ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής: Καθηγητής Νικόλαος Σακελλαρίδης

Διδακτορική Διατριβή

ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΗΣ ΜΝΗΜΗΣ

Σταυρούλα Τσιτσιρίγκου

Λάρισα 2013

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

Διδακτορική Διατριβή

ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΗΣ ΜΝΗΜΗΣ

Σταυρούλα Τσιτσιρίγκου, MPHARM
Φαρμακοποιός

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2013

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΣΑΚΕΛΛΑΡΙΔΗΣ, M.D., PhD

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

1. Νικόλαος Σακελλαρίδης

Καθηγητής εργαστηρίου Φαρμακολογίας τμήματος Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

2. Πασχάλης Αδάμ Μολυβδάς

Καθηγητής εργαστήριου Φυσιολογίας τμήματος Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

3. Ευτυχία Ασπροδύνη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια εργαστηρίου Φαρμακολογίας τμήματος Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

Τα Μέλη της Επταμελούς Επιτροπής Κρίσης της διδακτορικής διατριβής, όπως ορίσθηκαν από την Γενική Συνέλευση Ειδικής Σύνθεσης του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στην 4η / 13-06-2013 συνεδρίαση της:

1. Νικόλαος Σακελλαρίδης

Καθηγητής Εργαστηρίου Φαρμακολογίας Τμήματος Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

2. Πασχάλης Αδάμ Μολυβδάς

Καθηγητής Εργαστηρίου Φυσιολογίας Τμήματος Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

3. Ευτυχία Ασπροδύνη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Εργαστηρίου Φαρμακολογίας Τμήματος Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

4. Νικόλαος Πιτσίκας

Αναπληρωτής Καθηγητής Εργαστηρίου Φαρμακολογίας Τμήματος Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

5. Άννα Βασιλάκη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Εργαστηρίου Φαρμακολογίας Τμήματος Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

6. Δήμας Κωνσταντίνος

Αναπληρωτής Καθηγητής Εργαστηρίου Φαρμακολογίας Τμήματος Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

7. Λιάπη Μαρία

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Εργαστηρίου Φαρμακολογίας Τμήματος Ιατρικής Σχολής Ελληνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ τα μέλη της τριμελής συμβουλευτικής επιτροπής που συμμετείχαν στην διεξαγωγή της έρευνας. Ευχαριστώ τον κ. Πασχάλη Αδάμ Μολυβδά για την τιμή να είναι μέλος της επιτροπής. Ευχαριστώ βαθύτητα την κα Ευτυχία Ασπροδύνη για τις γνώσεις, την στήριξη και την αμέριστη συμπαράσταση και ενθάρρυνση που μου πρόσφερε όλα τα χρόνια. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμη τον κ. Σακελλαρίδη για την υπομονή του, την επιμονή του και την εμψύχωσή του να ολοκληρώσω την συγγραφή της διδακτορικής διατριβής παρά τις δύσκολες συνθήκες που υφίστανται μετά την απόκτηση των παιδιών μου . Δεν σταμάτησε ποτέ να με παρακινεί και να με κατευθύνει στην επίτευξη του στόχου μου. Δεν είναι υπερβολή ότι η συγγραφή του κειμένου δεν θα είχε ολοκληρωθεί χωρίς την συνεχή παρότρυνσή του.

Ευχαριστώ τον κ. Νικόλαο Πιτσίκα για την συνεργασία στην εξέλιξη της μελέτης.

Ευχαριστώ την κα Άννα Βασιλάκη για τον άφθονο χρόνο που αφιέρωσε, με θυσία της προσωπικής της δουλειάς, και για την κριτική και τις επιστημονικές παρατηρήσεις της καθώς ακόμη και για την συνεισφορά της στην γλωσσική επιμέλεια του κειμένου της διδακτορικής διατριβής.

Ευχαριστώ και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελής επιτροπής, κ. Κωνσταντίνο Δήμα και κα Μαρία Λιάπη, που συμμετέχουν στην κρίση της διδακτορικής διατριβής.

Ευχαριστώ όλους όσους γνώρισα στην Ιατρική σχολή, κάποιοι από αυτούς με βοήθησαν, άλλοι με στήριξαν και άλλοι μου χάρισαν την φιλία τους.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

Επίσης ευχαριστώ βαθύτητα την μητέρα μου, τον πατέρα μου και τον σύζυγο μου Γιώργο για την υπομονή τους και την συμπαράσταση τους.

