



Δράση «Εμβληματικές δράσεις σε διαθεματικές επιστημονικές περιοχές με ειδικό ενδιαφέρον για την σύνδεση με τον παραγωγικό ιστό» ID 16618

Εθνικό δίκτυο έρευνας για την ανάδειξη της γενετικής βάσης των νευροεκφυλιστικών νόσων Alzheimer και Parkinson, την ανίχνευση αξιόπιστων βιοδεικτών και την ανάπτυξη καινοτόμων υπολογιστικών τεχνολογιών και θεραπευτικών στρατηγικών στη βάση της ιατρικής ακριβείας (BRAIN PRECISION, TAEDR-0535850)

ΤΙΤΛΟΣ ΠΑΡΑΔΟΤΕΟΥ: Ανοσοϊστοχημική ανάλυση τρωκτικών μετά από απενεργοποίηση νευρωνικών $\beta^*nAChRs$

ΕΝΟΤΗΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 4: Ανάπτυξη κυτταρικών και ζωικών μοντέλων, καθώς και νέων βιοδεικτών για τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες Alzheimer και Parkinson.

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ (ΦΟΡΕΑΣ): ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΖΗΣΙΜΟΠΟΥΛΟΥ (ΕΙΠ)

Ανοσοϊστοχημική ανάλυση τρωκτικών μετά από απενεργοποίηση νευρωνικών β**nAChRs*

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Με τις εξωκυττάριας περιοχές (ΕΚΠ) υπομονάδων του νικοτινικού υποδοχέα ακετυλοχολίνης (*nAChR*) α3, α4, α5, α7 και β2 (κύριες υπομονάδες στον ιππόκαμπο και περιφερικό νευρικό σύστημα), που απομονώθηκαν από βακτήρια, έγιναν ανοσοποιήσεις τρωκτικών, και ελέγχθηκε η παραγωγή αντισωμάτων με ELISA που φτιάχτηκε για το σκοπό αυτόν στο εργαστήριο.

Μετά την ολοκλήρωση των ανοσοποιήσεων, διάρκειας 5 μηνών, ακολούθησε ένα διάστημα αναμονής δυο μηνών για τυχόν εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων στα ανοσοποιημένα ζώα. Κατά την διάρκεια αυτού του διαστήματος τα ζώα υποβλήθηκαν στα τεστ open field, elevated maze και inverted grip test και έγιναν βιντεοσκοπήσεις σε όλη τη διάρκεια των πειραμάτων. Οι λήψεις αυτές χρησιμοποιούνται στη συνέχεια για τη συμπεριφορική ανάλυση των ζώων, η οποία αποτελεί και το στόχο του παραδοτέου «Συμπεριφορική ανάλυση τρωκτικών μετά από απενεργοποίηση νευρωνικών β**nAChRs*», το οποίο ολοκληρώθηκε τον Μ14.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΥΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΔΟΤΕΟΥ – ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΟΦΕΛΗ

Οι νευρικοί νικοτινικοί υποδοχείς ακετυλοχολίνης (*nAChRs*) διακρίνονται σε πολλούς υπότυπους και είναι ευρέως καταμετρημένοι στο νευρικό σύστημα και σε αρκετούς μη-νευρικούς ιστούς. Ρυθμίζουν τη νευρωνική διεγερσιμότητα μέσω νευροδιαβιβαστών. Οι νευρικοί *nAChRs* αποτελούν υποψήφια αυτοαντιγόνα στην αυτοάνοση εγκεφαλίτιδα (AES), καθώς είναι σημαντικοί στη διανευρωνική επικοινωνία στον εγκέφαλο, ενώ γενετικές μεταλλάξεις τους έχουν συνδεθεί με τα βασικά συμπτώματα της AES. Επίσης, η δράση τους σχετίζεται με πολλές νευρολογικές ασθένειες όπως Πάρκινσον, Αλτσχάιμερ, αυτισμός κλπ.

Για να μελετηθεί ο ρόλος αυτών των υπομονάδων, οι εξωκυττάριας περιοχές (ΕΚΠ) των ανθρώπινων νευρικών υπομονάδων (α2-α7, α9 και β2-β4) εκφράστηκαν και απομονώθηκαν από *E. Coli*. Θηλυκά ποντίκια ηλικίας 6-8 εβδομάδων C57bl6 ανοσοποιήθηκαν υποδόρια με τις καθαρισμένες ανασυνδυασμένες υπομονάδες.

