθους των ενεργοποιημένων κυττάρων μικρογλοίας μεταξύ των ζώων που είχαν α) αρνητική (DER), β) θετική (RER) ή γ) καμία (CTRL) εξωγενή πρόωμη εμπειρία με (stressed) ή χωρίς (basal) έκθεση σε στρες κατά την ενήλικη ζωή.

Από τους διάφορους συνδυασμούς των πρώιμων και ενήλικων εμπειριών ο στόχος ήταν να διερευνήσουμε αν η ποιότητα των πρώιμων εμπειριών προκαλεί σταθερές αλλαγές στο ΚΝΣ, που διατηρούνται στην ενήλικη ζωή και αν επηρεάζουν τις επιπτώσεις που έχει μία επόμενη στρεσογόνα εμπειρία στον οργανισμό και ακολούθως την ευαλωτότητα του στην εμφάνιση κάποιας νευροψυχιατρικής διαταραχής.

9.2 Δευτερογενείς στόχοι

Οι δευτερογενείς στόχοι αφορούν τη συνεισφορά στην επιστήμη τους στρες μέσω της προσπάθειας διαλεύκανσης του μηχανισμού έναρξης, εγκατάστασης και εξέλιξης των νευροψυχιατρικών διαταραχών, με έμφαση στην κατάθλιψη, εξ ου και η επιλογή των συγκεκριμένων τριών εγκεφαλικών περιοχών. Διαλέγοντας συγχρόνως δύο στρεσογόνες συνθήκες κρίσιμης σημασίας για τους ανθρώπους, όπως ο μητρικός δεσμός και η κοινωνική επαφή, αλλά και την αλληλουχία τους που έχει φανεί να επηρεάζει καθοριστικά την ευρωστία του ατόμου.

Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

10. Σχεδιασμός έρευνας

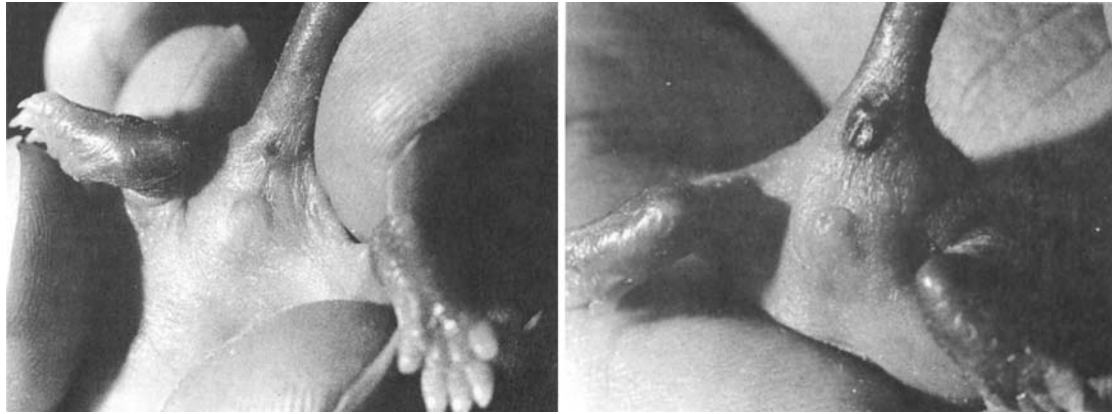
10.1. Πειραματόζωα

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν αρουραίοι (επίμυες) Wistar, ένα αλφικό στέλεχος του είδους *Rattus norvegicus* που χρησιμοποιείται ευρέως ως πειραματόζωο (Εικ. 38) (158).



Εικόνα 38. Επίμυες του στελέχους Wistar. Πηγή: www.janvier-labs.com/actualites/news-detail/items/1221.html

Τα ζώα αναπαράχθηκαν και μεγάλωσαν στο εκτροφείο του εργαστηρίου Βιολογίας-Βιοχημείας της Σχολής Επιστημών Υγείας του ΕΚΠΑ, υπό βασικές συνθήκες διαβίωσης (23 ± 1 C, 12:12 h φωτεινός/σκοτεινός κύκλος) με τροφή (Kounker-Keramari Bros. & Co., Athens, Greece) και νερό *ad libitum*. Η ημέρα της γέννηση ορίστηκε ως PND0 (postnatal day 0) Από τα νεογνά της κάθε γέννας αναγνωρίστηκαν τα αρσενικά βάσει της απουσίας ίχνους θηλών και της μεγαλύτερης σε σχέση με τα θηλυκά ουρογεννητικής απόστασης (Εικ. 39) (159) και κατανεμήθηκαν τυχαία στις διαφορετικές κατηγορίες.



Εικόνα 39. Στοιχεία αναγνώρισης του φύλου στους αρουραίους. Πηγή: Valle FP, Allen DB. Sex-typing newborn rats: An improved procedure with Agouti strains. Behav Res Methods Instrum. 1970 Jul 1;2(4):205–6.

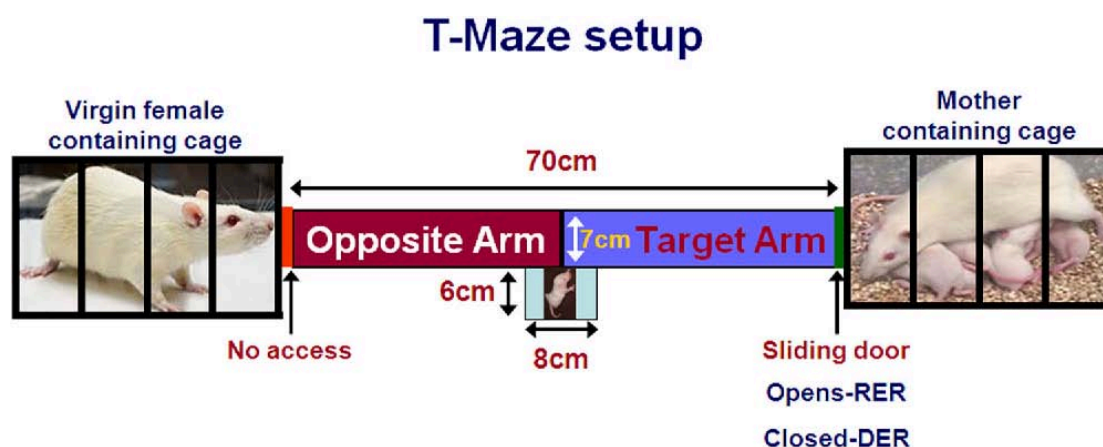
Έγινε τυχαιοποίηση των ζώων της κάθε γέννας για την απόδοση στις διάφορες κατηγορίες με σκοπό την εξάλειψη της «πίπτωσης της γέννας» και σε συγχρονισμένες γέννες τα νεογνά αναμίχθηκαν και ανακατανεμήθηκαν στις διάφορες μητέρες με σκοπό την εξάλειψη της «επίπτωσης της φωλιάς» (160).

Καθ' όλη τη διάρκεια του θηλασμού, προστίθετο φρέσκο ροκανίδι κάθε 4-5 μέρες, χωρίς να διαταράσσονται τα νεογνά. Κατά την μεταγεννητική ημέρα 22 (PND22), τα νεογνά απογαλακτίστηκαν και μεταφέρθηκαν ανά 3-4 στο κάθε κλουβί, με μέλη του ίδιου φύλου και της ίδιας πειραματικής ομάδας. Μετά τον απογαλακτισμό, τα κλουβιά καθαρίζονταν εβδομαδιαία από τους πειραματιστές, με την λιγότερη δυνατή διατάραξη των ζώων (157)

Οι δύο βασικές πειραματικές κατηγορίες ήταν οι: α) Stressed, όπου τα ζώα εκτέθηκαν ως ενήλικα στη δοκιμασία χρόνιας κοινωνικής ήττας (chronic social defeat, CSD) (βλ. κεφ. 6) και β) Basal, όπου δεν εκτέθηκαν σε στρεσογόνο ερέθισμα κατά την ενήλικη ζωή. Σε κάθε κατηγορία υπήρχαν τρεις υποκατηγορίες: α) DER (denied the expected reward), όπου τα νεογνά εκπαιδεύτηκαν σε λαβύρινθο σχήματος T υπό συνθήκες άρνησης ανταμοιβής, β) RER (receiving the expected reward), όπου τα νεογνά εκπαιδεύτηκαν σε λαβύρινθο σχήματος T υπό συνθήκες λήψης ανταμοιβής, γ) Control, όπου δεν έγινε καμία παρέμβαση στα νεογνά. Σε κάθε υποκατηγορία κατανεμήθηκαν 6-8 ζώα και ο συνολικός αριθμός των ζώων που θυσιάστηκαν τελικά, σε ηλικία ~140-150 ημερών, ήταν 41. Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν σύμφωνα με τις ηθικές υποδείξεις της ντιρεκτίβας του Συμβουλίου της Ευρωπαϊκής Ένωσης της 22ας Σεπτεμβρίου 2010 (2010/63/EU) (161). Δόθηκε κάθε δυνατή προσπάθεια ώστε να ελαχιστοποιηθεί η ταλαιπωρία των πειραματόζωων.

10.2. Νεογνική εκπαίδευση σε λαβύρινθο σχήματος T υπό συνθήκες άρνησης ανταμοιβής

Στο εργαστήριο Βιολογίας-Βιοχημείας της Σχολής Επιστημών Υγείας του ΕΚΠΑ, αναπτύχθηκε ένα νέο μοντέλο πρώιμων εμπειριών, στο οποίο νεογνά επίμυ εκπαιδεύονται σε έναν λαβύρινθο σχήματος T χρησιμοποιώντας την επαφή με την μητέρα ως ανταμοιβή και την άρνηση της επαφής με την μητέρα ως εμπειρία ήπιας αντιξοότητας (Εικ. 40) (156,162).



Εικόνα 40. Διάταξη λαβυρίνθου σχήματος T εκπαίδευσης των νεογνών. Πηγή: Stamatakis A, Diamantopoulou A, Panagiotaropoulos T, Raftogianni A, Stylianopoulou F. A novel model of early experiences involving neonatal learning of a T-maze using maternal contact as a reward or its denial as an event of mild emotional adversity. *Dev Psychobiol.* 2014 Dec;56(8):1651–60.

Τα νεογνά, τα οποία δεν έχουν ανοίξει ακόμα τα μάτια τους, ξεκινούν να εκπαιδεύονται στον λαβύρινθο σχήματος T, την PND10 (10η Μεταγεννητική Ημέρα), διαδικασία που ολοκληρώνεται την PND13 (13η Μεταγεννητική Ημέρα). Τα νεογνά φαίνεται ότι διαθέτουν την ικανότητα να μαθαίνουν τον λαβύρινθο T κατά τις μεταγεννητικές ημέρες 10^η-13^η και μάλιστα, η ικανότητά τους αυτή, οφείλεται σε πραγματική μάθηση και όχι στην ανάπτυξη των κινητικών δυνατοτήτων τους όπως δείχνουν πειράματα του εργαστηρίου (162). Ο λαβύρινθος έχει προσαρμοστεί στο μέγεθος των νεογνών. Το κουτί έναρξης (start box) του λαβυρίνθου έχει διαστάσεις 8 x 6 εκατοστά και οδηγεί άμεσα, χωρίς την παρεμβολή κάποιου διαχωριστικού, σε δύο βραχίονες (arms) οι οποίοι οδηγούν σε δύο ξεχωριστά κλουβιά. Ο δεξιός βραχίονας (target arm) του λαβυρίνθου οδηγεί σε ένα κλουβί με διαστάσεις 30 x 22 εκατοστά, στρωμένο με ροκανίδι, μέσα στο οποίο βρίσκεται η μητέρα των νεογνών. Ο

αριστερός βραχίονας (opposite arm) του λαβυρίνθου οδηγεί σε ένα δεύτερο κλουβί, ίδιων διαστάσεων με το πρώτο, στρωμένο επίσης με ροκανίδι, μέσα στο οποίο βρίσκεται ένα άλλο παρθένο, θηλυκό ζώο. Το πλάτος των δύο βραχιόνων είναι 7 εκατοστά ενώ το μήκος τους είναι συνολικά 70 εκατοστά, το οποίο αντιστοιχεί σε 30 εκατοστά για κάθε βραχίονα και 10 εκατοστά για την περιοχή που αποτελεί την άμεση προέκταση του κουτιού έναρξης. Στο τέλος του δεξιού βραχίονα μια μικρή ανασυρόμενη θυρίδα (sliding door) με διαστάσεις 9 x 11 εκατοστά οδηγεί στο εσωτερικό του κλουβιού της μητέρας. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα κλουβιά δεν καθαρίζονται από την PND 10 έως την PND 13 ώστε να διατηρήσουν στο μέγιστο τη μυρωδιά της φωλιάς και ότι τα δύο θηλυκά ενήλικα ζώα είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό κατά τη διάρκεια της εκπαίδευσης. Κατά την άφιξη των νεογνών έξω από το κλουβί της μητέρας, στα ζώα της DER πειραματικής ομάδας δεν επιτρέπεται η είσοδος, με αποτέλεσμα να μη λαμβάνουν την αναμενόμενη ανταμοιβή της μητρικής φροντίδας, ενώ στα ζώα της RER πειραματικής ομάδας η είσοδος επιτρέπεται και η μητέρα δύναται να ανακτήσει το νεογνό, οπότε και λαμβάνει την ανταμοιβή της μητρικής φροντίδας.

Αναλυτικότερα η διαδικασία εκπαίδευσης έχει ως εξής: Τα πειραματόζωα υποβάλλονται καθημερινά σε 10 δοκιμασίες εκπαίδευσης στο λαβύρινθο (σύνολο 40 δοκιμασίες για τις 4 ημέρες που διαρκεί η εκπαίδευση). Αρχικά, η μητέρα των πειραματόζωων απομακρύνεται από το κλουβί μέσα στο οποίο διαβιώνει με τα νεογνά και τοποθετείται στο δεξί κλουβί της πειραματικής διάταξης του λαβυρίνθου σε σχήμα T. Στη συνέχεια, όλα τα ζώα της γέννας τοποθετούνται επίσης στο δεξί κλουβί της πειραματικής διάταξης. Έπειτα, με τη σειρά, κάθε νεογνό τοποθετείται στο κουτί έναρξης του λαβυρίνθου και παραμένει σε αυτόν για μέγιστο διάστημα 60 δευτερολέπτων. Στην περίπτωση των DER πειραματοζώων, ακόμα κι αν καταφέρουν να βρουν το κλουβί της μητέρας, η θυρίδα που οδηγεί στο κλουβί παραμένει κλειστή και το νεογνό παραμένει σε αυτό το σημείο για 20 δευτερόλεπτα. Στην περίπτωση των RER πειραματοζώων, εάν καταφέρουν να βρουν το κλουβί της μητέρας, η θυρίδα ανοίγει και το νεογνό λαμβάνει την ανταμοιβή της μητρικής φροντίδας για 20 δευτερόλεπτα. Αμέσως μετά, και στις δύο περιπτώσεις, ο πειραματιστής επιστρέφει το πειραματόζωο στο κουτί έναρξης του λαβυρίνθου για να υποβληθεί στην επόμενη δοκιμασία, μέχρι την ολοκλήρωση των 10 δοκιμασιών ανά ημέρα εκπαίδευσης. Τη χρονική στιγμή εύρεσης του κλουβιού της μητέρας η καταγραφή των συμπεριφορικών δεδομένων σταματά. Σε κάθε άλλη περίπτωση μη-εύρεσης του

κλουβιού, η καταγραφή των συμπεριφορικών δεδομένων σταματά αμέσως μετά την ολοκλήρωση των 60 δευτερολέπτων και ο πειραματιστής οδηγεί με απαλές κινήσεις το πειραματόζωο στην είσοδο του κλουβιού της μητέρας. Εκεί το ζώο παραμένει μπροστά στην κλειστή θυρίδα (DER) ή με άνοιγμα της θυρίδας έρχεται σε επαφή με τη μητέρα (RER) για 20 δευτερόλεπτα. Μετά το τέλος κάθε δοκιμασίας ο λαβύρινθος καθαρίζεται με διάλυμα αιθανόλης 70% και στη συνέχεια στεγνώνεται, προκειμένου να απομακρυνθούν οσμές που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν από τα επόμενα πειραματόζωα για να προσανατολιστούν στο χώρο. Στο τέλος των δέκα δοκιμασιών, η μητέρα των πειραματόζωων και αμέσως μετά τα πειραματόζωα, επιστρέφουν στο κλουβί διαβίωσής τους και στο δωμάτιο των πειραματόζωων. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι κάθε νεογνό επιστρέφει στο κλουβί με τη μητέρα απευθείας μετά το τέλος της εκπαίδευσής του στον λαβύρινθο T, η οποία διαρκεί συνολικά περίπου 10-15 λεπτά για το κάθε νεογνό.

10.3. Δοκιμασία Χρόνιας Κοινωνικής Ήττας (Chronic Social Defeat)

Η δοκιμασία κοινωνικής ήττας σε αρσενικούς επίμυς βασίζεται στην κοινωνική αλληλεπίδραση ενός επίμυ-κατοίκου (resident) και ενός επίμυ-εισβολέα (intruder) (76). Για την επιτυχία της πειραματικής διαδικασίας απαιτείται η εκδήλωση επιθετικής συμπεριφοράς από τους επίμυς-κατοίκους. Το στέλεχος *Wistar* από μόνο του δεν εκδηλώνει μεγάλη επιθετικότητα, για τον λόγο αυτό πριν την έναρξη του πειράματος χρειάζεται εκπαίδευση μη πειραματικών επίμυων για εμφάνισης επιθετικής-κυριαρχικής συμπεριφοράς. Οι επίμυες που επιλέχθηκαν για κυρίαρχα αρσενικά ήταν τουλάχιστον δύο μήνες μεγαλύτεροι και ζύγιζαν τουλάχιστον 50 g περισσότερο από τα πειραματικά ζώα. Έναν μήνα πριν τη διεξαγωγή του πειράματος στεγάστηκαν σε κλουβιά διαστάσεων 5639×42 cm με μία θηλυκή, με τροφή και νερό *ad libidum*. Για την ενίσχυση της κυριαρχικής συμπεριφοράς μόνο το μισό πριονίδι του κλουβιού αλλαζόταν κάθε 15 μέρες. Μετά από διαμονή 20 ημερών με τα θηλυκά ξεκίνησε η εκπαίδευση τους με μη πειραματικούς επίμυς ηλικιακά μικρότερους και ελαφρύτερους, για την εξασφάλιση της νίκης των επίμυων-κατοίκων. Αφού απομακρύνθηκαν οι θηλυκές για 15 λεπτά εισήχθη στο χώρο του «κατοίκου» ο μη πειραματικός «εισβολέας» για 15 λεπτά. Ακολούθησε σύγκρουση με νίκη του «κατοίκου». Μετά το πέρας των 15 λεπτών ο «εισβολέας» απομακρύνθηκε από το κλουβί και επέστρεψε η θηλυκή. Η εκπαίδευση διήρκεσε 2 εβδομάδες και επετεύχθη η κυριαρχική/επιθετική συμπεριφορά, η οποία εκδηλώνεται με επίθεση στον «εισβολέα» σε λιγότερο από 1,5 λεπτό με ταυτόχρονη υιοθέτηση

ύπτιας στάσης από τον «εισβολέα» (ένδειξη παράδοσης). Κάθε μέρα οι επίμυς-κάτοικοι έρχονταν αντιμέτωποι με διαφορετικούς «εισβολείς» για την αποφυγή μειωμένης επιθετικότητας λόγω οικείας μυρωδιάς. Κατά την εκπαίδευση αποκλεισθήκαν υποψήφιοι επίμυς-κάτοικοι που εμφάνιζαν μειωμένη επιθετικότητα. Η εκπαίδευση των «κατοίκων» έγινε κατά τη σκοτεινή φάση του κύκλου υπό χαμηλό φωτισμό, όπως προβλέπεται και για το βασικό πείραμα. Για την διευκόλυνση της πειραματικής διαδικασίας από την αρχή της εκπαίδευσης των επίμυων-κατοίκων ο κύκλος φωτός-σκοταδιού άλλαξε για όλη την αποικία (05:00-17:00 φως, 17:00-05:00 σκοτάδι)

Οι αρσενικοί πειραματικοί επίμυς-εισβολείς (κατηγορία "Stressed") διέμεναν σε κλουβιά διαστάσεων 42×26×18 cm ανά ομάδες 2-3 ατόμων υπό σταθερές συνθήκες διαβίωσης. Σε ηλικία 4 μηνών υποβλήθηκαν σε χρόνια στρες κοινωνικής ήττας για 3 εβδομάδες, 5 ημέρες την εβδομάδα. Κάθε συνεδρία κοινωνικής ήττας χωρίστηκε σε δύο φάσεις και είχε συνολική διάρκεια 45 λεπτά. Το πείραμα ξεκίνησε στην αρχή της σκοτεινής φάσης του κύκλου των πειραματόζωων. Αφού απομακρύνθηκε η θηλυκή από το κλουβί του επίμυ-κατοίκου, εισήλθε ο πειραματικός επίμυς-εισβολέας. Η πρώτη φάση, διάρκειας 15 λεπτών, περιελάμβανε φυσική επαφή και συνεπώς ήττα και υποτακτική στάση του «εισβολέα» (όπως περιγράφηκε από Miczek, 1979) (76). Στη δεύτερη φάση της πειραματικής διαδικασίας ο εισβολέας παρέμενε στο κλουβί του «κατοίκου» για 30 λεπτά υπό την προστασία ενός συρμάτινου πλέγματος. Το συρμάτινο πλέγμα εξασφαλίζει την αποφυγή απτικής επαφής αλλά επιτρέπει την οπτική και οσφρητική επαφή. Μετά το πέρας των 30 λεπτών της δεύτερης φάσης, ο εισβολέας επέστρεφε στο κλουβί του. Για να εξασφαλιστεί η μέγιστη επιθετικότητα, η ελαχιστοποίηση των ενδοατομικών διαφορών επιθετικότητας, καθώς και το διαφορετικό επίπεδο ενεργοποίησης στη σκοτεινή φάση των πειραματόζωων συνολικά, καθημερινά τα ζεύγη ήταν διαφορετικά και κανένας «κάτοικος» δεν αντιμετώπισε τον ίδιο «εισβολέα» περισσότερες από δύο φορές.

