



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Nurturing nature : testing the three-hit hypothesis of schizophrenia

Daskalakis, N.

Citation

Daskalakis, N. (2011, December 8). *Nurturing nature : testing the three-hit hypothesis of schizophrenia*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/18195>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/18195>

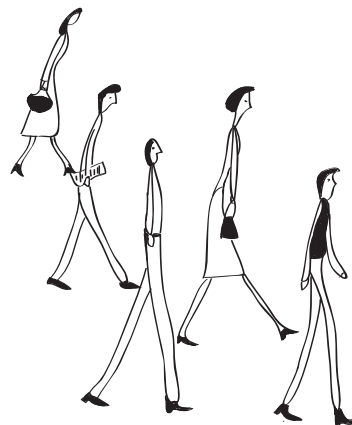
Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Summary

English Summary

Nederlandse samenvatting

Περίληψη στα ελληνικά



English Summary

The objective of the research described in this thesis was to develop an animal model for schizophrenia in order to identify novel targets for treatment of this devastating psychiatric disorder. For this purpose we have investigated the effect of interactions between genetic predisposition for enhanced dopamine susceptibility, early-life experience and later-life stressors on the development of psychosis vulnerability in rats.

We used common outbred rat strains (Long Evans, Wistar) and genetically-selected apomorphine-susceptible (APO-SUS) rats. In addition, two early-life paradigms of adverse maternal environment were applied. On the one hand, the rat pups were, during the first week, of life selected on the basis of naturally occurring variations in maternal care and pups were separated from the dam under various conditions on the other. Furthermore, rats experienced in pre-pubertal life either social rearing or isolation rearing. As output parameters, we measured during development, eye-opening and body growth and between juvenility and puberty, social interactions and working memory. At adulthood dopamine sensitivity, sensorimotor gating and contextual fear conditioning were assessed, while at all life stages hormonal markers of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and related adrenal and brain activity were measured.

In **Chapter 1**, current knowledge on psychotic disorders and, more specifically, on schizophrenia was summarized with a special focus on dopamine and stress system dysregulation. The '*neurodevelopmental* hypothesis' was presented as one of the most prevailing etiological theories for the pathogenesis of schizophrenia. This hypothesis states that abnormal brain development, driven by genes-by environment interactions, enhances the risk for clinical symptoms of schizophrenia. Furthermore, the discussion of gene-by-environment interactions was extended with the presentation of the 'nature-nurture' framework. The necessity of endophenotypes of schizophrenia for the proper understanding of the disease mechanism and the usefulness of such phenotypes in animal models of schizophrenia were also discussed. Common animal models of schizophrenia were presented that have been used for testing etiological theories. The chapter concludes with the rationale to perform the current studies and states the specific hypotheses to be tested in each chapter.

The work described in this thesis was triggered by experiments performed during research projects as part of medical training at the Universities of Athens and Leiden. These experiments are summarized in Appendix Iddendum. Evidence was provided that the nature and intensity of the individual components (novelty exposure and tactile stimulation) of a mild early-life manipulation, like early handling, can affect the outcome of early-life experience on spatial memory and basal adrenocortical function of adult rats. In contrast with the rest of the thesis, where more severe early-life stress paradigms were used, we showed that even transient variations in early-life experience

could lead to behavioral variation or plasticity of the response towards a later-life event.

In **Chapter 2**, we described the immediate endocrine effects of maternal separation (MS) in the rat. We have used two MS conditions: (i) pups remained in the home cage with their siblings when separated from the dam, i.e. 'home-separation' (HOME SEP) and (ii) pups were removed from the home cage and placed in isolation individually in novel cages, i.e. 'novel separation' (NOVEL SEP). A single episode of 8h-MS slowly increased corticosterone (CORT) levels in the 5 day old rat pups. However, if the pups had been exposed also to 8h-MS on postnatal days 3 and 4, this separation-induced rise in CORT was abolished irrespective of the MS-context or rat-genotype. To explain this endocrine desensitization to maternal absence we favored the reasoning that the newborn rats readily learn to predict the return of the dam after the first experience of 8h absence irrespective of housing the pups in the home or the novel environment.

While readily habituating to repeated maternal absence, HOME SEP pups stayed however on alert and did display a rapid CORT response to an acute heterotypic stressor. This CORT response could be explained by increased adrenal activity as evidenced by increased tyrosine hydroxylase (TH) and melanocortin 2 receptors (MC2-R) protein content. The increased adrenal stress responsiveness after repeated episodes of home rather than novel 8h-MS was influenced by genotype, with the Long Evans pups displaying a higher CORT stress response after repeated HOME MS, than the Wistar pups.