Μία ομάδα ποντικών (6 ζώα) ανοσοποιήθηκαν υποδόρια με ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη (50 μg ανά ποντικό) και ενισχύθηκαν κάθε μήνα επί 5 μήνες. Η δεύτερη ομάδα (6 ζώα) έλαβε αποκλειστικά μόνο ανοσοενισχυτικό CFA. Η ομάδα ελέγχου περιλάμβανε 6 ποντίκια στα οποία δεν δόθηκε τίποτα. Μετά το τέλος του κύκλου ανοσοποίησης, υπήρξε μία περίοδος δύο μηνών αναμονής κατά την οποία έγινε συμπεριφορική ανάλυση των ζώων για τον εντοπισμό τυχόν νευρολογικών συμπτωμάτων, λόγω της δράσης των αντισωμάτων που αναπτύχθηκαν. Στη συνέχεια τα ποντίκια θυσιάστηκαν με εξάρθρωση του αυχένα. Τομές 20 μm ελήφθησαν σε κρουτόμο για τους περισσότερους εγκεφάλους και χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοϊστοχημική ανάλυση.

Λόγω των ευρημάτων στη συμπεριφορική ανάλυση, τα ποντίκια που είχαν ανοσοποιηθεί με τη β2 υπομονάδα, ελέγχθηκαν ως προς α) τη διατήρηση των ντοπαμινεργικών νευρώνων, β) την ενεργοποίηση μικρογλοίας, γ) των επιπέδων προφλεγμονωδών κυτταροκινών και δ) της δυσλειτουργίας αστροκυττάρων.

Η επίδραση της ανοσοποίησης με την υπομονάδα β2 σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες στη μέλαινα ουσία

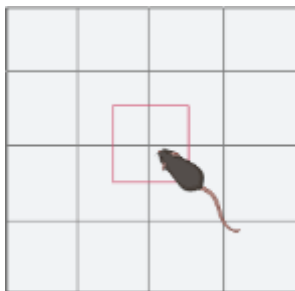
Για να προσδιορίσουμε ποιες περιοχές του εγκεφάλου επηρεάστηκαν περισσότερο από τα β2 αντισώματα που παράγονται στα ποντίκια μετά από ανοσοποίηση, πραγματοποιήσαμε πειράματα ανοσοϊστοχημείας. Οβελιαίες τομές εγκεφάλου επωάστηκαν, αρχικά, με ορό από τα β2 ανοσοποιημένα ποντίκια, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι τα αντισώματα που παράγονται *in vivo* στοχεύουν επιλεκτικά τους ενδογενείς β2 νικοτινικούς υποδοχείς και να προσδιοριστεί η θέση του. Οι νευρικοί νικοτινικοί υποδοχείς ακετυλοχολίνης (*nAChRs*) διακρίνονται σε πολλούς υπότυπους και είναι ευρέως καταμετρημένοι στο νευρικό σύστημα και σε αρκετούς μη-νευρικούς ιστούς [1,2]. Ρυθμίζουν τη νευρωνική διεγερσιμότητα μέσω νευροδιαβιβαστών [3,4,5,6]. Οι νευρικοί *nAChRs* αποτελούν υποψήφια αυτοαντιγόνα στην αυτοάνοση εγκεφαλίτιδα (AES), καθώς είναι σημαντικοί στη διανευρωνική επικοινωνία στον εγκέφαλο, ενώ γενετικές μεταλλάξεις τους έχουν συνδεθεί με τα βασικά συμπτώματα της AES (7). Επίσης, η δράση τους σχετίζεται με πολλές νευρολογικές

