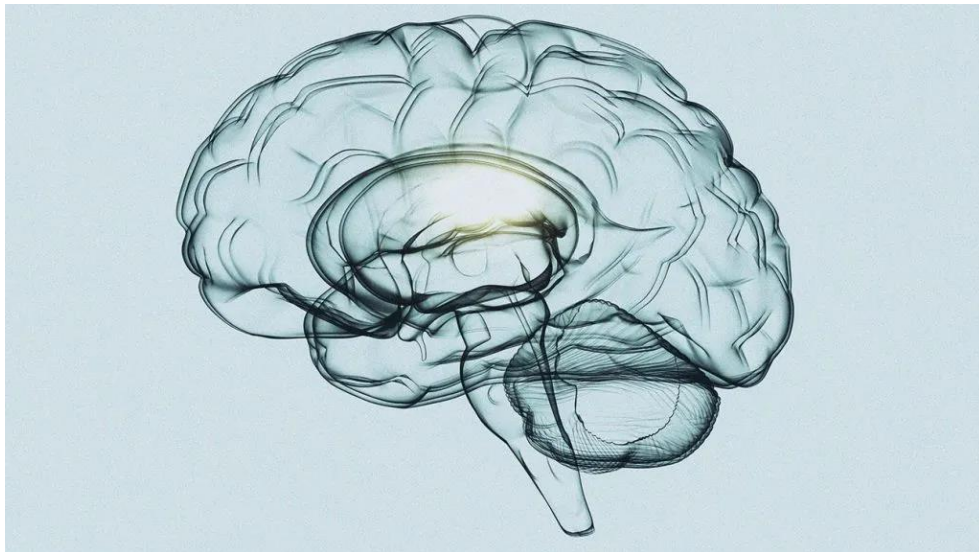




Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ο ρόλος των δοτών μονοξειδίου του αζώτου (NO) στις αγχώδεις διαταραχές
The role of nitric oxide (NO) donors in anxiety disorders



Ελένη Περιστέρη του Μιλτιάδη

ΛΑΡΙΣΑ, 2022

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- **Πιτσίκας Νικόλαος**, Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Επιβλέπων)
- **Ψαρρά Άννα-Μαρία**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Συνεπιβλέπουσα)
- **Δήμας Κωνσταντίνος**, Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Μέλος)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1. Άγχος και αγχώδεις διαταραχές.....	8
1.1.1. Ιδιοψυχαναγκαστική διαταραχή (Obsessive Compulsive Disorder-OCD).....	9
• Νευροβιολογική βάση της ιδιοψυχαναγκαστικής διαταραχής.....	10
1.1.2. Μετατραυματικό stress (Post-traumatic stress disorder-PTSD).....	11
• Νευροβιολογική βάση του μετατραυματικού stress.....	11
1.2. Σύγχρονες θεραπευτικές προσεγγίσεις.....	12
1.2.1. Διαβίβαση με γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) και άγχος.....	12
1.2.2. Διαβίβαση με σεροτονίνη (5-HT) και άγχος.....	12
1.2.3. Κατηγορίες φαρμάκων που χρησιμοποιούνται έως σήμερα.....	13
• Βενζοδιαζεπίνες.....	13
• Αζαπρόνες.....	13
• Αντικαταθλιπτικά (SSRIs, SNRIs).....	14
• Αντιεπιληπτικά.....	14
• Ζολπιδέμη.....	15
1.3. Μονοξείδιο του αζώτου (NO).....	16
1.3.1. Σύνθεση του NO και σηματοδότηση.....	16
• Συνθάσες του μονοξειδίου του αζώτου (NO).....	16
• Σύνθεση του μονοξειδίου του αζώτου (NO).....	17
• Σηματοδότηση μέσω μονοξειδίου του αζώτου (NO).....	18
1.3.2. Δράσεις του NO, Νευροπροστασία, Νευροτοξικότητα.....	20
1.3.3. Μονοξείδιο του αζώτου (NO) και άγχος.....	22
• Γενετικές μελέτες.....	22
• Ιστολογικές μελέτες.....	22
• Φαρμακολογικές μελέτες.....	23
1.3.4. Δότες του μονοξειδίου του αζώτου.....	23
• Νιτροπρωσσικό νάτριο (SNP).....	25
• Μολσιδομίνη.....	27
1.3.5. Δότες του μονοξειδίου του αζώτου και άγχος.....	28
ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	32
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ.....	33
2.1. Πειραματόζωα.....	33
2.2. Συμπεριφορικές τεχνικές.....	34
2.2.1. Πειραματικό πρότυπο ιδιοψυχαναγκαστικής διαταραχής.....	34
• Υπερβολικός αυτοκαθαρισμός.....	34
• Πειραματικό πρωτόκολλο.....	35

2.2.2.	Πειραματικό πρότυπο μετατραυματικού στρες.....	36
	• Συμπεριφορά «παγώματος».....	36
	• Πειραματικό πρωτόκολλο.....	37
2.3.	Αντιδραστήρια.....	39
2.4.	Πειράματα.....	40
2.4.1.	Πείραμα 1: Επίδραση του SNP επί του υπερβολικού αυτοκαθαρισμού, προκληθέντα από τον αγωνιστή του σεροτονεργικού 5-HT _{2C} υποδοχέα, 1-μετα-χλωροφαινυλιπεραζίνη (mCPP).....	40
2.4.2.	Πείραμα 2: Επίδραση του SNP στη συμπεριφορά των επιμύων στη δοκιμασία του πλαίσιο-εξαρτώμενου φόβου.....	41
2.4.3.	Πείραμα 3: Επίδραση της μολσιδομίνης επί του υπερβολικού αυτοκαθαρισμού, προκληθέντα από τον αγωνιστή του σεροτονεργικού 5-HT _{2C} υποδοχέα, 1-μετα-χλωροφαινυλιπεραζίνη (mCPP).....	41
2.4.4.	Πείραμα 4: Επίδραση της μολσιδομίνης στη συμπεριφορά των επιμύων στη δοκιμασία του πλαίσιο-εξαρτώμενου φόβου.....	42
2.5.	Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.....	43
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	44
3.1.	Πείραμα 1: Επίδραση του SNP επί του υπερβολικού αυτοκαθαρισμού, προκληθέντα από τον αγωνιστή του σεροτονεργικού 5-HT _{2C} υποδοχέα, 1-μετα-χλωροφαινυλιπεραζίνη (mCPP).....	44
3.2.	Πείραμα 2: Επίδραση του SNP στη συμπεριφορά των επιμύων στη δοκιμασία του πλαίσιο-εξαρτώμενου φόβου.....	47
3.3.	Πείραμα 3: Επίδραση της μολσιδομίνης επί του υπερβολικού αυτοκαθαρισμού, προκληθέντα από τον αγωνιστή του σεροτονεργικού 5-HT _{2C} υποδοχέα, 1-μετα-χλωροφαινυλιπεραζίνη (mCPP).....	48
3.4.	Πείραμα 4: Επίδραση της μολσιδομίνης στη συμπεριφορά των επιμύων στη δοκιμασία του πλαίσιο-εξαρτώμενου φόβου.....	51
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	52
	• Ιδιοψυχαναγκαστική διαταραχή.....	52
	• Μετατραυματικό stress.....	54
	• Πιθανοί μηχανισμοί δράσης των δοτών του NO.....	54
5.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	56
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	57

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κύριο Πιτσικά Νικόλαο, Καθηγητή Φαρμακολογίας του τμήματος για την καθοδήγηση που μου προσέφερε και το χρόνο που διέθεσε δίνοντάς μου χρήσιμες συμβουλές και οδηγίες για την πραγματοποίηση των πειραμάτων και την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας, καθώς και τους υπόλοιπους καθηγητές της τριμελούς επιτροπής, κύριο Δήμα Κωνσταντίνο, Καθηγητή Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Π.Θ., και κυρία Ψαρρά Άννα-Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Π.Θ.

Στο ίδιο πλαίσιο ευγνωμοσύνης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο οποίο φοιτώ ως προπτυχιακή φοιτήτρια, για τη συμβολή τους στην επιστημονική μου συγκρότηση στα χρόνια της φοίτησής μου στο Τμήμα.

Οφείλω επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους εκείνους που συνέβαλαν είτε πρακτικά είτε ψυχικά στην ολοκλήρωση της εργασίας μου.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου και τους φίλους μου, για την ηθική και ψυχολογική υποστήριξη, κατά τη διενέργεια της εργασίας μου αλλά και καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι αγχώδεις διαταραχές είναι ψυχιατρικές παθήσεις οι οποίες πλήττουν μεγάλο μέρος του πληθυσμού. Οι διαθέσιμες θεραπείες των αγχωδών διαταραχών χαρακτηρίζονται από μέτρια αποτελεσματικότητα και παρουσιάζουν σημαντικές παρενέργειες. Είναι επιστημονικά τεκμηριωμένο ότι το μονοξείδιο του αζώτου (NO), ένας ενδο- και δια-κυτταρικός νευροδιαβιβαστής, εμπλέκεται στις αγχώδεις διαταραχές. Συγκεκριμένα, αποτελέσματα προκλινικών ερευνών προτείνουν ότι ουσίες που επάγουν την απελευθέρωση εξωγενούς NO στον οργανισμό όπως είναι οι δότες του NO διαθέτουν αγχολυτικές ιδιότητες. Η παρούσα έρευνα σχεδιάστηκε να μελετήσει τη δράσης δύο δοτών του NO, του νιτροπρωσσικού νατρίου (SNP) και της μολσιδομίνης, σε πειραματικά προκλινικά πρότυπα της ιδεοψυχαναγκαστικής διαταραχής (OCD) όπως είναι ο προκαλούμενος υπερβολικός αυτοκαθαρισμός από τη χορήγηση του αγωνιστή του υποδοχέα 5-HT_{2c} της σεροτονίνης μετα-χλωροφαινυλιπεραζίνη (mCPP) και του μετατραυματικού stress (PTSD) όπως είναι η δοκιμασία του πλαίσιο-εξαρτώμενου φόβου. Οξεία χορήγηση του SNP (1 mg/kg) και της μολσιδομίνης (4 mg/kg), μείωσε το προκληθέντα από το mCPP (0.6 mg/kg) υπερβολικό αυτοκαθαρισμό και τη συμπεριφορά παγώματος στις προαναφερθείσες συμπεριφορικές διαδικασίες. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών υποδεικνύουν την αποτελεσματικότητα των δοτών του NO σε προκλινικά πρότυπα που αντανακλούν δυο σοβαρές αγχώδεις διαταραχές όπως είναι η OCD και το PTSD.

ABSTRACT

Anxiety disorders are psychiatric conditions that affect a large part of the population. The available treatments for anxiety disorders are characterized by moderate effectiveness and have significant side effects. It is scientifically documented that nitric oxide (NO), an intracellular and transcellular neurotransmitter, is involved in anxiety disorders. In particular, results from preclinical studies suggest that substances that induce the release of exogenous NO into the body such as NO donors possess anxiolytic properties. The present research was designed to study the action of two NO donors, sodium nitroprusside (SNP) and molsidomine, on experimental preclinical models of obsessive-compulsive disorder (OCD) such as the excessive self-grooming induced by administration of the serotonin 5-HT_{2C} receptor agonist metachlorophenylpiperazine (mCPP) and post-traumatic stress disorder (PTSD) such as the context-dependent fear test. Acute administration of SNP (1 mg/kg) and molsidomine (4 mg/kg) reduced mCPP (0.6 mg/kg) induced excessive self-grooming and freezing behavior in the behavioral processes mentioned above. The results of these experiments indicate the efficacy of NO donors in preclinical models reflecting two severe anxiety disorders such as OCD and PTSD.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Άγχος και Αγχώδεις διαταραχές

Το άγχος ορίζεται ως μία προσαρμοστική, ψυχολογική, φυσιολογική και συμπεριφορική κατάσταση, η οποία διευκολύνει την αντιμετώπιση μίας πραγματικής ή ενδεχόμενης απειλής. (Steimer, 2002)

Το αίσθημα άγχους, μπορεί να θεωρηθεί παθολογική κατάσταση, είτε όταν είναι πολύ έντονο, είτε όταν προκαλείται χωρίς όμως να υπάρχει κάποια πραγματικός ή πιθανός κίνδυνος. Η κατάσταση αυτή χαρακτηρίζεται από επαναλαμβανόμενα, ξαφνικά επεισόδια έντονου άγχους, φόβου ή ακόμη και τρόμου, τα οποία κορυφώνονται εντός λίγων λεπτών. Πρόκειται για τις αγχώδεις διαταραχές.

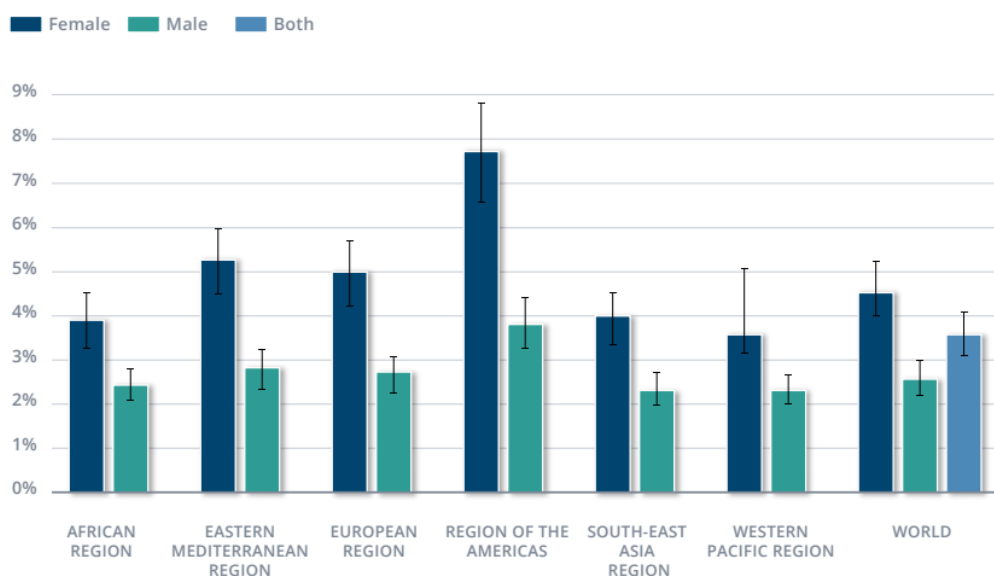
Οι αγχώδεις διαταραχές περιλαμβάνουν διάφορους τύπους. (Pitsikas, 2018)
Ενδεικτικά αναφέρονται μερικοί από τους πιο συνηθισμένους:

- Γενικευμένη αγχώδης διαταραχή (Generalized Anxiety Disorder- GAD): διαταραχή που χαρακτηρίζεται από υπερβολική και επίμονη ανησυχία για μία πληθώρα θεμάτων και καταστάσεων, και όχι για κάτι συγκεκριμένο.
- Κοινωνικές φοβίες (Social Anxiety): το άτομο που πάσχει από αυτή τη διαταραχή, βιώνει έντονο άγχος και φόβο για το ενδεχόμενο να δεχτεί κριτική, απόρριψη ή αρνητικά σχόλια, στο πλαίσιο ενός κοινωνικού συνόλου.
- Διαταραχή πανικού: χαρακτηρίζεται από αυθόρμητες, απροσδόκητες κρίσεις πανικού, καθώς και από ανησυχία του πάσχοντα για μία επαναλαμβανόμενη κρίση.
- Μετατραυματικό stress (Post-traumatic stress disorder- PTSD)
- Ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή (Obsessive Compulsive Disorder- OCD)

Οι αγχώδεις διαταραχές αποτελούν τον πιο συχνό τύπο ψυχικής ασθένειας. Σε σύγκριση με άλλες ψυχικές ασθένειες, εμφανίζουν τον υψηλότερο «ισόβιο επιπολασμό». Ειδικότερα, μία έρευνα που δημοσιεύτηκε το 2005, (Kessler et al., 2005), ανέφερε πως το 28,8% του εξεταζόμενου δείγματος, είχε εμφανίσει κάποια στιγμή στη ζωή του συμπτώματα αγχώδους διαταραχής. Επίσης, σύμφωνα με την ίδια έρευνα, οι αγχώδεις διαταραχές είναι οι ψυχικές ασθένειες με την μικρότερη ηλικία εμφάνισης, η οποία προσδιορίζεται στα 11 χρόνια.

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), το ποσοστό του παγκόσμιου πληθυσμού που πληθυσμού που έπασχε από κάποιου είδους αγχώδη διαταραχή, το 2017 ανήλθε στο 3,6%. Μάλιστα, το μεγαλύτερο ποσοστό αφορούσε γυναίκες.

Prevalence of anxiety disorders (% of population), by WHO Region



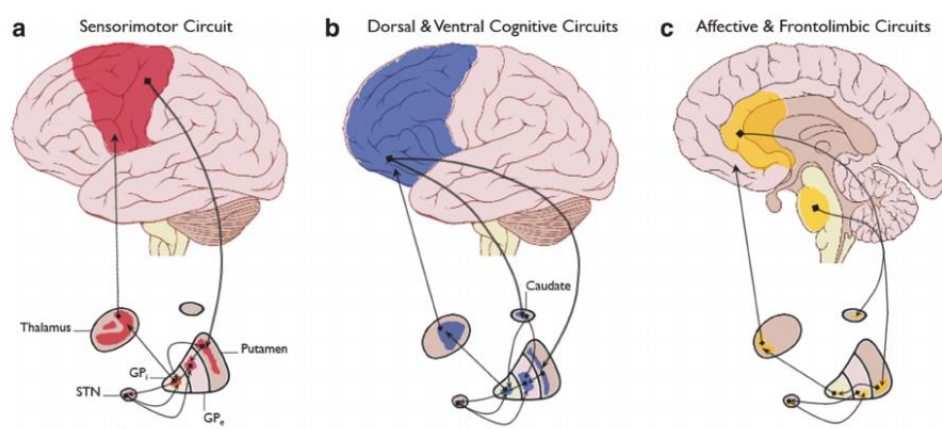
Εικόνα 1: Καταγεγραμμένα περιστατικά που αφορούν αγχώδεις διαταραχές, ανά περιοχή παγκοσμίως. Πηγή: World Health Organization 2017 (Depression and Other Mental Disorders)

1.1.1. Ιδιοψυχαναγκαστική διαταραχή (*Obsessive Compulsive Disorder-OCD*)

Η ιδιοψυχαναγκαστική διαταραχή (OCD) ορίζεται ως μία ψυχική και συμπεριφορική διαταραχή, η οποία χαρακτηρίζεται όπως υποδηλώνει το όνομά της, από εμμονές και ψυχαναγκασμούς. Πρόκειται δηλαδή για μία αγχώδη διαταραχή, κατά την οποία ο ασθενής υποφέρει από σκέψεις που προκαλούν άγχος και δυσφορία. Οι σκέψεις αυτές αποτελούν τις εμμονές (συχνότερα αφορούν τη μόλυνση, σεξουαλικές, σωματικές και θρησκευτικές ανησυχίες, κ.ά.). Αυτές είναι που προκαλούν τους καταναγκασμούς-ψυχαναγκασμούς, δηλαδή επαναλαμβανόμενες ενέργειες σε βαθμό που προκαλούν δυσφορία και βλάπτουν την ποιότητα ζωής του ατόμου (συχνό πλύσιμο, επανέλεγχος, καταμέτρηση, μάζεμα, κ.ά.). (Bandelow et al., 2012)

Νευροβιολογική βάση της ιδεοψυχαναγκαστικής διαταραχής

Η αιτιολογία της OCD θεωρείται ετερογενής, καθώς έχουν βρεθεί πολλοί παράγοντες που σχετίζονται με τη διαταραχή αυτή, όπως γενετικοί, μολυσματικοί, ορμονικοί κ.ά. (Pittenger et al., 2011). Ωστόσο, έχει αποδειχτεί πως ο σημαντικότερος παράγοντας που σχετίζεται με την ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή, είναι το «Φλοιο-ραβδωτο-θαλαμο-φλοιώδες κύκλωμα» (Cortico-striato-thalamo-cortical circuit- CSTC) (Εικόνα 2). Ειδικότερα, έχει βρεθεί μεταβολική υπερδραστηριότητα στο ραβδωτό σώμα (κερκοφόρος πυρήνας και κέλυφος φακοειδούς πυρήνα, Εικόνα 2α), στον πρόσθιο θάλαμο, τον πρόσθιο φλοιό, και τον κογχικό μετωπιαίο φλοιό. (Pittenger et al., 2011)



Εικόνα 2: Το CSTC αποτελείται από επιμέρους «κυκλώματα»: a) Αισθητοκινητικό, b) Ραχιαία και Κοιλιακά Γνωστικά Κυκλώματα, c) Συναισθηματικά και Μετωπιαία Κυκλώματα. STN: υποθαλαμικός πυρήνας, GP: ωχρά σφαίρα, Caudate: κερκοφόρος πυρήνας, Putamen: κέλυφος φακοειδούς πυρήνα. Πηγή: Kayser et al., 2019

Το σύνολο αυτών των κυκλωμάτων χρησιμοποιεί για τη νευρωνική διαβίβαση, είτε το γλουταμινικό (διεγερτικός νευροδιαβιβαστής), είτε το GABA (ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής). Ωστόσο, και άλλοι νευροδιαβιβαστές διαδραματίζουν ρυθμιστικό ρόλο σε αυτό το κύκλωμα, όπως η ντοπαμίνη, η ακετυλοχολίνη, η σεροτονίνη και η ισταμίνη. (Pittenger et al., 2011)

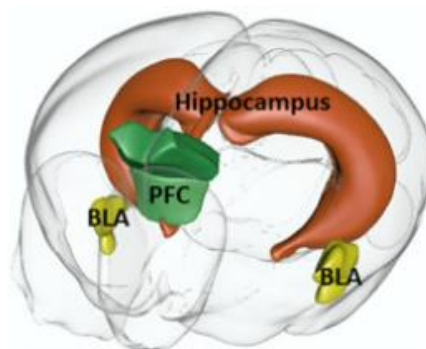
1.1.2. Μετατραυματικό stress (Post-traumatic stress disorder-PTSD)

Το μετατραυματικό stress είναι μία αγχώδης διαταραχή που αναπτύσσεται μετά από μία δυσάρεστη εμπειρία, η οποία μπορεί να αφορά είτε το ίδιο το άτομο, είτε το περιβάλλον του. Το άτομο που πάσχει από PTSD, συχνά ανακαλεί στη μνήμη του το οδυνηρό συμβάν που πυροδότησε την αγχώδη διαταραχή, πάσχει από εφιάλτες, παραισθήσεις ή ψευδαισθήσεις, καθώς και από έντονη δυσφορία σε περίπτωση που εκτεθεί σε κάποιο ερέθισμα σχετικό με το τραυματικό συμβάν. Συχνά, η PTSD οδηγεί σε διαταραχές του ύπνου, υπερβολική αντίδραση τρόμου, ακόμη και αποξένωση. (Bandelow et al., 2012)

Νευροβιολογική βάση του μετατραυματικού stress

Όσον αφορά την PTSD, τρεις περιοχές του εγκεφάλου έχουν συσχετιστεί με τη διαταραχή αυτή: ο προμετωπιαίος φλοιός, ο ιππόκαμπος και η βασοπλάγια αμυγδαλή. (Εικόνα 3) Ειδικότερα, η αμυγδαλή αποτελεί το κέντρο του εγκεφάλου που είναι υπεύθυνο για τα συναισθήματα, συμπεριλαμβανομένου συνεπώς και του φόβου, και φαίνεται να υπερλειτουργεί σε περίπτωση PTSD. Αντιθέτως, ο προμετωπιαίος φλοιός και ο ιππόκαμπος, σε ασθενείς PTSD βρέθηκε πως υπολειτουργούν. (Kohda et al., 2007)

Όπως συμβαίνει και με την OCD που αναφέρθηκε παραπάνω, και η PTSD είναι μία πολυδιάστατη διαταραχή, για την οποία έχουν αναφερθεί αρκετοί γενετικοί παράγοντες.