10.4 Προετοιμασία ιστού

Τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν για τον ανοσοϊστοχημικό εντοπισμό θυσιάστηκαν 2 ώρες μετά την ολοκλήρωση της δοκιμασίας χρόνιας κοινωνικής ήττας (Κατηγορία: Stressed), ενώ αυτά που δεν υπέστησαν στρες ως ενήλικα (Κατηγορία: Basal) στην ίδια ηλικία (~140-150 ημερών). Τα ζώα αναισθητοποιήθηκαν με ισοφλουράνιο, αποκεφαλίστηκαν και απομονώθηκαν οι εγκεφαλοι τους, οι οποίοι ψύχθηκαν ακαριαία σε ισοπεντάνιο στους -40°C. Με τη χρήση ψυχρής μικροκρυοτόμου στους

-17°C (Leica CM1900, Nussloch, Germany) πάρθηκαν τομές των 20μm, που συλλέχθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες καλυμμένες με σιλάνιο και αποθηκεύτηκαν στους -80°C (157).

10.5. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός Iba-1 (δείκτης μικρογλοιακών κυττάρων)

Για τον προσδιορισμό της πυκνότητας της μικρογλοίας στον προμετωπιαίο φλοιό, τον ιππόκαμπο και την αμυγδαλή χρησιμοποιήθηκε έμμεση μέθοδος ανοσοφθορισμού έναντι της πρωτεΐνης Iba-1. Η Iba-1 είναι μία ασβεστο-δεσμεύουσα πρωτεΐνη η οποία εκφράζεται συγκεκριμένα στα ενεργοποιημένα μακροφάγα και μικρογλοιακά κύτταρα. Η Iba-1 έχει δραστηριότητα δεσμοποίησης ακτίνης και συμμετέχει στις αναδιπλώσεις της μεμβράνης και στη φαγοκυττάρωση από την ενεργοποιημένη μικρογλοία (104).

Μετά την εξισορρόπηση της θερμοκρασίας των τομών από τους 80°C (θερμοκρασία φύλαξης) σε θερμοκρασία δωματίου (RT), οι τομές μονιμοποιήθηκαν σε 4% διάλυμα παραφορμαλδεΐδης σε φωσφορικά (PB) με pH 7,4, για μία ώρα. Έπειτα από τρία ξεπλύματα (x 5 λεπτά το καθένα) σε ρυθμιστικό διάλυμα (0,1M διάλυμα φωσφορικών αλάτων, PBS), ακολούθησε διαπερατοποίηση των τομών, με ένα διάλυμα απορρυπαντικού 0,1% Triton X-100 0,4% σε PBS 0,1 M για την αύξηση της διεισδυτικότητας των αντισωμάτων στις τομές (3 ξεπλύματα x 5 λεπτά το καθένα). Στη συνέχεια παρεμποδίστηκε η μη ειδική πρόσδεση του 2^{ου} αντισώματος με επώαση των τομών για μία ώρα σε διάλυμα παρεμπόδισης μη ειδικής σύνδεσης των αντισωμάτων (blocking) που περιέχει 10% φυσιολογικό ορό γαϊδάρου (NDS) σε PBS (0,01% Triton X-100, 10% NDS και 1% ορό βοδιού (BSA)), σε RT. Έπειτα, οι τομές επώασθησαν στους 4°C με διάλυμα 1^{ου} αντισώματος, πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι του Iba-1 (72h anti-Iba1, 1:2000, WEK6254, Wako, Japan; διαλυμένο σε PBS 0,01% Triton X-100, 1% NDS, και 1% BSA). Μετά την επώαση με το 1^ο αντίσωμα οι τομές ξεπλήθηκαν σε PBS (3 ξεπλύματα x 5 λεπτά το καθένα) και ακολούθησε επώαση για 2 ώρες σε RT με αντίσωμα Ig G γαϊδάρου έναντι κουνελιού συζευγμένο με Alexafluor555 (A21206, συγκέντρωση 1:200 σε PBS που περιείχε 2% NDS). Η περίσσεια του αντισώματος απομακρύνθηκε με πλύσιμο των τομών σε PBS (5x5 λεπτά) και ακολούθησε κάλυψη των τομών με καλυπτρίδα με χρήση διαλύματος γλυκερόλης (Mowiol mounting medium).

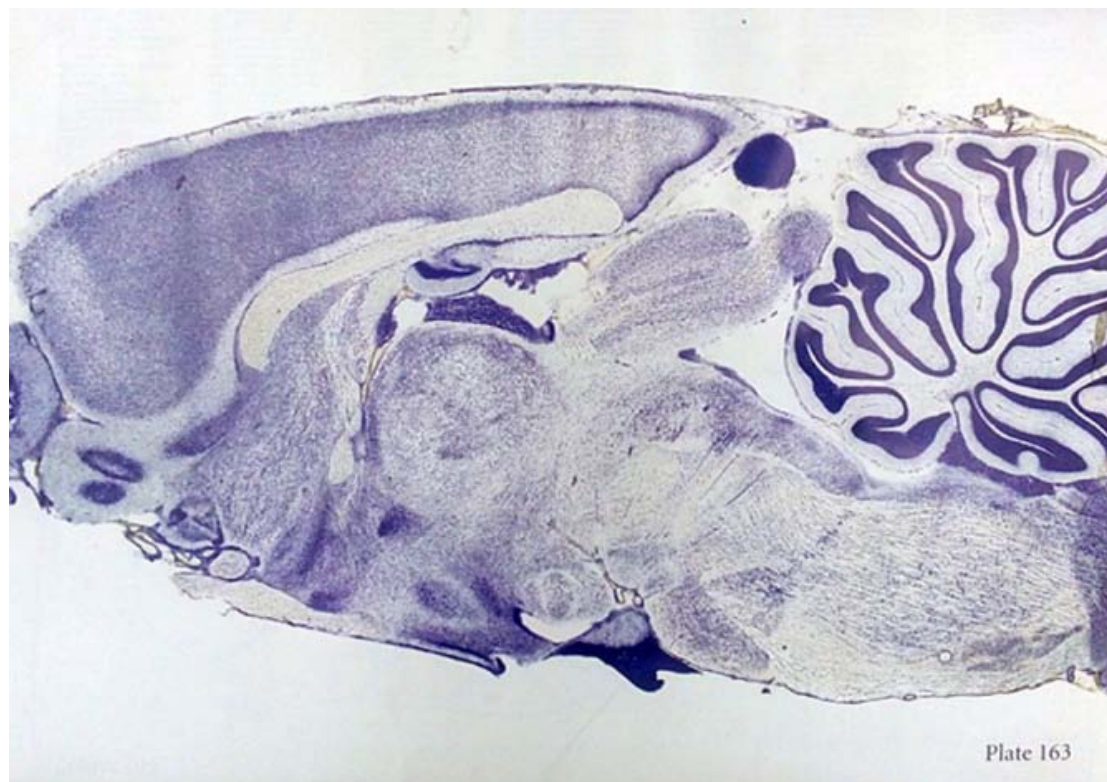
10.6. Ποσοτική καταγραφή των Iba-1 ανοσοθετικών μικρογλοιακών κυττάρων

Για την ποσοτικοποίηση της επίδρασης των στρεσογόνων εμπειριών στον πληθυσμό της μικρογλοίας επιλέχθηκε η καταγραφή του αριθμού των Iba-1 ανοσοθετικών

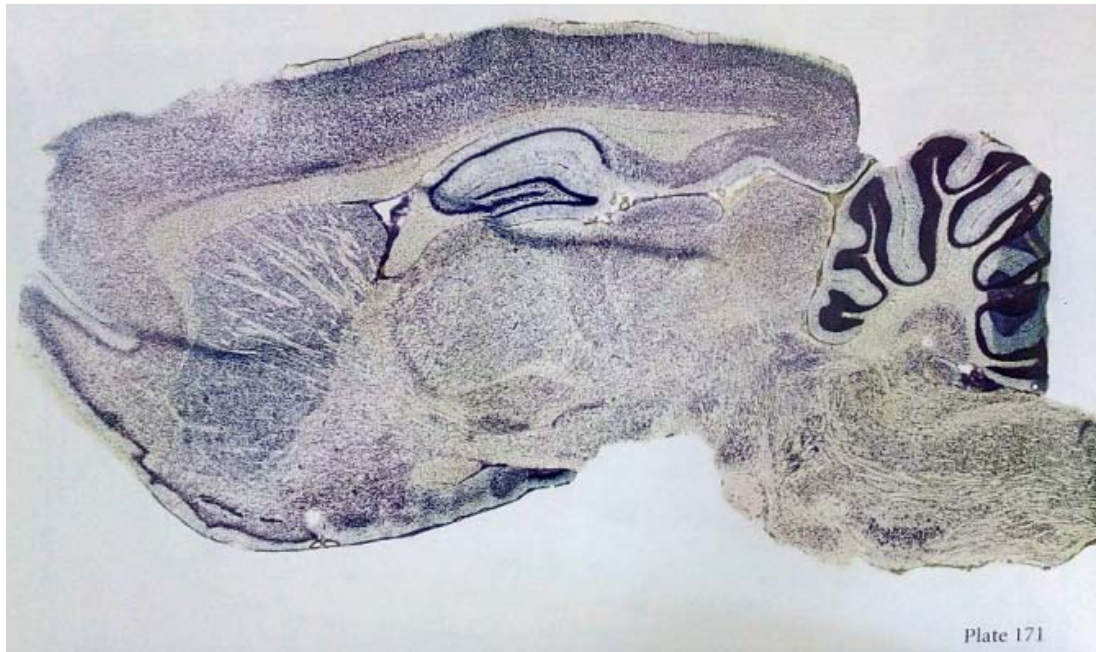
μικρογλοιακών κυττάρων. Οι περιοχές που μελετήθηκαν ήταν η περιοχή A25 του μέσου κοιλιακού προμετωπιαίου φλοιού (medial orbital cortex, MO), η εσωτερική περιοχή (hilus) της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου (dentate gyrus, DG) και το εμπρόσθιο τμήμα των εξωτερικών και βασικών πυρήνων της αμυγδαλής (anterior part of basolateral amygdaloid nucleus, BLA). Η αναγνώριση και εντοπισμός των εγκεφαλικών περιοχών έγινε με τη χρήση του άτλαντα "The rat brain in stereotaxic coordinates" των Paxinos και Watson (Εικ. 41-43) (163).

Πίνακας 7. Οι εγκεφαλικές περιοχές που μελετήθηκαν.

<i>Εγκεφαλική περιοχή</i>	<i>Εγκεφαλική υποπεριοχή</i>	<i>Συντομογραφία</i>
Ιππόκαμπος	Εσωτερική περιοχή της οδοντωτής έλικας (hilus of DG)	HIP
Προμετωπιαίος φλοιός	Περιοχή A25 του μέσου κοιλιακού προμετωπιαίου φλοιού (MO)	PFC
Αμυγδαλή	Εμπρόσθιο τμήμα των εξωτερικών και βασικών πυρήνων της αμυγδαλής (BLA)	AMY



Εικόνα 41. Φωτογραφία από τον άτλαντα "The rat brain in stereotaxic coordinates" των Paxinos και Watson, βάση της οποίας εντοπίστηκε η περιοχή A25 του μέσου κοιλιακού προμετωπιαίου φλοιού (medial orbital cortex, MO). Πηγή: The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates - 7th Edition [Internet]. [cited 2018 Apr 28].

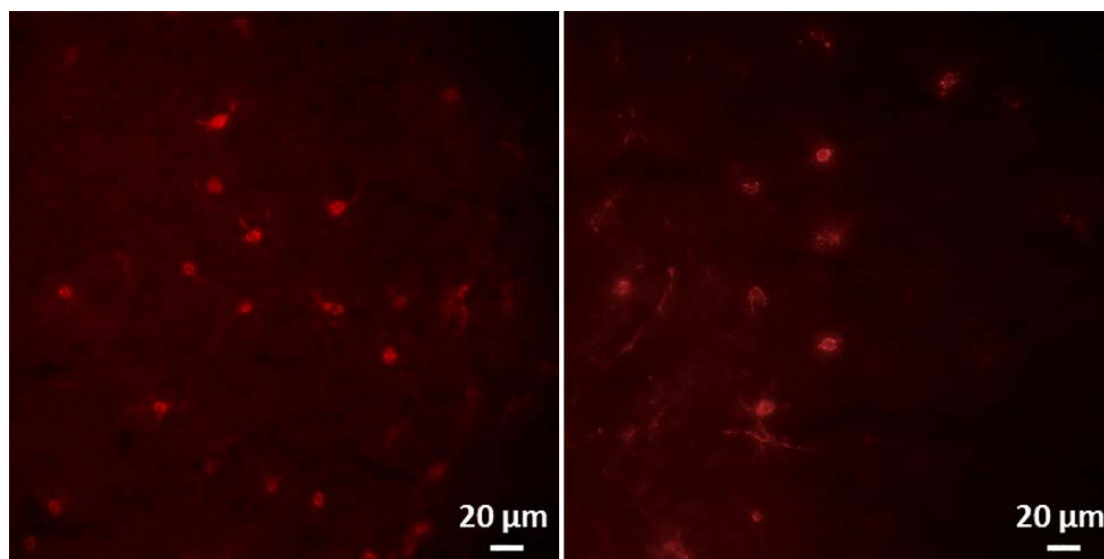


Εικόνα 42. Φωτογραφία από τον άτλαντα "The rat brain in stereotaxic coordinates" των Paxinos και Watson, βάση της οποίας εντοπίστηκε η εσωτερική περιοχή (hilus) της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου (dentate gyrus, DG). Πηγή: The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates - 7th Edition [Internet]. [cited 2018 Apr 28].



Εικόνα 43. Φωτογραφία από τον άτλαντα "The rat brain in stereotaxic coordinates" των Paxinos και Watson, βάση της οποίας εντοπίστηκε το εμπρόσθιο τμήμα των εξωτερικών και βασικών πυρήνων της αμυγδαλής (anterior part of basolateral amygdaloid nucleus, BLA). Πηγή: The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates - 7th Edition [Internet]. [cited 2018 Apr 28].

Για την καταμέτρηση χρησιμοποιήθηκε μικροσκόπιο φθορισμού (Eclipse E400, Nikon, Japan) με επιλογή του φίλτρου G-2A (excitation filter 510-560nm, barrier filter 590nm), μιας και το φθορίζον δευτερεύον αντίσωμα Alexafluor555 εκπέμπει στα 555nm. Η καταγραφή του αριθμού των μικρογλοιακών κυττάρων έγινε σε τυχαία οπτικά πεδία μεγέθυνσης 100x, σε 3 διαδοχικές εγκεφαλικές τομές των 20μm, εντός της κάθε εγκεφαλικής περιοχής και για κάθε πειραματική ομάδα Εικ. 44.

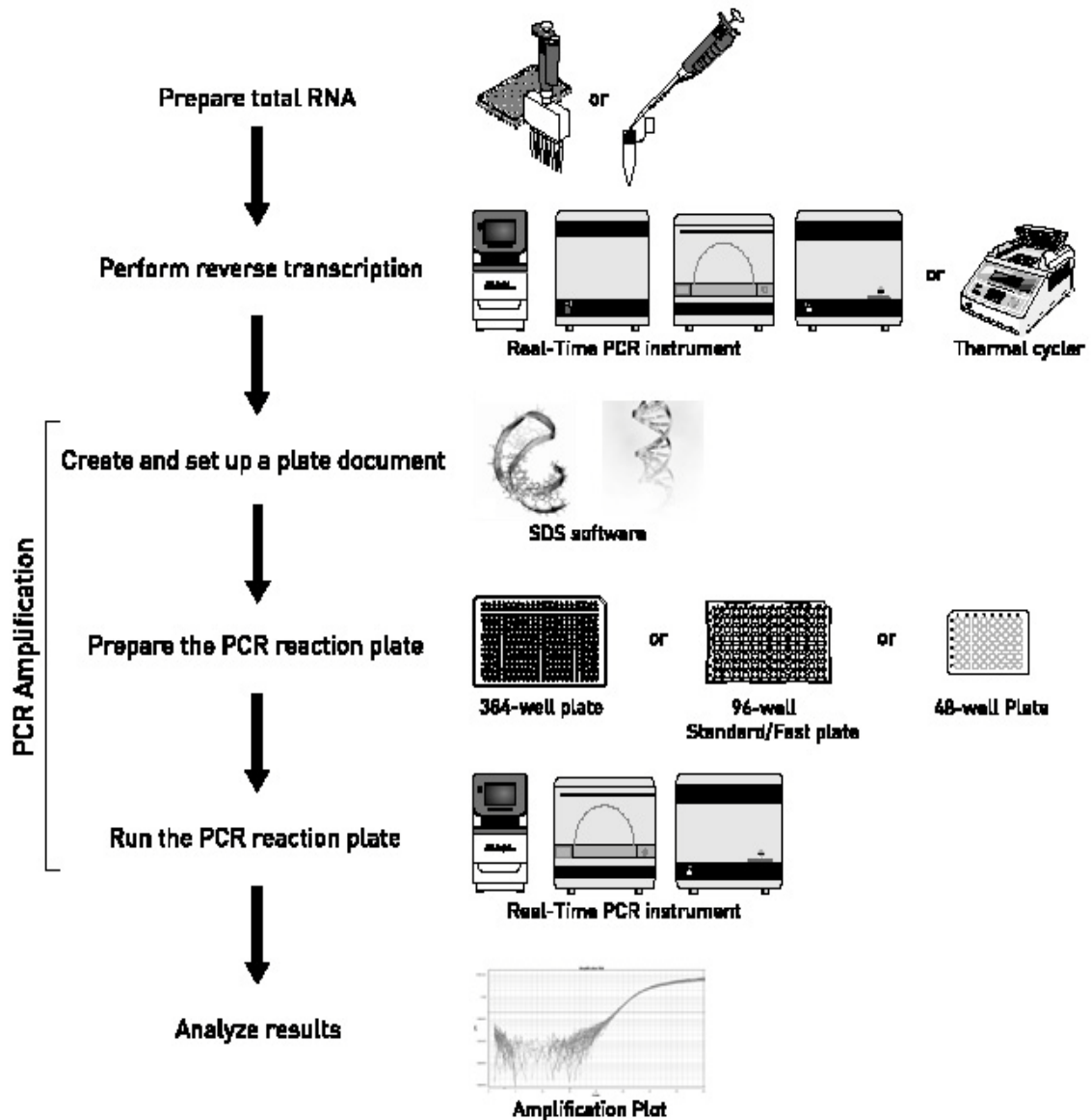


Εικόνα 44. Φωτογραφίες κυττάρων μικρογλοίας στον ιππόκαμπο.

10.7. Απομόνωση RNA και ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων *IL-1β*, *TNF-α*, *PPAR-γ* με qRT-PCR

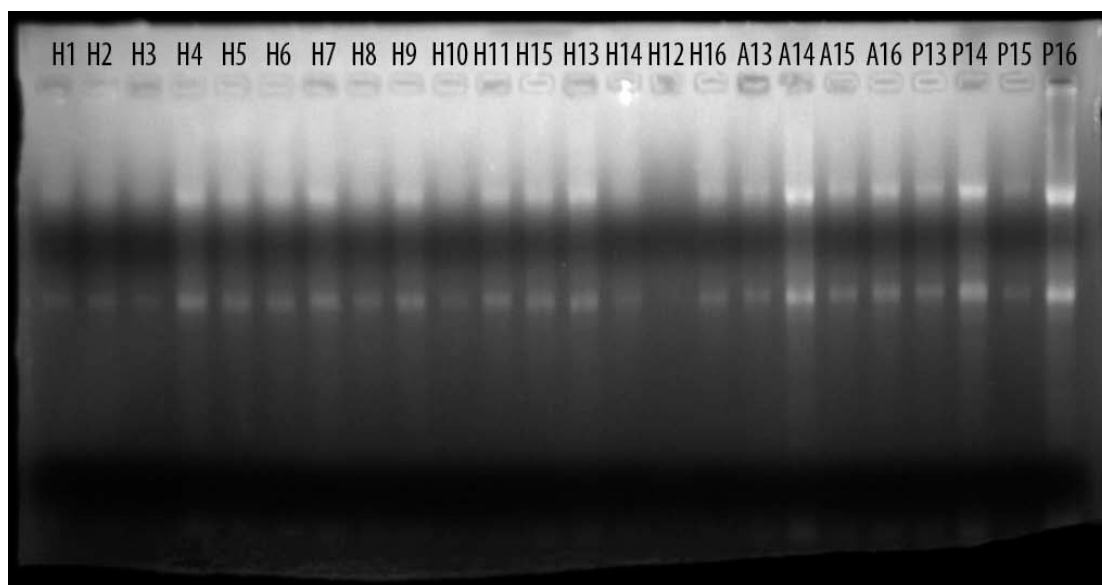
Για να μελετηθούν οι πιθανές μεταβολές των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *IL-1β*, *TNF-α* και *PPAR-γ* στα ζώα που εκτέθηκαν στη δοκιμασία χρόνιας κοινωνικής ήττας ως ενήλικα και που ως νεογνά είτε δεν είχαν υποστεί στρες (ομάδα stressed-CONTROL), είτε είχαν περάσει την εκπαίδευση DER (ομάδα stressed-DER) ή RER (ομάδα stressed-RER) επιλέχθηκε η τεχνική της ποσοτικής-αντίστροφης μεταγραφής-αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qRT-PCR, quantitative-Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) (Εικ. 45).

Οι εγκεφαλικές περιοχές του προμετωπιαίου φλοιού, του ιπποκάμπου και της αμυγδαλής διαχωρίστηκαν κατά τη θυσία των ζώων και ψύχθηκαν ακαριαία σε ισοπεντάνιο στους -80°C . Το συνολικό RNA της κάθε περιοχής απομονώθηκε με τη χρήση 200-250 μl αντιδραστηρίου TRIzol (Thermo Fisher Scientific) ανά ιστό και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (164).