ασθένειες όπως Πάρκινσον, Άλτσχάιμερ, αυτισμός κλπ [8,9]. Για να μελετηθεί ο ρόλος αυτών των υπομονάδων, οι εξωκυττάρια περιοχές (ΕΚΠ) των ανθρώπινων νευρικών υπομονάδων (α2-α7, α9 και β2-β4) εκφράστηκαν και απομονωθήκαν από *E. Coli*. Θηλυκά ποντίκια ηλικίας 6-8 εβδομάδων C57bl6 ανοσοποιήθηκαν υποδόρια με τις καθαρισμένες ανασυνδυασμένες υπομονάδες από *E.coli* ακολουθώντας πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοποίηση ποντικών με την εξωκυττάρια περιοχή της α7 υπομονάδας [10]. Μία ομάδα ποντικών (6 ζώα) ανοσοποιήθηκαν υποδόρια με ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη (50 μg ανά ποντικό) και ενισχύθηκαν κάθε μήνα επί 5 μήνες. Οι πρώτες δύο ανοσοποιήσεις πραγματοποιήθηκαν με πλήρες ανοσοενισχυτικό Freund (CFA), η τρίτη με ανοσοενισχυτικό Freund μη πλήρες, ενώ οι επόμενες ανοσοποιήσεις έγιναν σε PBS. Η δεύτερη ομάδα (6 ζώα) έλαβε αποκλειστικά μόνο ανοσοενισχυτικό CFA. Η ομάδα ελέγχου περιελάμβανε 6 ποντίκια στα οποία δεν δόθηκε τίποτα. Μετά το τέλος του κύκλου ανοσοποίησης υπήρξε μία περίοδος δύο μηνών αναμονής κατά την οποία έγινε συμπεριφορική ανάλυση των ζώων για τον εντοπισμό τυχόν νευρολογικών συμπτωμάτων, λόγω της δράσης των αντισωμάτων που αναπτύχθηκαν. Στη συνέχεια τα ποντίκια θυσιάστηκαν με εξάρθρωση του αυχένα.

Μέθοδοι συμπεριφορικής ανάλυσης των ζώων. Για να αξιολογήσουμε αλλαγές στο φαινότυπο συμπεριφοράς, χρησιμοποιήσαμε μία σειρά τυποποιημένων δοκιμών: υπερυψωμένο λαβύρινθο (elevated zero maze), τεστ ανοιχτού πεδίου και ένα τεστ αναγνώρισης καινούργιου αντικειμένου. Όλες οι συμπεριφορικές διαδικασίες διεξήχθησαν σε σταθερή θερμοκρασία, υγρασία και φωτισμό. Πριν τη διεξαγωγή των δοκιμασιών, τα ζώα υποβάλλονταν για λίγες ημέρες σε μία διαδικασία εξοικείωσης με τον πειραματιστή, προκειμένου να αποφευχθεί το ενδεχόμενο άγχους της επαφής τους, και για να μην υπάρχουν οι αντίστοιχες επιπτώσεις στα αποτελέσματα. Η εν λόγω διαδικασία, περιελάμβανε ήπιο χειρισμό, κατά τον οποίο το ζώο αφηνόταν στη παλάμη του πειραματιστή για μερικά δευτερόλεπτα, ελεύθερο να εξερευνήσει και να οσμιστεί. Τέλος, να σημειωθεί πως πριν τη διεξαγωγή κάθε δοκιμασίας, τα ζώα αφήνονταν για μισή ώρα στο χώρο όπου θα λάμβανε χώρα η δοκιμασία, έτσι ώστε να εξοικειωθούν με τον χώρο (habituation) και να αποβάλλουν τυχόν άγχος το οποίο θα προέκυπτε από την αλλαγή χώρου.

Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (Openfield)

Η δοκιμασία ανοιχτού πεδίου είναι ένα τεστ, το οποίο αξιολογεί την αγχώδη συμπεριφορά των τρωκτικών, την εξερευνητικότητα, καθώς και την κινητικότητα. Για τη συγκεκριμένη δοκιμασία, έγινε χρήση ενός ξύλινου κουτιού, διαστάσεων 50x50x50 cm. Η επιφάνεια χωρίστηκε σε κουτάκια με ίσες πλευρές (10 cm) όπως φαίνεται στην εικόνα 1.



Εικόνα 58. Η επιφάνεια του κουτιού όπου διετελέστηκαν τα τεστ ανοιχτού πεδίου χωρίστηκε σε ίσα κουτάκια πλευράς 10 cm. Τα 4 εσωτερικά κουτάκια αποτελούν τον εσωτερικό χώρο και το κόκκινο κουτάκι το κέντρο της επιφάνειας.

Σε αυτό το κουτί αφήθηκε κάθε ζώο ελεύθερο να εξερευνήσει. Η διαδικασία κράτησε 10 λεπτά. Σε κάθε λήξη, η διάταξη καθαριζόταν με διάλυμα 70% αιθανόλης ώστε να φύγει η οσμή του προηγούμενου ζώου.