Using the same MS paradigm, we demonstrated in Chapter 3 that the experience of being kept in isolation in a novel environment (NOVEL SEP) during repeated MS rather than the maternal absence experience per se caused priming of the amygdala fear pathway with lasting consequences for the responsiveness of the neuroendocrine and behavioral stress system. We found that NOVEL SEP pups displayed enhanced stress-induced c-Fos amygdala activation and pituitary ACTH release after a one day post-reunion period. These NOVEL SEP pups also showed several aspects of a behaviorally fearful phenotype later in life including reduced play fighting at adolescence and enhanced emotional memory at adulthood. This enhanced emotional memory performance was deduced from increased freezing and enhanced amygdala c-Fos mRNA expression in response to contextual fear. Taken together, these findings disclosed the amazing plasticity of the newborn brain. We discovered that a non-shared stressful experience by the pups kept in isolation during maternal absence favors programming of amygdala activity, fear-related behavior and enhanced activity of central components of the HPA-axis.

In **Chapter 4**, we tested the *three-hit* or *cumulative stress* hypothesis, which states that exposure to early-life adversity and later psychosocial stressors, when superimposed on a genetic predisposition result in a severe schizophrenia-like phenotype. For this purpose we used rats of the apomorphine susceptible rat strain (APO-SUS) that have a genetic predisposition for enhanced dopaminergic sensitivity and glucocorticoid resistance. We also used the naturally occurring variation of maternal care as a measure of early-

life adversity and post-weaning social isolation rearing as unfavorable pre-puberty social environment. APO-SUS rats, when exposed to low maternal care showed a much enhanced central and peripheral stress responsiveness and low prepulse inhibition (PPI) of the acoustic startle. If these low maternal care APO-SUS individuals are reared in social isolation then the PPI was extremely disrupted and working memory deficits did arise. In contrast, the high maternal care APO-SUS individuals showed enhanced behavioral function and resistance to the detrimental effects of social isolation, but not to a supraphysiological dose of the stress hormone. In conclusion, the findings indicate that a severe schizophrenia-like phenotype develops upon combined exposure of genetically predisposed individuals to early-life adversity and peri-pubertal experience of chronic social stress.

In **Chapter 5**, we tested both the *cumulative stress* and the *mismatch* hypothesis in a non genetically-selected Wistar rat population. The *cumulative stress* hypothesis predicts that the combination of environmental risk factors act in one direction enhancing vulnerability and psychopathology. The *mismatch* hypothesis proposes that experience early in life programs the developing brain in preparation of later life. We specifically studied whether the adversity of the maternal environment can influence later-life psychosis susceptibility, while taking into account the later-life stress context. As early-life adversity paradigms were used either the naturally occurring variation of maternal care or the MS-induced disruption of maternal care. The results were complex, but if summarized present an interesting overview of the possible outcomes after exposure to environmental stress:

- *Match*: Naturally occurring low maternal care, if combined with post-weaning isolation rearing, led to decreased psychosis susceptibility. Accordingly, matching conditions have a beneficial influence protecting against enhanced vulnerability to psychosis after two seemingly negative environmental conditions.

- *Mismatch*: Individuals with a history of low maternal care induced by MS displayed increased psychosis susceptibility if housed post-weaning in groups. Apart from the confirmation of the *mismatch* hypothesis, we showed that there is an opposite outcome of an adverse early-life experience depending on the option of the pups to be altogether or in isolation during maternal absence.

- *Mismatch*: Also supportive for the *mismatch* hypothesis is the combination of high maternal care history with the negative experience of isolation rearing that led to enhanced psychosis susceptibility.

- *Cumulative stress*: Finally, supraphysiological levels of CORT can lead to enhanced psychosis susceptibility, but only in the low maternal care offspring. If the CORT administration is taken as a feature of the stress influence, one can consider that in this particular case the *cumulative stress* hypothesis is supported.

In **Chapter 6**, we have made a synthesis of our findings. Our work defined specific genetic and environmental factors that influence the programming of stress system hyperactivity and schizophrenia endophenotypes in the rat. We found that priming

of the amygdala fear pathway is driven by early stressful experience away from peers. The enhanced activity of the amygdala fear pathway appeared programmed for life and accompanied by increased central stress drive and glucocorticoid resistance which are characteristic features of a psychosis vulnerable phenotype. In the case of genetically predisposed individuals (APO-SUS rats) or exposure to supraphysiological CORT concentrations, we provide strong evidence for the *three-hit* or *cumulative stress* hypothesis in the schizophrenia-susceptible individuals. In the case of the non genetically-selected Wistar rats, the *mismatch* hypothesis is supported since often the outcome of early-life stress negatively interacted with the pre-puberty social context.

In conclusion, genetic selection for enhanced dopamine susceptibility implies selection for highly reactive dopaminergic alleles that enhance susceptibility to all kinds of environmental influence. Individuals carrying these reactive alleles display enhanced susceptibility to the detrimental effects of cumulative stress and to the beneficial effects of an enriched environment.

Nederlandse samenvatting

Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift was de ontwikkeling van een diemodel voor schizofrenie teneinde nieuwe aangrijpingspunten te vinden voor de behandeling van deze psychiatrische aandoening. Het diemodel was gebaseerd op ratten die onderworpen werden aan interactie tussen genetische predispositie voor verhoogde dopaminerge activiteit, vroege levenservaringen en stress later in het leven.