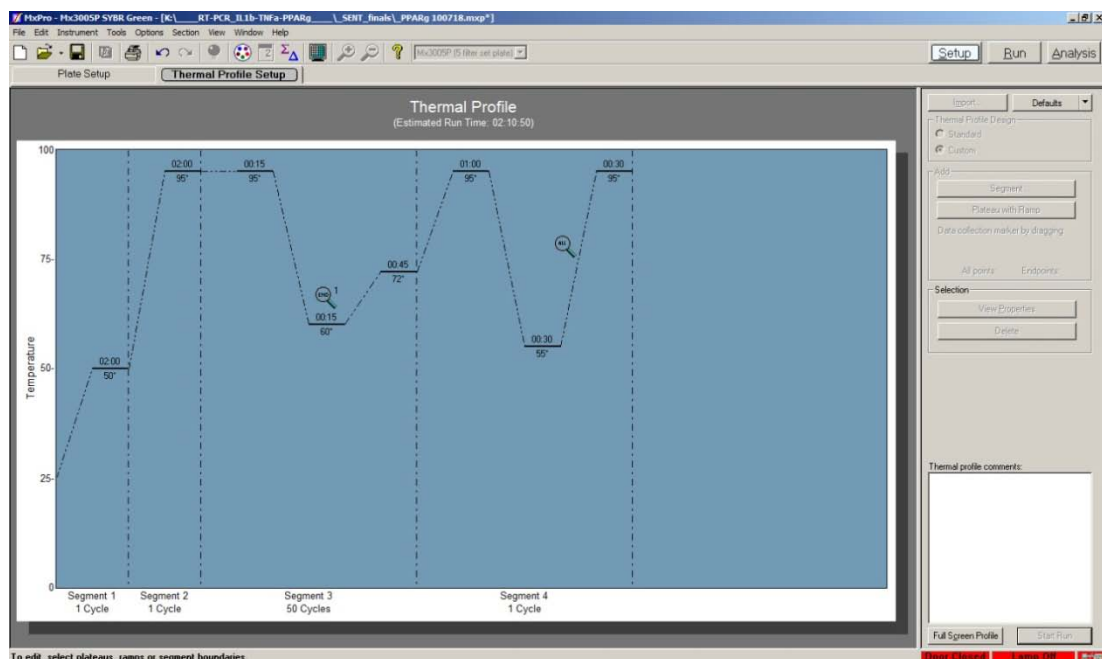
Εικόνα 45. Διαγραμματική περιγραφή της διαδικασίας της qRT-PCR. Πηγή: SYBR Select Master Mix - Thermo Fisher Scientific [Internet]. [cited 2018 Jun 20]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4472908>

Κατά την απομόνωση χρησιμοποιήθηκαν υλικά μιας χρήσης ελεύθερα από RNάσες και όπου ήταν δυνατό οι χειρισμοί εκτελέστηκαν στους 4°C για να αποφευχθεί η αποικοδόμηση του RNA. Η συγκέντρωση του συνολικού RNA και η καθαρότητα των διαλυμάτων του εκτιμήθηκε με φασματοφωτομέτρηση στα 260 και 280nm (BioSpec-nano, Shimadzu) (165). Ο έλεγχος για πιθανά επίπεδα αποικοδόμησης RNA έγινε με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αгарόζης 1,5% (100V) (Εικ. 46) (165).



Εικόνα 46. Ηλεκτροφόρημα ενδεικτικών RNA δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης 1,5% (100V).

Ποσότητα 500ng RNA μεταγράφηκαν αντίστροφα προς cDNA με τη χρήση του αντιδραστηρίου PrimeScript RT reagent Kit (Takara) και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, ενώ η επώαση έγινε στο θερμοκυκλοποιητή PTC-100 (MJ Research, Inc) (166). Για τον προσδιορισμό των σχετικών επιπέδων RNA αξιοποιήθηκε η τεχνολογία SYBR Green real-time PCR (166). Στην αντίδραση της PCR χρησιμοποιήθηκαν 9μl απ' το 1:20 αραιωμένο cDNA για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης των πειραματικών γονιδίων *IL-1β*, *TNF-α*, *PPAR-γ* και 5μl απ' το 1:20 αραιωμένο cDNA για το γονίδιο αναφοράς *GAPDH*. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 20μl και η συγκέντρωση των εκκινητών (primers) 2μM. Η PCR-ενίσχυση έγινε σε θερμικό κυκλοποιητή MX-3000P (Stratagene, Agilent) με τη χρήση αντιδραστηρίου SYBR Select Master Mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) και σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών (167,168). Το θερμικό πρωτόκολλο που επιλέχθηκε ήταν: 50°C για 2min (Κύκλος έναρξης) / 95°C για 2min (Κύκλος ενεργοποίησης της πολυμεράσης) / 95°C για 15sec → 60°C για 15sec → 72°C για 45sec (Κύκλοι ενίσχυσης) / 95°C για 1min → 55°C για 30sec → 95°C για 30sec (Κύκλος λήξης) (Εικ. 47). Για το γονίδιο *GAPDH* εκτελέστηκαν 40 κύκλοι ενίσχυσης ενώ για τα πειραματικά γονίδια 50 κύκλοι ενίσχυσης. Για κάθε δείγμα εκτελέστηκαν δύο ξεχωριστές PCR αντιδράσεις.



Εικόνα 47. Θερμικό πρωτόκολλο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για το γονίδιο PPAR- γ .

Για την ενίσχυση των γονιδίων *IL-1 β* , *TNF- α* , *PPAR- γ* και του γονιδίου αναφοράς *GAPDH* κατά την διαδικασία της PCR επιλέχθηκαν από τη βιβλιογραφία οι ακόλουθοι εκκινητές (169–172):

IL-1 β forward: 5'-TACCTATGTCTTGCCCGTGGAG-3',

IL-1 β reverse: 5'-ATCATCCCACGAGTCACAGAGG-3',

TNF- α forward: 5'-AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC-3',

TNF- α reverse: 5'-TCCGCTTGGTGGTTTGCTACGAC-3',

PPAR- γ forward: 5'-GTCTCACAATGCCATCAGGTTT-3',

PPAR- γ reverse: 5'-TCAGCGGGAAGGACTTTATGTAT-3',

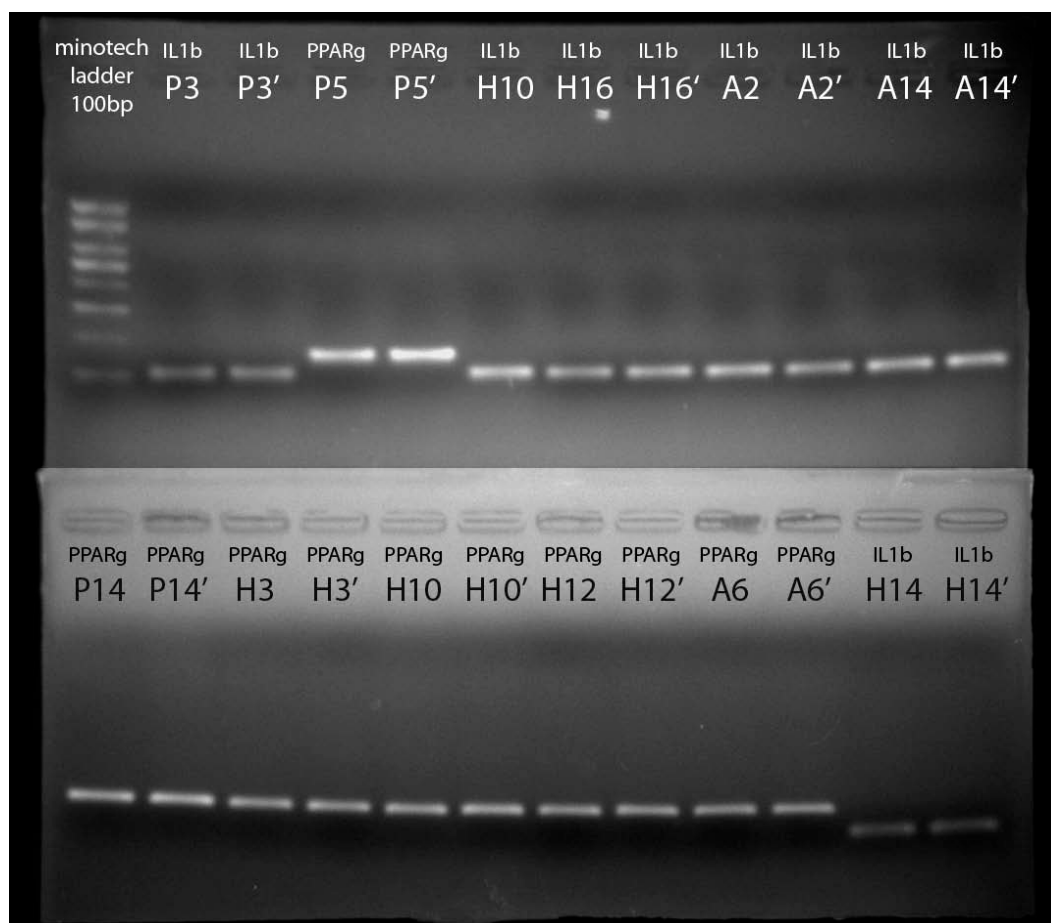
GAPDH forward: 5'-CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3',

GAPDH reverse: 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3',

οι οποίοι και συντέθηκαν κατά παραγγελία (Eurofins genomics, Bio Supplies, Tzortzatos) (173). Κατά τη διαδικασία επιλογής των βέλτιστων εκκινητών έγινε έλεγχος των χαρακτηριστικών και των ιδιοτήτων τους με τη χρήση online βάσεων δεδομένων και λογισμικών βιοπληροφορικής, όπως οι NCBI's "Nucleotide" database, "Multalin" Multiple sequence alignment, "Reverse Complement", "Primer3Plus" (174–177). Οι εκκινητές των γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν εδράζονταν είτε σε διαφορετικά εξώνια, είτε σε σημεία συρραφής εξωνίων (165).

Οι τιμές των οριακών κύκλων ενίσχυσης (Ct, Threshold Cycle) κάθε δείγματος υπολογίστηκαν με το λογισμικό MxPro (QPCR Software for Mx3000P and Mx3005P QPCR Systems, v4.10 Build 389, Stratagene, Agilent) και με επιλογή της χρωστικής SYBR green ως εξωτερική χρωστική αναφοράς (reporter dye) και της ROX ως εσωτερική χρωστική αναφοράς (reference dye) (178). Η ανάλυση των Ct δεδομένων για την εξαγωγή των τιμών της σχετικής γονιδιακής έκφρασης των πειραματικών γονιδίων έγινε με τη μέθοδο $2^{-\Delta\Delta Ct}$, σύμφωνα με προηγούμενες αναφορές (179). Ως γονίδιο αναφοράς (housekeeping gene) για την εκτέλεση τη $2^{-\Delta\Delta Ct}$ μεθόδου χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *GAPDH*.

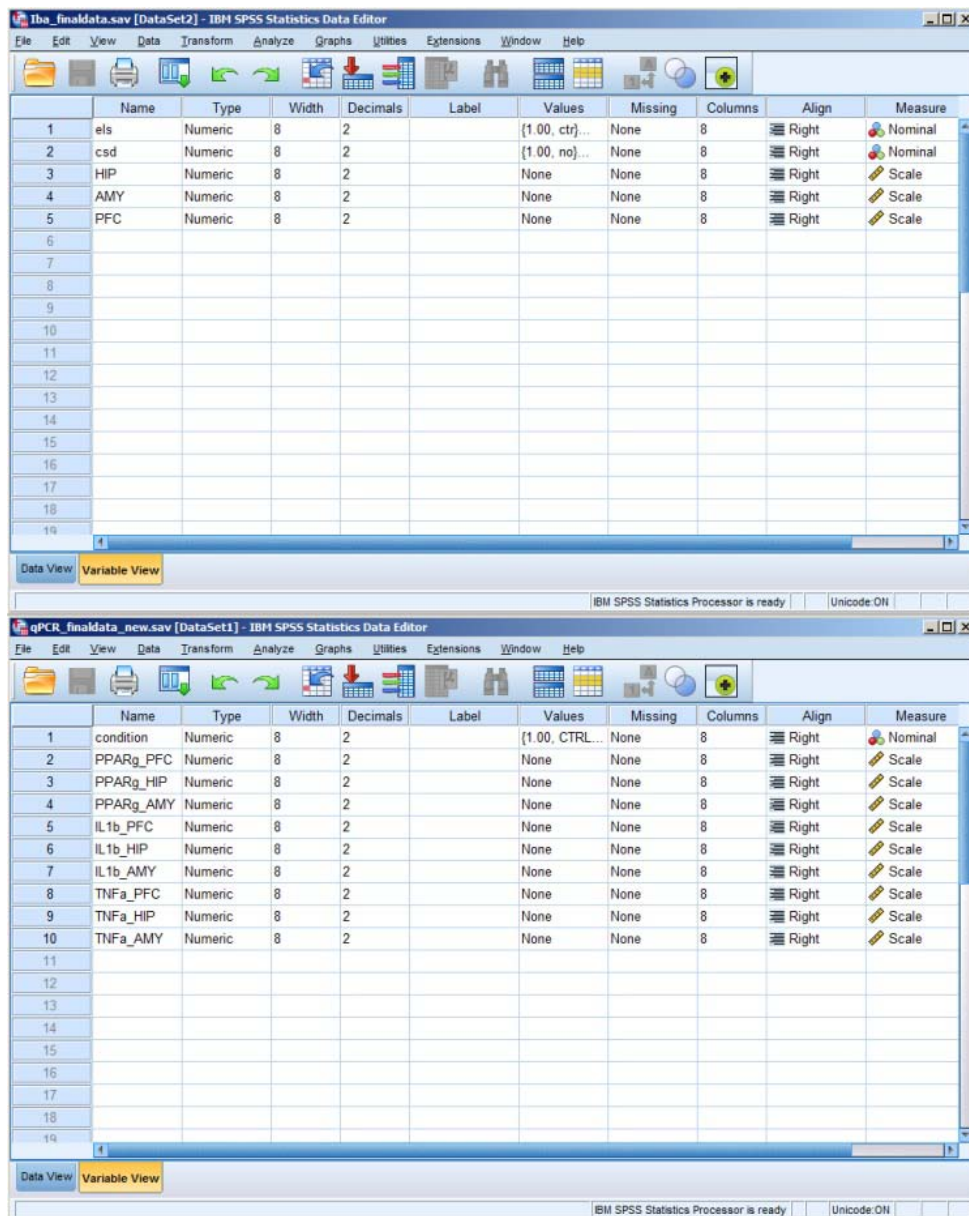
Για την επιβεβαίωση της ειδικής ενίσχυσης του αναμενόμενου προϊόντος αλλά και για τον έλεγχο της τεχνικής αρτιότητας της διαδικασίας της PCR έγινε ηλεκτροφόρηση των PCR-προϊόντων σε πηκτή αгарόζης 2% (100V) παρουσία εμπορικά διαθέσιμων αλληλουχιών DNA γνωστού μοριακού βάρους (100bp, Minotech) (Εικ. 48). Έτσι ελέγχθηκε το μοριακό βάρος των αναμενόμενων PCR-προϊόντων, η ισοφόρτωση των διπλών δειγμάτων και η απουσία διμερών των εκκινητών (primer-dimers) και μη ειδικών προϊόντων.



Εικόνα 48. Ηλεκτροφόρημα ενδεικτικών PCR-προϊόντων σε πηκτή αгарόζης 2% (100V).

11. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του λογισμικού IBM SPSS Statistics (Version 25, SPSS, USA) και εκτελέστηκε μονοπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης (Univariate Analysis of Variance) ή μονής κατεύθυνσης ανάλυση διακύμανσης (One-Way ANOVA). Όπου οι συγκρινόμενες ομάδες ήταν περισσότερες από δύο και η μονοπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης έδινε στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα, εκτελέσθηκε στη συνέχεια η post-hoc δοκιμασία 2-sided Dunnett. Ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε το $p=0,05$ (157).



Εικόνα 49. Το λογισμικό IBM SPSS Statistics, Version 25.

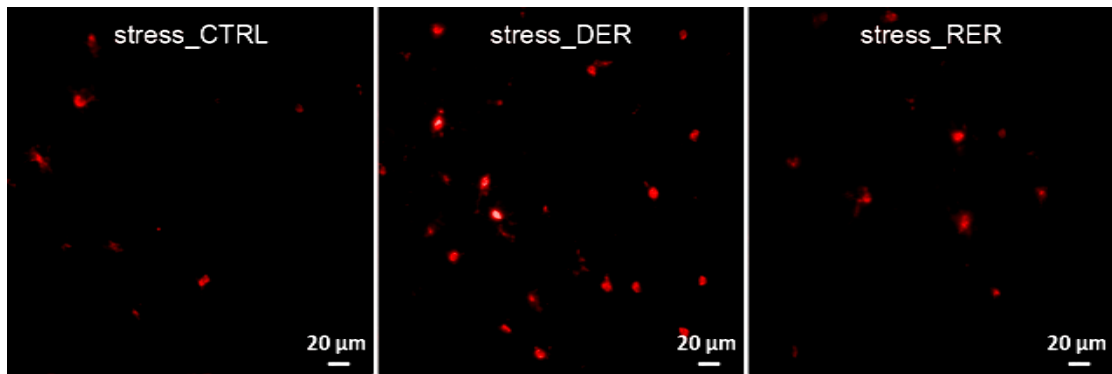
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

12. Επίδραση του στρες στον αριθμό των Iba-1 ανοσοθετικών μικρογλοιακών κυττάρων

Για να μελετήσουμε το κυτταρικό μονοπάτι και το είδος της επίδρασης του στρες στο ΚΝΣ διερευνήσαμε κατά πόσον η έκθεση σε στρες μόνο κατά την νεογνική περίοδο ("basal" συνθήκη) είτε η έκθεση σε στρες και κατά την νεογνική περίοδο και μετά κατά την ενήλικο ζωή ("stress" συνθήκη) επηρεάζει τον αριθμό των Iba-1 ανοσοθετικών μικρογλοιακών κυττάρων (Iba-1⁺) στον υπόκαμπο, τον προμετωπιαίο φλοιό και την αμυγδαλή. Στον πίνακα 8 βλέπουμε αναλυτικά τις πειραματικές ομάδες που χρησιμοποιήθηκαν και στην εικόνα 51 κάποιες ενδεικτικές φωτογραφίες.

Πίνακας 8. Οι στρεσογόνες δοκιμασίες που εφαρμόστηκαν στις πειραματικές ομάδες.

Στρεσογόνες δοκιμασίες		Συνομογραφία
Ήπια πρώιμη στρεσογόνος εμπειρία: Εκπαίδευση σε λαβύρινθο σχήματος T (Early Life Stress)		ELS (CTRL, DER, RER)
Ενήλικη στρεσογόνος δοκιμασία: Χρόνια κοινωνική ήττα (Chronic Social Defeat)		CSD (basal, stress)
<i>Πειραματικές συνθήκες</i>		<i>Πειραματικές ομάδες</i>
<i>Νεογνική περίοδος (ELS)</i>	<i>Ενήλικος ζωή (CSD)</i>	
Καμία παρέμβαση στα νεογνά	Καμία παρέμβαση κατά την ενήλικο ζωή	basal_CTRL
Εκπαίδευση των νεογνών σε λαβύρινθο σχήματος T υπό συνθήκες άρνησης ανταμοιβής	Καμία παρέμβαση κατά την ενήλικο ζωή	basal_DER
Εκπαίδευση των νεογνών σε λαβύρινθο σχήματος T υπό συνθήκες λήψης ανταμοιβής	Καμία παρέμβαση κατά την ενήλικο ζωή	basal_RER
Καμία παρέμβαση στα νεογνά	Έκθεση στη δοκιμασία χρόνιας κοινωνικής ήττας κατά την ενήλικο ζωή	stress_CTRL
Εκπαίδευση των νεογνών σε λαβύρινθο σχήματος T υπό συνθήκες άρνησης ανταμοιβής	Έκθεση στη δοκιμασία χρόνιας κοινωνικής ήττας κατά την ενήλικο ζωή	stress_DER
Εκπαίδευση των νεογνών σε λαβύρινθο σχήματος T υπό συνθήκες λήψης ανταμοιβής	Έκθεση στη δοκιμασία χρόνιας κοινωνικής ήττας κατά την ενήλικο ζωή	stress_RER

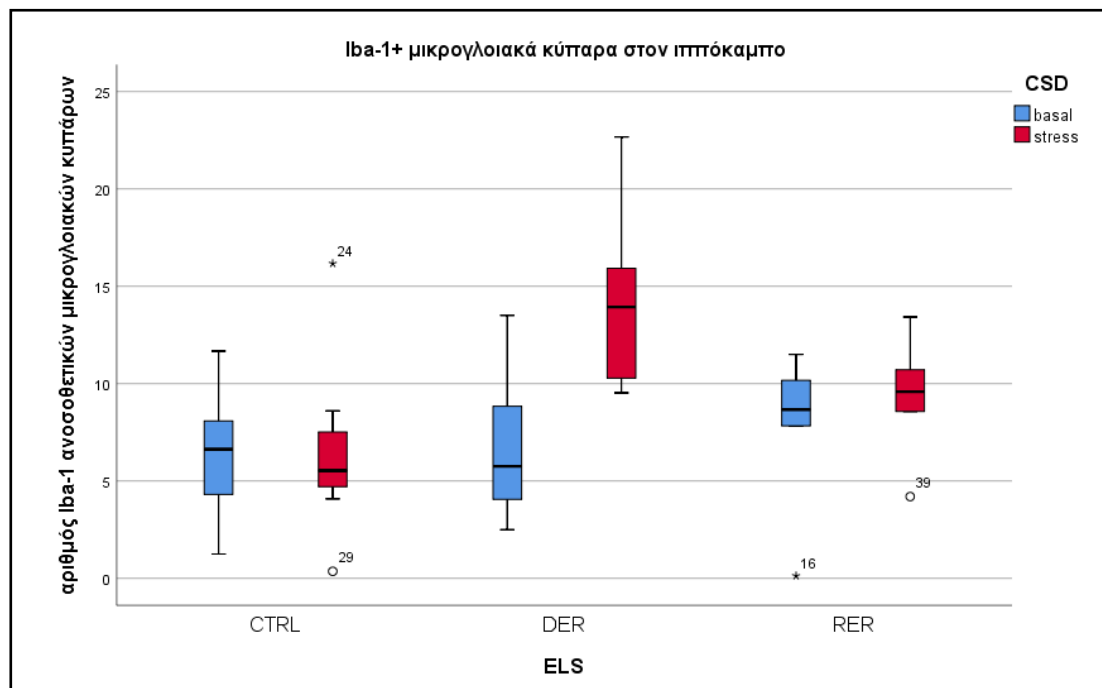


Εικόνα 51. Ενδεικτικές φωτογραφίες Iba-1 ανοσοθετικών μικρογλοιακών κυττάρων στον ιππόκαμπο.