Συγκεκριμένα, οι μετρήσεις αφορούσαν α) τη συνολική διανυόμενη απόσταση, μέτρηση που σχετίζεται με τη κινητική δραστηριότητα, β) τον αριθμό των ανορθώσεων, μέτρηση που σχετίζεται με την εξερευνητική ικανότητα, γ) τον αριθμό διελεύσεων από το κέντρο και δ) το χρόνο που δαπάνησε το ζώο στο κέντρο της διάταξης (σε έναν οροθετημένο χώρο 20x20 cm) που εκφράζει τα επίπεδα άγχους (Gould et al., 2009) μέσα σε 10 λεπτά. Για την αξιολόγηση, τα ζώα βιντεοσκοπήθηκαν και τα βίντεο αναλύθηκαν μετέπειτα από ουδέτερο χρήστη. Ο χρήστης μέτρησε το χρόνο παραμονής κάθε ζώου και με τα 4 πόδια στο εσωτερικό οριοθετημένο χώρο, τις διελεύσεις του από το κέντρο και των αριθμό των τετραγώνων που διανύθηκαν από κάθε ζώο για να προσδιοριστεί η συνολική απόσταση.

Υπερυψωμένος λαβύρινθος (Elevated Plus Maze-EPM)

Παράλληλα, διεξήχθη η δοκιμασία του υπερυψωμένου λαβυρίνθου (elevated plus maze). Για τη συγκεκριμένη δοκιμασία, έγινε χρήση μίας κατασκευής σε σχήμα σταυρού, ύψους 50cm, η οποία αποτελείται από τέσσερις βραχίονες, πλάτους 6cm και μήκους 65cm: οι δύο είναι «ανοιχτοί», ενώ οι άλλοι δύο είναι «κλειστοί», με τοιχώματα ύψους 14cm. Αυτοί οι δύο βραχίονες, ενώνονται σε σχήμα σταυρού και σχηματίζουν έτσι ένα μικρό κεντρικό τετράγωνο 6x6cm (Εικόνα 59).



Εικόνα 59. Η κατασκευή που χρησιμοποιήθηκε για τη δοκιμασία του υπερυψωμένου λαβυρίνθου (elevated plus maze).

Κατά την έναρξη της δοκιμασίας, κάθε ζώο τοποθετήθηκε στο κεντρικό τετράγωνο, με το κεφάλι του να βλέπει προς τον ένα ανοιχτό βραχίονα, και στη συνέχεια αφήθηκε ελεύθερο να εξερευνήσει για 5 min. Ο καθαρισμός της διάταξης μετά την κάθε χρήση γινόταν με διάλυμα 70% αιθανόλης. Η όλη διαδικασία βιντεοσκοπήθηκε. Οι αναλύσεις και οι μετρήσεις περιελάμβαναν τον αριθμό εισόδων του ζώου στους ανοιχτούς και κλειστούς βραχίονες καθώς και το χρόνο που δαπανήθηκε στον κάθε έναν από αυτούς, ενώ υπολογίστηκε και το ποσοστό του αντίστοιχου χρόνου που δαπανήθηκε στους κλειστούς βραχίονες, εκφραζόμενο ως ο επί τοις εκατό λόγος της διαφοράς του χρόνου που δαπανήθηκε στους ανοιχτούς και κλειστούς βραχίονες ως προς το άθροισμά τους. Για να θεωρηθεί εισόδος, το ζώο έπρεπε να έχει τοποθετήσει και τα τέσσερα άκρα του εντός του βραχίονα. Να σημειωθεί εδώ πως τα τρωκτικά προτιμούν να περνούν περισσότερο χρόνο στους κλειστούς βραχίονες σε σχέση με τους ανοιχτούς. Σε αντίστοιχη μελέτη έχει βρεθεί πως ο χρόνος των ζώων στους ανοιχτούς βραχίονες συνδέεται με αγχώδη συμπεριφορά των ζώων («παγώματα», ακινησία κλπ) καθώς και με μεγαλύτερη συγκέντρωση κορτικοστερόνης (Pellow et al., 1985). Κατά συνέπεια, όταν ο χρόνος που περνάει στους ανοιχτούς βραχίονες είναι μεγαλύτερος, είναι δείγμα άγχους.