Gezien eerder onderzoek werd verwacht dat de uitkomst van deze gen x omgeving interactie de gevoeligheid voor psychose-gerelateerde verschijnselen zou verhogen in de rat. Hiertoe zijn dieren met een verschillende genetische achtergrond gebruikt, te weten Long Evans, Wistar en genetisch geselecteerde apomorfine gevoelige (APO-SUS) ratten. Daarnaast is als vroege levenservaring een tweetal condities gebruikt die beiden variaties in moederzorg als uitgangspunt hadden. Tijdens de eerste week na de geboorte werden jonge ratten enerzijds geselecteerd op basis van natuurlijk voorkomende variaties in moederzorg. Anderzijds werden moeder en jong dagelijks 8 uur gescheiden gedurende 3 dagen. Stress later in het leven werd opgewekt door dieren vanaf de pre-adolescentie fase in groepen of in sociale isolatie op te laten groeien.

Tenslotte werden de dieren getest onder basale danwel stressvolle condities. Om de invloed van deze gen x omgevingsinteractie te onderzoeken werden tijdens de ontwikkeling het lichaamsgewicht en de leeftijd bij het openen van de ogen vastgesteld. Tijdens de adolescentie en jong volwassenheid werden sociale interactie en werkgeheugen onderzocht. In volwassen dieren werd dopamine gevoeligheid en 'sensorimotor gating' gemeten. Prolactine niveau's en de activiteit van het hypothalamus-hypofyse-bijnier (HBB) as, alsmede markers voor bijnier en neuronale activiteit werden op alle leeftijden bestudeerd.

In **hoofdstuk 1**, werd de bestaande kennis van psychotische stoornissen, en meer specifiek schizofrenie, samengevat met speciale aandacht voor deregulatie van het dopamine en stress systeem. Tegen de achtergrond van het 'nature-nurture'debate is in dit proefschrift met name de 'neurodevelopmental' hypothese voor de pathogenese van schizofrenie besproken. Deze hypothese stelt dat een abnormale hersenontwikkeling het risico voor de klinische symptomen van schizofrenie verhoogt.

De noodzaak tot bestudering van endofenotypes van schizofrenie, teneinde het inzicht in het onderliggende mechanisme te kunnen vergroten, werd benadrukt. Ook werden de diemodellen besproken die gebruikt worden om deze theoriën voor schizofrenie te testen. De inleiding werd afgesloten met de rationale voor het uitvoeren van de experimenten die beschreven zijn in dit proefschrift.

De inspiratie voor dit onderzoek kwam uit projecten, die als onderdeel van mijn opleiding geneeskunde aan de universiteiten van Athene en Leiden zijn uitgevoerd. Deze experimenten zijn samengevat in addendum en tonen aan dat manipulaties

zoals blootstelling aan een nieuwe omgeving en het variëren van de hoeveelheid tactiele stimulatie tijdens de postnatale periode het leervermogen en functioneren van het stress systeem later in het leven beïnvloeden. In tegenstelling tot de rest van het proefschrift, waar de consequenties van meer ingrijpende manipulaties werden beschreven, lieten we hier zien dat subtiele variatie in vroege levenservaringen kan leiden tot verschillen in het functioneren in het latere leven.

In **hoofdstuk 2**, werden de acute effecten van maternale scheiding (MS) besproken. We hebben twee verschillende MS condities gebruikt: (i) pups bleven in de thuishoek tijdens MS, 'home separation' (HOME SEP) en (ii) pups werden tijdens MS individueel gehuisvest in een nieuwe onbekende kooi, 'novel separation' (NOVEL SEP). Een éénmalige blootstelling aan MS op dag 5 resulteerde in een langzame toename van de corticosteron (CORT) concentratie in het bloed van de pups. Als de pups op dag 3 en 4 ook al MS hadden ondergaan, vertoonden ze echter geen langzame toename meer in CORT op dag 5, onafhankelijk van de MS conditie (NOVEL of HOME SEP).

Het is daarom waarschijnlijk dat deze desensitisatie van de bijnieraftgifte van CORT het gevolg is van het feit dat de pups de terugkomst van de moeder kunnen voorspellen. HOME SEP (en niet NOVEL SEP) pups vertoonden in afwezigheid van de moeder echter wel een snelle CORT respons na blootstelling aan een acute heterotypische stressor. Dit ging gepaard met een toegenomen tyrosine hydroxylase en melanocortine-2 receptor (MC2-R) eiwit gehalte in de bijnieren, dat wijst op verhoogde bijnieractiviteit. Deze verhoogde bijnier-stressreactiviteit bij dieren die herhaaldelijk zijn blootgesteld aan HOME SEP condities werd ook beïnvloed door het genotype. Long Evans ratten vertoonden een hogere CORT respons in vergelijking met Wistars.

De ratten hebben dus al na één ervaring geleerd dat moeder na 8 uur weer terug komt, maar blijven wel alert. Dat geldt met name voor de HOME SEP groep die in afwezigheid van de moeder met een flinke CORT respons reageerde op stress in tegenstelling tot hun NOVEL SEP lotgenoten.

