

Τ.Ε.Ι. ΜΟΥΣΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΚΟΥΣΤΙΚΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΘΕΜΑ:

**«ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΣΥΝΑΙΣΘΗΜΑΤΟΣ
ΜΕΣΩ ΕΚΠΟΜΠΗΣ ΗΧΗΤΙΚΩΝ ΜΗΝΥΜΑΤΩΝ»**

ΒΑΣΙΛΕΙΑΔΗ ΜΑΡΙΝΑ ΑΝΝΑ

A.M. 390

Υπό την επίβλεψη του καθηγητή:

Κουζούπη Σπύρου

ΡΕΘΥΜΝΟ 2007

Η εργασία αυτή εκπονήθηκε σε συνεργασία του Τμήματος Μουσικής Τεχνολογίας και ακουστικής και του εργαστηρίου Ανοσολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, υπό την επίβλεψη του Δρ.Κουζούπη Σπύρου, τον οποίο και ευχαριστώ θερμά για την καθοδήγηση και τις γνώσεις που μου έδωσε.

Ήθελα να δώσω επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ, στην καθηγήτρια κ.Αθανασάκη Ειρήνη, για τη συνεργασία και τη φιλοξενία της στο εργαστήριο Ανοσολογίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω:

- ▶ Την καθηγήτρια κ. Μπούρα Βασιλεία, για τις συμβουλές της ως προς την επεξεργασία του ήχου,**
- ▶ Τους προπτυχιακούς φοιτητές του εργαστηρίου Ανοσοβιολογίας , Θεοχάρη Κατερίνα και Σάρδη Μάριο, για την πολύτιμη βοήθειά τους,**
- ▶ Τον Γεωργιακάκη Παναγιώτη, καθώς και το Μουσείο Φυσικής Ιστορίας για την παραχώρηση ειδικού εξοπλισμού και...**
- ▶ Όλους εκείνους που με εμπιστευτήκαν και με στήριξαν.**

Τέλος, θέλω να ζητήσω μία μεγάλη συγγνώμη από τα ποντικάκια, για την ταλαιπωρία που υπέστησαν από εμάς, τους βάνουσσους!

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ:

Περίληψη.....	5
1. Εισαγωγή.....	7
1.1 Ακοή και αντίληψη ήχου στα σπονδυλωτά.....	7
1.2 Η βιολογία της ακοής.....	8
1.3 Ποντίκια.....	10
1.4 Η ακοή και η αντίληψη ήχου στα ποντίκια.....	13
1.5 Η επίδραση του ήχου στη φυσιολογία του Οργανισμού.....	15
1.6 Πρωτεΐνες στα ούρα των ποντικών.....	17
1.7 Στόχος και σύντομη περιγραφή της παρούσας εργασίας.....	18
2. Υλικά και μέθοδοι.....	20
2.1 Πειραματόζωα.....	20
2.2 Συλλογή ούρων.....	21
2.3 Χειρισμός πειραματόζων.....	22
2.4 Διαδικασία Ηχογράφησης.....	22
2.5 Επεξεργασία και ανάλυση ηχητικών μηνυμάτων.....	24
2.6 Ηχοβόληση πειραματικών ποντικών.....	34
2.7 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση Ακρυλαμιδίου.....	35
2.8 Ανίχνευση πρωτεϊνών με ενζυμική ανοσοπροσροφητική διαδικασία (ELISA).....	37
3. Αποτελέσματα.....	38
3.1 Ηχητικά μηνύματα που εκπέμπονται από πειραματικά ποντίκια.....	38
A. Καταγραφή και ανάλυση ηχητικών μηνυμάτων στο ακουστό φάσμα.....	38
A.1. Εξωγενής χειρισμός πειραματικών ποντικών.....	38
A.1.2. Ανάλυση ηχητικών σημάτων.....	40
A.2 Ενδογενής χειρισμός: Διαμάχη μεταξύ αρσενικών ζώων.....	41
A.2.1. . Ανάλυση ηχητικών σημάτων.....	42
A.3 Ενδογενής χειρισμός: Νεογνά προς αναζήτηση της μητέρας τους.....	44
A.3.1. Ανάλυση ηχητικών σημάτων.....	45
B. Καταγραφή και ανάλυση ηχητικών μηνυμάτων στο υπερηχητικό φάσμα.....	46
B.1 . Ανάλυση ηχητικών σημάτων.....	47

3.2 Πρωτεϊνικό προφίλ ούρων πειραματικών ποντικών.....	49
3.3 Μεταφορά συναισθήματος μέσω ηχητικών μηνυμάτων.....	51
4. Συζήτηση.....	54
5. Βιβλιογραφία.....	57
6. Παράρτημα I-ΑΝΑΛΥΣΗ ΗΧΗΤΙΚΩΝ ΜΗΝΥΜΑΤΩΝ.....	60
Παράρτημα II-ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΑ.....	80

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παραγωγή ήχων και η ακοή αποτελούν σημαντικές λειτουργίες αποτύπωσης και μεταφοράς συναισθημάτων που αναμφίβολα επηρεάζουν την φυσιολογία ενός οργανισμού. Χρησιμοποιώντας σαν πειραματικό μοντέλο το ποντίκι, έγινε καταγραφή ηχητικών μηνυμάτων που προκαλούνται από συναισθήματα τρόμου/πόνου και οργής/μίσους. Η ανάλυση των μηνυμάτων έδειξε τα συχνοτικά επίπεδα στο ακουστό και υπερηχητικό φάσμα. Η συλλογή ούρων κατά την διάρκεια ηχητικής καταγραφής επέτρεψε την αποτύπωση του πρωτεϊνικού προφίλ των συναισθημάτων σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου. Οι ήχοι του ακουστού φάσματος αφού απομονώθηκαν και επεξεργάστηκαν κατάλληλα, χρησιμοποιήθηκαν για ηχοβόληση ποντικιών από τα οποία και πάλι συλλέχθηκαν ούρα για ηλεκτροφορητική ανάλυση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα ζώα ανταποκρίθηκαν στο ηχητικά αποτυπωμένο συναίσθημα τρόμου/πόνου και οργής/μίσους, παρουσιάζοντας ένα πρωτεϊνικό προφίλ των ούρων παρόμοιο με αυτό του άμεσου πρωτογενούς ερεθίσματος. Η παρούσα μελέτη αποτελεί θεμελιώδη λίθο για την προσέγγιση σημαντικών επιστημονικών ερωτημάτων δίνοντας την δυνατότητα ποσοτικοποίησης του στρες και τον συνδυασμό του με την φυσιολογία του οργανισμού.

EMOTION TRANSFER THROUGH TRANSMISSION OF VOCAL MESSAGES IN MICE

ABSTRACT

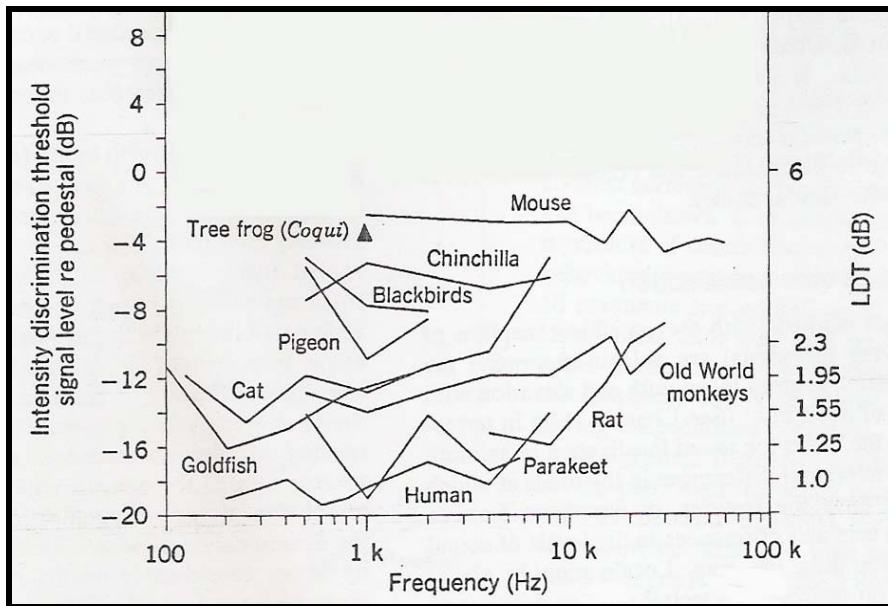
Vocal sound production and hearing are major biological processes for imprinting and transferring emotion affecting the physiology of an organism. Experimental mice were submitted to an externally induced stress conditions referred as “fear/pain” emotion produced by exerting muscular pressure to mice and another referred as “anger/hate” produced as a result of male fighting in their effort to seduce a female. In both experimental conditions, animals responded by transmitting vocal messages in the sonic and ultrasonic frequencies which were recorded, analyzed and all spectral characteristics defined. Changes in animal physiology were estimated by analyzing the protein profile of mouse urine produced during the direct manipulation procedures. In order to evaluate whether sound messages could transfer emotions without direct manipulation, the sounds recorded in the sonic spectrum were given back to virgin mice, while collecting urine samples and submitting them to SDS-page electrophoresis. These mice responded to the transmitted sound messages and produced urine protein profiles similar to the animals that received the direct emotional stimulus. This study, by giving the opportunity to quantify stress and correlate it to the pathophysiology of an organism, provides basic knowledge for approaching several scientific questions.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΑΚΟΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΛΗΨΗ ΗΧΟΥ ΣΤΑ ΣΠΟΝΔΥΛΩΤΑ

Ακοή είναι η ικανότητα της αντίληψης ήχων που εκπέμπονται από μακρινές παλλόμενες πηγές μέσω του αέρα, του νερού, ή του υποστρώματος. Ο βασικότερος ρόλος της ακοής είναι η πληροφόρηση για την ύπαρξη μιας ηχητικής πηγής και τα χαρακτηριστικά της. Το εύρος συχνοτήτων της ακοής στα διάφορα είδη κυμαίνεται από <math><1\text{Hz}</math> μέχρι $>100\text{kHz}$. Αυτό επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας ειδικά οργανικά συστήματα που συλλέγουν τον ήχο από το περιβάλλον (εξωτερικό αυτί ή ανάλογες δομές), μεταφέρουν αποτελεσματικά τον ήχο στο γεμάτο με υγρό εσωτερικό αυτί (μέσω του ενδιάμεσου αυτιού ή ανάλογων δομών), μετατρέπουν την κίνηση σε ηλεκτροχημικά μηνύματα στο εσωτερικό αυτί τα οποία μεταφέρονται και επεξεργάζονται στο νευρικό σύστημα στον εγκέφαλο. Έτσι ο ήχος μετατρέπεται σε ηλεκτροχημικό σήμα και μέσω του νευρικού συστήματος μπορεί να επηρεάσει όλη τη φυσιολογία του οργανισμού.

Μελέτες συμπεριφοράς δείχνουν ότι τα σπονδυλωτά παρουσιάζουν περισσότερες ομοιότητες παρά διαφορές στο σύστημα της ακοής (Fay, 1997). Οι βασικές διαφορές παρατηρούνται στο εύρος της συχνότητας ακοής για το κάθε είδος (Διάγραμμα 1). Για παράδειγμα, το χρυσόψαρο έχει το χαμηλότερο και στενότερο εύρος συχνότητας που ξεκινάει περίπου από 100Hz και φτάνει έως τα 3kHz. Τα θηλαστικά έχουν το υψηλότερο και μεγαλύτερο εύρος συχνοτήτων που ξεκινάει περίπου από 100Hz και μπορεί να φτάσει, ή ακόμα και να ξεπεράσει τα 100kHz. Είναι σημαντικό όμως να πούμε ότι παρουσιάζεται μεγάλη ποικιλομορφία σε σχέση με το είδος. Δεν υπάρχει κάποιο είδος στα θηλαστικά που να ακούει σε όλο το εύρος του φάσματος. Σε ότι αφορά τη λειτουργία της ακοής, δηλαδή την ευαισθησία, τη συχνότητα, το χρόνο, την ανάλυση φάσματος και τον εντοπισμό της ακουστικής πηγής, όλα τα σπονδυλωτά ακολουθούν βασικά κοινούς νόμους και οι ποικιλομορφίες που παρατηρούνται δεν σχετίζονται με την φυλογένεση.



Διάγραμμα 1

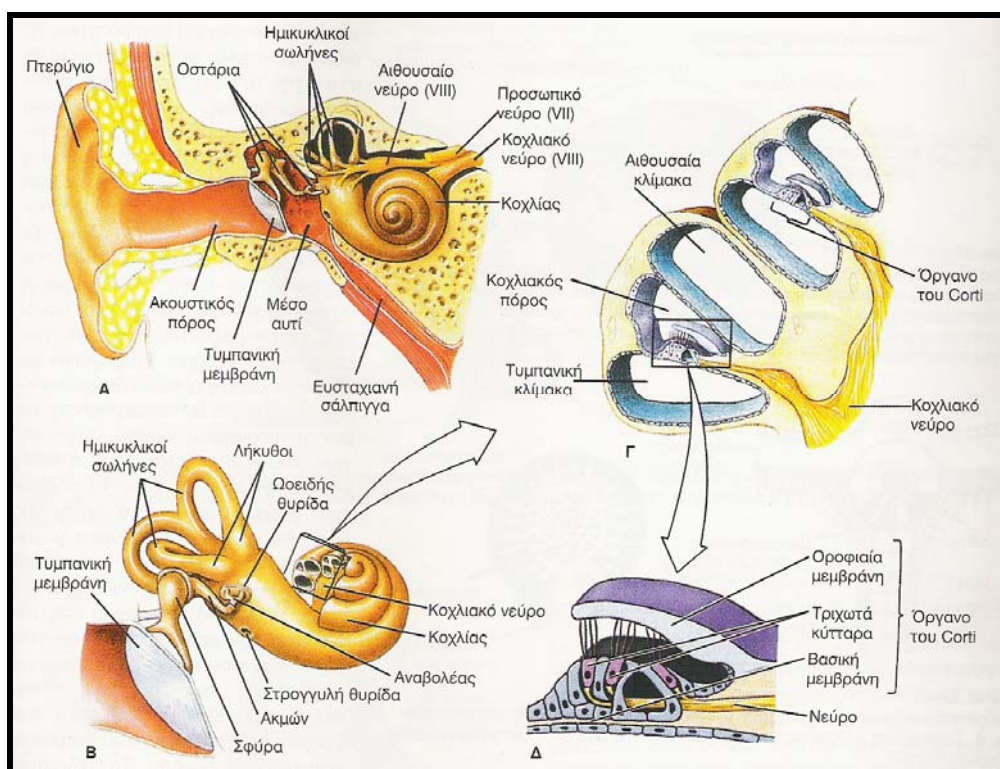
Το κατώφλι διάκρισης ηχητικών επιπέδων διαφόρων σπονδυλωτών ως προς τη συχνότητα. Το επίπεδο διάκρισης του κατωφλίου σημειώνεται σαν επίπεδο αύξησης της ηχητικής πίεσης LDT (Level Discrimination Threshold) σε dB στον δεξιό άξονα. Ο αριστερός άξονας δείχνει τη διάκριση του κατωφλίου σαν επίπεδο του ενός καθαρού τόνου (signal), το οποίο είναι μόλις ανιχνεύσιμο, όταν προστίθεται σε έναν άλλο καθαρό τόνο της ίδιας συχνότητας και φάσης (Fay, 1997).

1.2 Η ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΚΟΗΣ

Το ανθρώπινο αυτί (Εικόνα 1Α) είναι χαρακτηριστικό των ακουστικών οργάνων των θηλαστικών. Το εξωτερικό αυτί συλλέγει τα ηχητικά κύματα και τα διαβιβάζει δια μέσου του **ακουστικού πόρου** στην τυμπανική μεμβράνη. Μετά από την **τυμπανική μεμβράνη** βρίσκεται το μέσο αυτί που είναι ένας θάλαμος γεμάτος αέρα και περιέχει μια αλυσίδα από τρία οστά γνωστά ως **σφύρα**, **άκμων** και **αναβολέας**. Τα οστά αυτά μεταφέρουν τα ηχητικά κύματα δια μέσου του μέσου αυτιού (Εικόνα 1Β). Η γέφυρα των οστών αυτών είναι έτσι διατεταγμένη ώστε η δύναμη των ηχητικών κυμάτων που θα φτάσει στην τυμπανική μεμβράνη να μεγαθύνεται έως και 90 φορές στο σημείο που ο αναβολέας έρχεται σε επαφή με την **ωοειδή θυρίδα** του εσωτερικού αυτιού. Οι μύες που έρχονται σε επαφή με τα οστά του μέσου αυτιού συσπώνται όταν το αυτί δέχεται πολύ δυνατούς ήχους. Το μέσο αυτί συνδέεται με το φάρυγγα μέσω της **ευσταχιακής σάλπιγγας** που επιτρέπει την εξισορρόπηση της πίεσης και στις δύο πλευρές της τυμπανικής μεμβράνης. Μέσα στο εσωτερικό αυτί υπάρχει το όργανο της ακοής, ο κοχλίας που έχει σπειροειδές σχήμα. Ο **κοχλίας** διαιρείται κατά μήκος σε τρεις παράλληλους σωληνοειδείς αγωγούς, οι οποίοι στενεύουν καθώς προχωράνε από τη

βάση του κοχλίου προς την κορυφή του. Ένας από τους αγωγούς αυτούς ονομάζεται **αιθουσαία κλίμακα** του οποίου η βάση κλείνεται από την ωοειδή θυρίδα. Η τυμπανική κλίμακα που επικοινωνεί με την αιθουσαία κλίμακα, κλείνεται στη βάση της από τη **στρογγυλή θυρίδα**. Μεταξύ των δυο αυτών κλιμάκων υπάρχει ο **κοχλιακός πόρος** που περιέχει το **όργανο του Corti** (Εικόνα 1Γ) που αποτελεί το αισθητήριο όργανο. Μέσα στο όργανο του Corti υπάρχουν λεπτές σειρές τριχωτών κυττάρων που διασχίζουν τον κοχλία. Κάθε κύτταρο συνδέεται με νευρώνες του ακουστικού νεύρου. Τα τριχωτά κύτταρα εφάπτονται με την **βασική μεμβράνη** η οποία διαχωρίζει την τυμπανική κλίμακα από τον κοχλιακό πόρο και καλύπτονται από την **καλυπτήρια μεμβράνη** (Εικόνα 1Δ).

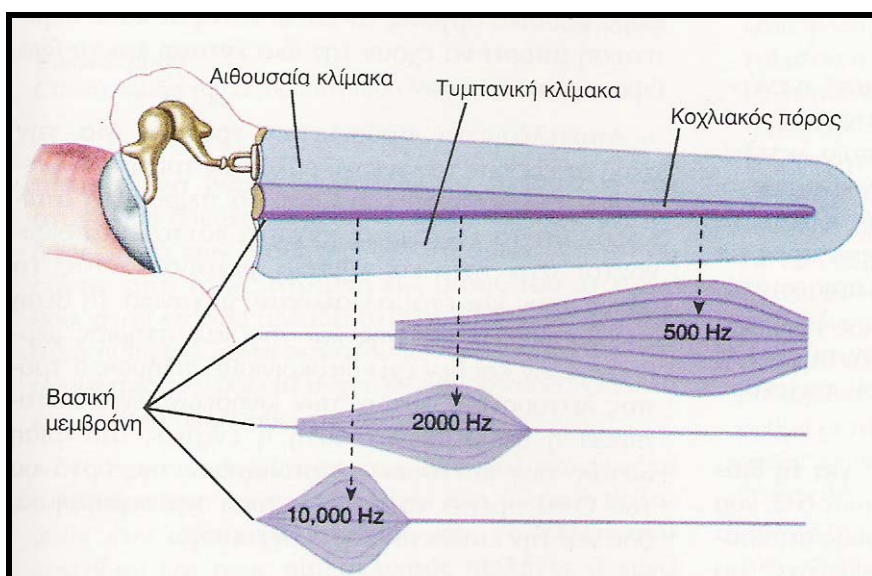
Όταν το ηχητικό κύμα φτάσει στο αυτί η ενέργεια του μεταφέρεται μέσω των οσταρίων του μέσου αυτιού στην ωοειδή θυρίδα, η οποία εκτελεί παλμικές κινήσεις μεταφέροντας έτσι την κίνηση στο υγρό της αιθουσαίας και της τυμπανικής κλίμακας. Επειδή τα υγρά αυτά είναι ασυμπίεστα, μία προς τα έξω κίνηση της ωοειδούς θυρίδας έχει σαν αποτέλεσμα μια προς τα



Εικόνα 1

Ανθρώπινο αυτί. Α) Επιμήκης τομή. Φαίνεται το εξωτερικό, το μέσο και το εσωτερικό αυτί. Β) Μεγέθυνση του μέσου και εσωτερικού αυτιού. Ο κοχλίας του εσωτερικού αυτιού έχει ανοιχθεί για να φανεί η διάταξη των σωλήνων στο εσωτερικό του. Γ) Μεγέθυνση εγκάρσιας τομής του κοχλίου όπου φαίνεται το όργανο του Corti. Δ) Λεπτομέρεια της λεπτής δομής του οργάνου Corti.

έξω κίνηση της στρογγυλής θυρίδας. Οι δονήσεις του υγρού προκαλούν σύγχρονη δόνηση της βασικής μεμβράνης και των τριχωτών κυττάρων. Κάθε περιοχή της βασικής μεμβράνης αποκρίνεται σε διαφορετικές συχνότητες (Εικόνα 2). Η ένταση του τόνου εξαρτάται από τον αριθμό των τριχωτών κυττάρων που έχουν διεγερθεί ενώ η χροιά ενός τόνου παράγεται από το είδος των τριχωτών κυττάρων που διεγείρονται από την δόνηση.



Εικόνα 2

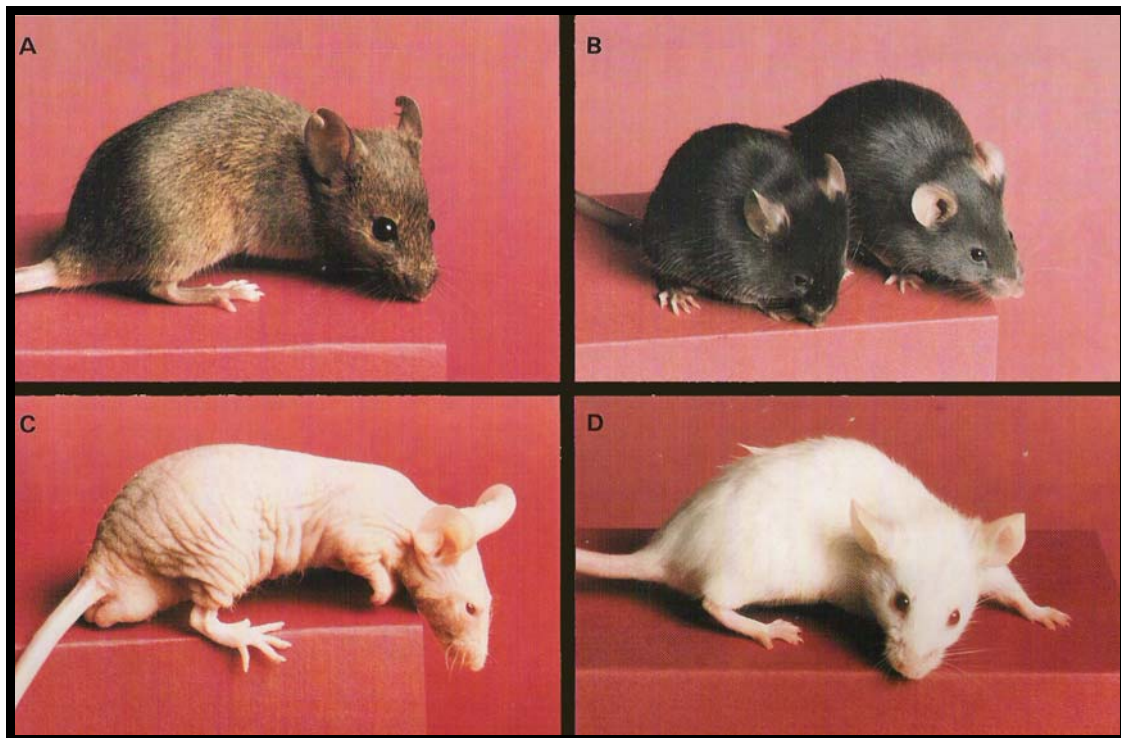
Εντοπισμός των συχνοτήτων στο κοχλία του αυτιού των θηλαστικών. Τα ηχητικά κύματα που μεταδίδονται στην ωσειδή θυρίδα προκαλούν δονήσεις που μεταδίδονται στη βασική μεμβράνη. Δονήσεις υψηλής συχνότητας προκαλούν συνήχηση της μεμβράνης κοντά στη ωσειδή θυρίδα, ενώ δονήσεις χαμηλής συχνότητας, προκαλούν συνήχηση της μεμβράνης κοντά στο άλλο άκρο.

1.3 ΠΟΝΤΙΚΙΑ

Τα ποντίκια είναι σε γενικές γραμμές οι ανεπιθύμητοι καλεσμένοι του ανθρώπου και μόνο σπάνια αντιμετωπίζονται σαν κατοικίδια ζώα. Τον τελευταίο αιώνα έχουν αναλάβει έναν νέο ρόλο (εφόσον αποτελούν το συνηθέστερο θηλαστικό στον ερευνητικό χώρο), ενώ τα άγρια στελέχη των ποντικών χρησιμοποιούνται περιστασιακά σαν εργαστηριακά ζώα. Η οικογένεια *mus musculus* αποτελεί τα πλέον κοινά πειραματόζωα όπου κατά εκατοντάδες γεννιούνται και πεθαίνουν στα ερευνητικά εργαστήρια της υφής.

Το ποντίκι, λόγω της ομοιότητας του με τον ανθρώπινο οργανισμό, της εύκολης διατροφής του, του μικρού χώρου που καταλαμβάνει και του σύντομου χρόνου αναπαραγωγής του, είναι το συνηθέστερο πειραματόζωο. Από τις αρχές κιόλας του περασμένου αιώνα, οι επιστήμονες μετά από συνεχείς διασταυρώσεις των ίδιων ποντικών κατόρθωσαν να φτιάξουν τις λεγόμενες «αιμομικτικές σειρές ποντικών», τα οποία με εξαίρεση το φύλο και τις πιθανές

θανατηφόρες γενετικές ανωμαλίες είναι οργανισμοί πανομοιότυποι μεταξύ τους. Η ύπαρξη τέτοιων πληθυσμών, βοήθησε σημαντικά την επιστήμη, διότι υπήρξε η δυνατότητα **ελέγχου** των πειραμάτων και **επαναληψιμότητας** των αποτελεσμάτων. Έτσι δημιουργήθηκαν πολλές αιμομικτικές σειρές (Εικόνες 3-4) οι οποίες πέρα από την εξωτερική εμφάνιση των ζώων (άσπρα, μαύρα, καφέ, γκρι κ.τ.λ.) είχαν και καθορισμένο γενετικό υπόβαθρο, συγκεκριμένες μεταλλάξεις, συγκεκριμένες αρρώστιες κ.τ.λ. Η λίστα των αιμομικτικών σειρών των ποντικών μεγαλώνει χρόνο με το χρόνο, εφόσον όλο και περισσότερα στελέχη με κάποιο διαφορετικό κάθε φορά χαρακτήρα απομονώνονται και εκτρέφονται ετησίως.



Εικόνα 3

Διάφορες αιμομικτικές σειρές ποντικών:

A) Υβρίδιο *CDAxC57BL/10*

B) *C57BL/6*

C) *Nude*

D) *Albino*.



Εικόνα 4
 Διάφορες αιμομικτικές σειρές ποντικών:
E) Chinchilla
F) Με επικρατείς κηλίδες
G) Με ζώνες
H) Ομόζυγη μετάλλαξη.

Για την παρούσα μελέτη λοιπόν χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές αιμομικτικές σειρές ποντικών και για την ακρίβεια τα BALB/c και C3H/HeN (Εικόνες 5-6) τα οποία πέρα από το διαφορετικό τους χρώμα (άσπρα με κόκκινα μάτια και γκρι με μαύρα μάτια αντίστοιχα) αντιπροσωπεύουν διαφορετικούς τύπους ιστοσυμβατότητας.



Εικόνα 5
 A) BALB/c



Εικόνα 6
 B) C3H/HeN

1.4 Η ΑΚΟΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΛΗΨΗ ΗΧΟΥ ΣΤΑ ΠΟΝΤΙΚΙΑ

Ενδιαφέρον έχει προκαλέσει σε πολλούς επιστήμονες, η μελέτη της ακουστικής συμπεριφοράς των ποντικών.

Στα ποντίκια η ακοή αποτελεί μία από τις πιο σημαντικές αισθήσεις και σε αντίθεση με την όραση διαφέρει κατά πολύ από την ακοή του ανθρώπου. Ενώ ο άνθρωπος αντιλαμβάνεται ήχους σε συχνότητες που κυμαίνονται από 20Hz μέχρι περίπου 20kHz, το ποντίκι αντιλαμβάνεται συχνότητες από 1kHz έως 70kHz και μπορούν να ακούσουν ακόμη και ήχους >100kHz. Κατά συνέπεια, κάποιες χαμηλές συχνότητες της ανθρώπινης φωνής, δεν γίνονται αντιληπτές από τα ποντίκια. Εφόσον οι συχνότητες που κυμαίνονται πάνω από 18kHz έως 20kHz θεωρούνται ότι ανήκουν στο υπερηχητικό φάσμα, μπορούμε να πούμε ότι το ποντίκι αντιλαμβάνεται κυρίως υπερήχους. Εφόσον λοιπόν τα ποντίκια ακούνε κυρίως ήχους στο υπερηχητικό φάσμα, είναι αναμενόμενο και να παράγουν κυρίως υπερήχους, μέσω των οποίων θα εξασφαλίζουν την επικοινωνία μεταξύ τους. Πράγματι, οι σημαντικότεροι ήχοι που εκπέμπονται από τα ποντίκια είναι στο υπερηχητικό φάσμα, ενώ παράγουν και μερικούς ήχους υψηλής έντασης στο ακουστικό φάσμα, οι οποίοι όμως θεωρούνται «προειδοποιητικοί ήχοι». Τα κυριότερα καλέσματα όμως θεωρούνται ότι γίνονται στο υπερηχητικό φάσμα. Για παράδειγμα, η αντίδραση των νεογέννητων ποντικών σε κάποια εξωτερική ενόχληση, ή κρύο καταγράφεται με καλέσματα στα περίπου 40kHz (Sales and Pye, 1974). Αυτό το κάλεσμα επηρεάζει τόσο τα θηλυκά όσο και τα αρσενικά ενήλικα ζώα. Στο κάλεσμα του κρύου, τα ενήλικα ζώα επαναφέρουν στη φωλιά το νεογνό που έχει απομακρυνθεί και εκπέμπει το κάλεσμα (Haack et al., 1983). Στο κάλεσμα της «ενόχλησης» το ενήλικο ζώο, που δεν είναι απαραίτητα ένας από τους γονείς, πηγαίνει στη φωλιά των νεογνών και τους συμπαραστέκεται. Στην αναπαραγωγική διαδικασία, τα αρσενικά ποντίκια όταν συναντούν τα θηλυκά ζώα ή τις φερομόνες τους, εκπέμπουν υπερηχητικές συχνότητες που κυμαίνονται από 30kHz έως 110kHz (Gourbal et al., 2004; Wysocki et al., 1982; Sipos et al., 1992; Stowers et al., 2002).

Τα καλέσματα στα νεογέννητα ποντίκια, ανιχνεύονται από την ηλικία των 3-13 ημερών (Sales & Smith, 1978; Haack et al., 1983) και εκπέμπονται για την αναζήτηση της μητέρας τους (Sewell, 1970; Smith, 1976; Haack et al., 1983). Την περίοδο της γαλούχησης, τα θηλυκά αντιλαμβάνονται υπερήχους ανάλογους με αυτούς των καλεσμάτων των νεογνών σε όλο το εύρος του φάσματος..

Όλα αυτά τα καλέσματα αποτελούν το μέσο επικοινωνίας των ποντικών και προφανώς χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένες εντάσεις, συχνότητες και διάρκειες που όλα αυτά μαζί αποτελούν τη γλώσσα των ποντικών. Πρόσφατα δείχτηκε ότι οι ήχοι που παράγονται από τα αρσενικά ποντίκια όταν συναντούν τη σύντροφό τους, παρουσιάζουν μία περιοδικότητα. Οι ήχοι αυτοί χαρακτηρίστηκαν ως «συλλαβές» που αποτελούν το λεγόμενο «άσμα των αρσενικών ποντικών» (Holy & Guo, 2005).

Η ύπαρξη καλεσμάτων σε υψηλές ή χαμηλές συχνότητες είναι πλήρως κατανοητή. Γενικά οι ήχοι χαμηλής συχνότητας μεταφέρονται πολύ πιο μακριά σε σχέση με τους ήχους υψηλής συχνότητας. Έτσι, ένα κάλεσμα χαμηλής συχνότητας από ένα νεογνό, θα γίνει εύκολα αντιληπτό από τον θηρευτή για τον εντοπισμό των φωλιών, ενώ ένα υπερηχητικό κάλεσμα θα γίνει αντιληπτό από τα γύρω ποντίκια αλλά όχι από τον θηρευτή που ενδεχομένως να βρίσκεται λίγα μέτρα μακριά. Τα υπερηχητικά καλέσματα, αποτελούν κυρίως τα κοινωνικά μηνύματα σε γειτονικά ποντίκια. Αυτά τα μηνύματα δε θα πρέπει να μεταφερθούν μακριά, διότι θα θέτουν σε κίνδυνο το ποντίκι. Τα καλέσματα που βρίσκονται στο ακουστό φάσμα, μεταφέρονται πολύ πιο μακριά και δρουν κυρίως σαν προειδοποιητικά μηνύματα σε άλλα ποντίκια στο ευρύτερο περιβάλλον.

Πρέπει να σημειωθεί ότι οι ήχοι που εκπέμπονται από τα ποντίκια γίνονται αντιληπτοί και από άλλα ζώα, όπως ο σκύλος και η γάτα. Επίσης, υπέρηχοι που εκπέμπονται από άλλα ζώα, ή άλλες πηγές του περιβάλλοντος, γίνονται αντιληπτοί από τα ποντίκια και είναι ικανοί να επηρεάσουν τη συμπεριφορά τους.

Όταν κάποιος προσπαθεί να μελετήσει τη συμπεριφορά των ποντικών στο υπερηχητικό φάσμα, πρέπει να λαμβάνει υπόψη του τις ανεπιθύμητες πηγές παραγωγής υπερηχητικών συχνοτήτων όπως για παράδειγμα μία βρύση που στάζει σε μεταλλικό νεροχύτη, ο μεταλλικός ήχος των κλειδιών, ή ακόμη και η λειτουργία συσκευών όπως τηλεόραση ή οθόνη Η/Υ. Αυτά τα δύο τελευταία, εκπέμπουν ένα σταθερό σήμα στα 22kHz με αρμονικές στο εύρος των (16-160)kHz, το οποίο γίνεται αντιληπτό από τα ποντίκια και μπορεί να επηρεάσει τη συμπεριφορά τους. Για το λόγο αυτό, ένας τρόπος αποτύπωσης και μελέτης των υπερηχητικών σημάτων που παράγονται από τα ποντίκια, είναι η χρήση ενός «ανιχνευτή νυχτερίδων» (bat detector) ή ενός παλμογράφου. Με αυτές τις τεχνικές, μπορούν να καταγραφούν τόσο τα καλέσματα των ποντικών στο υπερηχητικό φάσμα, όσο οι συνεχείς μηχανικές πηγές παραγωγής υπερήχων. (Sales et al., 1992)

Στην παρούσα μελέτη, για την καταγραφή καλεσμάτων των ποντικών, χρησιμοποιήθηκε ένας ανιχνευτής νυχτερίδων. Όπως θα δούμε παρακάτω, τα καλέσματα αυτά αφορούν καταστάσεις

«πόνου/τρόμου» και «οργής/μίσους». Στο τελικό στάδιο της μελέτης, τα καλέσματα αυτά επανεκπέμφθηκαν μέσω φορητού Η/Υ. Το σταθερό σήμα που εκπέμπεται από τους φορητούς Η/Υ δεν επηρεάζει τη συμπεριφορά των ποντικιών, όπως θα τα επηρέαζε μία οθόνη κανονικού Η/Υ.

1.5 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΗΧΟΥ ΣΤΗΝ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ

Παρόλη την αμφισβήτηση, πολλές θεραπευτικές αγωγές εφαρμόζουν τη λεγόμενη «μουσικοθεραπεία» (music therapy) η οποία και εφαρμόζεται από ειδικούς «μουσικοθεραπευτές».

Υπό αμφισβήτηση επίσης βρίσκονται και κάποιες μελέτες του 1993, που υποστήριξαν ότι «...ακούγοντας Mozart, γίνεσαι εξυπνότερος-τουλάχιστον προσωρινά». Αυτή η ιδέα έγινε γνωστή σαν “Mozart effect”.

Πειράματα που έγιναν σε ένα σχολείο, έδειξαν ότι ακούγοντας 10 λεπτά Mozart, οι μαθητές παρουσίασαν μεγαλύτερη ευστροφία για τα επόμενα 10-15 λεπτά (Rauscher et al., 1993).

Μελέτες σε αρουραίους έδειξαν ότι ζώα που είχαν υποβληθεί σε ακούσματα Mozart τόσο κατά το εμβρυικό τους στάδιο, όσο και για 60 μέρες μετά τη γέννησή τους, μπορούσαν να ανταποκριθούν στην εκπαίδευση του λαβυρίνθου, γρηγορότερα και με λιγότερα λάθη σε σχέση με ζώα μάρτυρες (Rauscher et al., 1998).

Οι επιστήμονες που αμφέβαλαν για την αξιοπιστία αυτών των αποτελεσμάτων, σημειώνουν ότι οι αρουραίοι και τα ποντίκια δε μπορούν καν να ακούσουν τη μουσική Mozart, γιατί η ένταση, καθώς και μεγάλο μέρος του φάσματος, είναι σε αρκετά χαμηλό επίπεδο για το σύστημα ακοής τους (Steele, 2001). Άλλοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι τα ποντίκια μπορούν να ακούσουν μερικές από τις υψηλότερες συχνότητες της μουσικής αυτής (Chikahisa et al., 2006).

Μερικοί ειδικοί δηλώνουν ότι υπεύθυνος για το αίσθημα της ηρεμίας (αν και πολλοί δεν μπορούν να το συνειδητοποιήσουν πλήρως) είναι ο ρυθμός της μουσικής ή αλλιώς το tempo (beat) (Convington, & Crosby, 1997). Υποστηρίζεται ότι στην εμβρυική μας ηλικία επηρεαζόμαστε από τον κτύπο της καρδιάς της μητέρας μας και έτσι αργότερα στη ζωή μας η μουσική συνδυάζεται με την ασφάλεια (και ειδικά με αυτήν που μας προσέφερε η μητέρα μας) και την ηρεμία.

Έχει δειχθεί ότι η μουσική μειώνει τους παλμούς της καρδιάς και τείνει να αυξήσει τη θερμοκρασία σώματος- ενδείξεις για την έναρξη ηρεμίας του οργανισμού και τη μείωση του

stress. Επίσης αναφέρεται ότι η μουσική επηρεάζει διάφορες ψυχοσωματικές καταστάσεις, για παράδειγμα προκαλεί περισσότερη αντοχή στον πόνο, αυξάνει την μυϊκή δύναμη κ.α. (Bonny, 1983; Brauchli, 1993; Allen et al., 1994).

Η μουσική αποδεικνύεται να έχει θετικά αποτελέσματα σε ανθρώπους με ειδικές ανάγκες κάθε ηλικίας. Ειδική εκπαίδευση στους τομείς της μουσικής, ψυχολογίας και μουσικοθεραπείας, επιτρέπει στους μουσικοθεραπευτές να δουλέψουν με άτομα με διανοητική καθυστέρηση, με φυσικές ανικανότητες, με εγκεφαλικά προβλήματα, με αυτισμό, με θανατηφόρες ασθένειες, ψυχολογικά προβλήματα κ.τ.λ.