Αναγνώριση νέου αντικείμενου (Novel Object Recognition Task-<ORT)

Για τη δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικείμενου, έγινε χρήση ενός κλωβού, διαστάσεων 50x50x50 cm, πανομοιότυπου με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε στη δοκιμασία του ανοιχτού πεδίου. Το πρωτόκολλο της εν λόγω δοκιμασίας, περιλαμβάνει τη εξοικείωση των ζώων με το χώρο και τα δύο ίδια αντικείμενα για διάρκεια 10 λεπτών επί δύο συνεχόμενες ημέρες.

Η διαδικασία αυτή έχει σκοπό να εξοικειωθεί το υπό εξέταση ζώο με τον χώρο, ώστε να τον γνωρίζει και να μην αναλωθεί τις επόμενες ημέρες με την εξερεύνηση του χώρου, αλλά να έχει εστιασμένη τη προσοχή του στη δοκιμασία αναγνώρισης (Cornejo et al., 2008). Για την εξοικείωση, το ζώο αφήνεται κάθε φορά ελεύθερο στο ίδιο σημείο του κλωβού, να εξερευνήσει για 10 λεπτά. Τα δύο πανομοιότυπα άσπρα αντικείμενα ήταν δυο πλαστικά ύψους 7 εκ. και πλάτους 2.5 εκ., τα οποία τοποθετήθηκαν στον κλωβό του πειράματος. Η απόσταση μεταξύ τους ήταν ίση με την απόστασή τους από τα τοιχώματα.

Την τρίτη ημέρα, το ένα από τα δύο αντικείμενα αντικαταστάθηκε με άλλο παρόμοιο

διαστάσεων και το κάθε ζώο αφέθηκε για 10 λεπτά να εξερευνήσει και μετρήθηκε ο χρόνος που σπατάλησε το ζώο οσφραϊνόμενο το γνωστό και το άγνωστο αντικείμενο (σε απόσταση μικρότερη από 2cm από το αντικείμενο). Όλες οι παράμετροι ήταν ίδιες (χρόνος του ζώου στη διάταξη, η απόσταση των αντικειμένων μεταξύ τους αλλά και από τα τοιχώματα του κλωβού, το είδος των μετρήσεων).

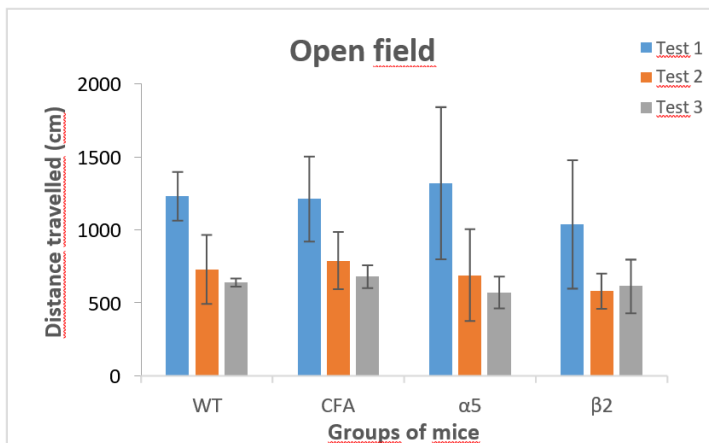
Τέλος, υπολογίστηκε ο δείκτης διάκρισης για κάθε ζώο (χρόνος όσφρησης νέου αντικειμένου - χρόνος όσφρησης γνωστού αντικειμένου) / (χρόνος όσφρησης νέου αντικειμένου + χρόνος όσφρησης γνωστού αντικειμένου).

Σαν αποτέλεσμα αναμένεται πως το υπό εξέταση ζώο όταν θα έχει μπροστά του ένα οικείο και ένα άγνωστο-νέο αντικείμενο, θα περάσει περισσότερο χρόνο με το νέο άγνωστο, παρά με το οικείο. Αυτή η προτίμηση για το νέο αντικείμενο, δείχνει πως η παρουσίαση του οικείου αντικειμένου, υπάρχει ήδη στη μνήμη του ζώου (Antunes & Biala, 2012). Τα ποντίκια που δεν ανταποκρίθηκαν στη δοκιμασία και πλησίασαν τα 2 αντικείμενα λιγότερο από 10 δευτερόλεπτα δεν λήφθηκαν υπόψιν στην αξιολόγηση.