In **hoofdstuk 3** werd aangetoond dat in de pups die tijdens MS in de thuis-situatie bleven (HOME SEP), met name de bijnier reageerde op een stressor. Echter, in de pups die tijdens de 8 uren MS niet in de thuishoek maar in een nieuwe omgeving werden geplaatst (NOVEL SEP) gebeurde er iets in de hersenen in plaats van in de bijnier. Het bleek dat niet de MS ervaring zelf, maar de blootstelling aan de stress van een nieuwe, onbekende omgeving tijdens MS (NOVEL SEP) resulteerde in activatie van het amygdala angstcircuit. Deze amygdala activatie had lange termijn gevolgen voor neuroendocriene en gedragsmatige stressreactiviteit.

NOVEL SEP pups vertoonden een toegenomen stress-geïnduceerde c-Fos activatie in de amygdala en ACTH afgifte in de hypofyse 1 dag na de MS ervaring. Deze dieren leken ook later in het leven een angstiger fenotype te hebben, dat zich uitte in minder speelgedrag in adolescentie en een versterkt geheugen voor emotionele stimuli op volwassen leeftijd. Dit ging wederom gepaard met verhoogde c-Fos activatie in de amygdala na blootstelling aan een geconditioneerde stressor.

Samengevat: deze bevindingen tonen de enorme plasticiteit van de jonge hersenen aan. De specifieke ervaring van blootstelling aan een onbekende omgeving in afwezigheid van de moeder heeft vergaande consequenties voor het programmeren van amygdala activiteit, angst-gerelateerd gedrag en activatie van het stress systeem.

In **hoofdstuk 4**, werd de drie-hit hypothese getest, die ook wel de cumulatieve stress hypothese genoemd wordt. Deze specificatie van de 'neurodevelopmental hypothesis' stelt dat de combinatie van stress vroeg en later in het leven samen met een genetische predispositie resulteert in een verhoogd risico op een schizofrenie-gerelateerd fenotype.

Om deze hypothese te toetsen gebruikten we APO-SUS ratten die een genetische predispositie hebben voor verhoogde dopaminerge activiteit en die tevens een opmerkelijke glucocorticoïd resistentie vertonen (hit 1). We gebruikten vervolgens natuurlijk voorkomende variatie in moederzorg als model voor stress vroeg in het leven (weinig moederzorg, hit 2) en sociale isolatie tijdens de pre-adolescentie als stressor later in het leven (hit 3). APO-SUS dieren die weinig moederzorg kregen hadden een verhoogde centrale en perifere stressreactiviteit en nog meer versterkte glucocorticoïdresistentie dan de APO-SUS dieren met gunstigere vroege levenservaringen. Bovendien vertoonden deze dieren een lage 'prepulse' inhibitie (PPI) van de akoestische 'startle' respons. Als deze dieren ook nog in sociale isolatie opgroeiden resulteerde dat in ernstig verstoorde PPI en afwijkingen in het werkgeheugen. Echter, de APO-SUS dieren die veel moederzorg kregen functioneerden wel goed en waren resistent tegen de negatieve effecten van sociale isolatie.

Samengevat: deze bevindingen toonden aan dat blootstelling aan stress zowel vroeg in het leven als tijdens de pre-adolescentie in combinatie met een genetische predispositie voor verhoogde dopaminerge activiteit kan leiden tot een schizofrenie-gerelateerd fenotype.

In **hoofdstuk 5**, hebben we zowel de cumulatieve stress als de mismatch hypothese bestudeerd in een populatie niet geselecteerde Wistar ratten. De mismatch hypothese stelt dat ervaringen vroeg in het leven de ontwikkelende hersenen programmeren in voorbereiding op het latere leven. In deze thesis is onderzocht of stress tijdens de vroege postnatale periode de psychose-gevoeligheid later in het leven kon beïnvloeden, en of dit afhankelijk was van stress die het dier rond de puberteit ervoer door blootstelling aan sociale isolatie. Als model voor stress tijdens de postnatale periode gebruikten we ofwel de natuurlijk voorkomende variatie in moederzorg, ofwel de door MS geïnduceerde verstoring van moederzorg.

Weinig moederzorg gecombineerd met sociale isolatie later in het leven gaf een verminderde psychose-gevoeligheid. Dit suggereerde dat afhankelijk van de aard van de stressor een match in de omgeving tijdens het vroege en latere leven (ook al lijken beide negatief) beschermend zou kunnen werken tegen psychose-gevoeligheid. Dieren die weinig moederzorg kregen als gevolg van MS en bovendien tijdens de MS onder stressvolle condities sociaal geïsoleerd waren, vertoonden een toegenomen

psychose-gevoeligheid wanneer ze opgroeiden in sociale huisvesting. Deze bevinding ondersteunde wederom de mismatch hypothese. Voorts, wanneer een hoge mate van moederzorg gecombineerd werd met opgroeien in sociale isolatie was er eveneens sprake van een toegenomen psychose-gevoeligheid, wat ook de mismatch hypothese ondersteunde. Tenslotte, een lage hoeveelheid moederzorg in combinatie met CORT toediening later in het leven leidde tot een verhoogde psychose-gevoeligheid. Als we de CORT toediening zien als een nabootsing van het ervaren van stress dan zouden we kunnen concluderen dat deze bevinding bewijs levert voor de cumulatieve stress hypothese.