Εικόνα 3: Οι τρεις περιοχές του εγκεφάλου που σχετίζονται με την εκδήλωση του μετατραυματικού stress. Πηγή: Török et al., 2019

1.2. Σύγχρονες θεραπευτικές προσεγγίσεις

Μέχρι σήμερα οι φαρμακευτικές αγωγές που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία των αγχωδών διαταραχών, στοχεύουν στη GABA-εργική ή στη σεροτον-εργική νευροδιαβίβαση. Ωστόσο, τα περισσότερα από αυτά τα φάρμακα, χαρακτηρίζονται από ισχυρές παρενέργειες, όπως απώλεια μνήμης, απόκτηση βάρους, εξάρτηση, σεξουαλική δυσλειτουργία. Επίσης, σε ορισμένες περιπτώσεις, οι θεραπείες αυτές κρίνονται ως αναποτελεσματικές, αφού ο ασθενής δεν εμφανίζει βελτίωση των συμπτωμάτων του. Για τους παραπάνω λόγους, κρίνεται επιτακτική ανάγκη η ανακάλυψη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων.

1.2.1. Διαβίβαση με γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) και άγχος

Η διαβίβαση μέσω GABA, συμβάλλει σε μεγάλο βαθμό στη ρύθμιση αποκρίσεων που σχετίζονται με το άγχος και τις αγχώδεις διαταραχές. Ειδικότερα, έχει βρεθεί πως η λειτουργία αυτή αφορά κυρίως τους ιοντοτροπικούς υποδοχείς του GABA, που διαθέτουν αλλοστερικές θέσεις πρόσδεσης ενδογενών ρυθμιστών, όπως τα νευροστεροειδή. Τόσο η ετερογένεια των υπομονάδων του υποδοχέα, όσο και άλλοι παράγοντες (π.χ. αλλοστερική ρύθμιση) που μεταβάλλουν τη δυνατότητα πρόσδεσης του GABA, μπορούν να επηρεάσουν τη GABA-εργική διαβίβαση, και κατ' επέκταση την απόκριση του οργανισμού σε καταστάσεις άγχους (Nuss, 2015).

1.2.2. Διαβίβαση με σεροτονίνη (5-HT) και άγχος

Ο υποδοχέας της σεροτονίνης 5-HT_{1A}, είναι αυτός που έχει συσχετιστεί περισσότερο με την εμφάνιση άγχους και αγχωδών διαταραχών. Ειδικότερα, σε ασθενείς που πλήττονται από τα παραπάνω, έχει εντοπιστεί μειωμένη δραστηριότητα (π.χ. λόγω εσφαλμένης δομής) και χαμηλά επίπεδα πρόσδεσης του προσδέτη στον υποδοχέα. Πιο έντονα μειωμένα επίπεδα δραστηριότητας, παρατηρήθηκαν στις εξής περιοχές του εγκεφάλου: πυρήνας της ραφής, τροχιακός μετωπιαίος φλοιός, κροταφικός λοβός, αμυγδαλή. (Nash JR et.al., 2008)

1.2.3. Κατηγορίες φαρμάκων που χρησιμοποιούνται έως σήμερα

Βενζοδιαζεπίνες

Οι βενζοδιαζεπίνες, είναι φάρμακα που στοχεύουν στη GABA-εργική διαβίβαση. Οι υποδοχείς GABA_A, εκτός από τις θέσεις πρόσδεσης του GABA, διαθέτουν και μία θέση πρόσδεσης για βενζοδιαζεπίνες. Όταν ένα μόριο βενζοδιαζεπίνης προσδεθεί στον υποδοχέα, αυξάνεται η συγγένεια δέσμευσης του GABA στον υποδοχέα καθώς και η συχνότητα διανοίξεων του διαύλου. Κατά συνέπεια, προκαλείται μεγαλύτερη εισροή ιόντων Cl⁻ στο κύτταρο, με αποτέλεσμα την υπερπόλωση αυτού, και τη μείωση της διεγερσιμότητας. Ειδικότερα, αναστέλλονται τα νευρωνικά κυκλώματα στο μεταιχμιακό σύστημα του εγκεφάλου. Οι βενζοδιαζεπίνες είναι αποτελεσματικές σε οξέα επεισόδια άγχους. Τα φάρμακα αυτά χαρακτηρίζονται από άμεση έναρξη της δράσης τους. Ωστόσο, η κατηγορία αυτή φαρμάκων, εμφανίζει υψηλή πιθανότητα εθισμού, και για τον λόγο αυτό δεν συνιστάται η μακροπρόθεσμη χρήση τους, αλλά ούτε η χορήγηση για την αντιμετώπιση του άγχους της καθημερινότητας, που δεν αποτελεί παθολογική κατάσταση. Τέλος, στις παρενέργειες συγκαταλέγονται η υπνηλία, και σε κάποιες περιπτώσεις η απώλεια μνήμης (αμνησία).

Αζαπρόνες

Οι αζαπρόνες δρουν ως αγωνιστές του υποδοχέα 5-HT_{1A}, στοχεύουν λοιπόν στη σεροτον-εργική διαβίβαση. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 6, υποδοχείς 5-HT εντοπίζονται τόσο στην προ-συναπτική, όσο και στη μετα-συναπτική μεμβράνη. Με βάση αυτή την ποικιλομορφία, οι αζαπρόνες εμφανίζουν διττό ρόλο, καθώς στους προσυναπτικούς υποδοχείς 5-HT_{1A} δρουν ως πλήρεις αγωνιστές, και μέσω του μηχανισμού αρνητικής ανατροφοδότησης, όταν προσδένονται στους υποδοχείς αυτούς, αποτρέπουν την περαιτέρω έκκριση 5-HT από τον προσυναπτικό νευρώνα. Αντίθετα, στους μετασυναπτικούς υποδοχείς 5-HT_{1A}, οι αζαπρόνες εμφανίζουν δράση μερικού ανταγωνιστή. Ειδικότερα, σε υψηλά επίπεδα σεροτονίνης δρουν ως ανταγωνιστές, ενώ σε χαμηλά επίπεδα έχουν ρόλο αγωνιστή (Knap et.al., 2018). Το μόνο φάρμακο αυτής της κατηγορίας που χρησιμοποιείται σήμερα είναι η βουσπιρόνη, ωστόσο η αποτελεσματικότητά του ως αγχολυτικό είναι σε κάποιες περιπτώσεις αμφιλεγόμενη, ενώ έχουν αναφερθεί ποικίλες παρενέργειες (ναυτία, ζάλη, πονοκέφαλος). Σε αντίθεση με τις βενζοδιαζεπίνες, η δράση των

αζαπρονών επάγεται πιο αργά, ωστόσο μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν αγωγή έναντι της γενικευμένης αγχώδους διαταραχής (GAD).

Αντικαταθλιπτικά (SSRIs, SNRIs)

Οι εκλεκτικοί αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης (SSRIs), εμποδίζουν την επαναπρόσληψη της 5-HT στον προσυναπτικό νευρώνα από τον μεταφορέα SERT (Εικόνα 6), με αποτέλεσμα να παραμένουν αυξημένα τα επίπεδά της στη συναπτική σχισμή. Παρά το γεγονός ότι τα SSRIs χορηγούνται κυρίως ως αντικαταθλιπτικά, έχει βρεθεί πως είναι αποτελεσματικά και σε πολλές περιπτώσεις αγχώδων διαταραχών, συμπεριλαμβανομένης της OCD και PTSD. Παρά την αποτελεσματικότητά τους, έχουν αναφερθεί αρκετές παρενέργειες, όπως διαταραχές ύπνου, σεξουαλική δυσλειτουργία, ναυτία, κεφαλαλγία, ακόμη και στερητικό σύνδρομο ύστερα από διακοπή της αγωγής. Οι αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης/νορεπινεφρίνης (SNRIs) αναστέλλουν μη εκλεκτικά την επαναπρόσληψη των παραπάνω διαβιβαστών στους αντίστοιχους προσυναπτικούς νευρώνες. Οι SNRIs μπορούν να εμφανίζουν αποτελεσματικότητα σε ασθενείς, στους οποίους η χορήγηση SSRIs δεν οδήγησε σε βελτίωση των συμπτωμάτων της κατάθλιψης. Οι SNRIs, επηρεάζοντας τη διαβίβαση μέσω σεροτονίνης αλλά και νορεπινεφρίνης, μπορούν να ανακουφίσουν σε πολλές περιπτώσεις και άλλα συμπτώματα της κατάθλιψης, όπως οι σωματικοί πόνοι. Ωστόσο και στην περίπτωση αυτή, οι παρενέργειες δεν απουσιάζουν.

Αντιεπιληπτικά

Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει έναν μεγάλο αριθμό φαρμάκων. Αυτά δρουν κυρίως μέσω τριών μηχανισμών: μέσω αναστολής διαύλων Na^+ και Ca^{2+} , μέσω ενίσχυσης της GABA-εργικής διαβίβασης, και μέσω παρέμβασης στη διεγερτική επίδραση του γλουταμινικού. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η GABA-εργική διαβίβαση διαθέτει σημαντικό ρόλο στις αγχώδεις διαταραχές, και μάλιστα η ενίσχυση της ανασταλτικής αυτής σηματοδότησης (π.χ. μέσω βενζοδιαζεπινών) είναι αποτελεσματική στη θεραπεία αυτών. Συνεπώς, εφόσον τα αντιεπιληπτικά φάρμακα στοχεύουν στη μείωση της νευρωνικής διαβίβασης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον ίδιο σκοπό και σε περιπτώσεις παθολογικού άγχους.

Ζολπιδέμη

Η ζολπιδέμη είναι ένα φάρμακο που χρησιμοποιείται κατά βάση σαν υπνωτικό. Παρά το γεγονός πως δεν εμφανίζει δομικές ομοιότητες με τις βενζοδιαζεπίνες, έχει την ιδιότητα να δεσμεύεται εκλεκτικά στον υποδοχέα υποτύπου BZ₁. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μεγάλες χρονικές περιόδους, καθώς δεν εμφανίζεται ανοχή μετά από χρόνια χορήγηση, ενώ οι παρενέργειές της είναι ήπιες (κεφαλαλγία, εφιάλτες, γαστρεντερικές διαταραχές, κ.ά.) έως ανύπαρκτες. Έχει μυοχαλαρωτικές και αντισπασμωδικές ιδιότητες, ωστόσο έχει βραχύ χρόνο ημιζωής (2-3 h).

1.3. Μονοξείδιο του αζώτου (NO)

Το NO είναι ένα διαλυτό αέριο, μία ελεύθερη ρίζα, με μικρή διάρκεια ζωής στο κύτταρο. Καθώς είναι υδατοδιαλυτό αλλά και λιποδιαλυτό, το NO έχει την ικανότητα να διαπερνά τις λιπιδιακές μεμβράνες, η οποία του προσδίδει την ιδιότητα του δια-κυτταρικού, εκτός από ενδο-κυτταρικού διαβιβαστή. Το μονοξείδιο του αζώτου ανήκει στην κατηγορία των αέριων νευροδιαβιβαστών. Αρχικά ταυτοποιήθηκε ως ένας παράγοντας που προκαλεί χαλάρωση, και προέρχεται από το ενδοθήλιο. Στη συνέχεια, διαπιστώθηκε πως το NO ως διαβιβαστής, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε μία πληθώρα φυσιολογικών διεργασιών, όπως η κυτταρική ανοσία (Hibbs Jr et.al., 1988), η νευροδιαβίβαση (Garthwaite et al., 1988) αλλά και ο αγγειακός τόνος (Palmer et al., 1987).

1.3.1. Σύνθεση του NO και σηματοδότηση

Συνθάσες του NO

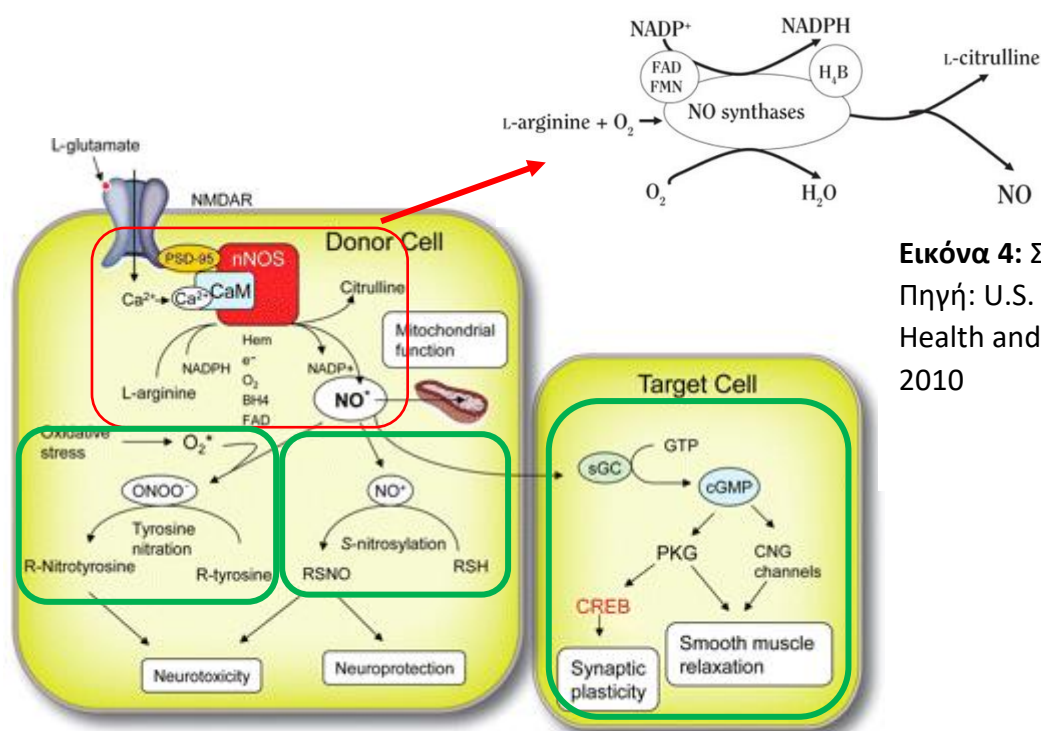
Τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση του μονοξειδίου του αζώτου ονομάζονται συνθάσες του μονοξειδίου του αζώτου (NOS), και διακρίνονται τρεις ισομορφές (Πίνακας 1). Τα γονίδια που κωδικοποιούν για τα ένζυμα nNOS και eNOS, υπόκεινται σε συνεχή έκφραση, και οι παραγόμενες πρωτεΐνες ενεργοποιούνται μετά την πρόσδεση σε αυτές, του συμπλόκου Ca^{2+} -καλμοδουλίνης (Bredt, 1999). Αντίθετα, η iNOS όταν είναι απαραίτητη στο κύτταρο, ενεργοποιείται μέσω μεταγραφής του γονιδίου NOS-2 σε πραγματικό χρόνο (Merrill et al., 1993)

Ισομορφή	Έκφραση	Γονίδιο	Εξάρτηση από Ca^{2+} -καλμοδουλίνη
Νευρωνική: nNOS	Νευρικός ιστός	NOS-1	Ναι
Επαγόμενη: iNOS	Επαγωγή από προ-φλεγμονώδεις παράγοντες (κυτοκίνες, ενδοτοξίνες)	NOS-2	Όχι
Ενδοθηλιακή: eNOS	Ενδοθηλιακά κύτταρα	NOS-3	Ναι

Πίνακας 1: Οι τρεις ισομορφές του ενζύμου συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (NOS).
Πηγή: David S. Bredt, 1999

Σύνθεση του NO

Η αντίδραση από την οποία προκύπτει η σύνθεση του NO, είναι η μετατροπή της L-αργινίνης σε L-κιτρουλλίνη. Το πρώτο βήμα είναι η ενεργοποίηση του ενζύμου (NOS) που θα καταλύσει στη συνέχεια την αντίδραση αυτή. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 5, η ενεργοποίηση του ενζύμου προϋποθέτει την πρότερη ενεργοποίηση του υποδοχέα NMDAR, με αποτέλεσμα την εισροή ιόντων Ca^{2+} στο εσωτερικό του κυττάρου. Το Ca^{2+} προσδένεται στην καλμοδουλίνη, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο ικανό να προσδεθεί και να ενεργοποιήσει τη NOS. Σαν επόμενο βήμα, η L-αργινίνη, με τη συμμετοχή οξυγόνου (O_2), φωσφωρικού νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκελοτιδίου ($NADP^+$), και των συμπαραγόντων φλαβινο-αδενινο-δινουκελοτιδίου (FAD), φλαβινομονονουκλεοτίδιο (FMN) και τετραυδροβιοπτερίνη (H_4B), μετατρέπεται σε L-κιτρουλλίνη, με ταυτόχρονη απελευθέρωση NO (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Σύνθεση του NO.
Πηγή: U.S. Department of Health and Human Services, 2010

Εικόνα 5: Σύνοψη της σύνθεσης του NO (κόκκινο πλαίσιο) και της μετέπειτα σηματοδότησης στην οποία αυτό συμμετέχει (πράσινα πλαίσια). Πηγή: Benarroch, 2011

Σηματοδότηση μέσω του NO

Η βιολογική δράση του παραχθέντος NO επιτελείται μέσω τριών διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών.

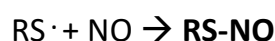
1. Μέσω της γουανυλικής κυκλάσης (sGC- soluble guanylic cyclase)

Ο υποδοχέας του NO είναι κυτταροπλασματικός, και συγκεκριμένα πρόκειται για τη γουανυλική κυκλάση (sGC- soluble guanylic cyclase/ διαλυτή γουανυλική κυκλάση). Με την πρόσδεση του NO σε μία ομάδα αίμης που αυτή διαθέτει (Bredt et al., 1992), η κυκλάση ενεργοποιείται, με αποτέλεσμα να παράγεται cGMP (cyclic Guanosine MonoPhosphate/ κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη). Το cGMP με τη σειρά του, μπορεί να αλληλεπιδράσει με ποικίλους στόχους, κυρίως με τη cGMP-εξαρτώμενη κινάση (PKG), με τη cAMP-εξαρτώμενη κινάση (PKA), επάγοντας τη φωσφορυλίωση διαφόρων στόχων, καθώς και με διαύλους CNG (cyclic nucleotide gated channels) (Εικόνα 5). Το σηματοδοτικό μονοπάτι του NO που εξαρτάται από τη γουανυλική κυκλάση, είναι το πιο σημαντικό, καθώς η sGC είναι απαραίτητη για τις περισσότερες δράσεις το NO (Arnold et al., 1977).

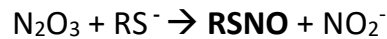
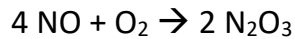
2. S-νιτροσυλίωση

Ωστόσο, το NO μπορεί να επάγει σηματοδότηση ανεξάρτητη από τη sGC. Πρόκειται για την S-νιτροσυλίωση, μία αντίδραση που περιλαμβάνει την τροποποίηση μίας ομάδαςθειόλης σε ένα κατάλοιπο κυστεΐνης μίας πρωτεΐνης, με την προσθήκη μίας ομάδας NO. Η προσθήκη μπορεί να συμβεί με δύο διαφορετικούς μηχανισμούς:

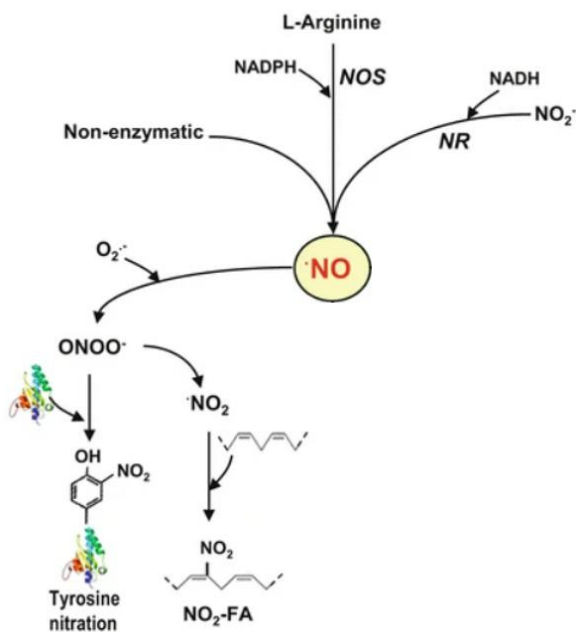
A. Οξειδωτική νιτροσυλίωση: περιλαμβάνει δύο βήματα, την οξείδωση της ομάδαςθειόλης, και στη συνέχεια την προσθήκη του μονοξειδίου του αζώτου (Heinrich et al., 2013).



