



Ελληνική
Εταιρεία
Περιγεννητικής
Ιατρικής

18^ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ
ΠΕΡΙΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ



16 - 18 Οκτωβρίου 2015

ΜΕΓΑΡΟ ΔΙΕΘΝΕΣ ΣΥΝΕΔΡΙΑΚΟ
ΚΕΝΤΡΟ ΑΘΗΝΩΝ

Η κάτωθι εργασία παρουσιάστηκε και βραβεύτηκε στα πλαίσια του
18ου Πανελληνίου Συνεδρίου Περιγεννητικής Ιατρικής,
16-18 Οκτωβρίου 2015, Μέγαρο Μουσικής Αθήνα.

Επίδραση της περιγεννητικής υποξίας στα ντοπαμινεργικά συστήματα του ανθρωπίνου εγκεφάλου: συμβολή στην αιτιοπαθογένεια ψυχιατρικών νοσημάτων

Παναγιωτακοπούλου Μαρία^{1,2}, Παγίδα Μαριάννα^{1,2}, Κωνσταντινίδου Αναστασία³

¹Α' Ψυχιατρική Κλινική, ²Ερευνητικό Πανεπιστημιακό Ινστιτούτο Ψυχικής Υγιεινής, ³Α' Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Αλληλογραφία: Μαρία Παναγιωτακοπούλου
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Α' Ψυχιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών και Ερευνητικό Πανεπιστημιακό Ινστιτούτο Ψυχικής Υγιεινής
Τ.Θ. 665 17, Τ.Κ. 156 01, Παπάγου
E-mail: mpanagiot@med.uoa.gr, Τηλ.: 210-6170884

Περίληψη

Η περιγεννητική υποξία/ ισχαιμία (ΠΥΙ) θεωρείται ότι αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου για τη μετέπειτα εμφάνιση δυσλειτουργιών μνήμης και μάθησης, διαταραχής ελλειμματικής προσοχής και υπερκινητικότητας και σχιζοφρένειας. Πειραματικές μελέτες έδειξαν ότι η ΠΥΙ προκαλεί ειδικές, μακράς διάρκειας αλλοιώσεις των κεντρικών ντοπαμινεργικών συστημάτων που διατηρούνται μέχρι την ενηλικίωση. Σε νεκροτομικό υλικό μελετήσαμε την έκφραση της υδροξυλάσης της τυροσίνης (TH, πρώτο και καθοριστικό ένζυμο για τη σύνθεση της ντοπαμίνης) στον εγκέφαλο νεογνών που είχαν διαγνωσθεί με νεογνική (υποξική/ ισχαιμική) εγκεφαλοπάθεια, σε σχέση με τη σοβαρότητα/ διάρκεια ή χρονιότητα της ΠΥΙ, όπως αυτή εκτιμήθηκε με νευροπαθολογικά κριτήρια. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η ΠΥΙ είχε διαφορετική επίδραση στην έκφραση της TH στα διαφορετικά μέρη του εγκεφάλου. Σε περιστατικά σοβαρής/ μικρής διάρκειας ΠΥΙ, εντοπίστηκε έντονη TH-ανοσοθετικότητα στις γνωστές ντοπαμινεργικές περιοχές του μεσεγκεφάλου μέλαινα ουσία (SN) και κοιλιακή καλυπτρική περιοχή (VTA). Στα νεογνά αυτά, TH-ανοσοθετικότητα βρέθηκε και στα κύτταρα που παράγουν urocortin-1 (πεπτιδίο του στρες) στον πυρήνα Edinger-Westphal που δεν είναι γνωστό από τα βιβλιογραφικά δεδομένα ότι παράγει κατεχολαμίνες. Σε νεογνά με αλλοιώσεις παρατεταμένης/ χρόνιας υποξίας, παρατηρήθηκε μείωση ή απουσία της TH-ανοσοθετικότητας στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες της SN και VTA, ενώ μαζική επαγωγή της TH παρατηρήθηκε στους νευροεκκριτικούς νευρώνες του υποθαλάμου. Συμπερασματικά, θεωρούμε ότι πρώιμες αλλαγές στην έκφραση της TH -και κατά συνέπεια της ντοπαμινεργικής νευρομεταβίβασης- σε κρίσιμα στάδια της ανάπτυξης του εγκεφάλου θα μπορούσε να προδιαθέτει παιδιά που επιβίωσαν από ΠΥΙ σε νευροαναπτυξιακά ψυχιατρικά νοσήματα στη μετέπειτα ζωή.

Λέξεις κλειδιά: Περιγεννητική υποξία, νεογνά, ντοπαμίνη, υδροξυλάση της τυροσίνης, ανθρωπίνος εγκέφαλος

Εισαγωγή

Η περιγεννητική υποξία/ ισχαιμία (ΠΥΙ) αποτελεί ακόμα και σήμερα ένα παγκόσμιο πρόβλημα υγείας με συχνότητα εμφάνισης στις 3-5 ανά 1000 γεννήσεις ζωντανών νεογνών, συχνότητα που δεν έχει μειωθεί παρά τη σημαντική πρόοδο που έχει επέλθει τα τελευταία χρόνια στο τομέα της μαιευτικής και περιγεννητικής φροντίδας. Κατά τη περιγεννητική περίοδο, διάφορες κλινικές καταστάσεις μπορούν να προκαλέσουν μείωση στην παροχή οξυγόνου (υποξία) ή/ και θρεπτικών συστατικών (ισχαιμία) στον εγκέφαλο του νεογνού, όπως οξεία έμφραξη του ομφάλιου λώρου, χρόνια ανεπάρκεια λειτουργίας του πλακούντα, μη φυσιολογικές συσπάσεις της μήτρας, αποτυχία του νεογνού να ξεκινήσει επιτυχώς να αναπνέει, πνευμονία, κυανωτική συγγενής καρδιακή νόσος, βρογχοπνευμονική δυσπλασία, σύνδρομο εισρόφησης (μικωνίου, αίματος, αμνιακού υγρού) ¹.

Περίπου το 25% των νεογνών που έχει υποστεί κάποιο υποξικό/ ισχαιμικό επεισόδιο επιβιώνει, αλλά με σοβαρές μακροχρόνιες διαταραχές, που αποτελούν σημαντικό επιβαρυντικό παράγοντα όχι μόνο για το ίδιο το άτομο και την οικογένειά του, αλλά και για την ίδια τη κοινωνία. Πάνω από το 10% των παιδιών που επιβιώνουν θα αναπτύξει κινητικά προβλήματα, όπως εγκεφαλική παράλυση ή σπαστικότητα. Ηπιότερης έντασης υποξικά/ ισχαιμικά επεισόδια έχουν συσχετισθεί με διαταραχές της μάθησης και μνήμης, καθώς και με διαταραχές ελλειμματικής προσοχής και υπερκινητικότητας ελλείψει εμφανών νευρολογικών προβλημάτων².