Samengevat: of gen x omgevingsinteractie leidt tot ondersteuning van de mismatch of de cumulatieve stress hypothese hangt af van de experimentele condities. In de experimenten in hoofdstuk 5 met een niet geselecteerde Wistarpopulatie zijn de aanwijzingen over het algemeen ondersteunend voor de mismatch hypothese. Alleen de situatie met hoge doseringen CORT direct voorafgaand aan een gedragstest geeft een aanwijzing voor de cumulatieve stress hypothese.

In **hoofdstuk 6**, werden alle bevindingen zoals besproken in dit proefschrift bediscussieerd. Hierbij zijn zowel genetische als omgevingsfactoren gedefinieerd die betrokken zijn bij het 'programmeren' van schizofrenie-gerelateerde endofenotypes in de rat. In genetisch geselecteerde dieren met hoge dopaminerge activiteit (APO-SUS) bleek de drie-hit of cumulatieve stress hypothese voor schizofrenie van toepassing te zijn. In dieren zonder genetische predispositie, zoals de Wistar rat, leek de mismatch hypothese juist meer van toepassing. Verhoogde psychose-gevoeligheid was in beide gevallen evenwel geassocieerd met een toegenomen centrale 'stress drive' ofwel glucocorticoïd resistentie. Als 'eye opener' van dit onderzoek toonden we aan dat de programmering van het amygdala angst circuit door een stressvolle ervaring vroeg in het leven tesamen met gesensitiseerde 'pathways' en hersenstructuren betrokken bij schizofrenie-geassocieerde endofenotypes veelbelovende targets zijn voor toekomstig onderzoek.

Samenvattend kunnen we concluderen dat dopamine gevoeligheid geassocieerd is met een 'reactieve' genetische achtergrond, die een individu ontvankelijk maakt voor omgevingsfactoren. Individuen met een dergelijke genetische predispositie worden hard geraakt door de negatieve effecten van cumulatieve stress, maar zouden wel eens extra kunnen profiteren van een sociaal verrijkte, stressvrije omgeving.

Περίληψη στα ελληνικά

Στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η δημιουργία ενός πειραματικού μοντέλου σε ζώα για την σχιζοφρένεια, προκειμένου να προσδιοριστούν νέοι φαρμακευτικοί στόχοι για την αντιμετώπιση αυτής της σοβαρής ψυχιατρικής διαταραχής. Γι' αυτό το λόγο διερευνήθηκε η αλληλεπίδραση της γενετικής προδιάθεσης και της έκθεσης σε στρεσογόνο περιβάλλον στην νεογνική και προ-εφηβική ηλικία ως προς την ανάπτυξη της ευαισθησίας για ψύχωση σε επίμυες.

Χρησιμοποιήθηκαν κοινοί επίμυες (Long Evans, Wistar) και επίμυες γενετικά επιλεγμένους για υπερ-ευαισθησία στην απομορφίνη (APO-SUS), δύο πειραματικές συνθήκες για δυσμενές μητρικό περιβάλλον (φυσική διακύμανση της μητρικής φροντίδας και μητρική απομόνωση) και δύο διαφορετικά κοινωνικά περιβάλλοντα στην προ-εφηβική ζωή (κοινωνικό και σε απομόνωση), καθώς και συνθήκες μετρήσεων με ποικίλου βαθμού στρες. Οι πειραματικές μετρήσεις περιελάμβαναν την καταγραφή του ανοίγματος των ματιών και του σωματικού βάρους κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, και των κοινωνικών αλληλεπιδράσεων και της μνήμης εργασίας μεταξύ παιδικής ηλικίας και ενηλικίωσης. Μετά την ενηλικίωση, μετρήσαμε την συμπεριφορική ευαισθησία στην ντοπαμίνη, το αισθητικοκινητικό φίλτρο και τα εξαρτημένα αντανακλαστικά φόβου. Σε όλα αυτά τα στάδια της ζωής παρακολουθήσαμε ορμονικούς δείκτες, του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (HPA-axis) και την σχετιζόμενη με τον άξονα ιστική δραστηριότητα στα επινεφρίδια και τον εγκέφαλο.

Στο **Κεφάλαιο 1** οι τρέχουσες γνώσεις σχετικά με τις ψυχωτικές διαταραχές και πιο συγκεκριμένα σχετικά με τη σχιζοφρένεια παρουσιάζονται συνοπτικά με ιδιαίτερη έμφαση στο ρόλο της ντοπαμίνης και της δυσλειτουργίας του συστήματος του στρες. Επιπλέον γίνεται λόγος για την τη «νευροαναπτυξιακή υπόθεση για τη σχιζοφρένεια» δηλαδή την επικρατούσα αιτιολογική θεωρία για την παθογένεση της νόσου αυτής. Η θεωρία αυτή υποθέτει ότι η ανώμαλη ανάπτυξη του εγκεφάλου προκαλείται από αλληλεπιδράσεις γονιδίων και περιβάλλοντος και οδηγεί σε αυξημένο κίνδυνο για κλινικά συμπτώματα σχιζοφρένειας. Η συζήτηση για τις αλληλεπιδράσεις γονιδίων και περιβάλλοντος επεκτείνεται με παρουσίαση της θεωρίας «φύση-ανατροφή». Η αναγκαιότητα της χρήσης ενδο-φαινοτύπων της σχιζοφρένειας για τη σωστή κατανόηση των μηχανισμών της νόσου και τη χρησιμότητα αυτών των φαινοτύπων σε πειραματικά μοντέλα σε ζώα εκθέτονται επίσης. Επιστημονικά καθιερωμένα πειραματικά μοντέλα σε ζώα για την σχιζοφρένεια παρουσιάζονται με έμφαση στη χρήση τους για την απόδειξη των αιτιολογικών θεωριών. Το κεφάλαιο κλείνει με το σκεπτικό της παρούσας μελέτης και την έκθεση των προς απόδειξη υποθέσεων.