B. Νιτροποίηση: κατά τη διαδικασία αυτή, τέσσερα μόρια NO αντιδρούν με ένα μόριο οξυγόνου (O₂), προς σχηματισμό δινιτρικού τριοξειδίου, το οποίο στη συνέχεια δρα σαν δότης NO (Heinrich et al., 2013).



Εκτός από την νιτροσυλίωση καταλοίπων κυστεΐνης, άλλες αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχει το NO, είναι η νιτροποίηση καταλοίπων τυροσίνης και λιπαρών οξέων. Ειδικότερα, το NO αντιδρά με ρίζες υπεροξειδίου (O₂^{·-}), σχηματίζοντας υπεροξυνιτρώδες (ONOO⁻). Αυτό, ως ισχυρό οξειδωτικό, με ενδιάμεσο μόριο το ·NO₂, προκαλεί την νιτροποίηση τυροσίνης και FA (Εικόνα 6). (Corpas et al., 2015)



Εικόνα 6: Η αλληλεπίδραση του NO με ρίζες υπεροξειδίου και η επακόλουθη νιτροποίηση τυροσίνης (κόκκινο πλαίσιο) και λιπαρού οξέος (πράσινο πλαίσιο). Πηγή: Corpas et al., 2015

Η S-νιτροσυλίωση είναι μία δράση του NO που μπορεί να επιφέρει ποικίλα αποτελέσματα σε διαφορετικούς στόχους. Τα αποτελέσματα αυτά συνοψίζονται στον Πίνακα 2.

<i>Πρωτεΐνη που υφίσταται S-νιτροσυλίωση</i>	<i>Επίπτωση στη δραστηριότητα της πρωτεΐνης μετά την S-νιτροσυλίωση</i>
Δίαυλοι BK _{Ca}	Αύξηση
Δίαυλοι CNG	Αύξηση
Υποδοχείς-δίαυλοι ρυανοδίνης (RyR)	Αύξηση
p21 ^{RAS}	Μείωση
Κασπάσες 1-4, 6-8	Μείωση
3-φωσφορική αφυδρογονάση της γλυκεραλδεΰδης	Μείωση
Υποδοχέας NMDA	Αύξηση/Μείωση

Πίνακας 2: Σύνοψη των επιπτώσεων (αύξηση ή μείωση) που μπορεί να επιφέρει η S-νιτροσυλίωση μίας πρωτεΐνης, κατά τη δράση του μονοξειδίου του αζώτου. Πηγή: Edwards et al., 2007

1.3.2. Δράσεις του NO, Νευροπροστασία, Νευροτοξικότητα

Το NO, δρώντας μέσω των μηχανισμών που αναφέρθηκαν εκτενώς παραπάνω, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μάθηση, τη μνήμη και τη συναπτική πλαστικότητα. Μπορεί επίσης να ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων, καθώς και την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών, ή ακόμη να δρα το ίδιο σαν διαβιβαστής.

Το αποτέλεσμα της δράσης του NO εξαρτάται άμεσα από τη συγκέντρωσή του (Εικόνα 7), καθώς σε υψηλά επίπεδα έχει τοξική δράση. Συνεπώς, η δράσεις του χωρίζονται σε νευροπροστατευτικές ή νευροτοξικές.

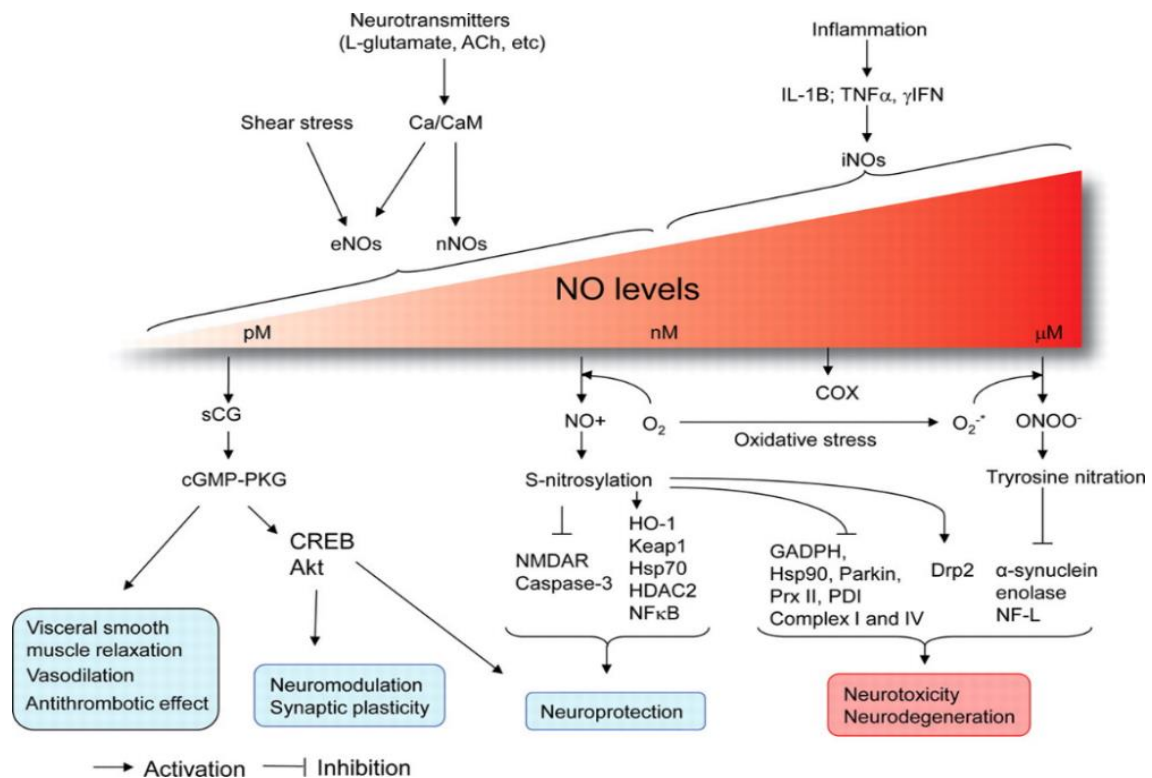
Ως νευροπροστασία ορίζεται το αποτέλεσμα της δράσης ενός νευροχημικού ρυθμιστή, που μπορεί να οδηγήσει σε αποκατάσταση ή αναγέννηση των κυττάρων, της δομής και κατ' επέκταση της λειτουργίας του νευρικού συστήματος.

Αντίθετα, νευροτοξικότητα είναι το αποτέλεσμα της έκθεσης σε νευροτοξικές ουσίες, κατά την οποία επάγεται καταστροφή των νευρώνων και άλλων κυττάρων του νευρικού συστήματος, με αποτέλεσμα τη διατάραξη της λειτουργίας του νευρικού συστήματος. Ειδικότερα για το NO, όπως αναφέρθηκε παραπάνω (Εικόνα 6), ο σχηματισμός του ισχυρού οξειδωτικού ONOO⁻, η πρόκληση βλαβών στο DNA και η αναστολή της δράσης της

γλουταθειόνης, αποτελούν μηχανισμούς που οδηγούν στη νευροτοξικότητα (Calabrese et al., 2007).

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 7, σε μικρές συγκεντρώσεις (της τάξης του pM), το NO ενεργοποιεί τη γουανυλική κυκλάση (sGC), επάγοντας λειτουργίες όπως η χαλάρωση του σπλαχνικού λείου μυ, η αγγειοδιαστολή και η δράση έναντι θρομβώσεων, η ρύθμιση του νευρικού συστήματος και η συναπτική πλαστικότητα. Σε ελαφρώς υψηλότερες συγκεντρώσεις NO (της τάξης των nM), επάγεται το «μονοπάτι» της S-νιτροσυλίωσης που περιγράφηκε παραπάνω, το οποίο με διαδικασίες που συνοψίζονται στον Πίνακα 2, οδηγεί σε νευροπροστασία.

Σε περίπτωση που η συγκέντρωση του μονοξειδίου του αζώτου είναι πολύ αυξημένη (μM), η S-νιτροσυλίωση και η νιτροποίηση καταλοίπων τυροσίνης,



Εικόνα 7: Δράσεις του μονοξειδίου του άνθρακα, σε σχέση με τη συγκέντρωσή του. (Μπλε χρώμα: νευροπροστασία/ Κόκκινο χρώμα: νευροτοξικότητα) Πηγή: Benarroch, 2011

στοχεύουν πρωτεΐνες που σχετίζονται με σημαντικές διεργασίες στο κυτταρόπλασμα και στα μιτοχόνδρια, οδηγώντας σε εσφαλμένη αναδίπλωσή τους, διατάραξη των διεργασιών στις οποίες αυτές συμμετέχουν, ακόμη και σε κυτταρικό θάνατο. Όλα αυτά τα αποτελέσματα χαρακτηρίζονται ως νευροτοξικά (Benarroch, 2011).

1.3.3. Μονοξείδιο του αζώτου (NO) και άγχος

Γενετικές μελέτες

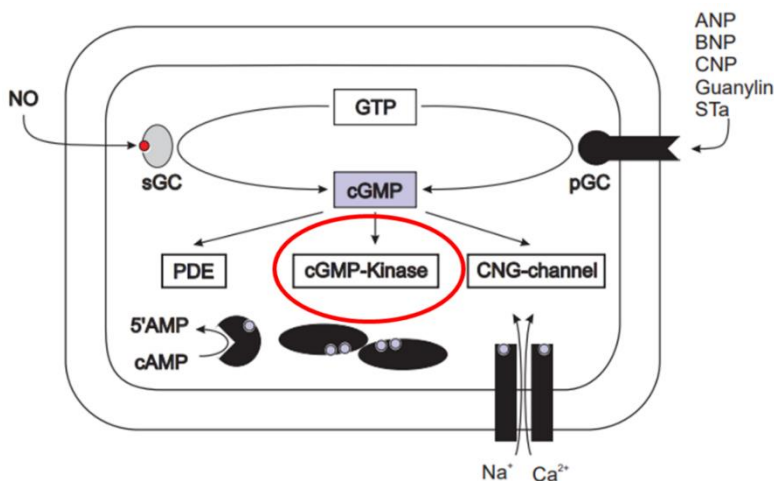
Σύμφωνα με προκλινικές και κλινικές γενετικές μελέτες η nNOS εμπλέκεται στις αγχώδεις διαταραχές (Gutknecht et al., 2007). Αντίθετα, για τις ισομορφές eNOS και iNOS, δεν έχουν προκύψει αντίστοιχα δεδομένα, ενώ δεν έχει διευκρινιστεί εάν η εμπλοκή του NO στις αγχώδεις διαταραχές εξαρτάται από το φύλο του ασθενούς.

Ιστολογικές μελέτες

Ιστολογικά ευρήματα συνηγορούν στην εμπλοκή του NO στις αγχώδεις διαταραχές.

Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα έκφρασης της nNOS σε εγκεφαλικές περιοχές του μεταϊχμιακού συστήματος που συνδέονται με το άγχος. Στις περιοχές αυτές συγκαταλέγονται ο υποθάλαμος, η μέση αμυγδαλή, η περί του υδραγωγείου φαιά ουσία (Vincent et al., 1992) και ο ιππόκαμπος (Dun et al., 1994).

Η cGMP-εξαρτώμενη κινάση II (cGKII) είναι ένα ένζυμο το οποίο φωσφορυλιώνει τους «στόχους» της, αφού πρώτα ενεργοποιηθεί από το κυκλικό GMP (cGMP), συνεπώς έμμεσα ενεργοποιείται από το NO, το οποίο επάγει την παραγωγή του cGMP μέσω της γουανυλικής κυκλάσης (Εικόνα 8). Η κινάση αυτή εντοπίστηκε σε αυξημένα επίπεδα σε εγκεφαλικές περιοχές άρρηκτα συνδεδεμένες με το άγχος όπως είναι ο εγκεφαλικός φλοιός, οι πυρήνες του θαλάμου και του υποθαλάμου, το μέσο διάφραγμα και η αμυγδαλή. Από πειράματα που διεξήχθησαν σε ποντίκια knock-out, βρέθηκε πως η έλλειψη της cGKII οδηγεί σε φαινότυπο που χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα άγχους (Hofmann et al., 2004).



Εικόνα 8: Το NO προσδένεται και ενεργοποιεί την sGC, η οποία παράγει cGMP. Αυτό με τη σειρά του ενεργοποιεί τη cGKII (κόκκινο πλαίσιο). Πηγή: Hofmann et al., 2000

Φαρμακολογικές μελέτες

Οι παραπάνω παρατηρήσεις επιβεβαιώνονται και από φαρμακολογικές μελέτες, οι οποίες καταδεικνύουν διάφορους ρυθμιστές του NO (πρόδρομα μόρια ή αναστολείς) ως ένα πιθανό θεραπευτικό μέσο κατά του άγχους (Pitsikas, 2018).

Μάλιστα, έχει βρεθεί πως η δράση του NO, μπορεί να επηρεάσει τη δραστηριότητα κάποιου άλλου αγχολυτικού φαρμάκου.

Το νευροστεροειδές θειική δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEAS), έχει αγχολυτική δράση. Η δράση αυτή φάνηκε να υποχωρεί, όταν πριν τη DHEAS χορηγήθηκε ο αναστολέας της συνθάσης του NO (NOS), L-NAME. Αντίθετα, η χορήγηση L-αργινίνης, που είναι το πρόδρομο μόριο για τη σύνθεση του NO, πριν τη χορήγηση του νευροστεροειδούς, φάνηκε να ενισχύει τη δράση αυτού (Chakraborti et al., 2011). Σε συμφωνία με τα προαναφερθέντα έχει παρατηρηθεί ότι η αγχολυτική δράση της βενζοδιαζεπίνης χλωροδιαζεποξείδιο μειώθηκε σημαντικά μετά από χορήγηση αναστολέων της NOS (Elflin et al., 2004).

Τέλος, πρόσφατα παρατηρήθηκε ότι η αγχολυτική δράση της μορφίνης ρυθμίζεται από το NO όσο και από την πρωτεΐνη θερμικού σοκ Hsp70 (Joshi et al., 2015).

1.3.4. Δότες του μονοξειδίου του αζώτου

Στους δότες μονοξειδίου του αζώτου συμπεριλαμβάνονται εκείνες οι ενώσεις που έχουν την ικανότητα να απελευθερώνουν NO, ή μόρια σχετιζόμενα με NO όπως το ιόν νιτροσονίου (NO^+) ή το ανιόν νιτροξυλίου (NO), είτε *in vitro* είτε *in vivo*. Παρόλο που ανήκουν στην ίδια κατηγορία, αυτή των δοτών NO, τα μόρια αυτά μπορούν να διαφέρουν μεταξύ τους ως προς:

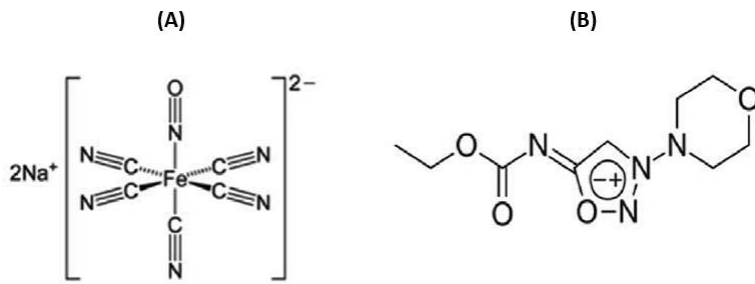
- Τον τρόπο απελευθέρωσης του NO
- Την ποσότητα του NO
- Τον χρόνο που απαιτείται
- Τα προϊόντα που προκύπτουν κατά τον μεταβολισμό ή την αποσύνθεσή τους

Χάρη στις διαφορές αυτές, οι δότες του μονοξειδίου του αζώτου χαρακτηρίζονται ο καθένας από διαφορετική φαρμακοκινητική και

φαρμακοδυναμική, και συνεπώς από διαφορετικές βιολογικές δράσεις (Miller et al., 2007). Με βάση τους μηχανισμούς δράσης τους, οι δότες του μονοξειδίου του αζώτου ταξινομούνται σε 5 τάξεις (Πίνακας 3). Χάρη στους ποικίλους μηχανισμούς δράσης, οι δότες του NO έχουν βρεθεί αποτελεσματικοί στη θεραπεία διαφόρων ασθενειών. Όσον αφορά το άγχος και τις αγχώδεις διαταραχές, στην παρούσα μελέτη, οι δότες του NO που ελέγχθηκαν ως προς την αποτελεσματικότητά τους για την ανακούφιση των συμπτωμάτων, είναι το νιτροπρωσσικό νάτριο (SNP) και η μολσιδομίνη (Εικόνα 9).

<i>Τάξη</i>	<i>Μηχανισμός δράσης</i>	<i>Παραδείγματα</i>
Οργανικά νιτρικά	Διεγείρουν το μονοπάτι παραγωγής του NO που εξαρτάται από τη γουανυλική κυκλάση (sGC). Η παραγωγή του NO μπορεί να είναι είτε μη-ενζυματική, είτε ενζυματική, με τη δράση του κυτοχρώματος P450 ή της S-τρανσφοράσης της γλουταθειόνης	Τρινιτρικό γλυκερύλιο (GTN), Μονονιτρικό ισοσορβίδιο (ISMN), Τετρανιτρική πενταερυθριτόλη (PETN)
Οργανικά νιτρώδη	Οδηγούν σε ενεργοποίηση των μονοπατιών σηματοδότησης του NO	Νιτρώδες βουτύλιο (BN), Νιτρώδες ισοβουτύλιο (ISBN), Νιτρώδες tert-βουτύλιο (BTN), Νιτρώδες αμύλιο (AMN), Νιτρώδες ισοαμύλιο (IAMN)
Σύμπλοκα μετάλλων	Άμεση απελευθέρωση NO. Το NO που είναι προσδεμένο σε κάποιο μέταλλο, είναι πιο επιρρεπές σε πυρηνόφιλη προσβολή	Νιτροπρωσσικό νάτριο (Sodium Nitroprusside-SNP)
Διαζενιοδιολικά άλατα	Άμεσα διασπώνται σε δύο μόρια NO	NONO-ικά (MAHMA/NO, DEA/NO, PROLI/NO, DETA/NO)
Συδνονιμίνες	Άμεσα, μέσω ενζυμικής αντίδρασης, αποικοδομούνται σε O ₂ και NO. Η ενεργοποίηση αυξάνει τη διαπερατότητα των καναλιών K ⁺ , και είναι ανεξάρτητη από το cGMP	3-μορφο-λινο-συδνονιμίνη (SIN-1), Μολισιδομίνη

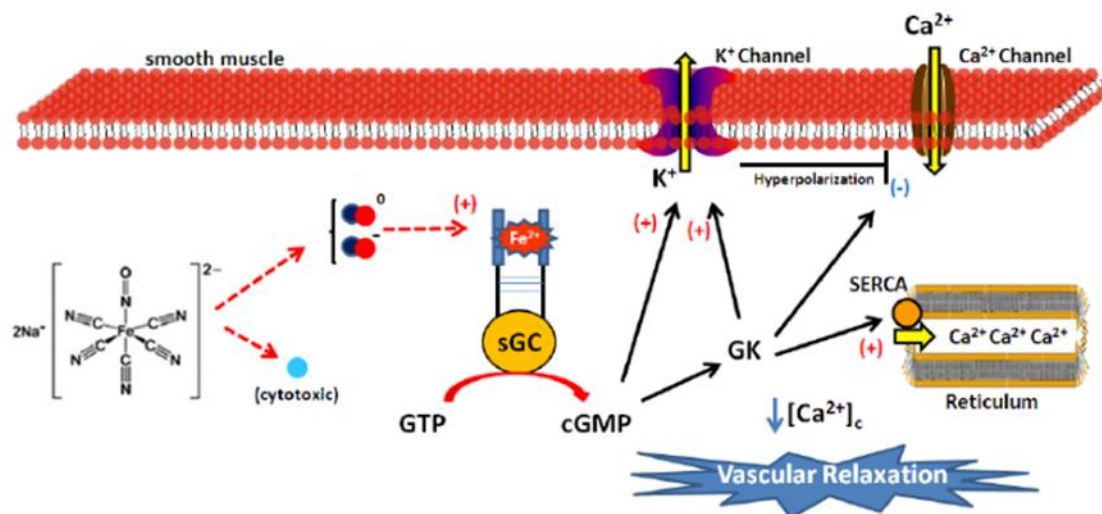
Πίνακας 3: Οι τάξεις των δοτών μονοξειδίου του αζώτου (NO) (Στήλη 1), οι μηχανισμοί δράσης τους (Στήλη 2) και χαρακτηριστικά μόρια της κάθε τάξης (Στήλη 3). Πηγή: Mintz et al., 2021



Εικόνα 9: (A): Χημική δομή του SNP ($[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})]^{2-}$), μοριακό βάρος 238,93 (B): Χημική δομή της μολσιδομίνης ($\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_4$), μοριακό βάρος 242,235

Νιτροπρωσικό νάτριο (SNP)

Το SNP είναι ένα υδατοδιαλυτό άλας, που όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οδηγεί σε παραγωγή NO, ανεξάρτητα από τις ενδογενείς πηγές αυτού. Χαρακτηρίζεται από φωτοευαισθησία, γι' αυτό τόσο στην κρυσταλλική του μορφή όσο και σαν διάλυμα, φυλάσσεται σε δοχεία προστατευμένα από το φως, και ο χρόνος ημιζωής του είναι μικρότερος από 2 min. Χρησιμοποιείται για περισσότερα από 70 χρόνια, κυρίως για την αντιμετώπιση της υπέρτασης, αφού προκαλεί μείωση της αρτηριακής πίεσης, χάρη στην αγγειοδιασταλτική του δράση (Marks et al., 1995), καθώς χαλαρώνει τους λείους μυς των αγγείων (Εικόνα 10).