Σύμφωνα με την υπόθεση του «αναπτυξιακού προγραμματισμού της υγείας και της ασθένειας», η πρώιμη έκθεση ενός ατόμου σε δυσμενείς περιβαλλοντικούς παράγοντες (π.χ.

υποξία, μόλυνση, έκθεση σε ουσίες, στρες) -σε συνδυασμό με τη γενετική προδιάθεση- μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στη φυσιολογική αναπτυξιακή πορεία του ατόμου και να αυξήσει το κίνδυνο εμφάνισης –κατά την ενηλικίωση- χρόνιων ασθενειών, όπως υπέρταση, στεφανιαία καρδιακή νόσο, αντίσταση στην ινσουλίνη και διαβήτη τύπου 2, παχυσαρκία, καρκίνο και οστεοπόρωση^{3,4}. Επιδημιολογικές μελέτες υποδεικνύουν ότι η ΠΥΙ πιθανώς αποτελεί ένα βασικό παράγοντα κινδύνου στην εκδήλωση νευρολογικών και ψυχικών ασθενειών αργότερα στη ζωή του ατόμου, όπως της διανοητικής καθυστέρησης, της επιληψίας², των αναπτυξιακών μορφών παρκινσονισμού^{5,6}, του συνδρόμου ελλειμματικής προσοχής με υπερκινητικότητα (ΔΕΠΥ)⁷, της σχιζοφρένειας⁸ και ενός φάσματος διαταραχών που σχετίζονται με τον αυτισμό⁹.

Σε κυτταρικό επίπεδο, η υποξία μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση με την ενεργοποίηση πολυάριθμων μεταγραφικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου του παράγοντα απόκρισης στην υποξία (HIF, hypoxia inducible factor) που αποτελεί σημαντικό μεσολαβητή στην ομοιόσταση οξυγόνου. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι μελέτες των Schmidt-Kastner και συνεργατών που βρήκαν ότι πάνω από το 50% των υποψήφιων γονιδίων που προδιαθέτουν για σχιζοφρένεια ρυθμίζονται από την υποξία ή/ και εκφράζονται στο αγγειακό σύστημα^{10,11}. Υπό υποξικές συνθήκες, ο HIF προκαλεί αύξηση της έκφρασης πολυάριθμων γονιδίων που φέρουν ειδικές αλληλουχίες που ανταποκρίνονται στην υποξία (HRE, hypoxia responsive elements) είτε στον υποκινητή είτε στον ενισχυτή τους [για ανασκόπηση¹²], όπως της υδροξυλάσης της τυροσίνης (TH), που είναι ένα ένζυμο κρίσιμο για τη σύνθεση της ντοπαμίνης και της νοραδρεναλίνης¹³. Η TH είναι ένα οξυγονο-εξαρτώμενο ένζυμο και κινητικές μελέτες υποδεικνύουν ότι η διαθεσιμότητα του οξυγόνου μπορεί να περιορίσει τη σύνθεση των κατεχολαμινών στον εγκέφαλο. Βιοχημικές όμως μελέτες δείχνουν ότι σε υποξικό στρες η TH χάνει την εξάρτησή της από το οξυγόνο. In vivo, η υποξία διεγείρει τα επίπεδα της TH πρωτεΐνης, του TH mRNA και της ντοπαμίνης. Η παρατεταμένη αυτή μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της TH εξαρτάται από τη διάρκεια του υποξικού ερεθίσματος και οδηγεί σε μακροχρόνιες - προσαρμοστικές ή και όχι- αλλαγές στην έκφραση της TH [για ανασκόπηση¹⁴].

Η μέλαινα ουσία (SN, substantia nigra) και η κοιλιακή καλυπτρική περιοχή (VTA, ventral tegmental area) στον μεσεγκεφαλο περιλαμβάνει τους περισσότερους ντοπαμινεργικούς (DA) νευρώνες του εγκεφάλου που εμπλέκονται κυρίως στον έλεγχο κινητικών και νοητικών συμπεριφορών. Οι νευρώνες αυτοί φυσιολογικά εκφράζουν σε μεγάλες ποσότητες την TH, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως σαν ιστοχημικός δείκτης των κατεχολαμινικών κυττάρων¹⁵. Δυσλειτουργία των DA αυτών συστημάτων έχει αναφερθεί στη παθοφυσιολογία πολλών νευρολογικών και νευροψυχιατρικών διαταραχών, κυρίως της νόσου Πάρκινσον^{6,16,17} και της σχιζοφρένειας¹⁸⁻²¹, δύο σοβαρές ασθένειες με πιθανή νευροαναπτυξιακή προέλευση^{5,22}. Εκτός της αιτιοπαθογένειας τα ντοπαμινικά αυτά συστήματα εμπλέκονται και στη φαρμακευτική αντιμετώπιση των ασθενειών αυτών^{23,24}. Η ντοπαμίνη αποτελεί ένα νευροδιαβιβαστή κλειδί στον εγκέφαλο καθώς εμπλέκεται στην ενίσχυση της μάθησης, της ανταμοιβής, της πλαστικότητας στον ιππόκαμπο, στην ενεργό μνήμη, στον εθισμό και στη κινητοποίηση λόγω κινήτρου¹⁵.

Πειραματικά μοντέλα ΠΥΙ έδειξαν ειδικές -μακράς διάρκειας- αλλοιώσεις στα DA συστήματα του εγκεφάλου. Υποξικές βλάβες κατά τον τοκετό αλληλεπιδρούν με το στρες με αποτέλεσμα να τροποποιούν τη DA λειτουργία του εγκεφάλου σε όλη τη μετέπειτα ζωή [για ανασκόπηση²⁴]. Η ΠΥΙ, ανάλογα με τη διάρκειά της, μπορεί να προκαλέσει τροποποιήσεις της DA νευροδιαβίβασης στα βασικά γάγγλια και το μεταιχμιακό σύστημα (περιοχές προβολής των DA νευρώνων) που διατηρούνται σε όλη τη μετέπειτα ζωή²⁵⁻²⁷.