Οι εργασίες που περιγράφονται στην παρούσα διατριβή είχαν αφετηρία τα πειράματα που εκτελέστηκαν από τον συγγραφέα στο πλαίσιο της ιατρικής εκπαίδευσης του στο Πανεπιστήμιο Αθηνών και το Πανεπιστήμιο του Leiden. Αυτά τα πειράματα συνοψίζονται στο Παράρτημα και παρείχαν αποδεικτικά στοιχεία ότι η φύση και η

ένταση των επιμέρους στοιχείων (έκθεση σε νέο περιβάλλον και απτικός ερεθισμός) μιας ήπιας νεογνικής χειραγώγησης του νεογνού επίμυ (neonatal handling) μπορεί να επηρεάσει την έκβαση της στην ενήλική ζωή ως προς την μνήμη του χώρου και τη βασική λειτουργία του φλοιού των επινεφριδίων. Σε αντίθεση με το υπόλοιπο της διατριβής, όπου έγινε πειραματική χρήση δυσμενούς πρώιμου περιβάλλοντος, κατεδείχθη ότι ακόμα και ήπιες αλλαγές στο πρώιμο περιβάλλον μπορούν να οδηγήσουν σε μεταβολές της συμπεριφοράς ή στην αύξηση της πλαστικότητας της απάντησης σε μετέπειτα γεγονότα στη ζωή.

Στο **Κεφάλαιο 2**, μελετήσαμε τις άμεσες επιδράσεις του μητρικού αποχωρισμού (MA) στο ενδοκρινικό σύστημα του νεογνού επίμυος. Χρησιμοποιήσαμε δύο είδη MA: (i) τα νεογνά παρέμειναν στο κλουβί-σπίτι με τα αδέρφια τους κατά τη διάρκεια του MA (MA στο σπίτι -HOME SEP) και (ii) τα νεογνά απομακρύνονταν από το κλουβί-σπίτι κατά τη διάρκεια του MA και τοποθετούνταν σε απομόνωση, μεμονωμένα σε καινούργια κλουβιά (MA σε καινούργιο περιβάλλον - NOVEL SEP). Ένα μεμονωμένο επεισόδιο 8h-MA αυξάνει αργά τα επίπεδα της κορτικοστερόνης (CORT) στο νεογνό ηλικίας ημερών. Ωστόσο, εάν τα νεογνά είχαν εκτεθεί σε 8h-MA τις προηγούμενες δύο μέρες, 3 και 4, ο MA την 5ή μέρα δεν προκαλεί πια αύξηση της CORT ανεξάρτητα από το περιβάλλον που λαμβάνει μέρος ή το γονότυπο του επιμυός. Για να εξηγήσουμε αυτήν την απευαισθητοποίηση του νεογνικού ενδοκρινικού συστήματος στην απουσία της μητέρας προτείνουμε ως αιτιολογία ότι οι νεογέννητοι επίμυες εύκολα μαθαίνουν να προβλέπουν την επιστροφή της μητέρας μετά την πρώτη εμπειρία του 8h-MA, ανεξάρτητα από το εάν είναι στο σπίτι ή σε καινούργιο περιβάλλον κατά τη διάρκεια του MA.

Τα HOME SEP νεογνά δείχνουν αύξηση της CORT ως απάντηση σε ένα ετερόλογο στρεσογόνο ερέθισμα, η οποία προέρχεται από την αυξημένη δραστηριότητα των επινεφριδίων, όπως τεκμαίρεται από την αύξηση των επινεφριδιακών πρωτεϊνών (της τυροσινικής υδροξύλασης-TH και των υποδοχέων μελανοκορτίνης 2 - MC2R). Η αυξημένη ανταπόκριση των επινεφριδίων στο στρες μετά από επαναλαμβανόμενα επεισόδια «MA στο σπίτι» και όχι «MA σε καινούργιο περιβάλλον» επηρεάζεται από τον γονότυπο, με τα Long Evans νεογνά να εμφανίζουν υψηλότερη CORT ως απάντηση στρες μετά από επανειλημμένες «MA στο σπίτι» από τα νεογνά Wistar.