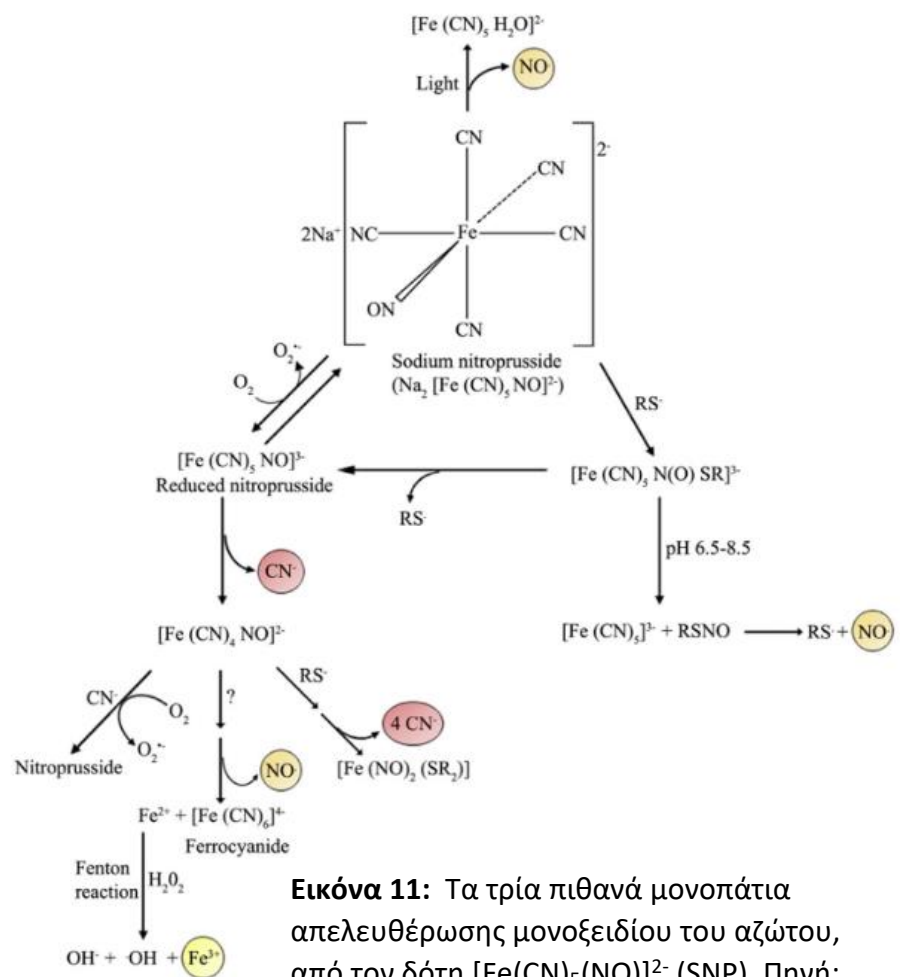


Εικόνα 10: (Πηγή: de Lima et al., 2014) Αναπαράσταση του ενδοκυτταρικού περιβάλλοντος ενός λείου μυϊκού κυττάρου. Το SNP απελευθερώνει NO (μπλε άτομο: N, κόκκινο άτομο: O) και ιόντα CN^- (γαλάζιο ιόν). Το NO προσδένεται στην ομάδα αίμης της sGC με αποτέλεσμα την αύξηση του cGMP, το οποίο ενεργοποιεί την κινάση GK. Ο καταρράκτης φωσφορυλιώσεων που επάγεται από τη GK οδηγεί σε κλείσιμο των καναλιών Ca^{2+} της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και ταυτόχρονη ενεργοποίηση της SERCA, που μεταφέρει ιόντα Ca^{2+} στο ΕΔ. Συνεπώς, μειώνονται τα επίπεδα ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα, που απαιτούνται για τη μυϊκή σύσπαση. Ως αποτέλεσμα επέρχεται χαλάρωση του λείου μυ του αγγείου και επακόλουθη διαστολή αυτού.

Επίσης, το SNP βρίσκει κλινική εφαρμογή σε περιστατικά προχωρημένης καρδιακής ανεπάρκειας, εγκεφαλικού εμφράγματος (Zhang et al., 1993) λόγω υποξίας και ισχαιμίας, ενώ έχει βρεθεί πως αποτρέπει αποτελεσματικά τη συσσώρευση αιμοπεταλίων (Booth and Fung, 1998).

Όσον αφορά την παραγωγή NO μέσω του SNP, ο μηχανισμός δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως. Είναι όμως γνωστό πως η απελευθέρωση του NO πραγματοποιείται είτε μέσω ακτινοβόλησης με φως, είτε μέσω αναγωγής με ένα ηλεκτρόνιο, καθώς και ότι ενισχύεται από θειόλες (Mir et al., 2019). (Εικόνα 11). Γενικά, η απελευθέρωση του NO μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με τη μεσολάβηση κάποιου ενζύμου, είτε μη ενζυμικά, μέσω ενός αναγωγικού παράγοντα. Η ποσότητα του NO που προκύπτει από φωτολυτική παραγωγή είναι αμελητέα (Butler and Glidewell, 1987), σε αντίθεση με αυτή που προκύπτει από αναγωγή με ένα ηλεκτρόνιο (κυρίως στον αγγειακό ιστό/πιθανοί αναγωγικοί παράγοντες: θειόλες, αιμοπρωτεΐνες, ασκορβικό οξύ).

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 11, ο μεταβολισμός του SNP μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή 5 ιόντων CN⁻, ή ακόμη και ONOO⁻, τα οποία καθιστούν το φάρμακο τοξικό. Ωστόσο, το NO είναι αρκετά ισχυρό σαν αγγειοδιαστολέας, και συνεπώς η χορήγηση SNP σε μικρές δόσεις είναι ταυτόχρονα αποτελεσματική χωρίς να προκαλεί τοξικότητα (Mir et al., 2019).

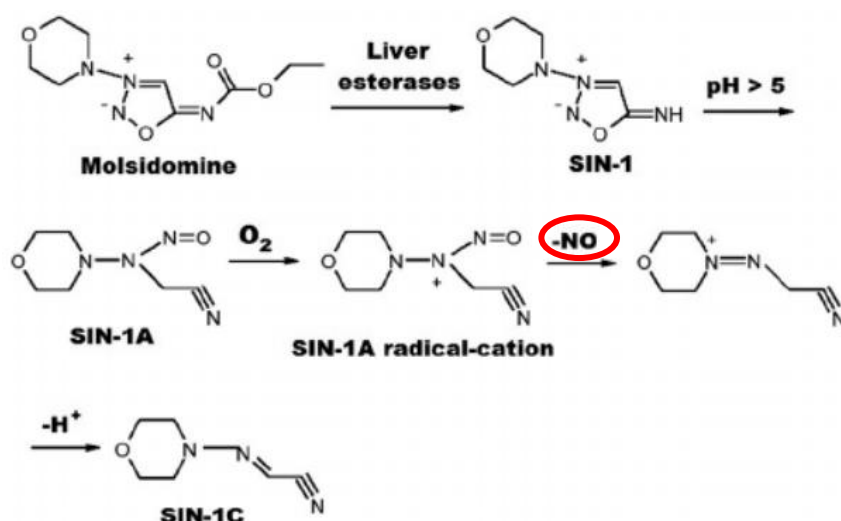


Εικόνα 11: Τα τρία πιθανά μονοπάτια απελευθέρωσης μονοξειδίου του αζώτου, από τον δότη $[Fe(CN)_5(NO)]^{2-}$ (SNP). Πηγή: Keisham et al., 2019

Μολσιδομίνη

Η μολσιδομίνη είναι ένας από τους δότες NO που ανήκουν στην τάξη των συδονιμινών. Ο χρόνος ημιζωής της κυμαίνεται μεταξύ 1-2 h. Διατίθεται στην αγορά από το 1977, και οι κλινικές εφαρμογές της σχετίζονται με παθήσεις όπως η ισχαιμική καρδιοπάθεια, η στηθάγχη, η χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια και η πνευμονική υπέρταση. Η αποτελεσματικότητά της στις παθήσεις αυτές οφείλεται στην ικανότητά της να επάγει τη χάλαση των λείων μυών των στεφανιαίων αιμοφόρων αγγείων. Έχει αναφερθεί επίσης πως η μολσιδομίνη στον αρουραίο εμφάνισε αντιαμνησιακή δράση (Pitsikas et al., 2006, Pitsikas and Sakellariadis, 2007), ενώ ενίσχυσε την αντισπασμωδική δράση ορισμένων ανταγωνιστών NMDA (Tutka et al., 2002). Η δράση της λοιπόν μοιάζει με αυτή που περιγράφηκε για το SNP (Εικόνα 10).

Ωστόσο, ο μηχανισμός παραγωγής NO από τη μολσιδομίνη είναι διαφορετικός από αυτόν του SNP. Στην πραγματικότητα, το πρώτο βήμα είναι ο μεταβολισμός της μολσιδομίνης στο ήπαρ, ώστε να προκύψει η 3-μορφο-λινο-συδονιμίνη (ή λινσιδομίνη) (SIN-1), η οποία στις κατάλληλες συνθήκες pH μετατρέπεται σε SIN-1A (ανοικτός δακτύλιος). Η SIN-1A παράγει αντιδρώντας με οξυγόνο μία ενδιάμεση ρίζα, η οποία είναι υπεύθυνη για την απελευθέρωση του NO. (Εικόνα 12)



Εικόνα 12: Ο μεταβολισμός και η αποδόμηση της μολσιδομίνης.

Πηγή: Deshpande et al., 2012

1.3.5. Δότες μονοξειδίου του αζώτου και άγχος

Μέχρι σήμερα, έχουν διεξαχθεί αρκετές προκλινικές έρευνες που εξετάζουν την αποτελεσματικότητα διαφόρων δοτών του NO ως προς την αντιμετώπιση του άγχους. Τα δεδομένα που προέκυψαν από τα πειράματα αυτά είναι τα εξής συνοψίζονται στους παρακάτω πίνακες:

SNP (Νιτροπρωσσικό νάτριο)					
	Οργανισμός-μοντέλο	Δόσεις	Χορήγηση	Συμπεριφορική τεχνική	Αποτέλεσμα
1	Αρουραίος	20 nmol	Οξεία, ενδοϊπποκαμπικά	Υπερυψωμένος σταυροειδής λαβύρινθος	Ανταγωνίστηκε την αγχολυτική δράση της αιθανόλης
2	Αρουραίος	40 nmol	Οξεία, ενδοϊπποκαμπικά	Υπερυψωμένος σταυροειδής λαβύρινθος	Αγχογόνος δράση
3	Ποντίκι	1, 2, 3 mg/kg	Οξεία, ενδοπεριτοναϊκά	Ταφή βόλων	Η δόση 3 mg/kg εμφάνισε αγχογόνο δράση
4	Ποντίκι	1, 2, 3 mg/kg	Οξεία, ενδοπεριτοναϊκά	Κινητική δραστηριότητα	Δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση
5	Αρουραίος	80 nmol	Οξεία, ενδοϊπποκαμπικά	Υπερυψωμένος T λαβύρινθος	Αγχογόνος δράση
6	Αρουραίος	1, 3 mg/kg	Οξεία, ενδοπεριτοναϊκά	Δοκιμασία φωτός/σκότους	Η δόση 1 mg/kg ήταν αγχολυτική ενώ η δόση 3 mg/kg προκάλεσε καταστολή
7	Αρουραίος	1, 3 mg/kg	Χρόνια, ενδοπεριτοναϊκά	Κινητική δραστηριότητα	Δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση

Πίνακας 4: Αποτελέσματα πειραμάτων που μελέτησαν την αποτελεσματικότητα του SNP ως αγχολυτικό. Πηγές: 1, 2: Ferreira et. al., 1999/ 3, 4: Umathe et. al., 2009/ 5: Calixto et. al., 2010/ 6, 7: Orfanidou et. al., 2017

Μολσιδομίνη

	Οργανισμός-μοντέλο	Δόσεις	Χορήγηση	Συμπεριφορική τεχνική	Αποτέλεσμα
1	Αρουραίος	1, 2, 4 mg/kg	Οξεία, ενδοπεριτοναϊκά	Δοκιμασία φωτός/σκότους	Η δόση 2 mg/kg εμφάνισε αγχολυτική δράση
2	Αρουραίος	1, 2, 4 mg/kg	Οξεία, ενδοπεριτοναϊκά	Δοκιμασία ανοικτού πεδίου	Η δόση 2 mg/kg εμφάνισε αγχολυτική δράση
3	Αρουραίος	1, 2, 4 mg/kg	Οξεία, ενδοπεριτοναϊκά	Κινητική δραστηριότητα	Δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση

Πίνακας 5: Αποτελέσματα πειραμάτων που μελέτησαν την αποτελεσματικότητα της μολσιδομίνης ως αγχολυτικό. Πηγή: Kalouda et. al., 2015

SNAP (S-νιτροσο-N-ακετυλ-πενικιλαμίνη)

Οργανισμός-μοντέλο	Δόσεις	Χορήγηση	Συμπεριφορική τεχνική	Αποτέλεσμα
Αρουραίος	20, 40 nmol	Οξεία, ενδοϊπποκαμπικά	Υπερυψωμένος σταυροειδής λαβύρινθος	Οι δόσεις αυτές δεν είχαν κάποια επίδραση στα επίπεδα άγχους, αλλά ανταγωνίστηκαν την αγχολυτική δράση της αιθανόλης

Πίνακας 6: Αποτελέσματα πειραμάτων που μελέτησαν την αποτελεσματικότητα της SNAP ως αγχολυτικό. Πηγή: Ferreira et. al., 1999

NOC-9 (6-(2-υδροξυ-1-μεθυλ-2-νιτροσο-υδραζινο)-N-μεθυλ-1-εξαμίνη)

	Οργανισμός-μοντέλο	Δόσεις	Χορήγηση	Συμπεριφορική τεχνική	Αποτέλεσμα
1	Ποντίκι	18.75, 37.5, 75 nmol/side	Οξεία, ενδοBNST	Δοκιμασία νέου πεδίου	Αγχογόνος δράση
2	Ποντίκι	18.75, 37.5, 75 nmol/side	Οξεία, ενδοBNST	Υπερυψωμένος σταυροειδής λαβύρινθος	Αγχογόνος δράση
3	Ποντίκι	9.37, 18.75, 37.5 nmol/side	Οξεία, ενδοLmPFC	Υπερυψωμένος σταυροειδής λαβύρινθος	Δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση
4	Ποντίκι	9.37, 18.75, 37.5 nmol/side	Οξεία, ενδοRmPFC	Υπερυψωμένος σταυροειδής λαβύρινθος	Αγχογόνος δράση
5	Ποντίκι	9.37, 18.75, 37.5 nmol/side	Οξεία, αμφίπλευρα σε LmPFC και RmPFC	Υπερυψωμένος σταυροειδής λαβύρινθος	Δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση

Πίνακας 7: Αποτελέσματα πειραμάτων που μελέτησαν την αποτελεσματικότητα της NOC-9 ως αγχολυτικό. Πηγές: 1, 2: Faria et. al., 2016/ 3, 4, 5: Costa et. al., 2016

SIN-1 (3-μορφο-λινο-συδνονιμίνη)

Οργανισμός-μοντέλο	Δόσεις	Χορήγηση	Συμπεριφορική τεχνική	Αποτέλεσμα
Ποντίκι	0.1, 0.3, 1 μg/επίμυ	Οξεία, ενδοεγκεφαλοκοιλιακά	Δοκιμασία φωτός/σκότους	Οι δόσεις 0.3 και 1 μg/επίμυ εμφάνισαν αγχολυτική δράση

Πίνακας 8: Αποτελέσματα πειραμάτων που μελέτησαν την αποτελεσματικότητα της SIN-1 ως αγχολυτικό. Πηγή: Li et. al., 2002

Detanonoate

	Οργανισμός-μοντέλο	Δόσεις	Χορήγηση	Συμπεριφορική τεχνική	Αποτέλεσμα
1	Ποντίκι	0.5 mg/kg	Οξεία, ενδοπεριτοναϊκά	Υπερυψωμένος σταυροειδής λαβύρινθος	Εμφανίστηκε αγχολυτική δράση σε ποντίκια με αυξημένα επίπεδα stress, αλλά όχι σε μη αγχωμένα ποντίκια
2	Ποντίκι	0.5 mg/kg	Οξεία, ενδοπεριτοναϊκά	Δοκιμασία πεδίου με οπές	
3	Ποντίκι	0.5 mg/kg	Οξεία, ενδοπεριτοναϊκά	Δοκιμασία ανοικτού πεδίου	

Πίνακας 9: Αποτελέσματα πειραμάτων που μελέτησαν την αποτελεσματικότητα του Detanonoate ως αγχολυτικό. Πηγή: Masood et. al., 2009

Από τα παραπάνω αποτελέσματα γίνεται σαφές πως οι δότες του NO είναι μία κατηγορία ενώσεων πολλά υποσχόμενη για την αντιμετώπιση του άγχους. Ωστόσο υπάρχουν πολλά αναπάντητα ερωτήματα όσον αφορά τους δότες, τις δόσεις και τους τρόπους χορήγησης, ώστε να επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα, δηλαδή η αγχώλυση.

ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σύμφωνα με προηγούμενες έρευνες που αφορούν το SNP και τη μολσιδομίνη, αυτοί οι δότες του NO έχουν εμφανίσει αγχολυτική δράση σε προκλινικά πρότυπα που εκφράζουν γενικευμένη αγχώδη διαταραχή και κοινωνική φοβία. Παραμένει άγνωστο μέχρι σήμερα εάν αυτοί οι δότες του NO επάγουν αγχολυτική συμπεριφορά σε προκλινικά πρότυπα που αντανακλούν άλλες αγχώδεις διαταραχές όπως είναι η ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή και το μετατραυματικό στρες. Αυτός είναι και ο σκοπός αυτής της έρευνας. Στα πειράματα που θα περιγραφούν παρακάτω, διερευνάται η επίδραση του SNP και της μολσιδομίνης, σε προκλινικά μοντέλα της ιδεοψυχαναγκαστικής διαταραχής και του μετατραυματικού στρες. Οι πειραματικές διαδικασίες και τα αποτελέσματα αναλύονται εκτενώς στη συνέχεια.

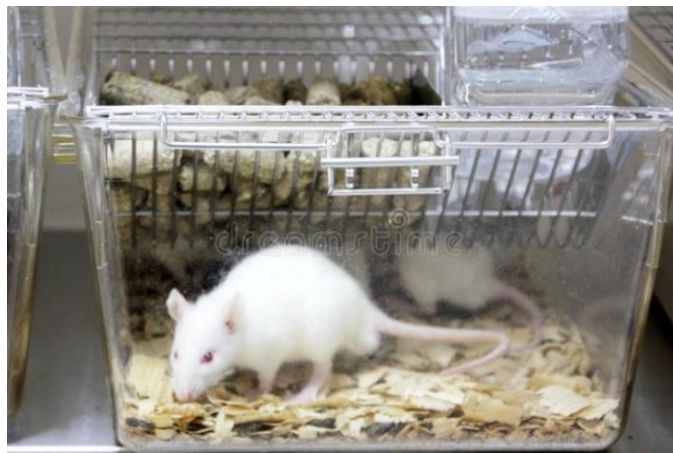
ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

2.1. Πειραματόζωα

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων που θα περιγραφούν στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί αλφικοί επίμυες, του γένους Wistar (Εικόνα 13), ηλικίας 3 μηνών και βάρους περίπου 250-300 g.

Οι επίμυες ήταν τοποθετημένοι ανά τρεις σε ίδια κλουβιά (47,5 cm μήκος x 20,5 cm ύψος x 27 cm πλάτος), κατασκευασμένα από πολυανθρακικό (Makrolon®), με ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό. Τα κλουβιά ήταν τοποθετημένα σε κλιματιζόμενο χώρο, με τη θερμοκρασία και την υγρασία ρυθμισμένες στους 20-22°C και 50-55% αντίστοιχα. Ο κύκλος φωτός/σκότους ήταν ρυθμισμένος σε 12 h φως/12 h σκοτάδι, με τα φώτα να ανάβουν αυτόματα στις 7 π.μ.

Ο χειρισμός των πειραματόζωων έγινε σε συμφωνία με εθνικές (Animal Act, P.D. 160/91) και διεθνείς οδηγίες (EEC Council Directive 86/609, JL 358, 1, December 12, 1987) όπως ορίζονται από τα νομικά πλαίσια του κράτους και της Ευρωπαϊκής Ένωσης.