Αντεστραμμένο τεστ κρεμάσματος από μεταλλικό πλέγμα

Σε αυτό το τεστ μυϊκής δύναμης, τοποθετούμε το ποντίκι σε ένα πλέγμα, γυρίζουμε προσεκτικά το πλέγμα και μετράμε το χρόνο μέχρι να αφήσει το ποντίκι το πλέγμα και να πέσει. Για όλα τα ποντίκια υπήρξε χρόνος προσαρμογής και μάθησης του τεστ πριν πραγματοποιηθούν οι μετρήσεις.

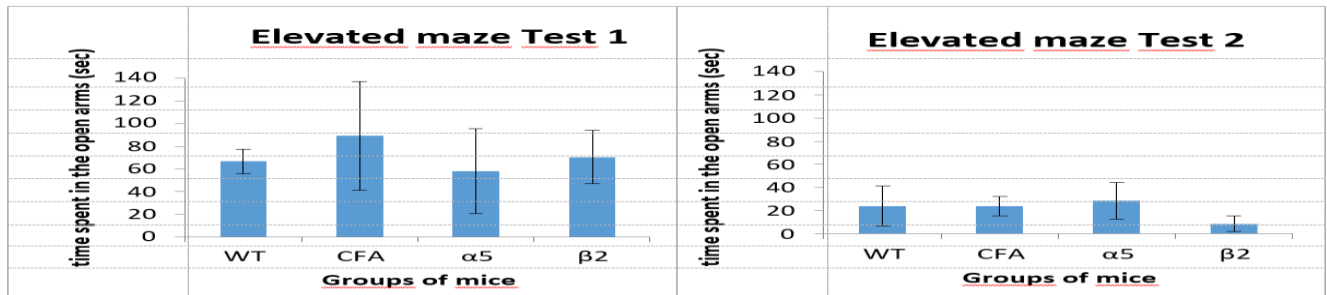
Αποτελέσματα συμπεριφορικής ανάλυσης. Τα ποντίκια χωρισμένα σε ομάδες υποβλήθηκαν στα τεστ που περιγράφονται παραπάνω. Εξετάστηκαν τα ποντίκια που ανοσοποιήθηκαν με τις εξωκυτταρίες περιοχές των υπομονάδων α5, β2 παράλληλα με μια ομάδα ποντικών που ανοσοποιήθηκαν μόνο με το ανοσοενισχυτικό και μια ομάδα αγρίου τύπου. Τα ποντίκια αυτά υποβλήθηκαν σε 3 τεστ συνολικά ανοιχτού πεδίου, στο διάστημα ανίχνευσης κάποιας συμπεριφορικής διαταραχής, ανα 15 ημέρες.



Εικόνα 60. Τα αποτελέσματα από τα τρία τεστ ανοιχτού πεδίου που πραγματοποιήθηκαν μέσα σε διάστημα δυο μηνών ανά 15 ημέρες και μετρήθηκε η συνολική απόσταση που διένυσαν τα ποντίκια κάθε ομάδας σε 10 λεπτά. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM ($n = 5$ ανά ομάδα).

Όπως φαίνεται και από το διάγραμμα (Εικόνα 60) δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων σε κανένα από τα τρία τεστ που πραγματοποιήθηκαν με διαφορά 15 ημερών. Ωστόσο, υπάρχει μία ένδειξη ότι τα β2 ανοσοποιημένα ποντίκια εμφανίζουν μειωμένη