Αφιερώνω την διδακτορική διατριβή μου στα παιδιά μου, Φοίβο και Χρήστο.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

Ημερομηνία γέννησης: 2 Δεκεμβρίου 1980

Οικογενειακή κατάσταση: Παντρεμένη, δύο παιδιά

Τόπος Διαμονής: Βόλος

1998: Αποφοίτηση από το 5^{ο} Γενικό Λύκειο Βόλου

2002: Αποφοίτηση από την Φαρμακευτική Σχολή του Brighton στο Ηνωμένο Βασίλειο με Masters στην φαρμακολογία

2007: Έναρξη λειτουργίας φαρμακείου

Διατελώ υποψήφια διδάκτορας στο εργαστήριο της Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με διευθυντή τον κ. Νικόλαο Σακελλαρίδη.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

Ο υποδοχέας 5-HT1A της Σεροτονίνης και η Αναγνωριστική Μνήμη. Πιθανή Ρύθμιση της Επίδρασης του επί της Μνήμης από το Νιτρεργικό Σύστημα.

Δημοσιευτηκε ως εξής:

The 5-HT_{1A} receptor and recognition memory. Possible modulation of its behavioral effects by nitrergic system

Nikolaos Pitsikas, Stavroula Tsitsirigou, Styliani Zisopoulou, Nikolaos Sakellaridis. **Behavioural Brain Research. 155 (2005): 287-293**

Περίληψη

Μελέτες υποδηλώνουν ότι η ενεργοποίηση του υποδοχέα $5HT_{1A}$ της σεροτονίνης αναστέλλει τις γνωσιακές λειτουργίες. Η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε με σκοπό να διερευνηθεί ο ρόλος του υποδοχέα $5HT_{1A}$ της σεροτονίνης στην αναγνωριστική μνήμη. Για το σκοπό αυτό, χορηγήθηκαν σε επίμυες ο $5HT_{1A}$ αγωνιστής 8-OH-DPAT και ο $5HT_{1A}$ ανταγωνιστής WAY 100635 και αξιολογήθηκε η δράση τους επί της μνήμης, χρησιμοποιώντας την πειραματική διαδικασία της αναγνώρισης νέου αντικειμένου. Επιπροσθέτως, διερευνήθηκε η πιθανή εμπλοκή του νιτρεργικού συστήματος στη δράση των υποδοχέων $5HT_{1A}$, χρησιμοποιώντας την ίδια συμπεριφορική τεχνική. Σε μια πρώτη μελέτη δόσης-απάντησης, χορήγηση της 8-OH-DPAT (0.1 και 0.3 mg/kg, υποδόρεια) προκάλεσε δοσοεξαρτώμενα ελλείμματα αναγνωριστικής μνήμης. Χορήγηση του WAY 100635 (0.3 και 1 mg/kg, ενδοπεριτοναϊκά) ανταγωνίστηκε επιτυχώς τα γνωσιακά ελλείμματα που προκάλεσε η χορήγηση της 8-OH-DPAT στους επίμυες. Ο δότης του NO, μολσιδομίνη (2 και 4 mg/kg, ενδοπεριτονϊακά), εξάλειψε τα ελλείμματα αναγνωριστικής μνήμης που προκάλεσε η υψηλή δόση της 8-OH-DPAT (0.3 mg/kg). Τα ευρήματα μας αυτά καταδεικνύουν ότι α) ο υποδοχέας $5HT_{1A}$ εμπλέκεται στην

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

αναγνωριστική μνήμη και β) ότι ο παράγοντας NO επηρεάζει την δράση του υποδοχέα $5HT_{1A}$ στη μάθηση και τη μνήμη.

Λέξεις-κλειδιά: 8-OHDPAT, WAY 100635, υποδοχέας της σεροτονίνης τύπου $5\text{-}HT_{1A}$, Μολσιδομίνη, μονοξείδιο του αζώτου, διαδικασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου, μνήμη

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

The 5-HT_{1A} receptor and recognition memory. Possible modulation of its behavioral effects by nitrergic system

Nikolaos Pitsikas, Stavroula Tsitsirigou, Styliani Zisopoulou, Nikolaos Sakellaridis. **Behavioural Brain Research. 155 (2005): 287-293**