Εικόνα 13: Επίμυς Wistar

2.2. Συμπεριφορικές τεχνικές

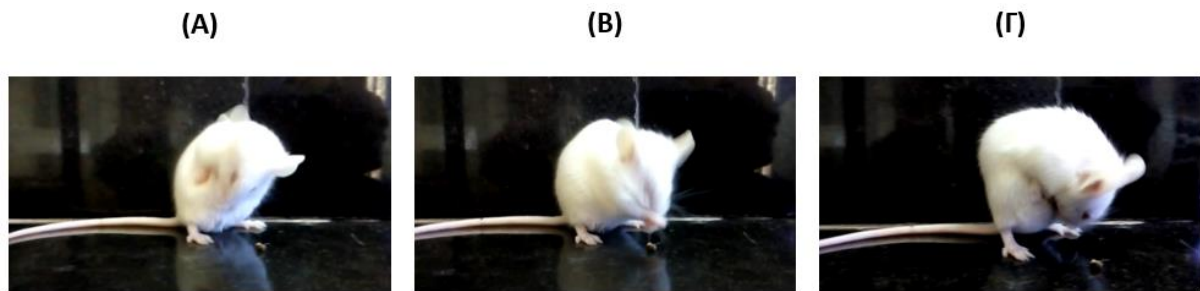
Η παρούσα έρευνα μελετά την επίδραση των δοτών NO στην ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή (OCD) και το μετατραυματικό stress (PTSD). Όπως και στον άνθρωπο, οι παθήσεις αυτές εκφράζονται στους επίμους με συγκεκριμένες συμπεριφορές, οι οποίες έχουν ταυτοποιηθεί και αποτέλεσαν τη βάση για τη δημιουργία των τεστ που θα περιγραφούν στη συνέχεια.

2.2.1. Πειραματικό πρότυπο ιδεοψυχαναγκαστικής διαταραχής

Υπερβολικός αυτοκαθαρισμός

Ο αυτοκαθαρισμός, το λεγόμενο self-grooming, είναι μία διαδικασία που ακολουθείται από τους επίμους, με σκοπό τον καθαρισμό του σώματος, του προσώπου και των γεννητικών τους οργάνων. Πιο συγκεκριμένα, περιλαμβάνει τρίψιμο (τρέμουλο), περιποίηση του σώματος συμπεριλαμβανομένης της ουράς, του προσώπου, της κεφαλής και των γεννητικών οργάνων, γλείψιμο των ποδιών και κούνημα της κεφαλής (Εικόνα 14) (Graf et al., 2003).

Έχει βρεθεί πως η συμπεριφορά αυτοκαθαρισμού αυξάνεται σε καταστάσεις άγχους, ακόμη και χωρίς το σώμα του επίμου να χρίζει καθαρισμού (Kalueff et al., 2005). Μάλιστα, η συμπεριφορά αυτή χαρακτηρίζεται από επαναλαμβανόμενο μοτίβο κινήσεων (στερεοτυπίες). Ο αγωνιστής του σεροτονεργικού 5-HT_{2C} υποδοχέα mCPP έχει την ιδιότητα να προκαλεί υπερβολικό αυτοκαθαρισμό στα τρωκτικά (Bagdy et. al., 1992) και να επιτείνει τα συμπτώματα σε ασθενείς που υποφέρουν από την ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή (OCD). Συνεπώς, αυτή η συμπεριφορά υπερβολικού αυτοκαθαρισμού επαγόμενη από το mCPP προσομοιάζει το OCD στον άνθρωπο το οποίο είναι μια αγχώδης διαταραχή που χαρακτηρίζεται από εμμονές σχετιζόμενες συχνά με την καθαριότητα, και εκδηλώνεται με επαναλαμβανόμενες ενέργειες, όπως συχνό πλύσιμο στην περίπτωση αυτή. Χορήγηση πιθανών αγχολυτικών φαρμάκων αποσκοπεί στη μείωση της διάρκειας του αυτοκαθαρισμού στον επίμου.



Εικόνα 14: Χαρακτηριστικά στιγμιότυπα από τη διαδικασία αυτοκαθαρισμού **(Α):** του σώματος, **(Β):** του προσώπου, **(Γ):** των γεννητικών οργάνων. Πηγή: <https://www.youtube.com/watch?v=w5JMeSNHpPY>

Πειραματικό πρωτόκολλο

Η δοκιμασία για τον προσδιορισμό της διάρκειας αυτοκαθαρισμού διήρκησε 2 μέρες και πραγματοποιήθηκε σε κλωβό κινητικής δραστηριότητας. Πρόκειται για μία συσκευή κατασκευασμένη από plexiglass (με εξαίρεση την κάτω έδρα που αποτελούταν από έναν μεταλλικό δίσκο), διαστάσεων 41 cm μήκος x 33 cm ύψος x 41 cm πλάτος. Ο κλωβός, και συγκεκριμένα η κάτω επιφάνειά του, είναι συνδεδεμένη με κατάλληλη συσκευή, δημιουργώντας ένα κύκλωμα που μετατρέπει τις κινήσεις του επίμους σε μετρήσιμη κινητικότητα-δραστηριότητα (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: **Αριστερά:** Ο κλωβός κινητικής δραστηριότητας, **Δεξιά:** Η συσκευή είναι συνδεδεμένη με τον κλωβό, ώστε να λαμβάνει δεδομένα σχετικά με τις κινήσεις του επίμους μέσα σε αυτόν. Στην οθόνη της συσκευής απεικονίζεται ο αριθμός που εκφράζει την κινητική δραστηριότητα του αρουραίου.

Την πρώτη μέρα διενέργειας της δοκιμασίας, κάθε αρουραίος τοποθετήθηκε στον κλωβό για 10 min. Η διαδικασία αυτή, γνωστή ως habituation, αποσκοπεί στην εξοικείωση του ζώου με το συγκεκριμένο περιβάλλον, καθώς η εμφάνιση αγχώδους συμπεριφοράς εξαιτίας της μεταφοράς του σε έναν άγνωστο χώρο, θα μπορούσε να διαστρεβλώσει τα αποτελέσματα της δοκιμασίας κατά τη δεύτερη μέρα.

Την επόμενη ημέρα, μετά τη χορήγηση των φαρμάκων, ο κάθε αρουραίος τοποθετούταν ξανά στον κλωβό, για 20 min, ενώ η συμπεριφορά του καταγραφόταν από μία βιντεοκάμερα.

Από τις καταγραφές αυτές προσδιορίστηκαν για κάθε ζώο, εκτός από τη διάρκεια του αυτοκαθαρισμού, η κάθετη (rearing) και η οριζόντια κινητικότητα του (Εικόνα 19).

2.2.2. Πειραματικό πρότυπο μετατραυματικού stress

Συμπεριφορά «παγώματος»

Το «πάγωμα» (freezing), είναι μία συμπεριφορά κατά την οποία ο επίμυς δεν πραγματοποιεί καμία κίνηση, εκτός από εκείνες που είναι απαραίτητες για την αναπνοή (Brandão et al, 2008).

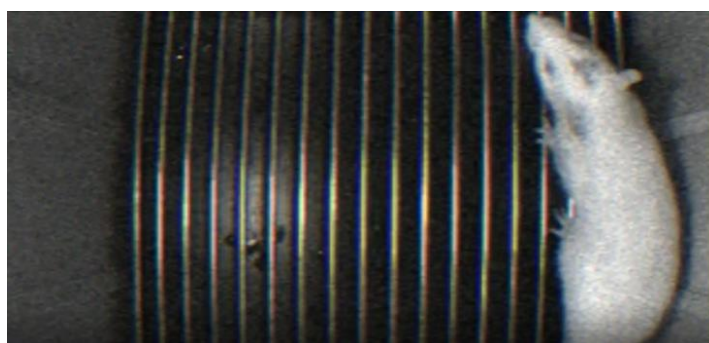
Αποτελεί ένα είδος αμυντικής συμπεριφοράς. Το συγκεκριμένο τεστ, που ονομάζεται δοκιμασία του πλαισιο-εξαρτώμενου φόβου (Contextual Fear Conditoning test-CFC test), στηρίζεται στην ανάμνηση ενός δυσάρεστου γεγονότος (έκθεση του τρωκτικού σε ηλεκτρικό σοκ). Σύμφωνα με μελέτες (Bolles and Fanselow, 1980), η πρόκληση ηλεκτρικού σοκ σε επίμυ τοποθετημένο σε ειδικά διαμορφωμένο κλωβό, επιφέρει δύο διαδοχικές αντιδράσεις. Η πρώτη αντίδραση οφείλεται κατά κύριο λόγο στο αίσθημα του πόνου που επιφέρει ο ηλεκτρισμός, και χαρακτηρίζεται ως έντονη, αφού περιλαμβάνει υψηλή κινητικότητα, άλματα, τρέξιμο, ως μία προσπάθεια διαφυγής. Στη συνέχεια όμως επέρχεται η δεύτερη αντίδραση, κατά την οποία το ζώο ακινητοποιείται-«παγώνει». Η αντίδραση αυτή δε σχετίζεται με τον πόνο, αλλά με τον φόβο και το άγχος που προκαλεί η πιθανότητα αναβίωσης του επίπνου ερεθίσματος.

Αυτό ακριβώς χαρακτηρίζει το μετατραυματικό stress, την αγχώδη διαταραχή κατά την οποία ο ασθενής βιώνει έντονο άγχος λόγω της ανάμνησης ενός

οδυνηρού ερεθίσματος. Συνεπώς, η μείωση της χρονικής διάρκειας του «παγώματος» μπορεί να αποτελέσει δείκτη της αγχολυτικής δράσης ενός φαρμάκου που μελετάται για την ανακούφιση των συμπτωμάτων του PTSD.

Πειραματικό πρωτόκολλο

Η δοκιμασία του πλαίσιο-εξαρτώμενου φόβου ακολουθεί ένα πρωτόκολλο που διαρκεί 3 ημέρες (Gravius et. al., 2006). Το τεστ πραγματοποιείται σε μια ειδική συσκευή κατασκευασμένη από plexiglass, της οποίας το δάπεδο αποτελείται από 17 ράβδους, κατασκευασμένες από ανοξείδωτο ασάλι. Κάθε ράβδος έχει διάμετρο 3 mm (Εικόνα 16). Μία απομονωμένη γεννήτρια χρησιμοποιήθηκε για την πρόκληση ηλεκτρικών σοκ στον αρουραίο, μέσω των ράβδων του δαπέδου.



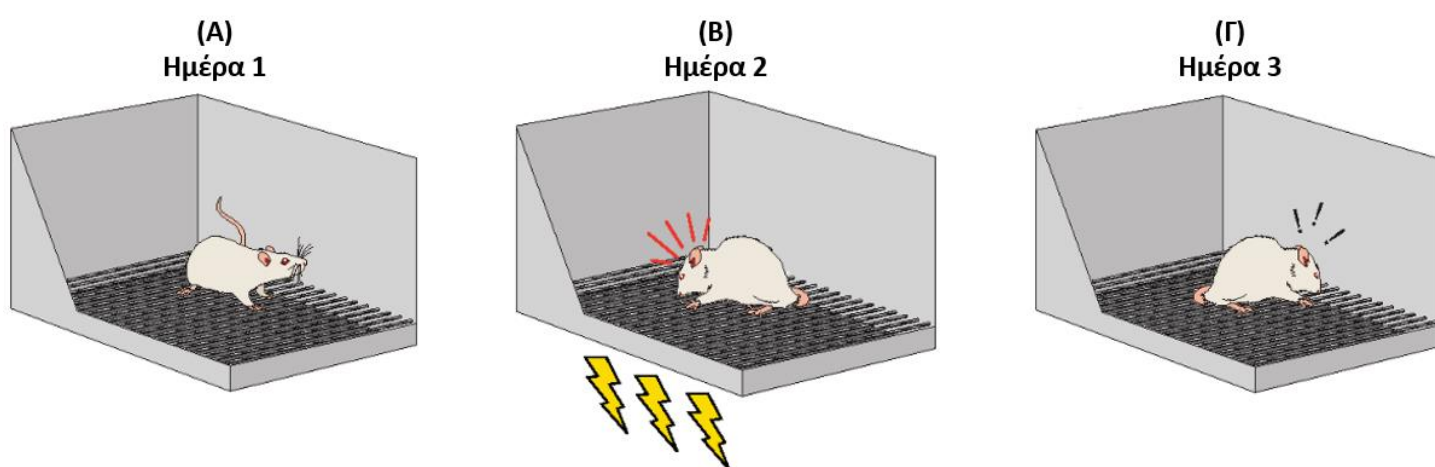
Εικόνα 16: Το εσωτερικού του κλωβού στον οποίο διενεργείται η δοκιμασία πλαίσιο-εξαρτώμενου φόβου (CFC test). Διακρίνονται στο δάπεδο οι ράβδοι μέσω των οποίων προκαλείται το ηλεκτρικό σοκ.

Την πρώτη μέρα διενέργειας του CFC τεστ, κάθε αρουραίος τοποθετήθηκε στη συσκευή για 2 min, με σκοπό όπως και στο προηγούμενο πείραμα, την εξοικείωσή του με το νέο περιβάλλον (habituation) (Εικόνα 17A).

Κατά τη δεύτερη ημέρα, τα ζώα έλαβαν το ηλεκτρικό ερέθισμα. Ειδικότερα, αφού τοποθετήθηκαν στον ειδικό κλωβό για 5 min, προκλήθηκαν 3 ηλεκτροσόκ έντασης 0,5 mA και διάρκειας 1 s το καθένα. Συγκεκριμένα, το πρώτο προκλήθηκε στα 5 min μετά την τοποθέτηση του επίμυος στον κλωβό, το δεύτερο στα 6 min και το τρίτο στα 7 min. Ένα λεπτό μετά από το τελευταίο σοκ, οι αρουραίοι επιστράφησαν στους κλωβούς τους (Εικόνα 17B).

Την τρίτη ημέρα, μετά τη λήψη του φαρμάκου, κάθε ζώο τοποθετήθηκε στον ειδικό κλωβό για 5 min, χωρίς να δεχθεί κάποιο ηλεκτρικό ερέθισμα. Η συμπεριφορά τους κατά το διάστημα αυτό καταγράφηκε με τη βοήθεια βιντεοκάμερας (Εικόνα 17Γ).

Από τις καταγραφές προσδιορίστηκε ο συνολικός χρόνος «παγώματος» για κάθε ζώο, σε δευτερόλεπτα (s).

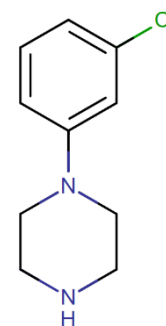


Εικόνα 17: **(Α):** Κατά την πρώτη ημέρα πραγματοποιείται εξοικείωση του αρουραίου με το περιβάλλον του κλωβού (Συνολική διάρκεια: 2 min). **(Β):** Τη δεύτερη ημέρα, ο επίμυς δέχεται τα τρία ηλεκτρικά σοκ (Συνολική διάρκεια: 8 min). **(Γ):** Την τρίτη ημέρα, μετά τη λήψη φαρμάκου και την τοποθέτηση του ζώου στον κλωβό, παρατηρείται η συμπεριφορά «παγώματος» (Συνολική διάρκεια: 5 min).

2.3. Αντιδραστήρια

Στις δοκιμασίες που διεξήχθησαν, χρησιμοποιήθηκαν οι δότες μονοξειδίου του αζώτου νιτροπρωσσικό νάτριο (SNP) και μολσιδομίνη (Βλ. Ενότητα 1.3.4.) καθώς και η μετα-χλωροφαινυλπιπεραζίνη (mCPP) (Εικόνα 18). Η mCPP έχει συγγένεια για την οικογένεια υποδοχέων 5-HT₂, η οποία αποτελείται από τους υποτύπους 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} και 5-HT_{2C}. Έχει βρεθεί πως η λήψη της μπορεί να προκαλέσει άγχος, ναυτία, απώλεια όρεξης και υποκινητικότητα (Kennett et al., 1989).

Επιπλέον επάγει υπερβολικό αυτοκαθαρισμό στα τρωκτικά, και για αυτόν τον λόγο χρησιμοποιείται ευρέως για τη δημιουργία του πειραματικού μοντέλου του OCD.



Εικόνα 18: Η χημική δομή της μετα-χλωροφαινυλπιπεραζίνης (mCPP).

Για την παρασκευή των διαλυμάτων, η εκάστοτε ουσία, μετά από ζύγιση σε ζυγό ακριβείας, διαλύθηκε σε φυσιολογικό ορό (NaCl 0.9%). Τα διαλύματα παρασκευάζονταν την ημέρα κατά την οποία θα πραγματοποιούταν η χορήγησή τους, η οποία έγινε ενδοπεριτοναϊκά (i.p.) σε αναλογία 1 ml/kg. Καθώς το SNP όπως αναφέρθηκε, είναι φωτοευαίσθητο, το δοχείο στο οποίο παρασκευάστηκε ήταν καλυμμένο, προς αποφυγή επαφής του διαλύματος με το φως.

Η δόση της mCPP που χρησιμοποιήθηκε ήταν 0.6 mg/kg, καθώς προκαλεί έντονη συμπεριφορά αυτοκαθαρισμού (Graf et al., 2003), που προσομοιάζει τα συμπτώματα της OCD. Οι δόσεις του SNP που ελέγχθηκαν ήταν 0.1 mg/kg, 0.5 mg/kg και 1 mg/kg, ενώ για τη μολσιδομίνη 1 mg/kg, 2 mg/kg και 4 mg/kg. Στα ζώα ελέγχου (control) χορηγήθηκε ανάλογος όγκος φυσιολογικού ορού (i.p.).

2.4. Πειράματα

Τα ζώα ζυγίστηκαν την ημέρα 1, πριν την πραγματοποίηση του habituation, ώστε να υπολογιστούν οι όγκοι του φαρμάκου που θα χορηγούνταν στη συνέχεια του πειράματος. Όλες οι δοκιμασίες έλαβαν χώρα μεταξύ 10:00 π.μ. και 15:00 μ.μ., κατά τη φωτεινή περίοδο του κύκλου φωτός/σκότους.

Οι πειραματικές συσκευές μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας για κάθε επίμυ, καθαρίζονταν με αιθανόλη 20% και στεγνώνονταν, καθώς οσμές όπως αυτή των ούρων, μπορούν να προκαλέσουν σύγχυση στο ζώο.

Τα βίντεο που καταγράφηκαν αναλύθηκαν από παρατηρητή που δεν είχε πληροφορίες για τη φαρμακευτική αγωγή που χορηγήθηκε σε κάθε περίπτωση.

2.4.1. Πείραμα 1: Επίδραση του SNP επί του υπερβολικού αυτοκαθαρισμού, προκληθέντα από τον αγωνιστή του σεροτονεργικού 5-HT_{2c} υποδοχέα, 1-μετα χλωροφαινυλπιπεραζίνη (mCPP)

Χρησιμοποιήθηκαν 6 πειραματικές ομάδες, η καθεμία αποτελούνταν από 8 αρουραίους. Οι πειραματικές ομάδες με βάση τη φαρμακευτική αγωγή που χορηγήθηκε, ήταν οι εξής:

Πειραματική ομάδα	Ένεση 1	Ένεση 2
1	Φυσιολογικός ορός	Φυσιολογικός ορός
2	Φυσιολογικός ορός	SNP (0.5 mg/kg)
3	Φυσιολογικός ορός	SNP (1 mg/kg)
4	Φυσιολογικός ορός	mCPP (0.6 mg/kg)
5	mCPP (0.6 mg/kg)	SNP (0.5 mg/kg)
6	mCPP (0.6 mg/kg)	SNP (1 mg/kg)

Το SNP χορηγήθηκε 20 min πριν την τοποθέτηση του ζώου στον κλωβό δραστηριότητας, ενώ η mCPP 10 min πριν τη δοκιμασία. Η ομάδα ελέγχου έλαβε φυσιολογικό ορό 20 min και 10 min πριν το πείραμα. Στη δεύτερη και τρίτη ομάδα χορηγήθηκε ορός 10 min νωρίτερα, ενώ στην τέταρτη, 20 min πριν τη δοκιμασία.

2.4.2. Πείραμα 2: Επίδραση του SNP στη συμπεριφορά των επιμύων στη δοκιμασία του πλαισιο-εξαρτώμενου φόβου

Οι αρουραίοι χωρίστηκαν σε 4 πειραματικές ομάδες (N=8 επίμυες), ως εξής:

Πειραματική ομάδα	Ένεση
1	Φυσιολογικός ορός
2	SNP (0.1 mg/kg)
3	SNP (0.5 mg/kg)
4	SNP (1 mg/kg)

Η ένεση του SNP ή του φυσιολογικού ορού, πραγματοποιήθηκε 30 min πριν την έναρξη του τεστ.

2.4.3. Πείραμα 3: Επίδραση της μολσιδομίνης επί του υπερβολικού αυτοκαθαρισμού, προκληθέντα από τον αγωνιστή του σεροτονεργικού 5-HT_{2c} υποδοχέα, 1-μετα-χλωροφαινυλπιπεραζίνη (mCPP)

Όμοια με το Πείραμα 1 (Βλ. Ενότητα 2.4.1.), με εξαίρεση τη φαρμακευτική αγωγή, καθώς στο πείραμα αυτό χορηγήθηκαν δύο δόσεις μολσιδομίνης ως εξής (N=8 επίμυες):

Πειραματική ομάδα	Ένεση 1	Ένεση 2
1	Φυσιολογικός ορός	Φυσιολογικός ορός
2	Φυσιολογικός ορός	Μολσιδομίνη (2 mg/kg)
3	Φυσιολογικός ορός	Μολσιδομίνη (4 mg/kg)
4	Φυσιολογικός ορός	mCPP (0.6 mg/kg)
5	mCPP (0.6 mg/kg)	Μολσιδομίνη (2 mg/kg)
6	mCPP (0,6 mg/kg)	Μολσιδομίνη (4 mg/kg)

Η μολσιδομίνη χορηγήθηκε 40 min ενώ το mCPP 10 min πριν το τεστ. Η ομάδα ελέγχου δέχτηκε στις ίδιες χρονικές στιγμές ενέσεις φυσιολογικού

ορού, ενώ ο ορός ενέθηκε 10 min πριν το τεστ στις ομάδες 2 και 3, και 40 min νωρίτερα στην τέταρτη ομάδα.