κινητικότητα συγκριτικά με τις υπόλοιπες ομάδες. Το ίδιο έδειξε και η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια του one-way ANOVA and Tukey post hoc test. Στην συνέχεια, τα ανοσοποιημένα ποντίκια με $\alpha 5$ και $\beta 2$ υποβλήθηκαν στο τεστ υπερυψωμένος λαβύρινθος (Elevated Plus Maze- EPM). Πραγματοποιήθηκαν με όλα τα ποντίκια συνολικά δυο δοκιμασίες μέσα στο διάστημα της συμπεριφορικής ανάλυσης με διαφορά 15 ημερών (Εικόνα 4). Μετρήθηκε ο χρόνος παραμονής των ζώων στον ανοιχτό χώρο εντός 5 λεπτών. Δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά μεταξύ των ομάδων. Αυτό που είναι αξιοσημείωτο είναι ότι στο δεύτερο τεστ εμφανίζουν μειωμένη παραμονή τα $\beta 2$ ποντίκια, χωρίς όμως να λαμβάνουμε υπόψιν κάποια που έμειναν στον ανοιχτό χώρο σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Αυτό παρατηρήθηκε και με τη δεύτερη ομάδα που ανοσοποιήθηκε με τη $\beta 2$ υπομονάδα, δηλαδή κάποια ποντίκια παραμένουν στον ανοιχτό χώρο όπου έχουν αφεθεί εκδηλώνοντας μικρή κινητικότητα και επιθυμία για εξερεύνηση. Αυτή η παθητική στάση πιθανώς δηλώνει κάποια αγχώδη διαταραχή.

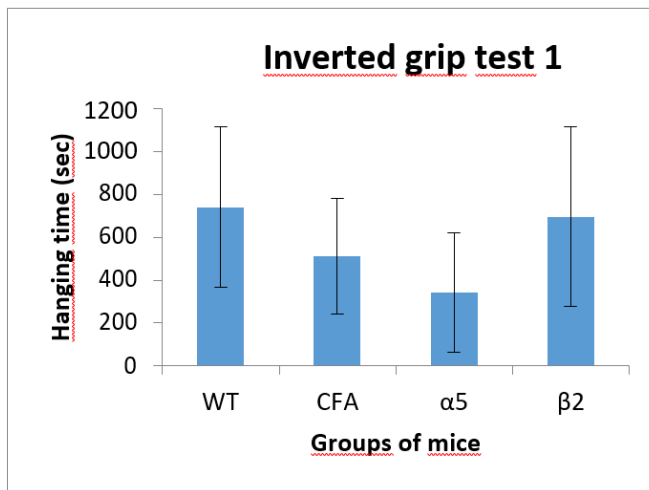


Εικόνα 61. Τα αποτελέσματα από τα δυο τεστ υπερυψωμένου λαβυρίνθου που πραγματοποιήθηκαν μέσα στο διάστημα συμπεριφορικής ανάλυσης ανά 15 ημέρες και μετρήθηκε ο συνολικός χρόνος παραμονής στον ανοιχτό χώρο. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM ($n = 5$ ανά ομάδα).

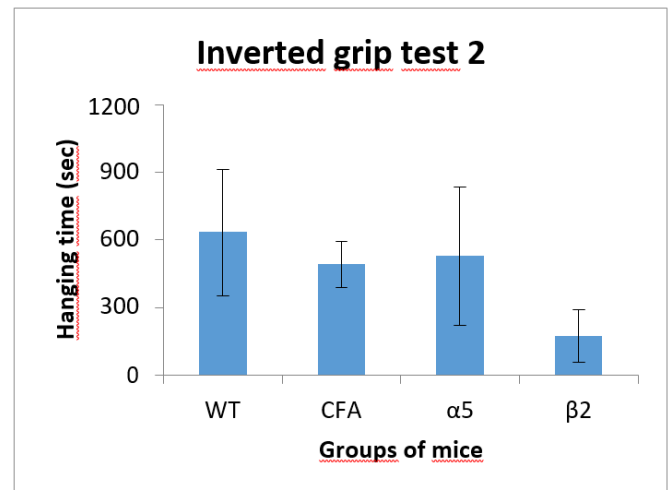
Τέλος, τα ποντίκια υποβλήθηκαν στο Inverted grip test και στο NOR test (Εικόνα 5 και Εικόνα 6 αντίστοιχα). Στο πρώτο αντεστραμμένο τεστ κρεμάσματος από μεταλλικό πλέγμα (Εικόνα 5^Α) δεν διαπιστώθηκε κάποια ιδιαίτερη διαφορά μεταξύ των διάφορων ομάδων και η ανάλυση των αποτελεσμάτων με το πρόγραμμα one-way ANOVA and Tukey post hoc test δεν κατέληξε σε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων. Αντίθετα στο δεύτερο τεστ (Εικόνα 5^Β) τα $\beta 2$ ανοσοποιημένα ποντίκια συγκριτικά με τις ομάδες ελέγχου εμφάνισαν στατιστικώς σημαντική μείωση στο χρόνο παραμονής στο ανεστραμμένο πλέγμα. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι σε παρατεταμένη φλεγμονή εμφανίζουν αυξημένη μυϊκή αδυναμία.