Abstract

Functional activation of the of 5-HT_{1A} receptor inhibit cognition, although discrepant findings have also been reported. The present study was designed to investigate the role of the 5-HT_{1A} receptor on cognition memory in the rat. For this purpose, the effects induced by the 5-HT_{1A} agonist (±)-8-hydroxy-2-(di-*n*-propilamino) tetralin (8-OH-DPAT) and the 5-HT_{1A} antagonist WAY 100635 N-[2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-N-(2-pyridinyl) cyclohexanene carboxamide 6trihydrochloride on memory were evaluated by using the object recognition task. In addition, the possible involvement of the nitrergic system on 5-HT_{1A} receptor's effect was also assessed by using the same behavioral procedure. In the first dose-response study, post-training administration of 8-OH-DPAT (0.1 and 0.3 mg/kg, subcutaneously (s.c.)) dose-dependently impaired animals' performance in this test. WAY 100635 (0.3 and 1 mg/kg, intraperitoneally (i.p.)) successfully antagonized these 8-OH-DPAT-induced deficits. The nitric oxide (NO) donor molsidomine (2 and 4 mg/kg, i.p.) counteracted cognition deficits produced by the highest dose of 8-OH-DPAT (0.3 mg/kg). Our findings indicate i) that the 5-HT_{1A} receptor is involved in recognition memory, and ii) that a NO component modulates the effects of the 5-HT_{1A} receptor on learning and memory.

Keywords: 8-OH-DPAT; WAY 100635; 5-HT_{1A} receptor; Molsidomine; Nitric oxide; Object recognition; Memory

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

1. Εισαγωγή 13
1.1 Η Νευροεπιστήμη της Συμπεριφοράς στην μελέτη της Μάθησης και της Μνήμης 13
1.2 Ο Ρόλος των Νευροδιαβιβαστών στις Νευροεκφυλιστικές Νόσους 16
1.3 Γενική Παρουσίαση του Μονοξειδίου του Αζώτου (Nitric Oxide, NO·) 18
1.3.1 Ιστορική Αναδρομή 18
Ιδιότητες του NO 20
Σύνθεση του NO 20
Βιοχημική προσέγγιση του μηχανισμού δράσης του NO 23
1.3.3 Νευροανατομία του NO 26
1.3.4 Φαρμακολογική Προσέγγιση της ρύθμισης του NO στον εγκέφαλο 27
Αναστολείς της NOS 29
Δότες του NO 30
1.4 Δράση του NO στο ΚΝΣ 33
1.4.1 Νευροπροστατευτική δράση του NO 35
Διεγερσιμότητα Νευρώνων 35
Αντι-αποπτωτική Δράση του NO 36
Μακρόχρονη Ενδυνάμωση, Μακρόχρονη Εξασθένηση και Συναπτική Πλαστικότητα 37
1.4.2 Νευροεκφυλιστική Δράση του NO 40
Βλάβη του DNA 40
Υπεροξείδωση των Λιπιδίων της Κυτταρικής Μεμβράνης 41
Αντιδράσεις με Πρωτεΐνες 42
Βλάβη στα Μιτοχόνδρια 43
Φλεγμονή 44
1.6 Δράση του NO στην Περιφέρεια 46
1.6.1 Ενδοκρινικό Σύστημα 46
1.6.2 Παρασυμπαθητικό Σύστημα 46
1.6.3 Αιμοποιητικό Σύστημα 47
1.6.4 Κατανάλωση Τροφής 47
1.6.5 Νεοπλασία 47
1.7 Ρύθμιση της Απελευθέρωσης των Νευροδιαβιστών από το NO 49
1.7.1 Ακετυλοχολίνη (Acetylcholine, Ach) 49
1.7.2 Διεγερτικά και Ανασταλτικά Αμινοξέα 51
1.7.3 Κατεχολαμίνες 53
1.7.4 Ισταμίνη 54