Προηγούμενες μελέτες μας είχαν ως σκοπό τη μελέτη της επίδρασης της ΠΥΙ στα κύρια ντοπαμινεργικά συστήματα του ανθρώπου, κάτι που δεν είχε προηγουμένως διερευνηθεί παρά την εξαιρετική σημασία του θέματος αυτού για την νευροαναπτυξιακή πορεία του νεογνού. Μελετήσαμε ανοσοϊστοχημικά την έκφραση της TH στα κύρια DA συστήματα του εγκεφάλου νεογνών (συνολικής διορθωμένης ηλικίας 32,5 -46,5 εβδομάδων) σε σχέση με τη σοβαρότητα/ διάρκεια ή χρονιότητα της ΠΥΙ, όπως εκτιμήθηκε με νευροπαθολογικά κριτήρια. Το νεκροτομικό υλικό εγκεφάλων συλλέχθηκε από το ΑεΕργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, Ελληνική Τράπεζα Εγκεφαλικού Ιστού (Greek Brain Bank, μέλος της Brain-Net Europe, διευθυντής: Καθηγητής Ε. Πατσούρης) και χρησιμοποιήθηκε κατόπιν γραπτής συγκατάθεσης των γονέων τους για χρήση των ιστών για διαγνωστικούς και ερευνητικούς σκοπούς. Η νευροπαθολογοανατομική εκτίμηση της νεογνικής εγκεφαλοπάθειας έγινε μακροσκοπικά και μικροσκοπικά με βάση την παρουσία αλλοιώσεων στη φαιά ή/και λευκή ουσία του εγκεφάλου (τοπογραφική κατανομή και διαβαθμίσεις νευρωνικής νέκρωσης, διαβαθμίσεις περικοιλιακής λευκομαλάκυνσης). Η εκτίμηση της έντασης και διάρκειας ή παλαιότητας της υποξικής/ισχαιμικής βλάβης βασίστηκε σε εδραιωμένα νευροπαθολογοανατομικά κριτήρια²⁸⁻³⁰ (Πίνακας 1). Λαμβάνοντας υπόψη την ύπαρξη περιορισμών στη μελέτη ανθρώπινου νεκροτομικού υλικού καθώς και το γεγονός ότι σε όλα τα νεογνά που ικανοποιούσαν τα κριτήρια ένταξης στη σειρά μας παρατηρήθηκε κάποιου βαθμού νευροπαθολογοανατομική βλάβη, δεν ήταν δυνατό να συμπεριληφθούν στη μελέτη αυτή αμιγείς αρνητικοί «μάρτυρες» [για ανασκόπηση³¹], ως εκ τούτου οι παρατηρήσεις μας αξιολογήθηκαν συγκριτικά με βάση τη διαβάθμιση των νευροπαθολογοανατομικών αλλοιώσεων.

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν έντονα κερωσμένους TH-ανοσοθετικούς νευρώνες στη SN και VTA (εικόνα 1Α) στα περιστατικά με ιστολογικές ενδείξεις έντονης/ μικρής διάρκειας ΠΥΙ, όπως φυσιολογικά παρατηρείται στον ενήλικα άνθρωπο¹⁵. Με έκπληξη, όμως παρατηρήθηκε έκφραση της TH, και σε σχεδόν όλους τους νευρώνες ενός άλλου πυρήνα του μεσεγκεφάλου -του Edinger-Westphal (EW) (εικόνα 1Γ)- που δεν είναι γνωστός βιβλιογραφικά για το κατεχολαμινικό του φαινότυπο^{31,32}. Ο EW είχε αρχικά θεωρηθεί ως μια χολινεργική, παρασυμπαθητική προγαγγλιονική περιοχή που εμπλέκεται στη συστολή της κόρης και της θέσης του φακού στον οφθαλμό³³, αλλά σήμερα θεωρείται ότι περιλαμβάνει νευρώνες με διαφορετική νευροχημεία και λειτουργία ανάμεσα στα διαφορετικά είδη³⁴. Στον άνθρωπο, ο EW περιλαμβάνει μη-προγαγγλιακούς νευρώνες που προβάλλουν κεντρικά και είναι θετικοί για την urocortin-1³⁵. Η urocortin-1 είναι ένα νευροπεπτίδιο 40-αμινοξέων³⁶, που ανήκει στην οικογένεια του εκλυτικού παράγοντα της κορτικοτρόπου ορμόνης (CRF,

Πίνακας 1: Εκτίμηση της διάρκειας/ έντασης της υποξίας με βάση τα νευροπαθολογοανατομικά κριτήρια

Βλάβη	Διάρκεια/ Ένταση		
	Έντονη/ μικρής διάρκειας	Ήπια / παρατεταμένης διάρκειας	Πολύ σοβαρή/ μακράς διάρκειας
Αλλοιώσεις στη φαιά ουσία	Θάλαμος Βασικά γάγγλια	Εγκεφαλικός φλοιός Θάλαμος Βασικά γάγγλια	Διάχυτη νευρωνική νέκρωση Αποτιτάνωση
Αλλοιώσεις στη λευκή ουσία	Οξεία	Υποξεία	Χρόνια
Ιστοπαθολογικά ευρήματα	Ισχαμική νέκρωση Οίδημα νευραξόνων	Ενδοθηλιακή υπερχλασία Πολλαπλασιασμός μικρογλοίας Μικροασβεστοποίηση Γλοίωση	Ουλή γλοίας Δημιουργία κυστικών κοιλοτήτων
Νευροπαθολογική εκτίμηση των αλλοιώσεων	Βαθμός 1	Βαθμός 2	Βαθμός 3

corticotropin-releasing factor). Οι νευρώνες αυτοί εμπλέκονται στη προσαρμογή του ατόμου στο stress και κατά συνέπεια σε ασθένειες που σχετίζονται με αυτό, όπως ανησυχία (anxiety), μείζων κατάθλιψη και χρήση εξαρτησιογόνων ουσιών (drugs of abuse)^{34,37}. Η αυξημένη έκφραση της TH στους urocortin1-ανοσοθετικούς νευρώνες του EW, ειδικά στα περιστατικά του δείγματός μας με ιστοπαθολογικές ενδείξεις οξείας ΠΥΙ, βλάβης μπορεί να αντιπροσωπεύει μια -εξααρτώμενη από τις κατεχολαμίνες- προσαρμογή του ανθρώπινου νεογνού στο οξύ υποξικό στρες, κάτι που χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση³². Εξαιρετικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η ιστοχημική μελέτη των Howes και συνεργατών που έδειξαν αυξημένο αριθμό TH-ανοσοθετικών νευρώνων στο μεσεγκεφάλο των σχιζοφρενών²¹. Στα περιστατικά με νευροπαθολογικές ενδείξεις παρατεταμένης διάρκειας ΠΥΙ βλάβης, παρατηρήθηκε μαζική μείωση της TH ανοσοθετικότητας στη SN και VTA (εικόνα 1B). Πειραματικές μελέτες in vivo και σε κυτταροκαλλιέργειες υποδεικνύουν ότι στα αρχικά στάδια της υποξίας παρατηρείται μαζική απελευθέρωση ντοπαμίνης²⁵. Εάν μια παρόμοια δραματική αύξηση στη σύνθεση και απελευθέρωση ντοπαμίνης συμβαίνει και στο ανθρώπινο νεογνό κατά τη διάρκεια της αρχικής φάσης της περιγεννητικής υποξίας, η παρατηρούμενη μείωση της TH-ανοσοθετικότητας στο δείγμα μας υπό συνθήκες παρατεταμένης υποξίας μπορεί να αποδοθεί στην ανάδρομη αναστολή της TH από το τελικό προϊόν της, ντοπαμίνη³⁸.