Μπορούμε να μελετήσουμε και να εφαρμόσουμε τα 7 βήματα του παρακάτω πίνακα.:

ΟΔΗΓΟΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΓΙΣΤΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΟΥΣΙΚΗΣ:

- Για να απομακρύνετε το stress, κάντε ένα 20λεπτο διάλειμμα με μουσική. Βάλτε κάποια χαλαρωτική μουσική και ξαπλώστε στον καναπέ σας. Για μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα φορέστε ακουστικά, ώστε να αφιερωθείτε αποκλειστικά σε αυτό.
- Διαλέξτε μουσική με πιο αργό ρυθμό κι από τους παλμούς της καρδιάς σας (72 παλμοί/min.). Η μουσική με επαναλαμβανόμενα μοτίβα θεωρείται πιο αποτελεσματική στη χαλάρωση.
- Όσο παίζει η μουσική προσπαθήστε να απελευθερωθείτε από το stress της ημέρας. Εστιαστείτε στην αναπνοή σας, η οποία πρέπει να γίνει βαθειά και αργή. Συγκεντρωθείτε στις παύσεις μεταξύ των νοτών. Αυτή η ανάλυση της μουσικής οδηγεί στην πλήρη χαλάρωση.
- Αν χρειάζεστε τόνωση προτιμήστε πιο έντονη και γρήγορη μουσική.
- Όταν η μέρας σας είναι σκληρή, επιλέξτε μία γνώριμη σε εσάς μουσική, όπως παιδικά, ή παλιά αγαπημένα τραγούδια. Αυτή η οικειότητα προκαλεί ηρεμία.
- Περπατήστε με ένα walkman και ακούστε τη μουσική που προτιμάτε. Κάντε εισπνοές και εκπνοές βάσει του ρυθμού της μουσικής. Αφήστε τη μουσική να σας ταξιδέψει.
- Το άκουσμα φυσικών ήχων όπως τα κύματα, το θρόισμα των φύλλων κ.α. βοηθάνε να χαλαρώσετε. Αν δε μπορείτε να έρθετε σε επαφή με τη φύση, φέρτε τη φύση σπίτι σας με ειδικά CD που περιέχουν ήχους της φύσης.

Η ψυχολογική ευφορία που προσφέρει η μουσική φαίνεται ότι μπορεί να επηρεάσει όλη την παθολογία του οργανισμού. Αντίθετα ο ανεπιθύμητος θόρυβος μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την προστατευτική άμυνα του οργανισμού, η οποία σε μερικές περιπτώσεις μπορεί να αντιστραφεί με φαρμακευτική αγωγή (Freire-Garabal et al., 1991; Freire-Garabal et al., 1995;

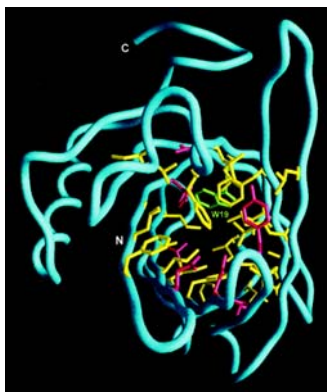
Freire-Garabal et al., 1997). Το στρες και η κατάθλιψη συσχετίζονται με αυξημένη θνησιμότητα (Murphy et al., 1987) και επιρρέπεια σε νεοπλασία (Shekelle et al., 1981). Έχει δειχτεί σε ποντίκια ότι η μουσική μειώνει την επαγόμενη από στρες καταστολή της προστατευτικής άμυνας του οργανισμού (ανοσοποιητικό σύστημα) και την ανάπτυξη μεταστατικών εστιών που προκαλούνται από καρκινικά κύτταρα (Nunez et.al., 2002)

1.6 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΣΤΑ ΟΥΡΑ ΠΟΝΤΙΚΩΝ

Όπως είναι πλέον φανερό, η μουσική επηρεάζει πολλά βιολογικά συστήματα. Ένας εύκολος τρόπος παρακολούθησης της αλλαγής της βιολογίας του ζώου από εξωτερικά ερεθίσματα είναι η μελέτη των ούρων. Η πρωτεϊνουρία, δηλαδή η έκκριση πρωτεϊνών στα ούρα, δεν είναι φυσιολογική λειτουργία στον άνθρωπο και υποδεικνύει κάποιο παθολογικό πρόβλημα στα νεφρά διότι οι πρωτεΐνες αυτές έχουν μεγάλο μοριακό βάρος και δε μπορούν να διαπεράσουν τα νεφρά. Η πρωτεϊνουρία όμως αποτελεί μία φυσιολογική λειτουργία στα ποντίκια όπου οι κύριες πρωτεΐνες των ούρων (major urinary proteins, MUPs) είναι μικρού μοριακού βάρους (περίπου 18000 Dalton) και μπορούν να φιλτραριστούν από τα νεφρά και να εκκριθούν στα ούρα (Thung, 1956; Finlayson et al., 1959; Finlayson et al., 1965; Berger et al., 1981). Σε μερικά ζώα οι ημερήσιες MUP πρωτεΐνες βρίσκονται σε συγκέντρωση της τάξεως των 70mg/ml, αλλά οι πιο συνήθεις ποσότητες κυμαίνονται από 10-30mg/ml (Beynon et al., 2002). Οι MUP πρωτεΐνες είναι σταθερές κάτω από μία ποικιλία συνθηκών όπως πάγωμα-ξεπάγωμα, ξήρανση, μέτρια θέρμανση, ακόμα και πρωτεόλυση (Berger et al., 1981). Η σύνθεση των MUP πρωτεϊνών γίνεται στο συκώτι και αντιστοιχεί στο 3,5-4% της συνολικής πρωτεϊνοσύνθεσης του ποντικιού. Οι MUP που εκφράζονται στα ηπατοκύτταρα αποκόπτονται από το πεπτιδίο σινιάλιο έκκρισης, εκκρίνονται στο αίμα και κατόπιν φιλτράρονται στα νεφρά (Finlayson et al., 1965). Η σύνθεση των MUP εξαρτάται από το φύλο του ζώου και επηρεάζεται από τα ανδρογόνα (Kurtz et al., 1977; Vandoren et al., 1978; Szoka et al., 1978; Lynch et al., 1982; Gosh et al., 1991; Spilgelberg et al., 1988; Ghosh et al., 1990; Johnson et al., 1995). Η τεστοστερόνη επάγει τη σύνθεση των MUP ακόμη και στα θηλυκά ενήλικα ποντίκια. Ορμόνες όπως η αυξητική ορμόνη (Vandoren et al., 1978; Szoka et al., 1978; Lynch et al., 1982; Johnson et al., 1995), η θυρεοειδής ορμόνη (Kurtz et al., 1976; Kurtz et al., 1977), τα γλυκοκορτικοειδή και η ινσουλίνη (Vandoren et al., 1978), είναι απαραίτητες για τη φυσιολογική παραγωγή των MUP. Από την άλλη μεριά οι MUP πρωτεΐνες επηρεάζουν τον άξονα υπόφυση/γονάδες και τον μεταβολισμό των νευρικών διαβιβαστών στον υποθάλαμο (Spilgelberg et al., 1988; Ghosh et al., 1990).

Οι MUP πρωτεΐνες προσδένουν τις πηπτικές οσμές στα ούρα οι οποίες κατά την απελευθέρωσή τους επηρεάζουν τη συμπεριφορά τόσο των θηλυκών, όσο και των αρσενικών ποντικών και θεωρούνται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη μετάδοση χημικών σημάτων μεταξύ των ατόμων.

Οι MUP πρωτεΐνες είναι μέλη της οικογένειας των λιποκαλινών. Η χαρακτηριστική δομή αυτής της οικογένειας περιλαμβάνει μία β-πτυχωτή επιφάνεια με 8 αλυσίδες που κυκλώνονται ώστε να σχηματιστεί μία δομή β-βαρελιού παρέχοντας μία πεπλατυσμένη ή ελλειψοειδή μορφή. Η δομή του β-βαρελιού εσωκλείει μία κοιλότητα που αποτελεί τη θέση πρόσδεσης για μια μεγάλη ποικιλία κυρίως υδροφοβικών δεσμευτών (στην περίπτωση των MUP πρωτεϊνών, οι δεσμευτές είναι οι οσμές). Η δομή των πρωτεϊνών αυτών, φαίνεται στην Εικόνα 7.



Εικόνα 7
Χαρακτηριστική δομή των MUP πρωτεϊνών.

1.7 ΣΤΟΧΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΤΟΜΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Όπως αποδεικνύεται από την ανάλυση της βιβλιογραφίας, η ακοή αποτελεί μία από τις βασικότερες αισθήσεις επικοινωνίας με το περιβάλλον και μεταφοράς μηνυμάτων όπου η κυματική υφή του ήχου μετατρέπεται σε ηλεκτροχημική ενέργεια επηρεάζοντας αρχικά το νευρικό σύστημα και στην συνέχεια όλη την παθολογία του οργανισμού. Στη παρούσα μελέτη θελήσαμε να μεταφέρουμε το συναίσθημα του στρες από ένα οργανισμό σε έναν άλλο μέσω φυσικά παραγόμενων ήχων. Ο οργανισμός που επιλέχθηκε ήταν το ποντίκι για λόγους που έχουν αναπτυχθεί εκτενώς στις προηγούμενες παραγράφους. Το συναίσθημα που θελήσαμε να μεταφέρουμε ήταν αυτό του πόνου/τρόμου που προκαλείται από εξωγενείς παράγοντες (ανθρώπινο χέρι) και της οργής/μίσους που προκαλείται από εσωτερική διαμάχη (τσακωμός αρσενικών για τη διεκδίκηση θηλυκού συντρόφου). Η μετατροπή του στρες σε χημικό μήνυμα έγινε ορατή με την μελέτη των ούρων στις διάφορες περιπτώσεις. Οι αντιδράσεις του νευρικού

συστήματος στο στρες είναι σχεδόν ακαριαίες και αυτές μεταφράζονται σε αύξηση ή μείωση της παραγωγής ουσιών στο αίμα, στα ούρα και σε ολόκληρο τον χυμό (υγρό) του οργανισμού. Η επιλογή της μελέτης των ούρων έγινε διότι δε χρειαζόταν κάποια ειδική μεταχείριση του ζώου και συνεπώς δε θα αλλοιωνόταν τα αποτελέσματα λόγω περεταίρω χειρισμού.

Αρχικά έγινε ηχογράφιση στο ακουστικό και υπερηχητικό φάσμα των ήχων που παράγουν στην κατάσταση πόνου/τρόμου και ανάλυση του πρωτεϊνικού προφίλ των ούρων. Οι ήχοι αναλύθηκαν, επεξεργάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για την ηχοβόληση άλλων ζώων με στόχο τη μεταφορά του συναισθήματος. Το πρωτεϊνικό προφίλ των ούρων των ζώων που υπέστησαν την ηχοβόληση συγκρίθηκε με αυτό των ζώων που είχαν δεχθεί το άμεσο ερέθισμα. Εκτός από την ανάλυση των φασμάτων που αντιστοιχούν στις καταστάσεις του πόνου/τρόμου που δεν έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα από άλλους ερευνητές, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι πράγματι είναι δυνατή η μεταφορά συναισθήματος μέσω του ήχου, η οποία και αποδεικνύουμε άμεσα ότι συνδέεται με την παθοφυσιολογία του οργανισμού.


2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ


2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

Τα πειραματικά ποντίκια των αιμομικτικών σειρών BALB/c και C3H/HeN (Charles River, Rome, Italy) που χρησιμοποιήθηκαν στεγάζονταν στο Ζωοτροφείο του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου της Κρήτης, σε δωμάτια με ελεγχόμενο κύκλο φωτός 12 ωρών (έναρξη κύκλου στις 06:00). Η ηλικία των θηλυκών ή αρσενικών ζώων ήταν 4 ή 12 εβδομάδων, ενώ τα νεογνά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 5 και 7 ημερών.

Πρώτα καταγράφηκαν ήχοι ποντικίων, προκαλώντας τους πόνο. Επειδή δε μπορεί κανείς να πει με σιγουριά ότι οι ήχοι αυτοί προέρχονται αποκλειστικά από το συναίσθημα του πόνου, τους ήχους αυτούς τους ονομάσαμε ήχους φόβου-τρόμου. Η διαδικασία αυτή-την οποία θα εξηγήσουμε αναλυτικά παρακάτω- έγινε σε αρσενικά και θηλυκά ποντίκια διαφόρων ηλικιών. Στη συνέχεια έγινε ηχητική καταγραφή τσακωμού μεταξύ αρσενικών ποντικίων στην προσπάθειά τους να διεκδικήσουν ένα θηλυκό.

Για να γίνουν αυτές οι καταγραφές, δημιουργήσαμε όσο το δυνατόν πιο ιδανικές συνθήκες για να μην επηρεαστεί το αποτέλεσμα από εξωτερικούς παράγοντες. Συγκεκριμένα:

 Πριν ξεκινήσει η διαδικασία καταγραφής και περισυλλογής ούρων πήραμε τα ποντίκια και τα απομονώσαμε σε ξεχωριστό δωμάτιο. Όπως ο άνθρωπος χρειάζεται να εγκλιματιστεί με το περιβάλλον του, το ίδιο συμβαίνει και με τα ποντίκια. Συνεπώς πριν την οποιαδήποτε ενέργεια, υπήρχε πάντα ένας χρόνος αναμονής (αυτό χρειάστηκε για το βιολογικό μέρος κυρίως).

 Για επαλήθευση των στοιχείων μας, χρησιμοποιήσαμε πολλές ομάδες ποντικίων. Αυτό σημαίνει ότι τα επόμενα ποντίκια δεν έπρεπε να επηρεαστούν από τα προηγούμενα. Είδαμε ότι από τη κάθε ομάδα ποντικίων εκείνο που αντιδρούσε πιο έντονα ήταν πάντα το πρώτο, λόγω της άγνοιάς του για το τι θα υποστεί. Τα επόμενα ποντίκια της ίδιας ομάδας έδειχναν πιο θαρραλέα και αυτό γιατί το πρώτο επικοινωνούσε με τα υπόλοιπα και τα ενημέρωνε. Η επικοινωνία αυτή γινόταν στο υπερηχητικό φάσμα αφού εμείς δε μπορούσαμε να ακούσουμε τίποτα με το αυτί μας. Αν δεν υπήρχε επικοινωνία/ενημέρωση, τα επόμενα ποντίκια λογικά θα αντιδρούσαν σαν το πρώτο, ή θα όφειλαν να είναι πιο φοβισμένα από τις κραυγές φόβου-τρόμου του πρώτου.

2.2 ΣΥΛΛΟΓΗ ΟΥΡΩΝ

Η βιολογική μελέτη βασίστηκε στην ανάλυση των ούρων. Αρχικά συλλέξαμε ούρα από ποντίκια που ήταν σε κατάσταση ηρεμίας (αυτά αλλιώς τα λέμε αρνητικούς μάρτυρες). Στη συνέχεια συλλέξαμε τα ούρα των ποντικιών που χρησιμοποιήσαμε για τη μελέτη μας.

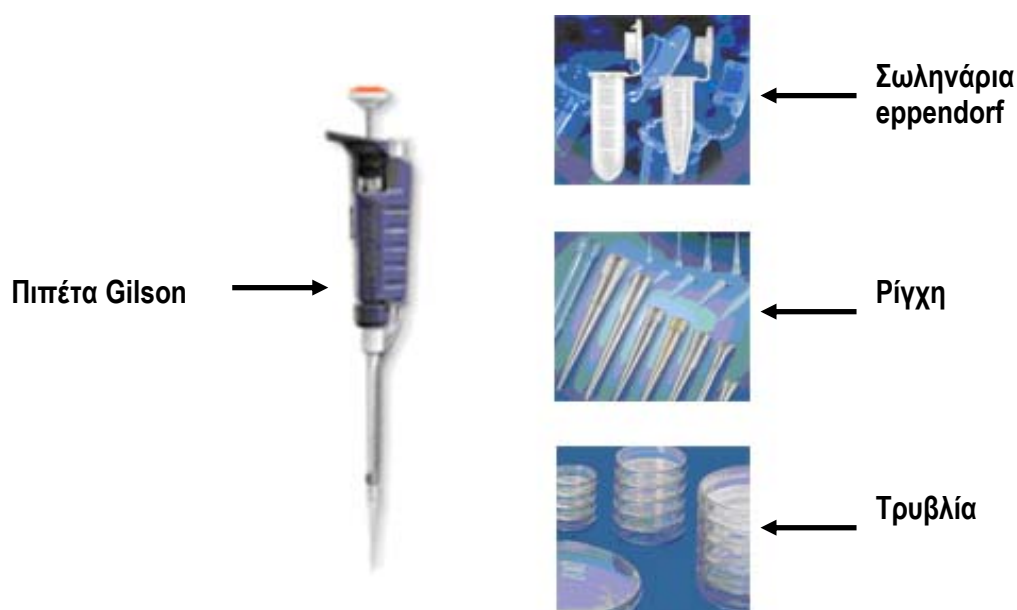
Ο εργαστηριακός εξοπλισμός για τη συλλογή των ούρων ήταν μία πιπέτα, ρίγχη, τρυβλία και σωληνάρια (Εικόνα 8).

Για κάθε ποντίκι χρησιμοποιήσαμε καινούργιο και αποστειρωμένο σετ εξοπλισμού, προκειμένου να μην αναμειχθούν τα ούρα από ποντίκι σε ποντίκι. Η σειρά της διαδικασίας συλλογής, ήταν η εξής:

1) Ο χειρισμός των ποντικιών έγινε πάνω από τρυβλία, με σκοπό τα ούρα τους να συλλεχθούν εκεί.

2) Τα ούρα από τα τρυβλία μεταφέρθηκαν σε μικροσκοπικά σωληνάρια (erpendorf) με τη βοήθεια πιπέτας ακριβείας Gilson. (Στην άκρη της πιπέτας προσαρμόζονται τα ρίγχη. Σε όλη τη διαδικασία συλλογής χρησιμοποιήθηκε η ίδια πιπέτα, αλλά σε κάθε ποντίκι χρησιμοποιήσαμε διαφορετικό ρίγχος. Η πιπέτα δεν έρχεται σε επαφή με τις ουσίες που απορροφάει, συνεπώς δεν υπάρχει κίνδυνος ανάμειξης των ούρων.)

3) Τέλος, τα σωληνάρια αυτά, φυλάχθηκαν σε ψυγεία. Η θερμοκρασία φύλαξης, εξαρτάται κάθε φορά από την άμεση ή όχι χρήση της ουσίας. Για άμεση χρήση, φυλάσσεται στους 4°C, ενώ για μη άμεση χρήση (παρατεταμένη διάρκεια), στους -20°C.



Εικόνα 8
Εξοπλισμός

2.3 ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ

Για την πρόκληση του συναισθήματος τρόμου/πόνου ασκήθηκε μυϊκή πίεση στα άκρα του ζώου ενώ αυτό βρισκόταν ακινητοποιημένο από τον χειριστή.

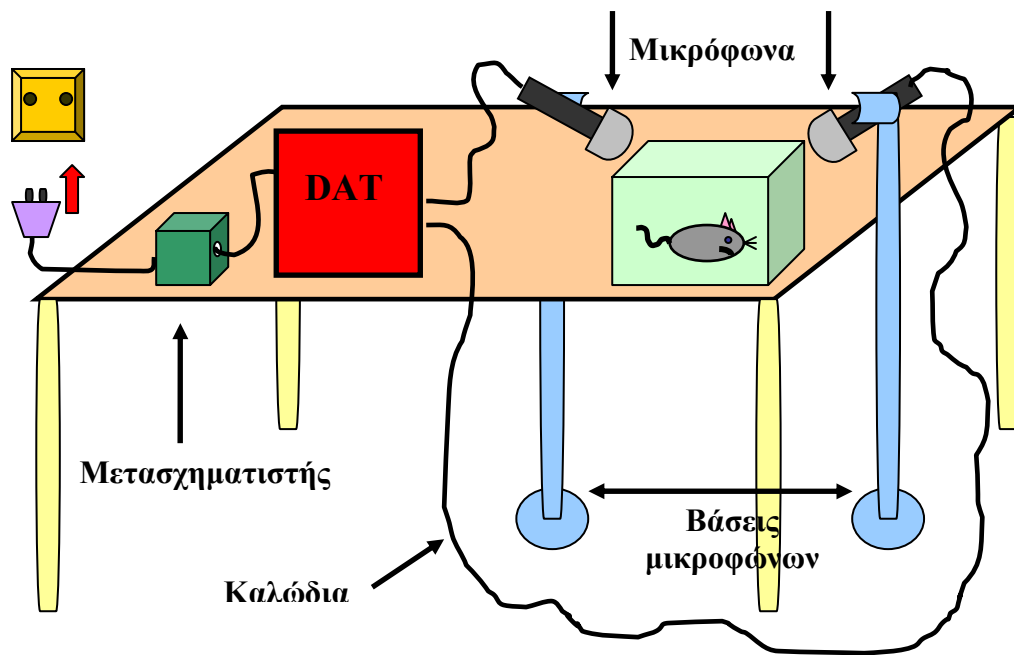
Για την πρόκληση της διαμάχης μεταξύ αρσενικών, αρχικά τοποθετήθηκαν σε ειδικό κλουβί ένα ενήλικο θηλυκό ζώο που βρισκόταν σε οίστρο και ένα ενήλικο αρσενικό. Ενώ είχε αρχίσει η διαδικασία προσέγγισης των δυο ζώων, προστέθηκε στο κλουβί ένα δεύτερο ενήλικο αρσενικό. Η διαμάχη μεταξύ των αρσενικών ποντικών ξεκίνησε λίγα λεπτά μετά την συνάντησή τους.

Ο χειρισμός της μητέρας, περιλάμβανε μόνο την πρόκληση ανησυχίας της, ώστε να απομακρυνθεί από την φωλιά της. Η ανησυχία αυτή προκλήθηκε σπρώχνοντάς την ελαφρά από τη φωλιά της (τα ποντίκια έτσι κι αλλιώς, δε θεωρούνται εξοικειωμένα με τον άνθρωπο). Τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν για μάρτυρες δεν υπέστησαν κανένα χειρισμό και η συλλογή ούρων έγινε εφόσον είχαν απομονωθεί σε καθαρά κλουβιά και είχαν παραμείνει σε κατάσταση ηρεμίας για τουλάχιστο 30 λεπτά.

2.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΗΧΟΓΡΑΦΗΣΗΣ

Για την ηχογράφηση στο ακουστό φάσμα συχνοτήτων χρησιμοποιήθηκαν:

- A) Δύο μικρόφωνα Shure SM57 τα οποία ήταν τοποθετημένα σε σταθερή απόσταση από το(α) ζώα.
 - B) Η καταγραφική συσκευή DAT και ο μετασχηματιστής του.
 - Γ) Ακουστικά AKG K271 STUDIO (για έλεγχο της ποιότητας του ήχου)
 - Δ) Καλώδια και βάσεις μικροφώνων.
- Η διάταξη φαίνεται στο Σχήμα 1:



Σχήμα 1
Διάταξη ηχογράφησης

Η αρχική ηχογράφηση έγινε με τον εξοπλισμό που φαίνεται στο παραπάνω σχήμα και αφορούσε μόνο το ακουστό φάσμα.

Πρέπει να αναφέρουμε ότι έγινε απόπειρα ηχογράφησης και στο υπερηχητικό φάσμα συχνοτήτων, χρησιμοποιώντας μία συσκευή καταγραφής του υπερηχητικού φάσματος (Pettersson Elektronik A.B. D980, Uppsala, Sweden). Συγχρόνως με την υπερηχητική καταγραφή, έγινε ηχογράφηση ακουστού φάσματος με τη βοήθεια του DAT για να καταγράψουμε και να συγκρίνουμε τόσο το ακουστό, όσο και το υπερηχητικό φάσμα. Η συγκεκριμένη ηχογράφηση έγινε με μικρόφωνο Earthworks και όχι με τα Shure SM57 που είχαν χρησιμοποιηθεί στην αρχική ηχογράφηση. Για την ηχοβόληση χρησιμοποιήσαμε μόνο το ακουστό φάσμα και κάποιοι υπέρηχοι χρησιμοποιήθηκαν μόνο για την ανάλυση του φάσματος.

Μελλοντικά-και χάρη στο νέο εξοπλισμό της σχολής μας- θα επαναληφθεί η ίδια διαδικασία έχοντας στόχο την ηχογράφηση, ηχοβόληση και κυρίως τη μελέτη υπερήχων.

Στην παρούσα εργασία δεν εκβαθύνουμε στο υπερηχητικό φάσμα γιατί αφενός δεν υπήρχε ο κατάλληλος εξοπλισμός και αφετέρου η συσκευή υπερηχητικής καταγραφής που δανειστήκαμε δεν πλοιορούσε βασικές προϋποθέσεις:

A) Η καταγραφή του υπερήχου, γινόταν με καθυστέρηση κάποιων δευτερολέπτων, διότι η συγκεκριμένη συσκευή αρχικά “φόρτωνε” στη μνήμη της τον ήχο και έπειτα τον αναπαρήγαγε. Όση ώρα “φόρτωνε” τον ήχο, η λειτουργία ηχογράφησης σταματούσε, με αποτέλεσμα να

χάνονται χρήσιμοι ήχοι (ειδικά στην περίπτωση των ποντικιών αυτό αποτελεί πραγματικό πρόβλημα, διότι οι κραυγές τους είναι μικρές, κοφτές και σύντομες).

Β) Είχε περιορισμένο χρόνο καταγραφής, με αποτέλεσμα να μη μπορούμε να έχουμε ολοκληρωμένες φράσεις.

Γ) Η συσκευή αυτή επέκτεινε από μόνη της τον ήχο. Συγκεκριμένα, το 1 sec του κανονικού ήχου, το καταγράφει σε 10 sec (expansion), με αποτέλεσμα την παραμόρφωση του ήχου.

Δ) Δεν μπορούσε να καταγράψει καθαρό ήχο. Υπήρχε τόσο μεγάλο ποσοστό θορύβου, που δυσκόλευε ακόμα περισσότερο τη μελέτη μας.

Η συσκευή καταγραφής του υπερηχητικού φάσματος (Pettersson Elektronik A.B. D980, Urpsala, Sweden) ανήκε στο Μουσείο Φυσικής Ιστορίας και δεν υπήρχε η δυνατότητα δικής μας επέμβασης/χειρισμού. Για να διαπιστώσουμε πριν από κάθε καταγραφή ότι λειτουργεί ορθά, ηχογραφήσαμε αντικείμενα που παρήγαγαν υπερήχους όπως ειδικές σφυρίχτρες για σκύλους και συσκευές που απωθούν έντομα. Τα παραπάνω προβλήματα ήταν εμφανή από το δοκιμαστικό κιόλας στάδιο.

Οι ηχογραφήσεις στο ακουστό φάσμα-όπως έχει ήδη αναφερθεί-πραγματοποιήθηκαν με το DAT (που ανήκει στη σχολή) το οποίο παίρνει ειδικές κασέτες (QUANTEGY DAT Certified Master Audio Tape R-94).

Οι ηχογραφήσεις τόσο από το DAT, όσο και από τη συσκευή υπερηχητικής καταγραφής, αποθηκεύτηκαν σε Η/Υ μέσω του προγράμματος Bat Sound, το οποίο συνόδευε την υπερηχητική συσκευή. Το Bat Sound είναι ένα πρόγραμμα στο οποίο απεικονίζεται το φάσμα του ήχου (δηλαδή μπορεί κάποιος να διακρίνει πολύ εύκολα τα formants της κάθε κραυγής) και συνοδεύεται από τον αντίστοιχο ήχο.

Ευτυχώς, το ηχητικό αρχείο του Bat Sound, ήταν συμβατό με τα αρχεία που “ανοίγουν” προγράμματα όπως το WaveLab και Sound Forge.

2.5 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΗΧΗΤΙΚΩΝ ΜΗΝΥΜΑΤΩΝ

Αφού περάσαμε τους ήχους στη μνήμη του Η/Υ, έγινε διαχωρισμός των ήχων των ζώων, ανάλογα με την ηλικία, το φύλο και τον πειραματικό χειρισμό που είχαν υποστεί. Η επεξεργασία που έγινε στο αρχείο ήχου, ήταν πολύ απλή και δεν είχε σκοπό την διαφοροποίηση των κραυγών, αλλά τη λειτουργικότητα των αρχείων. Για παράδειγμα:

► Σε ορισμένους ήχους αυξήσαμε την ένταση (gain) μέχρι και 5dB, προσέχοντας όμως μην προκληθεί παραμόρφωση.

- ▶ Κόπηκαν τα σημεία που υπήρχαν μεγάλα τμήματα σιωπής, με σκοπό το υλικό μας να γίνει πιο πυκνό.
- ▶ Τα σημεία που είχαν εξωτερικούς (ανεπιθύμητους) ήχους, όπως κτυπήματα των ουρών των ποντικών σε διάφορες επιφάνειες, αφαιρέθηκαν.
- ▶ Για την ηχοβόληση επιλέχθηκαν οι πιο καθαρές και ολοκληρωμένες κραυγές και δημιουργήσαμε νέα ηχητικά αρχεία (στο περιβάλλον του WaveLab), τοποθετώντας τον ένα ήχο μετά τον άλλο και επαναλαμβάνοντας κάποιους ήχους ξανά και ξανά σε αραιά χρονικά διαστήματα.

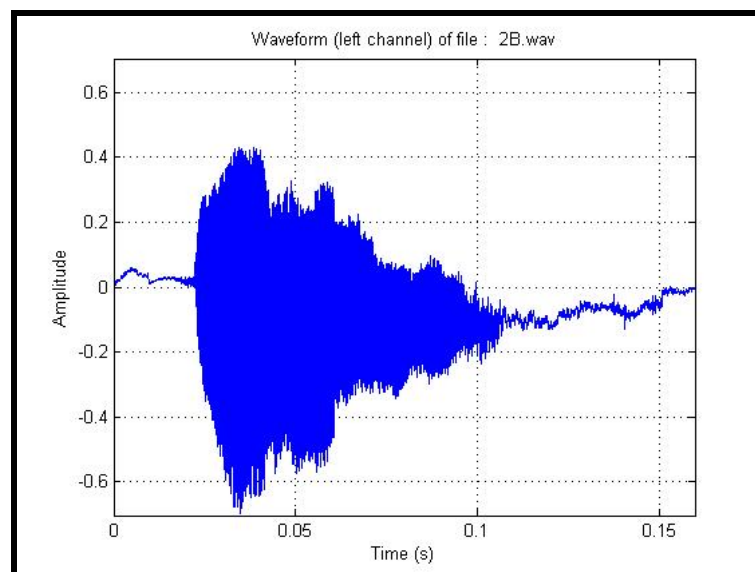
Ήχοι με έντονο το στοιχείο του θορύβου δεν χρησιμοποιήθηκαν. Η χρήση τεχνικών όπως De Noiser μπορεί να αφαιρεί ικανοποιητικά το θόρυβο, αλλά αλλοιώνει σημαντικά τον ήχο, με φόβο να μην αναγνωρίζεται πλέον από τα ζώα.

Εκτός από τα προγράμματα Bat Sound και WaveLab, χρησιμοποιήθηκε και το πρόγραμμα MATLAB.

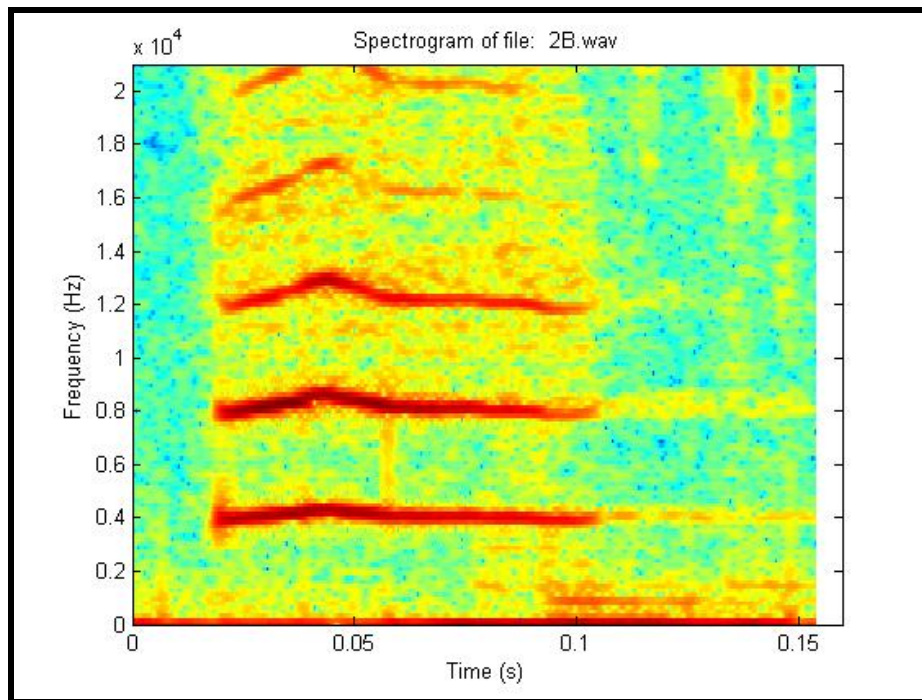
Χρησιμοποιήθηκε ένα πρόγραμμα σε γλώσσα MATLAB που κατασκευάστηκε από τον κ. Κουζούπη και κάνει εξής:

Επεξεργάζεται αρχεία ήχου και παράγει αρκετά σχήματα, τα οποία εξηγούνται παρακάτω. Αρχικά επιλέγουμε ένα αρχείο wav (είτε mono είτε stereo). Αν το αρχείο είναι στέρεο τότε παίρνει το αριστερό κανάλι. Ο επιλεγμένος ήχος ακούγεται από τα ηχεία ή τα ακουστικά. Μετά το πρόγραμμα παράγει διαγράμματα. Η αρίθμηση όλων των σχημάτων (Figures) είναι ακριβώς όπως η αρίθμηση των σχημάτων που ακολουθούν:

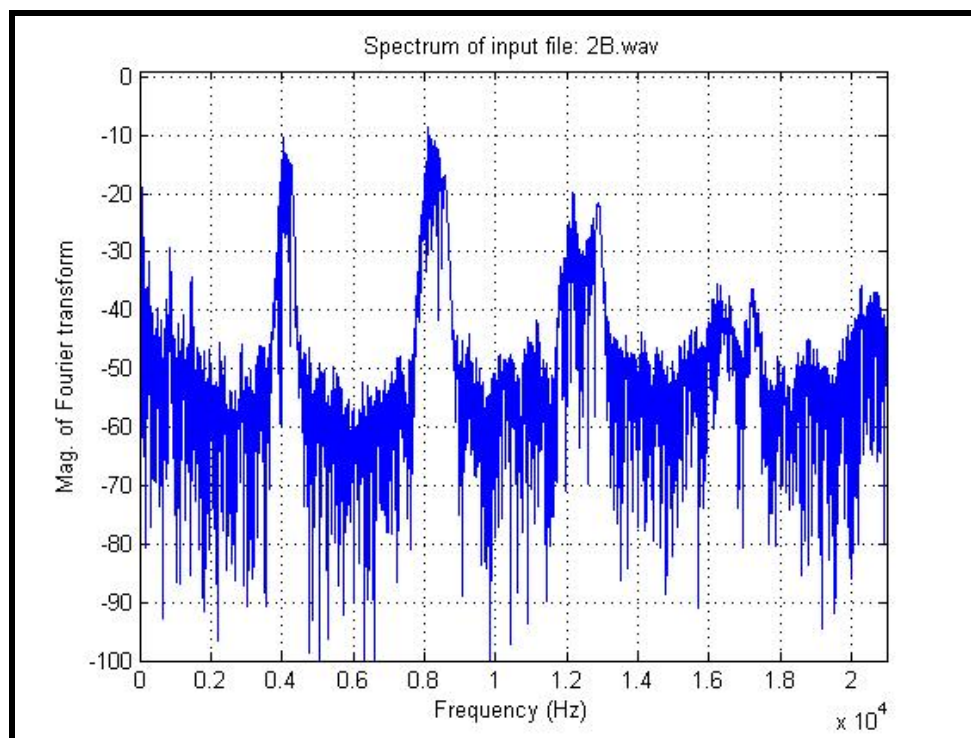
1 Το audio σήμα που φορτώθηκε.



2 Φασματογράφημα του audio σήματος, (οι κάθετες τιμές πολλαπλασιάζονται επί 10000 Hz).

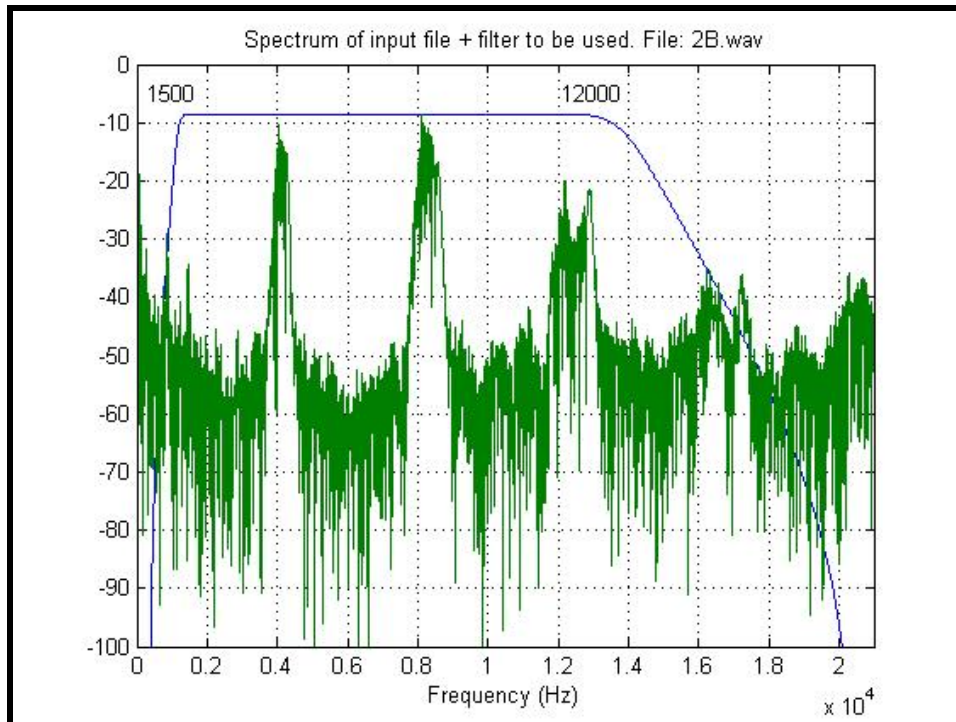


3 Το φάσμα του audio σήματος, ως έχει.