Κατά τη διάρκεια του NOR τεστ τα $\beta 2$ ανοσοποιημένα ποντίκια εμφάνισαν μειωμένη απόδοση στην αναγνώριση καινούργιου αντικειμένου.

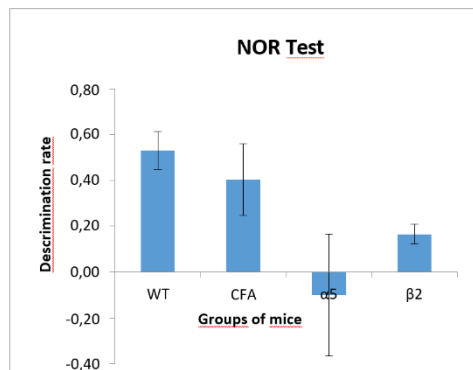
A



B.



Εικόνα 62. Τα αποτελέσματα από το ανεστραμμένο τεστ κρεμάσματος από μεταλλικό πλέγμα που πραγματοποιήθηκε μέσα στο διάστημα συμπεριφορικής ανάλυσης και μετρήθηκε ο συνολικός χρόνος παραμονής του κάθε ποντικού στο πλέγμα μέχρι να πέσει. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM ($n = 5$ ανά ομάδα). Τα $\beta 2$ ανοσοποιημένα ποντίκια συγκριτικά με τις ομάδες ελέγχου εμφάνισαν στατιστικώς σημαντική μείωση στο χρόνο παραμονής στο ανεστραμμένο πλέγμα ($*p < 0.05$, σε σύγκριση με τα ανοσοποιημένα ποντίκια με CFA; $**p < 0.01$, σε σύγκριση με τα ποντίκια που δεν έλαβαν τίποτα).



Εικόνα 63. Τα αποτελέσματα από το τεστ NOR. Το συγκεκριμένο τεστ αποτελεί δείκτης αναγνώρισης νέου αντικειμένου, στη φάση εξέτασης της βραχείας μνήμης διαφορετικών ομάδων ποντικών. Τα αποτελέσματα της δοκιμής NOR παρουσιάζονται ως λόγος διάκρισης (DR) που υπολογίζεται ως η διαφορά στον αριθμό των εξερευνηήσεων «νέου» και «παλαιού» αντικειμένου διαιρεμένη με τον συνολικό αριθμό

εξερευνηήσεων. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM ($n = 5$) ανά ομάδα. Τα $\beta 2$ ανοσοποιημένα ποντίκια πέρασαν περισσότερο χρόνο με το παλιό αντικείμενο παρά με το νέο σε σύγκριση με τις δύο άλλες ομάδες ελέγχου ($*p < 0,05$), σε σύγκριση με την ομάδα ανοσοποιημένης μόνο με CFA, $**p < 0,01$, σε σύγκριση με τα ποντίκια που δεν έλαβαν κάτι). Τα $\alpha 5$ ανοσοποιημένα ποντίκια δεν αναγνώρισαν καθόλου το παλιό αντικείμενο ($**p < 0,01$), σε σύγκριση με τα ποντίκια που δεν έλαβαν κάτι και αυτά που έλαβαν μόνο CFA.

Από το σύνολο των αποτελεσμάτων από τα τεστ ανοιχτού πεδίου διαπιστώσαμε ότι τα $\beta 2$ ανοσοποιημένα ποντίκια, εμφανίζουν κάποια κινητική δυσλειτουργία. Στα τεστ μνήμης, τα $\beta 2$ ανοσοποιημένα ποντίκια εμφάνισαν μειωμένη βραχεία μνήμη σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου ενώ τα $\alpha 5$ ανοσοποιημένα ποντίκια δεν αναγνώρισαν σχεδόν καθόλου το καινούργιο αντικείμενο. Σίγουρα, τα συμπεριφορικά τεστ χρειάζονται πολλές επαναλήψεις και μεγαλύτερες ομάδες ποντικών. Αυτό όμως δεν ήταν εφικτό γιατί στα πλαίσια προστασίας των πειραματόζωων εγκρίθηκαν από την ελληνική νομαρχία μόνο μικρές ομάδες ζώων.