12.1. Iba-1 ανοσοθετικά μικρογλοιακά κύτταρα στον ιππόκαμπο

12.1.1. Σύγκριση του αριθμού των Iba-1 ανοσοθετικών μικρογλοιακών κυττάρων στον ιππόκαμπο μεταξύ όλων των πειραματικών ομάδων

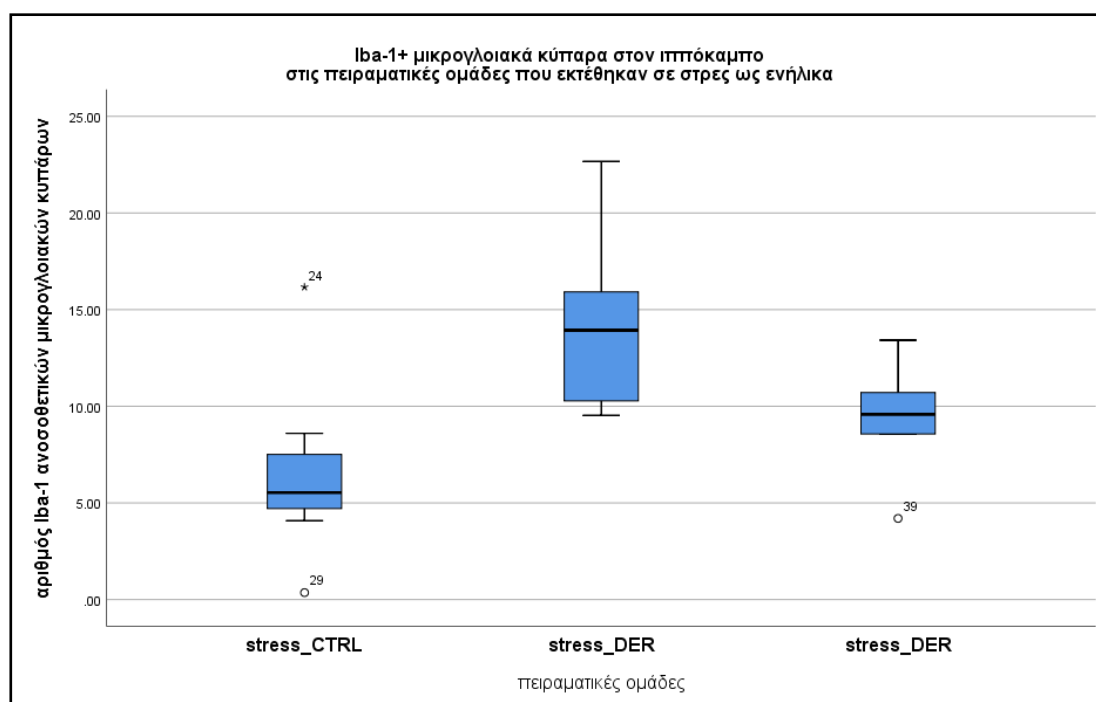
Στον ιππόκαμπο, από τη σύγκριση του αριθμού των Iba-1 ανοσοθετικών μικρογλοιακών κυττάρων όλων των πειραματικών ομάδων μεταξύ τους (Two way ANOVA, με ανεξάρτητες μεταβλητές την εμπειρία κατά τη νεογνική ηλικία και την έκθεση ή όχι σε κοινωνικό στρες κατά την ενήλικη ζωή) προέκυψε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των ανεξάρτητων μεταβλητών ($p=0,050$). Στο γράφημα 1 βλέπουμε την κατανομή τους.



Γράφημα 1. Κατανομή του αριθμού των Iba-1 ανοσοθετικών μικρογλοιακών κυττάρων στον ιππόκαμπο (ELS*CSD: $p=0,050$).

12.1.2. Σύγκριση του αριθμού των Iba-1 ανοσοθετικών μικρογλοιακών κυττάρων στον ιππόκαμπο ανάμεσα στις πειραματικές ομάδες που εκτέθηκαν σε στρες ως ενήλικα

Στον ιππόκαμπο, από την σύγκριση των "stressed" πειραματικών ομάδων (One way ANOVA, Post Hoc Tests: Multiple Comparisons: Dunnett t 2-sided) προέκυψε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική ($p=0,006$) μέση αύξηση +54,8% στον αριθμό των Iba-1 ανοσοθετικών μικρογλοιακών κυττάρων μεταξύ των ομάδων stress_CTRL και stress_DER (Γράφημα 2).



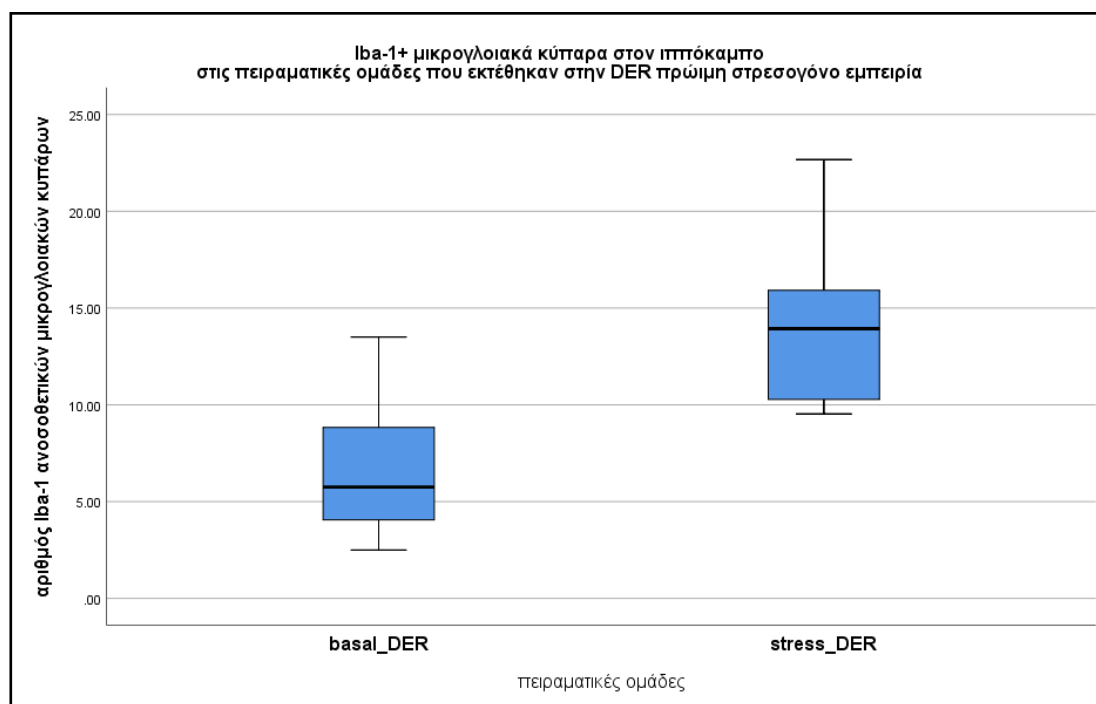
Γράφημα 2. Κατανομή του αριθμού των Iba-1 ανοσοθετικών μικρογλοιακών κυττάρων στον ιππόκαμπο στις πειραματικές ομάδες που εκτέθηκαν σε στρες ως ενήλικα (stress_DER/stress_CTRL= 1.548, $p=0.006$).

Δηλαδή, όταν της έκθεσης σε χρόνια στρες κοινωνικής ήττας προηγείται η DER εμπειρία (stress_DER) παρατηρείται αύξηση στον αριθμό των Iba-1 ανοσοθετικών μικρογλοιακών κυττάρων στον ιππόκαμπο, συγκριτικά με την έκθεση σε στρες στην ενήλικη ζωή χωρίς να έχει προηγηθεί κάποια πρόμη στρεσογόνος εμπειρία (stress_CTRL).

12.1.3. Σύγκριση του αριθμού των Iba-1 ανοσοθετικών μικρογλοιακών κυττάρων στον ιππόκαμπο ανάμεσα στις DER πειραματικές ομάδες.

Στον ιππόκαμπο, από την σύγκριση μεταξύ των basal_DER και stress_DER (One way ANOVA) προέκυψε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική ($p=0,009$) μέση αύξηση +52,7% στον αριθμό των Iba-1 ανοσοθετικών μικρογλοιακών κυττάρων στον ιππόκαμπο (Γράφημα 3).

Δηλαδή, η έκθεση στην DER εμπειρία που ακολουθείται από έκθεση σε χρόνιο στρες κοινωνικής ήττας (stress_DER) συνδέεται με αύξηση στον αριθμό των Iba-1 ανοσοθετικών μικρογλοιακών κυττάρων στον ιππόκαμπο συγκριτικά με την έκθεση στην DER εμπειρία που δεν ακολουθείται από κάποιο στρες στην ενήλικη ζωή (basal_DER).



Γράφημα 3. Κατανομή του αριθμού των Iba-1 ανοσοθετικών μικρογλοιακών κυττάρων στον ιππόκαμπο στις DER πειραματικές ομάδες (stress_DER/ basal_DER= 1.527, $p=0.009$).

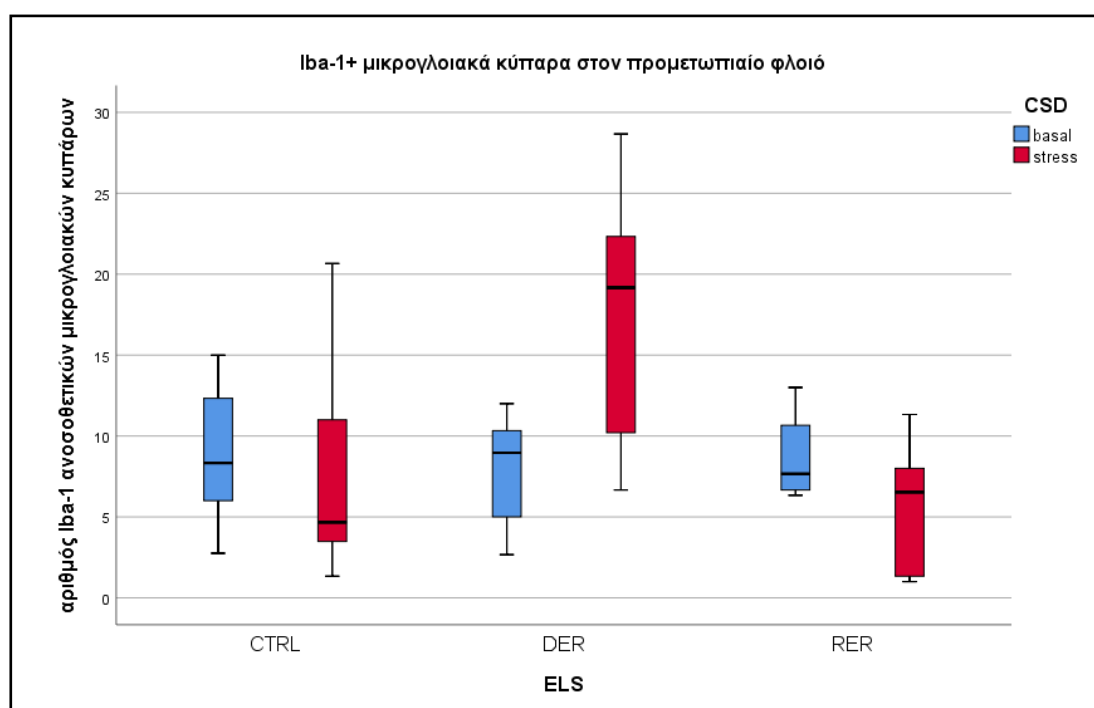
12.1.4. Λοιπές συγκρίσεις στον ιππόκαμπο

Όλες οι υπόλοιπες συγκρίσεις που εκτελέστηκαν στον ιππόκαμπο δεν έδωσαν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα.

12.2. Iba-1 ανοσοθετικά μικρογλοιακά κύτταρα στον προμετωπιαίο φλοιό

12.2.1. Σύγκριση του αριθμού των Iba-1 ανοσοθετικών μικρογλοιακών κυττάρων στον προμετωπιαίο φλοιό μεταξύ όλων των πειραματικών ομάδων

Στον προμετωπιαίο φλοιό, από την σύγκριση του αριθμού των Iba-1 ανοσοθετικών μικρογλοιακών κυττάρων όλων των πειραματικών ομάδων μεταξύ τους (Two way ANOVA, με ανεξάρτητες μεταβλητές την εμπειρία κατά τη νεογνική ηλικία και την έκθεση ή όχι σε κοινωνικό στρες κατά την ενήλικη ζωή) προέκυψε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των ανεξάρτητων μεταβλητών ($p=0,032$). Στο γράφημα 4 βλέπουμε την κατανομή τους.

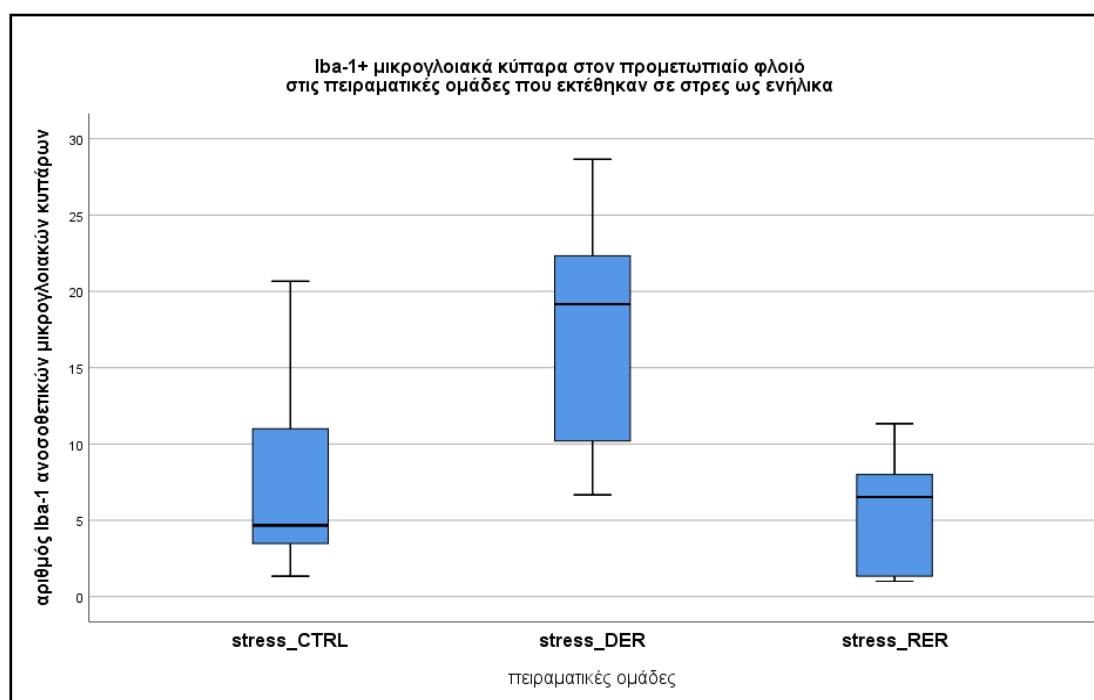


Γράφημα 4. Κατανομή του αριθμού των Iba-1 ανοσοθετικών μικρογλοιακών κυττάρων στον προμετωπιαίο φλοιό (ELS*CSD: $p=0,032$).

12.2.2. Σύγκριση του αριθμού των Iba-1 ανοσοθετικών μικρογλοιακών κυττάρων στον προμετωπιαίο φλοιό ανάμεσα στις πειραματικές ομάδες που εκτέθηκαν σε στρες ως ενήλικα

Στον προμετωπιαίο φλοιό, από την σύγκριση των "stressed" πειραματικών ομάδων (One way ANOVA, Post Hoc Tests: Multiple Comparisons: Dunnett t 2-sided) προέκυψε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική ($p=0,038$) μέση αύξηση +55,1% στον αριθμό των Iba-1 ανοσοθετικών μικρογλοιακών κυττάρων μεταξύ των ομάδων stress_CTRL και stress_DER (Γράφημα 5).

Δηλαδή, όταν προηγείται η DER εμπειρία της έκθεσης σε χρόνια στρες κοινωνικής ήττας (stress_DER) παρατηρείται αύξηση στον αριθμό των Iba-1 ανοσοθετικών μικρογλοιακών κυττάρων στον προμετωπιαίο φλοιό, συγκριτικά με την έκθεση σε χρόνια στρες κοινωνικής ήττας στην ενήλικη ζωή χωρίς να έχει προηγηθεί κάποια πρότερη στρεσογόνος εμπειρία (stress_CTRL).

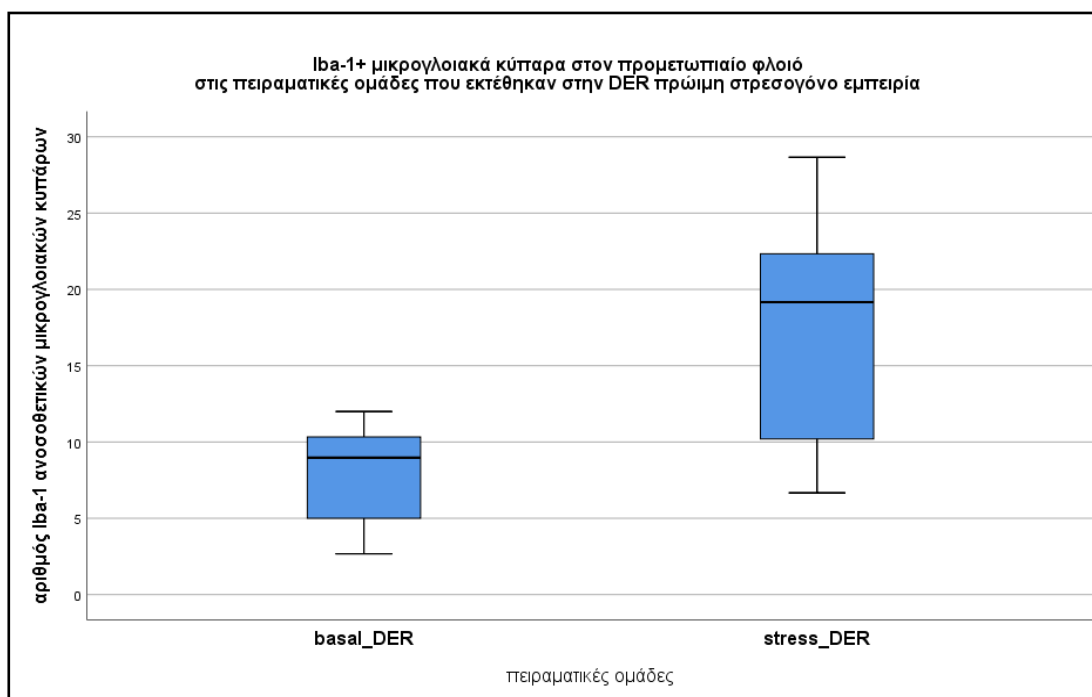


Γράφημα 5. Κατανομή του αριθμού των Iba-1 ανοσοθετικών μικρογλοιακών κυττάρων στον προμετωπιαίο φλοιό των πειραματικών ομάδων που εκτέθηκαν σε στρες ως ενήλικα (stress_DER/stress_CTRL= 1.551, p=0.038).

12.2.3. Σύγκριση του αριθμού των Iba-1 ανοσοθετικών μικρογλοιακών κυττάρων στον προμετωπιαίο φλοιό ανάμεσα στις DER πειραματικές ομάδες.

Στον προμετωπιαίο φλοιό, από την σύγκριση μεταξύ των basal_DER και stress_DER (One way ANOVA) προέκυψε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική (p=0,024) μέση αύξηση +54,9% στον αριθμό των Iba-1 ανοσοθετικών μικρογλοιακών κυττάρων στον προμετωπιαίο φλοιό (Γράφημα 6).

Δηλαδή, η έκθεση στην DER εμπειρία που ακολουθείται από έκθεση σε χρόνια στρες κοινωνικής ήττας (stress_DER) συνδέεται με αύξηση στον αριθμό των Iba-1 ανοσοθετικών μικρογλοιακών κυττάρων στον προμετωπιαίο φλοιό συγκριτικά με την έκθεση στην DER εμπειρία που δεν ακολουθείται από κάποιο στρες στην ενήλικη ζωή (basal_DER).



Γράφημα 6. Κατανομή του αριθμού των Iba-1 ανοσοθετικών μικρογλοιακών κυττάρων στον προμετωπιαίο φλοιό στις DER πειραματικές ομάδες ($\text{stress_DER}/\text{basal_DER} = 1.549$, $p=0.024$).

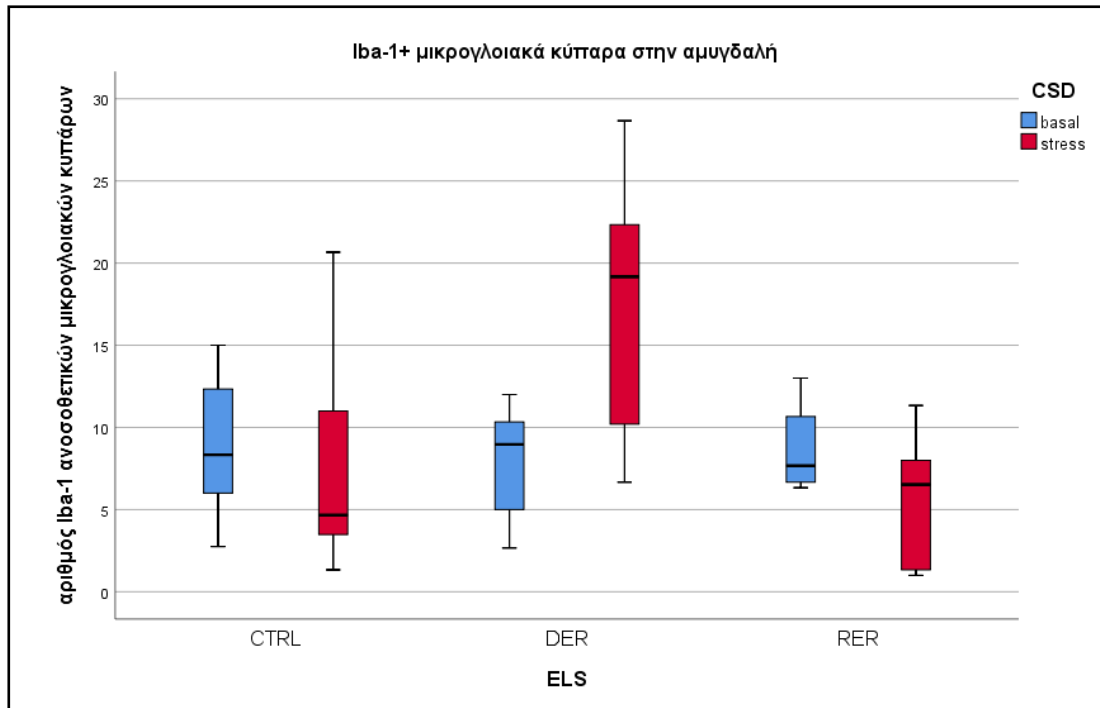
12.2.4. Λοιπές συγκρίσεις στον προμετωπιαίο φλοιό

Όλες οι υπόλοιπες συγκρίσεις που εκτελέστηκαν στον προμετωπιαίο φλοιό δεν έδωσαν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα.