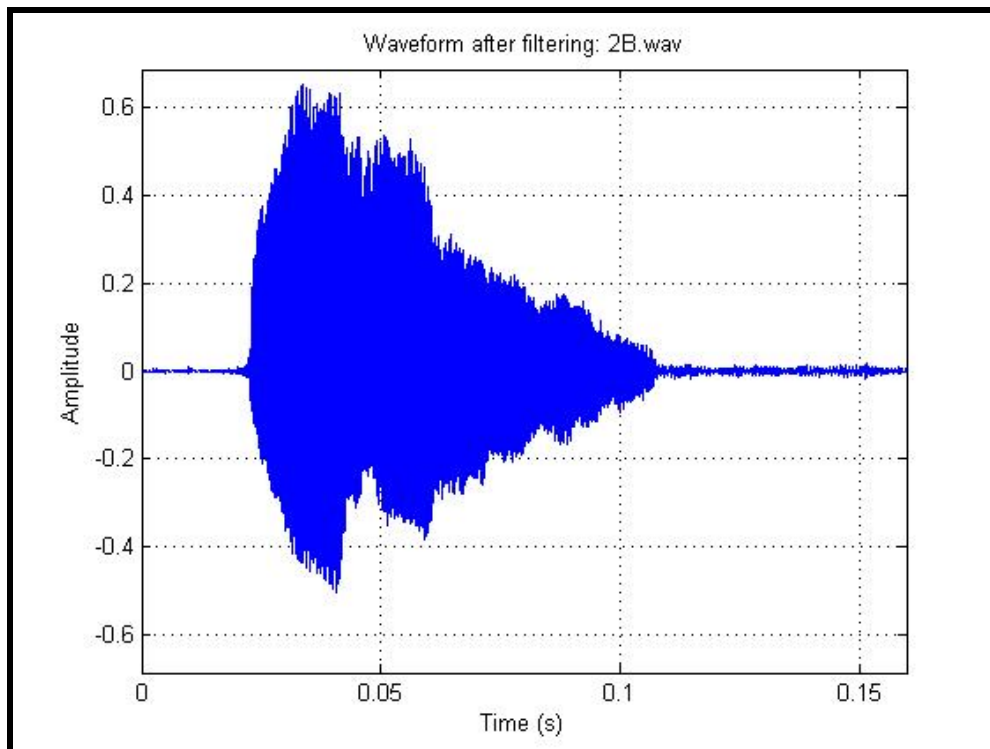


3.1 Επειδή οι περισσότερες κυματομορφές έχουν αρκετό θόρυβο και στις χαμηλές αλλά και στις ψηλές συχνότητες, (υπάρχουν δηλαδή συνιστώσες πολύ χαμηλές), γίνεται ένα

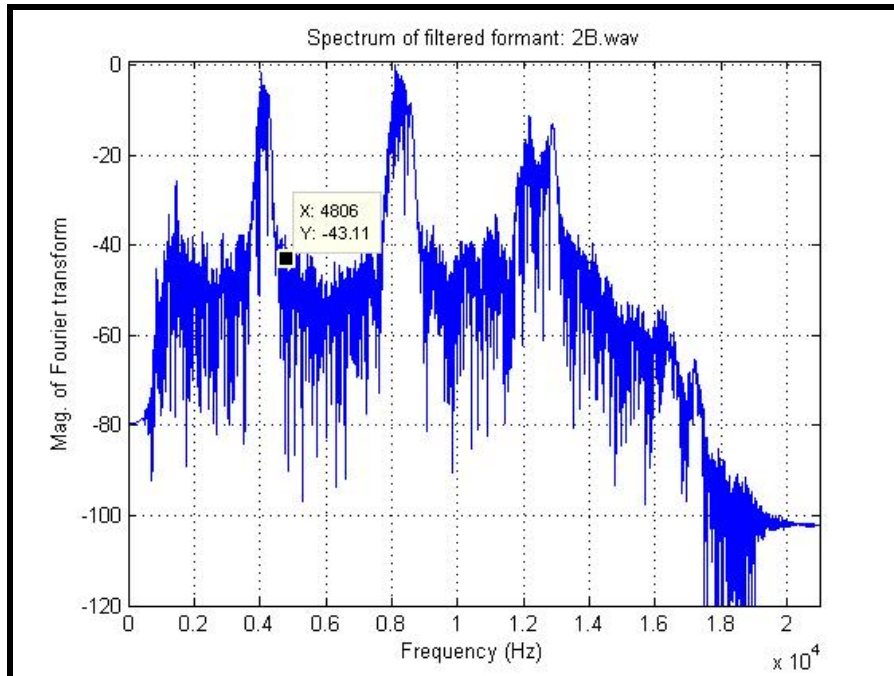
φιλτράρισμα ώστε να αφαιρεθούν οι περιοχές αυτές. Το σχήμα αυτό δείχνει την προεπιλεγμένη συνάρτηση μεταφοράς του φίλτρου εφαρμοσμένη πάνω στο φάσμα του συγκεκριμένου ήχου. Η μορφή του φίλτρου είναι προεπιλεγμένη αλλά μπορεί να γίνει ρυθμιζόμενη, (αν χρειαστεί θα επέμβουμε εδώ, να αλλάξουμε την περιοχή του φίλτρου).



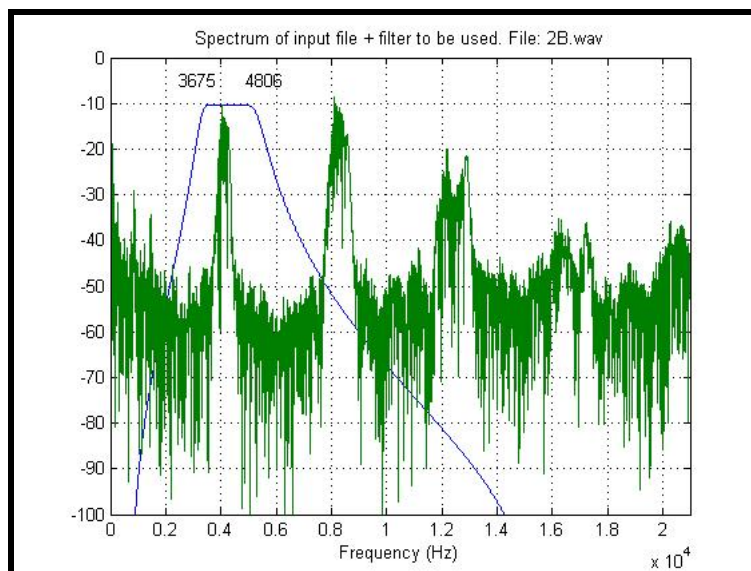
3.2 Αφού γίνει το φιλτράρισμα εδώ εμφανίζεται το αποτέλεσμα του φιλτραρίσματος στη κυματομορφή (ως προς το χρόνο).



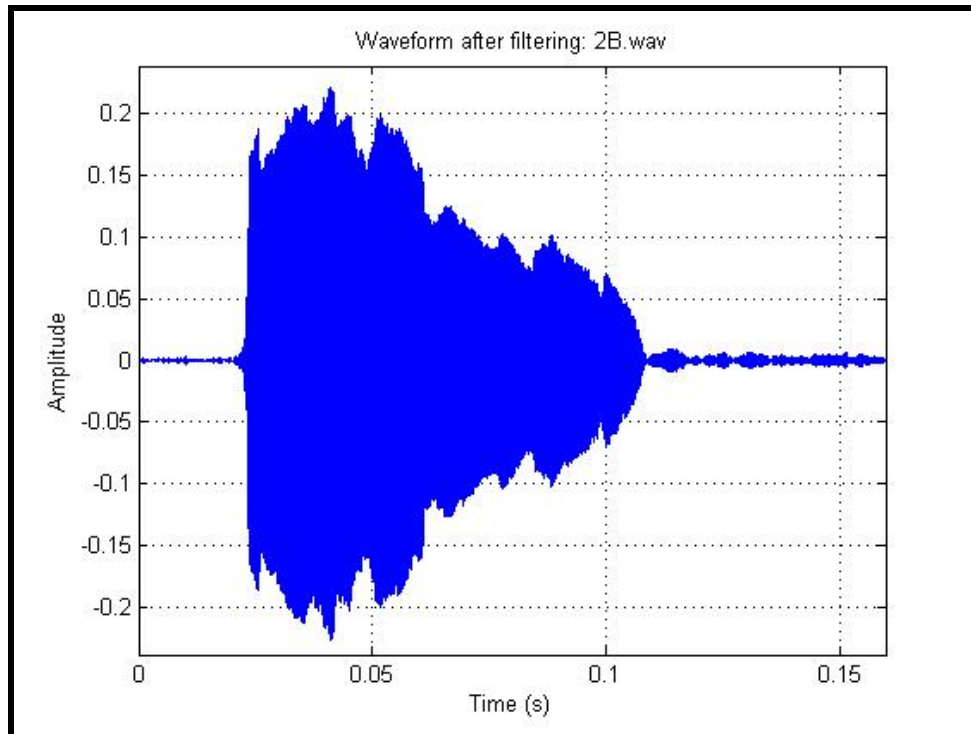
3.3 Αφού γίνει το φιλτράρισμα, παρακάτω εμφανίζεται το αποτέλεσμα του φιλτραρίσματος στο φάσμα. Για να απομονώσουμε τώρα το πρώτο (συνήθως) ή το δεύτερο formant του 'φωνήματος', χρησιμοποιούμε ένα bandpass φίλτρο. Γι'αυτό στο επόμενο βήμα το πρόγραμμα μας ζητάει να εισάγουμε τις πλευρικές συχνότητες αποκοπής.



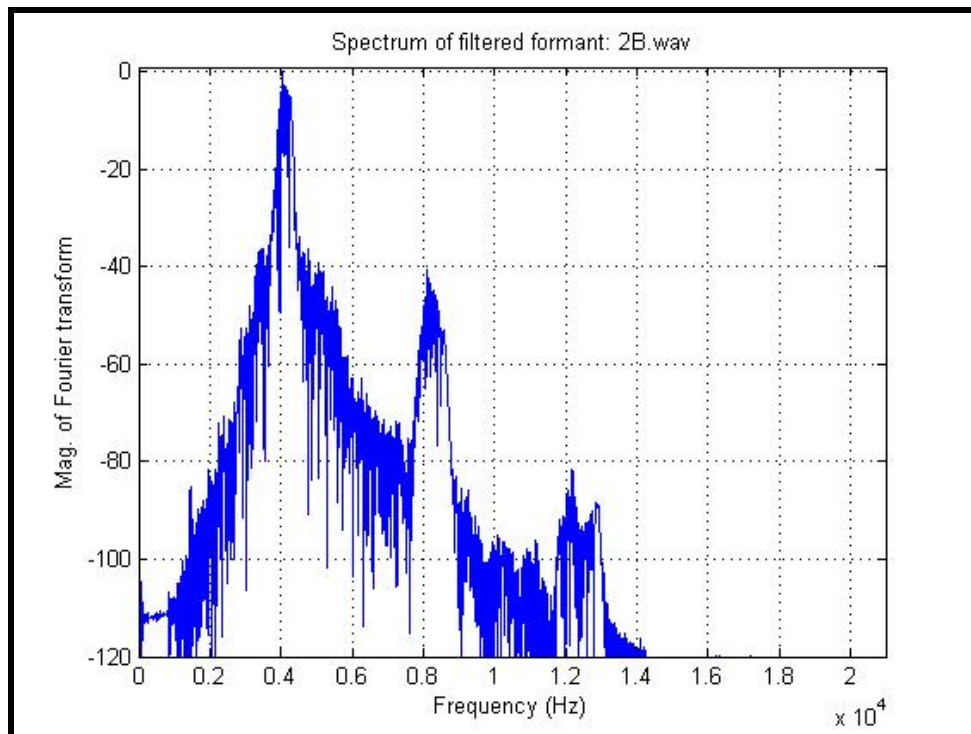
3.4 Αφού έχουμε εισάγει και τις δύο τιμές, εδώ φαίνεται πάλι η συνάρτηση μεταφοράς του φίλτρου εφαρμοσμένη πάνω στο φάσμα του συγκεκριμένου ήχου.



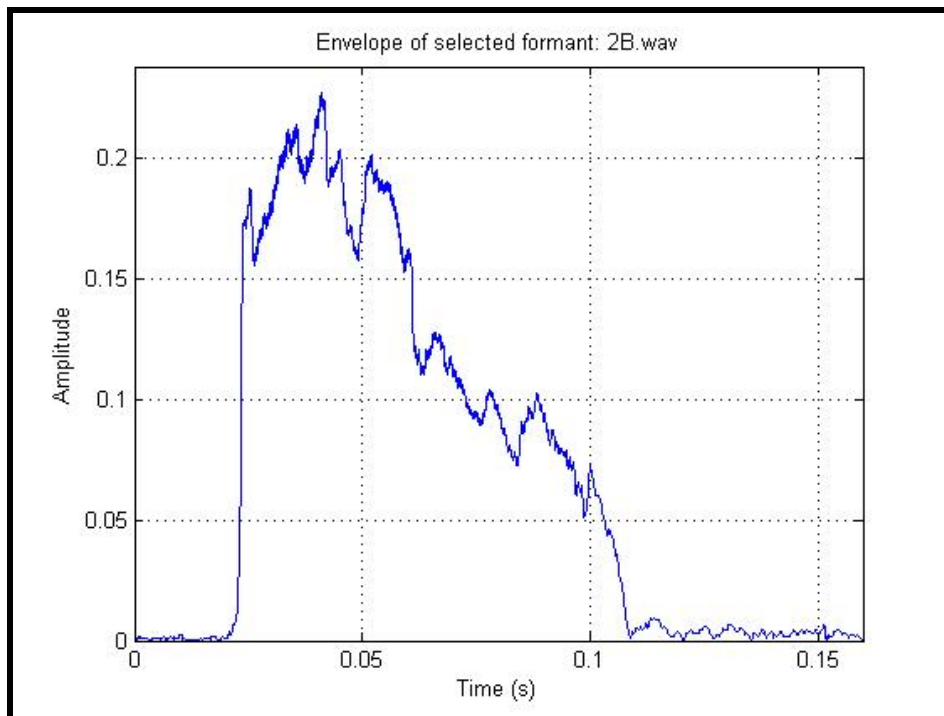
3.5 Αφού γίνει το φιλτράρισμα εδώ εμφανίζεται το αποτέλεσμα του φιλτραρίσματος στη κυματομορφή (ως προς το χρόνο)



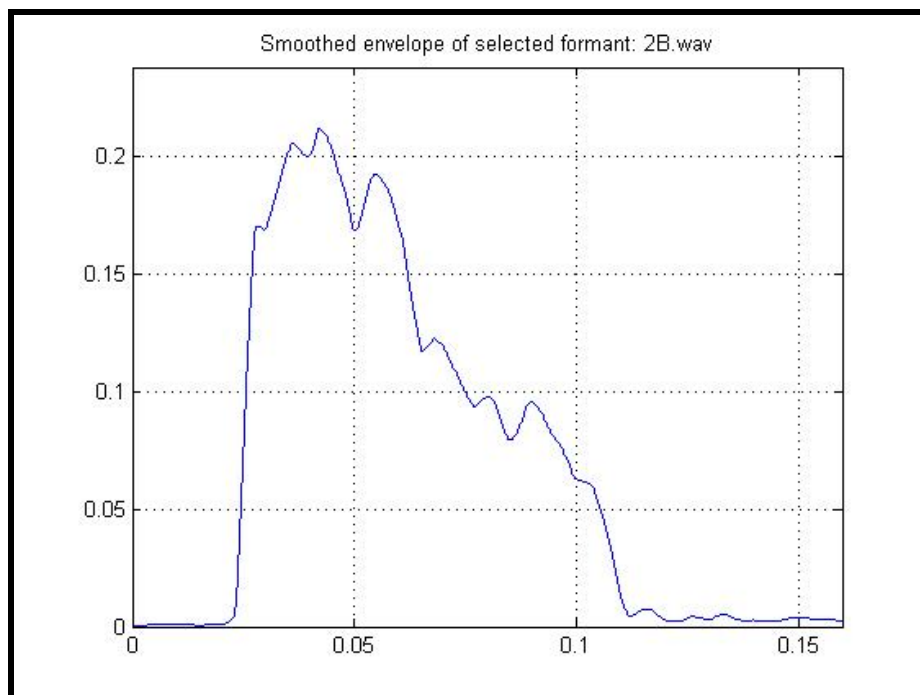
3.6 Αφού γίνει το φιλτράρισμα εδώ εμφανίζεται το αποτέλεσμα του φιλτραρίσματος στο φάσμα (ως προς τη συχνότητα).



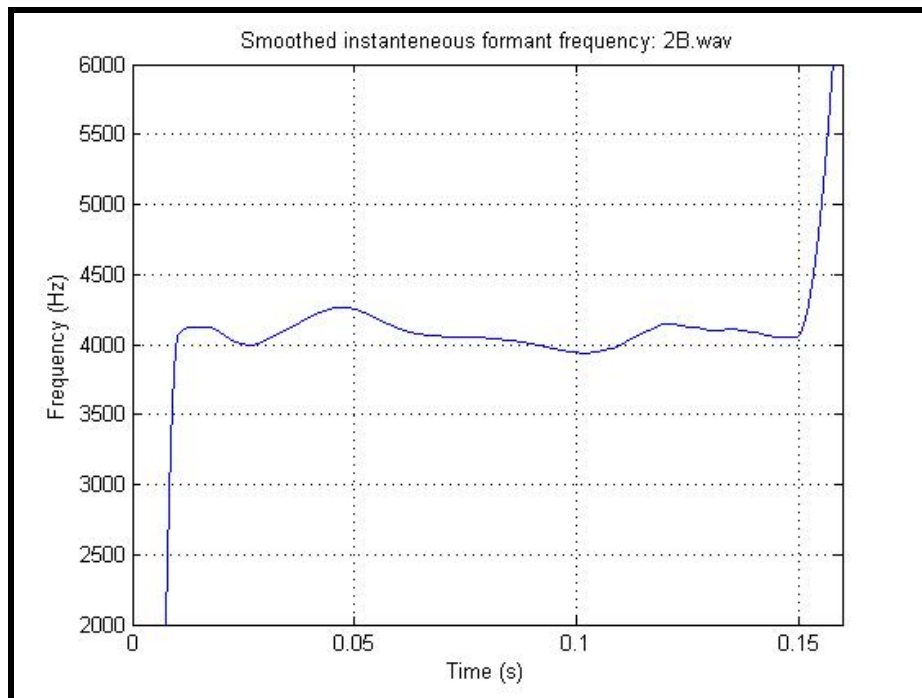
3.7 Εδώ φαίνεται η περιβάλλουσα του συγκεκριμένου formant ως προς το χρόνο.



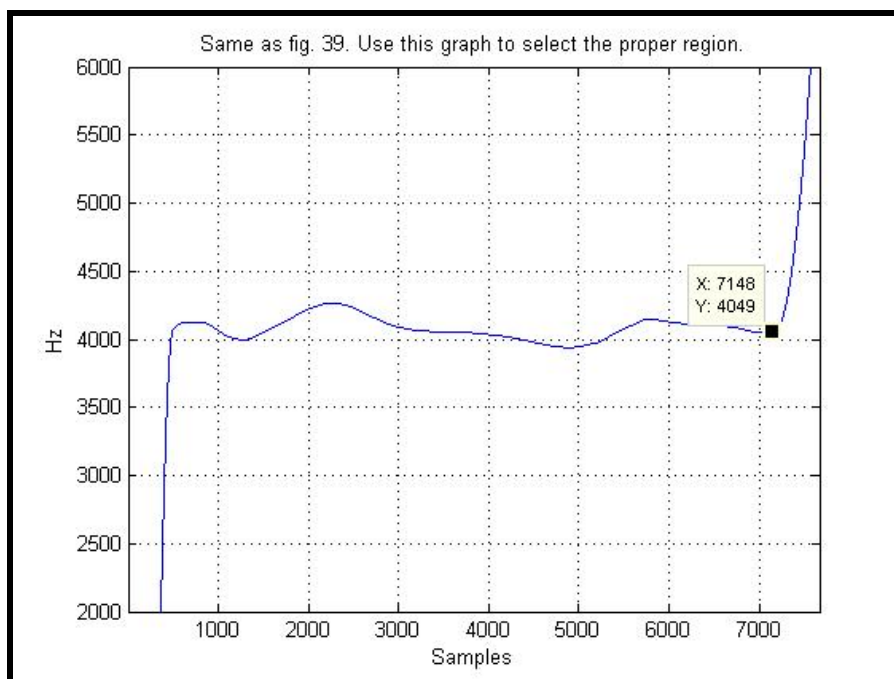
3.8 Εδώ φαίνεται η περιβάλλουσα του συγκεκριμένου formant ως προς το χρόνο, με επιπλέον φιλτράρισμα..



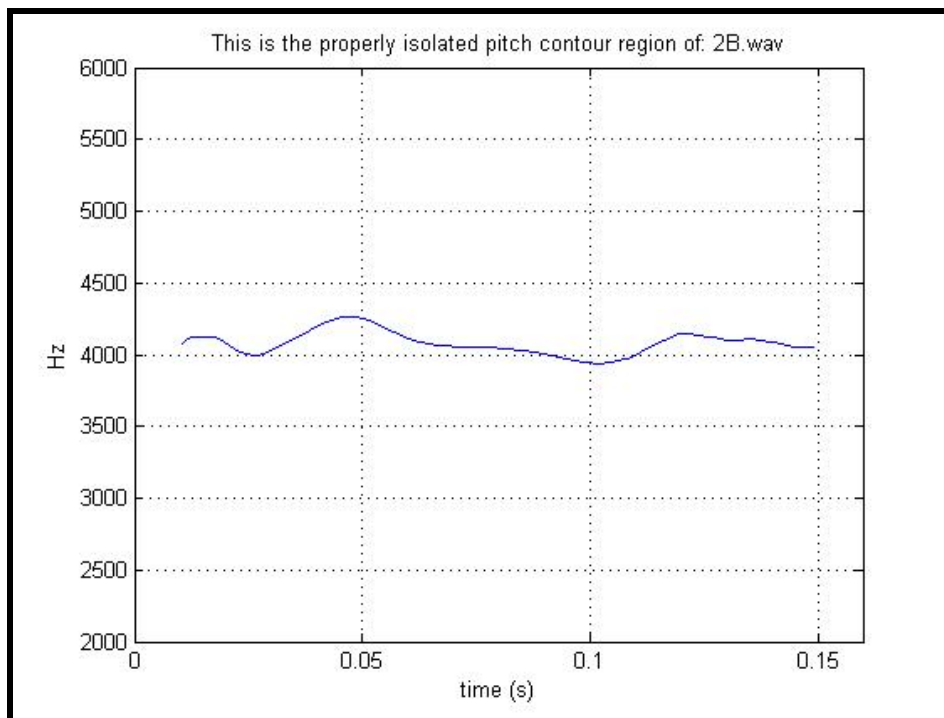
3.9 Η στιγμιαία συχνότητα του επιλεγμένου formant ως προς το χρόνο.



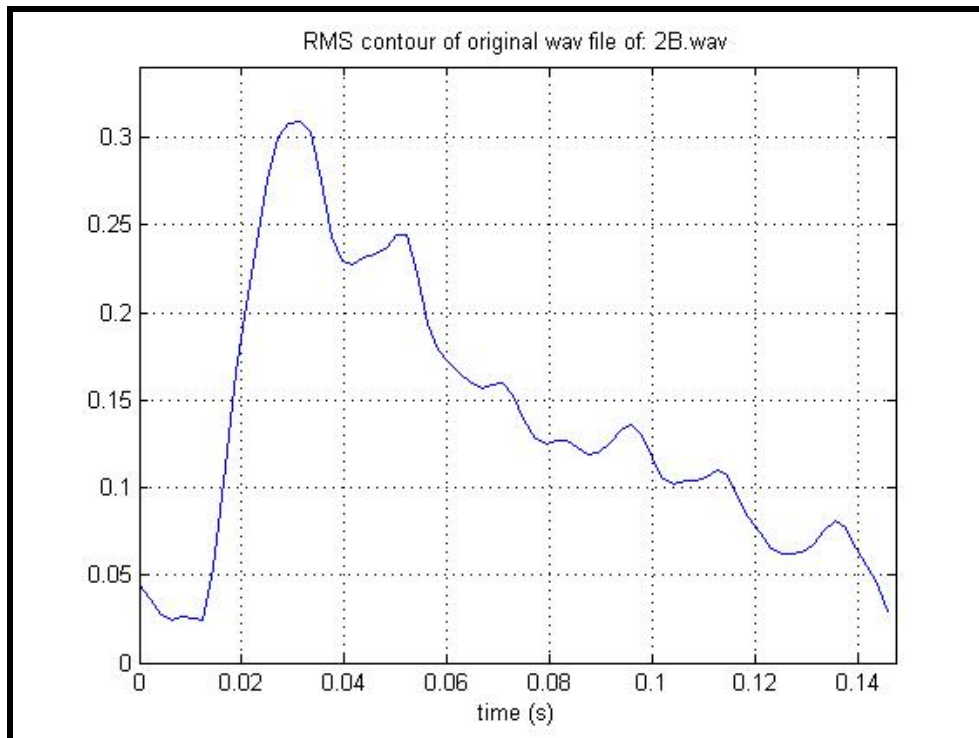
4 Επειδή πριν την αρχή και μετά το τέλος της κυματομορφής δε μπορεί να προσδιοριστεί η στιγμιαία συχνότητα (βλέπε καμπύλη 3.9), πρέπει να απομονωθεί το σωστό τμήμα της. Για να γίνει αυτό, σχεδιάζεται ξανά το fig. 3.9, μόνο που στον οριζόντιο άξονα το σχήμα έχει αριθμό δειγμάτων.



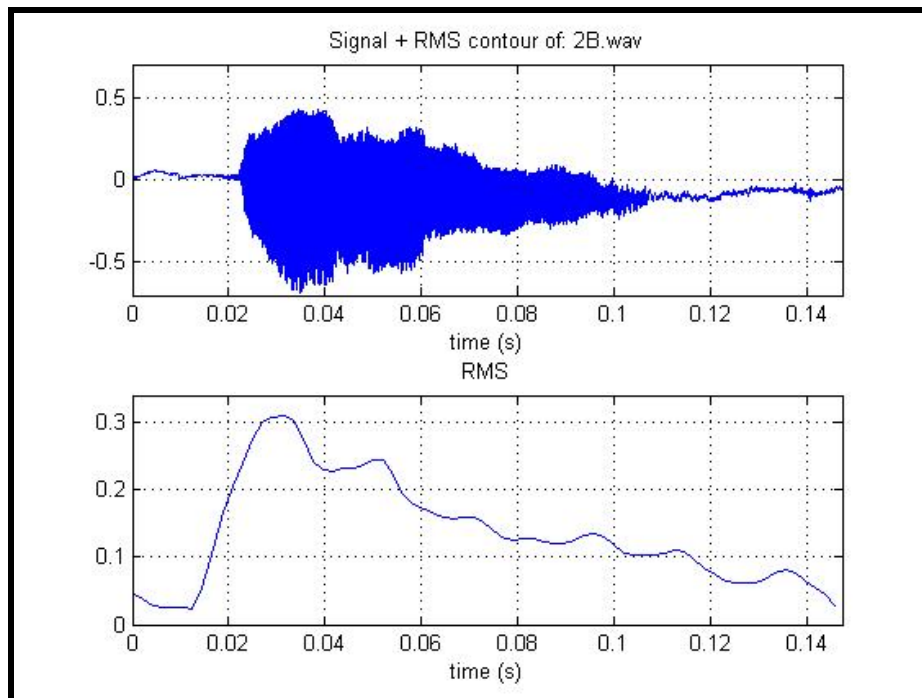
4.1 Το τμήμα της καμπύλης του τονικού ύψους που απομονώθηκε.



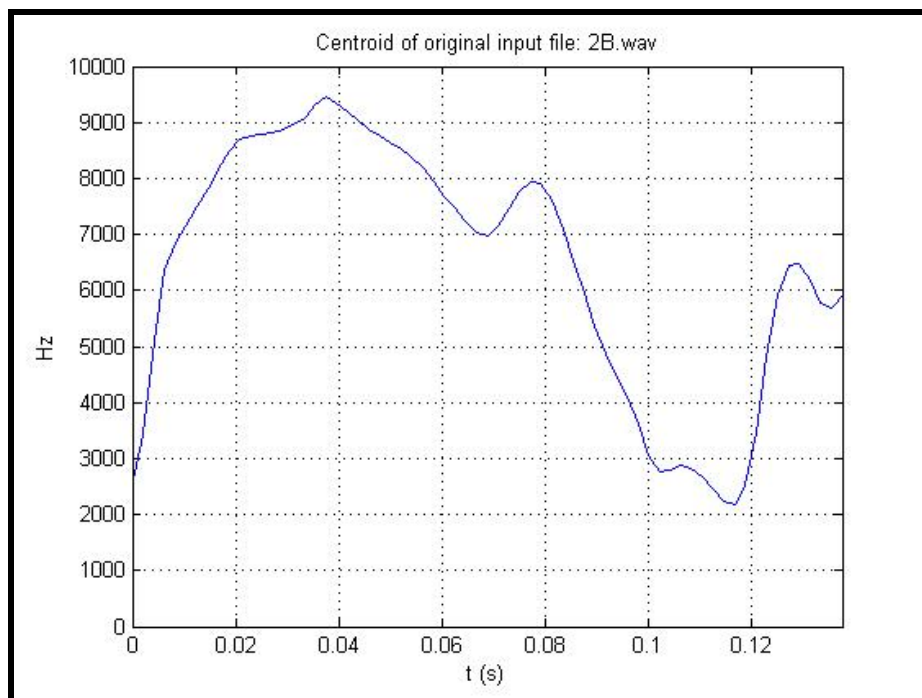
5 Η «ένταση» του σήματος σε dB (RMS contour). Οι αριθμητικές τιμές στον κάθετο άξονα είναι αυθαίρετες (απλά εξετάζεται η μορφή της καμπύλης).



5.1 Το fig. 1 μαζί με το 5.



6.1 Το «κέντρο βάρους» του φάσματος του αρχικού ήχου σαν συνάρτηση του χρόνου, δηλαδή το «κέντρο βάρους» του fig. 3 (σελ..26).



Όταν τελειώσει η ανωτέρω διαδικασία, για κάθε ηχητικό δείγμα, στο περιβάλλον του Matlab εμφανίζεται ένα report, για παράδειγμα όπως το παρακάτω:

Report:

This is the analysis of file: 2B.wav

The sampling rate is: 48000 Hz

The length in samples of the file is: 7671

Originally the waveform was bandpass filtered between 1500 and 12000 Hz

The formant selected was between 3675 and 4806 Hz.

The selected pitch contour region was defined between 505 and 7148 sample numbers.

The mean frequency found as the mean value of fig. 4.1, is: 4082 Hz

The highest value of frequency is: 4265 Hz

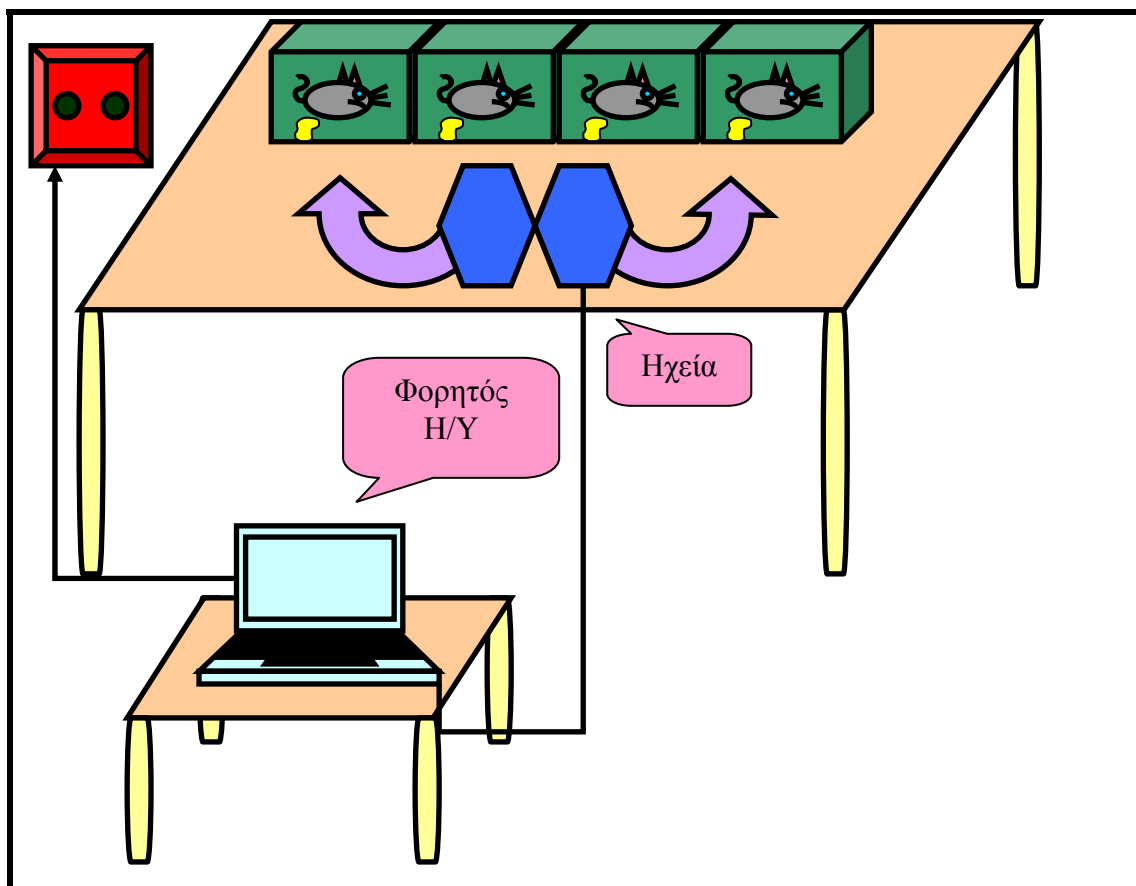
The lowest value of frequency is: 3940 Hz

The mean value of (fig. 6.1), the centroid of the filtered waveform is: 4142 Hz

2.6 ΗΧΟΒΟΛΗΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΠΟΝΤΙΚΙΩΝ

Για την ηχοβόληση πραγματοποιήθηκε επιλογή ηχητικών μηνυμάτων και δημιουργία νέων αρχείων μέσω του WaveLab. Η ηχοβόληση έγινε μέσω Η/Υ. Τα ηχεία του Η/Υ, ήταν απλά, κοινών προδιαγραφών που κυκλοφορούν στο εμπόριο (PowerMax 80/2, Stereo Sreaker System, TEAC.), τα οποία όμως δεν αλλοίωναν καθόλου τον ήχο. Έτσι κι αλλιώς η ένταση του ήχου δεν ήταν μεγάλη, για να μην υπάρχει υπόνοια ότι τα αποτελέσματα του τρόμου προκλήθηκαν από την μεγάλη ένταση και όχι από τον καθαυτό ήχο. .

Στο στάδιο την ηχοβόλησης, τα ηχεία είχαν τοποθετηθεί με τρόπο ώστε όλα τα υπό πειραματισμό ζώα να δέχονται ήχο ίδιας έντασης. Εκτός από την κατάλληλη τοποθέτηση, επαναλάβαμε την διαδικασία σε πολλές ομάδες ποντικών μεταβάλλοντας κάθε φορά την ένταση, για να βεβαιωθούμε ότι ενοχλούνται με το περιεχόμενο του ήχου και όχι με τη μεγάλη ένταση. (Εάν τα επηρέαζε η ένταση, τα ποντίκια που λάμβαναν τον ήχο σε μικρή ένταση θα όφειλαν να μην αντιδράσουν με τον ίδιο τρόπο που αντέδρασαν εκείνα που έλαβαν τον ήχο σε κανονική ένταση.) Στο Σχήμα 2, μπορεί κανείς να δει τη διάταξη της ηχοβόλησης.



Σχήμα 2

Διάταξη ηχοβολήσης πειραματικών ποντικών

2.7 ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΗ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε ένα ασυνεχές πήκτωμα ακρυλαμιδίου (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) το οποίο περιλαμβάνει το πήκτωμα πακεταρίσματος όπου γίνεται τοποθέτηση των πρωτεϊνικών μορίων και το πήκτωμα ανάλυσης όπου γίνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνικών μορίων. Από ένα στοκ διάλυμα που περιείχε 38.8% w/v ακρυλαμιδίου και 1.2% w/v bis-acrylamide (Boehringer Mannheim), σε διαλύτη $H_2O_{dist.}$ (40%T, 3%C), για το πήκτωμα ανάλυσης, χρησιμοποιήθηκαν 10ml στοκ διαλύματος, 7.5ml διαλύματος 1.5M Tris-HCl (pH=8.8), 0.3ml διαλύματος 10% w/v APS (Ammonium persulfate, Sigma (St.Louis, MO, USA), διαλύτης $H_2O_{dist.}$), 0.3ml διαλύματος 10% w/v SDS (AppliChem), 0.012ml διαλύματος TEMED (Sigma) και 11.9ml $H_2O_{dist.}$. Ο όγκος του πηκτώματος που προέκυψε ήταν 30ml και ήταν 10%T και 3%C. Για την προετοιμασία του πηκτώματος πακεταρίσματος, χρησιμοποιήθηκαν 1.7ml στοκ διαλύματος, 1.25ml διαλύματος 0.5M Tris-HCl (pH=6.8), 0.1ml διαλύματος 10% w/v APS, 0.1ml διαλύματος 10% w/v SDS, 0.01ml διαλύματος TEMED και 6.8ml $H_2O_{dist.}$. Ο όγκος του πηκτώματος που προέκυψε ήταν 10ml. Το

πήκτωμα ανάλυσης πακεταριζόταν στην γυάλινη φόρμα της συσκευής κάθετης ηλεκτροφόρησης (Gibco BRL, Vertical Gel Electrophoresis Model V15.15, Grand Island, NY) τουλάχιστο 16 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου πριν από την προσθήκη του πηκτώματος πακεταρίσματος πάνω στο μέτωπο του πηκτώματος ανάλυσης. Τα δείγματα ούρων (2 ή 5 μl) αραιώθηκαν με 47 ή 44 μl διαλύματος ηλεκτροφόρησης (0.1% w/v SDS, 0.003% w/v EDTA (Sigma), 0.01% w/v Bromophenol Blue (AppliChem), 2.5% v/v ρυθμιστικό διάλυμα πηκτώματος ανάλυσης (1.5M Tris-HCl pH=8.8) και 25% v/v διάλυμα 85% v/v γλυκερόλης) και 1μl β-μερκαπτοεθανόλης (AppliChem), θερμάνθηκαν στους 95°C για 5 λεπτά και στην συνέχεια φορτώθηκαν στο πήκτωμα. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε με 120V και 30mA κατά την διάρκεια που το μέτωπο βρισκόταν στο πήκτωμα πακεταρίσματος και με 180V και 40mA, όταν το μέτωπο εισερχόταν στο πήκτωμα ανάλυσης, σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης που περιείχε 0.05M Tris-HCl με pH=8.2, 0.196M γλυκίνη και 0.1% w/v SDS. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε διάλυμα 0.01% w/v Coomassie Blue R-250 (Sigma), 10% v/v αιθανόλη (Merck, pure 99.5%) και 50% v/v CH₃COOH και ανακινήθηκε για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την φωτογράφιση των ζωνώσεων, το πήκτωμα αποχρωματίστηκε με διάλυμα 10% v/v μεθανόλη (AppliChem), 40% v/v CH₃COOH και 50% v/v H₂O_{dist.} για περίπου 14 ώρες με ήπια ανακίνηση. Κατόπιν το πήκτωμα πλύθηκε καλά με H₂O_{dist} και ακολούθησε χρώση με νιτρικό άργυρο (AgNO₃). Έτσι το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε 100ml διαλύματος 0.1% w/v K₂Cr₂O₇ (AppliChem) και 0.04% v/v HNO₃ (Ultragrade 65%, AppliChem) και ανακινήθηκε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (Laemmli, 1970; Heukeshoven & Dernick, 1988). Το πήκτωμα πλύθηκε 5 φορές (5-10 λεπτά η κάθε πλύση) με 200ml H₂O_{dist.}, μέχρι να απομακρυνθεί εντελώς το κίτρινο χρώμα που είχε αποκτήσει από το διάλυμα K₂Cr₂O₇. Μετά την ολοκλήρωση των πλύσεων, προστέθηκε στο πήκτωμα διάλυμα 0.2% w/v AgNO₃ (Biochemica, AppliChem) σε H₂O_{dist.} Το πήκτωμα ανακινήθηκε στο σκοτάδι για 30 λεπτά και ακολούθησαν 4 πλύσεις με 200ml H₂O_{dist} και διάρκεια 10 λεπτά η κάθε μια, με συνεχή ανακίνηση. Οι ζωνώσεις των πρωτεϊνών εμφανίστηκαν με την αναγωγή των ιόντων αργύρου σε μεταλλικό άργυρο με διάλυμα εμφάνισης, 0.07% v/v φορμαλδεΐδης (AppliChem) σε αλκαλικό περιβάλλον 2.9% w/v Na₂CO₃ (Merck, Anhydrous extra pure). Η αντίδραση τερματίστηκε με την προσθήκη διαλύματος 10% v/v CH₃COOH (διαλύτης H₂O_{dist.}). Για την ανάλυση των ζωνώσεων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Gel Analyser Pro 3.1 με ένα δείκτη αναφοράς μοριακών βαρών που κυμαινόταν από 20 έως 212 kD (Protein Marker Broad Range, P7702S, New England Biolabs).