2.4.4. Πείραμα 4: Επίδραση της μολσιδομίνης στη συμπεριφορά των επιμύων στη δοκιμασία του πλαισιο-εξαρτώμενου φόβου

Όμοια με το πείραμα 2 (Βλ. Ενότητα 2.4.2.), ωστόσο πραγματοποιήθηκε χορήγηση μολσιδομίνης, και οι πειραματικές ομάδες (N=9 επίμυες) διαμορφώθηκαν ως εξής:

Πειραματική ομάδα	Ένεση
1	Φυσιολογικός ορός
2	Μολσιδομίνη (1 mg/kg)
3	Μολσιδομίνη (2 mg/kg)
4	Μολσιδομίνη (4 mg/kg)

Η μολσιδομίνη ή ο φυσιολογικός ορός χορηγήθηκαν 60 min πριν την πραγματοποίηση της δοκιμασίας για κάθε επίμυ.

2.5. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Για την ανάλυση των δεδομένων από τα πειράματα 1 και 3, χρησιμοποιήθηκε η αμφίδρομη ανάλυση διασποράς (two-way ANOVA), καθώς περιλάμβαναν δύο παράγοντες, την mCPP και το SNP ή τη μολσιδομίνη. Αντίστοιχα, στα Πειράματα 2 και 4, με παράγοντα το μοναδικό φάρμακο που χορηγήθηκε σε κάθε αρουραίο, εφαρμόστηκε μονόδρομη ανάλυση διασποράς (one-way ANOVA). Στις στατιστικά σημαντικές αλληλεπιδράσεις που προέκυψαν από την αμφίδρομη ανάλυση διασποράς, πραγματοποιήθηκε περαιτέρω ανάλυση μέσω του Turkey's t-test.

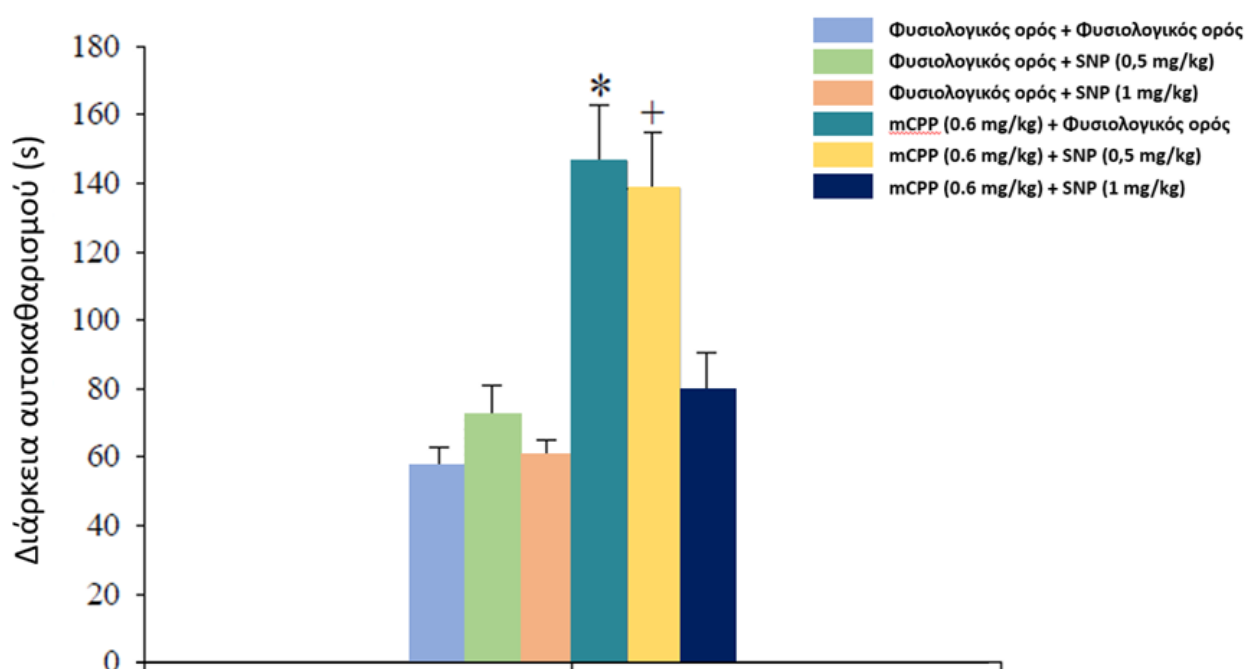
Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα, και οι τιμές $p < 0.05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Πείραμα 1: Επίδραση του SNP επί του υπερβολικού αυτοκαθαρισμού, προκληθέντα από τον αγωνιστή του σεροτονεργικού 5-HT_{2c} υποδοχέα, 1-μετα χλωροφαινυλιπεραζίνη (mCPP)

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε στατιστική σημαντικότητα στις δράσεις του mCPP [F(1,47) = 18.8, p < 0.001] και του SNP [F(2,47) = 5.9, p = 0.006], αλλά και της αλληλεπίδρασης: mCPP x SNP [F(2,47) = 4.95, p = 0.012].

Οι ομάδες που έλαβαν mCPP είτε με φυσιολογικό ορό είτε με SNP (0,5 mg/kg), εμφάνισαν τις μεγαλύτερες χρονικές διάρκειες αυτοκαθαρισμού. Ωστόσο, η ομάδα που σε συνδυασμό με το mCPP έλαβε SNP σε δόση 1 mg/kg, εμφάνισε αρκετά χαμηλότερα επίπεδα αυτοκαθαρισμού, και μάλιστα αυτά δεν διέφεραν στατιστικά από των ομάδων ελέγχου. (Διάγραμμα 1A)

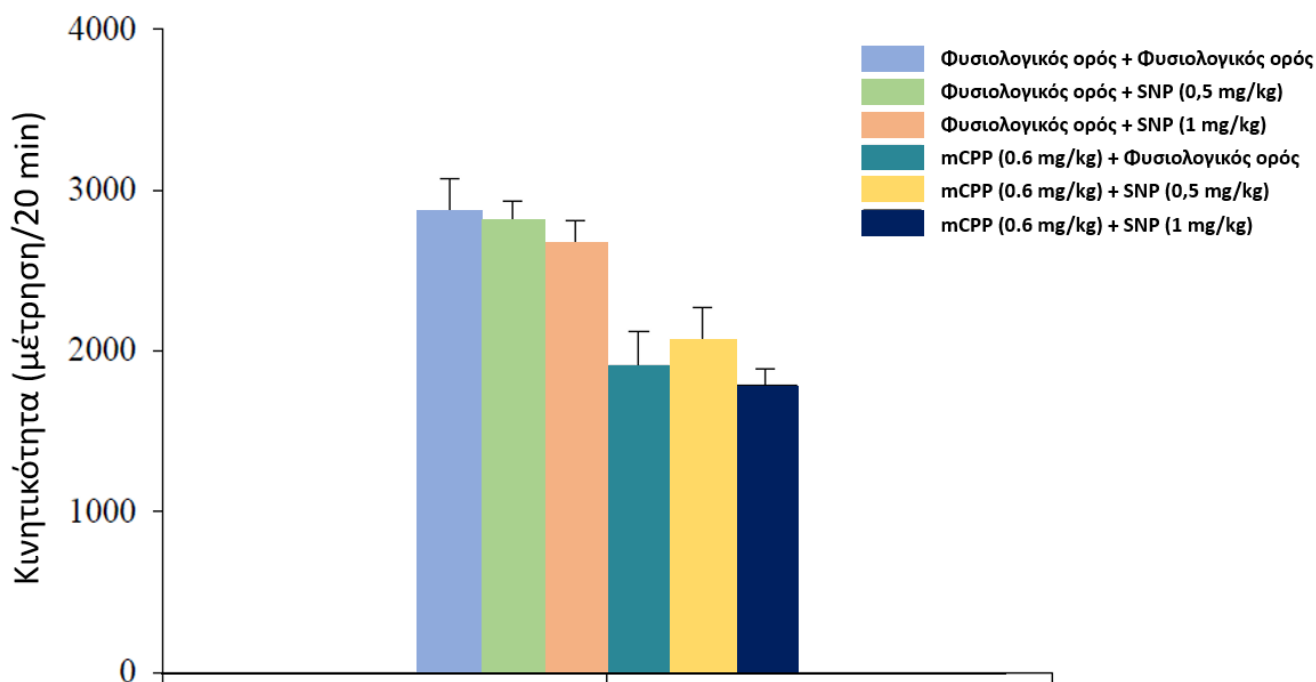


Διάγραμμα 1A: Η χρονική διάρκεια αυτοκαθαρισμού σε δευτερόλεπτα (s). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα για 8 επίμυες ανά πειραματική ομάδα. Τα SNP και mCPP χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά 20 min και 10 min πριν το τεστ αντίστοιχα.

*p<0.05 έναντι των υπόλοιπων πειραματικών ομάδων [με εξαίρεση την ομάδα mCPP + SNP (0.5 mg/kg)]

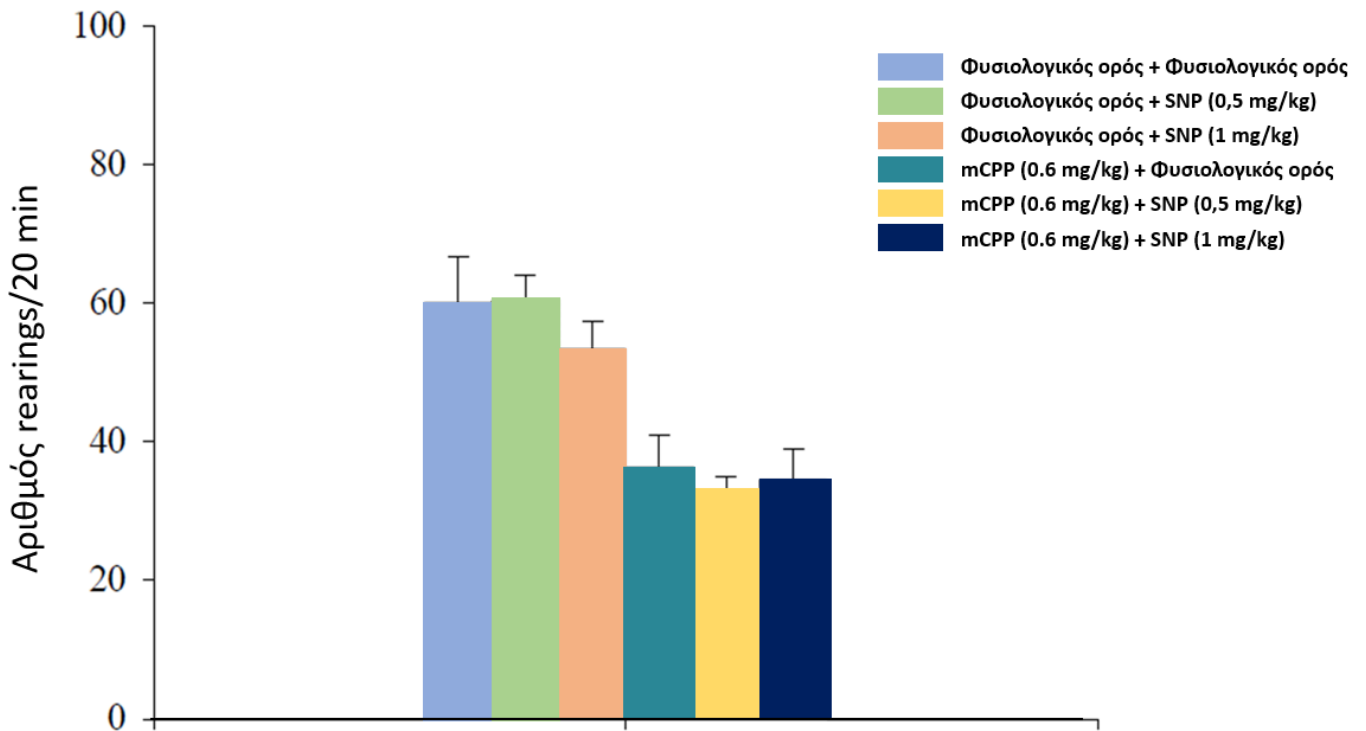
+p<0.05 έναντι των υπόλοιπων πειραματικών ομάδων (με εξαίρεση την ομάδα mCPP + φυσιολογικός ορός)

Από τη δοκιμασία αυτή, με ειδική συσκευή προσδιορίστηκε και η κινητικότητα των ζώων. Από ανάλυση των δεδομένων με two-way ANOVA, στατιστικά σημαντική βρέθηκε μόνο η δράση του mCPP [$F(1,47) = 36.8, p < 0,001$], όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 1B. Οι πειραματικές ομάδες που έλαβαν mCPP, εμφάνισαν χαμηλότερη κινητικότητα σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου.



Διάγραμμα 1B: Αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μετρήσεις κινητικότητας κατά τη δοκιμασία για τον προσδιορισμό του χρόνου αυτοκαθαρισμού. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα για 8 επίμυες ανά πειραματική ομάδα. Τα SNP και mCPP χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά 20 min και 10 min πριν το τεστ αντίστοιχα.

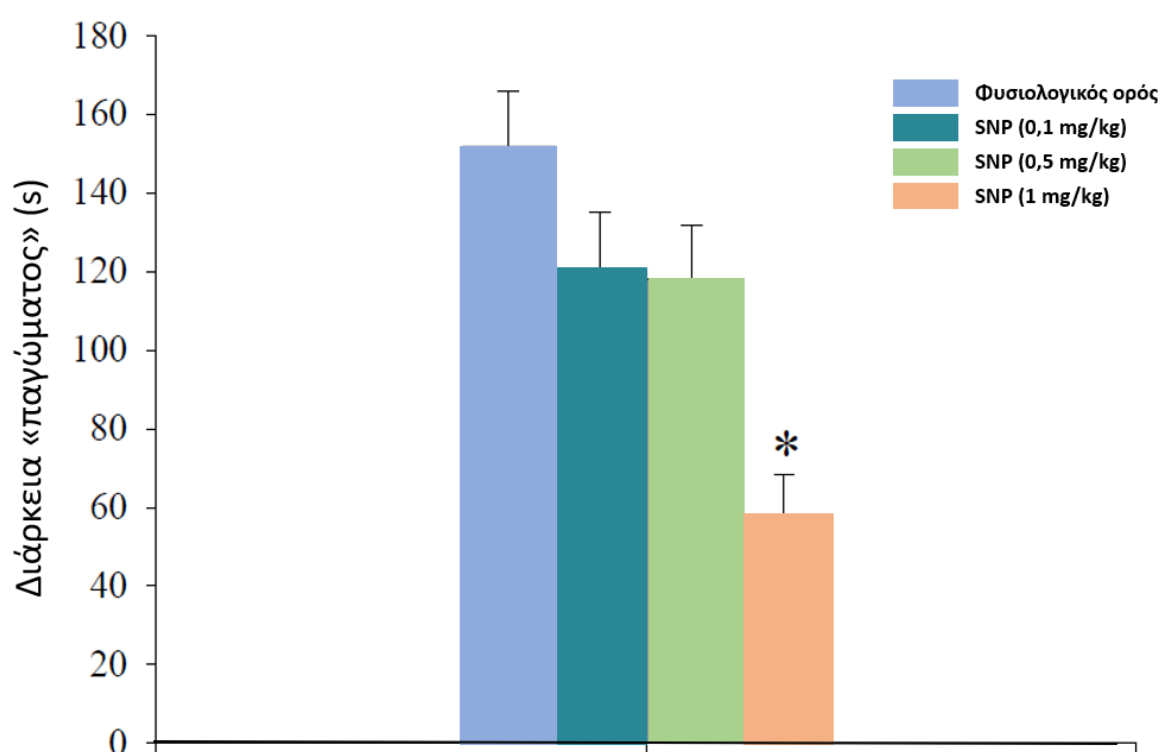
Ανάλυση των πειραματικών δεδομένων σχετιζόμενων με τον αριθμό των καθέτων εγέρσεων του ζώου (rearing) ανέδειξε μια στατιστική σημαντικότητα που αφορά μόνο τη δράση του mCPP [$F(1,47) = 41.4, p < 0.001$]. Όλοι οι επίμυες στους οποίους ενέθηκε mCPP εμφάνισαν μειωμένο αριθμό rearing συγκρινόμενοι με τις ομάδες ελέγχου. (Διάγραμμα 1Γ)



Διάγραμμα 1Γ: Αποτελέσματα που προέκυψαν από τον προσδιορισμό των rearings κατά τα 20 min που διήρκησε η δοκιμασία στον κλωβό δραστηριότητας. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα για 8 επίμυες ανά πειραματική ομάδα. Τα SNP και mCPP χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά 20 min και 10 min πριν το τεστ αντίστοιχα.

3.2. Πείραμα 2: Επίδραση του SNP στη συμπεριφορά των επιμύων στη δοκιμασία του πλαισιο-εξαρτώμενου φόβου

Σύμφωνα με τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας του πλαισιο-εξαρτώμενου φόβου, η δράση του SNP είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της διάρκειας της συμπεριφοράς παγώματος [$F(3,31) = 9, p < 0.001$]. Πιο έντονη μείωση ωστόσο σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες, παρατηρήθηκε στην πειραματική ομάδα που έλαβε θεραπεία με την υψηλότερη δόση του SNP (1 mg/kg) ($p < 0.05$). (Διάγραμμα 2)



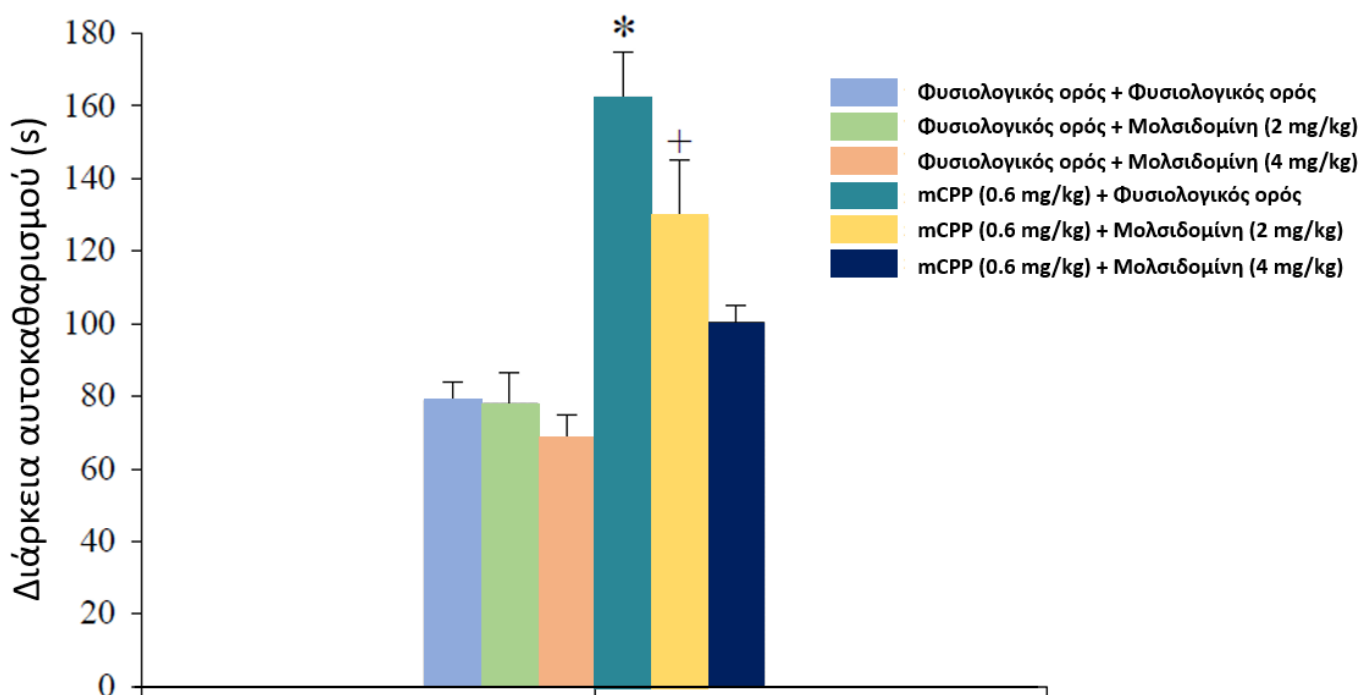
Διάγραμμα 2: Η χρονική διάρκεια της συμπεριφοράς «παγώματος» σε δευτερόλεπτα (s). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα για 8 επίμυες ανά πειραματική ομάδα. Το SNP και ο φυσιολογικός ορός χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά 30 min πριν το τεστ.

* $p < 0.05$ έναντι των υπόλοιπων πειραματικών ομάδων

3.3. Πείραμα 3: Επίδραση της μολσιδομίνης επί του υπερβολικού αυτοκαθαρισμού, προκληθέντα από τον αγωνιστή του σεροτονεργικού 5-HT_{2C} υποδοχέα, 1-μετα-χλωροφαινυλπιπεραζίνη (mCPP)

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την παρατήρηση των καταγραφών του πειράματος, υποδεικνύει στατιστική σημαντικότητα των δράσεων του mCPP [F(1,47) = 47.4, p < 0.001], της μολσιδομίνης [F(2,47) = 6.7, p = 0.003], αλλά και της συνδυαστικής δράσης αυτών: mCPP x μολσιδομίνη [F(2,47) = 3.5, p = 0.04].

Τη μεγαλύτερη διάρκεια αυτοκαθαρισμού εμφάνισαν οι πειραματικές ομάδες στις οποίες χορηγήθηκε είτε mCPP με φυσιολογικό ορό, είτε mCPP με μολσιδομίνη (2 mg/kg). Αντίθετα, η υψηλότερη δόση της μολσιδομίνης (4 mg/kg) φάνηκε να μετριάζει αισθητά τον επαγόμενο από το mCPP υπερβολικό αυτοκαθαρισμό (Διάγραμμα 3Α).