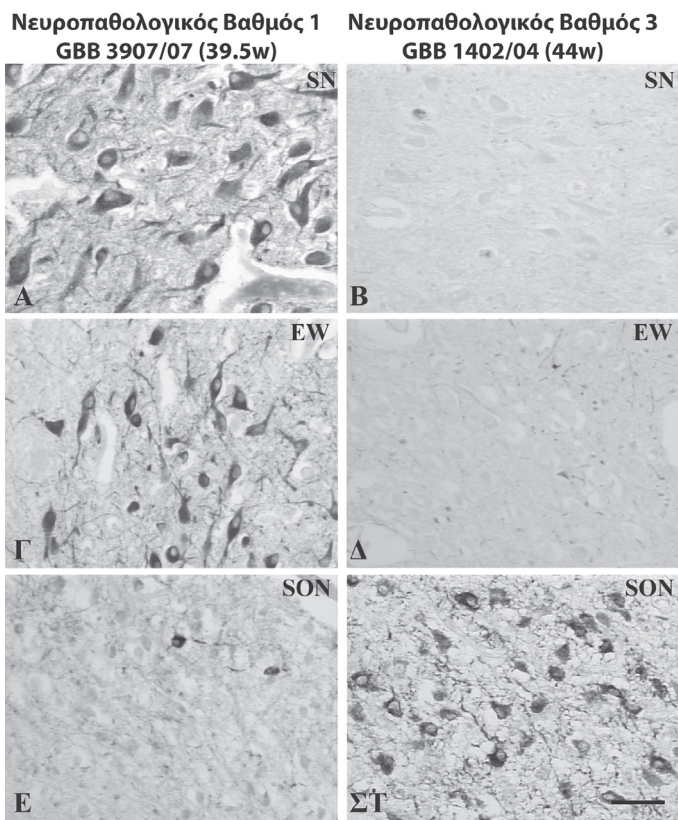
In vitro και in vivo μελέτες δείχνουν ότι η ντοπαμίνη είναι τοξική σε υψηλές συγκεντρώσεις³⁹. Από το μεταβολισμό της ντοπαμίνης παράγονται κινόνες και ενεργές ρίζες οξυγόνου που συμβάλλουν στη κυτταρική βλάβη μέσω της ενεργοποίησης της κασπάσης-3⁴⁰, της αναστολής της μιτοχondριακής αναπνοής⁴¹ και της βλάβης του DNA^{39,42}. Κατά τη διάρκεια της υποξίας, τα ενεργειακά αποθέματα του ιστού αδειάζουν, οδηγώντας σε αδυναμία επαναπρόσληψης και αποθήκευσης της ντοπαμίνης, καθιστώντας την περίσσειά της «επικίνδυνη» για τους νευρώνες του ραβδωτού σώματος, ειδικότερα σε συνδυασμό με τη τοξική δράση του γλουταμινικού⁴³⁻⁴⁵.

Τα αποτελέσματά μας είναι σε συμφωνία με πειραματικά δεδομένα που δείχνουν ότι η περιγεννητική υποξία προκαλεί αλλαγές -που εξαρτώνται από τη διάρκεια της υποξίας- στον αριθμό των DA νευρώνων στη SN και VTA, καθώς και στη

ντοπαμινεργική νευροδιαβίβαση στις περιοχές στόχους, δηλαδή στα βασικά γάγγλια και προμετωπιαίο φλοιό/ μεσομεταιχμιακές περιοχές. Αύξηση στον αριθμό των DA νευρώνων παρατηρήθηκε στη SN και VTA του αρουραίου μετά από ένα οξύ περιγεννητικό υποξικό επεισόδιο, υποδεικνύοντας πιθανώς πολλαπλασιασμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων ή μείωση του κυτταρικού θανάτου κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης^{46,47}. Όταν όμως οι υποξικές συνθήκες διαρκούσαν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (που οδηγούσαν σε ποσοστό σχεδόν 100% σε θάνατο τα νεογνήτα πειραματοζώα), παρατηρήθηκε μειωμένος αριθμός DA νευρώνων και στις δύο περιοχές των νεογνών που επιβίωσαν. Το πιο σημαντικό είναι ότι αυτή η απώλεια διατηρείται και στην ενήλικη ζωή^{47,48}. Ο μειωμένος αριθμός των DA νευρώνων στη SN στον ενήλικα αποδόθηκε σε απόπτωση «παθολογικού τύπου» (“pathological apoptosis”) που προκλήθηκε από τη μειωμένη τροφική στήριξη από το ραβδωτό σώμα (στόχος)⁴⁹. Σύμφωνα με τους Young και συνεργάτες⁵⁰, ένα πρώτο κύμα τοξικότητας -λόγω νευρωνικής διέγερσης- καταστρέφει τους νευρώνες που φυσιολογικά αποτελούν τους συναπτικούς στόχους άλλων νευρώνων στη συνέχεια που πεθαίνουν σε ένα δεύτερο αποπτωτικό κύμα, όπως περιγράφεται στην SN ενήλικων πειραματοζώων στα μοντέλα περιγεννητικής υποξίας^{48,49,51}. Η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης στον άνθρωπο έδειξε μειωμένη νευροτροφική στήριξη και αλλαγές στα μόρια «οδηγούς» των αξόνων (axon guidance cues) στα πρώιμα στάδια του κυτταρικού στρες, που τελικώς οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο τα ντοπαμινικά κύτταρα της SN στη νόσο Πάρκινσον⁵².

Εκτός από τις αλλαγές στην έκφραση της TH, αξίζει να αναφερθεί ότι μετά από παρατεταμένη ΠΥΙ παρατηρήθηκε παράλληλα και μείωση του κυτταρικού μεγέθους στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες της SN και της VTA των νεογνών αυτών, υποδεικνύοντας καθυστέρηση ή προσωρινή αναστολή της ανάπτυξής τους στον άνθρωπο υπό παρατεταμένη υποξία. Μη φυσιολογική ωρίμανση της SN έχει βρεθεί στο ΔΕΠΥ (Romanos et al., 2010) και σημαντικά μικρότερος όγκος της μελαινοραβδωτής περιοχής με μικρότερου μεγέθους νευρώνες στη SN έχει αναφερθεί στη σχιζοφρένεια (Bogerts et al., 1983).