2.8 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΦΟΦΗΤΙΚΗ

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ (ELISA)

Πηγαδάκια σε πλάκες 96-θέσεων γεμίστηκαν με 0.1ml διαλύματος ούρων (αραίωση 1/50) και διαλύματος επικάλυψης (coating buffer, 0.05M NaHCO₃, 0.05M Na₂CO₃ σε H₂O_{dist}, pH=9.6) σε αναλογία 1:1 και ακολούθησε επώαση στους 4°C για 18 ώρες. Τα πηγαδάκια πλύθηκαν 3 φορές με 0.2ml διαλύματος 0.05% v/v Tween 20 σε PBS (1x, pH=7.4) και στην συνέχεια οι πιθανές θέσεις πρόσδεσης του αντισώματος παρεμποδίστηκαν με προσθήκη 0.2ml 2% w/v BSA (Bovine Serum Albumin, AppliChem) σε PBS (1x, pH=7.4). Μετά από επώαση 90 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου, τα πηγαδάκια πλύθηκαν 3 φορές με 0.2ml διαλύματος 0.05% v/v Tween 20 σε PBS (1x, pH=7.4). Ως πρώτο αντίσωμα, χρησιμοποιήσαμε το αντί-H-2K^d σε συγκέντρωση 0.1 μg/ml σε διάλυμα 0.1% w/v BSA σε PBS (1x, pH=7.4) και στην συνέχεια 0.1ml από το διάλυμα προστέθηκε σε κάθε πηγαδάκι. Ακολούθησε μια επώαση 90 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου και στην συνέχεια κάθε πηγαδάκι πλύθηκε 3 φορές με 0.2ml διαλύματος 0.05% v/v Tween 20 σε PBS (1x, pH=7.4). Για την ανίχνευση του πρώτου αντισώματος χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα αντί-IgG (Fab ειδικότητα) το οποίο προερχόταν από αίγα και παρουσίαζε ειδικότητα κατά των ανοσοσφαιρινών IgG του ποντικού και ήταν προσδεμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση που απομονώνεται από το *Armoracia rusticana* (Horse radish peroxidase, HRP). Το δεύτερο αντίσωμα αραιώθηκε 1/10000 (1,6μg/ml) σε διάλυμα 0.1% w/v BSA σε PBS (1x, pH=7.4) και 0.1ml από αυτό το διάλυμα προστέθηκε σε κάθε πηγαδάκι. Η πλάκα επώαστηκε με το διάλυμα που περιείχε το δεύτερο αντίσωμα για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Ακολούθησαν 5 πλύσεις με 0.2ml διαλύματος 0.05% v/v Tween 20 σε PBS (1x, pH=7.4). Η ποιοτική ποσοτικοποίηση της πρόσδεσης του αντισώματος έγινε με την προσθήκη 0.1ml (για κάθε πηγαδάκι) διαλύματος εμφάνισης που περιείχε 50μl υποστρώματος υπεροξειδάσης (Peroxidase substrate, Pierce) και 50μl H₂O₂ (Pierce). Η αντίδραση τερματίστηκε με την προσθήκη 50μl διαλύματος 1M H₂SO₄, το οποίο αναστέλλει την δράση του ενζύμου. Η μέτρηση της απορρόφησης έγινε στα 450nm.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΗΧΗΤΙΚΑ ΜΗΝΥΜΑΤΑ ΠΟΥ ΕΚΠΕΜΠΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΠΟΝΤΙΚΙΑ

A. Καταγραφή και ανάλυση ηχητικών μηνυμάτων στο ακουστό φάσμα

Από τη παρούσα μελέτη, φάνηκε ότι και στις τρεις καταστάσεις που προκαλέσαμε (πόνου/τρόμου, οργής/μίσους και ανησυχίας), τα ποντίκια εκπέμπουν και λαμβάνουν ήχους στο ακουστό φάσμα.

Στην παρούσα μελέτη καταγράφηκαν ηχητικά μηνύματα που προήλθαν από:

- 1) Εξωγενή χειρισμό των ζώων, προκαλώντας τους πόνο και τρόμο.
- 2) Διαμάχη μεταξύ αρσενικών για την διεκδίκηση θηλυκού ζώου.
- 3) Νεογνά που αναζητούσαν τη μητέρα τους.

A.1. Εξωγενής χειρισμός πειραματικών ποντικών (πόνος/τρόμος)

Ο εξωγενής χειρισμός περιλάμβανε την άσκηση μυϊκής πίεσης στα άκρα των ζώων, δύο διαφορετικών αιμομικτικών σειρών BALB/c και C3H/HeN με στόχο την πρόκληση του συναισθήματος τρόμου/ πόνου (βλέπε Υλικά και Μέθοδοι).

Η μελέτη περιλάμβανε περίπου **100** θηλυκά και αρσενικά ζώα διαφόρων ηλικιών, εκ των οποίων μόνο το **60%** αντέδρασε με εκπομπή μηνυμάτων τρόμου/ πόνου (Σχήμα 3). Κατά την ανάλυση των φασμάτων παρατηρήθηκε ότι στα αρσενικά ζώα τα formants είχαν δύο διαφορετικά ίχνη ως προς το χρόνο.

A) Τα αναφερόμενα ως «**καμπυλωτά**» με σχήμα καμπάνας, συμμετρικό ή μη (χαρακτηριστικό παράδειγμα φαίνεται στο φασματογράφημα 3E του Σχήματος 3).

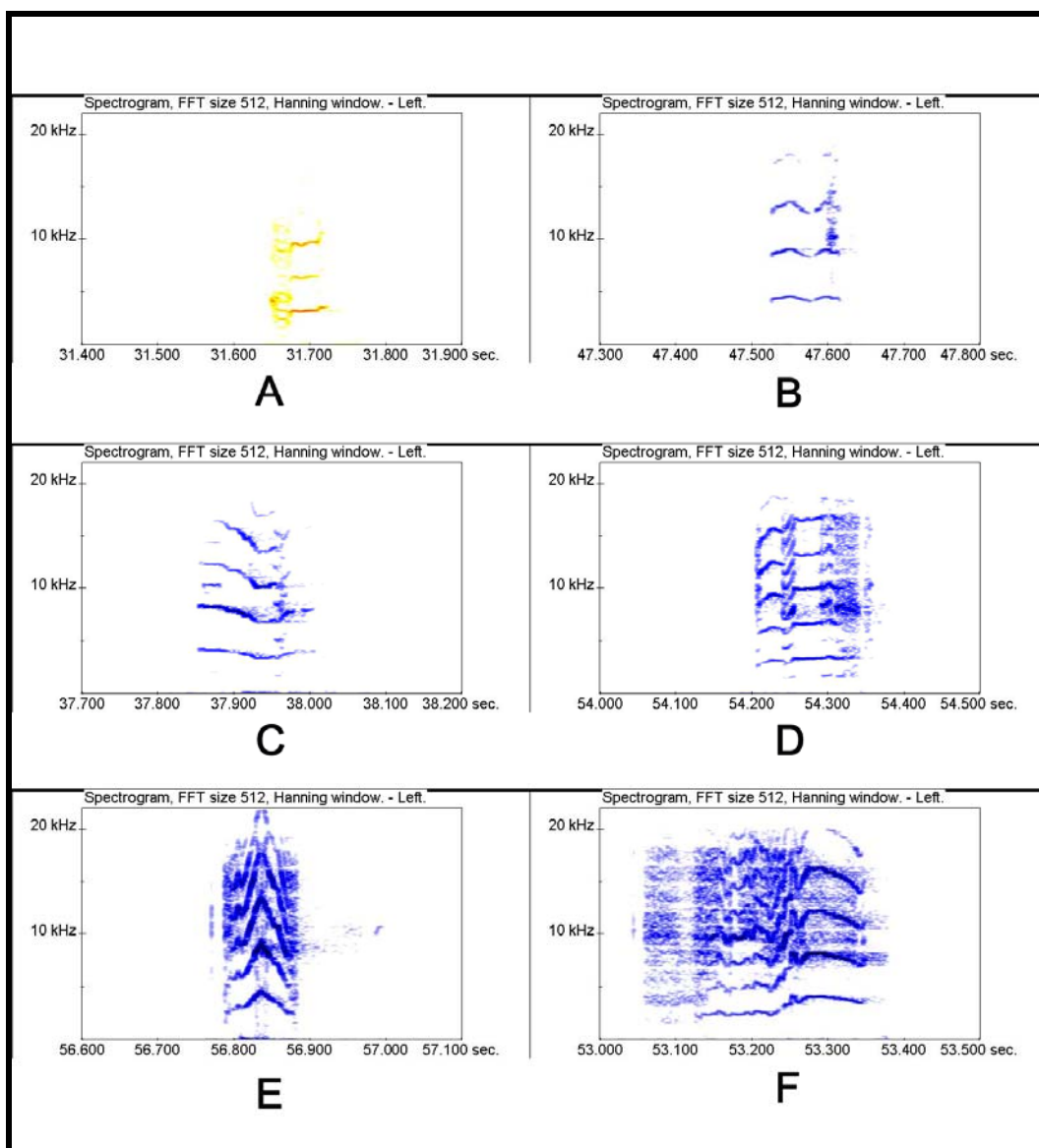
B) Τα αναφερόμενα ως «**μη καμπυλωτά**» (χαρακτηριστικά παραδείγματα φαίνονται στα φασματογραφήματα A, B, D του Σχήματος 3).

Ανεξάρτητα από το είδος, ο **αριθμός των formants**, τόσο στα θηλυκά όσο και στα αρσενικά ζώα υπολογίστηκε να είναι 4 ± 1 (μέγιστος αριθμός αρμονικών 8, ελάχιστος 2, με αριθμό δειγμάτων $n=108$).

Το **εύρος συχνοτήτων** που κάλυπταν, στα μεν αρσενικά ζώα κυμαινόταν από (2-22) kHz και στα θηλυκά από (2.5-18) kHz.

Σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν, το **πρώτο formant** εμφανίζεται στην περιοχή 1-6 kHz. Αξίζει να σημειωθεί ότι στο 20% των περιπτώσεων, το **βασικό formant** ήταν το δεύτερο και όχι το πρώτο. Σε αυτές τις περιπτώσεις το δεύτερο formant εμφανίζεται στην περιοχή 5-10 kHz.

Η **διάρκεια των ηχητικών μηνυμάτων** κυμαινόταν και στα δύο φύλα από (100-200) msec. Σχετικά με την **ένταση**, παρατηρήθηκε ότι οι καταγεγραμμένες στάθμες του σήματος από τα θηλυκά ποντίκια ήταν σε γενικές γραμμές 8-10 dB χαμηλότερες σε σχέση με εκείνες των αρσενικών. Η ανάλυση των φασμάτων έδειξε ότι, **το είδος και η ηλικία των ζώων** δεν φέρει διαφορετικά αποτελέσματα ως προς τα ίχνη, τις εντάσεις, τον αριθμό των formants κ.α.



Σχήμα 3

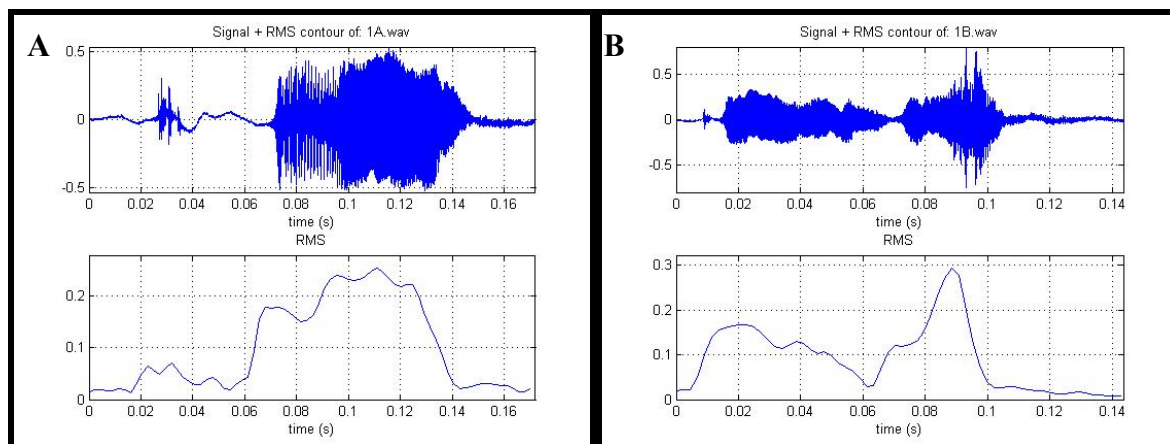
Φασματογραφήματα ηχητικών μηνυμάτων από θηλυκά (A, B, C) και αρσενικά (D, E, F) πειραματικά ποντίκια κατά τη διάρκεια συναισθήματος τρόμου/πόνου.

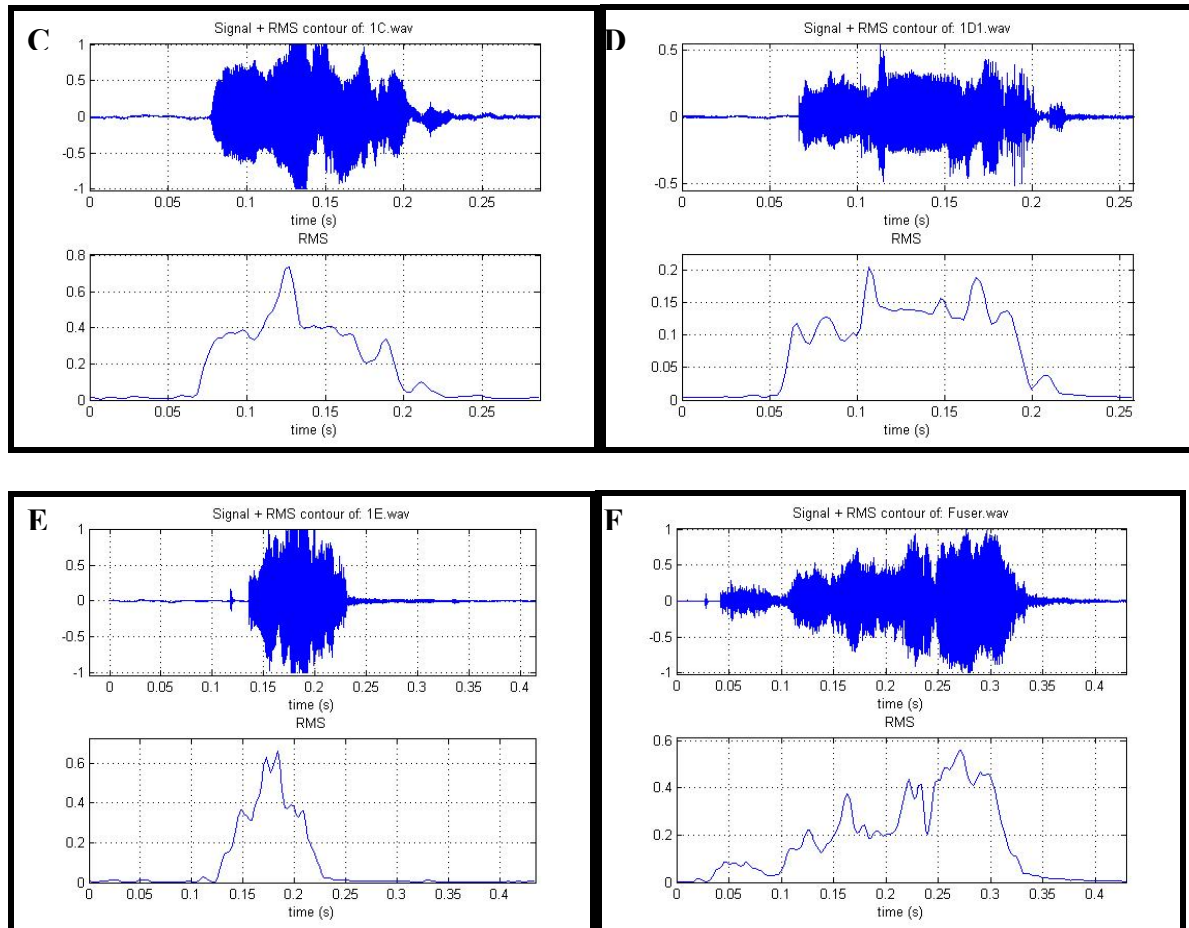
A.1.2. Ανάλυση ηχητικών σημάτων

Τα φάσματα του Σχήματος 3 προέκυψαν από το λογισμικό που περιγράφεται στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι». Ενδεικτικά το σήμα και το RMS contour δείχνονται στο Σχήμα 4. Η λεπτομερής ανάλυση φαίνεται στο παράρτημα. Συνοπτικά όμως τα αποτελέσματα που προκύπτουν από το gerot του αλγόριθμου παρουσιάζονται στον Πίνακα 1:

Πίνακας 1: Συνοπτική καταγραφή ανάλυσης ηχητικών μηνυμάτων από τα θηλυκά (A, B,C) και αρσενικά (D, E, F) πειραματικά ποντίκια του Σχήματος 3 κατά τη διάρκεια συναισθήματος τρόμου/πόνου.

	Θηλυκά			Αρσενικά		
	A	B	C	D	E	F
Κεντρική συχνότητα (Hz)	3204	4351	3803	3345	9077	3917
Μέγιστη Συχνότητα (Hz)	3428	4512	4169	3572	10031	4878
Ελάχιστη συχνότητα (Hz)	3074	4028	3392	2952	8473	3481
Επιλεγμένο formant (Hz)	2992- 3297	3850- 4617	3257- 4458	2722- 3623	7804- 9669	3130- 4302
Επιλεγμένο pitch contour (αριθμός δειγμάτων)	449- 7736	486- 6446	515- 12690	432- 11620	717- 19520	427- 19170





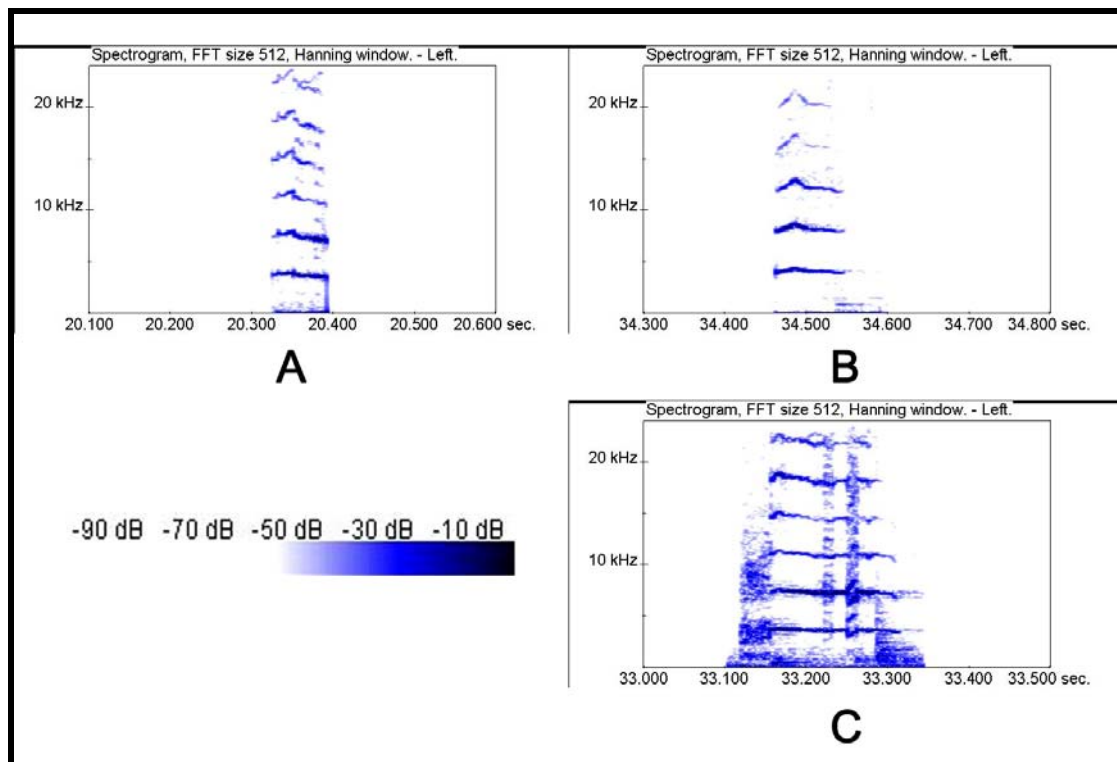
Σχήμα 4
 Διαγράμματα ηχητικών μηνυμάτων από τα θηλυκά (A, B, C) και αρσενικά (D, E, F) πειραματικά ποντίκια του Σχήματος 3 κατά τη διάρκεια συναισθήματος τρόμου/πόνου.

Η μέση συχνότητα των ηχητικών μηνυμάτων που εκπέμπονται από τα θηλυκά και αρσενικά ποντίκια και παρουσιάζουν «μη καμπυλωτά» ίχνη δεν φαίνεται να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Αντίθετα οι συχνότητες που παρατηρούνται στα «καμπυλωτά» ίχνη είναι 3-φορές υψηλότερες από τις μη καμπυλωτές στα αρσενικά ποντίκια.

A.2 Ενδογενής χειρισμός: Διαμάχη μεταξύ αρσενικών ζώων

Όπως περιγράφεται και στις μεθόδους, ένα θηλυκό ζώο σε οίστρο τοποθετήθηκε σε κλουβί με ένα αρσενικό και όταν το αρσενικό ποντίκι άρχισε να προσεγγίζει το θηλυκό για την αναπαραγωγική διαδικασία (περίπου 10 min.), ένα δεύτερο αρσενικό ζώο τοποθετήθηκε στο κλουβί. Η διαδικασία επαναλήφθηκε 6 φορές. Η διαμάχη μεταξύ των αρσενικών καταγράφηκε και απεικονίζεται στο Σχήμα 5. Σε αυτή τη περίπτωση ο αριθμός των formants ανά ηχητικό μήνυμα υπολογίστηκε 5 ± 1 (μέγιστος αριθμός formants 6, ελάχιστος αριθμός formants 4 με

αριθμό κραυγών $n=71$), ενώ το **εύρος συχνοτήτων** τους κυμαινόταν από (2-25)kHz. Πρέπει να σημειωθεί ότι σε αυτή την πειραματική διαδικασία, καταγράφηκαν ανά πείραμα τα ηχητικά μηνύματα που εκπέμπονται από τα δύο αρσενικά ζώα, ενώ το θηλυκό παρέμενε σιωπηλό καθ' όλη τη διάρκεια της διαμάχης.

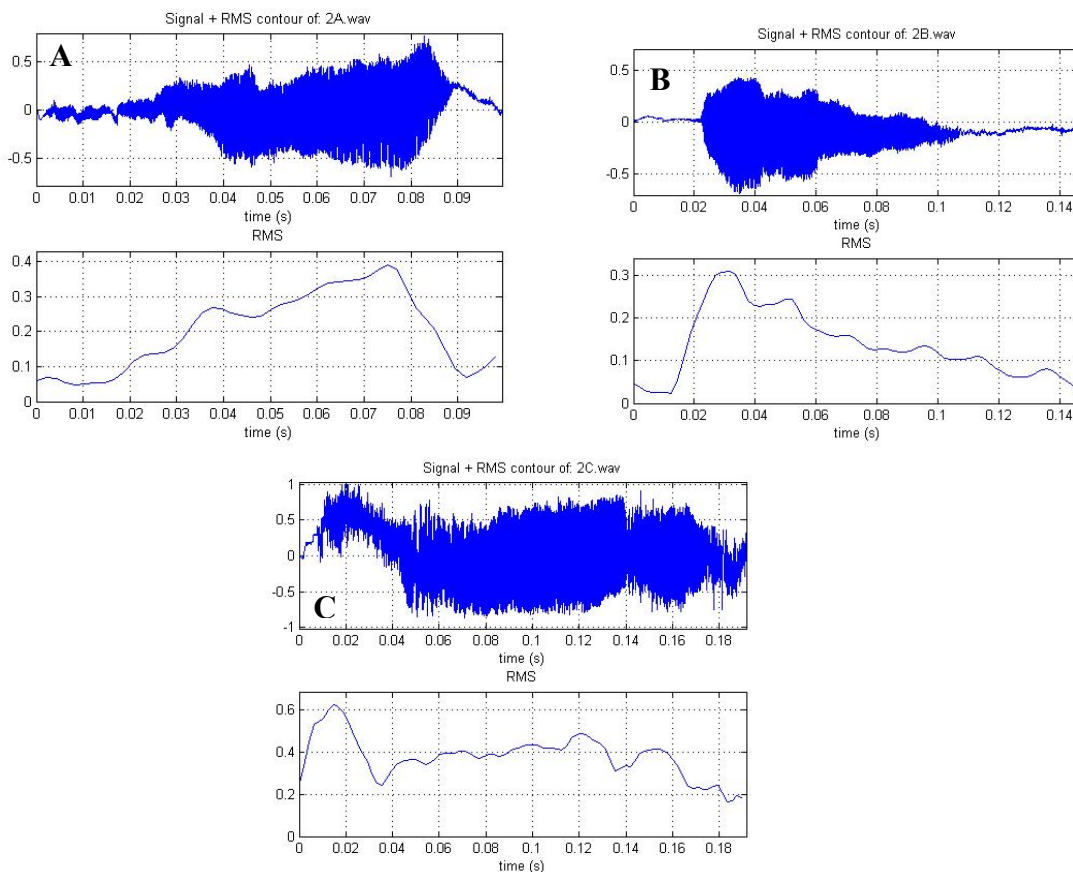


Σχήμα 5

Τυπικά φασματογραφήματα ηχητικών μηνυμάτων από αρσενικά πειραματικά ποντίκια κατά την διάρκεια συναισθήματος οργής/μίσους.

A.2.1 Ανάλυση ηχητικών σημάτων

Τα σήματα-και σε αυτή την περίπτωση-αναλύθηκαν με το λογισμικό που περιγράφεται στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι». Ενδεικτικά το σήμα και το RMS contour δείχνονται στο Σχήμα 6. Η λεπτομερής ανάλυση φαίνεται στο παράρτημα Ι. Συνοπτικά όμως τα αποτελέσματα που προκύπτουν από το report του αλγόριθμου παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα 2:



Σχήμα 6

Διαγράμματα ηχητικών μηνυμάτων από αρσενικά πειραματικά ποντίκια του Σχήματος 5 κατά τη διάρκεια συναισθήματος οργής/μίσους

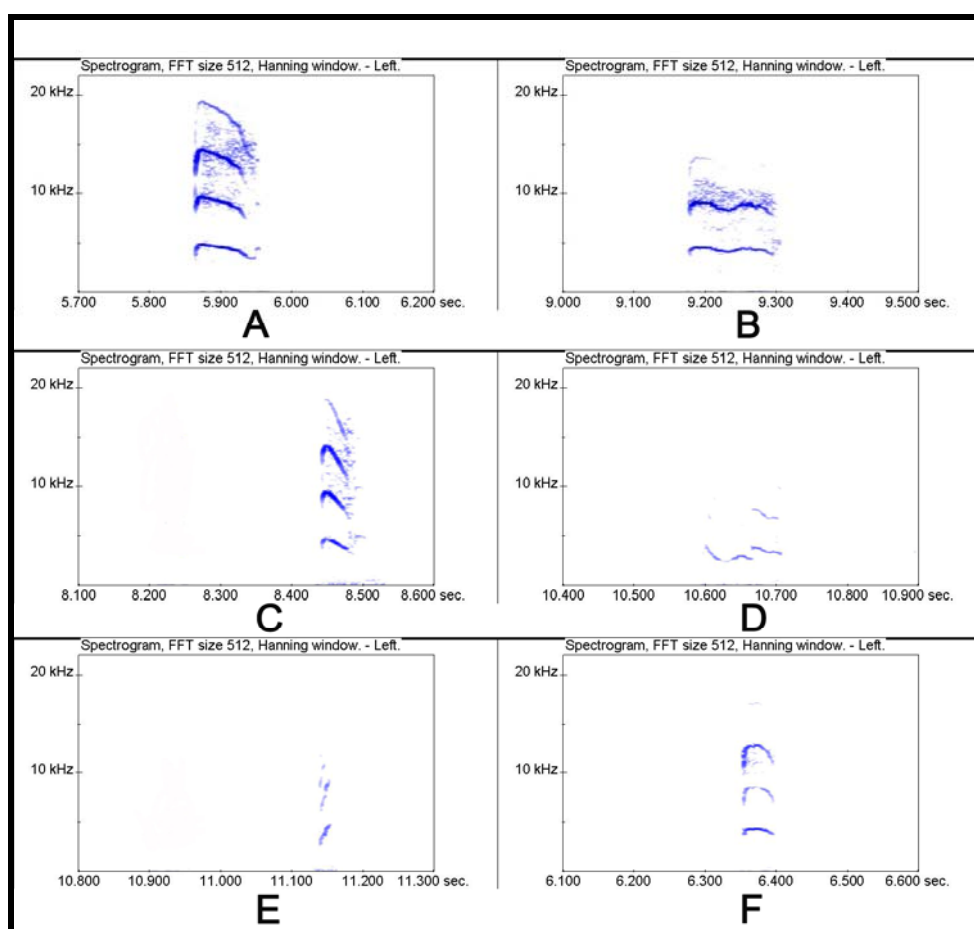
Πίνακας 2: Συνοπτική καταγραφή ανάλυσης ηχητικών μηνυμάτων από τα αρσενικά πειραματικά ποντίκια του Σχήματος 5 κατά τη διάρκεια συναισθήματος οργής/μίσους.

	Οργή/μίσος		
	A	B	C
Κεντρική Συχνότητα (Hz)	3695	4082	3608
Μέγιστη Συχνότητα (Hz)	3867	4265	3744
Ελάχιστη Συχνότητα (Hz)	3550	3940	3327
Επιλεγμένο formant (Hz)	3076- 4317	3675- 4806	3215- 4108
Επιλεγμένο pitch contour (αριθμός δειγμάτων)	468- 4929	505- 7148	422- 9246

Από τους Πίνακες 1 και 2 παρατηρείται, ότι τόσο κατά τη διάρκεια της κατάστασης οργής/μίσους, όσο και κατά τη διάρκεια πόνου/τρόμου, οι συχνότητες που εκπέμπονται από τα ζώα δεν παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές. Για τον εντοπισμό διαφορών ως προς την κατάσταση και το φύλο, μπορεί κανείς να μελετήσει το παράρτημα II.

A.3 Ενδογενής χειρισμός: Νεογνά προς αναζήτηση της μητέρας τους

Λίγα λεπτά μετά την απομάκρυνση της μητέρας από τη φωλιά, τα νεογνά εξέφρασαν μία ανησυχία, η οποία καταγράφηκε όπως αναφέρεται στις Μεθόδους (Σχήμα 7). Τα νεογνά εμφάνισαν σημαντικές διαφορές στα ηχητικά μηνύματα που εξέπεμψαν σε σύγκριση με τη μητέρα τους. Ο **αριθμός των formants** στα νεογνά υπολογίστηκε 3 ± 1 , ενώ στη μητέρα τους 4 ± 1 . Η **ένταση των μηνυμάτων** από το νεογνά ήταν περίπου 10dB πιο χαμηλά σε σχέση με εκείνη της μητέρας τους. Το **εύρος των συχνοτήτων** υπολογίστηκε στα (4-15) kHz, τόσο στα νεογνά, όσο και στη μητέρα τους. Ο αριθμός δειγμάτων ήταν $n=32$.

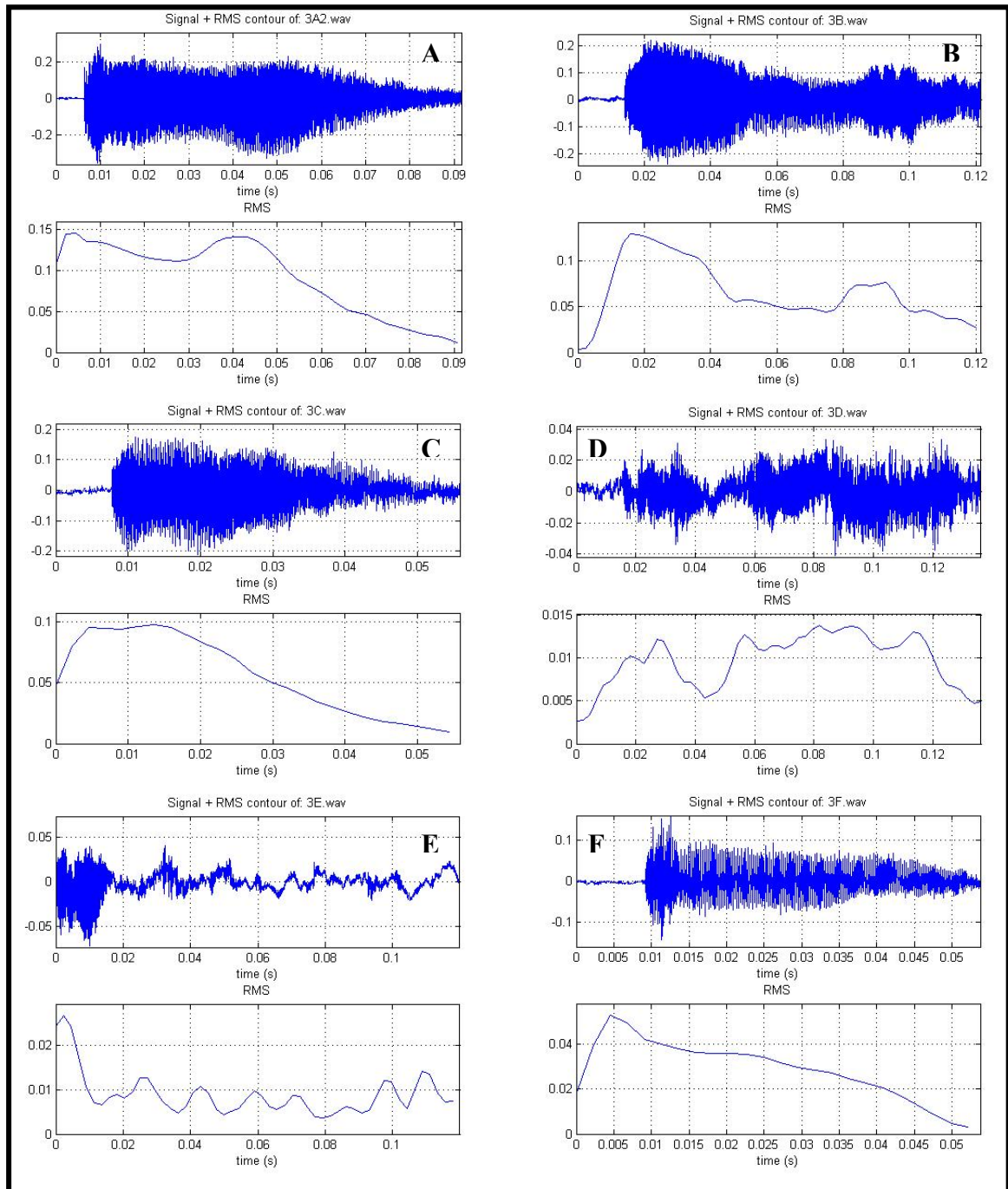


Σχήμα 7

Φασματογραφήματα ηχητικών μηνυμάτων από θηλυκά (A, B, C) και νεογνά (D, E, F) κατά την απομάκρυνση της μητέρας από την φωλιά.

A.3.1. Ανάλυση ηχητικών σημάτων

Τα φάσματα του Σχήματος 7 αναλύθηκαν με τον αλγόριθμο που περιγράφεται στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι». Ενδεικτικά το σήμα και το RMS contour δείχνονται στο Σχήμα 8. Η λεπτομερής ανάλυση φαίνεται στο παράρτημα. Συνοπτικά όμως τα αποτελέσματα που προκύπτουν από το gerot του αλγόριθμου παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα 3:



Σχήμα 8
Ανάλυση ηχητικών μηνυμάτων από θηλυκά (A, B, C) και νεογνά (D, E, F) κατά την απομάκρυνση της μητέρας από την φωλιά.

Πίνακας 3: Συνοπτική καταγραφή ανάλυσης ηχητικών μηνυμάτων από θηλυκά (A, B, C) και νεογνά (D, E, F) κατά την απομάκρυνση της μητέρας από την φωλιά.

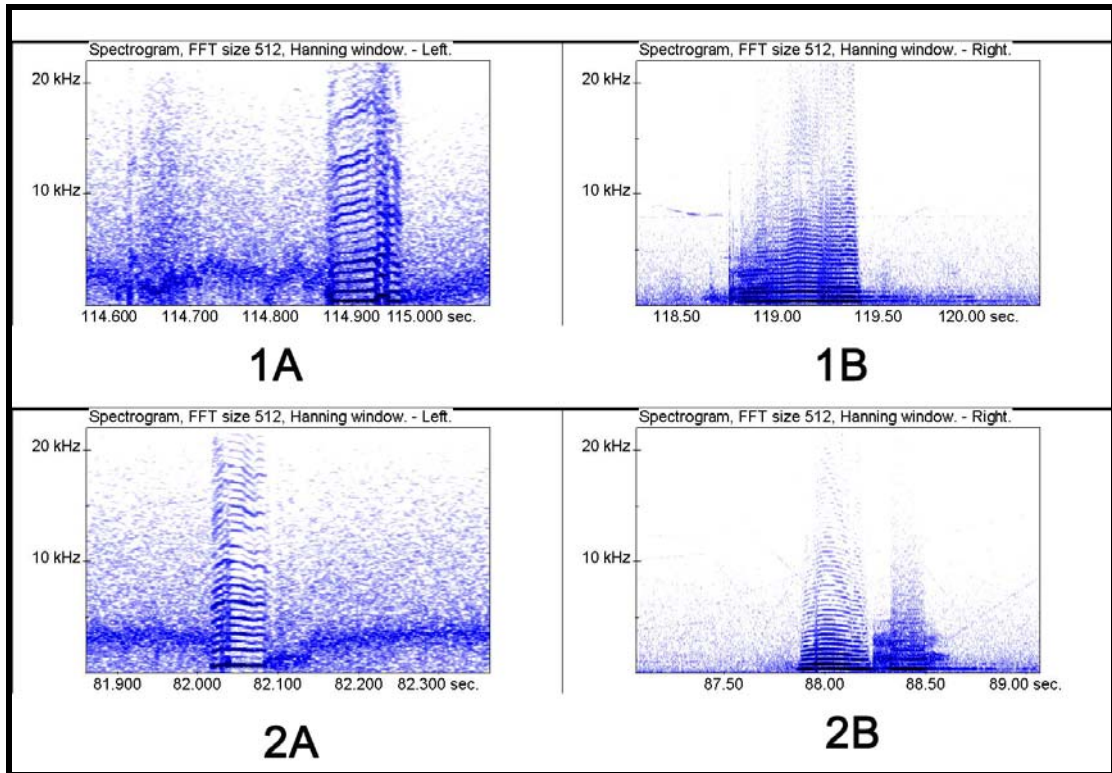
	Θηλυκά			Νεογνά		
	A	B	C	D	E	F
Κεντρική Συχνότητα (Hz)	4366	4345	4412	3187	4107	4137
Μέγιστη Συχνότητα (Hz)	4799	4545	4946	3724	4417	4279
Ελάχιστη Συχνότητα (Hz)	3556	3996	4001	2549	3804	3928
Επιλεγμένο formant (Hz)	3368- 5472	3583- 4824	3664- 5485	2444- 4087	3599- 5038	3632- 4497
Επιλεγμένο pitch contour (αριθμός δειγμάτων)	469- 3949	492- 5538	451- 2640	466- 6133	492- 5396	427- 2597

Αν και αναμενόμενο, βλέπουμε ότι η συχνότητα των ηχητικών μηνυμάτων που παράγονται από τις μητέρες είναι υψηλότερη από αυτή των νεογνών.

Παρόμοια αύξηση παρατηρείται και μεταξύ των συχνοτήτων των ηχητικών μηνυμάτων που παράγονται από τις μητέρες σε σχέση με τις συχνότητες των ηχητικών μηνυμάτων που παράγονται από τα θηλυκά κατά την διάρκεια του συναισθήματος τρόμου/φόβου.

B. Καταγραφή και ανάλυση ηχητικών μηνυμάτων στο υπερηχητικό φάσμα

Η εκπομπή σημάτων στο υπερηχητικό φάσμα χρησιμοποιείται από τα ποντίκια για τη μεταξύ τους επικοινωνία συνήθως σε κατάσταση ηρεμίας όταν δε θέλουν να γίνουν αντιληπτά από τον θηρευτή. Στην παρούσα μελέτη έγινε καταγραφή των υπερηχητικών μηνυμάτων τόσο στην κατάσταση του εξωγενούς χειρισμού τρόμου/πόνου, όσο και του ενδογενούς χειρισμού οργής/μίσους μεταξύ αρσενικών. Στην περίπτωση του εξωγενούς χειρισμού τρόμου/πόνου καταγράφηκαν 11 ± 5 formants (αριθμός κραυγών, $n=56$) σε ένα εύρος συχνοτήτων (10-250)kHz. Η συχνότητα, γύρω από την οποία κυμαίνονταν τα περισσότερα ζώα, ήταν εκείνη στα 150kHz. Στον ενδογενή πειραματισμό διαμάχης αρσενικών καταγράφηκαν 12 ± 6 formants (αριθμός κραυγών, $n=45$) σε εύρος συχνοτήτων από (10-150)kHz. Χαρακτηριστικό παράδειγμα φασματογραφήματος, του χειρισμού διαμάχης αρσενικών δείχνεται στο Σχήμα 9. Πρέπει να θυμίσουμε ότι, για να καταγραφεί ο υπέρηχος, υποδεκαπλασιάζεται η ταχύτητα αναπαραγωγής του αρχείου, με αποτέλεσμα να υπάρχει χρονοκαθυστέρηση της τάξεως των 4-10 sec.