12.3. Iba-1 ανοσοθετικά μικρογλοιακά κύτταρα στην αμυγδαλή

12.3.1. Σύγκριση του αριθμού των Iba-1 ανοσοθετικών μικρογλοιακών κυττάρων στην αμυγδαλή μεταξύ όλων των πειραματικών ομάδων

Στην αμυγδαλή, από την σύγκριση του αριθμού των Iba-1 ανοσοθετικών μικρογλοιακών κυττάρων όλων των πειραματικών ομάδων μεταξύ τους (Two way ANOVA, με ανεξάρτητες μεταβλητές την εμπειρία κατά τη νεογνική ηλικία και την έκθεση ή όχι σε κοινωνικό στρες κατά την ενήλικη ζωή) προέκυψε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των ανεξάρτητων μεταβλητών ($p=0,479 > 0,050$). Στο γράφημα 7 βλέπουμε την κατανομή τους.



Γράφημα 7. Κατανομή του αριθμού των Iba-1 ανοσοθετικών μικρογλοιακών κυττάρων στην αμυγδαλή (ELS*CSD: $p=0,479>0,050$).

13. Επίδραση της διαδοχικής έκθεσης σε στρες στη σχετική έκφραση των γονιδίων PPAR γ , IL-1 β , TNF α .

Για να μελετήσουμε το μοριακό μονοπάτι που εμπλέκεται στις αλλαγές που παρατηρήσαμε στη μικρογλοία μετά τη διαδοχική έκθεση σε στρες και κατά την νεογνική περίοδο και κατά την ενήλικη ζωή ("stressed" ομάδες), διερευνήσαμε κατά πόσον μεταβάλλονται τα επίπεδα της σχετικής έκφρασης των γονιδίων PPAR γ , IL-1 β , και TNF α στον ιππόκαμπο, τον προμετωπιαίο φλοιό και την αμυγδαλή ανάμεσα στις ομάδες stress_CTRL, stress_DER, stress_RER.

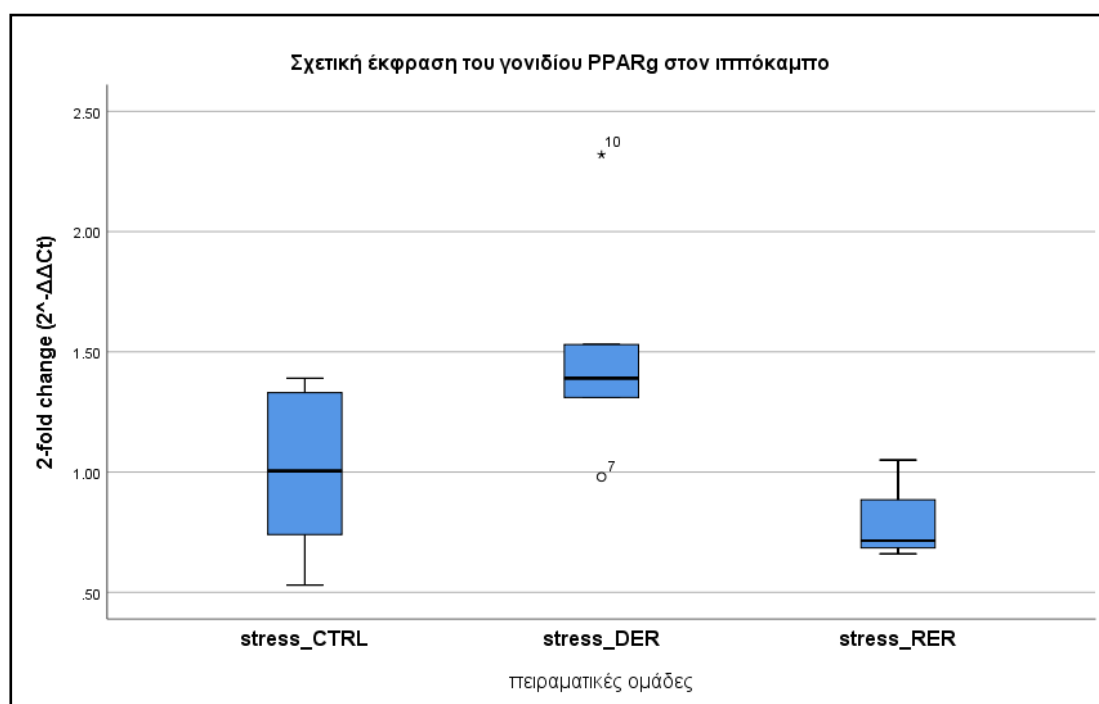
13.1. Σχετική έκφραση του γονιδίου PPAR γ στις πειραματικές ομάδες που εκτέθηκαν σε στρες ως ενήλικα

13.1.1. Σχετική έκφραση του γονιδίου PPAR γ στον ιππόκαμπο στις πειραματικές ομάδες που εκτέθηκαν σε στρες ως ενήλικα

Στον ιππόκαμπο, από την σύγκριση των "stressed" πειραματικών ομάδων (One way ANOVA, Post Hoc Tests: Multiple Comparisons: Dunnett t 2-sided) προέκυψε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική ($p=0,048$) μέση αύξηση 49% της σχετικής έκφρασης

του γονιδίου PPAR γ μεταξύ των ομάδων stress_CTRL και stress_DER (Γράφημα 11).

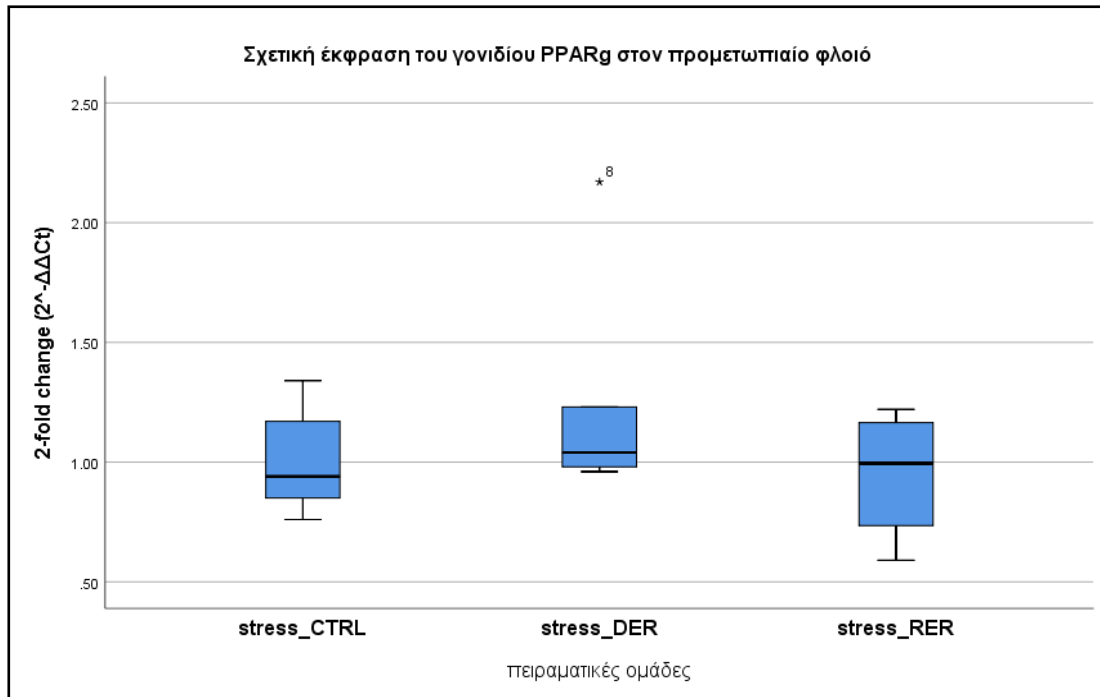
Δηλαδή, όταν της έκθεσης σε χρόνια στρες κοινωνικής ήττας προηγείται η πρόωμη DER εμπειρία (stress_DER), παρατηρείται αυξημένη σχετική έκφραση του γονιδίου PPAR γ στον ιππόκαμπο, συγκριτικά με όταν δεν έχει προηγηθεί κάποια πρόωμη στρεσογόνος εμπειρία (stress_CTRL).



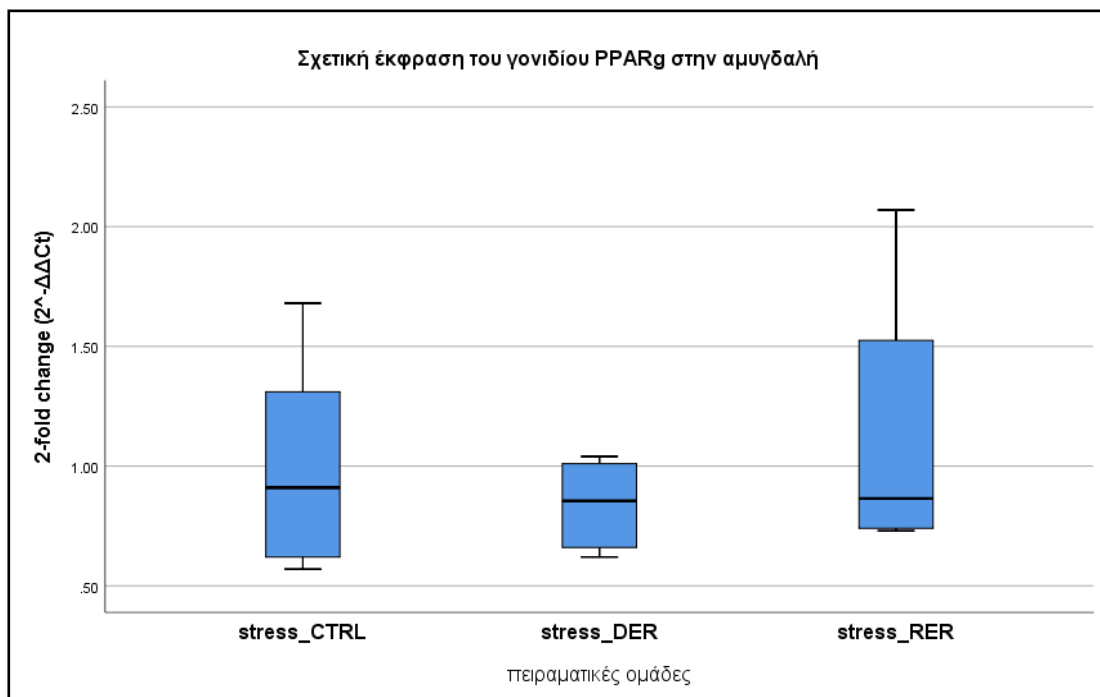
Γράφημα 8. Κατανομή της σχετικής έκφρασης του γονιδίου PPAR γ στον ιππόκαμπο στις πειραματικές ομάδες που εκτέθηκαν σε στρες ως ενήλικα ($p=0,048$).

13.1.2. Σχετική έκφραση του γονιδίου PPAR γ στον προμετωπιαίο φλοιό και την αμυγδαλή στις πειραματικές ομάδες που εκτέθηκαν σε στρες ως ενήλικα

Η ανάλυση της διακύμανσης (One way ANOVA) της σχετικής έκφρασης του γονιδίου PPAR γ στον προμετωπιαίο φλοιό και την αμυγδαλή στις "stressed" πειραματικές ομάδες δεν έδωσε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα (PFC: $p=0,376$ / AMY: $p=0,561$). Οι κατανομές φαίνονται στα γραφήματα 9, 10.



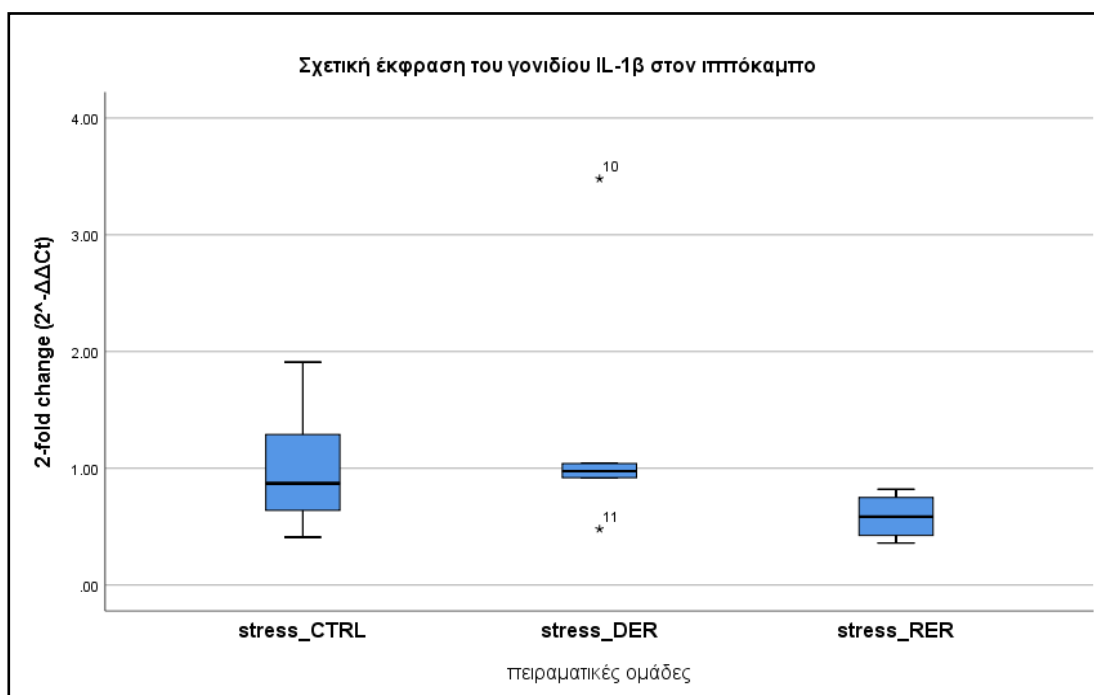
Γράφημα 9. Κατανομή της σχετικής έκφρασης του γονιδίου PPARγ στον προμετωπιαίο φλοιό στις πειραματικές ομάδες που εκτέθηκαν σε στρες ως ενήλικα ($p=0,376$).



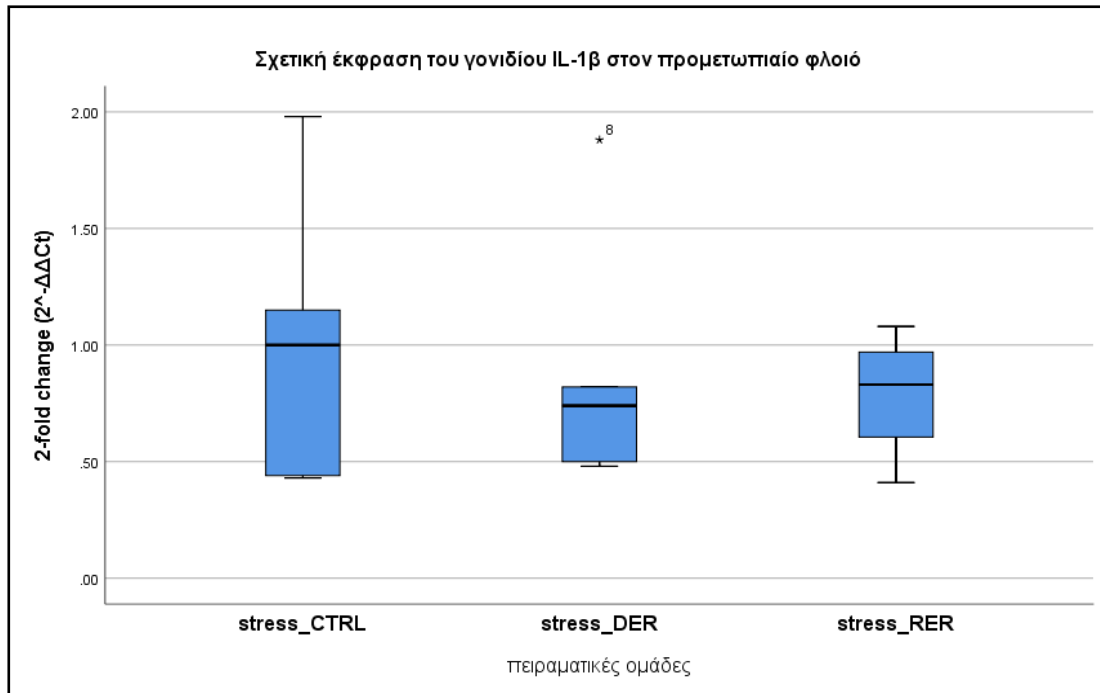
Γράφημα 10. Κατανομή της σχετικής έκφρασης του γονιδίου PPARγ στην αμυγδαλή στις πειραματικές ομάδες που εκτέθηκαν σε στρες ως ενήλικα ($p=0,561$).

13.2. Σχετική έκφραση των γονιδίων IL-1β και TNFa στις πειραματικές ομάδες που εκτέθηκαν σε στρες ως ενήλικα

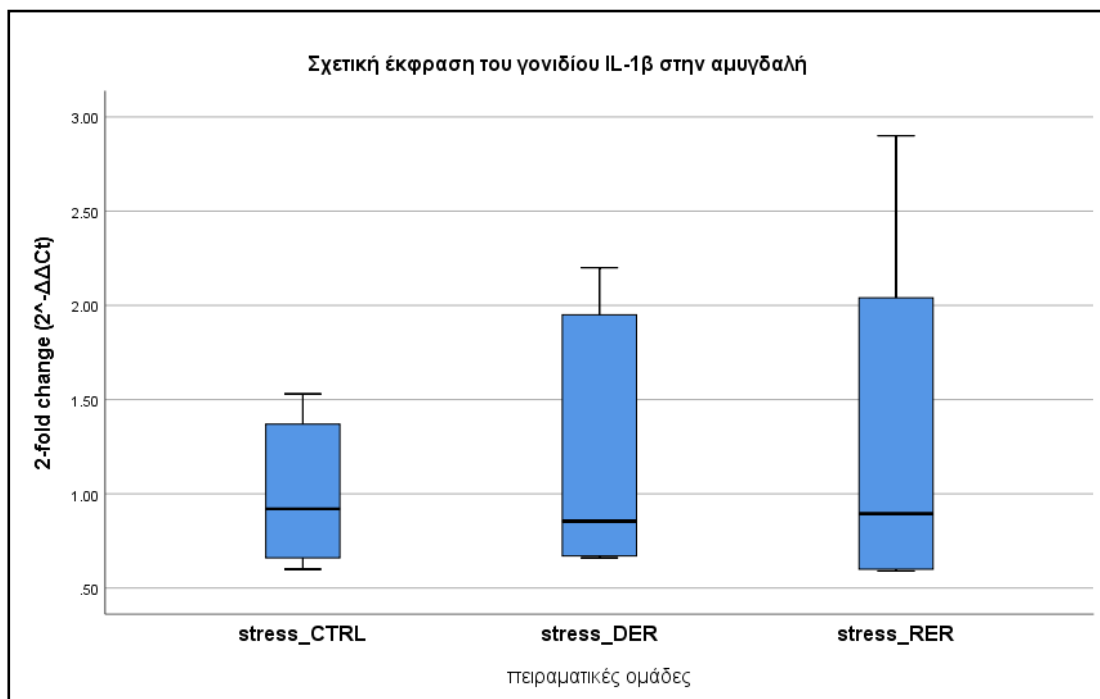
Η ανάλυση της διακύμανσης (One way ANOVA) της σχετικής έκφρασης των γονιδίων IL-1β, TNFa στις υπό μελέτη εγκεφαλικές περιοχές μετά από διαδοχική έκθεση σε ELS και CSD δεν έδωσε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα (IL1b_HIP: $p=0,361$ / IL1b_PFC: $p=0,788$ / IL1b_AMY: $p=0,779$ / TNFa_HIP: $p=0,950$ / TNFa_PFC: $p=0,666$ / TNFa_AMY: $p=0,126$). Οι κατανομές φαίνονται στα γραφήματα 11-16.



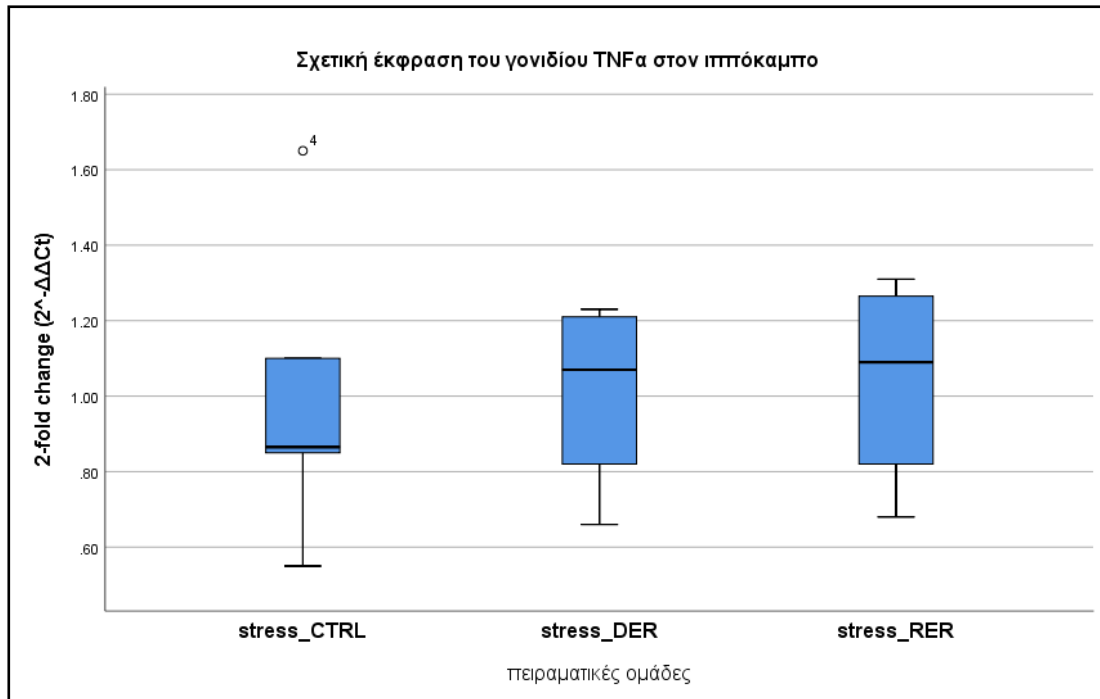
Γράφημα 11. Κατανομή της σχετικής έκφρασης του γονιδίου IL-1β στον ιππόκαμπο στις πειραματικές ομάδες που εκτέθηκαν σε στρες ως ενήλικα ($p=0,361$).