Συνεπώς, στον άνθρωπο, οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες της SN και της VTA φαίνεται να είναι ιδιαίτερα ευάλωτοι στη παρα-



Εικόνα 1: Τομές παραφίνης που έχουν χρωσθεί για υδροξυλάση της τυροσίνης (TH) από διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου δύο νεογνών με διαφορετική νευροπαθολογική εκτίμηση περιγεννητικής υποξικής/ ισχαιμικής βλάβης GBB3907/07 με βαθμό 1 (εικ. Α, Γ, Ε) και 1402/04 με βαθμό 3 (εικ. Β, Δ, ΣΤ). Στη μέλαινα ουσία (SN) του μεσεγκεφάλου, στο νεογνό GBB3907/07 με νευροπαθολογικές βλάβες μικρής διάρκειας υποξίας, παρατηρείται έντονη χρώση για TH στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες (Α), ενώ στο νεογνό GBB 1402/04 με νευροπαθολογικές βλάβες παρατεταμένης διάρκειας υποξίας, παρατηρείται απουσία TH ανοσοθετικότητας (Β). Στο GBB 3907/07 σχεδόν όλοι οι νευρώνες του πυρήνα Edinger-Westphal (EW) έχουν έντονα χρωσθεί με TH (Γ), ενώ στο GBB 1402/04 δεν παρατηρήθηκε TH-ανοσοθετικότητα στον EW (Δ). Στο υπεροπτικό πυρήνα του υποθαλάμου (SON), στο περιστατικό GBB 3907/07 βρέθηκε ένας περιορισμένος αριθμός TH-ανοσοθετικών νευρώνων (Ε), ενώ στο περιστατικό GBB 1402/04 παρατηρήθηκε μαζική αύξηση της ανοσοαντίδρασης για TH (ΣΤ). (κλίμακα=50 μm)

τεταμένης διάρκειας ΠΥΙ βλάβη³¹ (συγκρίνατε εικόνα 1Α με Β). Αυτό το φαινόμενο φαίνεται να είναι ειδικό για τους DA νευρώνες του μεσεγκεφάλου, καθώς στον υποθάλαμο των ίδιων περιστατικών παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης της TH και αύξηση του μεγέθους των κυττάρων στους νευροεκκριτικούς πυρήνες (παρακοιλιακό και υπεροπτικό πυρήνα) νεογνών που υπέστησαν παρατεταμένη περιγεννητική υποξία (εικόνα 1 ΣΤ)^{53,54}. Οι μεγαλοκυτταρικοί νευροεκκριτικοί νευρώνες του υποθαλάμου αποτελούν σημαντικά κέντρα ρύθμισης ομοιοστατικών διαδικασιών και συνθέτουν δύο βασικές βιολογικά ενεργές πεπτιδικές ορμόνες, την αντιδιουρητική

ορμόνη (AVP) και την ωκυτοκίνη (OXY). Ενεργοποίηση των νευρώνων αυτών έχει περιγραφεί να συμβαίνει κατά τη γέννηση, επειδή υψηλά επίπεδα AVP και OXY έχουν μετρηθεί στο εμβρυϊκό αίμα που έχει ληφθεί από τον ομφάλιο λώρο κατά τη διάρκεια του τοκετού⁵⁵⁻⁵⁷. Η ενεργοποίηση αυτή θεωρείται ένας προσαρμοστικός μηχανισμός έναντι του στρες του τοκετού, με σκοπό την ανακατανομή της ροής του εμβρυϊκού αίματος: σημαντική ελάττωση της αιματικής ροής παρατηρείται στο γαστρεντερικό σύστημα και σε άλλα περιφερικά όργανα, ενώ αύξηση παρατηρείται σε ζωτικά όργανα, όπως ο εγκέφαλος, η καρδιά και τα επινεφρίδια^{55,58}.

Στον άνθρωπο, έχει αναφερθεί σημαντική διακύμανση ως προς την έκφραση της TH στους AVP-νευρώνες μεταξύ των ατόμων, που φαίνεται ότι εξαρτάται από την δραστηριότητα των μεγαλοκυτταρικών νευροεκκριτικών νευρώνων^{14,59}. Ένας μεγάλος αριθμός TH-ανοσοθετικών κυττάρων έχει παρατηρηθεί στον παρακοιλιακό και υπεροπτικό πυρήνα ασθενών που έπασχαν από σωματικές νόσους που προκαλούσαν παρατεταμένη οσμωτική (π.χ. αφυδάτωση) ή μη-οσμωτική (π.χ. καρδιαγγειακά νοσήματα) ενεργοποίηση του υποθάλαμο-νευροϋποφυσιακού συστήματος⁶⁰. Στα νεογέννητα βρέφη, η TH επάγεται στους μεγαλοκυτταρικούς AVP-νευρώνες μετά από παρατεταμένης διάρκειας ΠΥΙ, υποδεικνύοντας ότι η AVP παίζει ζωτικό ρόλο στη προσαρμογή των νεογνών στο υποξικό στρες. Με βάση τα ευρήματα αυτά προτείνουμε την αυξημένη αυτή έκφραση της TH ως νευροπαθολογικό δείκτη παρατεταμένης περιγεννητικής υποξικής/ισχαιμικής βλάβης σε ανθρώπινο νεκροτομικό υλικό⁵³.

Έχει προταθεί ότι η TH μπορεί να έχει ενεργό ρόλο στη σύνθεση ντοπαμίνης^{53,59,61}, και κατά συνέπεια, δε θα πρέπει να θεωρείται ως μια τυχαία έκτοπη έκφραση ενός ενζύμου σύνθεσης κατεχολαμινών^{62,63}. Επειδή η ντοπαμίνη δρα σαν αναστολέας της έκκρισης AVP στον άνθρωπο^{64,65}, η αύξηση της ντοπαμινεργικής σύνθεσης ως αποτέλεσμα της περιγεννητικής υποξίας μπορεί να έχει σημαντικές κλινικές συνέπειες. Μέσω μαζικής αναστολής της έκκρισης AVP, μπορεί να προκληθεί κεντρικός άποιος διαβήτης, όπως έχει αναφερθεί να συμβαίνει σε ασθενείς και παιδιά που έχουν υποστεί σοβαρού τύπου υποξική/ ισχαιμική εγκεφαλική βλάβη⁶⁶⁻⁷⁰ ή δηλητηρίαση με μονοξείδιο του άνθρακα^{71,72}. Ο κεντρικός ή νευρογενής άποιος διαβήτης χαρακτηρίζεται από σοβαρής μορφής πολυουρία και πολυδιψία λόγω ανεπαρκούς έκκρισης της AVP από την οπίσθια υπόφυση⁷³.

Συμπερασματικά, τα ευρήματά μας παρέχουν ιστοπαθολογικές ενδείξεις για πρώιμες αλλαγές στην έκφραση της TH και κατά συνέπεια, της κατεχολαμινικής νευροδιαβίβασης, μετά από παρατεταμένης διάρκειας περιγεννητική υποξική/ ισχαιμική βλάβη. Η περιγεννητική υποξία, ως κύριος κοινός μηχανισμός των μαιευτικών επιπλοκών, παρόλο που αποτελεί έναν μη ειδικό παράγοντα κινδύνου μικρής επίδρασης [π.χ. ~2% αύξηση κινδύνου στην εμφάνιση σχιζοφρένειας, παρόμοιο μέγεθος επίδρασης μεταξύ του παθητικού καπνίσματος και του καρκίνου των πνευμόνων ή του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού με τη λήψη αντισυλληπτικών χαπιών] δεν θα πρέπει να την αγνοούμε. Σύμφωνα με πειραματικές μελέτες, οι αλλαγές που προκαλεί παραμένουν μέχρι την ενήλικη ζωή και πιθανώς προδιαθέτουν –σε συνδυασμό με τη γενετική προδιάθεση- τα άτομα που επιβιώνουν μετά από περιγεννητική υποξία σε νευρολογικά ή/ και νευροαναπτυξιακά ψυχικά νο-

σήματα («αναπτυξιακός προγραμματισμός της υγείας και της ασθένειας»). Επιδημιολογικές έρευνες ενοχοποιούν πολλούς επιγενετικούς παράγοντες στην αιτιοπαθγένεια των ψυχικών νόσων με στατιστικά μεγαλύτερη συχνότητα εκείνων που συνδέονται με μαιευτικές και περιγεννητικές επιπλοκές⁷⁴. Μεγαλύτερη κατανόηση της επίδρασης της περιγεννητικής υποξίας στην ανάπτυξη του εγκεφάλου θα μας βοηθήσει να μάθουμε περισσότερα για την αιτιοπαθγένεια, τους αιτιολογικούς μηχανισμούς και τη σχέση γονιδίων-περιβάλλοντος στις κύριες νευρολογικές και ψυχικές νόσους.