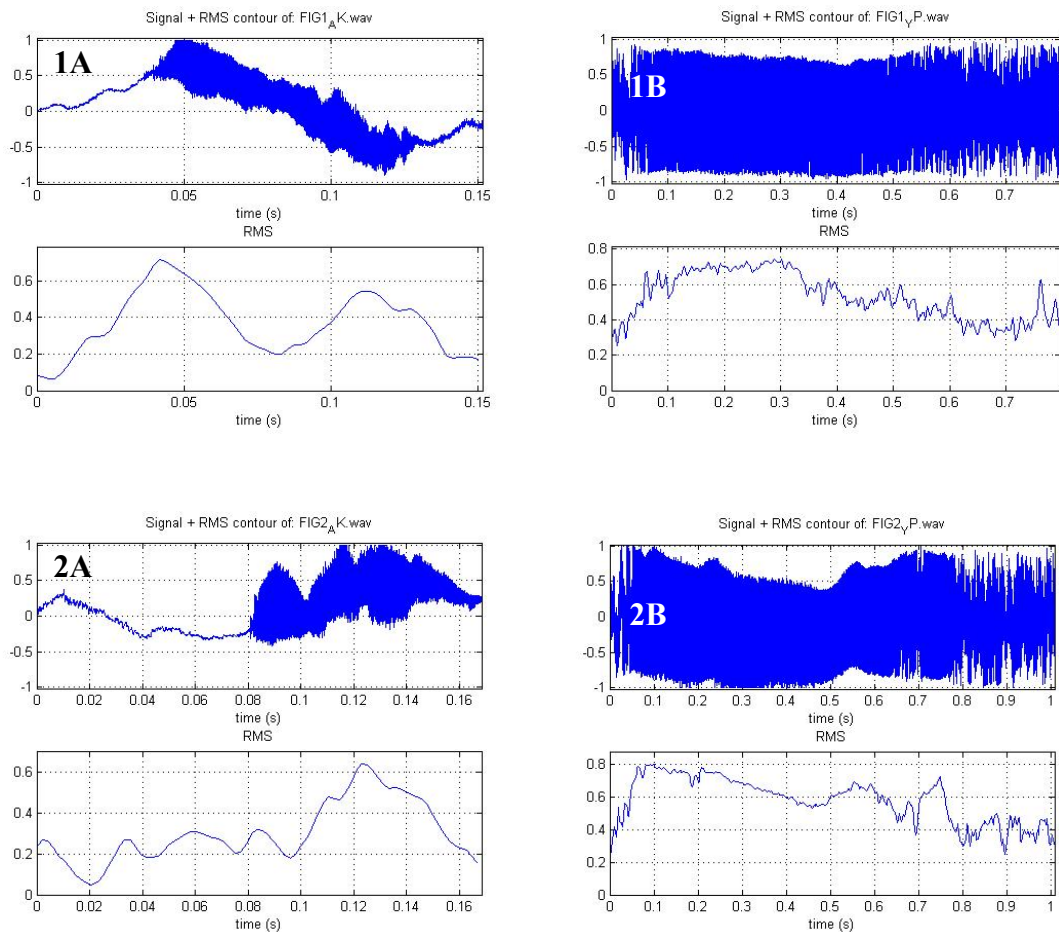


Σχήμα 9

Φασματογραφήματα ηχητικών μηνυμάτων στο ακουστικό φάσμα (1A, 2A) και τα αντίστοιχα μηνύματα στο υπερηχητικό φάσμα (1B, 2B) κατά την διάρκεια συναισθήματος οργής/μίσους

B.1. Ανάλυση ηχητικών σημάτων

Τα φάσματα του Σχήματος 10 αναλύθηκαν με τον αλγόριθμο που περιγράφεται στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι». Ενδεικτικά το σήμα και το RMS contour δείχνονται στο Σχήμα 10. Η λεπτομερής ανάλυση φαίνεται στα παράρτημα. Συνοπτικά όμως τα αποτελέσματα που προκύπτουν από το gerot του αλγόριθμου παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα 4:



Σχήμα 10

Ανάλυση φασμάτων ηχητικών μηνυμάτων στο ακουστικό φάσμα (1A, 2A) και τα αντίστοιχα μηνύματα στο υπερηχητικό φάσμα (1B, 2B) κατά την διάρκεια συναισθήματος οργής/μίσους

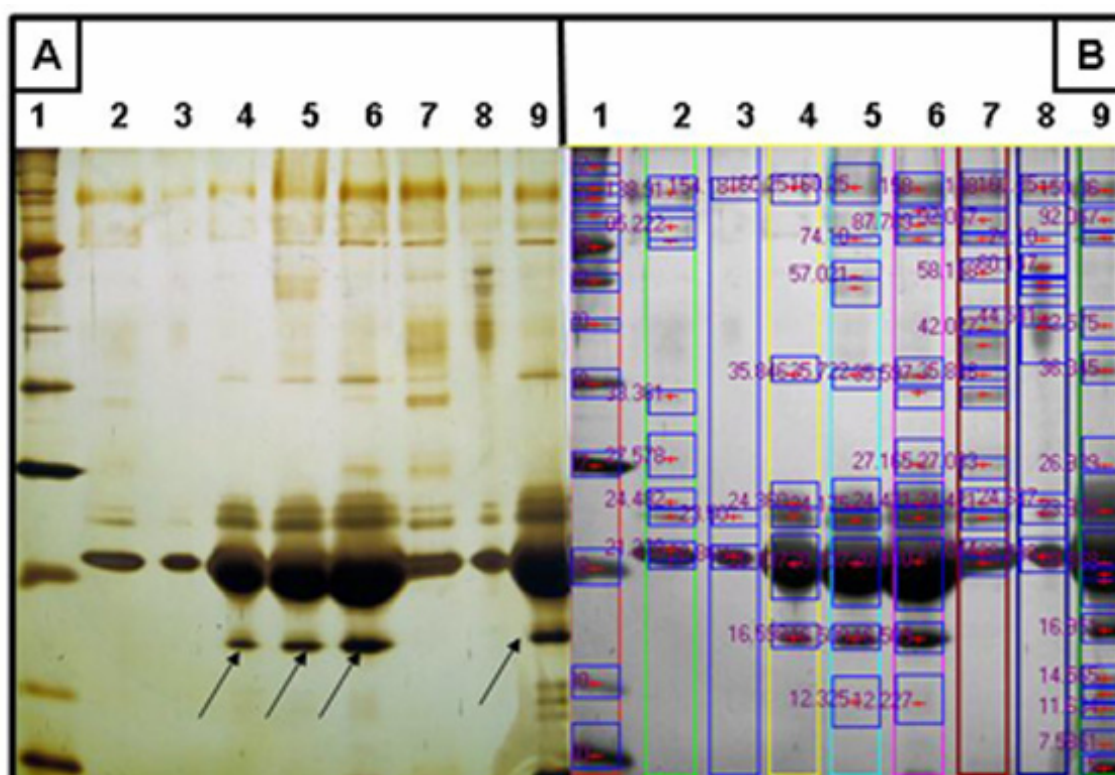
Πίνακας 4: Συνοπτική καταγραφή ανάλυσης ηχητικών μηνυμάτων στο ακουστικό φάσμα (1A, 2A) και τα αντίστοιχα μηνύματα στο υπερηχητικό φάσμα (1B, 2B) κατά την διάρκεια συναισθήματος οργής/μίσους

ΑΚΟΥΣΤΟ/ΥΠΕΡΗΧΗΤΙΚΟ ΦΑΣΜΑ				
	A1	Y1/10	A2	Y2/10
Κεντρική Συχνότητα (Hz)	4640	1412	4085	1214
Μέγιστη Συχνότητα (Hz)	4799	1770	4391	1396
Ελάχιστη Συχνότητα (Hz)	4017	1193	3609	1015
Επιλεγμένο formant	3719- 4901	1027- 1854	3486- 4696	1084- 1400
Επιλεγμένο pitch contour (αριθμός δειγμάτων)	466- 4403	483- 38150	293- 7812	625- 48400

Σημειώνεται ότι το sampling rate σε αυτή την ηχογράφιση είναι στα 48000 Hz σε σχέση με τις υπόλοιπες περιπτώσεις που το sampling rate είναι στα 44100 Hz.

3.2 ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΟΥΡΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΠΟΝΤΙΚΙΩΝ

Η ούρηση αποτελεί μία από τις άμεσες βιολογικές αποκρίσεις σε κάποιο ερέθισμα. Έτσι αρχικά ελέγχθηκε το αν ο εξωγενής χειρισμός, τρόμου/πόνου, όπως αυτός καταγράφηκε ηχητικά, προκαλεί κάποια διαφοροποίηση στο πρωτεϊνικό προφίλ των ούρων. Η συλλογή των ούρων πραγματοποιήθηκε συγχρόνως με την καταγραφή των ηχητικών μηνυμάτων (βλέπε Υλικά και Μέθοδοι) και το πρωτεϊνικό τους προφίλ αποτυπώθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακριλαμιδίου (Σχήμα 11A).



Σχήμα 11

Ηλεκτροφορητική ανάλυση ούρων σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (A) και ανάλυση πρωτεϊνικού προφίλ με το λογισμικό Gel Analyzer Pro 3.1 (B). Οι αριθμοί δηλώνουν τα εξής:
1: Πρωτεϊνικός μάρτυρας (control)
2: αρνητικός μάρτυρας BALB/c 1 (2μl ούρα)
3: αρνητικός μάρτυρας C3H/HeN 1 (2μl ούρα)
4: BALB/c 1 κατά την διάρκεια συναισθήματος τρόμου/πόνου (2μl ούρα)
5: BALB/c 2 κατά την διάρκεια συναισθήματος τρόμου/πόνου (2μl ούρα)
6: C3H/HeN 1 κατά την διάρκεια συναισθήματος τρόμου/πόνου (2μl ούρα)
7: αρνητικός μάρτυρας BALB/c 1 (5μl ούρα)
8: αρνητικός μάρτυρας C3H/HeN 1 (5μl ούρα)
9: BALB/c 1 κατά την διάρκεια συναισθήματος τρόμου/πόνου (5μl ούρα).

Στις σειρές 2 έως 6 χρησιμοποιήθηκαν 2μl ούρων ενώ στις σειρές 7 έως 9 χρησιμοποιήθηκαν 5μl ούρων. Εμφανής είναι η ποσοτική διαφορά μεταξύ των ζώων που δεν είχαν υποστεί κάποιο χειρισμό (Σχήμα 11Α, σειρές 2,3,7,8) και αυτών που είχαν δεχτεί το εξωτερικό ερέθισμα τρόμου/ πόνου (Σχήμα 11Α, σειρές 4,5,6,9). Εκτός όμως από την ποσοτική διαφορά, στα ζώα που είχαν υποστεί τον χειρισμό τρόμου/ πόνου εμφανίζεται μία χαρακτηριστική ζώνωση στα ~16kD (Σχήμα 11Β) η οποία απουσιάζει από τους αρνητικούς μάρτυρες ακόμη και στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκαν 5μl ούρων (Σχήμα 11Β, σειρές 7,8). Πληροφορικά, το σχήμα 11Β, είναι ουσιαστικά το 11Α, αφού πρώτα έχει περαστεί από ένα εργαστηριακό-ηλεκτρονικό πρόγραμμα στο οποίο καταγράφονται όλα τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών.

3.3 ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΣΥΝΑΙΣΘΗΜΑΤΟΣ ΜΕΣΩ ΗΧΗΤΙΚΩΝ ΜΗΝΥΜΑΤΩΝ

Οι ήχοι που καταγράφηκαν στο ακουστικό φάσμα κατά τη διάρκεια του άμεσου χειρισμού των πειραματικών ζώων, απομονώθηκαν και αφού επεξεργάστηκαν συγκεντρώθηκαν σε δύο αρχεία, ένα για τον εξωγενή χειρισμό τρόμου/ πόνου και ένα για τον ενδογενή χειρισμό διαμάχης αρσενικών ζώων. Τα αρχεία αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την ηχοβόληση θηλυκών και αρσενικών ζώων τα οποία δεν είχαν υποστεί καμία μεταχείριση. Τα ούρα συλλέχθηκαν μετά το τέλος της ηχοβόλησης των ζώων και ακολούθησε αποτύπωση του πρωτεϊνικού τους προφίλ σε πήκτωμα ακριλαμιδίου (Σχήμα 12). Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται εμφανώς αποδεικνύουν την πρόκληση δευτερογενούς αντίδρασης σε ένα έμμεσο συναίσθημα στρες μέσω εκπομπής ηχητικών μηνυμάτων. Παρατηρείται ότι τόσο η πρώτη ομάδα ζώων που ηχοβολήθηκε με τα ηχητικά μηνύματα τρόμου/ πόνου όσο και η δεύτερη ομάδα που ηχοβολήθηκε με τα ηχητικά μηνύματα διαμάχης μεταξύ αρσενικών, εμφανίζουν ένα παρόμοιο πρωτεϊνικό πρότυπο με αυτό των ζώων που δέχτηκαν άμεσα το ερέθισμα.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι υπάρχει διαφοροποίηση μεταξύ των αρσενικών και θηλυκών ποντικών. Στο ερέθισμα τρόμου/ πόνου τα θηλυκά είτε ανήκουν στην αιμομικτική σειρά BALB/c ή C3H/HeN απαντούν με τρόπο παρόμοιο με τα ζώα που είχαν δεχτεί το πρωτογενές ερέθισμα δηλαδή σημαντική ποσοτική αύξηση των πρωτεϊνικών στοιχείων και εμφάνιση της επιπλέον ζώνωσης στα ~16kD (Σχήμα 12, σειρές 2,4,6).

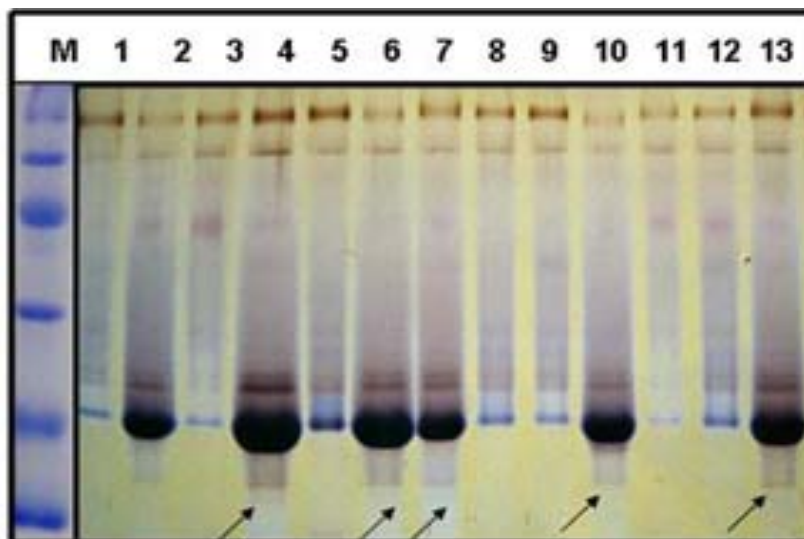
Σε αντίθεση με τα θηλυκά, τα BALB/c αρσενικά (Σχήμα 12, σειρές 3,5) **δεν επηρεάστηκαν από το δευτερογενές ερέθισμα**, εφόσον παρουσιάζουν ένα πρωτεϊνικό προφίλ παρόμοιο με αυτό των αρνητικών μαρτύρων (Σχήμα 12, σειρές 1,8).

Τα C3H/HeN αρσενικά (Σχήμα 12, σειρά 7) παρουσίασαν ένα πρωτεϊνικό προφίλ παρόμοιο με αυτό των θηλυκών ζώων δηλαδή ποσοτική αύξηση του πρωτεϊνικού περιεχόμενου των ούρων και εμφάνιση της ζώνωσης στα ~16kD.

Στο δευτερογενές ερέθισμα της διαμάχης αρσενικών και πάλι τα θηλυκά ζώα, ανεξάρτητα από την αιμομικτική σειρά στην οποία ανήκουν, εμφανίστηκαν πιο ευαίσθητα στα ηχητικά μηνύματα, εφόσον αντέδρασαν με ποσοτική αύξηση των πρωτεϊνικών τους στα ούρα και εμφάνιση της ζώνωσης στα 16kD (Σχήμα 12, σειρές 10,13).

Τα αρσενικά, ανεξάρτητα από το αν ανήκουν στην αιμομικτική σειρά BALB/c ή C3H/HeN (Σχήμα 12, σειρές 9,11,12), δεν επηρεάστηκαν από το δευτερογενές αυτό ερέθισμα εφόσον παρουσίασαν ένα πρωτεϊνικό προφίλ παρόμοιο με αυτό των αρνητικών μαρτύρων. Δυστυχώς η φύση του πειράματος είναι τέτοια ώστε να μην ήταν δυνατή η συλλογή ούρων από

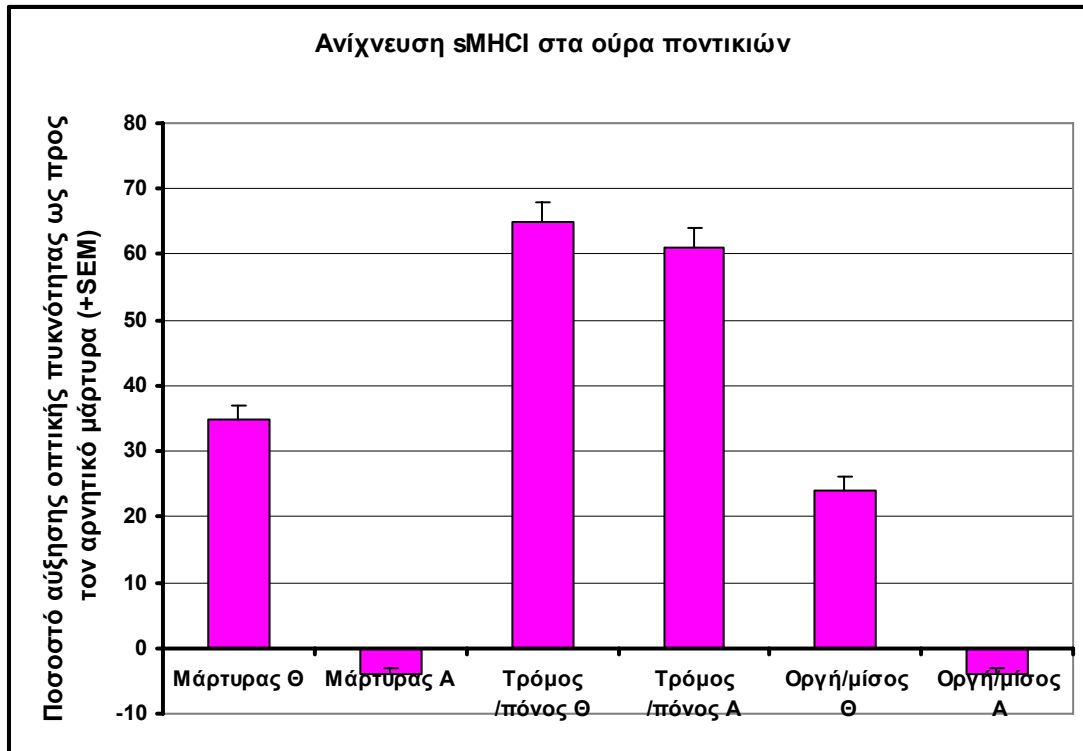
μεμονωμένα ποντίκια κατά τη διάρκεια της άμεσης διαμάχης μεταξύ δύο αρσενικών παρουσία ενός θηλυκού ζώου και κατά συνέπεια να μην μπορεί να υπάρξει σύγκριση με το πρωτογενές ερέθισμα.



Σχήμα 12

Ηλεκτροφορητική ανάλυση 2 μl ούρων στα συναισθήματα τρόμου/πόνου (σειρές 1-8) και μίσους/οργής (σειρές 9-13) **M:** Πρωτεϊνικός μάρτυρας, **1:** αρνητικός μάρτυρας BALB/c **2:** θηλυκό BALB/c **1,** **3:** αρσενικό BALB/c **1,** **4:** θηλυκό BALB/c **2,** **5:** αρσενικό BALB/c **2,** **6:** θηλυκό C3H/HeN), **7:** αρσενικό C3H/HeN, **8:** αρνητικός μάρτυρας C3H/HeN, **9:** αρσενικό BALB/c, **10:** θηλυκό BALB/c, **11:** αρσενικό C3H/HeN, **12:** αρσενικό C3H/HeN, **13:** θηλυκό C3H/HeN.

Ένα είδος πρωτεϊνών που ανιχνεύεται στα ούρα των ποντικών είναι τα διαλυτά τάξης I αντιγόνα ιστοσυμβατότητας (sMHC I), τα οποία καθορίζουν τον λεγόμενο «οσμότυπο» (odortype, Restrepo et al., 2006) και δρουν σαν φερομόνες για την επιλογή του αρσενικού ή θηλυκού συντρόφου για αναπαραγωγή. Για να ελέγξουμε το κατά πόσο οι πειραματικές διαδικασίες που εφαρμόστηκαν στην παρούσα εργασία επηρεάζουν την παραγωγή των sMHC I, πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες ELISA με τα διάφορα δείγματα ούρων που είχαν συλλεχθεί κατά την διάρκεια του χειρισμού εμέσου συναισθήματος. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 13 μόνο το συναίσθημα τρόμου/πόνου οδήγησε σε αύξηση της παραγωγής των sMHC I στα ούρα τόσο των αρσενικών όσο και των θηλυκών ζώων κατά ~2- και 65-φορές αντίστοιχα. Η μεταφορά του συναισθήματος οργής/μίσους δεν επηρέασε τα επίπεδα των sMHC I πρωτεϊνών.



Σχήμα 13

Ανίχνευση μορίων sMHCII στα ούρα αρσενικών (Α) ή θηλυκών (Θ) ποντικών BALB/c που συλλέχθηκαν κατά την διάρκεια των συναισθημάτων τρόμου/πόνου και μίσους/οργής). Τα ούρα χρησιμοποιήθηκαν σε αραιώση 1/50 και η ανίχνευση των sMHCII πραγματοποιήθηκε με το μονοκλωνικό αντίσωμα αντι- H-2K^d. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν ποσοστό αύξησης σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα \pm SEM (n=5). Το πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η βιολογία της ακοής συνδέει άμεσα τα ακουστικά ερεθίσματα με το νευρικό σύστημα του οργανισμού το οποίο στη συνέχεια σηματοδοτεί ποικίλα βιολογικά φαινόμενα. Η συσχέτιση του ηχητικού ακούσματος με συγκεκριμένους μηχανισμούς του οργανισμού αποτελεί ένα πολύ ενδιαφέρον επιστημονικό πεδίο, διότι μπορεί να αποκαλύψει απλούς συνδυασμούς ήχων οι οποίοι μπορούν να επιδρούν στην ενεργοποίηση ή καταστολή παραγωγής ορμονών, αυξητικών παραγόντων, κυτοκινών κλπ, παράγοντες που με την σειρά τους επιδρούν σε ποικίλα κυτταρικά συστήματα και μεταβάλλουν ολόκληρη την φυσιολογία του οργανισμού. Χρησιμοποιώντας σαν πειραματικό μοντέλο το ποντίκι, στην παρούσα μελέτη ηχογραφήθηκαν ακουστικά μηνύματα που εκπέμπονται κατά την πρόκληση των συναισθημάτων τρόμου/πόνου ενώ συγχρόνως αποτυπώθηκαν οι άμεσες αλλαγές στο πρωτεϊνικό προφίλ των ούρων. Τα ηχητικά μηνύματα αναλύθηκαν, επεξεργάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για την ηχοβολήση άλλων ποντικίων, με στόχο την αναπαραγωγή του πρωτεϊνικού προφίλ ούρων που είχαν προκύψει από τον άμεσο χειρισμό.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όντως μπορεί να γίνει μεταφορά συναισθήματος μέσω ηχητικών μηνυμάτων, γεγονός που ανοίγει νέες προσεγγίσεις στην βιοϊατρική θεραπευτική.

Λόγω της πολυπλοκότητας του ήχου και της εξαιρετικά μεγάλης δυνατότητας συνδυασμού των ηχητικών συχνοτήτων, η παρούσα μελέτη εστιάστηκε στους παραγόμενους από τα ίδια τα ζώα ήχους, εφόσον αυτοί αντιπροσωπεύουν μια συγκεκριμένη συναισθηματική/φυσιολογική κατάσταση. Έτσι, ηχογραφήθηκαν BALB/c και C3H/HeN αρσενικά και θηλυκά ζώα σε κατάσταση τρόμου/πόνου όπου υπήρξε εξωγενής άσκηση μυικής πίεσης στα άκρα των ποντικών και σε κατάσταση μίσους/οργής όπου καταγράφηκε η διαμάχη 2 αρσενικών για την διεκδίκηση ενός θηλυκού. Η ανάλυση των φασμάτων έδειξε ότι τα αρσενικά ζώα, ανεξάρτητα από την αιμομικτική σειρά που ανήκουν, εκπέμπουν σε υψηλότερες συχνότητες και μεγαλύτερη ένταση από ότι τα θηλυκά. Στο συναίσθημα τρόμου/πόνου το εύρος συχνοτήτων στα αρσενικά κυμάνθηκε από 2-22 kHz και στα θηλυκά από 2,5-18 kHz, ενώ η ένταση των ηχητικών μηνυμάτων στα θηλυκά ποντίκια ήταν σε γενικές γραμμές 8-10 dB χαμηλότερες σε σχέση τα αρσενικά. Στο συναίσθημα μίσους/οργής τα αρσενικά αντέδρασαν διαφορετικά, ενώ η συχνότητα κυμαινόταν από 2-25 kHz. Πολλές φορές, η εκπομπή στο ακουστό φάσμα συνοδευόταν από υπερηχητικά σήματα τα οποία έφταναν μέχρι τα 250 kHz, αλλά ο μέσος όρος ήταν γύρω στα 150kHz (Πίνακας 5).

Μια επίσης ενδιαφέρουσα ηχογράφηση περιλάμβανε νεογνά με την μητέρα τους. Παρόλο που και η μητέρα, αλλά και τα νεογνά χρησιμοποιούσαν εύρος συχνοτήτων από 4kHz έως 15kHz, τα νεογνά έδειξαν την ανησυχία τους, εκπέμποντας με λιγότερη ένταση σε σχέση με τη μητέρα τους. Λίγο πιο συγκεκριμένα, διακρίναμε 3 ± 1 formants, με ένταση περίπου 10 dB πιο κάτω από την αντίστοιχη της μητέρας (Πίνακας 5).

Πίνακας 5: Συνοπτική παρουσίαση μέσου όρου συχνοτήτων και αριθμός δειγμάτων, όλων των καταστάσεων στο ακουστικό και υπερηχητικό φάσμα.

Κατάσταση	Μέσος όρος συχνοτήτων (kHz)		Αριθμός δειγμάτων (n)
ΑΚΟΥΣΤΟ ΦΑΣΜΑ			
Τρόμος/Πόνος	2-22 (αρσενικά)	2.5-18 (θηλυκά)	108
Οργή /Μίσος	2-25 (αρσενικά)		71
Μητέρα/Νεογνά	4-15 (μητέρες)	4-15 (νεογνά)	32
ΥΠΕΡΗΧΗΤΙΚΟ ΦΑΣΜΑ			
Τρόμος/Πόνος	10-250 (αρσενικά και θηλυκά)		56
Οργή /Μίσος	10-150 (αρσενικά)		45

Μετά τη λήψη του ήχου-και αφού επεξεργάστηκε-ακολούθησε ηχοβόληση άλλων ποντικιών που δεν είχαν υποβληθεί σε κανένα χειρισμό. Η ανησυχία των ζώων στο άκουσμα των μηνυμάτων ήταν εμφανής. Τα θηλυκά ζώα εμφανίστηκαν πιο ευαίσθητα από ότι τα αρσενικά, γεγονός που αποτυπώθηκε και στο πρωτεϊνικό προφίλ των ούρων τους.

Στην παρούσα μελέτη το πρωτεϊνικό προφίλ των ούρων επιλέχθηκε ως ο βιολογικός δείκτης του προκαλούμενου συναισθήματος. Ενώ το περιφερικό αίμα προσφέρεται για ένα μεγαλύτερο αριθμό εξετάσεων, η διαδικασία λήψης αίματος στο ποντίκι δημιουργεί ένα σημαντικό στρες με αποτέλεσμα να μην γίνεται εύκολα διακριτή η διαφορά των αρνητικών μαρτύρων από τα ζώα που είχαν υποστεί τον άμεσο ή έμμεσο χειρισμό ενός συναισθήματος. Η ούρηση στα ποντίκια αποτελεί μια από τις πλέον άμεσες βιολογικές αποκρίσεις και η συλλογή τους δεν υποβάλλει τα ζώα σε επιπρόσθετο στρες. Έτσι κατά την διάρκεια της άμεσης μεταχείρισης των ζώων συλλέχθηκαν ούρα τα οποία αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης και μετά από χρώση φάνηκε ότι τα ζώα που είχαν υποβληθεί σε εξωγενές στρες εμφάνιζαν ποσοτική αύξηση των MUP, ενώ εμφανίστηκε ένα επιπλέον πρωτεϊνικό είδος στα ~16 kD που απουσίαζε από τους αρνητικούς μάρτυρες. Ένα αντίστοιχο πρωτεϊνικό προφίλ ανακτήθηκε από τα ζώα που είχαν δεχθεί έμμεσα το ερέθισμα μέσω της

εκπομπής ηχητικών μηνυμάτων. Η διαφοροποίηση των θηλυκών και αρσενικών ποντικών-κατά έναν περίεργο τρόπο-είχε γίνει αντιληπτή κατά την διάρκεια της ηχοβόλησης. Ακόμα και εμείς οι ίδιοι, μπορούσαμε να δούμε και να αντιληφθούμε ποια ζώα είχαν επηρεαστεί από το ηχητικό ερέθισμα, βάσει των αντιδράσεών τους. Αυτό στη συνέχεια αποδείχθηκε και στο προφίλ των MUP.

Ενώ μέχρι αυτό το στάδιο της μελέτης δεν είχε παρατηρηθεί κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των BALB/c και C3H/HeN ζώων, φάνηκε ότι τα C3H/HeN αρσενικά μπορούσαν να ευαισθητοποιηθούν στο άκουσμα της διαμάχης BALB/c αρσενικών ποντικών, εφόσον παρουσίασαν ένα προφίλ MUP παρόμοιο με αυτό των θηλυκών ζώων. Αυτή η παρατήρηση θα μπορούσε να υποδηλώνει μια υπερισχύουσα δύναμη των BALB/c έναντι των C3H/HeN, αλλά περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες για την ανάλυση των ενδογενών ταξικών διαφορών του είδους.

Επιπλέον στο επίπεδο των βιολογικών αναλύσεων παρατηρήθηκε αύξηση των διαλυτών τάξης I αντιγόνων ιστοσυμβατότητας που θεωρούνται φερομόνες μέσω των οποίων γίνεται η επιλογή συντρόφου κατά την αναπαραγωγή μόνο στην περίπτωση τρόμου/πόνου και όχι κατά την διάρκεια του χειρισμού οργής μίσους. Συμπερασματικά, αυτή η μελέτη παρουσιάζει για πρώτη φορά την δυνατότητα μεταφοράς συναισθήματος μέσω ηχητικών μηνυμάτων τα οποία άμεσα μεταφράζονται σε διαφοροποίηση χημικών σημάτων. Χρησιμοποιώντας αρχικά απλές συχνοτικές συνθέσεις θα μπορούσε να γίνει προσπάθεια ενίσχυσης ή καταστολής του οργανισμού με στόχο την υποστήριξη ή ακόμη και την αντικατάσταση διαφόρων φαρμακευτικών θεραπευτικών προσεγγίσεων.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

♪ Allen K, Blasovich J. (1994) Effects of music on cardiovascular reactivity among surgeons. JAMA 272:1724.

♪ Beynon R, Veggerby C, Payne C, Robertson DHL, Gaskell S, Humphries RE, Hurst JL.(2002) Polymorphism in major urinary proteins: Molecular heterogeneity in a wild mouse population. J Chem Ecol 28:1429-1446.

♪ Berger FG, Szoka P. (1981) Biosynthesis of the MUP in mouse liver: a biochemical genetic study, Biochem. Genet. 19: 325-335.

♪ Bonny HL. (1983) Music listening for intensive coronary care units: A pilot project. Music Therapy 3: 4-16

♪ Brauchli PA. (1993) Comparative study of the psychophysiological relaxation effects induced by an optical acoustic mind machine and relaxing music. Zeitschrift fur Experimentelle und Angewandte Psychologie 40:179-93.

♪ Chikahisa, S., Sei, H., Morishima, M., Sano, A., Kitaoka, K., Nakaya, Y., Morita, Y. (2005) "Exposure to music in the perinatal period enhances learning performance and alters BDNF/TrkB signaling in mice and adults". Behav. Brain Res. 169: 312-319.

♪ Convington, H. and Crosby, C. (1997) "Music therapy as nursing intervention." J. Psychosocial Nursing and Mental Health Services, 35: 3467.

♪ Fay RR (1997) Hearing and sound perception among vertebrate animals, in Encyclopedia of Acoustics, M.J. Crocker (ed) John Wiley & Sons, Inc. pp 1789-1797.

♪ Finlayson JS, Baumann CA. (1959) Mouse proteinuria, Am.J. Physiol. 192: 69-72.

♪ Finlayson JS, Asofsky R, Potter M, Runner CC. (1965) Major urinary protein complex of normal mice: origin, Science 149: 981-982.

♪ Freire-Garabal M, Belmonte A, Orallo F, Nunez MJ. (1991) Effects of alprazolam on T cell immunosuppressive response to surgical stress in mice. Cancer Letters 58:183-7.

♪ Freire-Garabal M, Nunez MJ, Balboa JL, Fernandez-Rial JC, Rey-Mendez M. (1995) Effects of buspirone on the immune response to stress in mice. Pharmacology Biochemistry and Behavior 51:821-5.

♪ Freire-Garabal M, Nunez MJ, Pereiro D, Riveiro P, Losada C, Fernandez-Rial JC, Garcia-Iglesias E, Prizmic J, Mayan JM, Rey-Mendez M. (1997) Effects of fluoxetine on the immunosuppressive response to stress in mice. Life Sciences 60:403-13.

♪ Ghosh PK, Chandrashenkar V, Stereg R, Bartke A. (1990) Effects of major androgen dependent urinary proteins α_{2u} -globulin on the pituitary gonadal axis and hypothalamic monoamine in adult male mice, Life Sci. 47: 721-728.

- ♪ Gosh PK, Stegen RW, Bartke A. (1991) Possible involvement of hypothalamic monoamines in mediating the action of α_{2u} -globulin on the pituitary-testicular axis in rats, *Neuroendocrinology* 53: 7-11.
- ♪ Gourbal BEF, Barthelemy M, Petit G, Gabrion C (2004) Spectrographic analysis of the ultrasonic vocalizations of adult male and female BALB/c mice. *Naturwissenschaften* 91:381-385.
- ♪ Haack B, Markl H, Ehret G (1983) Sound communication between parents and offspring. In: Willott JF, editor. *The auditory psychobiology of the mouse*. Springfield (Illinois): C.C. Thomas. pp 57-97.
- ♪ Holy T.E. and Guo Z. (2005) "Ultrasonic Songs of male mice". *PLoS Biol* 3: 2177-2186.
- ♪ Johnson D, Al-Shawi R, Bishop JO. (1995) Sexual dimorphism and growth hormone induction of murine pheromone-binding proteins, *J. Mol.Endocrinol.* 14: 21-34.
- ♪ Kurtz D, Sippel AE, Feigelson PK. (1976) Effect of the thyroid hormones on the level of the hepatic mRNA for α_{2u} -globulin, *Biochemistry* 15: 1031-1036.
- ♪ Kurtz D, Feigelson PK. (1977) Multihormonal induction of hepatic α_{2u} -globulin mRNA as measured by hybridization to complementary DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 4791-4795.
- ♪ Lynch KR, Dolan KP, Nakhasi HL, Unterman R, Feigelson P. (1982) The role of growth hormone in α_{2u} -globulin synthesis: a reexamination, *Cell* 28: 185-189.
- ♪ Murphy JM, Monson RR, Olivier DC, Sobol AM, Leighton AH. (1987) Affective disorders and mortality. A general population study. *Archives of General Psychiatry* 44: 473-80.
- ♪ Nunez MJ, Mana P, Linares D, Riveiro P, Balboa JL, Suarez-Quintanilla J, Maracchi M, Rey-Mendez M, Lopez JM, Freire-Garabal M. (2002) Music, Immunity and cancer. *Life Sciences* 71: 1047-1057.
- ♪ Rauscher F.H., Shaw G.L., Ky K.N. (1993) "Music and spatial task performance". *Nature* 365: 611.
- ♪ Rauscher F.H., Robinson K.D., Jens J.J. (1998) "Improved maze learning through early music exposure in rats". *Neurol. Res.* 20: 427-432.
- ♪ Sales, G.D. and Pye, D. (1974). *Ultrasonic Communication by Animals*. Chapman and Hall, London.
- ♪ Sales, G.D. and Smith, J.C. (1978). "Comparative studies of the ultrasonic calls of infant murid rodents," *Dev. Psychobiol.* 11: 595-619.
- ♪ Sales, G.D., Milligan, S.R., Khirngkh, K. (1992). *The acoustic environment of laboratory animals: a report to the RSPCA*. University Federation for Animal Welfare, Potters Bar, U.K.
- ♪ Sewell, G.D. (1970). "Ultrasonic Communication in rodents," *Nature (London)* 227: 410.