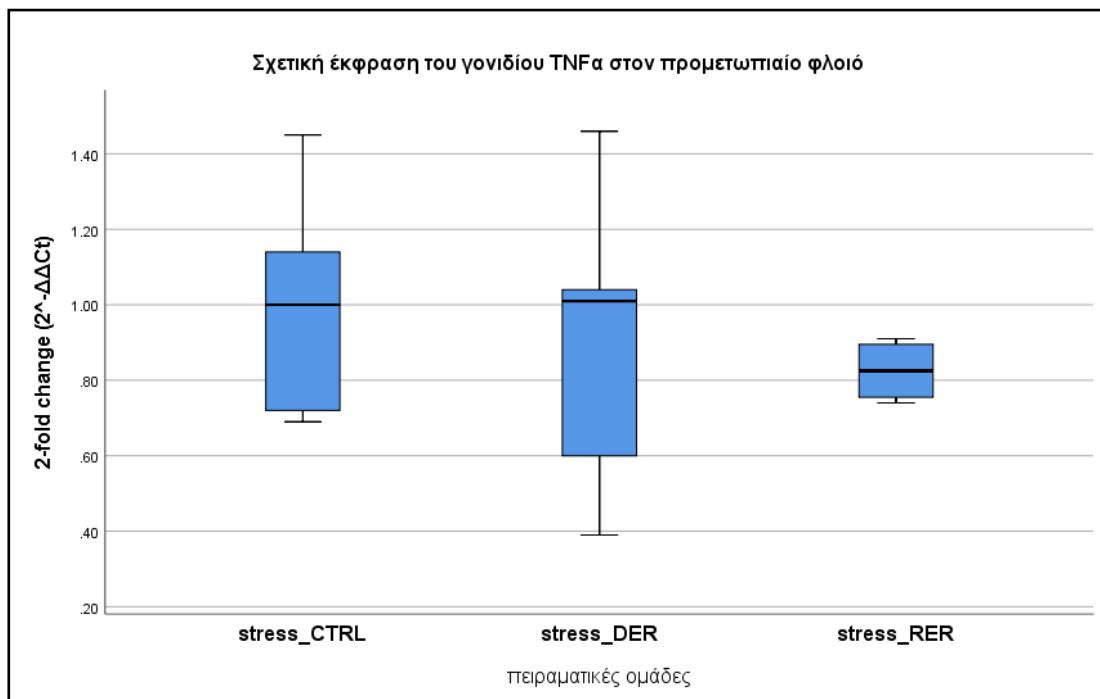
Γράφημα 12. Κατανομή της σχετικής έκφρασης του γονιδίου IL-1β στον προμετωπιαίο φλοιό στις πειραματικές ομάδες που εκτέθηκαν σε στρες ως ενήλικα ($p=0,788$).



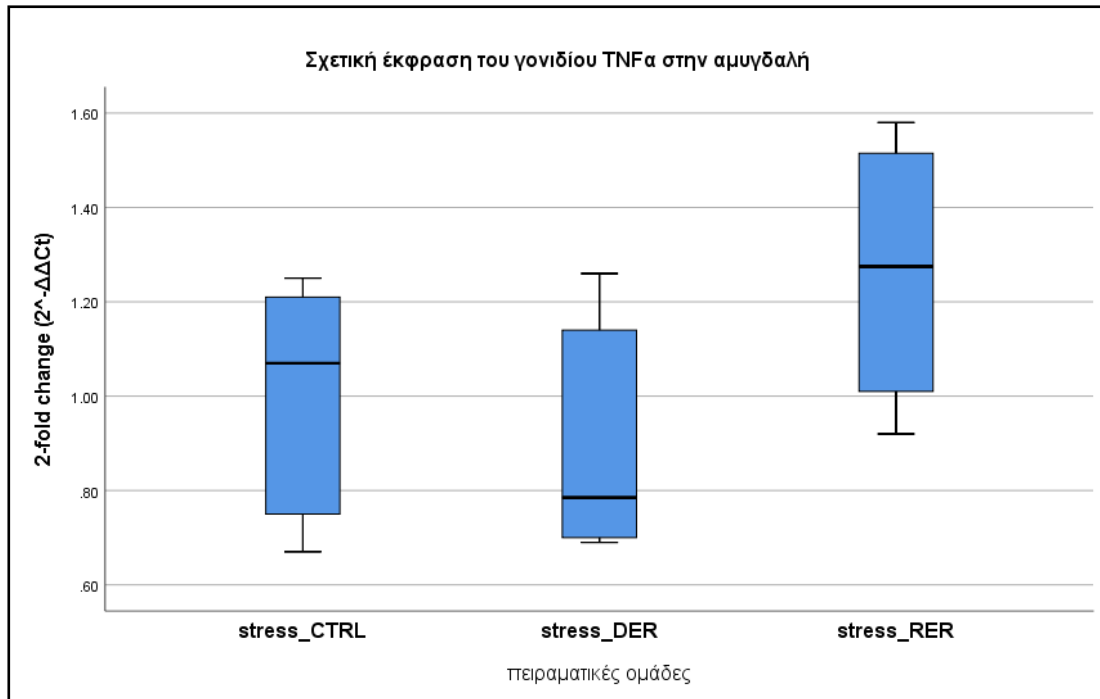
Γράφημα 13. Κατανομή της σχετικής έκφρασης του γονιδίου IL-1β στην αμυγδαλή στις πειραματικές ομάδες που εκτέθηκαν σε στρες ως ενήλικα ($p=0,779$).



Γράφημα 14. Κατανομή της σχετικής έκφρασης του γονιδίου TNFα στον ιππόκαμπο στις πειραματικές ομάδες που εκτέθηκαν σε στρες ως ενήλικα ($p=0,950$).



Γράφημα 15. Κατανομή της σχετικής έκφρασης του γονιδίου TNFα στον προμετωπιαίο φλοιό στις πειραματικές ομάδες που εκτέθηκαν σε στρες ως ενήλικα ($p=0,666$).



Γράφημα 16. Κατανομή της σχετικής έκφρασης του γονιδίου TNFα στην αμυγδαλή στις πειραματικές ομάδες που εκτέθηκαν σε στρες ως ενήλικα ($p=0,126$).

14. Συγκεντρωτικός πίνακας στατιστικά σημαντικών αποτελεσμάτων

Στο παρακάτω πίνακα αναφέρονται συγκεντρωμένα όλα τα στατιστικά σημαντικά ευρήματα της παρούσας μελέτης.

Πίνακας 9. Συγκεντρωτικός πίνακας στατιστικά σημαντικών αποτελεσμάτων.

Παράγοντας σύγκρισης	Εγκεφαλική περιοχή	Πειραματικές ομάδες	Λόγος (α/β)	Στατιστική σημαντικότητα (p)
Iba1+	Ιππόκαμπος	stress_DER/ stress_CTRL	1.548	0.006
Iba1+	Ιππόκαμπος	stress_DER/ basal_DER	1.527	0.009
Iba1+	Προμετωπιαίος φλοιός	stress_DER/ stress_CTRL	1.551	0.038
Iba1+	Προμετωπιαίος φλοιός	stress_DER/ basal_DER	1.549	0.024
PPAR γ $2^{-\Delta\Delta Ct}$	Ιππόκαμπος	stress_DER/ stress_CTRL	1.490	0,048

ΥΠΟΜΝΗΜΑ: Iba1+ : αριθμός Iba-1 ανοσοθετικών μικρογλοιακών κυττάρων,
PPAR γ $2^{-\Delta\Delta Ct}$: Σχετική έκφραση του γονιδίου PPAR γ

E. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

15. Συμπεράσματα

Είναι κοινώς αποδεκτό, και υποστηρίζεται από ένα μεγάλο εύρος ερευνών, ότι η έκθεση στο στρες στα αρχικά στάδια της ζωής, τόσο προγεννητικά (1) όσο και μεταγεννητικά (3) μπορεί να επιδράσει στις συναισθηματικές και γνωστικές ικανότητες του ατόμου κατά την ενήλικη ζωή (2). Όπως έχει φανεί από αρκετές μελέτες σε επίμυες, οι αλλαγές αυτές μπορούν, επίσης, να επηρεάσουν και να μεταβάλλουν τον προγραμματισμό των νευροενδοκρινικών και νευροανοσολογικών συστημάτων των ζώων, όπως για παράδειγμα τον άξονα ΥΥΕ (υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων) (4). Οι αλλαγές αυτές μπορεί να συμβαίνουν κατά τις πρώτες μέρες ζωής, διατηρούνται ωστόσο και εκδηλώνονται και κατά την ενήλικη ζωή των ζώων (180). Έτσι, υπάρχει ένα τεράστιο ενδιαφέρον για τη μελέτη της επίδρασης των πρώιμων εμπειριών στο εγκέφαλο των νεαρών επίμυων αλλά και των μηχανισμών που συμμετέχουν για την διατήρηση αυτών των αλλαγών στην ενήλικη ζωή τους, και κατά πόσο αυτά τα ευρήματα μπορούν να συσχετιστούν και με την ανθρώπινη φυσιολογία και συμπεριφορά.

Έτσι, στην παρούσα μελέτη ως πρωτογενής στόχος τέθηκε η διερεύνηση της συσχέτισης του στρες στην πρώιμη νεογνική περίοδο, στην ενήλικη ζωή και σε διαδοχή αυτών α) με μεταβολές στο πλήθος της μικρογλοίας και β) με μεταβολές στην έκφραση του αντιφλεγμονώδους γονιδίου PPAR γ και των προφλεγμονωδών γονιδίων IL-1 β , TNF α , στο ν εγκέφαλο. Κατ' αυτόν τον τρόπο οι μοριακοί αυτοί δείκτες χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της "Υπόθεσης των δύο χτυπημάτων" (5,118,119) και υποθέσεων που εμπλέκουν το στρες με τη φλεγμο ή και την εμφάνιση κατάθλιψης όπως η υπόθεση της νευροφλεγμονής, του φλεγμονοσώματος, της περιφερικής ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού, της μειωμένης ανοσίας μετά από χρόνιο στρες (41).

Ως ενήλικη στρες επιλέχθηκε η δοκιμασία της χρόνιας κοινωνικής ήττας: το κυρίαρχο ζωικό πειραματικό μοντέλο για την εκτίμηση της επίπτωσης του ψυχοκοινωνικού στρες στους ενήλικες και τη μελέτη προδιαθεσικών παραγόντων για την εμφάνιση ψυχιατρικών διαταραχών (50). Ως στρες της πρώιμης ζωής επιλέχθηκε η εκπαίδευση επίμυων σε λαβύρινθο σχήματος T υπό συνθήκες άρνησης ή λήψης ανταμοιβής. Ένα μοντέλο ήπιας νεογνικής αντιξοότητας του εργαστηρίου μας που φαίνεται να αναπαράγει εύστοχα τη μητρική παραμέληση (157).

Η εκπαίδευση σε λαβύρινθο σχήματος «T» (156,162) αν και αναπτύχθηκε με αρχικό στόχο τον έλεγχο της χωρικής μάθησης στους επίμυες, στην παρούσα μελέτη θα μπορούσε η δοκιμασία αυτή να ειδοθεί ως ένα ήπιο στρες κατά την πρώιμη ηλικία. Τη μία πειραματική ομάδα που εκπαιδεύτηκε υπό συνεχόμενη ενίσχυση, μπορούμε να την προσεγγίσουμε ως νεογνά τα οποία εκτέθηκαν σε ήπιο στρες (απομάκρυνση από τη μητέρα) και έπειτα έλαβαν μητρική φροντίδα η οποία έδρασε επανορθωτικά, ενώ η άλλη πειραματική ομάδα, που εκπαιδεύτηκε υπό συνεχόμενη ματαίωση, εκτέθηκε στο ίδιο ήπιο στρες, μόνο που δεν έλαβε άμεσα την «προσδοκώμενη» φροντίδα παρά την παρουσία της μητέρας, γεγονός που μπορεί να θεωρηθεί ως επιπλέον στρες (156,162).

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι στη νεογνική ηλικία η επαφή με τη μητέρα κατέχει εξέχουσα σημασία για την επιβίωση και την ομαλή ανάπτυξη του εγκεφάλου του οργανισμού και συγκαταλέγεται σε αυτήν την ομάδα των ερεθισμάτων ανταμοιβής που καλούνται πρωτογενείς ενισχυτές (181). Έτσι, η όλη εμπειρία επαφής με τη μητέρα ή αποστέρησής της προκαλεί τη γέννηση συναισθηματικών αποκρίσεων από τα νεογνά. Σύμφωνα με αυτό, τα συναισθήματα μπορούν να προσδιοριστούν ως αποκρίσεις που προκαλούνται από την επίδραση ερεθισμάτων ανταμοιβής ή τιμωρίας. Η απογοήτευση (ή ματαίωση), ο θυμός ή η λύπη μπορεί να προκύψουν από την παράλειψη μιας αναμενόμενης ανταμοιβής ή τον τερματισμό μιας ανταμοιβής (182). Η γαλουχία και η μητρική φροντίδα (licking and grooming) παρέχει θετικά, ενισχυτικά ερεθίσματα, ενώ η άρνηση της μητρικής επαφής επιδρά ως αρνητικό, ματαιωτικό ερέθισμα (183).

Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας, όσον αφορά την εκπαίδευση των νεογνών σε λαβύρινθο σχήματος T υπό συνθήκες άρνησης ανταμοιβής (DER), έδειξαν ότι δεν επηρεάζει το πλήθος της μικρογλοίας στον ενήλικο προμετωπιαίο φλοιό (MO/IL, medial orbital/infralimbic cortex) (157). Αντίθετα, όταν ελέγχθηκε ο εγκέφαλος των νεογνών κατά τη διάρκεια της τετραήμερης εκπαίδευσης, φάνηκε ότι την 3η και 4η ημέρα εκπαίδευσης (PND12-13), ενώ όχι την 1η και 2η (PND10-11), η πυκνότητα της μικρογλοίας αυξάνεται (157).

Άλλες έρευνες του εργαστηρίου, όσον αφορά την έκθεση σε χρόνιο στρες κοινωνικής ήττας, έδειξαν ότι τα DER ζώα εμφανίζουν ανηδονία ως ενήλικα, και σε βασικές συνθήκες αλλά και μετά από έκθεση σε χρόνιο κοινωνικό στρες, όπως αυτό αποτυπώνεται μέσω της απουσία προτίμησης στη σουκρόζη στοιχείο ζωικού καταθλιπτικόμορφου φαινοτύπου (184).

Άλλη μελέτη του εργαστηρίου έδειξε ότι η έκθεση των DER ζώων σε χρόνιο κοινωνικό στρες (CSS) οδήγησε σε μόνιμη μείωση της προσαρμοστικότητας τους (τεστ ανοιχτού πεδίου: μειωμένη κινητικότητα και χρόνος παραμονής στο κέντρο), ενδεικτικό άγχους ή/και μειωμένου κινήτρου για εξερεύνηση (184). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι όλα τα "stressed" ζώα εμφάνισαν αρχικά (τις δυο πρώτες βδομάδες) μείωση της προσαρμοστικότητας, με τη διαφορά ότι όλα ανέκαμψαν (stressed_CTRL stressed_DER), εκτός από τα stressed_DER. Τα ίδια ζώα εμφάνισαν επίσης παθητικότητα στη διαχείριση του στρες (τεστ εξαναγκασμένης κολύμβησης: αυξημένος χρόνος ακινησίας) (184).

Παράλληλα, τα τελευταία δέκα χρόνια, αυξανόμενος αριθμός μελετών διερευνά τη συσχέτιση της μικρογλοίας και του στρες σε διάφορα πειραματικά μοντέλα (5), και αρκετές εξ αυτών αφορούν τις πρώιμες στρεσογόνες εμπειρίες (5–8,8–29). Ο μοριακός δείκτης που χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο είναι ο Iba-1, ενώ σε λιγότερες περιπτώσεις οι CD11b, CD45, CD68, CX3CR1. Όσον αφορά το ανοσολογικό της προφίλ οι κυτοκίνες που κυρίως έχουν μελετηθεί είναι η IL-1β, TNFα και IL-6 (41,88,90,185–187). Ένα γενικό συμπέρασμα που προκύπτει από τις μελέτες αυτές είναι ότι καθοριστικό ρόλο παίζει το είδος του στρες, η αναπτυξιακή περίοδος στην οποία εκτίθεται ο οργανισμός στο στρες και η διάρκεια του.

Έτσι, στη μελέτη μας επιλέξαμε, μέσω του ανοσοεντοπισμού της πρωτεΐνης Iba-1 σε τομές εγκεφάλου, να παρακολουθήσουμε το μέγεθος του πληθυσμού της μικρογλοίας στις διάφορες πειραματικές συνθήκες. Παράλληλα μέσω PCR να αναλύσουμε τη γονιδιακή έκφραση σε περιοχές του εγκεφάλου. Τα γονίδια που επιλέχθηκαν ήταν η IL-1β και ο TNFα για το χαρακτηρισμό του φλεγμονώδους προφίλ της, ενώ για τη διερεύνηση της περίπτωσης καταστολής της φλεγμονής επιλέξαμε το γονίδιο PPARγ (100,101). Έτσι πέραν του μικρογλοιακού πληθυσμού σε αριθμητικό επίπεδο προσπαθήσαμε να διερευνήσουμε και τη λειτουργία αυτού.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας έδειξαν ότι από μόνες το ω , ούτε η πρώιμη στρεσογόνος εμπειρία DER ούτε η δοκιμασία χρόνιας κοινωνικής ήττας δεν συνδέονται με αύξηση του αριθμού των μικρογλοιακών κυττάρων. Αλλά φάνηκε ότι όταν έχουμε διαδοχή στρεσογόνων γεγονότων, όπου το νεογνικό στρες ακολουθείται από ενήλικο, τότε παρατηρείται έντονη αύξηση του πληθυσμού της μικρογλοίας σε ποσοστό περίπου 50%, τόσο στον υπόκαμπο όσο και στον προμετωπιαίο φλοιό. Παράλληλα στον υπόκαμπο η διαδοχή αυτή στρεσογόνων γεγονότων συνδέθηκε με

αύξηση της σχετικής έκφρασης του PPAR γ επίσης σε ποσοστό περίπου 50% αλλά όχι στον προμετωπιαίο φλοιό. Η αμυγδαλή φάνηκε να μην επηρεάζεται και στους δύο τύπους αναλύσεων. Όπως επίσης δεν φάνηκε να μεταβάλλεται σε κάθε περίπτωση η έκφραση των IL-1 β και ο TNF α .

Κατά αυτό τον τρόπο η αρχική μας υπόθεση εν μέρη επιβεβαιώθηκε και εν μέρη απορρίφθηκε. Η έκθεση στις στρεσογόνες εμπειρίες μεμονωμένα δεν επηρέασε ούτε τον πληθυσμό της μικρογλοίας ούτε την έκφραση των γονιδίων PPAR γ , IL-1 β , TNF α στον ενήλικο εγκέφαλο. Αυτό συμφωνεί με τη βιβλιογραφία που συχνά επισημαίνει ότι η επίπτωση του στρες στη μικρογλοία έχει τυπολογικά, χρονολογικά και τοπολογικά χαρακτηριστικά, επιπλέον της εξατομικευμένης διαφοροποίησης (5,90,103,188) όπως επίσης και η επίπτωση του στρες στο ανοσοποιητικό γενικότερα (189).

Επιβεβαιώθηκε, όμως, η "Υπόθεση των δύο χτυπημάτων" (46,116,117). Αποδείχτηκε ότι ακόμη και εμπειρίες ήπιας έντασης, όπως η πρόιμη στρεσογόνος εμπειρία DER, μπορεί να επηρεάσει τη μελλοντική αντιδραστικότητα (priming) ενός κυτταρικού τύπου ή ενός μοριακού μηχανισμού. Επιπλέον επιβεβαιώθηκε ότι και η μικρογλοία (στον υπόκαμπο και τον προμετωπιαίο φλοιό) και το γονίδιο PPAR γ (στον υπόκαμπο) υπόκεινται σε priming από την DER εμπειρία. Η διαπίστωση αυτή συμφωνεί με άλλα δεδομένα του εργαστηρίου που συνδέουν τις μακρόχρονες επιπτώσεις της DER εμπειρίας με άλλα συστήματα του εγκεφάλου (19,190).

Για παράδειγμα, έχει δειχθεί ότι τα DER ζώα που εκτίθενται ως ενήλικα στη δοκιμασία χρόνιας κοινωνικής ήττας εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα σεροτονίνης και αυξημένα επίπεδα serotonin turnover (5-HIAA/5-HT) στον υπόκαμπο (184) και αυξημένα επίπεδα σεροτονίνης στον προμετωπιαίο φλοιό (190).

Επίσης ότι τα basal DER ζώα εμφανίζουν μειωμένη πυκνότητα νευρώνων και δενδριτικών ακάνθων στον προμετωπιαίο φλοιό (19).

Η απουσία αύξησης της έκφρασης του PPAR γ και στον προμετωπιαίο φλοιό, όπως αναμέναμε, υποθέτοντας ότι αυτή συνδέεται με την αντίστοιχη αύξηση στον πληθυσμό της μικρογλοίας, ίσως εξηγείται από τη φύση του προμετωπιαίου φλοιού σε αντιδιαστολή με του υποκάμπου. Κατά την απομόνωση των ιστών για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης χρησιμοποιήθηκε ολόκληρος ο σχηματισμός του υποκάμπου και ολόκληρη η περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού. Εν αντιθέσει με την καταμέτρηση της μικρογλοίας που έγινε σε πολύ πιο συγκεκριμένες υποπεριοχές (HIP: hilus of DG, PFC: A25) Ο υπόκαμπος είναι ένας μικρότερος ιστός και το

στρες επιδρά με έναν σχετικά ομοιογενή τρόπο σε αυτόν. Αντίθετα, για τον προμετωπιαίο φλοιό έχει συχνά επισημανθεί ότι σε κάθε υποπεριοχή οι επιδράσεις είναι αρκετά διαφορετικές έως και αντίθετες (157,191). Αυτό συνεπάγεται ότι αντιμετωπίζοντας τον ως έναν ενιαίο σχηματισμό, τοπολογικά εξειδικευμένες αντιθετικές επιδράσεις πιθανώς να εξομοιώνονται στην τελική συνολική εικόνα που εμφανίζει.