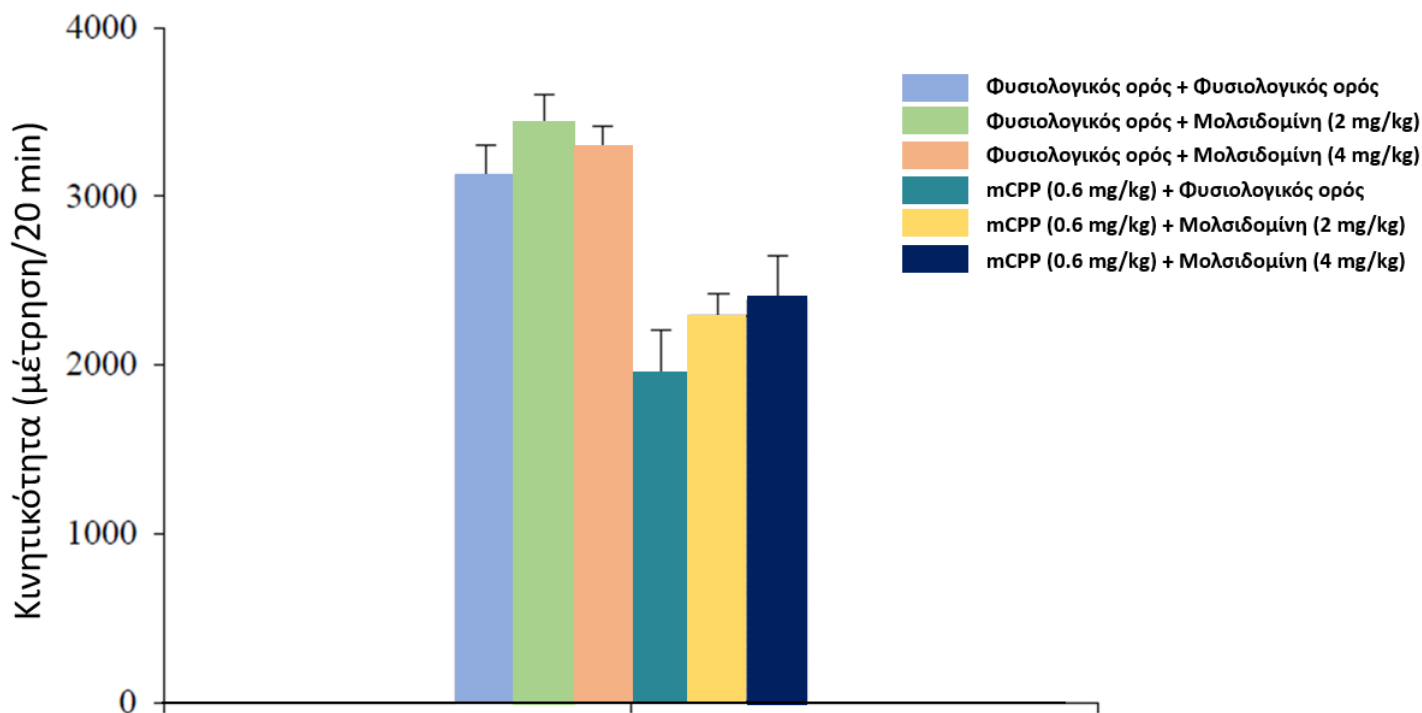


Διάγραμμα 3Α: Η χρονική διάρκεια αυτοκαθαρισμού σε δευτερόλεπτα (s). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα για 8 επίμυες ανά πειραματική ομάδα. Η μολσιδομίνη και mCPP χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά 40 min και 10 min πριν το τεστ αντίστοιχα.

*p<0.05 έναντι των υπόλοιπων πειραματικών ομάδων [με εξαίρεση την ομάδα mCPP x Μολσιδομίνη (2 mg/kg)]

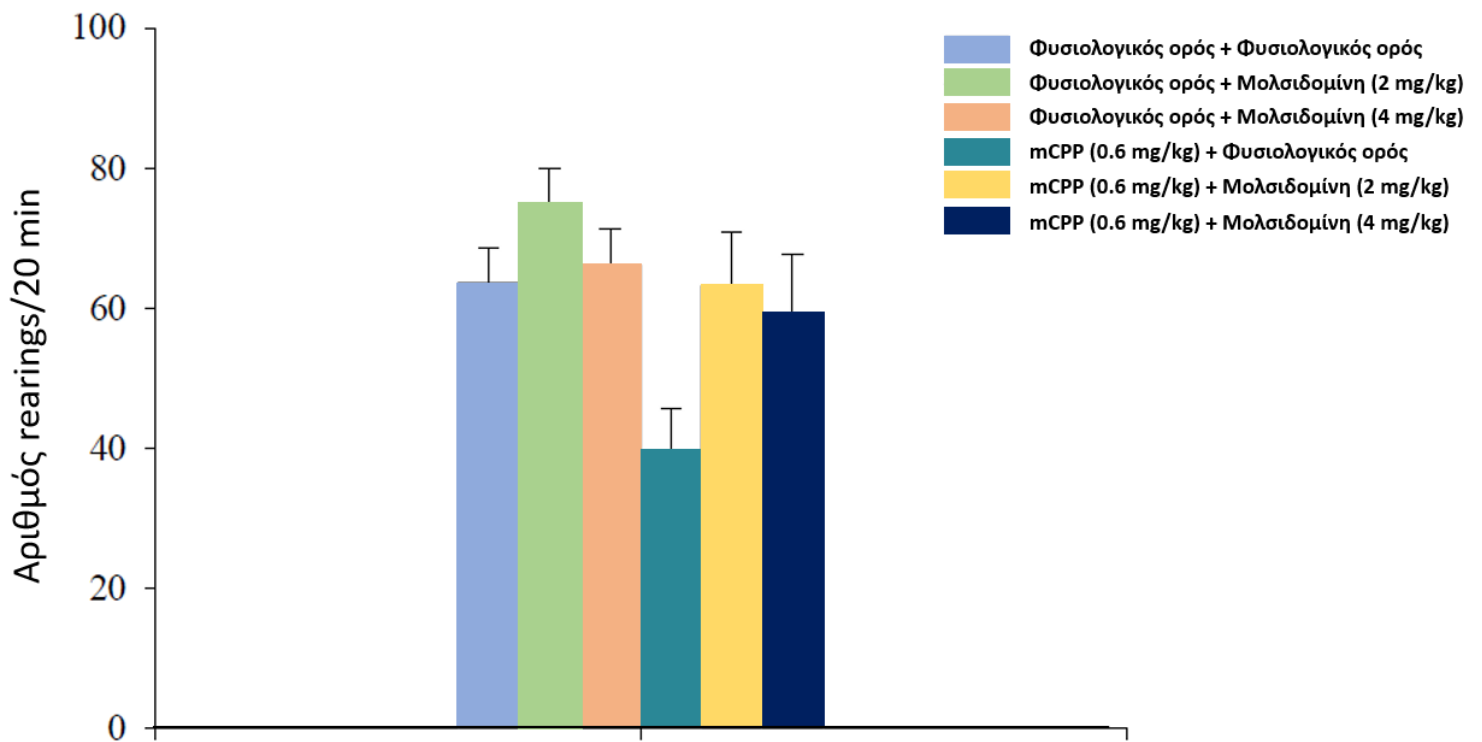
†p<0.05 έναντι των υπόλοιπων πειραματικών ομάδων (με εξαίρεση την ομάδα mCPP + φυσιολογικός ορός)

Ανάλυση των δεδομένων της κινητικότητας υποδεικνύει ότι ούτε η δράση της μολσιδομίνης αλλά ούτε και της αλληλεπίδρασης mCPP x μολσιδομίνη φάνηκε να είναι στατιστικά σημαντικές. Αντίθετα, στατιστικά σημαντική αποδείχθηκε η δράση του mCPP [$F(1,47) = 45.3, p < 0.001$]. Σύμφωνα με τα παραπάνω, όλες οι πειραματικές ομάδες που έλαβαν mCPP παρουσίασαν μειωμένη κινητικότητα (Διάγραμμα 3B).



Διάγραμμα 3B: Αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μετρήσεις κινητικότητας κατά τη δοκιμασία για τον προσδιορισμό του χρόνου αυτοκαθαρισμού. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα για 8 επίμυες ανά πειραματική ομάδα. Η μολσιδομίνη και mCPP χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά 40 min και 10 min πριν το τεστ αντίστοιχα.

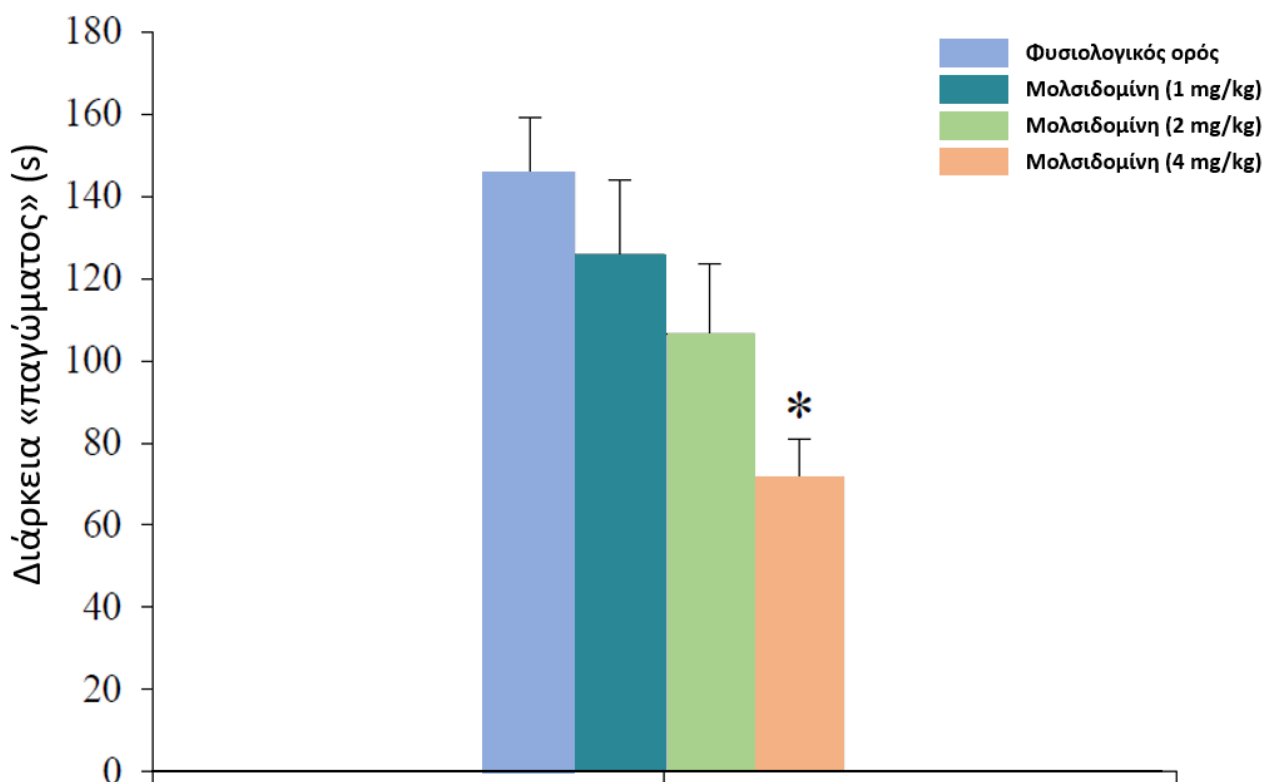
Όπως και στο πείραμα 1, προσδιορίστηκε ο αριθμός των rearings για κάθε πειραματική ομάδα. Σύμφωνα με τη στατιστική ανάλυση, στατιστικά σημαντικές βρέθηκαν οι επιδράσεις των mCPP [$F(1,47) = 7.7, p < 0.008$] και μολσιδομίνης [$F(2,47) = 3.9, p = 0.029$], σε αντίθεση με την αλληλεπίδραση mCPP x μολσιδομίνη, που δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Το mCPP μείωσε αισθητά τον αριθμό των rearings και αυτή η δράση του ανταγωνίστηκε με επιτυχία και από τις 2 δόσεις της μολσιδομίνης (Διάγραμμα 3Γ).



Διάγραμμα 3Γ: Αποτελέσματα που προέκυψαν από τον προσδιορισμό των rearings κατά τα 20 min που διήρκησε η δοκιμασία στον κλωβό δραστηριότητας. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα για 8 επίμυες ανά σε κάθε πειραματική ομάδα. Η μολσιδομίνη και mCPP χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά 40 min και 10 min πριν το τεστ αντίστοιχα.

3.4. Πείραμα 4: Επίδραση της μολσιδομίνης στη συμπεριφορά των επιμύων στη δοκιμασία του πλαισιο-εξαρτώμενου φόβου

Ανάλυση των πειραματικών δεδομένων αναδεικνύει την αποτελεσματικότητα της μολσιδομίνης [$F(3,35) = 4.5, p = 0.001$]. Ειδικότερα, όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 4, η μεγαλύτερη δόση του φαρμάκου (4 mg/kg), προκάλεσε την πιο αισθητή μείωση της συμπεριφοράς παγώματος, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου που έλαβε φυσιολογικό ορό, και την ομάδα στην οποία χορηγήθηκε μολσιδομίνη (1 mg/kg).



Διάγραμμα 2: Η χρονική διάρκεια της συμπεριφοράς «παγώματος» σε δευτερόλεπτα (s). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα για 9 επίμυες ανά πειραματική ομάδα. Η μολσιδομίνη και ο φυσιολογικός ορός χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά 60 min πριν το τεστ.

* $p < 0.05$ έναντι των πειραματικών ομάδων που έλαβαν φυσιολογικό ορό και μολσιδομίνη (1 mg/kg)

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες ο αγωνιστής του 5-HT_{2c} σεροτονεργικού υποδοχέα mCPP προκάλεσε υποκινητικότητα και αύξησε αισθητά τον χρόνο αυτοκαθαρισμού των επιμύων.

Από τις δόσεις των δοτών του NO που ελέγχθηκαν ως προς την αγχολυτική τους δράση (SNP: 0.5 και 1 mg/kg – μολσιδομίνη: 2 mg/kg και 4 mg/kg), οι υψηλότερες δόσεις ήταν αυτές που επέφεραν το επιθυμητό αποτέλεσμα, δηλαδή ανταγωνίστηκαν τη δράση του mCPP. Επιπλέον, καμία από τις δόσεις των φαρμάκων που δοκιμάστηκαν, δεν φάνηκε να επηρεάζει τη διάρκεια αυτοκαθαρισμού, όταν χορηγούταν μεμονωμένα, δηλαδή χωρίς την μετέπειτα χορήγηση mCPP.

Παράλληλα με τη συμπεριφορά αυτοκαθαρισμού, από το τεστ αυτό αντλήθηκαν δεδομένα για την κινητικότητα των ζώων καθώς και για τον αριθμό των rearings που πραγματοποίησαν.

Η κινητικότητα, είναι ένας παράγοντας, μέσω του οποίου μπορεί να διαπιστωθεί αν τα αποτελέσματα που αφορούν τον αυτοκαθαρισμό, είναι συνυφασμένα με πιθανές μεταβολές που προκαλούν οι χορηγούμενες ουσίες στην κινητικότητα του δέκτη. Στα συγκεκριμένα πειράματα (Πείραμα 1 και 3), το mCPP προκάλεσε αισθητή μείωση της κινητικής δραστηριότητας, αποτέλεσμα που δεν αναστράφηκε ούτε από το SNP, ούτε από τη μολσιδομίνη. Συνεπώς, η κινητικότητα των ομάδων που έχουν λάβει mCPP, είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό με κάποιον δότη του NO, ήταν χαμηλότερη σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου. Ταυτόχρονα όμως, οι ομάδες αυτές, παρά τη μειωμένη κινητικότητα, εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα αυτοκαθαρισμού, μιας έντονης διαδικασίας επαναλαμβανόμενων κινήσεων, συγκριτικά με τις ομάδες ελέγχου. Εξάγεται λοιπόν το συμπέρασμα, πως τα αποτελέσματα που αφορούν τη διάρκεια αυτοκαθαρισμού είναι έγκυρα, και δεν επηρεάζονται από την υποκινητικότητα που επάγει η mCPP.

Η τάση του ζώου να στηρίζεται στα πίσω άκρα του, σηκώνοντας το σώμα του, ταυτίζεται με την τάση του για εξερεύνηση, η οποία αναμένεται να περιορίζεται σε περιπτώσεις άγχους. Πράγματι, η αγχογόνος δράση της mCPP οδήγησε σε σημαντική μείωση των rearings. Όσον αφορά τη δόση των δύο δοτών NO, τα αποτελέσματα είναι εξαιρετικά ενδιαφέροντα. Το SNP φάνηκε

να μην έχει κάποια επίδραση στον παράγοντα αυτό, με τον αριθμό των rearings να παραμένει χαμηλός σε όλες τις ομάδες που έλαβαν την mCPP. Αντίθετα, η χορήγηση μολσιδομίνης κατάφερε να αναστρέψει την μείωση στην τάση εξερεύνησης των ζώων, επαναφέροντάς τη στα επίπεδα των ομάδων που δεν έλαβαν τον αγχογόνο παράγοντα.

Περαιτέρω μελέτη είναι απαραίτητη ώστε να διευκρινιστεί η διαφορά στη δράση των δύο δοτών NO, που επιφέρει αυτό το διαφορετικό αποτέλεσμα. Το ενδεχόμενο μία υψηλότερη δόση SNP (αντίστοιχη με αυτή της μολσιδομίνης), να προκαλούσε παρόμοια αποτελέσματα, δεν είναι πιθανό, καθώς έχει ήδη αποδειχθεί ότι η δόση SNP 3 mg/kg, εμφάνισε αγχογόνο δράση (Umathe et al., 2009) και προκάλεσε καταστολή (Orfanidou et al., 2017).

Τα αποτελέσματα σχετιζόμενα με τη μείωση του επαγόμενου από το mCPP υπερβολικού αυτοκαθαρισμού προτείνουν μία λειτουργική αλληλεπίδραση μεταξύ των δοτών του NO και του σεροτονεργικού υποδοχέα 5-HT_{2C}. Υποθέτουμε ότι οι NO δότες δρουν μέσω ανταγωνιστικής πρόσδεσης στον σεροτονεργικό υποδοχέα 5-HT_{2C}. Η υπόθεση αυτή στηρίζεται στις τεκμηριωμένες φαρμακοδυναμικές ιδιοτητες του mCPP (βλ. Ενότητα 2.3.). Συγκεκριμένα, το mCPP εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια για τον σεροτονεργικό υποδοχέα 5-HT_{2C} (Porter et al., 1999). Το δεδομένο αυτό προκύπτει από προηγούμενες έρευνες των Graf et al., 2003, οι οποίοι εξέτασαν τη διάρκεια αυτοκαθαρισμού μετά από χορήγηση mCPP σε συνδυασμό με δύο επιλεκτικούς ανταγωνιστές, έναν του 5-HT_{2C} (SB-242084), και έναν του 5-HT_{2B} (SB-205505). Μόνο ο πρώτος ανταγωνιστής ήταν αποτελεσματικός στη μείωση της συμπεριφοράς αυτοκαθαρισμού, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η mCPP δρα μέσω του 5-HT_{2C} υποδοχέα. Συνεπώς, είναι πιθανό οι δότες του NO που ελέγχθηκαν, να δρουν ακριβώς όπως ο SB-242084, δηλαδή η αγχόλυση που επιφέρουν να οφείλεται στην ανταγωνιστική τους δράση ως προς τον υποδοχέα αυτό.

Μετατραυματικό stress

Κατά τη δοκιμασία του πλαίσιο-εξαρτώμενου φόβου (CFC test), το ηλεκτρικό ερέθισμα ήταν αυτό που προκάλεσε συμπτωματολογία όμοια με αυτή του μετατραυματικού στρες (PTSD), και συγκεκριμένα επέφερε συμπεριφορά «παγώματος», απόρροια του φόβου αναβίωσης του δυσάρεστου ερεθίσματος. Οι υψηλές δόσεις δοτών του NO [SNP (1 mg/kg), μολσιδομίνη (4 mg/kg)] αντιμετώπισαν αποτελεσματικά το σύμπτωμα αυτό, καθώς η διάρκεια του παγώματος στις ομάδες που τις έλαβαν ενδοπεριτοναϊκά, ήταν κατά πολύ μικρότερη συγκριτικά με των υπόλοιπων ομάδων. Το ενδεχόμενο ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων λόγω υπότασης ως παρενέργεια των φαρμάκων, έχει αποκλειστεί, καθώς οι χαμηλές δόσεις που χορηγήθηκαν δεν έχει διαπιστωθεί ότι προκαλούν αυτό το σύμπτωμα (Estévez et al., 1995).

Πιθανοί μηχανισμοί δράσης των δοτών του NO

Παρά το γεγονός πως οι δότες του NO έχει βρεθεί ότι εμφανίζουν αγχολυτική δράση, ο μηχανισμός που επάγει αυτό το αποτέλεσμα δεν έχει προσδιοριστεί πλήρως. Αντ' αυτού, υπάρχουν ορισμένες υποθέσεις οι οποίες θα μπορούσαν να ερμηνεύσουν την ιδιότητα των μορίων αυτών, να λειτουργούν θεραπευτικά έναντι των αγχωδών διαταραχών.