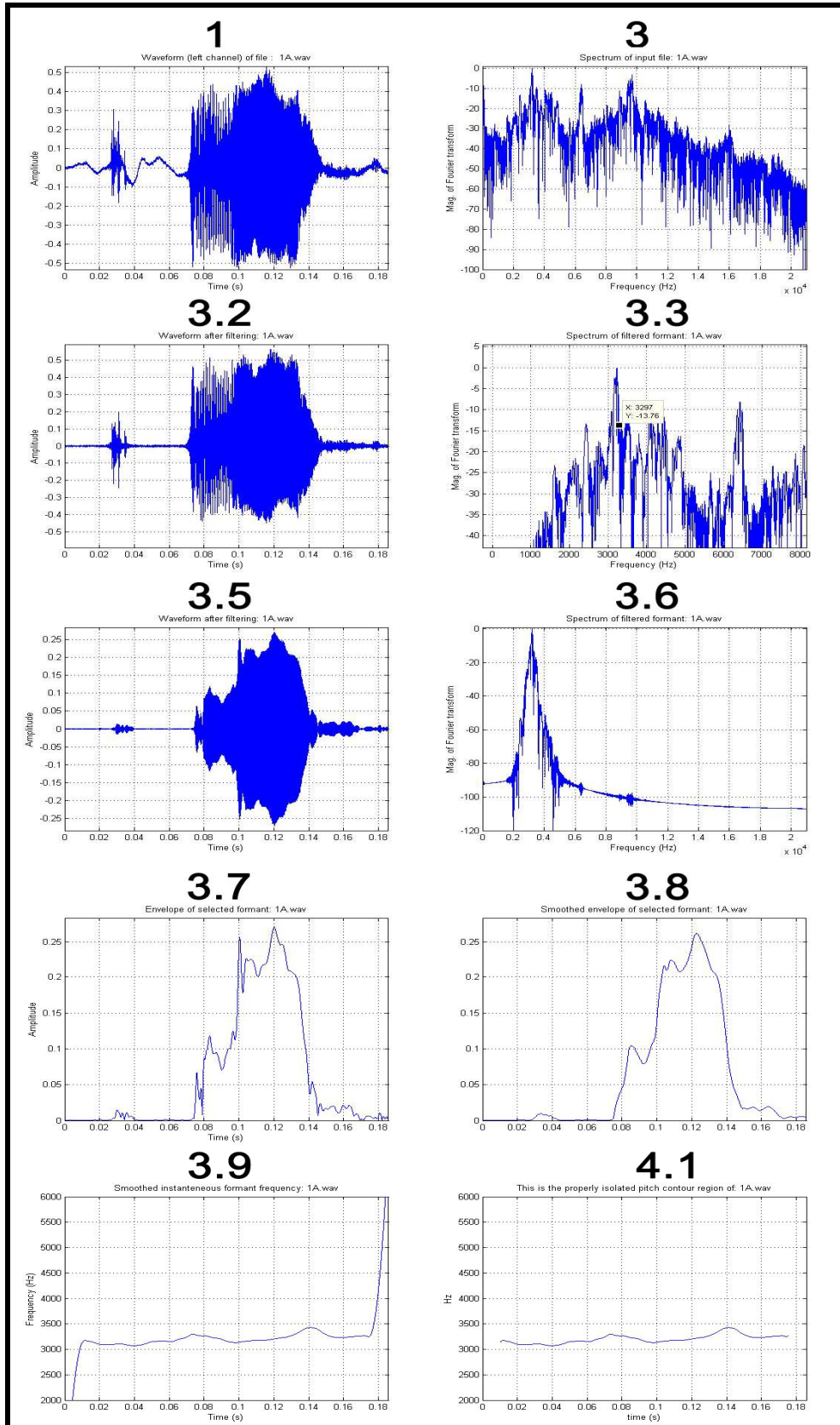
- ♪ Shekelle RB, Raynor WJ, Ostfeld AM, Garron DC, Bieliauskas LA, Liu SC, Maliza C, Paul O. (1981) Psychological depression and 17 year risk of death from cancer. *Psychosomatic Medicine* 43:117-25.
- ♪ Sipos M, Kerchner M, Nyby J (1992) An ephemeral sex pheromone in the urine of female house mice. (*Mus domesticus*). *Behav Neural Biol* 58:138-143.
- ♪ Smith, J.C., (1976). "Responses of adult mice to models of infant calls," *J. Comp. Physiol. Psychol.* 90: 1105-1115.
- ♪ Spigelberg T, Bishop JO. (1988) Tissue-specific gene expression in mouse hepatocytes cultured in growth-restricting medium, *Mol. Cell. Biol.* 8: 3338-3344.
- ♪ Steele, K.M. (2001)"Do rats show a Mozart effect?" *Music Perception*, 21: 251-265.
- ♪ Stowers L, Holy T, Meister M, Dulac C, Koentges G (2002) Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science* 295: 1493-1500.
- ♪ Szoka PR, Paigen K. (1978) Regulation of mouse MUP production by the MUP-A gene, *Genetics* 90: 597-612.
- ♪ Thung PJ. (1959)Proteinuria in mice and its relevance to comparative gerontology, *Experientia Suppl.* 4: 192-201.
- ♪ Vandoren G, von Baelen H, Verhoeven G, de Moor P. (1978) Relationship between the pituitary gland and gonadal steroids: involvement of a hypophyseal factor in reduced α_{2u} -globulin and increased transcortin concentrations in rat serum, *J. Endocrinol.* 78: 31-38.
- ♪ Wysocki C, Nyby J, Whitney G, Beauchamp G, Katz Y (1982) The vomeronasal organ: Primary role in mouse chemosensory gender recognition. *Physiol Behav* 29: 315-327

6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

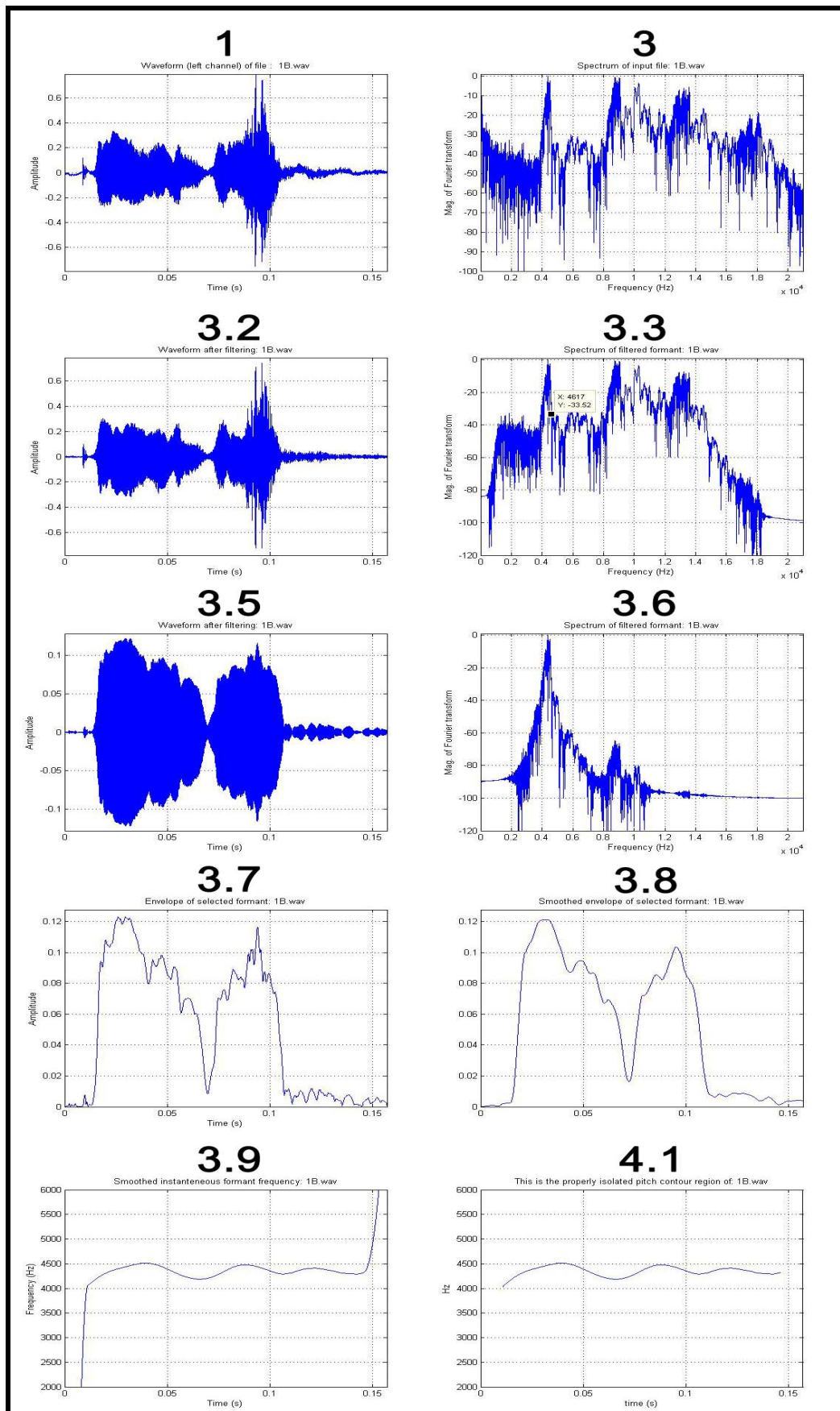
ΑΝΑΛΥΣΗ ΗΧΗΤΙΚΩΝ ΜΗΝΥΜΑΤΩΝ

Ανάλυση ηχητικών μηνυμάτων Σχήματος 3
 Θηλυκά (A, B, C) και αρσενικά(D, E, F) πειραματικά
 ποντίκια κατά τη διάρκεια συναισθήματος τρόμου/πόνου (σελ.39).

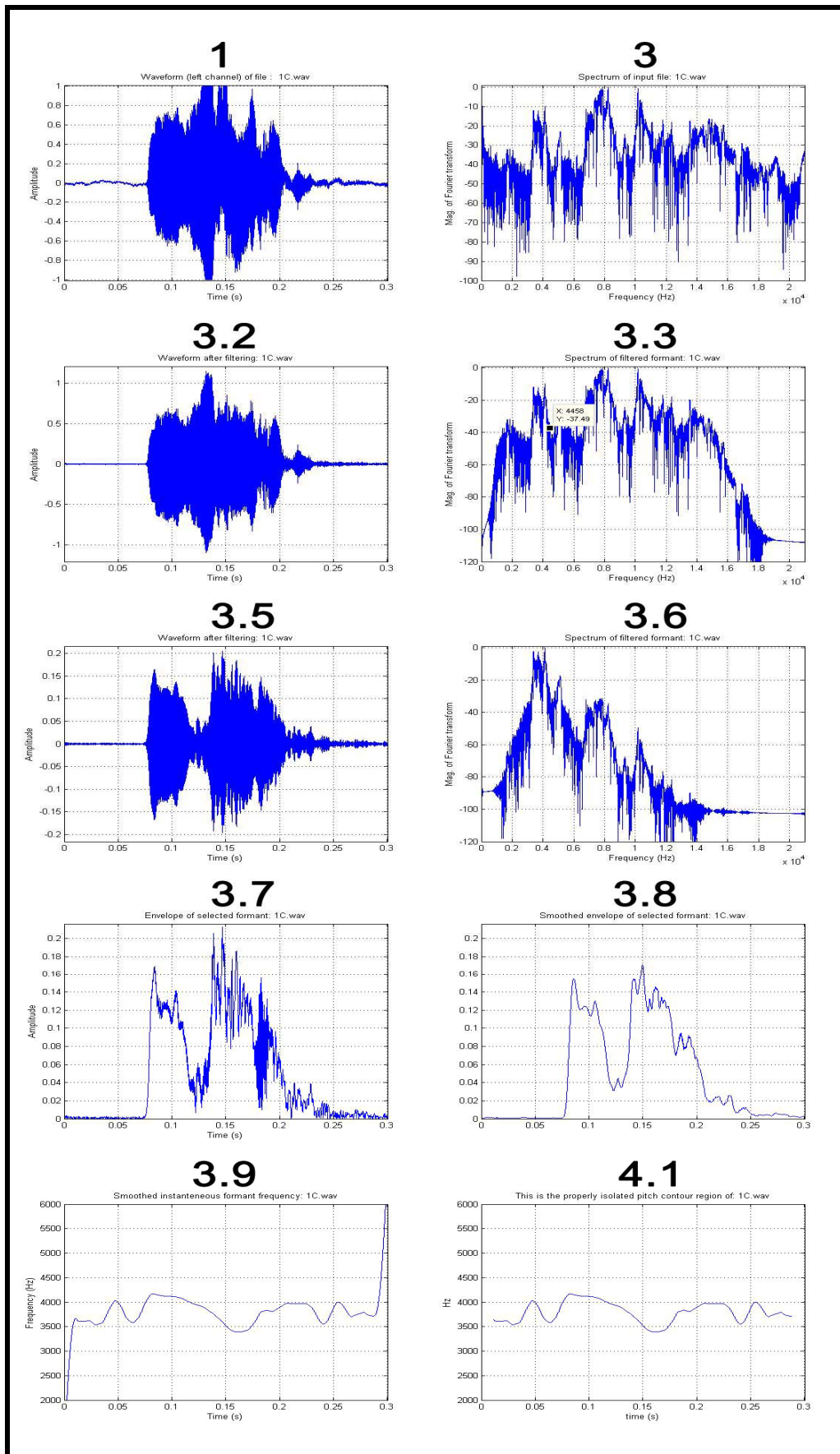
Θηλυκό 1A



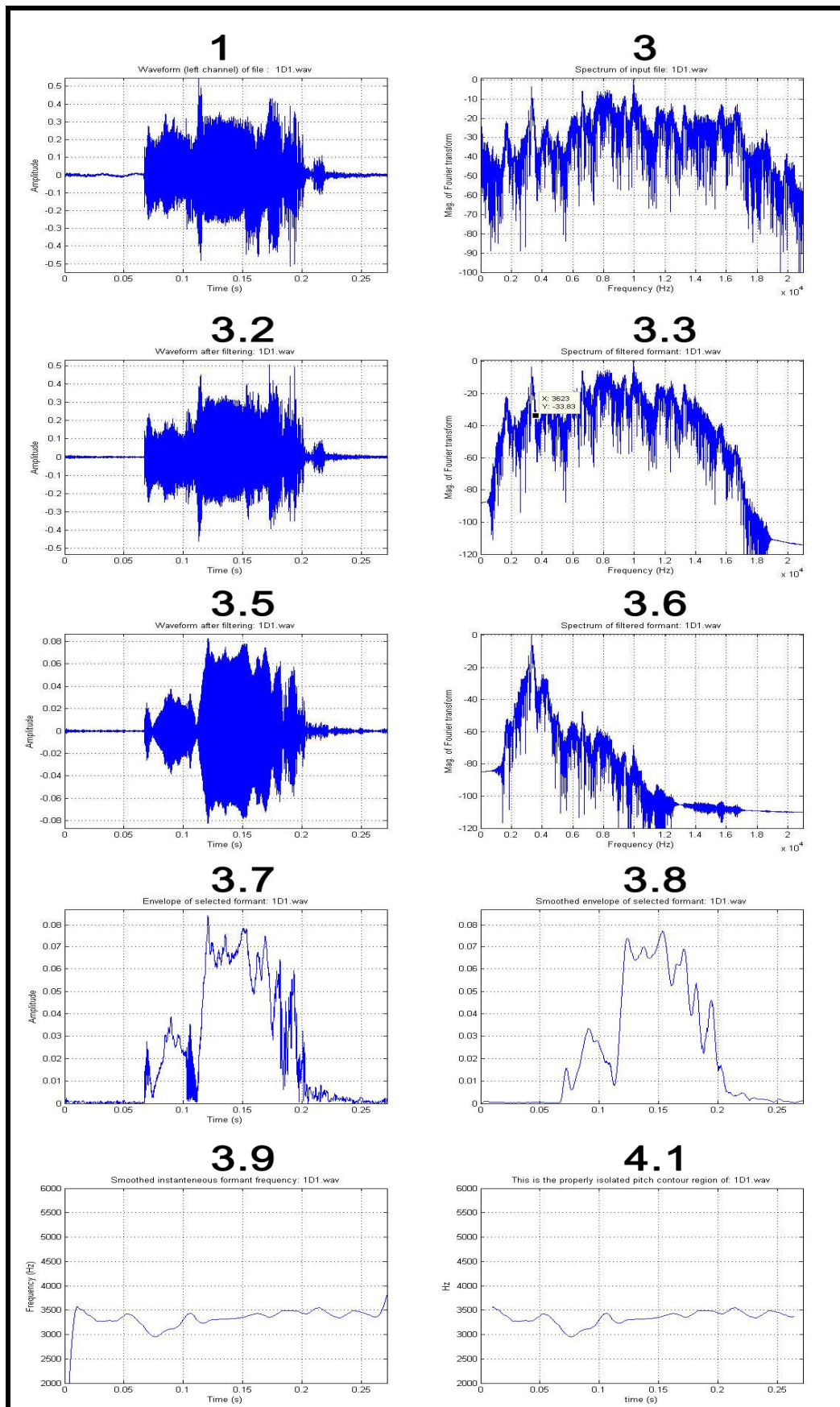
Θηλυκό 1B



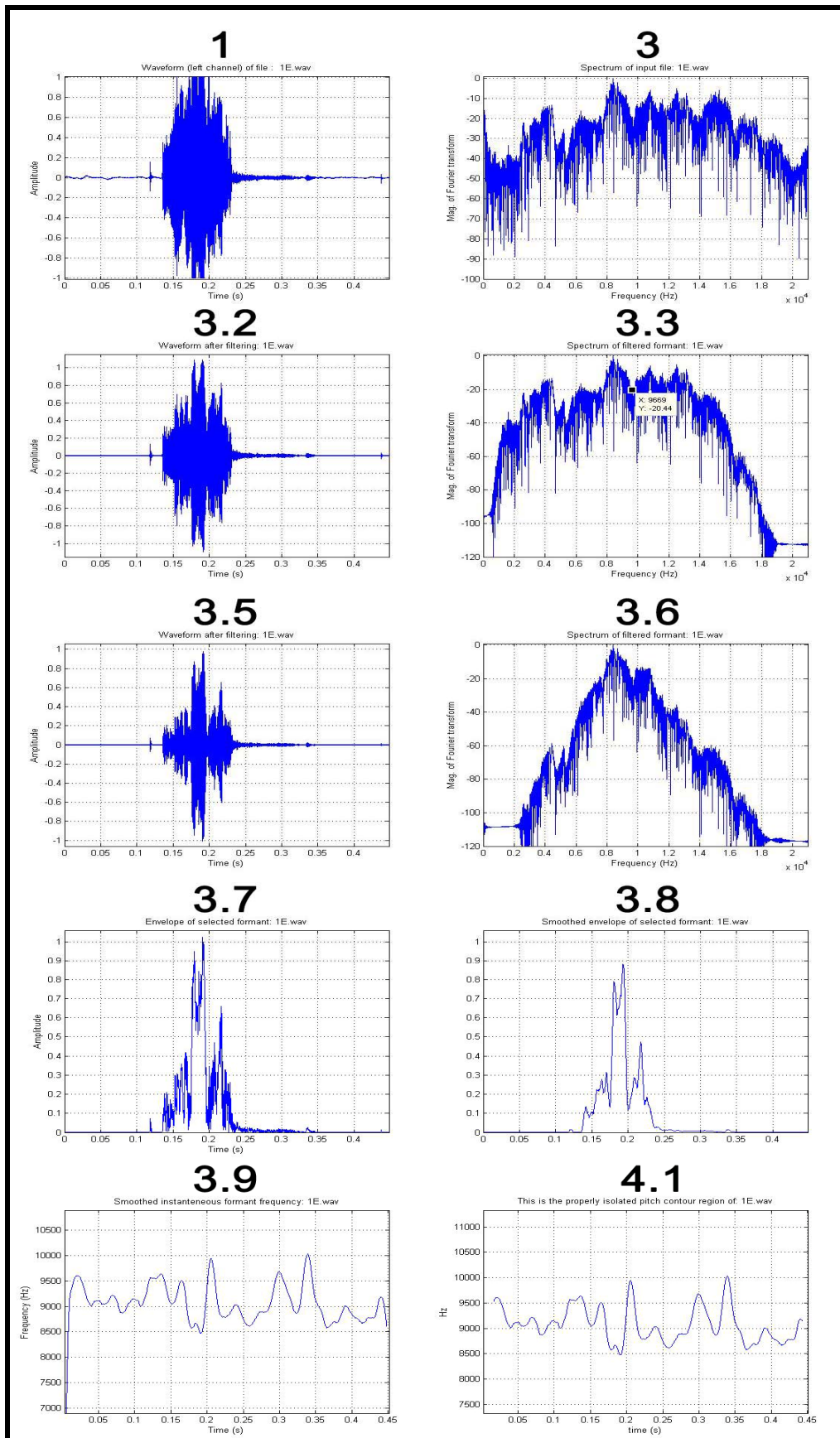
Θηλυκό 1C



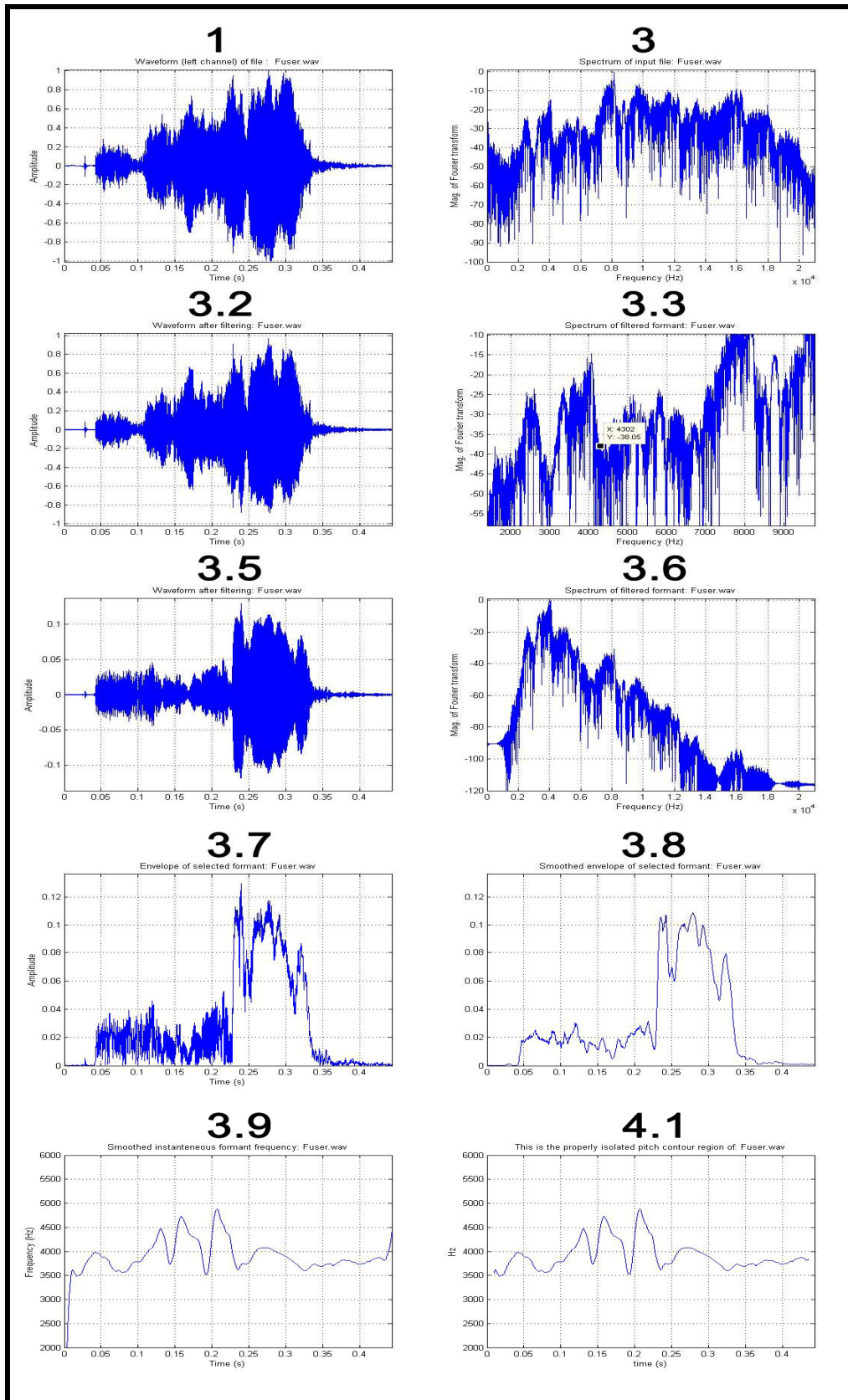
Αρσενικό 1D



Αρσενικό 1E (Καμπυλωτές αρμονικές)

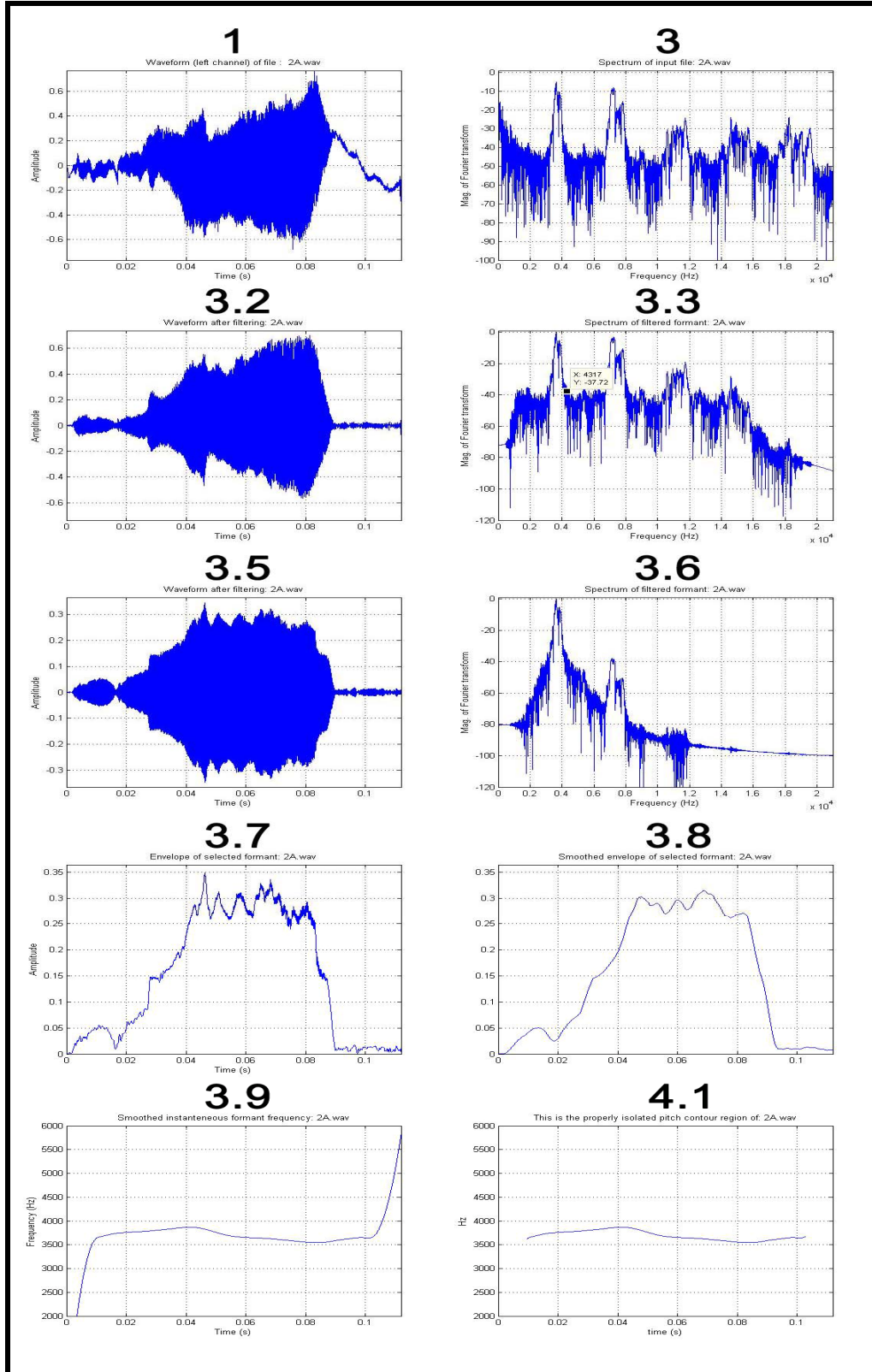


Αρσενικό 1F

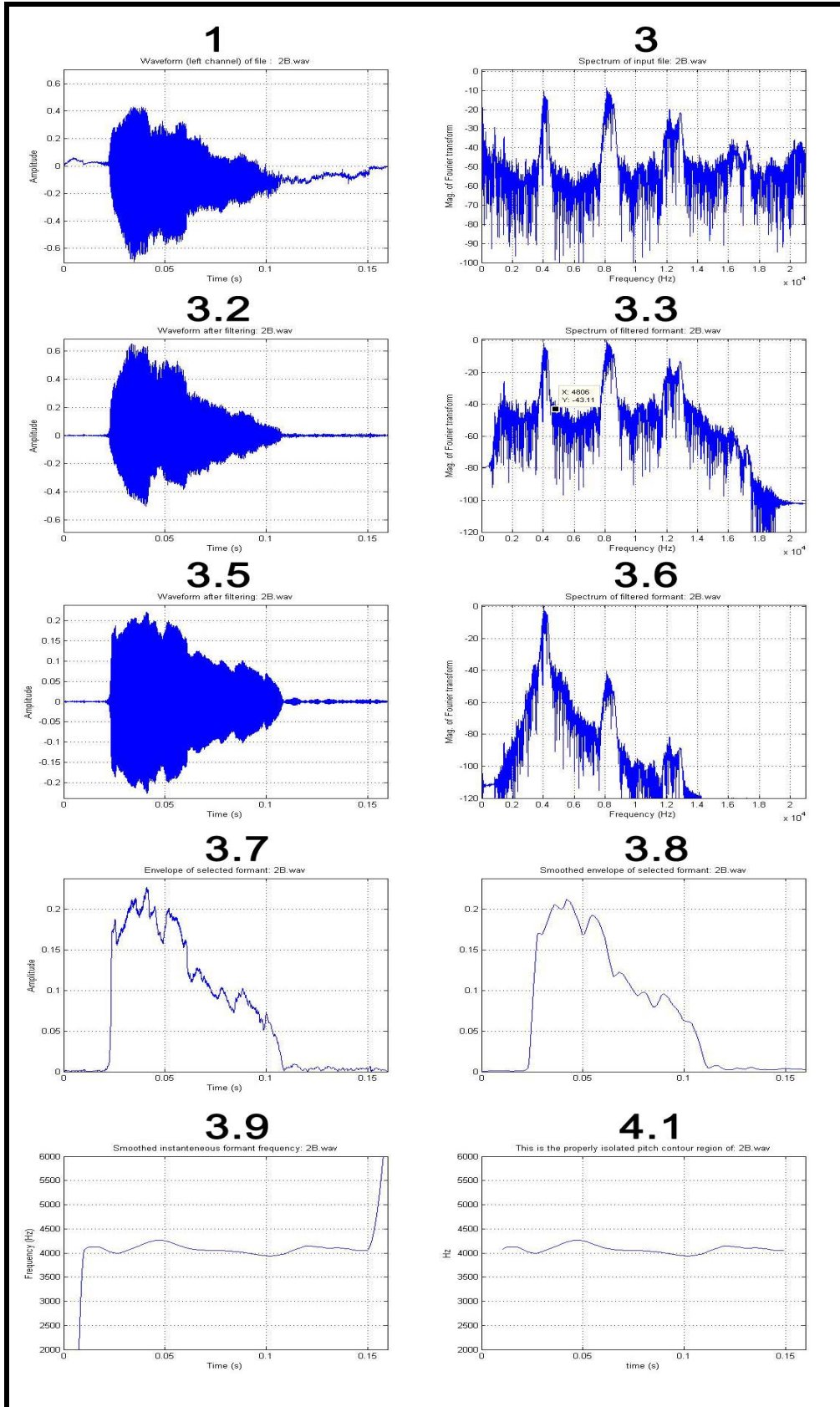


Ανάλυση ηχητικών μηνυμάτων Σχήματος 5
Αρσενικά πειραματικά ποντίκια κατά την διάρκεια συναισθήματος οργής/μίσους (σελ.42).

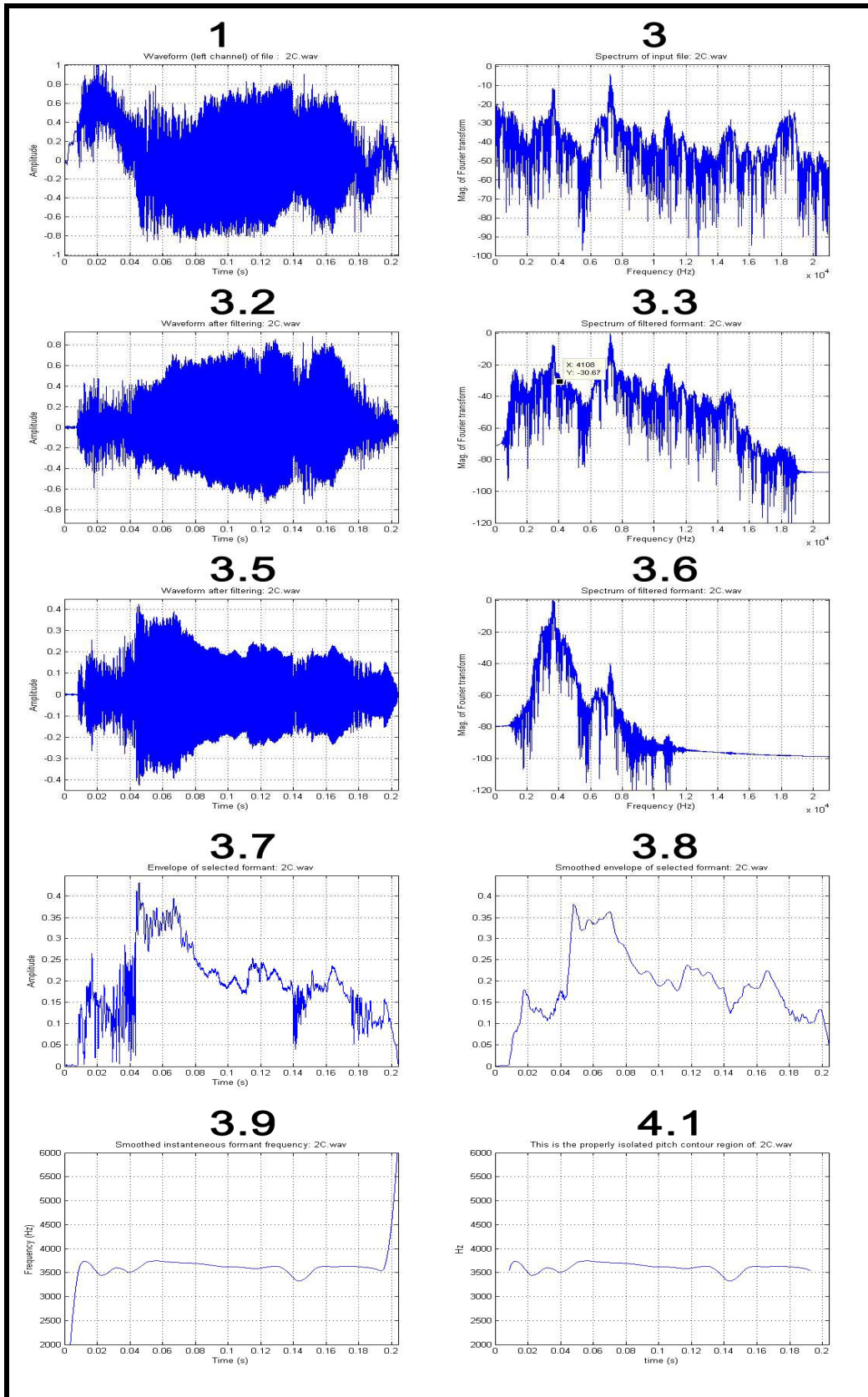
A



B

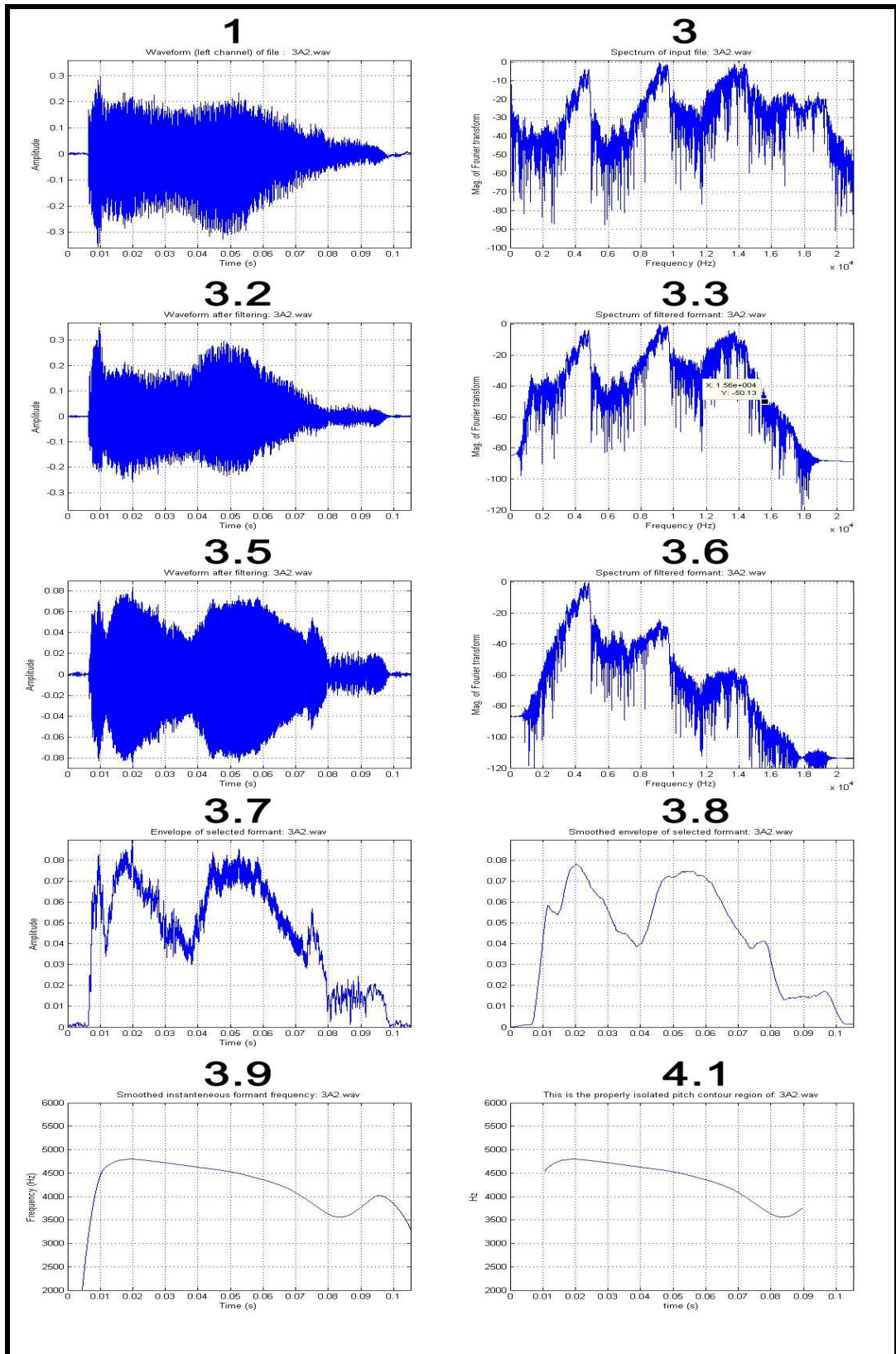


C

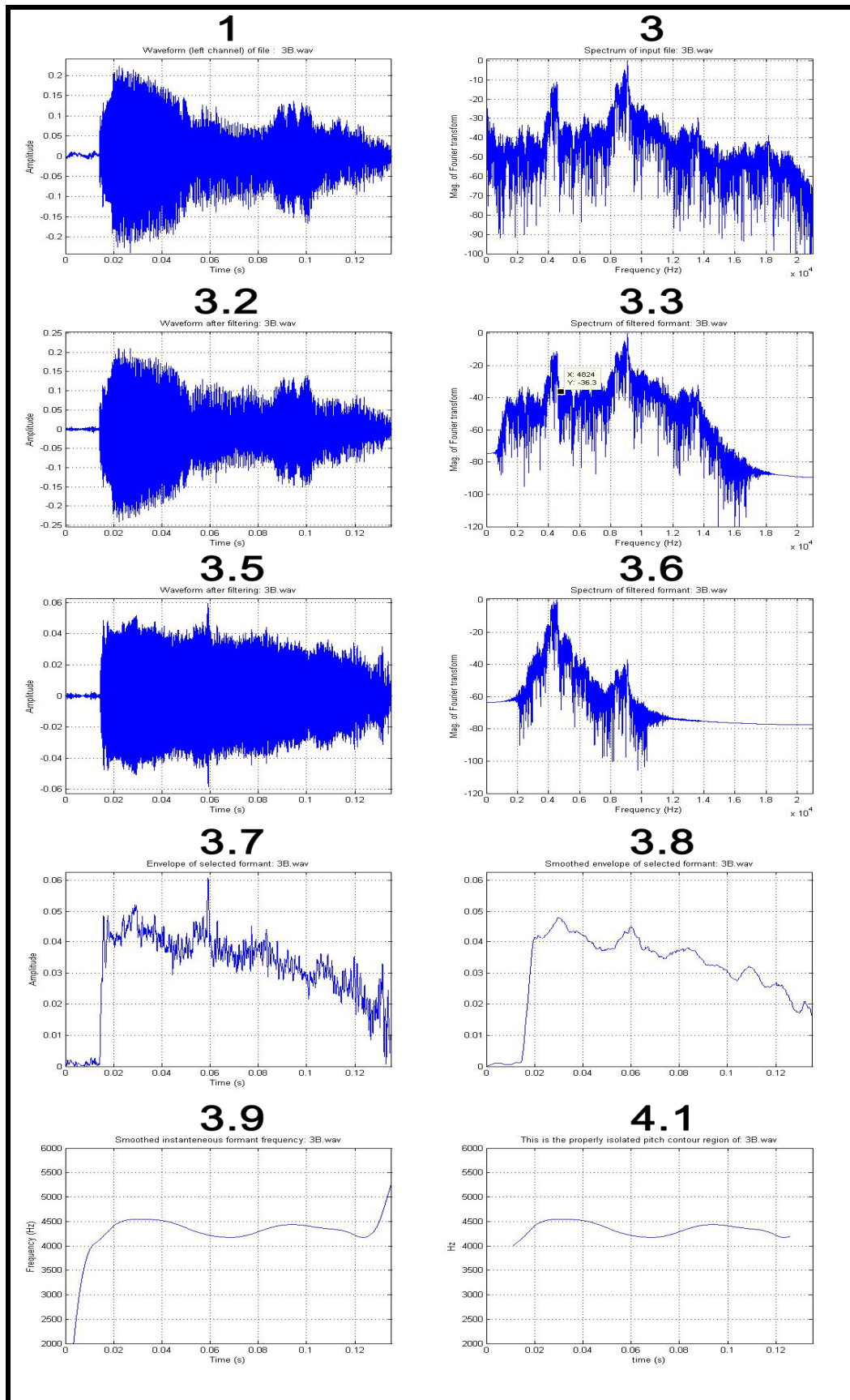


Ανάλυση ηχητικών μηνυμάτων Σχήματος 7
 Θηλυκά (A, B, C) και νεογνά (D, E, F) κατά την απομάκρυνση της μητέρας από την φωλιά