Στο **Κεφάλαιο 3**, χρησιμοποιώντας τα δύο είδη MA, αποδείξαμε ότι η εμπειρία της παραμονής σε απομόνωση σε νέο περιβάλλον (NOVEL SEP) κατά τη διάρκεια των επαναλαμβανόμενων MA και όχι η εμπειρία της απουσίας της μητέρας αυτή καθαυτή προκαλεί την πρώιμη ενεργοποίηση της νευρικής οδού φόβου της αμυγδαλής με μακροχρόνιες συνέπειες για την ανταπόκριση των νευροενδοκρινικών και συμπεριφορικών συστημάτων στο στρες. Βρήκαμε ότι τα NOVEL SEP νεογνά εμφανίζουν, μετά από στρες την 5η μέρα από την γέννηση, αυξημένη ενεργοποίηση του γονιδίου c-Fos της αμυγδαλής και απελευθέρωση κορτικοτροπίνης (ACTH) από την υπόφυση μια ημέρα μετά την επανένωση με την μητέρα. Αυτά τα NOVEL SEP νεογνά δείχνουν στην συμπεριφορά αργότερα στη ζωή τους αρκετές πτυχές ενός φοβικού φαινοτύπου,

συμπεριλαμβανομένων της μειωμένης πρωτοβουλίας για παιχνίδι στην παιδική ηλικία και της ενισχυμένης συναισθηματικής μνήμης με εξαρτημένα αντανakλαστικά φόβου. Η ενισχυμένη συναισθηματική μνήμη στη συμπεριφορά συνδυάστηκε με αυξημένα επίπεδα c-Fos mRNA στην αμυγδαλή. Τα ευρήματα αυτά τονίζουν την καταπληκτική πλαστικότητα του νεογνικού εγκεφάλου. Ανακαλύψαμε ότι μια νεογνική στρεσογόνος εμπειρία, που τα νεογνά δεν μοιράζονται με άλλους κατά τη διάρκεια της απουσίας της μητέρας, ευνοεί τον προγραμματισμό της δραστηριότητας της αμυγδαλής και των λειτουργιών του φόβου και κατ' επέκταση της συμπεριφοράς και δραστηριότητας του άξονα HPA.

Στο **Κεφάλαιο 4**, εξετάσαμε την ισχύ της θεωρίας «φύση-ανατροφή» για τη σχιζοφρένεια και πιο συγκεκριμένα στην υπόθεση των τριών-χτυπημάτων (συσσωρευτικό στρες), η οποία αναφέρει ότι το στρες πρώιμα στη ζωή και αργότερα ένα ψυχοκοινωνικό στρες, επάνω σε μια γενετική προδιάθεση οδηγεί σε σοβαρό κίνδυνο ανάπτυξης των φαινοτύπων της σχιζοφρένειας. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε επίμυες γενετικά επιλεγμένους για υπερ-ευαισθησία στην απομορφίνη (APO-SUS), που έχουν μια γενετική προδιάθεση για αυξημένη ευαισθησία του συστήματος της ντοπαμίνης και κεντρική αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή. Ως μέτρο των επιπέδων του στρες στη πρώιμη ζωή, χρησιμοποιήσαμε την φυσική διακύμανση της μητρικής φροντίδας στον πληθυσμό των επιμύων και ως στρεσογόνο περιβάλλον στην προ-εφηβική ζωή την κοινωνική απομόνωση μετά τον απογαλακτισμό. Οι APO-SUS επίμυες, όταν εκτίθεντο σε χαμηλά επίπεδα μητρικής φροντίδας έδειξαν ενισχυμένη κεντρική και περιφερική ανταπόκριση στο στρες και μικρή αναστολή του ακουστικού αντανakλαστικού (PPI). Εάν πέρα από τα χαμηλά επίπεδα της μητρικής φροντίδας οι APO-SUS επίμυες εκτρέφονται σε κοινωνική απομόνωση, στη συνέχεια, το PPI ήταν εξαιρετικά χαμηλό, καθώς και η μνήμη εργασίας μειωμένη. Αντίθετα, οι APO-SUS επίμυες με υψηλή μητρική φροντίδα δείχνουν βελτιωμένη συμπεριφορά και είναι προστατευμένοι από τις αρνητικές επιπτώσεις της κοινωνικής απομόνωσης. Τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι ένας σοβαρός φαινότυπος που προσομοιάζει με σχιζοφρένεια αναπτύσσεται μετά την συνδυασμένη έκθεση των γενετικά προδιατεθειμένων ατόμων σε χρόνιο στρεσογόνο περιβάλλον στην πρώιμη και την προ-εφηβική ζωή.