Μία ερμηνεία για την αύξηση του PPAR γ και τη εν παραλλήλω μη μεταβολή των IL-1 β , TNF α ίσως είναι το γεγονός ότι η αύξηση του πληθυσμού της μικρογλοίας δεν συνεπάγεται απαραίτητως και εκδήλωση φλεγμονής. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι η μικρογλοία έχει έναν δυναμικό χαρακτήρα και βρίσκεται σε μία συνεχή μεταβατική κατάσταση, μεταπίπτοντας μεταξύ των καταστάσεων M0 (αδρανής), M1 (προφλεγμονώδης), M2 (αντιφλεγμονώδης) (5,97,98). Άρα η αύξηση του πληθυσμού της μικρογλοίας θα μπορούσε να αφορά τον M0 ή M2 φαινότυπο.

Μία άλλη ερμηνεία θα μπορούσε να είναι ότι ακόμη και εάν ο χαρακτήρας της συγκεκριμένης μικρογλοιακής αύξησης είναι προφλεγμονώδης (M1), η αυξημένη έκφραση του PPAR γ δύναται να εξισορροπήσει το συγκεκριμένο φαινόμενο, καθώς έχει δειχθεί ότι ο PPAR γ επάγει τον νευροπροστατευτικό M2 φαινότυπο της μικρογλοίας (87), αναστέλλει την έκκριση προφλεγμονωδών παραγόντων από τη μικρογλοία (όπως ο TNF α) και επάγει τη λύση της φλεγμονής στο μικροπεριβάλλον (100,101).

Έτσι η αύξηση του πληθυσμού της μικρογλοίας μπορεί να αφορά την νευροπροστατευτική της δράση και να αποτελεί μία έμμεση απόδειξη της έντονης διατάραξης της ομοιόστασης του ΚΝΣ και της ανάγκης για συνεισφορά στην πλαστικότητα του εγκεφάλου.

Βέβαια, δεδομένων των πειραμάτων που δείχνουν συμπεριφορικά μειωμένη προσαρμοστικότητα των συγκεκριμένων ζώων (184), αυτή η έντονα αυξημένη νευροπροστατευτική δράση μπορεί ίσως να έχει αρνητικά αποτελέσματα για τον οργανισμό (π.χ. μέσω over-pruning συνάψεων ή έναρξη αποπτωτικών νευρωνικών μονοπατιών), κάτι ανάλογο της αυτοανοσίας που παρατηρείται στο σωματικό ανοσοποιητικό σύστημα και που συνδέεται με την έκθεση σε στρες (189,192).

Η απουσία επίδρασης σε κάθε περίπτωση στην αμυγδαλή, είναι ένα φαινόμενο που συμφωνεί και με δεδομένα άλλων εργαστηρίων που δεν έχουν βρει αλλαγές στη μικρογλοία μετά από έκθεση σε στρες (188). Αυτό ίσως να ερμηνεύεται από το ότι η αμυγδαλή θεωρείται ότι συμμετέχει κυρίως στην εκτίμηση των περιβαλλοντικών

ερεθισμάτων για να δώσει σήμα εκκίνησης της απόκρισης στρες και όχι στην ίδια την απόκριση (193). Επίσης, η αμυγδαλή, λόγω της πολύ χαμηλότερης ταχύτητας ωρίμανσης και της μεγαλύτερης διάρκειας μέχρι την πλήρη ωρίμανση της, εμφανίζει εμφανώς μειωμένη ευαλωτότητα στην έκθεση σε στρες (2).

16. Περιορισμοί της μελέτης-Μελλοντικές προοπτικές

Ένας βασικός περιορισμός της μελέτης ήταν ότι η αξιοποίηση του ανοσοεντοπισμού με Iba-1 έγινε μόνο για την αριθμητική εκτίμηση του πληθυσμού της μικρογλοίας. Αρκετές μελέτες και επισκοπήσεις δείχνουν ότι εκτός από τον αριθμό των κυττάρων ιδιαίτερης σημασίας είναι η πιο αναλυτική μορφολογική εκτίμηση της μικρογλοίας, όπως το σχήμα του κυτταρικού σώματος, το μέγεθος και η πολυπλοκότητα των αποφύδων ή η εκτίμηση του συνολικού σήματος (87,103,194), κάτι που δεν κατέστη δυνατόν τεχνικά. Επιπλέον, όσον αφορά την εκτίμηση του δυναμικού της γονιδιακής έκφρασης της μικρογλοίας, η ανάλυση του ιστού ίσως δίνει ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Αυτό δικαιολογείται από την αραιή διασπορά της μικρογλοίας εντός του εγκεφαλικού ιστού και από τα πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης κυτοκινών που δίνει ως ιστός συνολικά, σε συνδυασμό με τον περιορισμό που θέτει η ευαισθησία της αναλυτικής τεχνικής που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση τους (194). Γι' αυτό η απομόνωση της μικρογλοίας και η καλλιέργεια της *in vitro* αποτελεί μία τεχνική ενίσχυσης που ίσως είναι απαραίτητη για την μελέτη της γονιδιακής έκφρασης αυτού του κυτταρικού πληθυσμού (194,195). Επιπλέον η απουσία πειραμάτων με διαγονιδιακά ζώα ή η χρήση αναστολέα ή επαγωγέα της μικρογλοίας (196) δεν μας επιτρέπει να πούμε αν τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν έχουν αιτιολογική σχέση ή αποτελούν επιφανόμενο.

17. Επίλογος

Σε κάθε περίπτωση βέβαια, τα δεδομένα δείχνουν μία σαφή τάση. Μια πρόιμη εμπειρία, ακόμη και ήπια, ακόμη και σύντομη, που προκαλεί στρες σε ένα νεογνό επίμυ, είναι ικανή να μεταβάλλει τη βιοχημεία και τη φυσιολογία του εγκεφάλου του σε τέτοιο βαθμό που να το καθιστά σαφώς πιο ευάλωτο ως ενήλικο σε μια μεταγενέστερη έκθεση σε άλλης μορφής ψυχοκοινωνικό στρες. Αυτό το φαινόμενο έχει σημαντικές φυσιολογικές και συμπεριφορικές επιπτώσεις για τον οργανισμό και ενοχοποιείται στην παθογένεια της κατάθλιψης, καθώς και άλλων ψυχιατρικών και

σωματικών διαταραχών. Η εμπλοκή του ανοσοποιητικού συστήματος σε αυτό το φαινόμενο, ισχυροποιεί τη σοβαρότητα του αλλά και την ανάγκη διερεύνησης του, ενώ παράλληλα ανοίγει ένα νέο κεφάλαιο στη μελέτη του ψυχοκοινωνικού στρες και των επιπτώσεων του. Με πολλά κενά γνώσης αλλά και εξίσου πολλές δυνατότητες έρευνας.

ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Glover V. Maternal stress or anxiety in pregnancy and emotional development of the child. *Br J Psychiatry*. 1997 Aug;171(2):105–6.
2. Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci*. 2009 Jun;10(6):434–45.
3. Pollak SD, Nelson CA, Schlaak MF, Roeber BJ, Wewerka SS, Wiik KL, et al. Neurodevelopmental effects of early deprivation in postinstitutionalized children. *Child Dev*. 2010 Feb;81(1):224–36.
4. Meagher MW, Sieve AN, Johnson RR, Satterlee D, Belyavskiy M, Mi W, et al. Neonatal maternal separation alters immune, endocrine, and behavioral responses to acute Theiler's virus infection in adult mice. *Behav Genet*. 2010 Mar;40(2):233–49.
5. Calcia MA, Bonsall DR, Bloomfield PS, Selvaraj S, Barichello T, Howes OD. Stress and neuroinflammation: a systematic review of the effects of stress on microglia and the implications for mental illness. *Psychopharmacology (Berl)*. 2016 May;233(9):1637–50.
6. Cohen S, Ke X, Liu Q, Fu Q, Majnik A, Lane R. Adverse early life environment increases hippocampal microglia abundance in conjunction with decreased neural stem cells in juvenile mice. *Int J Dev Neurosci Off J Int Soc Dev Neurosci*. 2016 Dec;55:56–65.
7. Takatsuru Y, Koibuchi N. Alteration of somatosensory response in adulthood by early life stress. *Front Mol Neurosci*. 2015;8:15.
8. Bilbo SD, Newsom NJ, Sprunger DB, Watkins LR, Rudy JW, Maier SF. Differential effects of neonatal handling on early life infection-induced alterations in cognition in adulthood. *Brain Behav Immun*. 2007 Mar;21(3):332–42.
9. Gong Y, Tong L, Yang R, Hu W, Xu X, Wang W, et al. Dynamic changes in hippocampal microglia contribute to depressive-like behavior induced by early social isolation. *Neuropharmacology*. 2018 Mar 21;135:223–33.
10. Saavedra LM, Fenton Navarro B, Torner L. Early Life Stress Activates Glial Cells in the Hippocampus but Attenuates Cytokine Secretion in Response to an Immune Challenge in Rat Pups. *Neuroimmunomodulation*. 2017;24(4–5):242–55.
11. Wei L, Simen A, Mane S, Kaffman A. Early life stress inhibits expression of a novel innate immune pathway in the developing hippocampus. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol*. 2012 Jan;37(2):567–80.

12. Delpuch J-C, Wei L, Hao J, Yu X, Madore C, Butovsky O, et al. Early life stress perturbs the maturation of microglia in the developing hippocampus. *Brain Behav Immun*. 2016 Oct;57:79–93.
13. Kazl C, Foote LT, Kim M-J, Koh S. Early-life experience alters response of developing brain to seizures. *Brain Res*. 2009 Aug 18;1285:174–81.
14. Schwarz JM, Hutchinson MR, Bilbo SD. Early-life experience decreases drug-induced reinstatement of morphine CPP in adulthood via microglial-specific epigenetic programming of anti-inflammatory IL-10 expression. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2011 Dec 7;31(49):17835–47.
15. Wang H-T, Huang F-L, Hu Z-L, Zhang W-J, Qiao X-Q, Huang Y-Q, et al. Early-Life Social Isolation-Induced Depressive-Like Behavior in Rats Results in Microglial Activation and Neuronal Histone Methylation that Are Mitigated by Minocycline. *Neurotox Res*. 2017 May;31(4):505–20.
16. Takatsuru Y, Nabekura J, Ishikawa T, Kohsaka S, Koibuchi N. Early-life stress increases the motility of microglia in adulthood. *J Physiol Sci JPS*. 2015 Mar;65(2):187–94.
17. Hoeijmakers L, Ruigrok SR, Amelanchik A, Ivan D, van Dam A-M, Lucassen PJ, et al. Early-life stress lastingly alters the neuroinflammatory response to amyloid pathology in an Alzheimer’s disease mouse model. *Brain Behav Immun*. 2017 Jul;63:160–75.
18. Somera-Molina KC, Nair S, Van Eldik LJ, Watterson DM, Wainwright MS. Enhanced microglial activation and proinflammatory cytokine upregulation are linked to increased susceptibility to seizures and neurologic injury in a “two-hit” seizure model. *Brain Res*. 2009 Jul 28;1282:162–72.
19. Stamatakis A, Manatos V, Kalpachidou T, Stylianopoulou F. Exposure to a mildly aversive early life experience leads to prefrontal cortex deficits in the rat. *Brain Struct Funct*. 2016;221(8):4141–57.
20. Roque A, Ochoa-Zarzosa A, Torner L. Maternal separation activates microglial cells and induces an inflammatory response in the hippocampus of male rat pups, independently of hypothalamic and peripheral cytokine levels. *Brain Behav Immun*. 2016;55:39–48.
21. Chocyk A, Dudys D, Przyborowska A, Majcher I, Maćkowiak M, Wędzony K. Maternal separation affects the number, proliferation and apoptosis of glia cells in the substantia nigra and ventral tegmental area of juvenile rats. *Neuroscience*. 2011 Jan 26;173:1–18.
22. Gracia-Rubio I, Moscoso-Castro M, Pozo OJ, Marcos J, Nadal R, Valverde O. Maternal separation induces neuroinflammation and long-lasting emotional alterations in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2016 Feb 4;65:104–17.

23. Genty J, Tetsi Nomigni M, Anton F, Hanesch U. Maternal separation stress leads to resilience against neuropathic pain in adulthood. *Neurobiol Stress*. 2018 Feb;8:21–32.
24. Bolton JL, Huff NC, Smith SH, Mason SN, Foster WM, Auten RL, et al. Maternal stress and effects of prenatal air pollution on offspring mental health outcomes in mice. *Environ Health Perspect*. 2013 Sep;121(9):1075–82.
25. Nelson LH, Lenz KM. Microglia depletion in early life programs persistent changes in social, mood-related, and locomotor behavior in male and female rats. *Behav Brain Res*. 2017 01;316:279–93.
26. Wang C-Y, Cheng C-W, Wang W-H, Chen P-S, Tzeng S-F. Postnatal Stress Induced by Injection with Valproate Leads to Developing Emotional Disorders Along with Molecular and Cellular Changes in the Hippocampus and Amygdala. *Mol Neurobiol*. 2016;53(10):6774–85.
27. Giovanoli S, Engler H, Engler A, Richetto J, Feldon J, Riva MA, et al. Preventive effects of minocycline in a neurodevelopmental two-hit model with relevance to schizophrenia. *Transl Psychiatry*. 2016 Apr 5;6:e772.
28. Kim Y-K, Na K-S. Role of glutamate receptors and glial cells in the pathophysiology of treatment-resistant depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2016 03;70:117–26.
29. Tang H-L, Zhang G, Ji N-N, Du L, Chen B-B, Hua R, et al. Toll-Like Receptor 4 in Paraventricular Nucleus Mediates Visceral Hypersensitivity Induced by Maternal Separation. *Front Pharmacol*. 2017;8:309.
30. Chrousos GP. Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol*. 2009 Jul 1;5(7):374–81.
31. McEwen BS, Bowles NP, Gray JD, Hill MN, Hunter RG, Karatsoreos IN, et al. Mechanisms of stress in the brain. *Nat Neurosci*. 2015 Oct;18(10):1353–63.
32. LeDoux JE. Emotion: clues from the brain. *Annu Rev Psychol*. 1995;46:209–35.
33. Chrousos GP. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Ann N Y Acad Sci*. 1998 Jun 30;851:311–35.
34. Chrousos GP. The stress response and immune function: clinical implications. The 1999 Novera H. Spector Lecture. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;917:38–67.
35. Oakley RH, Cidlowski JA. The Biology of the Glucocorticoid Receptor: New Signaling Mechanisms in Health and Disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Nov;132(5):1033–44.
36. Deak T, Kudinova A, Lovelock DF, Gibb BE, Hennessy MB. A multispecies approach for understanding neuroimmune mechanisms of stress. *Dialogues Clin Neurosci*. 2017;19(1):37–53.

37. Kettenmann H, Hanisch U-K, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev.* 2011 Apr;91(2):461–553.
38. Padgett DA, Glaser R. How stress influences the immune response. *Trends Immunol.* 2003 Aug;24(8):444–8.
39. Irwin MR, Cole SW. Reciprocal regulation of the neural and innate immune systems. *Nat Rev Immunol.* 2011 Sep;11(9):625–32.
40. Gyoneva S, Traynelis SF. Norepinephrine modulates the motility of resting and activated microglia via different adrenergic receptors. *J Biol Chem.* 2013 May 24;288(21):15291–302.
41. Singhal G, Baune BT. Microglia: An Interface between the Loss of Neuroplasticity and Depression. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:270.
42. McCusker RH, Kelley KW. Immune–neural connections: how the immune system’s response to infectious agents influences behavior. *J Exp Biol.* 2013 Jan 1;216(1):84–98.
43. Epigenetics - Latest research and news | Nature [Internet]. [cited 2017 Jul 9]. Available from: <https://www.nature.com/subjects/epigenetics>
44. Επιγενετική και περιβαλλοντικές εκθέσεις | HCDCP [Internet]. [cited 2017 Jul 9]. Available from: <http://www2.keelpno.gr/blog/?p=2860>
45. Krishnan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression. *Nature.* 2008 Oct 16;455(7215):894–902.
46. Lewis CR, Olive MF. Early life stress interactions with the epigenome: potential mechanisms driving vulnerability towards psychiatric illness. *Behav Pharmacol.* 2014 Sep;25(5 0 6):341–51.
47. Waddington CH. The epigenotype. 1942. *Int J Epidemiol.* 2012 Feb;41(1):10–3.
48. Tsankova N, Renthal W, Kumar A, Nestler EJ. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci.* 2007 May;8(5):355–67.
49. Toyoda A. Social defeat models in animal science: What we have learned from rodent models. *Anim Sci J Nihon Chikusan Gakkaiho.* 2017 Jul;88(7):944–52.
50. Slattery DA, Cryan JF. Modelling depression in animals: at the interface of reward and stress pathways. *Psychopharmacology (Berl).* 2017 May;234(9–10):1451–65.
51. Blanchard RJ, McKittrick CR, Blanchard DC. Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiol Behav.* 2001 Jun;73(3):261–71.
52. Cunliffe VT. The epigenetic impacts of social stress: how does social adversity become biologically embedded? *Epigenomics.* 2016 Dec;8(12):1653–69.

53. Resources and tools [Internet]. UNICEF. [cited 2017 Jul 9]. Available from: https://www.unicef.org/earlychildhood/index_resources.html
54. Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci*. 2009 Jun;10(6):434–45.
55. Silberman DM, Acosta GB, Zorrilla Zubilete MA. Long-term effects of early life stress exposure: Role of epigenetic mechanisms. *Pharmacol Res*. 2016 Jul 1;109:64–73.
56. Cao-Lei L, Laplante DP, King S. Prenatal Maternal Stress and Epigenetics: Review of the Human Research. *Curr Mol Biol Rep*. 2016 Mar 1;2(1):16–25.
57. Hao Y, Metz GAS. Non-genetic Inheritance of Behaviour and Stress Resilience. *Non-Genet Inherit*. 2013;1:9–16.
58. Chrousos G. P. Stress and Epigenetics 2017. Presentation presented at;
59. Essentials for Childhood Framework|Child Maltreatment|Violence Prevention|Injury Center|CDC [Internet]. [cited 2017 Jul 9]. Available from: <https://web.archive.org/web/20160121080529/http://www.cdc.gov/80/violenceprevention/childmaltreatment/essentials.html>
60. About the CDC-Kaiser ACE Study Error processing SSI file
 [Internet]. [cited 2017 Jul 9]. Available from: <https://www.cdc.gov/violenceprevention/acestudy/about.html>
61. Bremne JD, Vermetten E. Stress and development: behavioral and biological consequences. *Dev Psychopathol*. 2001;13(3):473–89.
62. McEwen BS. Early life influences on life-long patterns of behavior and health. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2003;9(3):149–54.
63. De Bellis MD, A.B. AZ. “The Biological Effects of Childhood Trauma.” *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am*. 2014 Apr;23(2):185–222.
64. Bernal J. Thyroid hormone receptors in brain development and function. *Nat Rev Endocrinol*. 2007 Mar;3(3):249–59.
65. Griffiths BB, Hunter RG. Neuroepigenetics of stress. *Neuroscience*. 2014 Sep 5;275:420–35.
66. Gray JD, Rubin TG, Hunter RG, McEwen BS. Hippocampal gene expression changes underlying stress sensitization and recovery. *Mol Psychiatry*. 2014 Nov;19(11):1171–8.
67. de Kloet ER, Fitzsimons CP, Datson NA, Meijer OC, Vreugdenhil E. Glucocorticoid signaling and stress-related limbic susceptibility pathway: about receptors, transcription machinery and microRNA. *Brain Res*. 2009 Oct 13;1293:129–41.

68. Σταματάκης Αντώνης. Διάλεξη στα πλαίσια του μαθήματος Ψυχονευροενδοκρινολογία με τίτλο "Πρώιμες εμπειρίες" στα πλαίσια του ΔΠΜΣ "Η επιστήμη του στρες και η προαγωγή της υγείας".
69. Klengel T, Binder EB. Epigenetics of Stress-Related Psychiatric Disorders and Gene × Environment Interactions. *Neuron*. 2015 Jun 17;86(6):1343–57.
70. Levine A, Worrell TR, Zimnisky R, Schmauss C. Early life stress triggers sustained changes in histone deacetylase expression and histone H4 modifications that alter responsiveness to adolescent antidepressant treatment. *Neurobiol Dis*. 2012 Jan;45(1):488–98.
71. Anier K, Malinovskaja K, Pruus K, Aonurm-Helm A, Zharkovsky A, Kalda A. Maternal separation is associated with DNA methylation and behavioural changes in adult rats. *Eur Neuropsychopharmacol J Eur Coll Neuropsychopharmacol*. 2014 Mar;24(3):459–68.
72. Bohacek J, Gapp K, Saab BJ, Mansuy IM. Transgenerational epigenetic effects on brain functions. *Biol Psychiatry*. 2013 Feb 15;73(4):313–20.
73. Nestler EJ, Hyman SE. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci*. 2010 Oct;13(10):1161–9.
74. Hollis F, Kabbaj M. Social defeat as an animal model for depression. *ILAR J*. 2014;55(2):221–32.
75. Meaney MJ. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci*. 2001;24:1161–92.
76. Miczek KA. A new test for aggression in rats without aversive stimulation: differential effects of d-amphetamine and cocaine. *Psychopharmacology (Berl)*. 1979 Feb 28;60(3):253–9.
77. Krishnan V, Han M-H, Graham DL, Berton O, Renthal W, Russo SJ, et al. Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell*. 2007 Oct 19;131(2):391–404.
78. Potegal M, Huhman K, Moore T, Meyerhoff J. Conditioned defeat in the Syrian golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Behav Neural Biol*. 1993 Sep;60(2):93–102.
79. Ruis null, de Groot J null, te Brake JH null, Dinand Ekkel E null, van de Burgwal JA null, Erkens null, et al. Behavioural and physiological consequences of acute social defeat in growing gilts: effects of the social environment. *Appl Anim Behav Sci*. 2001 Jan 6;70(3):201–25.
80. Oliveira RF, Simões JM, Teles MC, Oliveira CR, Becker JD, Lopes JS. Assessment of fight outcome is needed to activate socially driven transcriptional changes in the zebrafish brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Feb 2;113(5):E654-661.