Ευχαριστίες: Η μελέτη χρηματοδοτήθηκε από το Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ειδικός Λογαριασμός Κονδυλίων Έρευνας (ΚΑ 70/3/10311, υποτροφία στη Παγίδα Μ.). Στη παρούσα μελέτη απονεμήθηκε το 2ο βραβείο καλύτερης Προφορικής Ανακοίνωσης στο 18ο Πανελλήνιο Συνέδριο Περιγεννητικής Ιατρικής συνοδευόμενο από χρηματικό έπαθλο.

Κατάλογος Συντομογραφιών:

ΠΥΙ, περιγεννητική υποξία/ ισχαιμία
ΔΕΠΥ, διαταραχή ελλειμματικής προσοχής και υπερκινητικότητας
HIF, παράγοντας απόκρισης στην υποξία
TH, υδροξυλάση της τυροσίνης
DA, ντοπαμινεργικός
SN, μέλαινα ουσία
VTA, κοιλιακή καλυπτρική περιοχή
EW, πυρήνας Edinger-Westphal
AVP, αντιδιουρητική ορμόνη
OXY, ωκυτοκίνη

The effect of perinatal hypoxia on the dopaminergic systems of the human brain: contribution to the pathophysiology of psychiatric disorders

Panayotacopoulou M.^{1,2}, Pagida M.^{1,2}, Konstantinidou A.³

¹1st Dept. of Psychiatry and ²University Mental Health Research Institute, ³1st Dept. of Pathology, University of Athens

Correspondence: Panayotacopoulou M.
Assoc. Prof. of Neurobiology
1st Dept. of Psychiatry and University
Mental Health Research Institute
PO Box 66517, Papagou, Athens, Greece
E-mail: mpanagiote@med.uoa.gr
Tel.: +30 210-6170884

Summary

Perinatal hypoxia/ ischemia (PHI) is considered to be a major risk factor for the later development of learning and memory impairments, attention deficit hyperactivity disorder and schizophrenia. Experimental evidence has shown that PHI causes selective long-standing disturbances of the central dopaminergic systems that persist into adulthood. In autopsy material, we investigated the expression of tyrosine hydroxylase

(TH, the first and limiting enzyme of dopamine synthesis) in the brain of human neonates diagnosed with neonatal (hypoxic/ischemic) encephalopathy, in relation to the severity/ duration or chronicity of PHI, as estimated by neuropathological criteria. Our results showed that PHI differentially affected the expression of TH in the different parts of the brain. In cases who suffered abrupt/ severe PHI, intense TH-immunoreactivity was found in the well-known dopaminergic areas of the mesencephalon, i.e. substantia nigra (SN) and ventral tegmental area (VTA). In these neonates, surprisingly, TH-immunoreactivity was also observed in neurons synthesizing urocortin1 (stress peptide) of the Edinger-Westphal nucleus-not known to produce catecholamines. In neonates with lesions of prolonged/ chronic perinatal hypoxia, a dramatic reduction or absence of TH-immunoreactivity was observed in the dopaminergic neurons of SN and VTA, while a massive induction of TH was seen in the neurosecretory neurons of their hypothalamus. Based on these results we may suggest that early disturbances of TH expression, and consequently of catecholamine neurotransmission, occurring at critical stages of brain development, could predispose the survivors of PHI to neurodevelopmental psychiatric disorders later in life, on the grounds of an impaired dopaminergic neuropathological background.

Key words: perinatal hypoxia, neonates, dopamine, tyrosine hydroxylase, human brain

Βιβλιογραφία

1. Rees S, Harding R, Walker D. The biological basis of injury and neuroprotection in the fetal and neonatal brain. *Int J Dev Neurosci* 2011;29:551-563.
2. de Haan M, Wyatt JS, Roth S, Vargha-Khadem F, Gadian D, Mishkin M. Brain and cognitive-behavioural development after asphyxia at term birth. *Dev Sci* 2006;9:350-358.
3. Barker DJ. The wellcome foundation lecture, 1994. The fetal origins of adult disease. *Proc Biol Sci* 1995;262:37-43.
4. Bezek S, Ujhazy E, Mach M, Navarova J, Dubovicky M. Developmental origin of chronic diseases: Toxicological implication. *Interdiscip Toxicol* 2008;1:29-31.
5. Barlow BK, Cory-Slechta DA, Richfield EK, Thiruchelvam M. The gestational environment and parkinson's disease: Evidence for neurodevelopmental origins of a neurodegenerative disorder. *Reprod Toxicol* 2007;23:457-470.
6. Riederer P, Foley P. Mini-review: Multiple developmental forms of parkinsonism. The basis for further research as to the pathogenesis of parkinsonism. *Journal of neural transmission* 2002;109:1469-1475.
7. Zappitelli M, Pinto T, Grizenko N. Pre-, peri-, and postnatal trauma in subjects with attention-deficit hyperactivity disorder. *Can J Psychiatry* 2001;46:542-548.
8. Lewis SW, Murray RM. Obstetric complications, neurodevelopmental deviance, and risk of schizophrenia. *J Psychiatr Res* 1987;21:413-421.
9. Kolevzon A, Gross R, Reichenberg A. Prenatal and perinatal risk factors for autism: A review and integration of findings. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2007;161:326-333.
10. Schmidt-Kastner R, van Os J, Esquivel G, Steinbusch HW, Rutten BP. An environmental analysis of genes associated with schizophrenia: Hypoxia and vascular factors as interacting elements in the neurodevelopmental model. *Mol Psychiatry* 2012;17:1194-1205.
11. Schmidt-Kastner R, van Os J, H WMS, Schmitz C. Gene regulation by hypoxia and the neurodevelopmental origin of schizophrenia. *Schizophr Res* 2006;84:253-271.
12. Singh N, Sharma G, Mishra V. Hypoxia inducible factor-1: Its potential role in cerebral ischemia. *Cell Mol Neurobiol* 2012;32:491-507.
13. Nagatsu T, Levitt M, Udenfriend S. Tyrosine hydroxylase. The initial step in norepinephrine biosynthesis. *J Biol Chem* 1964;239:2910-2917.
14. Panayotacopoulou MT, Raadsheer FC, Swaab DF. Colocalization of tyrosine hydroxylase with oxytocin or vasopressin in neurons of the human paraventricular and supraoptic nucleus. *Brain Res Dev Brain Res* 1994;83:59-66.