Στο **Κεφάλαιο 5** εξετάσαμε την ισχύ δύο υποθέσεων, του συσσωρευτικού στρες και της αναπτυξιακής αναντιστοιχίας, για τους επίμυες χωρίς γενετική προδιάθεση (Wistar). Η υπόθεση συσσωρευτικού στρες προβλέπει ότι οι περιβαλλοντικοί παράγοντες κινδύνου λειτουργούν προς μια κατεύθυνση που οδηγεί στην αύξηση της ευαλωτότητας για ψυχοπαθολογία. Η υπόθεση αναπτυξιακής αναντιστοιχίας προτείνει ότι οι εμπειρίες νωρίς στη ζωή προγραμματίζουν την ανάπτυξη του εγκεφάλου σε αναμονή της μετέπειτα ζωή τους. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε το κατά πόσον το μητρικό περιβάλλον μπορεί να επηρεάσει αργότερα στη ζωή την ευαισθησία για ψύχωση, σε σχέση με το μετέπειτα κοινωνικό πλαίσιο. Χρησιμοποιήθηκαν οι δύο πειραματικές συνθήκες για δυσμενές μητρικό περιβάλλον, φυσική διακύμανση της μητρικής φροντίδας και MA στο σπίτι ή σε καινούριο περιβάλλον. Τα αποτελέσματα ήταν περίπλοκα, αλλά αν

συνοψισθούν παρουσιάζουν μια ενδιαφέρουσα επισκόπηση των πιθανών εκβάσεων μετά από έκθεση σε περιβαλλοντικό στρες:

-Αντιστοιχία: όταν η χαμηλή μητρική φροντίδα συνδυαστεί με κοινωνική απομόνωση μετά τον απογαλακτισμό οδηγεί σε μειωμένη ευαισθησία για ψύχωση, διαπίστωση που υποστηρίζει ουσιαστικά ότι όταν οι μετέπειτα συνθήκες ταιριάζουν με το πρώιμο περιβάλλον έχουν ευεργετική επίδραση και προστατεύουν από την ψύχωση ακόμα και μετά από δύο φαινομενικά αρνητικές περιβαλλοντικές συνθήκες για την ανάπτυξη.

-Αναντιστοιχία: Σε άτομα με ιστορικό χαμηλής μητρικής φροντίδας που προκαλείται από ΜΑ σε καινούριο περιβάλλον, όταν μετά τον απογαλακτισμό ζούν σε ομάδες, ο κίνδυνος για ψύχωση αυξάνεται. Εκτός από την επιβεβαίωση της υπόθεσης αναπτυξιακής αναντιστοιχίας, φαίνεται επίσης ότι υπάρχει αντίθετο αποτέλεσμα μιας ανεπιθύμητης πρώιμης εμπειρίας, ανάλογα με το αν οι νεογνοί επίμυες είναι σε ΜΑ όλοι μαζί ή μεμονωμένα.

-Αναντιστοιχία: Μια άλλη απόδειξη της υπόθεσης αναπτυξιακής αναντιστοιχίας προκύπτει εάν περιβάλλον υψηλής μητρικής φροντίδας συνδυαστεί με την μεταγενέστερη κοινωνική απομόνωση οδηγώντας σε αυξημένη ευαισθησία για ψύχωση.

-Συσσωρευτικό στρες, τα φυσικά χαμηλά επίπεδα μητρικής φροντίδας μπορούν να οδηγήσουν σε αυξημένη ευαισθησία για ψύχωση μετά από οξεία χορήγηση υπερβολικής δόσης CORT. Αν η CORT ληφθεί ως χαρακτηριστική επίπτωση της επιρροής του στρες, μπορεί κανείς να θεωρήσει αυτό το εύρημα ως αποδεικτικό στοιχείο για την υπόθεση συσσωρευτικού στρες.

Στο **Κεφάλαιο 6** κάνουμε μια σύνθεση των ευρημάτων μας. Η δουλειά μας όρισε γενετικούς και περιβαλλοντικούς παραγόντες που προγραμματίζουν υπερδραστηριότητα του συστήματος του στρες και ενδοφαινότυπους της σχιζοφρένειας σε επίμυες. Πρώιμες στρεσογόνες εμπειρίες σε κοινωνική απομόνωση προγραμματίζουν την λειτουργία της αμυγδαλής για όλη τη ζωή. Στην περίπτωση των γενετικά προδιατεθειμένων επιμύων (APO-SUS), παρέχουμε ισχυρά αποδεικτικά στοιχεία για την υπόθεση των τριών-χτυπημάτων για τη σχιζοφρένεια (συσσωρευτικό στρες) . Στην περίπτωση των μη γενετικά προδιατεθειμένων επιμύων (Wistar), υποστηρίζουμε την υπόθεση της αναπτυξιακής αναντιστοιχίας δεδομένου ότι συχνά το αποτέλεσμα του στρες στη πρώιμη ζωή αλληλεπιδρά με το μεταγενέστερο προ-εφηβικό κοινωνικό πλαίσιο, καθορίζοντας το αποτέλεσμα.

Στο σύνολο τους τα αποτελέσματα αυτής της διατριβής δείχνουν ότι το γενετική επιλογή για υπερευαισθησία στη ντοπαμίνη σημαίνει ουσιαστικά αντιδραστικά ντοπαμινεργικά αλληλόμορφα που αυξάνουν την ευαισθησία σε όλες τις εμπειρίες. Το άτομο που φέρει αυτά τα αντιδραστικά αλληλομορφα είναι ευαίσθητο στις επιβλαβείς συνέπειες του συσσωρευτικού στρες και δείχνει επίσης αυξημένη ανταπόκριση σε ένα θετικό περιβάλλον με απουσία στρες.