81. Penn JKM, Zito MF, Kravitz EA. A single social defeat reduces aggression in a highly aggressive strain of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jul 13;107(28):12682–6.
82. Rillich J, Stevenson PA. A fighter's comeback: dopamine is necessary for recovery of aggression after social defeat in crickets. *Horm Behav*. 2014 Sep;66(4):696–704.
83. Wallace DL, Han M-H, Graham DL, Green TA, Vialou V, Iñiguez SD, et al. CREB regulation of nucleus accumbens excitability mediates social isolation-induced behavioral deficits. *Nat Neurosci*. 2009 Feb;12(2):200–9.
84. Chuang J-C, Krishnan V, Yu HG, Mason B, Cui H, Cui H, et al. A beta3-adrenergic-leptin-melanocortin circuit regulates behavioral and metabolic changes induced by chronic stress. *Biol Psychiatry*. 2010 Jun 1;67(11):1075–82.
85. Chaouloff F. Social stress models in depression research: what do they tell us? *Cell Tissue Res*. 2013 Oct;354(1):179–90.
86. Christoffel DJ, Golden SA, Dumitriu D, Robison AJ, Janssen WG, Ahn HF, et al. IκB kinase regulates social defeat stress-induced synaptic and behavioral plasticity. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2011 Jan 5;31(1):314–21.
87. Kabba JA, Xu Y, Christian H, Ruan W, Chenai K, Xiang Y, et al. Microglia: Housekeeper of the Central Nervous System. *Cell Mol Neurobiol*. 2017 May 22;
88. Frost JL, Schafer DP. Microglia: Architects of the Developing Nervous System. *Trends Cell Biol*. 2016 Aug 1;26(8):587–97.
89. Paolicelli RC, Ferretti MT. Function and Dysfunction of Microglia during Brain Development: Consequences for Synapses and Neural Circuits. *Front Synaptic Neurosci*. 2017;9:9.
90. Yirmiya R, Rimmerman N, Reshef R. Depression as a Microglial Disease. *Trends Neurosci*. 2015 Oct 1;38(10):637–58.
91. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, editors. *Principles of neural science*. 4th ed. New York: McGraw-Hill, Health Professions Division; 2000. 1414 p.
92. Ma Y, Wang J, Wang Y, Yang G-Y. The biphasic function of microglia in ischemic stroke. *Prog Neurobiol*. 2017 Oct 1;157:247–72.
93. Santambrogio L, Belyanskaya SL, Fischer FR, Cipriani B, Brosnan CF, Ricciardi-Castagnoli P, et al. Developmental plasticity of CNS microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 May 22;98(11):6295–300.
94. Nayak D, Roth TL, McGavern DB. Microglia development and function. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:367–402.
95. Ransohoff RM, Cardona AE. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature*. 2010 Nov 11;468(7321):253–62.

96. Smith PLP, Hagberg H, Naylor AS, Mallard C. Neonatal peripheral immune challenge activates microglia and inhibits neurogenesis in the developing murine hippocampus. *Dev Neurosci*. 2014;36(2):119–31.
97. Franco R, Fernández-Suárez D. Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Prog Neurobiol*. 2015 Aug 1;131(Supplement C):65–86.
98. Verkhratsky A, Noda M. General Physiology and Pathophysiology of Microglia. In: *Neuroinflammation and Neurodegeneration* [Internet]. Springer, New York, NY; 2014 [cited 2018 May 23]. p. 47–60. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4939-1071-7_3
99. Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol*. 2016 Feb;173(4):649–65.
100. Gurley C, Nichols J, Liu S, Phulwani NK, Esen N, Kielian T. Microglia and Astrocyte Activation by Toll-Like Receptor Ligands: Modulation by PPAR- γ Agonists. *PPAR Res*. 2008;2008:453120.
101. Croasdell A, Duffney PF, Kim N, Lacy SH, Sime PJ, Phipps RP. PPAR γ and the Innate Immune System Mediate the Resolution of Inflammation. *PPAR Res*. 2015;2015:549691.
102. Peferoen L, Kipp M, van der Valk P, van Noort JM, Amor S. Oligodendrocyte-microglia cross-talk in the central nervous system. *Immunology*. 2014 Mar;141(3):302–13.
103. Kreisel T, Frank MG, Licht T, Reshef R, Ben-Menachem-Zidon O, Baratta MV, et al. Dynamic microglial alterations underlie stress-induced depressive-like behavior and suppressed neurogenesis. *Mol Psychiatry*. 2014 Jun;19(6):699–709.
104. Ohsawa K, Imai Y, Sasaki Y, Kohsaka S. Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *J Neurochem*. 2004 Feb;88(4):844–56.
105. Karssen AM, Meijer OC, de Kloet ER. Chapter 3.4 - Corticosteroids and the blood–brain barrier. In: Steckler T, Kalin NH, Reul JM, editors. *Techniques in the Behavioral and Neural Sciences* [Internet]. Elsevier; 2005 [cited 2018 May 12]. p. 329–40. (Handbook of Stress and the Brain; vol. 15). Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921070905800197>
106. Frank MG, Weber MD, Watkins LR, Maier SF. Stress sounds the alarmin: the role of the danger-associated molecular pattern HMGB1 in stress-induced neuroinflammatory priming. *Brain Behav Immun*. 2015 Aug;48:1–7.
107. Sorrells SF, Sapolsky RM. An Inflammatory Review of Glucocorticoid Actions in the CNS. *Brain Behav Immun*. 2007 Mar;21(3):259–72.
108. Wohleb ES, Hanke ML, Corona AW, Powell ND, Stiner LM, Bailey MT, et al. β -Adrenergic receptor antagonism prevents anxiety-like behavior and microglial

- reactivity induced by repeated social defeat. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2011 Apr 27;31(17):6277–88.
109. Maes M, Yirmiya R, Noraberg J, Brene S, Hibbeln J, Perini G, et al. The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. *Metab Brain Dis*. 2009 Mar;24(1):27–53.
 110. Sierra A, Gottfried-Blackmore A, Milner TA, McEwen BS, Bulloch K. Steroid hormone receptor expression and function in microglia. *Glia*. 2008 Apr 15;56(6):659–74.
 111. Johnson JD, Zimomra ZR, Stewart LT. Beta-adrenergic receptor activation primes microglia cytokine production. *J Neuroimmunol*. 2013 Jan 15;254(1–2):161–4.
 112. Cohen S, Herbert TB. Health psychology: psychological factors and physical disease from the perspective of human psychoneuroimmunology. *Annu Rev Psychol*. 1996;47:113–42.
 113. Miller GE, Cohen S, Ritchey AK. Chronic psychological stress and the regulation of pro-inflammatory cytokines: a glucocorticoid-resistance model. *Health Psychol Off J Div Health Psychol Am Psychol Assoc*. 2002 Nov;21(6):531–41.
 114. Goshen I, Yirmiya R. Interleukin-1 (IL-1): a central regulator of stress responses. *Front Neuroendocrinol*. 2009 Jan;30(1):30–45.
 115. Pocock JM, Kettenmann H. Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci*. 2007 Oct;30(10):527–35.
 116. Bilbo SD, Schwarz JM. Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system. *Front Behav Neurosci*. 2009;3:14.
 117. Ganguly P, Brenhouse HC. Broken or maladaptive? Altered trajectories in neuroinflammation and behavior after early life adversity. *Dev Cogn Neurosci*. 2015 Feb;11:18–30.
 118. Macrì S, Würbel H. Developmental plasticity of HPA and fear responses in rats: a critical review of the maternal mediation hypothesis. *Horm Behav*. 2006 Dec;50(5):667–80.
 119. Bayer TA, Falkai P, Maier W. Genetic and non-genetic vulnerability factors in schizophrenia: the basis of the “two hit hypothesis.” *J Psychiatr Res*. 1999 Dec;33(6):543–8.
 120. Frank MG, Baratta MV, Sprunger DB, Watkins LR, Maier SF. Microglia serve as a neuroimmune substrate for stress-induced potentiation of CNS pro-inflammatory cytokine responses. *Brain Behav Immun*. 2007 Jan;21(1):47–59.
 121. Chocyk A, Majcher-Maślanka I, Dudys D, Przyborowska A, Wędzony K. Impact of early-life stress on the medial prefrontal cortex functions - a search for

- the pathomechanisms of anxiety and mood disorders. *Pharmacol Rep PR*. 2013;65(6):1462–70.
122. Gracia-Rubio I, Moscoso-Castro M, Pozo OJ, Marcos J, Nadal R, Valverde O. Maternal separation induces neuroinflammation and long-lasting emotional alterations in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2016 Feb 4;65:104–17.
 123. Kazl C, Foote LT, Kim M-J, Koh S. Early-life experience alters response of developing brain to seizures. *Brain Res*. 2009 Aug 18;1285:174–81.
 124. Takatsuru Y, Nabekura J, Ishikawa T, Kohsaka S, Koibuchi N. Early-life stress increases the motility of microglia in adulthood. *J Physiol Sci JPS*. 2015 Mar;65(2):187–94.
 125. Gold PW, Machado-Vieira R, Pavlatou MG. Clinical and biochemical manifestations of depression: relation to the neurobiology of stress. *Neural Plast*. 2015;2015:581976.
 126. Yang L, Zhao Y, Wang Y, Liu L, Zhang X, Li B, et al. The Effects of Psychological Stress on Depression. *Curr Neuropharmacol*. 2015;13(4):494–504.
 127. GBD Results Tool | GHDx [Internet]. [cited 2017 Jul 3]. Available from: <http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool>
 128. WHO | Depression [Internet]. WHO. [cited 2017 Jul 2]. Available from: <http://www.who.int/topics/depression/en/>
 129. WHO | Global burden of disease [Internet]. WHO. [cited 2017 Jul 3]. Available from: http://www.who.int/topics/global_burden_of_disease/en/
 130. Albert PR. Why is depression more prevalent in women? *J Psychiatry Neurosci JPN*. 2015 Jul;40(4):219–21.
 131. Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of depression. *Neuron*. 2002 Mar 28;34(1):13–25.
 132. New thinking means new hope on depression [Internet]. *New Scientist*. [cited 2017 Jul 1]. Available from: <https://www.newscientist.com/article/mg21929273-000-new-thinking-means-new-hope-on-depression/>
 133. DSM-5 [Internet]. [cited 2017 Jul 1]. Available from: <https://www.psychiatry.org/psychiatrists/practice/dsm>
 134. pmhdev. Depression: How effective are antidepressants? *PubMed Health [Internet]*. 2017 Jan 12 [cited 2017 Jul 4]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0087089/>
 135. Andrade C. Stahl's Essential Psychopharmacology: Neuroscientific Basis and Practical Applications. *Mens Sana Monogr*. 2010;8(1):146–50.

136. Krishnan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression. *Nature*. 2008 Oct 16;455(7215):894–902.
137. Mayberg HS. Defining the neural circuitry of depression: toward a new nosology with therapeutic implications. *Biol Psychiatry*. 2007 Mar 15;61(6):729–30.
138. Krishnan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression. *Nature*. 2008 Oct 16;455(7215):894–902.
139. Dean J, Keshavan M. The neurobiology of depression: An integrated view. *Asian J Psychiatry*. 2017 Jun;27:101–11.
140. Drevets WC. Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. *Curr Opin Neurobiol*. 2001 Apr;11(2):240–9.
141. Sheline YI. Neuroimaging studies of mood disorder effects on the brain. *Biol Psychiatry*. 2003 Aug 1;54(3):338–52.
142. Harrison PJ. The neuropathology of primary mood disorder. *Brain J Neurol*. 2002 Jul;125(Pt 7):1428–49.
143. Pittenger C, Duman RS. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol*. 2008 Jan;33(1):88–109.
144. Carlson NR. *Foundations of physiological psychology*. Boston: Pearson A and B; 2005.
145. Hasler Γ. Pathophysiology of depression: Do we have any solid evidence of interest to clinicians? *World Psychiatry*. 2010 Oct;9(3):155–61.
146. Duman RS, Monteggia LM. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry*. 2006 Jun 15;59(12):1116–27.
147. Brouwer JP, Appelhof BC, Hoogendijk WJG, Huyser J, Endert E, Zuketto C, et al. Thyroid and adrenal axis in major depression: a controlled study in outpatients. *Eur J Endocrinol*. 2005 Feb;152(2):185–91.
148. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* [Internet]. Fifth Edition. American Psychiatric Association; 2013 [cited 2018 May 13]. Available from: <https://psychiatryonline.org/doi/book/10.1176/appi.books.9780890425596>
149. Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, et al. A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry*. 2010 Mar 1;67(5):446–57.
150. Hellwig S, Brioschi S, Dieni S, Frings L, Masuch A, Blank T, et al. Altered microglia morphology and higher resilience to stress-induced depression-like behavior in CX3CR1-deficient mice. *Brain Behav Immun*. 2016;55:126–37.

151. Müller N, Myint A-M, Schwarz MJ. The impact of neuroimmune dysregulation on neuroprotection and neurotoxicity in psychiatric disorders--relation to drug treatment. *Dialogues Clin Neurosci.* 2009;11(3):319–32.
152. Sferrazza C. The Basics of Depression Testing in Rodents [Internet]. Maze Engineers. 2017 [cited 2018 May 14]. Available from: <https://mazeengineers.com/depression-testing-in-rodents/>
153. Gould TD, Gottesman II. Psychiatric endophenotypes and the development of valid animal models. *Genes Brain Behav.* 2006 Mar;5(2):113–9.
154. Raftogianni A, Diamantopoulou A, Alikaridis F, Stamatakis A, Stylianopoulou F. Effects of interaction of an early experience of reward through maternal contact or its denial with social stress during adolescence on the serotonergic system and the stress responsiveness of adult female rats. *Neuroscience.* 2012 May 3;209:84–96.
155. Raftogianni A, Stamatakis A, Diamantopoulou A, Kollia A-M, Stylianopoulou F. Effects of an early experience of reward through maternal contact or its denial on the dopaminergic system of the rat brain. *Neuroscience.* 2014 Jun 6;269:11–20.
156. Stamatakis A, Diamantopoulou A, Panagiotaropoulos T, Raftogianni A, Stylianopoulou F. A novel model of early experiences involving neonatal learning of a T-maze using maternal contact as a reward or its denial as an event of mild emotional adversity. *Dev Psychobiol.* 2014 Dec;56(8):1651–60.
157. Stamatakis A, Manatos V, Kalpachidou T, Stylianopoulou F. Exposure to a mildly aversive early life experience leads to prefrontal cortex deficits in the rat. *Brain Struct Funct.* 2016 Nov;221(8):4141–57.
158. Clause BT. The Wistar rat as a right choice: Establishing mammalian standards and the ideal of a standardized mammal. *J Hist Biol.* 1993 Jun 1;26(2):329–49.
159. Valle FP, Allen DB. Sex-typing newborn rats: An improved procedure with Agouti strains. *Behav Res Methods Instrum.* 1970 Jul 1;2(4):205–6.
160. Lazic SE, Essioux L. Improving basic and translational science by accounting for litter-to-litter variation in animal models. *BMC Neurosci.* 2013 Mar 22;14:37.
161. Legislation for the protection of animals used for scientific purposes - Environment - European Commission [Internet]. [cited 2018 May 15]. Available from: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm
162. Panagiotaropoulos T, Diamantopoulou A, Stamatakis A, Dimitropoulou M, Stylianopoulou F. Learning of a T-maze by rat pups when contact with the mother is either permitted or denied. *Neurobiol Learn Mem.* 2009 Jan;91(1):2–12.

163. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates - 7th Edition [Internet]. [cited 2018 Apr 28]. Available from: <https://www.elsevier.com/books/the-rat-brain-in-stereotaxic-coordinates/paxinos/978-0-12-391949-6>
164. TRIzol Reagent - Thermo Fisher Scientific [Internet]. [cited 2018 Jul 16]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/15596026>
165. Repouskou A, Sourlingas TG, Sekeri-Pataryas KE, Prombona A. The circadian expression of c-MYC is modulated by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A in synchronized murine neuroblastoma cells. *Chronobiol Int.* 2010 Jun;27(4):722–41.
166. PrimeScript RT Reagent Kit: Generate cDNA for Real Time PCR [Internet]. [cited 2018 Jul 16]. Available from: <https://www.takarabio.com/products/real-time-pcr/reverse-transcription-prior-to-qpcr/primescript-rt-reagent-kit>
167. Mx3000P qPCR System [Internet]. [cited 2018 Jul 17]. Available from: <https://www.genomics.agilent.com/en/Mx3005P-Mx3000P-qPCR-Instruments-Software/Mx3000P-qPCR-System/?cid=AG-PT-199&tabId=AG-PR-1126>
168. SYBR Select Master Mix - Thermo Fisher Scientific [Internet]. [cited 2018 Jun 20]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4472908>
169. Malik IA, Moriconi F, Sheikh N, Naz N, Khan S, Dudas J, et al. Single-Dose Gamma-Irradiation Induces Up-Regulation of Chemokine Gene Expression and Recruitment of Granulocytes into the Portal Area but Not into Other Regions of Rat Hepatic Tissue. *Am J Pathol.* 2010 Apr 1;176(4):1801–15.
170. Peinnequin A, Mouret C, Birot O, Alonso A, Mathieu J, Clarençon D, et al. Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. *BMC Immunol.* 2004 Feb 5;5:3.
171. Gokina NI, Chan S-L, Chapman AC, Oppenheimer K, Jetton TL, Cipolla MJ. Inhibition of PPAR γ during rat pregnancy causes intrauterine growth restriction and attenuation of uterine vasodilation. *Front Physiol.* 2013 Jul 23;4.
172. Langaese K, John R, Schweizer H, Ebmeyer U, Keilhoff G. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in a rat asphyxial cardiac arrest model. *BMC Mol Biol.* 2008 May 28;9:53.
173. EurofinsGenomics [Internet]. [cited 2018 Jul 17]. Available from: <https://www.eurofinsgenomics.eu/>
174. Multalin interface page [Internet]. [cited 2018 Jun 18]. Available from: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>
175. Reverse complement [Internet]. [cited 2018 Jun 18]. Available from: <http://reverse-complement.com/>

176. Nucleotide - NCBI [Internet]. [cited 2018 Jun 18]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>
177. Primer3Plus - Pick Primers [Internet]. [cited 2018 Jul 16]. Available from: <https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>
178. MxPro QPCR Software [Internet]. [cited 2018 Jul 17]. Available from: <https://www.genomics.agilent.com/en/Mx3005P-Mx3000P-qPCR-Instruments-Software/MxPro-QPCR-Software/?cid=AG-PT-199&tabId=prod200003>
179. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods San Diego Calif.* 2001 Dec;25(4):402–8.
180. Craft TKS, Zhang N, Glasper ER, Hurn PD, Devries AC. Neonatal factors influence adult stroke outcome. *Psychoneuroendocrinology.* 2006 Jun;31(5):601–13.
181. Rolls ET. The functions of the orbitofrontal cortex. *Brain Cogn.* 2004 Jun;55(1):11–29.
182. Rolls ET. The orbitofrontal cortex and reward. *Cereb Cortex N Y N* 1991. 2000 Mar;10(3):284–94.
183. Li X, Song L, Kolasa K, Jope RS. Adrenalectomy Potentiates Immediate Early Gene Expression in Rat Brain. *J Neurochem.* 1992 Jun 1;58(6):2330–3.
184. Diamantopoulou A, Kalpachidou T, Aspiotis G, Gampierakis I, Stylianopoulou F, Stamatakis A. An early experience of mild adversity involving temporary denial of maternal contact affects the serotonergic system of adult male rats and leads to a depressive-like phenotype and inability to adapt to a chronic social stress. *Physiol Behav.* 2018 01;184:46–54.
185. Bhattacharya A, Drevets WC. Role of Neuro-Immunological Factors in the Pathophysiology of Mood Disorders: Implications for Novel Therapeutics for Treatment Resistant Depression. *Curr Top Behav Neurosci.* 2017;31:339–56.
186. Korzhevskii DE, Kirik OV. Brain Microglia and Microglial Markers. *Neurosci Behav Physiol.* 2016 Mar 1;46(3):284–90.
187. Takahashi Y, Yu Z, Sakai M, Tomita H. Linking Activation of Microglia and Peripheral Monocytic Cells to the Pathophysiology of Psychiatric Disorders. *Front Cell Neurosci.* 2016;10.
188. Tynan RJ, Naicker S, Hinwood M, Nalivaiko E, Buller KM, Pow DV, et al. Chronic stress alters the density and morphology of microglia in a subset of stress-responsive brain regions. *Brain Behav Immun.* 2010 Oct;24(7):1058–68.
189. Dhabhar FS. Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful. *Immunol Res.* 2014 May;58(2–3):193–210.

190. Diamantopoulou A, Raftogianni A, Stamatakis A, Alikaridis F, Oitzl MS, Stylianopoulou F. Denial of reward in the neonate shapes sociability and serotonergic activity in the adult rat. *PloS One*. 2012;7(3):e33793.
191. McEwen BS, Nasca C, Gray JD. Stress Effects on Neuronal Structure: Hippocampus, Amygdala, and Prefrontal Cortex. *Neuropsychopharmacology*. 2016 Jan;41(1):3–23.
192. Dhabhar FS. Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection and immunopathology. *Neuroimmunomodulation*. 2009;16(5):300–17.
193. Roozendaal B, McEwen BS, Chattarji S. Stress, memory and the amygdala. *Nat Rev Neurosci*. 2009 Jun;10(6):423–33.
194. Boche D, Perry VH, Nicoll J a. R. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2013 Feb;39(1):3–18.
195. Monif M, Reid CA, Powell KL, Drummond KJ, O'Brien TJ, Williams DA. Interleukin-1 β has trophic effects in microglia and its release is mediated by P2X7R pore. *J Neuroinflammation*. 2016 Dec;13(1).
196. Ramirez K, Shea DT, McKim DB, Reader BF, Sheridan JF. Imipramine attenuates neuroinflammatory signaling and reverses stress-induced social avoidance. *Brain Behav Immun*. 2015 May;46:212–20.