15. Halliday GM, Reyes S, Double K. Substantia nigra, ventral tegmental area and retrorubral fields. In: Mai J, Paxinos G, editors. The human nervous system. Waltham: Academic Press; 2012, p 441-457.
16. Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM. The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in parkinson's disease. *Brain* 1999;122 (Pt 8):1437-1448.
17. Ehringer H, Hornykiewicz O. [distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system]. *Klin Wochenschr* 1960;38:1236-1239.
18. Hirvonen J, van Erp TG, Huttunen J, Aalto S, Nagren K, Huttunen M, et al. Increased caudate dopamine d2 receptor availability as a genetic marker for schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 2005;62:371-378.
19. Howes OD, Kapur S. The dopamine hypothesis of schizophrenia: Version iii--the final common pathway. *Schizophr Bull* 2009;35:549-562.
20. Perez-Costas E, Melendez-Ferro M, Roberts RC. Basal ganglia pathology in schizophrenia: Dopamine connections and anomalies. *J Neurochem* 2010;113:287-302.
21. Howes OD, Williams M, Ibrahim K, Leung G, Egerton A, McGuire PK, et al. Midbrain dopamine function in schizophrenia and depression: A post-mortem and positron emission tomographic imaging study. *Brain* 2013;136:3242-3251.
22. Fatemi SH, Folsom TD. The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia, revisited. *Schizophr Bull* 2009;35:528-548.
23. Gonon F. The dopaminergic hypothesis of attention-deficit/hyperactivity disorder needs re-examining. *Trends Neurosci* 2009;32:2-8.
24. Boksa P, El-Khodori BF. Birth insult interacts with stress at adulthood to alter dopaminergic function in animal models: Possible implications for schizophrenia and other disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 2003;27:91-101.
25. Burke RE, Kent J, Kenyon N, Karanas A. Unilateral hypoxic-ischemic injury in neonatal rat results in a persistent increase in the density of striatal tyrosine hydroxylase immunoperoxidase staining. *Brain Res Dev Brain Res* 1991;58:171-179.
26. Kostic VS, Przedborski S, Jackson-Lewis V, Cadet JL, Burke RE. Effect of unilateral perinatal hypoxic-ischemic brain injury on striatal dopamine uptake sites and d1 and d2 receptors in adult rats. *Neurosci Lett* 1991;129:197-200.
27. Brake WG, Noel MB, Boksa P, Gratton A. Influence of perinatal factors on the nucleus accumbens dopamine response to repeated stress during adulthood: An electrochemical study in the rat. *Neuroscience* 1997;77:1067-1076.
28. Fallet-Bianco C. Diagnosis and dating of hypoxic-ischemic encephalopathy 20th European Congress of Pathology. Paris, France, 2005, pp 127-132.
29. Rorke-Adams L, Larroche J, de Vries L. Fetal and neonatal brain damage. In: Gilbert-Barnes E, editor *Potter's pathology of the fetus, infant and child*. Philadelphia: Mosby-Elsevier; 2007. vol 2, p 2027-2053.
30. Squier W. Gray matter lesions. In: Golden J, Harding B, editors. *Pathology and genetics, developmental neuropathology*. Basel: ISN Neuropathology Press; 2004, p 171-175.
31. Pagida MA, Konstantinidou AE, Tsekoura E, Mangoura D, Patsouris E, Panayotacopoulou MT. Vulnerability of the mesencephalic dopaminergic neurons of the human neonate to prolonged perinatal hypoxia: An immunohistochemical study of tyrosine hydroxylase expression in autopsy material. *J Neuropathol Exp Neurol* 2013;72:337-350.
32. Pagida MA, Konstantinidou AE, Tsekoura E, Patsouris E, Panayotacopoulou MT. Immunohistochemical demonstration of urocortin 1 in edinger-westphal nucleus of the human neonate: Colocalization with tyrosine hydroxylase under acute perinatal hypoxia. *Neurosci Lett* 2013;554:47-52.
33. May PJ, Reiner AJ, Ryabinin AE. Comparison of the distributions of urocortin-containing and cholinergic neurons in the periculomotor midbrain of the cat and macaque. *J Comp Neurol* 2008;507:1300-1316.
34. Kozicz T, Bittencourt JC, May PJ, Reiner A, Gamlin PD, Palkovits M, et al. The edinger-westphal nucleus: A historical, structural, and functional perspective on a dichotomous terminology. *J Comp Neurol* 2011;519:1413-1434.
35. Ryabinin AE, Tsvirkovskaia NO, Ryabinin SA. Urocortin 1-containing neurons in the human edinger-westphal nucleus. *Neuroscience* 2005;134:1317-1323.
36. Vaughan J, Donaldson C, Bittencourt J, Perrin MH, Lewis K, Sutton S, et al. Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin i and to corticotropin-releasing factor. *Nature* 1995;378:287-292.
37. Xu L, Scheenen WJ, Roubos EW, Kozicz T. Peptidergic edinger-westphal neurons and the energy-dependent stress response. *Gen Comp Endocrinol* 2012;177:296-304.
38. Naoi M, Minami M, Maruyama W, Parvez H. Allosteric regulation of tyrosine hydroxylase activity by its cofactor tetrahydrobiopterin. In: Naoi M, Parvez H, editors. *Tyrosine hydroxylase from discovery to cloning*. VSP BV; 1993
39. Moldeus P, Nordenskjold M, Bolcsfoldi G, Eiche A, Haglund U, Lambert B. Genetic toxicity of dopamine. *Mutat Res* 1983;124:9-24.
40. Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci* 2000;25:502-508.
41. Gluck MR, Zeevalk GD. Inhibition of brain mitochondrial respiration by dopamine and its metabolites: Implications for parkinson's disease and catecholamine-associated diseases. *J Neurochem* 2004;91:788-795.
42. Stokes AH, Hastings TG, Vrana KE. Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. *J Neurosci Res* 1999;55:659-665.
43. Globus MY, Ginsberg MD, Dietrich WD, Busto R, Scheinberg P. Substantia nigra lesion protects against ischemic damage in the striatum. *Neurosci Lett* 1987;80:251-256.
44. Masuda T, Yamazaki M, Ito Y. Comparison between extracellular and tissue fluctuation of dopamine and related metabolites in striatum under hypoxia. *Brain Res* 1990;523:356-358.
45. Lopez-Perez SJ, Vergara P, Ventura-Valenzuela JP, Urena-Guerrero ME, Segovia J, Beas-Zarate C. Modification of dopaminergic markers expression in the striatum by neonatal exposure to glutamate during development. *Int J Dev Neurosci* 2005;23:335-342.
46. Bjelke B, Andersson K, Ogren SO, Bolme P. Asphyctic lesion: Proliferation of tyrosine hydroxylase-immunoreactive nerve cell bodies in the rat substantia nigra and functional changes in dopamine neurotransmission. *Brain Res* 1991;543:1-9.
47. Chen Y, Herrera-Marschitz M, Bjelke B, Blum M, Gross J, Andersson K. Perinatal asphyxia-induced changes in rat brain tyrosine hydroxylase-immunoreactive cell body number: Effects of nicotine treatment. *Neurosci Lett* 1997;221:77-80.
48. Burke RE, Macaya A, DeVivo D, Kenyon N, Janec EM. Neonatal hypoxic-ischemic or excitotoxic striatal injury results in a decreased adult number of substantia nigra neurons. *Neuroscience* 1992;50:559-569.
49. Oo TF, Henchcliffe C, Burke RE. Apoptosis in substantia nigra following developmental hypoxic-ischemic injury. *Neuroscience* 1995;69:893-901.
50. Young C, Tenkova T, Dikranian K, Olney JW. Excitotoxic versus apoptotic mechanisms of neuronal cell death in perinatal hypoxia/ischemia. *Curr Mol Med* 2004;4:77-85.
51. Ezquer M, Seltzer AM. C-fos and tyrosine hydroxylase expression after an excitotoxic lesion on the nigrostriatal system: A study on the effects of hypoxia used as a preconditioning stimulus. *Exp Neurol* 2003;183:523-531.
52. Bossers K, Meerhoff G, Balesar R, van Dongen JW, Kruse CG, Swaab DF, et al. Analysis of gene expression in parkinson's disease: Possible involvement of neurotrophic support and axon guidance in dopaminergic cell death. *Brain Pathol* 2009;19:91-107.
53. Ganou V, Pagida MA, Konstantinidou AE, Malidelis YI, Kontostavlaki DP, Tsekoura E, et al. Increased expression of tyrosine hydroxylase in the supraoptic nucleus of the human neonate under hypoxic conditions: A potential neuropathological marker for prolonged perinatal hypoxia. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 2010;69:1008-1016.
54. Pagida MA, Konstantinidou AE, Malidelis YI, Ganou V, Tsekoura E, Patsouris E, et al. The human neurosecretory neurons under perinatal hypoxia: A quantitative immunohistochemical study of the supraoptic nucleus in autopsy material. *J Neuroendocrinol* 2013;25:1255-1263.
55. Chard T, Hudson CN, Edwards CR, Boyd NR. Release of oxytocin and vasopressin by the human foetus during labour. *Nature* 1971;234:352-354.
56. Giralaldi A, Enevoldsen AS, Wagner G. Oxytocin and the initiation of parturition. A review. *Dan Med Bull* 1990;37:377-383.
57. Hoppenstein JM, Miltenberger FW, Moran WH, Jr. The increase in blood levels of vasopressin in infants during birth and surgical procedures. *Surg Gynecol Obstet* 1968;127:966-974.
58. Swaab D. Supraoptic and paraventricular nucleus (son, pvn). In: Aminoff M, Boller F, Swaab D, editors. *The human hypothalamus: Basic and clinical aspects, part I: Nuclei of the human hypothalamus*. Amsterdam: Elsevier; 2003. vol 79, p 163-237.
59. Panayotacopoulou MT, Malidelis Y, van Heerikhuizen J, Unmehopa U, Swaab D. Individual differences in the expression of tyrosine hydroxylase mRNA in neurosecretory neurons of the human paraventricular and supraoptic nuclei: Positive correlation with vasopressin mRNA. *Neuroendocrinology* 2005;81:329-338.
60. Panayotacopoulou MT, Malidelis YI, Fliers E, Bouras C, Ravid R, Swaab DF. Increased expression of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in paraventricular and supraoptic neurons in illnesses with prolonged osmotic or nonosmotic stimulation of vasopressin release. *Neuroendocrinology* 2002;76:254-266.
61. Kontostavlaki DP, Panayotacopoulou MT, Sluijs JA, Unmehopa UA, Huitinga I, Hol EM, et al. Co-expression of tyrosine hydroxylase and gtp cyclohydrolase i in arginine vasopressin-synthesizing neurons of the human supraoptic nucleus demonstrated by laser microdissection and real-time pcr. *Neuroendo-*