Η πρώτη υπόθεση, σχετίζεται με τη σηματοδότηση του NO που εξαρτάται από το cGMP. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω (Βλ. Ενότητα 1.3.3., Ιστολογικές μελέτες), μειωμένα επίπεδα της συνθάσης του NO, ή της cGMP-εξαρτώμενης κινάσης II (cGKII), άρα και μειωμένη σηματοδότηση του NO, μεσολαβούμενη από cGMP, οδήγησαν σε εμφάνιση συμπεριφοράς που προσομοιάζει τα συμπτώματα των αγχωδών διαταραχών. Το γεγονός πως οι δότες NO, αναστέλλουν τη συμπεριφορά αυτή, υποδεικνύει ότι πιθανότατα επιδρούν σε αυτό το σηματοδοτικό μονοπάτι.

Εκτός από το παραπάνω μονοπάτι, είναι πιθανό η δράση των δοτών NO να οφείλεται στη ρύθμιση ορισμένων βιοδεικτών που σχετίζονται με φλεγμονή και οξειδωτικό stress. Ειδικότερα, οι αγχώδεις διαταραχές έχουν συσχετιστεί με αυξημένα επίπεδα κυτοκινών και CRP (C-reactive proteins), τα οποία υποδεικνύουν φλεγμονή (Michopoulos et al., 2016), καθώς και με συσσώρευση δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) στους νευρώνες και υπεροξείδωση λιπιδίων και πρωτεϊνών [ιππόκαμπος και αμυγδαλή τρωκτικών,

(Salim et al., 2014)], χαρακτηριστικοί δείκτες οξειδωτικού stress (Smaga et al., 2015). Στο πλαίσιο αυτό, έχει βρεθεί πως οι δότες NO σε κατάλληλες δόσεις, έχουν αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική δράση, οι οποίες είναι πιθανό να επαναφέρουν σε φυσιολογικά επίπεδα τους βιολογικούς δείκτες που προαναφέρθηκαν.

Τέλος, σε καταστάσεις άγχους, έχουν βρεθεί χαμηλά επίπεδα Εγκεφαλικού Νευροτροφικού Παράγοντα (Brain Derived Neurotrophic Factor- BDNF). Πρόκειται για μία πρωτεΐνη που δρα κυρίως στον ιππόκαμπο, τον πρόσθιο εγκέφαλο και τον φλοιό του εγκεφάλου, προωθώντας την επιβίωση, τη διαφοροποίηση και την ανάπτυξη των νευρώνων, καθώς και τη δημιουργία συνάψεων. Το νιτροπρωσσικό νάτριο έχει την ιδιότητα να αυξάνει τα επίπεδα του BDNF στους νευρώνες του εγκεφάλου, και πιθανότατα κατά συνέπεια να εξομαλύνει τα συμπτώματα του άγχους (Chen et al., 2006).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω, η οξεία χορήγηση χαμηλών δόσεων των δοτών του NO, SNP και μολσιδομίνης, φαίνεται πως εξομαλύνει και σε κάποιες περιπτώσεις αντιμετωπίζει πλήρως συμπεριφορές σε προκλινικά συμπεριφορικά πρότυπα που αντανακλούν την ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή και το μετατραυματικό στρες.

Ωστόσο, πολλά ερωτήματα δεν έχουν ακόμη απαντηθεί, όπως για παράδειγμα οι ακριβείς μηχανισμοί με τους οποίους επάγεται η πιθανή αγχολυτική δράση των δοτών του NO. Οι πιθανοί «στόχοι» των δοτών NO σχετίζονται είτε με τη μεσολαβούμενη από cGMP σηματοδότηση, είτε με παράγοντες που σχετίζονται με τη ρύθμιση της φλεγμονής, του οξειδωτικού stress αλλά και της ομαλής λειτουργίας του ΚΝΣ. Τέλος, είναι σημαντικό να αναφερθεί πως οι αγχώδεις διαταραχές έχουν πολύ υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης σε γυναίκες. Συνεπώς, ο έλεγχος της δράσης των παραπάνω δοτών NO σε θηλυκά ζώα θα μπορούσε να αποτελέσει πηγή ακόμη περισσότερων πληροφοριών σχετικά με τον τρόπο δράσης τους, αλλά και τον βαθμό στον οποίο τα χαρακτηριστικά του φύλου επηρεάζουν την εξέλιξη των διαταραχών και την αποτελεσματικότητα των θεραπειών. Στη παρούσα έρευνα η αγχολυτική δράση των δοτών του NO που παρατηρήθηκε ήταν αποτέλεσμα οξείας χορήγησης τους. Δεν έχει τεκμηριωθεί μέχρι σήμερα αν χρόνια χορήγηση δοτών του NO μπορεί να έχει αγχολυτική δράση σε προκλινικά πρότυπα που προσομοιάζουν την ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή και το μετραυματικό στρες. Συνεπώς, επιπλέον έρευνες είναι αναγκαίες για να διελευκανθεί αυτό το ζήτημα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Arnold, W., Mittal, C., Katsuki, S., & Murad, F. (1977). Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 74(8), 3203-3207. doi: 10.1073/pnas.74.8.3203
- Bagdy, G., Kalogeras, K., & Szemerédi, K. (1992). Effect of 5-HT_{1C} and 5-HT₂ receptor stimulation on excessive grooming, penile erection and plasma oxytocin concentrations. *European Journal Of Pharmacology*, 229(1), 9-14. doi: 10.1016/0014-2999(92)90279-d
- Bandelow, B., Sher, L., Bunevicius, R., Hollander, E., Kasper, S., Zohar, J., & Möller, H. (2012). Guidelines for the pharmacological treatment of anxiety disorders, obsessive-compulsive disorder and posttraumatic stress disorder in primary care. *International Journal Of Psychiatry In Clinical Practice*, 16(2), 77-84. doi: 10.3109/13651501.2012.667114
- Benarroch, E. (2011). Nitric oxide: A pleiotropic signal in the nervous system. *Neurology*, 77(16), 1568-1576. doi: 10.1212/wnl.0b013e318233b3e4
- Bolles, R., & Fanselow, M. (1980). A perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain. *Behavioral And Brain Sciences*, 3(2), 291-301. doi: 10.1017/s0140525x0000491x
- Booth, B., & Fung, H. (1998). Contribution of Vascular Tissue to the Antiplatelet Activity of Sodium Nitroprusside. *Journal Of Cardiovascular Pharmacology*, 32(1), 129-133. doi: 10.1097/00005344-199807000-00020
- Brandão, M., Zanoveli, J., Ruiz-Martinez, R., Oliveira, L., & Landeira-Fernandez, J. (2008). Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: Association with different types of anxiety. *Behavioural Brain Research*, 188(1), 1-13. doi: 10.1016/j.bbr.2007.10.018
- Brecht, D. (1999). Endogenous nitric oxide synthesis: Biological functions and pathophysiology. *Free Radical Research*, 31(6), 577-596. doi: 10.1080/10715769900301161
- Brecht, D., & Snyder, S. (1992). Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron*, 8(1), 3-11. doi: 10.1016/0896-6273(92)90104-l
- Butler, A., & Glidewell, C. (1987). Recent chemical studies of sodium nitroprusside relevant to its hypotensive action. *Chemical Society Reviews*, 16, 361. doi: 10.1039/cs9871600361
- Calabrese, V., Mancuso, C., Calvani, M., Rizzarelli, E., Butterfield, D., & Giuffrida Stella, A. (2007). Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(10), 766-775. doi: 10.1038/nrn2214
- Calixto, A., Duarte, F., Duzzioni, M., Nascimento Häckl, L., Faria, M., & De Lima, T. (2010). Role of ventral hippocampal nitric oxide/cGMP pathway in anxiety-related behaviors in rats submitted to the elevated T-maze. *Behavioural Brain Research*, 207(1), 112-117. doi: 10.1016/j.bbr.2009.09.037

- Chakraborti, A., Gulati, K., & Ray, A. (2011). Involvement of nitric oxide in the protective effects of dehydroepiandrosterone sulphate on stress induced neurobehavioral suppression and brain oxidative injury in rats. *European Journal Of Pharmacology*, 652(1-3), 55-59. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.11.002
- Chen, M., Ivy, A., & Russo-Neustadt, A. (2006). Nitric oxide synthesis is required for exercise-induced increases in hippocampal BDNF and phosphatidylinositol 3' kinase expression. *Brain Research Bulletin*, 68(4), 257-268. doi: 10.1016/j.brainresbull.2005.08.013
- Corpas, F., Begara-Morales, J., Sánchez-Calvo, B., Chaki, M., & Barroso, J. (2014). Nitration and S-Nitrosylation: Two Post-translational Modifications (PTMs) Mediated by Reactive Nitrogen Species (RNS) and Their Role in Signalling Processes of Plant Cells. *Signaling And Communication In Plants*, 267-281. doi: 10.1007/978-3-319-10079-1_13
- Costa, N., Vicente, M., Cipriano, A., Miguel, T., & Nunes-de-Souza, R. (2016). Functional lateralization of the medial prefrontal cortex in the modulation of anxiety in mice: Left or right?. *Neuropharmacology*, 108, 82-90. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.04.011
- de Lima, R., Silva, B., da Silva, R., & Bendhack, L. (2014). Ruthenium Complexes as NO Donors for Vascular Relaxation Induction. *Molecules*, 19(7), 9628-9654. doi: 10.3390/molecules19079628
- Deshpande, S., Pai, K., Satyanarayana, K., & Rao, M. (2012). Nitric oxide modulators: An emerging class of medicinal agents. *Indian Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 74(6), 487. doi: 10.4103/0250-474x.110572
- Dun, N., Dun, S., Wong, R., & Förstermann, U. (1994). Colocalization of nitric oxide synthase and somatostatin immunoreactivity in rat dentate hilar neurons. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 91(8), 2955-2959. doi: 10.1073/pnas.91.8.2955
- Edwards, T., & Rickard, N. (2007). New perspectives on the mechanisms through which nitric oxide may affect learning and memory processes. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 31(3), 413-425. doi: 10.1016/j.neubiorev.2006.11.001
- Elfline, G., Branda, E., Babich, M., & Quock, R. (2004). Antagonism by NOS Inhibition of the Behavioral Effects of Benzodiazepine and GABAA Receptor Agonists in the Mouse Elevated Plus-Maze. *Neuropsychopharmacology*, 29(8), 1419-1425. doi: 10.1038/sj.npp.1300437
- Estévez, A.G., Viera, L., Kamaid, A., Beckman, J.S. (2000). Nitric Oxide Toxicity in Neuronal Injury and Degeneration. In: Kalsner, S. (eds) Nitric Oxide and Free Radicals in Peripheral Neurotransmission. Nitric Oxide in Biology and Medicine, vol 2. Birkhäuser, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1328-4_12
- Faria, M., Miguel, T., Gomes, K., & Nunes-de-Souza, R. (2016). Anxiety-like responses induced by nitric oxide within the BNST in mice: Role of CRF1 and NMDA receptors. *Hormones And Behavior*, 79, 74-83. doi: 10.1016/j.yhbeh.2016.01.002

- Ferreira, V., Valenzuela, C., & Morato, G. (1999). Role of Nitric Oxide-Dependent Pathways in Ethanol-Induced Anxiolytic Effects in Rats. *Alcoholism: Clinical And Experimental Research*, 23(12), 1898-1904. doi: 10.1111/j.1530-0277.1999.tb04089.x
- Garthwaite, J., Charles, S., & Chess-Williams, R. (1988). Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature*, 336(6197), 385-388. doi: 10.1038/336385a0
- Graf, M., Kantor, S., Anheuer, Z., Modos, E., & Bagdy, G. (2003). m-CPP-induced self-grooming is mediated by 5-HT_{2C} receptors. *Behavioural Brain Research*, 142(1-2), 175-179. doi: 10.1016/s0166-4328(02)00404-7
- Gravius, A., Barberi, C., Schäfer, D., Schmidt, W., & Danysz, W. (2006). The role of group I metabotropic glutamate receptors in acquisition and expression of contextual and auditory fear conditioning in rats – a comparison. *Neuropharmacology*, 51(7-8), 1146-1155. doi: 10.1016/j.neuropharm.2006.07.008
- Gutknecht L., Chizat, F., Golfier, G., Schmitt, A., Gass, A., Lesch, K.P., Reif, A. (2007) Behavioural and expressional phenotyping of nitric oxide synthase-1 knockdown animals, *J. Neural Trasm.* (72):69-85. doi: 10.1007/978-3-211-73574-9_10. PMID: 17982880
- Heinrich, T., da Silva, R., Miranda, K., Switzer, C., Wink, D., & Fukuto, J. (2013). Biological nitric oxide signalling: chemistry and terminology. *British Journal Of Pharmacology*, 169(7), 1417-1429. doi: 10.1111/bph.12217
- Hibbs, J., Taintor, R., Vavrin, Z., & Rachlin, E. (1988). Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 157(1), 87-94. doi: 10.1016/s0006-291x(88)80015-9
- Hofmann, F., Ammendola, A., & Schlossmann, J. (2000). Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *Journal Of Cell Science*, 113(10), 1671-1676. doi: 10.1242/jcs.113.10.1671
- Joshi, J., Ray, A., & Gulati, K. (2015). Effects of morphine on stress induced anxiety in rats: Role of nitric oxide and Hsp70. *Physiology & Behavior*, 139, 393-396. doi: 10.1016/j.physbeh.2014.11.056
- Kalouda, T., & Pitsikas, N. (2015). The nitric oxide donor molsidomine induces anxiolytic-like behaviour in two different rat models of anxiety. *Pharmacology Biochemistry And Behavior*, 138, 111-116. doi: 10.1016/j.pbb.2015.09.004
- Kalueff, A., & Tuohimaa, P. (2005). The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research. *Journal Of Neuroscience Methods*, 143(2), 169-177. doi: 10.1016/j.jneumeth.2004.10.001
- Kayser, R., Snorrason, I., Haney, M., Lee, F., & Simpson, H. (2019). The Endocannabinoid System: A New Treatment Target for Obsessive Compulsive Disorder?. *Cannabis And Cannabinoid Research*, 4(2), 77-87. doi: 10.1089/can.2018.0049

- Keisham, M., Jain, P., Singh, N., von Toerne, C., Bhatla, S., & Lindermayr, C. (2019). Deciphering the nitric oxide, cyanide and iron-mediated actions of sodium nitroprusside in cotyledons of salt stressed sunflower seedlings. *Nitric Oxide*, 88, 10-26. doi: 10.1016/j.niox.2019.03.008
- Kennett, G., Whitton, P., Shah, K., & Curzon, G. (1989). Anxiogenic-like effects of mCPP and TFMPP in animal models are opposed by 5-HT_{1C} receptor antagonists. *European Journal Of Pharmacology*, 164(3), 445-454. doi: 10.1016/0014-2999(89)90252-5
- Knap, B., Kwiatkowski, S., Kolasińska, K., Knap-Czop, K., Przystupski, D., Roguzińska, S., & Kędzierska, E. (2018). Azapirones for the treatment of anxiety – an overview. *World Scientific News*, (109), 14–25
- Kohda, K., Harada, K., Kato, K., Hoshino, A., Motohashi, J., & Yamaji, T. et al. (2007). Glucocorticoid receptor activation is involved in producing abnormal phenotypes of single-prolonged stress rats: A putative post-traumatic stress disorder model. *Neuroscience*, 148(1), 22-33. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.05.041
- Li, S., & Quock, R. (2002). Effects of a nitric oxide donor on behavior and interaction with nitrous oxide in the mouse light/dark exploration test. *European Journal Of Pharmacology*, 447(1), 75-78. doi: 10.1016/s0014-2999(02)01891-5
- Marks, G. S., McLaughlin, B. E., Jimmo, S. L., Poklewska-Koziell, M., Brien, J. F., & Nakatsu, K. (1995). Time-dependent increase in nitric oxide formation concurrent with vasodilation induced by sodium nitroprusside, 3-morpholinopyridone, and S-nitroso-N-acetylpenicillamine but not by glyceryl trinitrate. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 23(11), 1248–1252
- Masood, A., Huang, Y., Hajjhussein, H., Xiao, L., Li, H., & Wang, W. et al. (2009). Anxiolytic Effects of Phosphodiesterase-2 Inhibitors Associated with Increased cGMP Signaling. *Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, 331(2), 690-699. doi: 10.1124/jpet.109.156729
- Merrill, J. E., Ignarro, L. J., Sherman, M. P., Melinek, J., & Lane, T. E. (1993). Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 151(4), 2132–2141
- Michopoulos, V., Powers, A., Gillespie, C., Ressler, K., & Jovanovic, T. (2016). Inflammation in Fear- and Anxiety-Based Disorders: PTSD, GAD, and Beyond. *Neuropsychopharmacology*, 42(1), 254-270. doi: 10.1038/npp.2016.146
- Miller, M., & Megson, I. (2007). Recent developments in nitric oxide donor drugs. *British Journal Of Pharmacology*, 151(3), 305-321. doi: 10.1038/sj.bjp.0707224
- Mintz, J., Vedenko, A., Rosete, O., Shah, K., Goldstein, G., & Hare, J. et al. (2021). Current Advances of Nitric Oxide in Cancer and Anticancer Therapeutics. *Vaccines*, 9(2), 94. doi: 10.3390/vaccines9020094
- Mir, J., Malik, B., & Maurya, R. (2019). Nitric oxide-releasing molecules at the interface of inorganic chemistry and biology: a concise overview. *Reviews In Inorganic Chemistry*, 39(2), 91-112. doi: 10.1515/revic-2018-0017

- Nash, J., Sargent, P., Rabiner, E., Hood, S., Argyropoulos, S., & Potokar, J. et al. (2008). Serotonin 5-HT_{1A} receptor binding in people with panic disorder: positron emission tomography study. *British Journal Of Psychiatry*, 193(3), 229-234. doi: 10.1192/bjp.bp.107.041186
- Nuss, P. & Gauthier, I. (2015). Anxiety disorders and GABA neurotransmission: a disturbance of modulation. *Neuropsychiatric Disease And Treatment*, 165. doi: 10.2147/ndt.s58841
- Orfanidou, M., Lafioniatis, A., Trevlopoulou, A., Touzlatzi, N., & Pitsikas, N. (2017). Acute and repeated exposure with the nitric oxide (NO) donor sodium nitroprusside (SNP) differentially modulate responses in a rat model of anxiety. *Nitric Oxide*, 69, 56-60. doi: 10.1016/j.niox.2017.05.002
- Palmer, R., Ferrige, A., & Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327(6122), 524-526. doi: 10.1038/327524a0
- Pitsikas, N. (2018). The role of nitric oxide (NO) donors in anxiety. Lights and shadows. *Nitric Oxide*, 77, 6-11. doi: 10.1016/j.niox.2018.04.002
- Pitsikas, N., & Sakellaridis, N. (2007). Memantine and recognition memory: Possible facilitation of its behavioral effects by the nitric oxide (NO) donor molsidomine. *European Journal Of Pharmacology*, 571(2-3), 174-179. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.06.019
- Pitsikas, N., Zisopoulou, S., & Sakellaridis, N. (2006). Nitric oxide donor molsidomine attenuates psychotomimetic effects of the NMDA receptor antagonist MK-801. *Journal Of Neuroscience Research*, 84(2), 299-305. doi: 10.1002/jnr.20889
- Pittenger, C., Bloch, M., & Williams, K. (2011). Glutamate abnormalities in obsessive compulsive disorder: Neurobiology, pathophysiology, and treatment. *Pharmacology & Therapeutics*, 132(3), 314-332. doi: 10.1016/j.pharmthera.2011.09.006
- Porter, R., Benwell, K., Lamb, H., Malcolm, C., Allen, N., & Revell, D. et al. (1999). Functional characterization of agonists at recombinant human 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptors in CHO-K1 cells. *British Journal Of Pharmacology*, 128(1), 13-20. doi: 10.1038/sj.bjp.0702751
- Salim, S. (2014). Oxidative Stress and Psychological Disorders. *Current Neuropharmacology*, 12(2), 140-147. doi: 10.2174/1570159x11666131120230309
- Smaga, I., Niedzielska, E., Gawlik, M., Moniczewski, A., Krzek, J., & Przegaliński, E. et al. (2015). Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 2. Depression, anxiety, schizophrenia and autism. *Pharmacological Reports*, 67(3), 569-580. doi: 10.1016/j.pharep.2014.12.015
- Steimer, T. (2002). The biology of fear- and anxiety-related behaviors. *Dialogues In Clinical Neuroscience*, 4(3), 231-249. doi: 10.31887/dcns.2002.4.3/tsteimer

- Török, B., Sipos, E., Pivac, N., & Zelena, D. (2019). Modelling posttraumatic stress disorders in animals. *Progress In Neuro-Psychopharmacology And Biological Psychiatry, 90*, 117-133. doi: 10.1016/j.pnpbp.2018.11.013
- Tutka, P. (2002). Molsidomine potentiates the protective activity of GYKI 52466, a non-NMDA antagonist, MK-801, a non-competitive NMDA antagonist, and riluzole against electroconvulsions in mice. *European Neuropsychopharmacology, 12*(4), 321-326. doi: 10.1016/s0924-977x(02)00046-9
- U.S. Department of Health and Human Services. How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A Report of the Surgeon General. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health, 2010
- Umathe, S., Bhutada, P., Jain, N., Mundhada, Y., Borkar, S., & Dhumal, B. (2009). Role of nitric oxide in obsessive–compulsive behavior and its involvement in the anti-compulsive effect of paroxetine in mice. *Nitric Oxide, 21*(2), 140-147. doi: 10.1016/j.niox.2009.07.001
- Vincent, S., & Kimura, H. (1992). Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience, 46*(4), 755-784. doi: 10.1016/0306-4522(92)90184-4
- Werner, C., Raivich, G., Cowen, M., Strekalova, T., Sillaber, I., & Buters, J. et al. (2004). Importance of NO/cGMP signalling via cGMP-dependent protein kinase II for controlling emotionality and neurobehavioural effects of alcohol. *European Journal Of Neuroscience, 20*(12), 3498-3506. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03793.x
- Zhang, F., & Iadecola, C. (1993). Nitroprusside improves blood flow and reduces brain damage after focal ischemia. *Neuroreport, 4*(5), 559-562. doi: 10.1097/00001756-199305000-00024