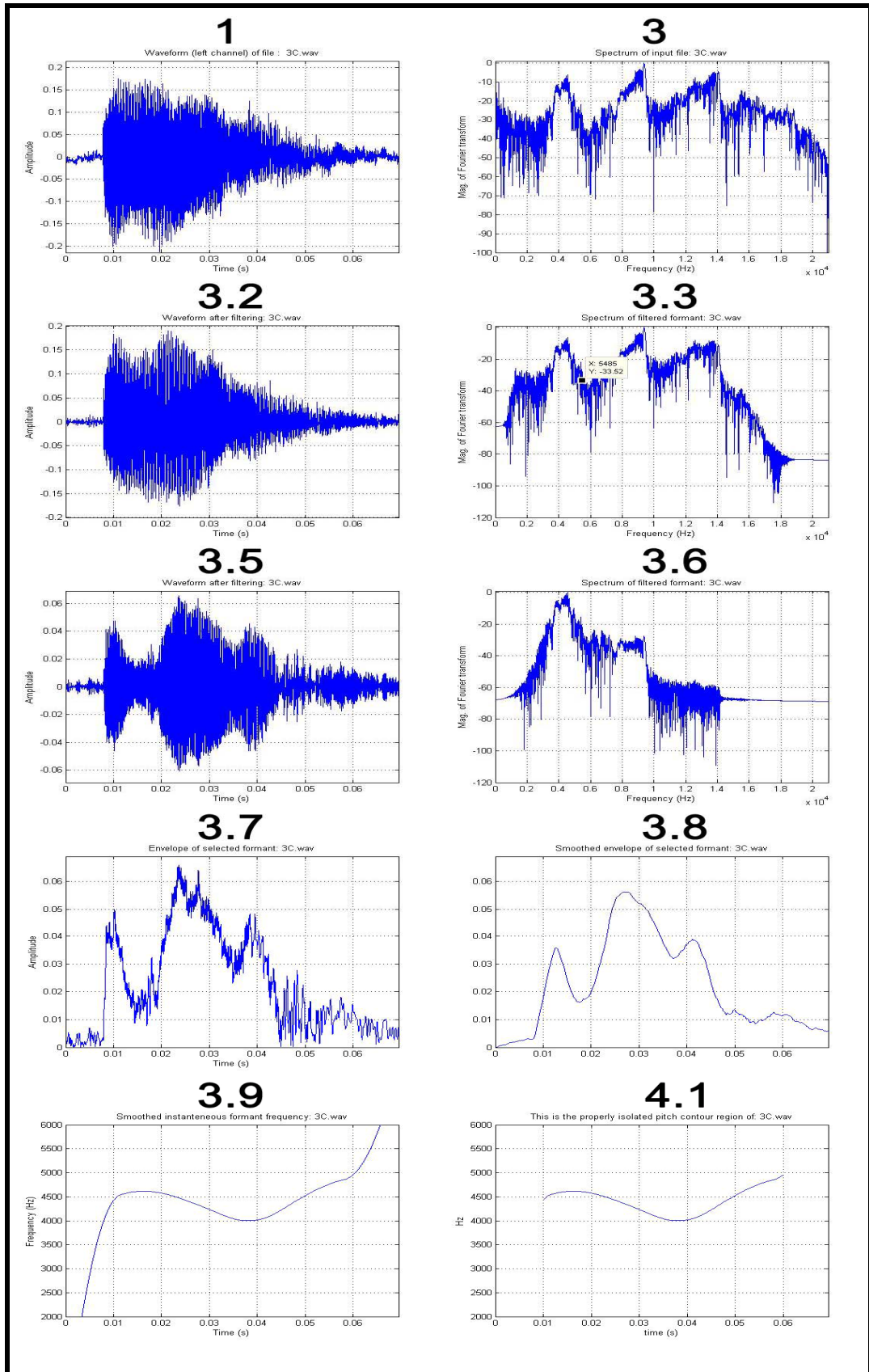
A (μητέρα)



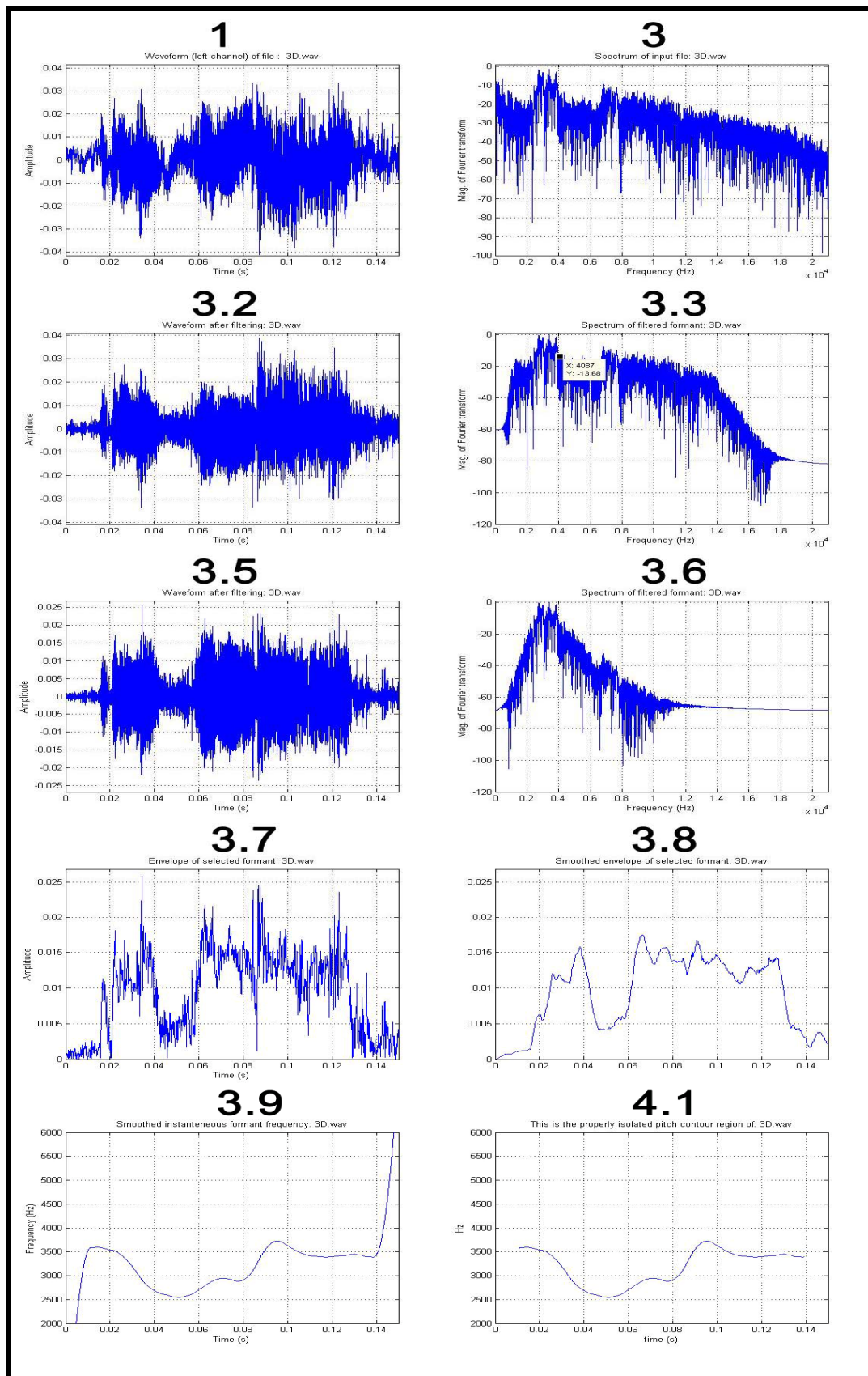
B (μητέρα)



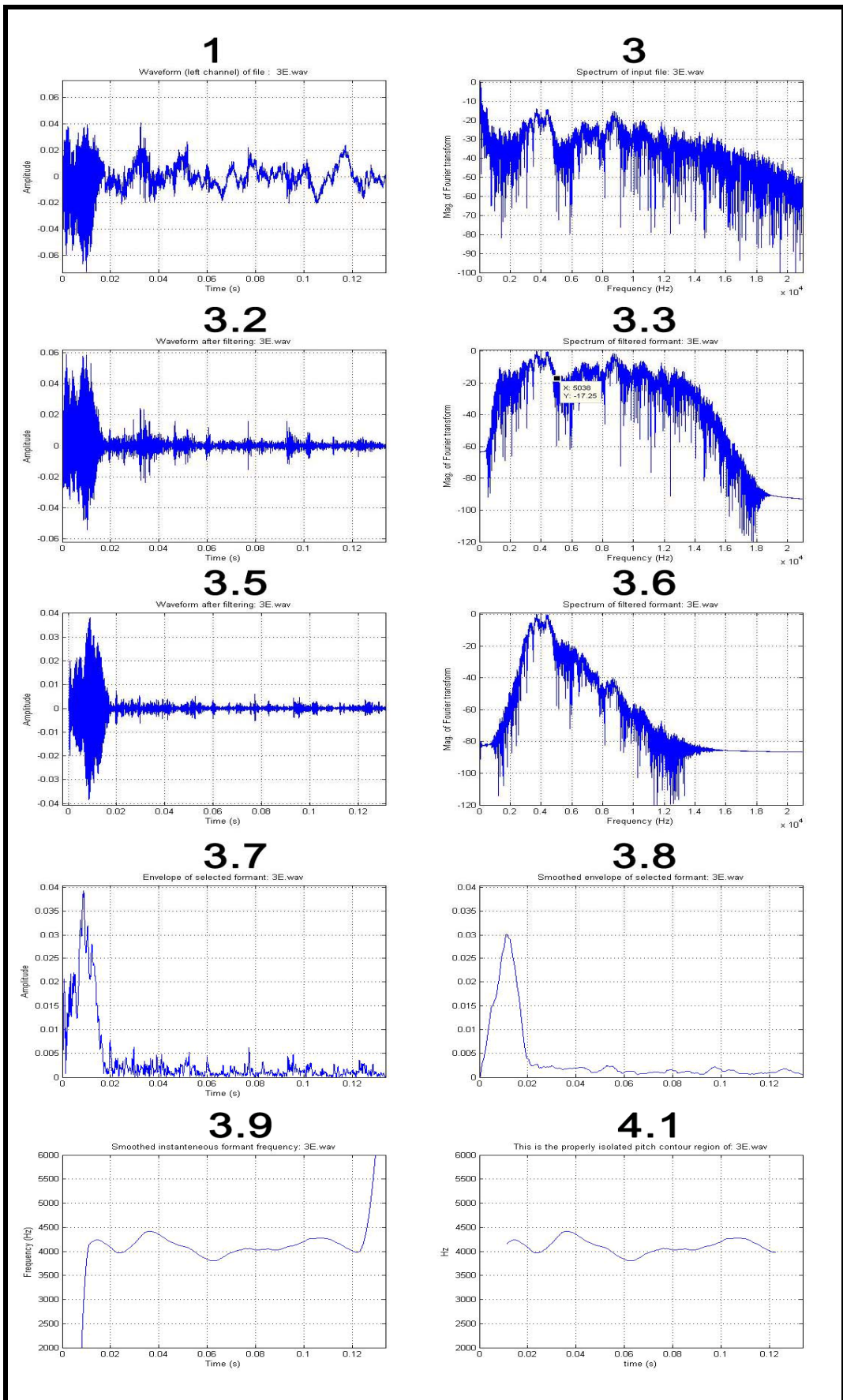
C (μητέρα)



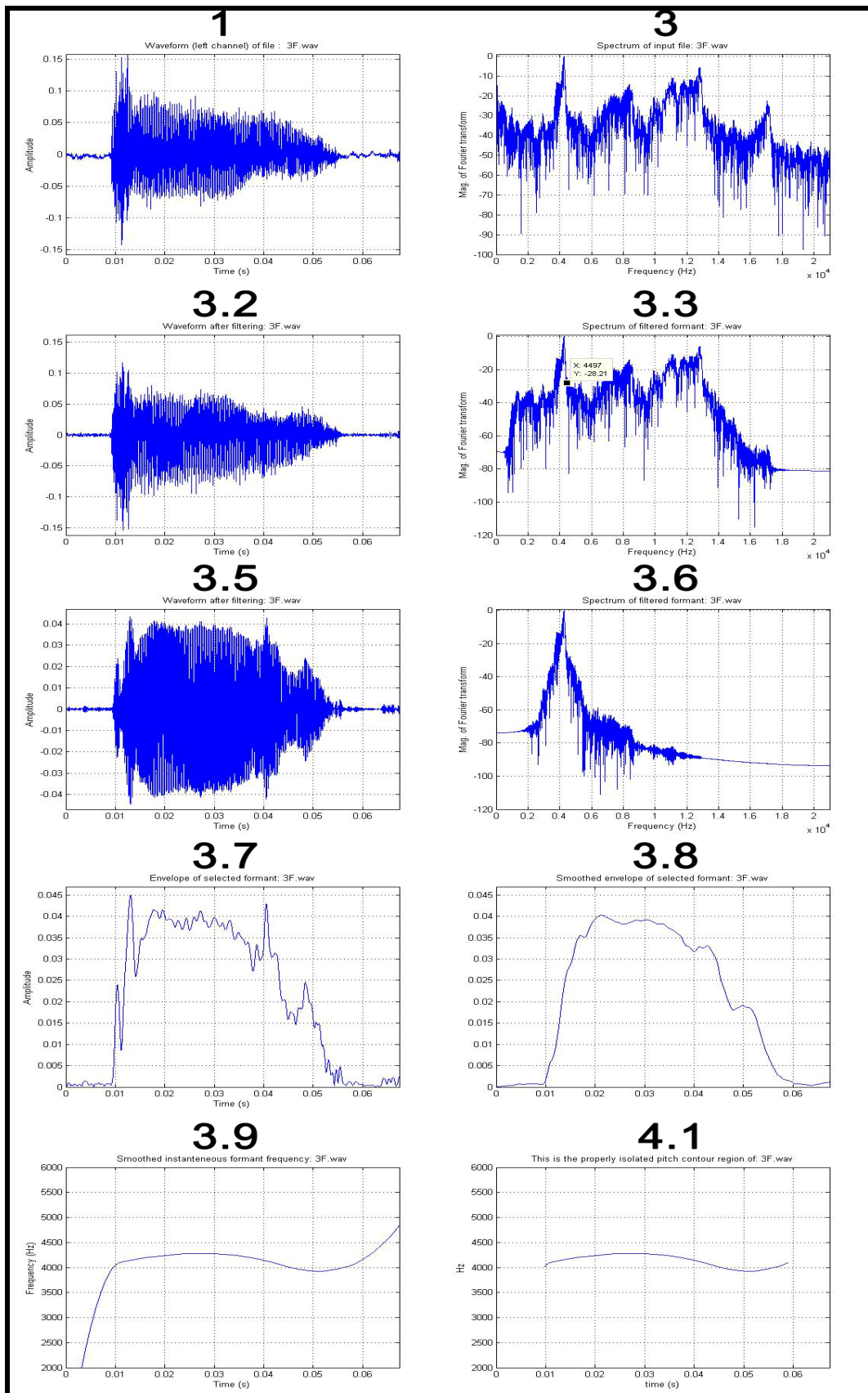
D (νεογνό)



E (νεογνό)

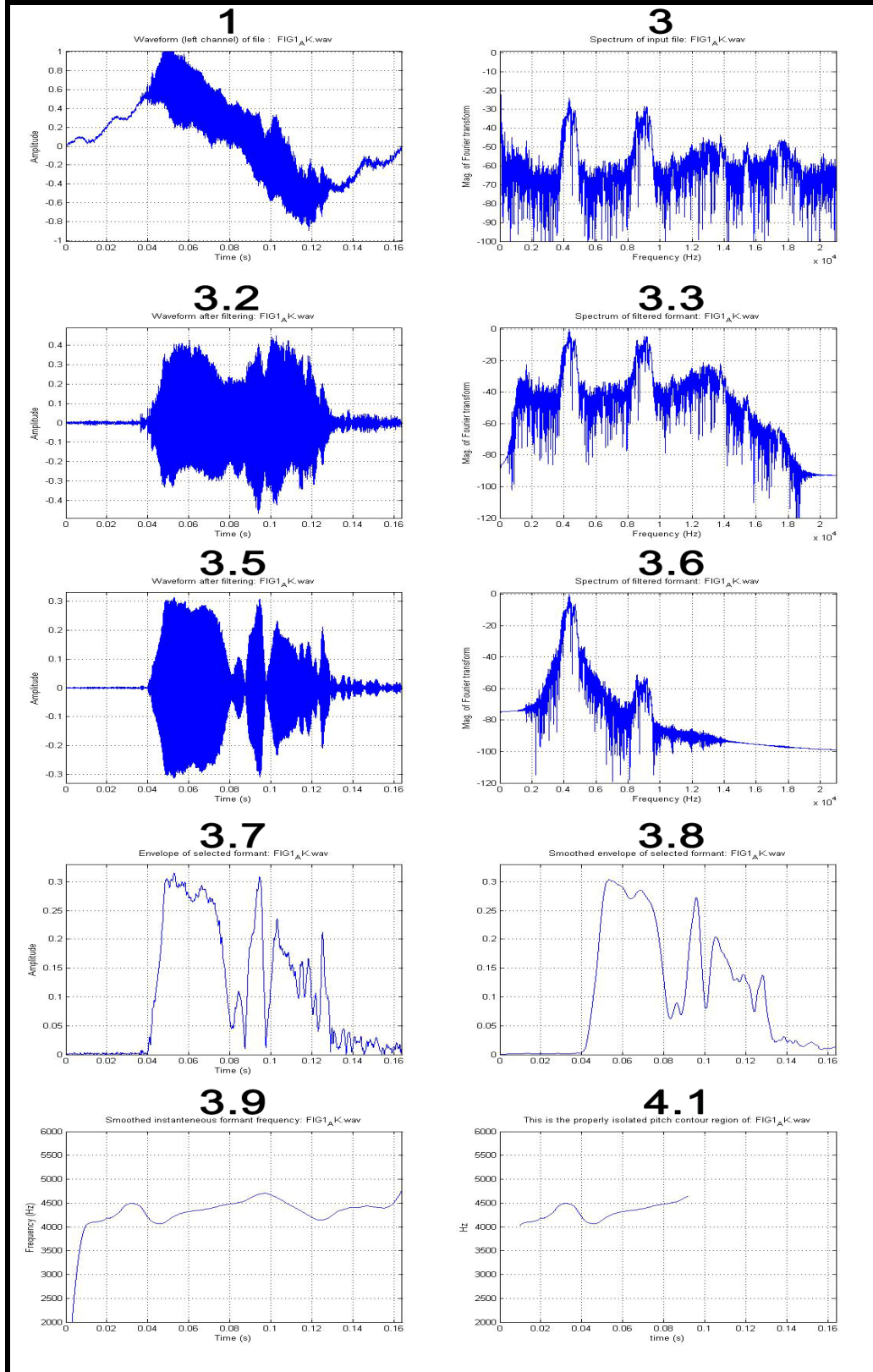


F (νεογνό)

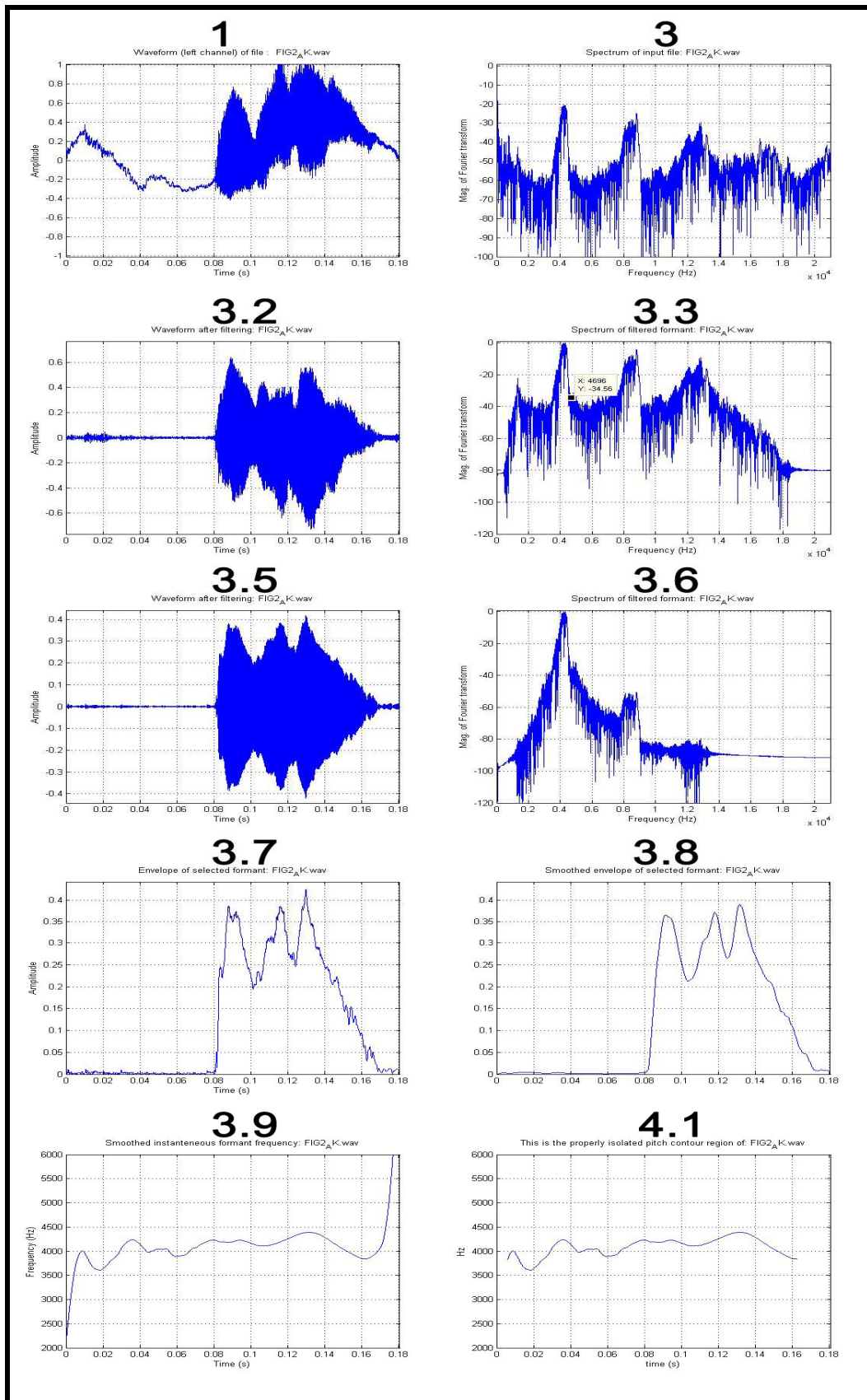


Ανάλυση ηχητικών μηνυμάτων Σχήματος 9
Ακουστό φάσμα (1A, 2A) και τα αντίστοιχα μηνύματα στο υπερηχητικό φάσμα (1B, 2B) κατά την διάρκεια συναισθήματος οργής/μίσους.

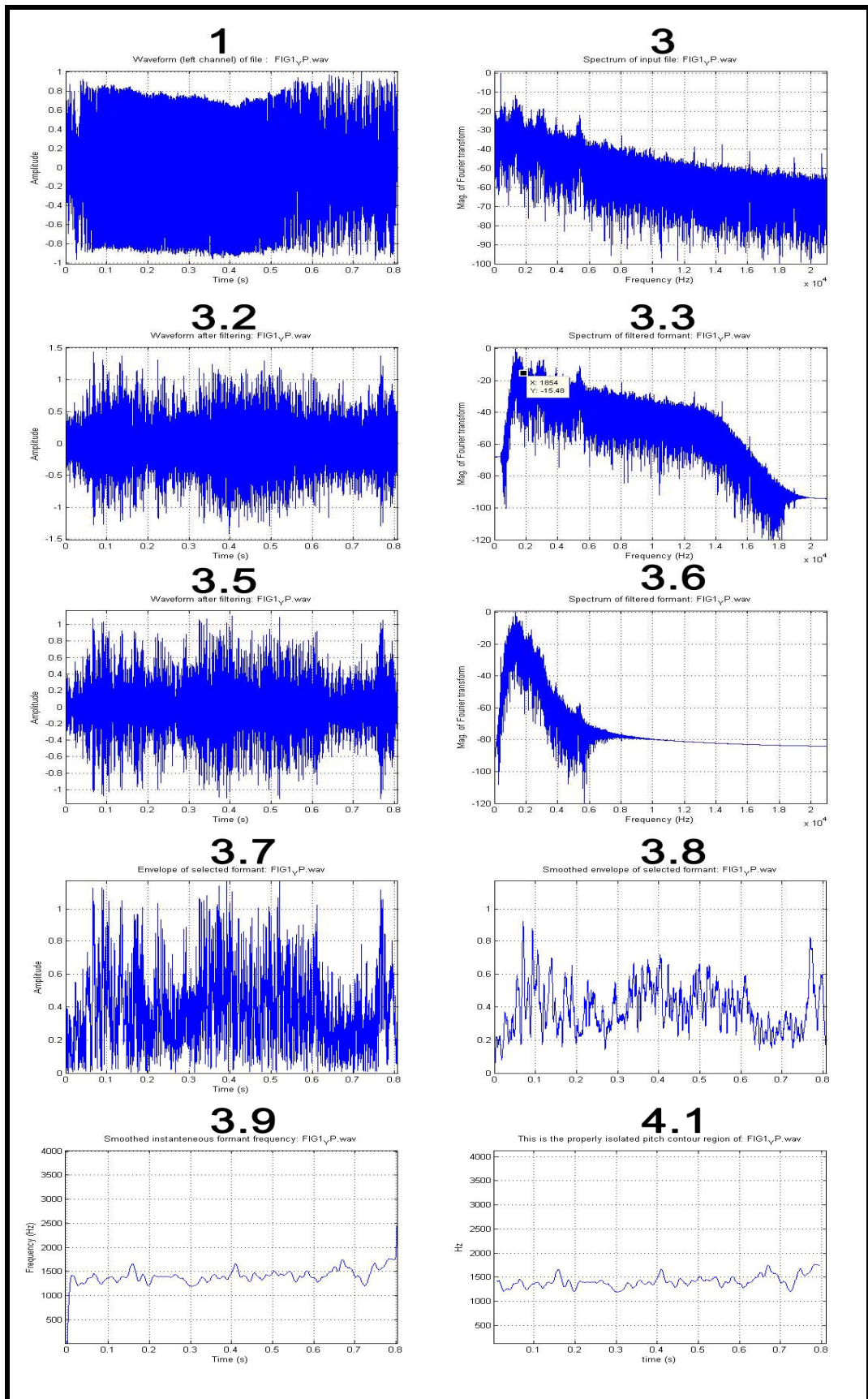
1A ΑΚΟΥΣΤΟ



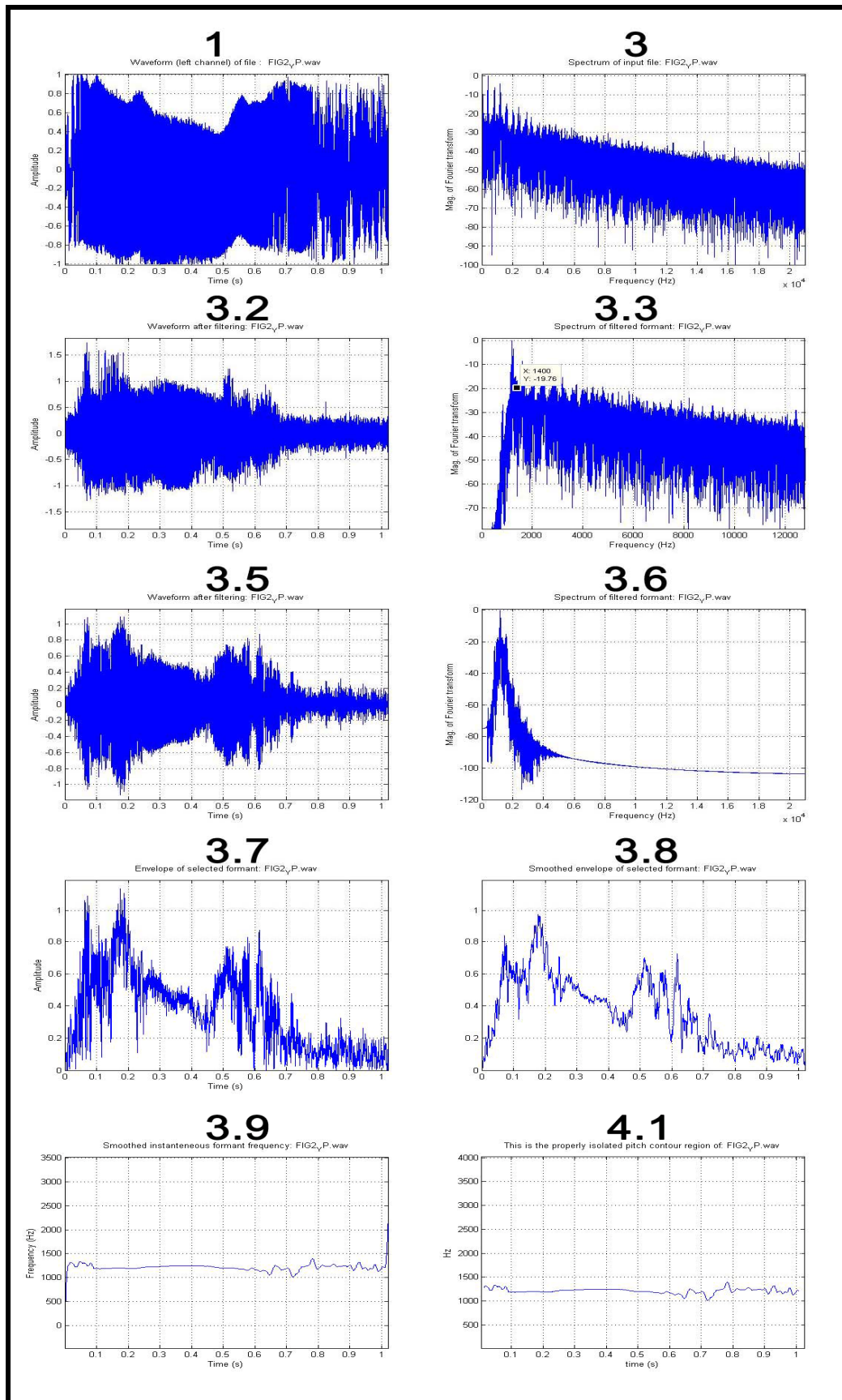
2Α ΑΚΟΥΣΤΟ



1B ΥΠΕΡΗΧΟΣ



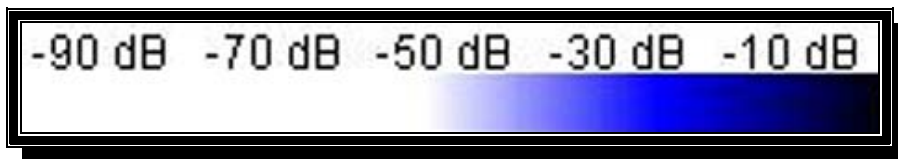
2B ΥΠΕΡΗΧΟΣ



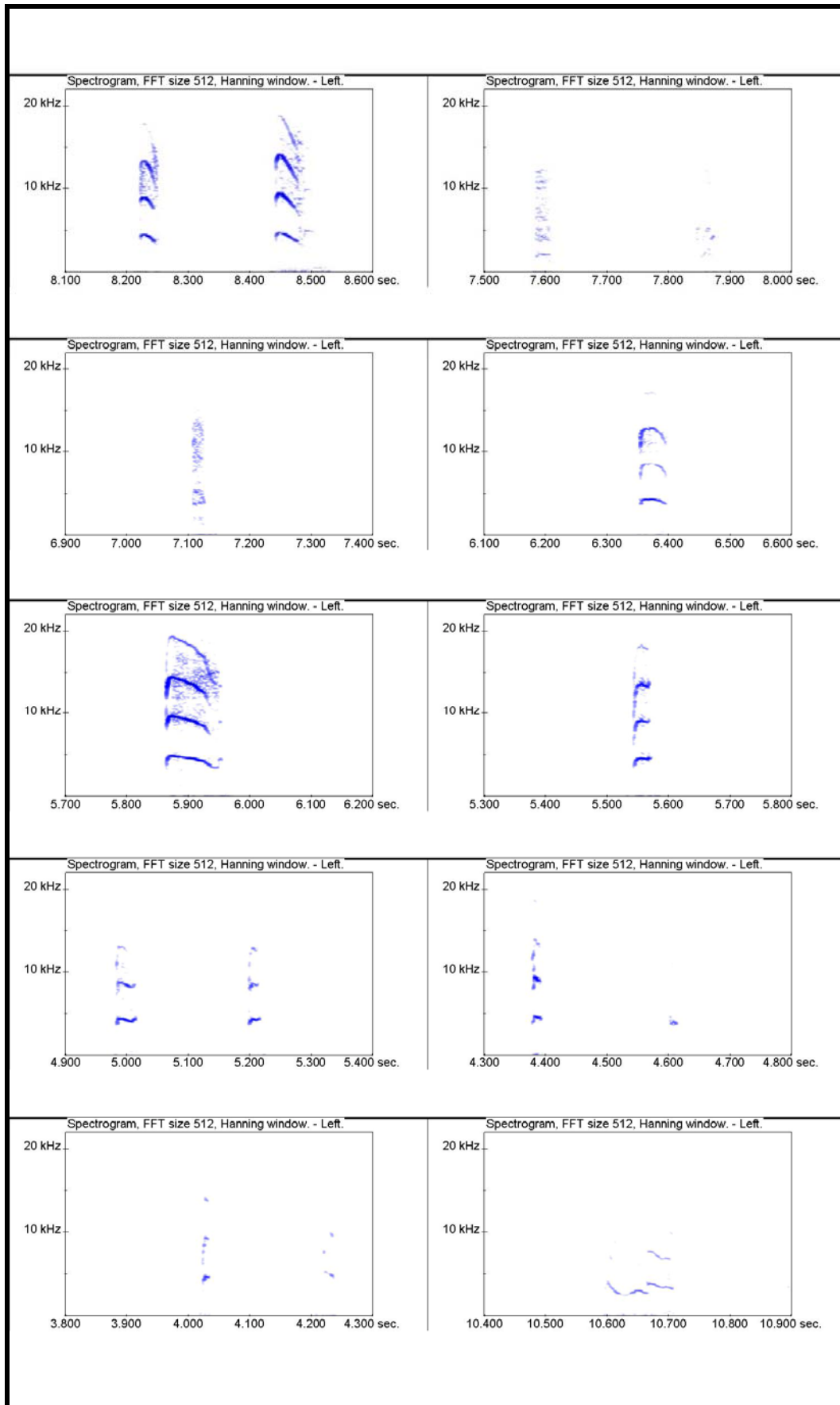
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

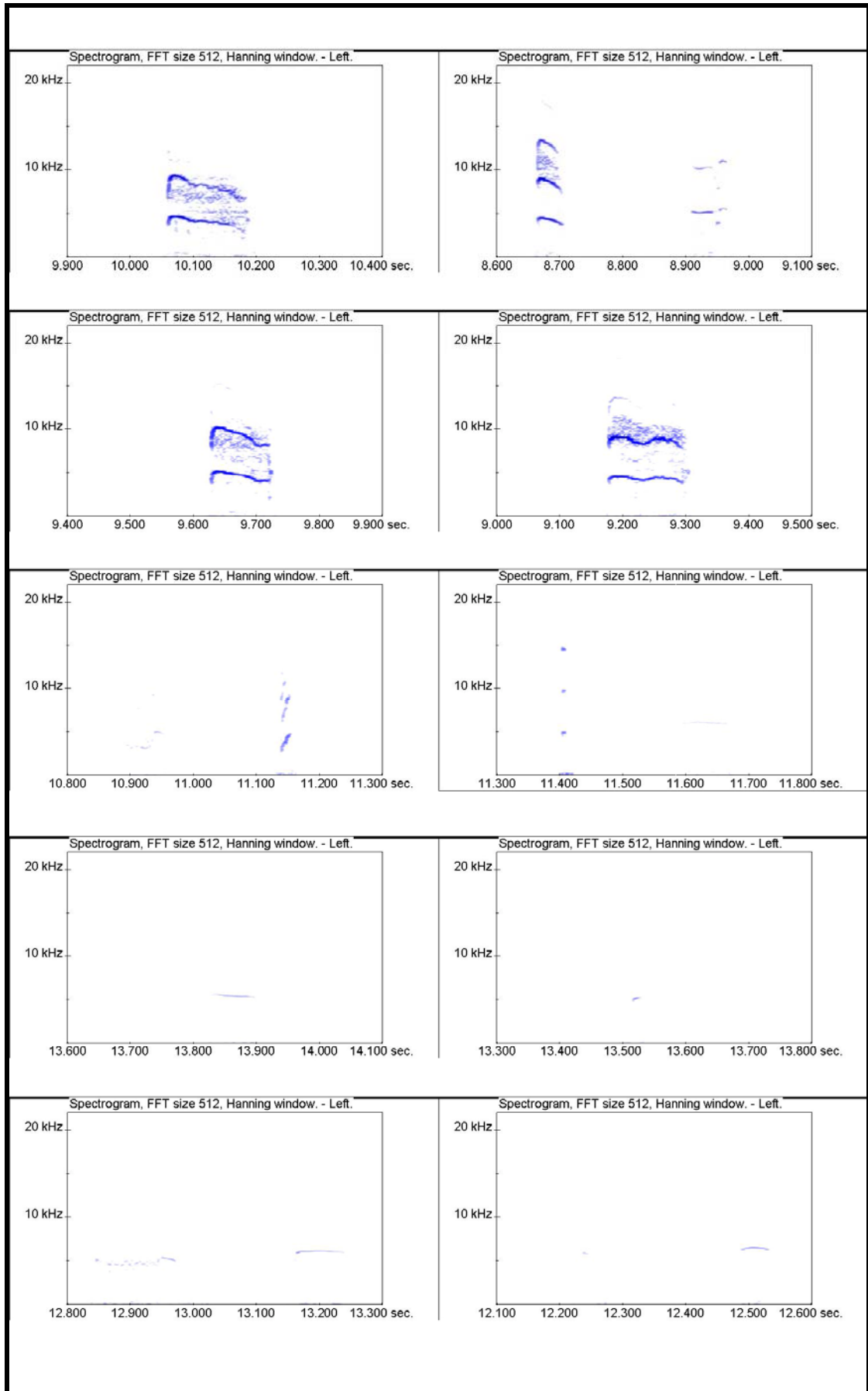
ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΑ

Χρωματικές ενδείξεις για τα dB:

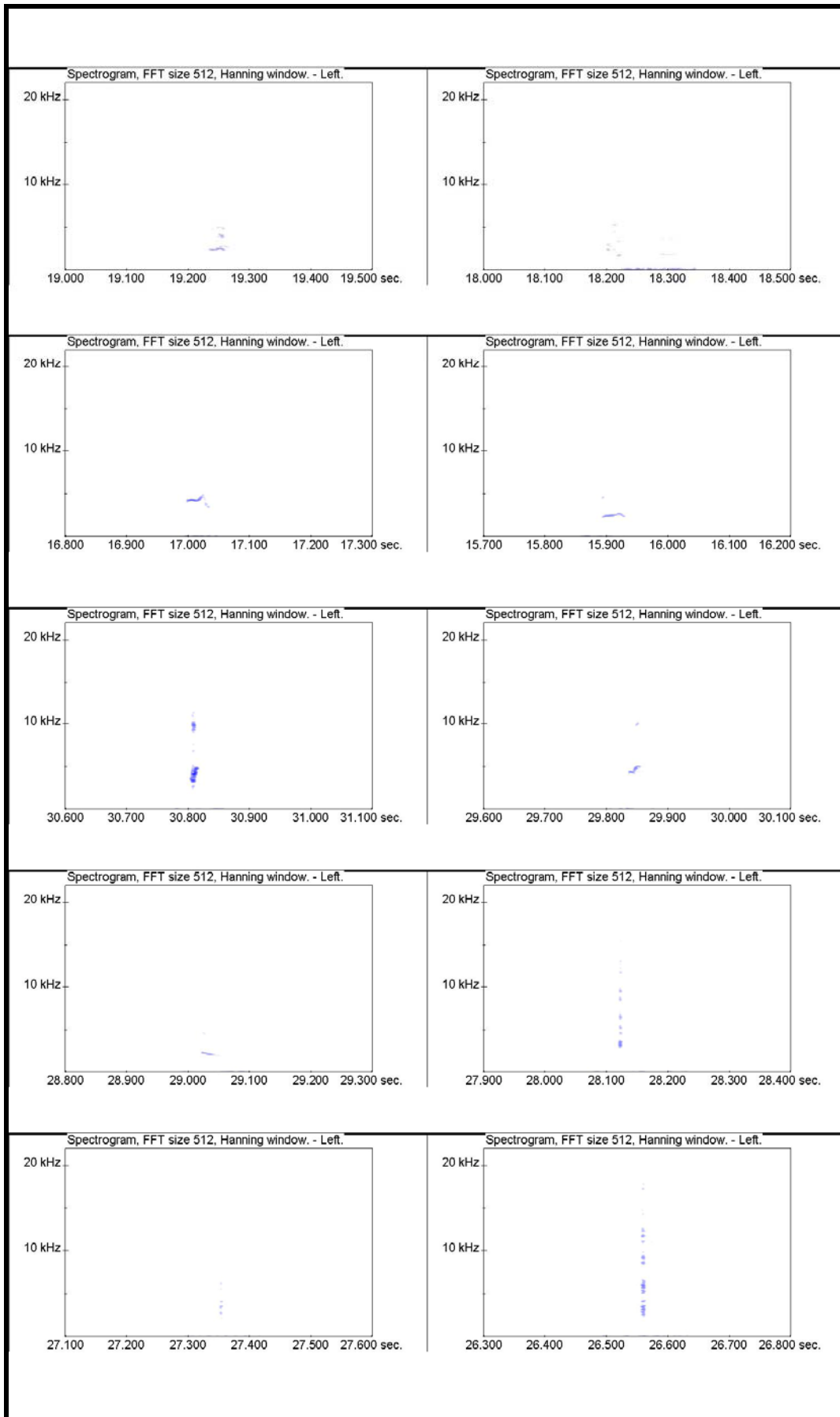


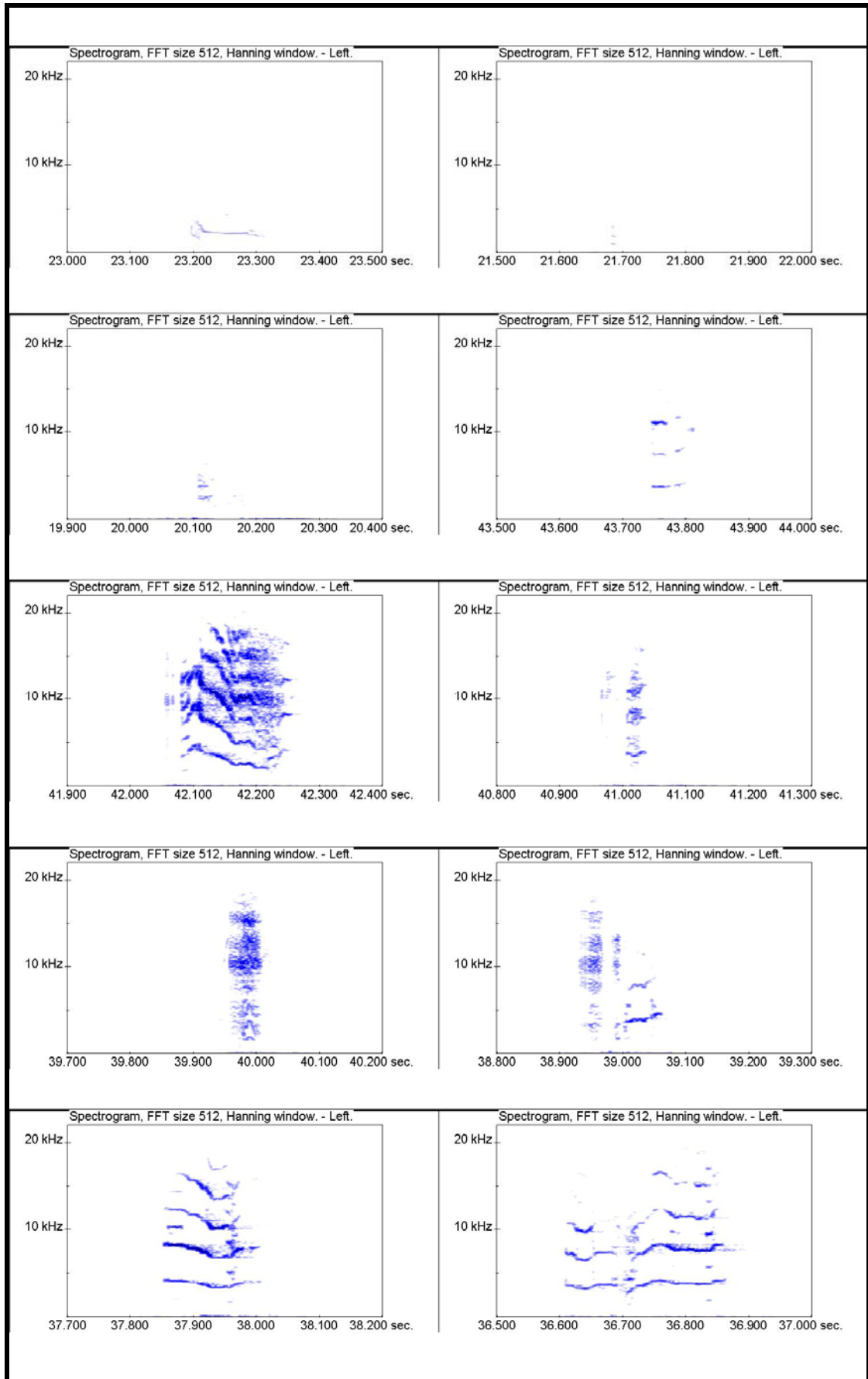
Μητέρα-παιδιά

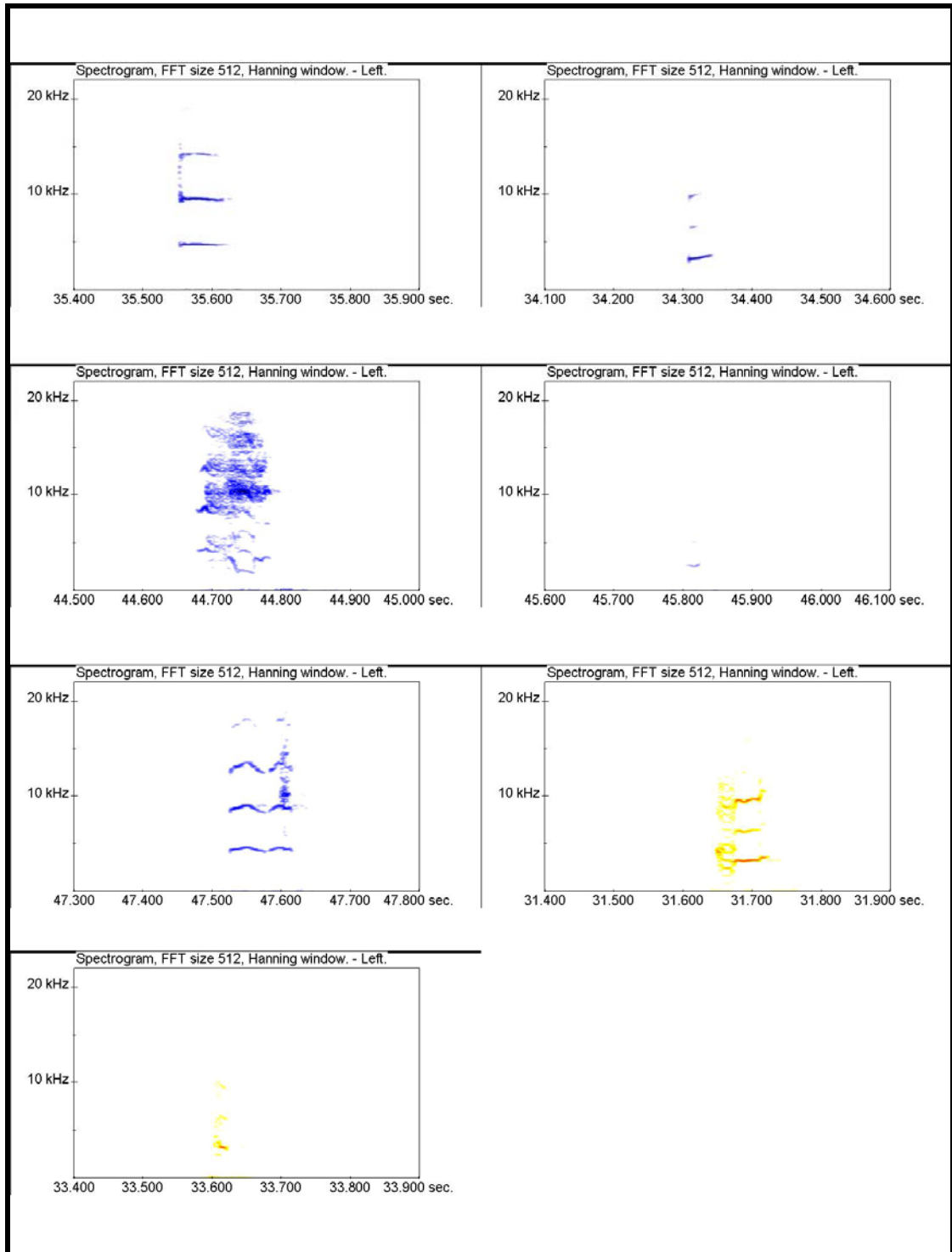




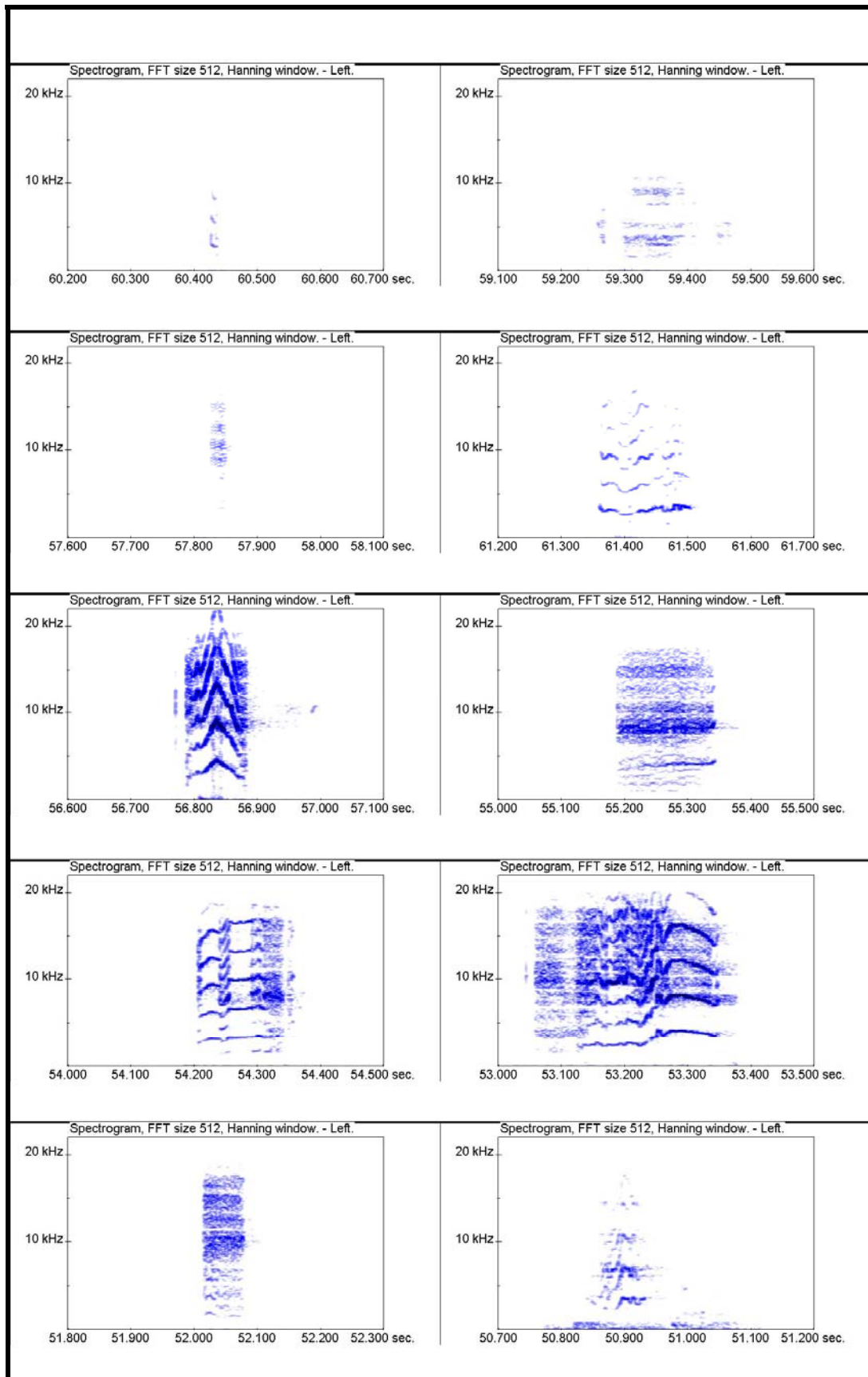
Κορίτσια (πόνος-τρόμος)

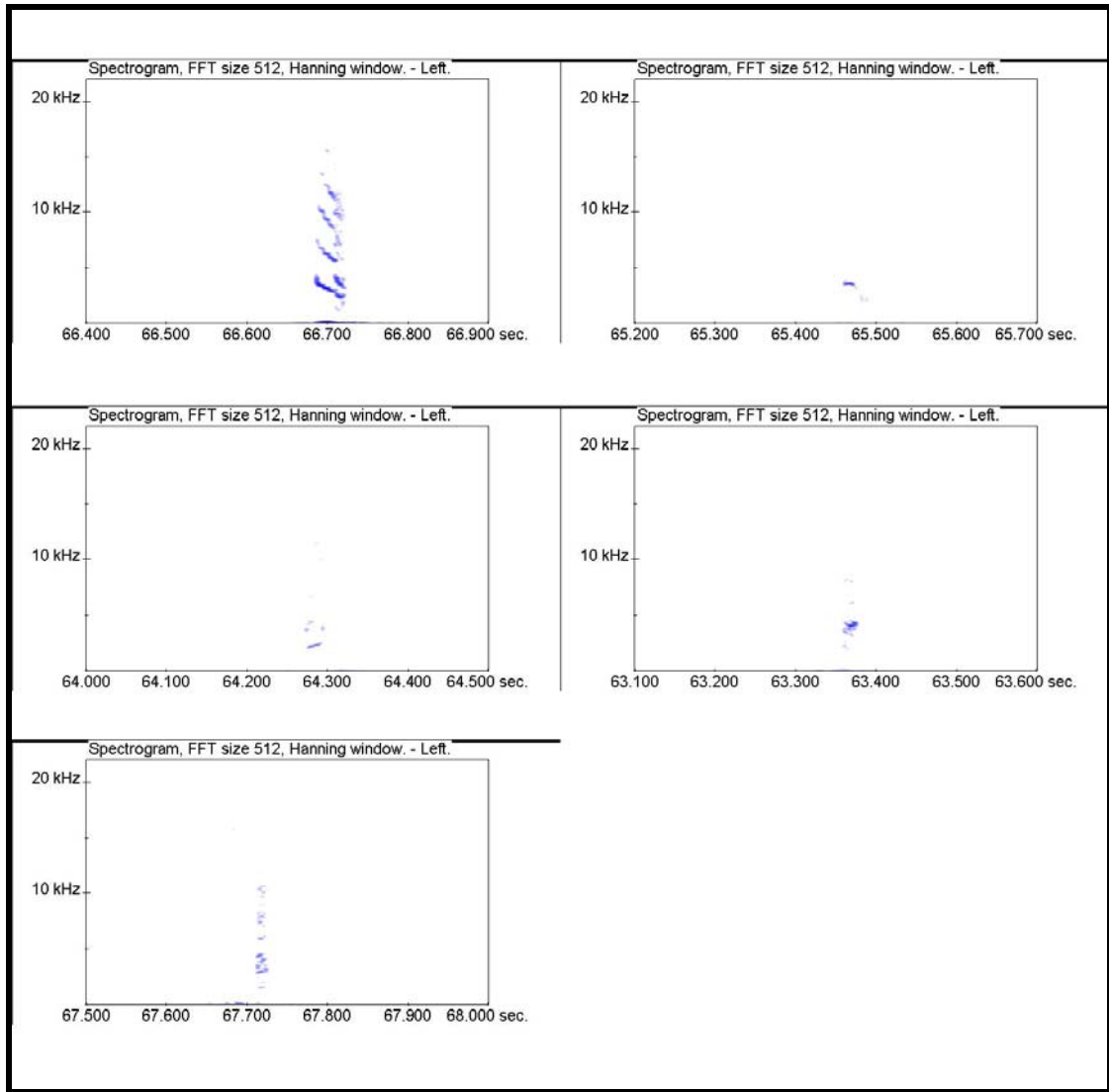




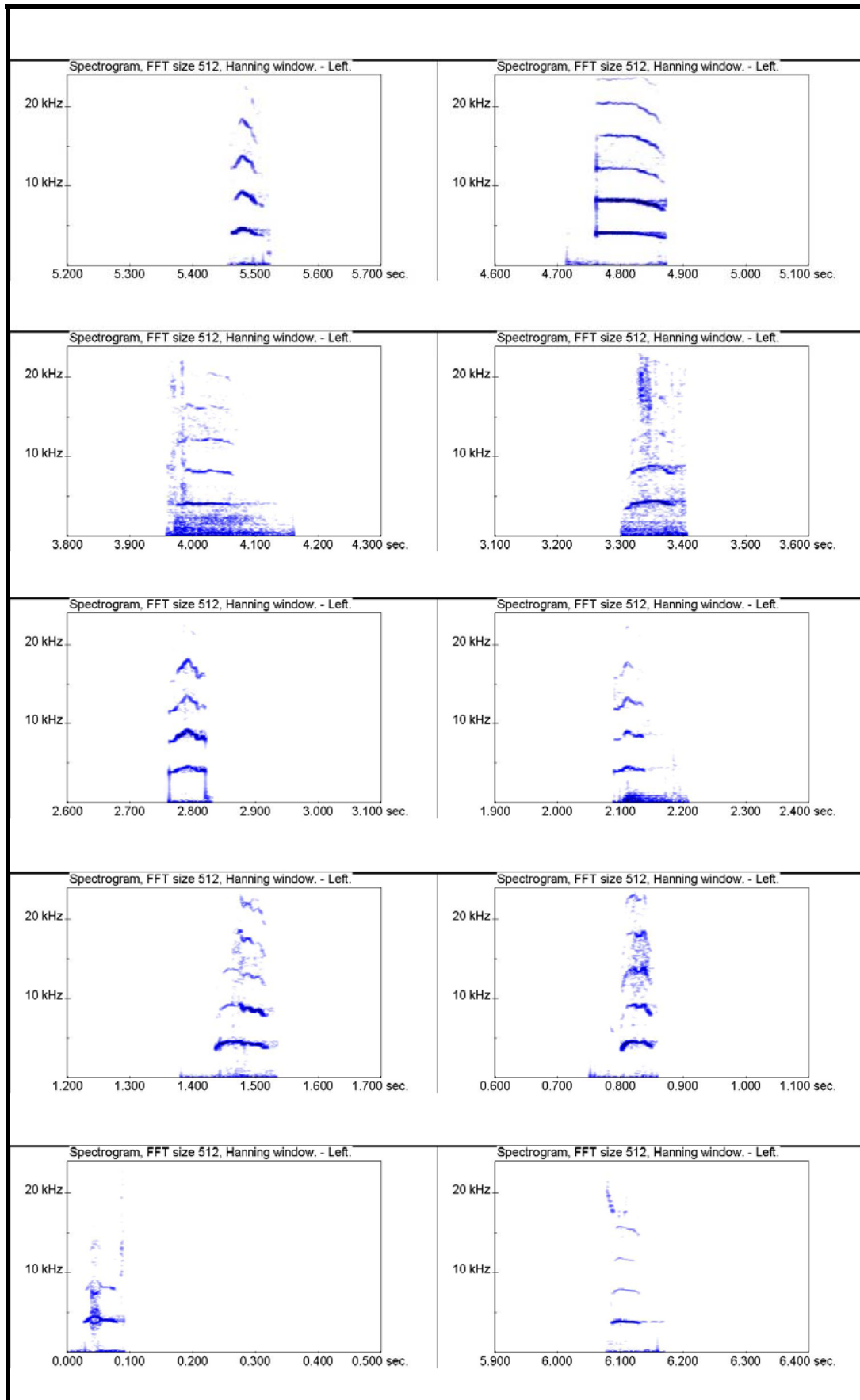


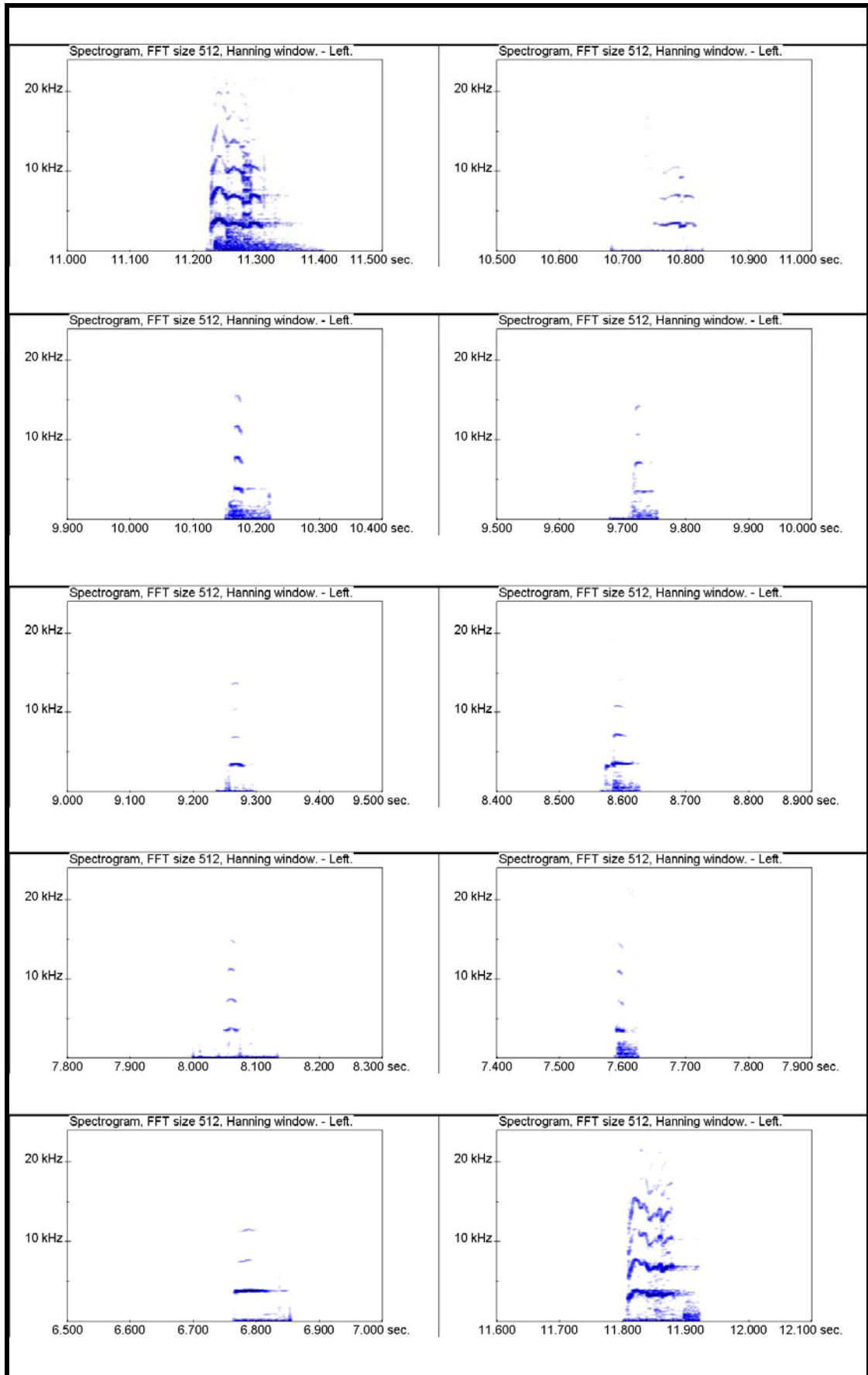
Αγόρια (πόνος-τρόμος)

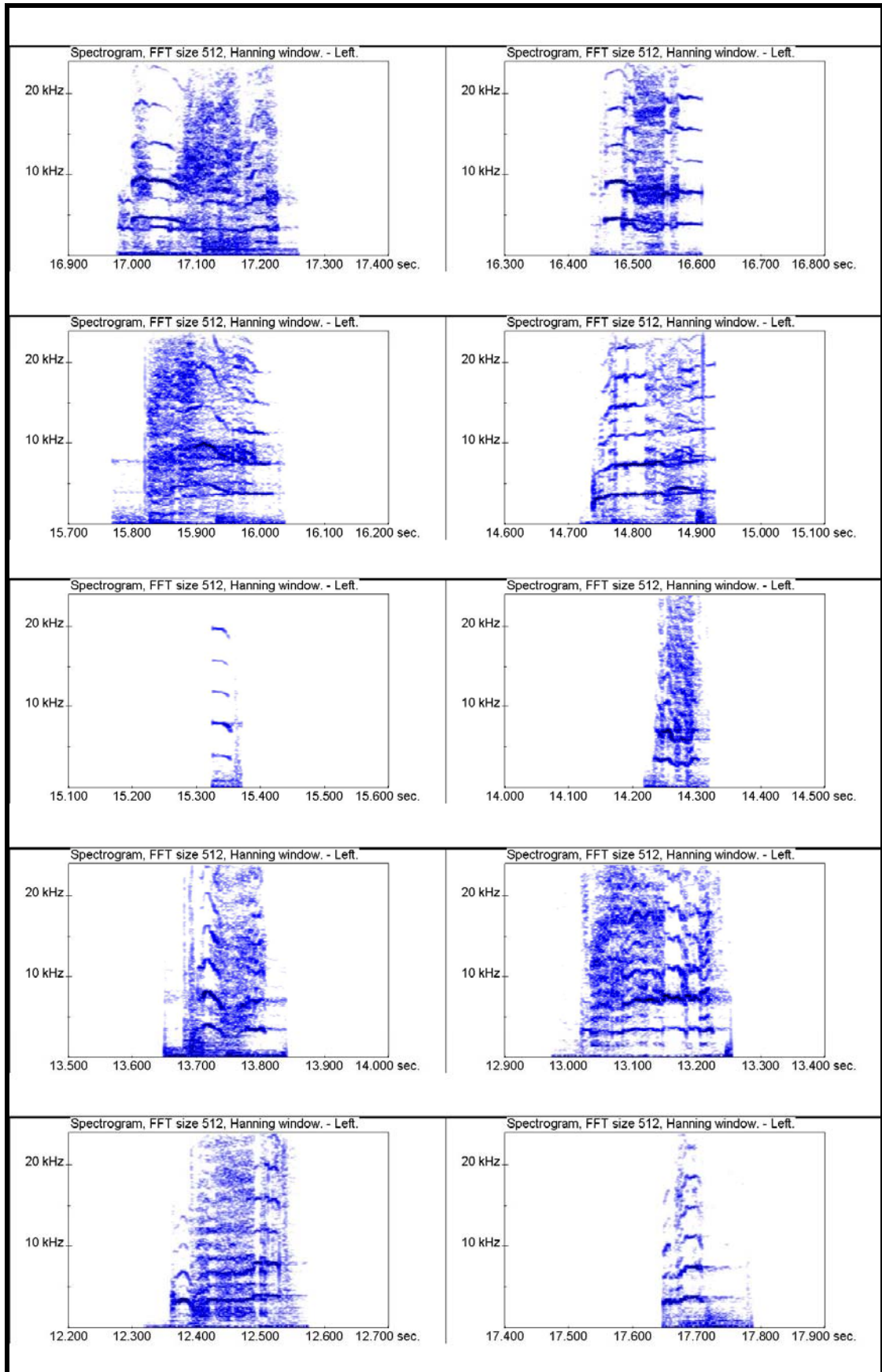


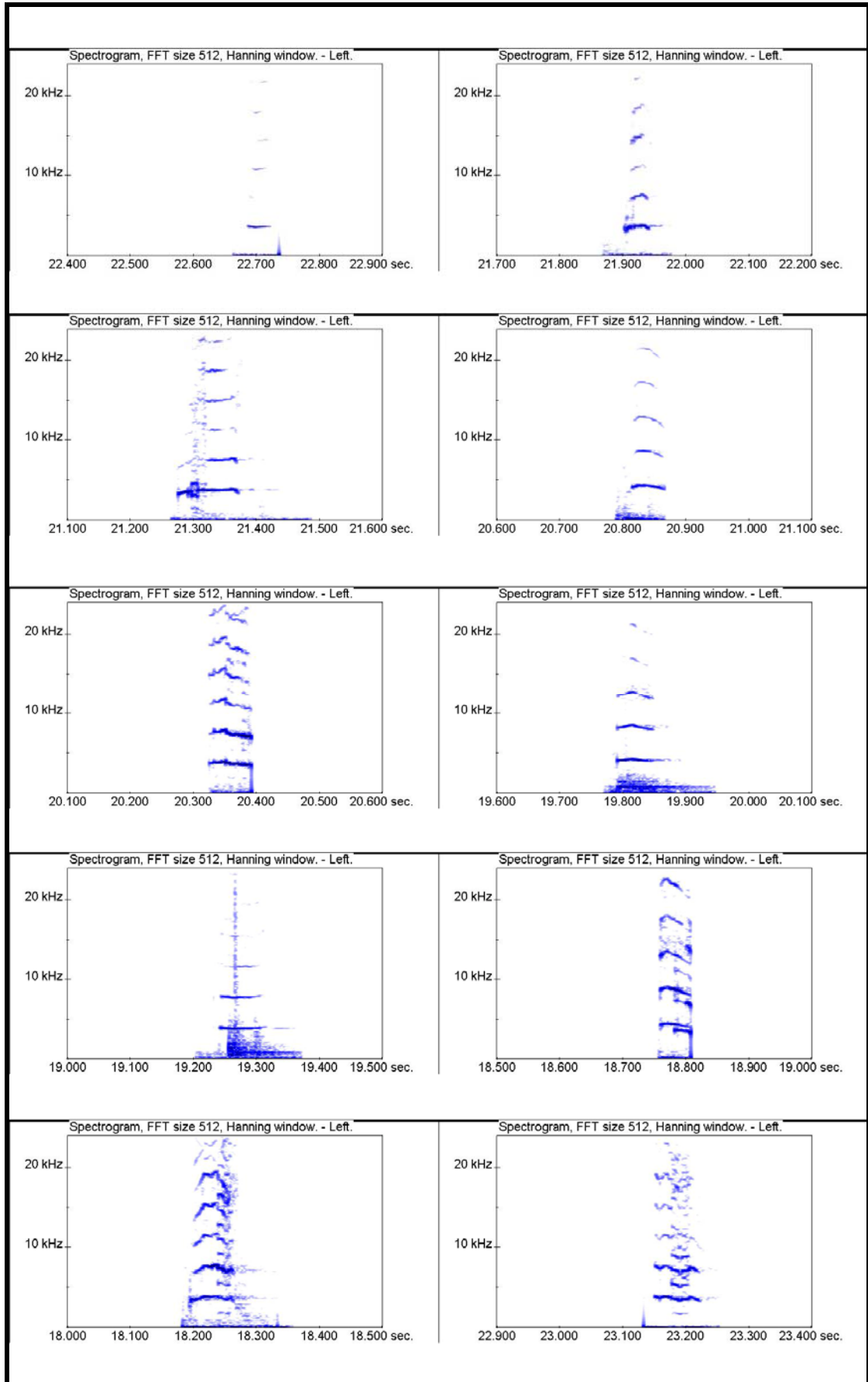


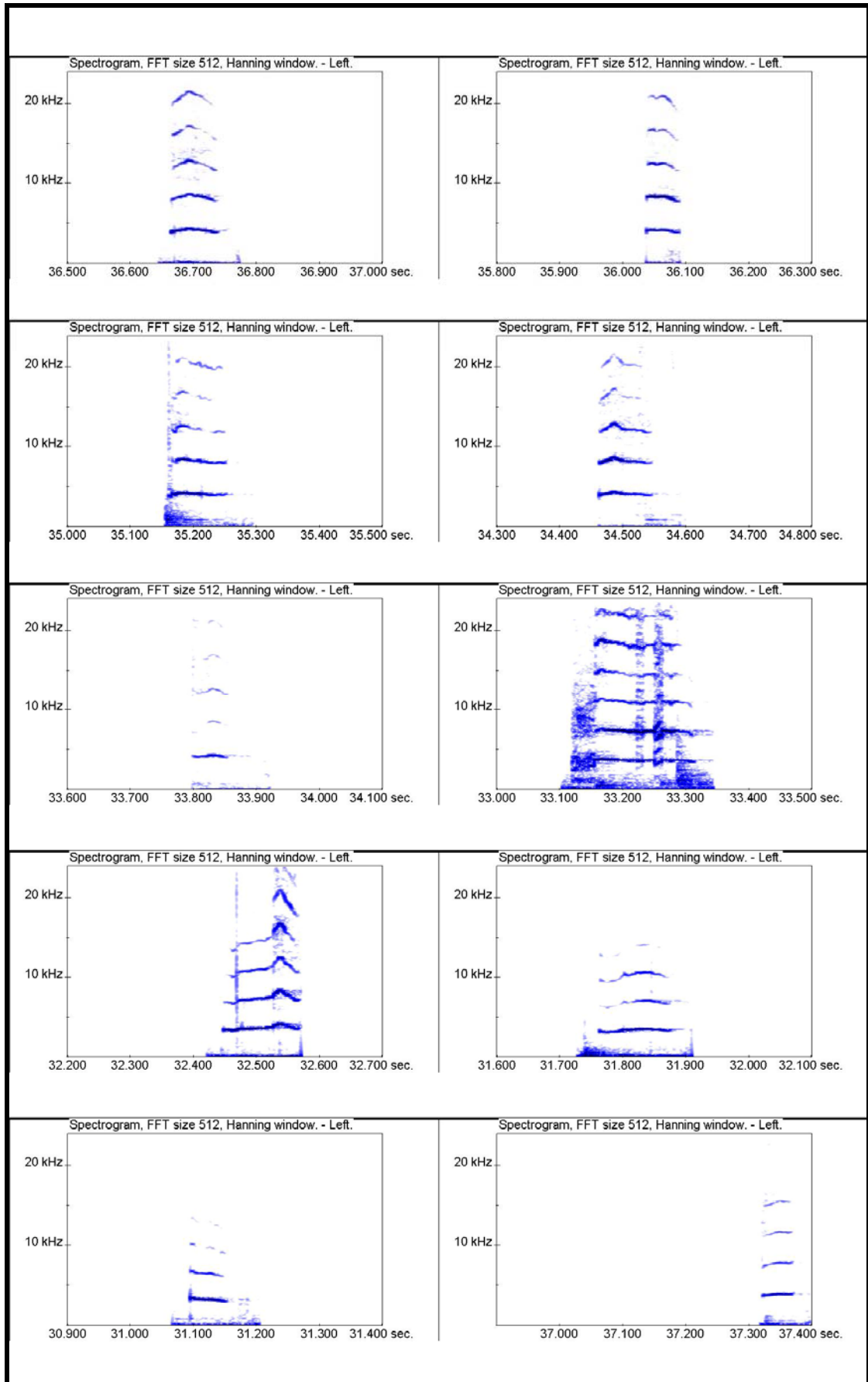
Τσακωμός (μίσος-οργή)

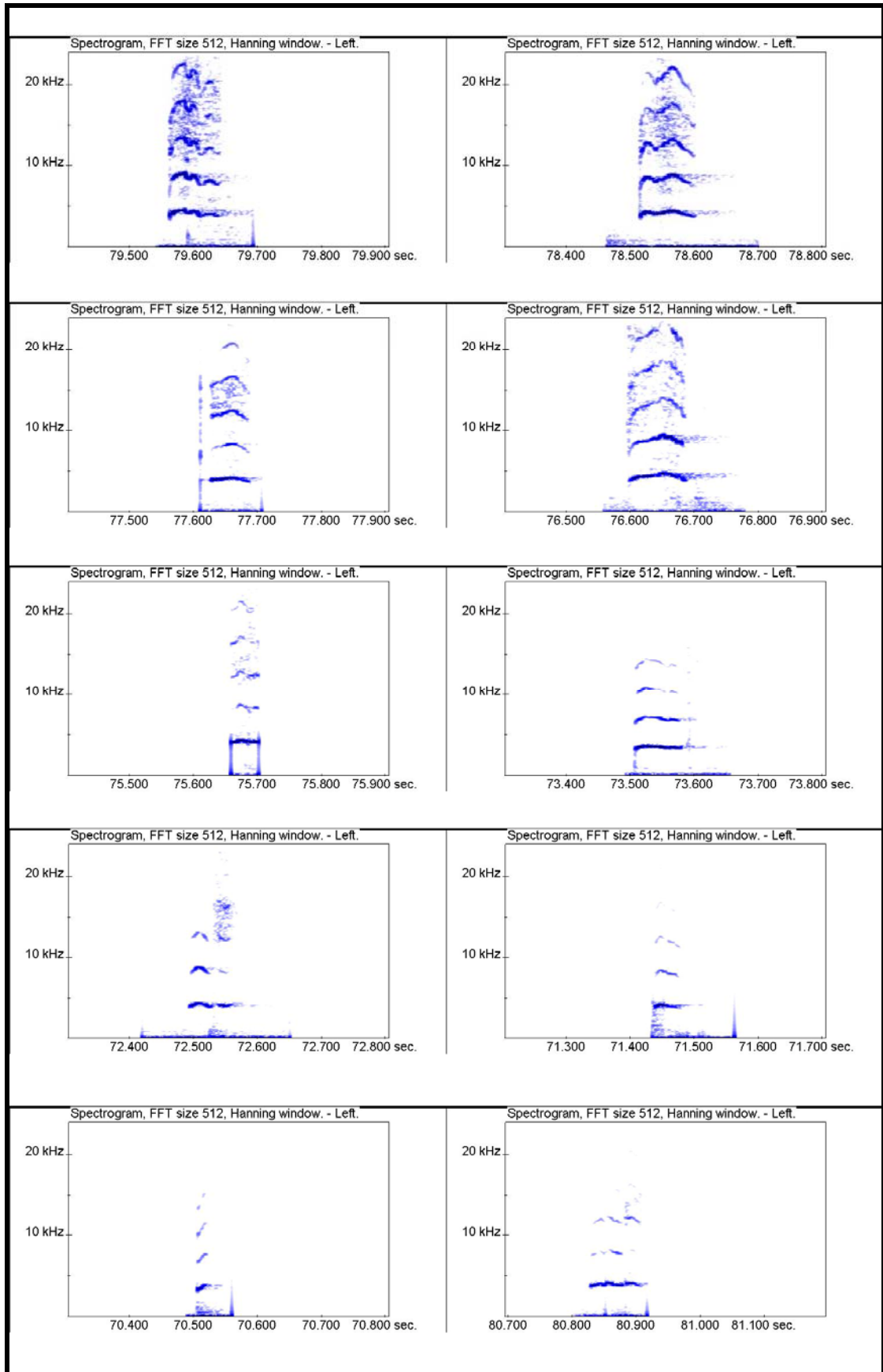












πόνος-τρόμος (αγόρια και κορίτσια)