crinology 2006;84:386-395.

62. Marsais F, Calas A. Ectopic expression of non-catecholaminergic tyrosine hydroxylase in rat hypothalamic magnocellular neurons. *Neuroscience* 1999;94:151-161.

63. Marsais F, Parmentier C, Terao E, Taxi J, Calas A. Expression of tyrosine hydroxylase and vasopressin in magnocellular neurons of salt-loaded aged rats. *Microsc Res Tech* 2002;56:81-91.

64. Holzbauer M, Muscholl E, Racke K, Sharman DF. Evidence that dopamine is a neurotransmitter in the neurointermediate lobe of the hypophysis. *Progress in brain research* 1983;60:357-364.

65. Lightman SL, Forsling M. Evidence for dopamine as an inhibitor of vasoprotein release in man. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1980;12:39-46.

66. Lee YJ, Huang FY, Shen EY, Kao HA, Ho MY, Shyur SD, et al. Neurogenic diabetes insipidus in children with hypoxic encephalopathy: Six new cases and a review of the literature. *Eur J Pediatr* 1996;155:245-248.

67. Lin JJ, Lin KL, Hsia SH, Wu CT, Wang HS. Combined central diabetes insipidus and cerebral salt wasting syndrome in children. *Pediatr Neurol* 2009;40:84-87.

68. Su DH, Liao KM, Chen HW, Huang TS. Hypopituitarism: A sequela of severe hypoxic encephalopathy. *J Formos Med Assoc* 2006;105:536-541.

69. Al-Agha AE, Thomsett MJ, Ratcliffe JF, Cotterill AM, Batch JA. Acquired central diabetes insipidus in children: A 12-year brisbane experience. *J Paediatr Child Health* 2001;37:172-175.

70. Arisaka O, Arisaka M, Ikebe A, Nijima S, Shimura N, Hosaka A, et al. Central diabetes insipidus in hypoxic brain damage. *Childs Nerv Syst* 1992;8:81-82.

71. Chang MY, Lin JL. Central diabetes insipidus following carbon monoxide poisoning. *Am J Nephrol* 2001;21:145-149.

72. Halebian P, Yurt R, Petite C, Shires GT. Diabetes insipidus after carbon monoxide poisoning and smoke inhalation. *J Trauma* 1985;25:662-663.

73. Frank E, Landgraf R. The vasopressin system--from antidiuresis to psychopathology. *Eur J Pharmacol* 2008;583:226-242.

74. Schmitt A, Malchow B, Hasan A, Falkai P. The impact of environmental factors in severe psychiatric disorders. *Front Neurosci* 2014;8:19.