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

1.7.5 Σεροτονίνη (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 56
1.7.6 Αδενοσίνη 57
1.8 Ο Ρόλος των Σεροτονινεργικών Υποδοχέων Τύπου $5HT_{1A}$ στη Μάθηση και τη Μνήμη 59
1.8.1 Εκλεκτική Φαρμακολογική Προσέγγιση των Σεροτονινεργικών Υποδοχέων Τύπου $5HT_{1A}$ 60
1.8.2 Η Συμμετοχή του $5HT_{1A}$ Υποδοχέα στην Αλληλουχία των Βιοχημικών Συμβάντων στον Ιππόκαμπο για τον Σχηματισμό Μνήμης 62
1.8.3 Η Δράση Αγωνιστών και Ανταγωνιστών των $5HT_{1A}$ Υποδοχέων στη Μνήμη 64
2. Σκοπός της Εργασίας 69
3. Υλικά και Μέθοδοι 70
3.1 Πειραματόζωα 70
3.2 Πειραματική Διάταξη Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου .. 70
3.3 Φάρμακα 74
3.4. Πείραμα 1: Αξιολόγηση της δράσης διαφόρων δόσεων της 8-OH-DPAT στις επιδόσεις επίμυων στην διαδικασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου (ΑΝΑ) 75
3.5. Πείραμα 2: Αξιολόγηση της ανταγωνιστικής δράσης διαφόρων δόσεων του WAY 100635 στην επαγόμενη αμνησία από τη χορήγηση της 8-OH-DPAT στην διαδικασία ΑΝΑ στους επίμυες 75
3.6. Πείραμα 3: Αξιολόγηση της ανταγωνιστικής δράσης διαφόρων δόσεων της μολσιδομίνης στην επαγόμενη αμνησία από τη χορήγηση της 8-OH-DPAT στην διαδικασία ΑΝΑ στους επίμυες 76
4. Αποτελέσματα 78
4.1. Πείραμα 1: Αξιολόγηση της δράσης διαφόρων δόσεων της 8-OH-DPAT στις επιδόσεις επίμυων στην διαδικασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου 79
4.2. Πείραμα 2: WAY 100635 και 8-OH-DPAT 81
4.3. Πείραμα 3: Μολσιδομίνη και 8-OH-DPAT 83
5. Συζήτηση 85
6. Διεξαγωγή Περαιτέρω Μελετών για την Διερεύνηση του Ρόλου του NO στην Ψυχομιμητική δράση των ανταγωνιστών των NMDA υποδοχέων 89
7. Βιβλιογραφία 90

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

1. Εισαγωγή

1.1 Η Νευροεπιστήμη της Συμπεριφοράς στην μελέτη της Μάθησης και της Μνήμης

Η νευροεπιστήμη της συμπεριφοράς έχει ως αντικείμενο μελέτης την σχέση εγκεφάλου και συμπεριφοράς με σκοπό να ερμηνεύσει την βιολογική δραστηριότητα του εγκεφάλου με βάση την συμπεριφορά (φυσιολογική και παθολογική) και αντίστροφα. Με άλλα λόγια, η επιστήμη αυτή έχει σαν σκοπό να κατανοήσει πως οι εγκεφαλικές λειτουργίες ορίζουν την αντίληψη, την μάθηση, την μνήμη, απλές κινητικές συμπεριφορές (π.χ. βάδισμα) αλλά και σύνθετες γνωσιακές δράσεις όπως το παίξιμο ενός μουσικού οργάνου και η ομιλία. Οι ανωμαλίες της ανθρώπινης συμπεριφοράς λόγω διαταραχών των ανώτερων γνωσιακών και κινητικών λειτουργιών αλλά και των συναισθημάτων οι οποίες χαρακτηρίζουν νευρολογικές και ψυχικές ασθένειες (π.χ. νόσος Parkinson, νόσος Alzheimer, σκλήρυνση κατά πλάκας, σχιζοφρένεια, κατάθλιψη, άγχος) αντικατοπτρίζουν διαταραχές του εγκεφάλου. Η κατανόηση της αλληλουχίας των βιοχημικών συμβάντων, της εμπλοκής των νευροδιαβιβαστών και των αμέτρητων νευρικών κυττάρων στον εγκέφαλο για την παραγωγή συμπεριφοράς είναι σημαντική για την ερμηνεία ασθενειών του ΚΝΣ και την αντιμετώπισης τους. Για τον λόγο αυτό, οι νευροεπιστήμονες χρησιμοποιούν μεθόδους και τεχνικές όπως της μοριακής βιολογίας, της βιοχημείας, της φαρμακολογίας, της ψυχολογίας, της ανοσοϊστοχημείας και της νευροανατομίας για να επιτύχουν τον στόχο τους [164, 165].

Μάθηση είναι η διεργασία με την οποία ο άνθρωπος και τα ζώα αποκτούν πληροφορίες για τον κόσμο και ενεργούν ανάλογα σύμφωνα με αυτές. Μνήμη

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

είναι η αποθήκευση των πληροφοριών αυτών. Τα ζώα έχουν την ικανότητα να επεξεργάζονται το περιβάλλον τους και να μαθαίνουν από αυτό και για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούνται ευρέως στην διεξαγωγή πειραμάτων συμπεριφοράς. Για παράδειγμα, είναι εύκολο να καταγραφεί η συμπεριφορά των επιμύων και των μύων γιατί παρουσιάζουν έντονα την τάση για εξερεύνηση και διάφορες μορφές κινητικότητας. Έχουν αναπτυχθεί ποικίλα πρότυπα μελέτης της μάθησης και της μνήμης σε πειραματόζωα. Οι δοκιμασίες αυτές βασίζονται στην παρατήρηση ότι το πειραματόζωο θα θυμηθεί να μην εκδηλώσει μια συγκεκριμένη συμπεριφορά η οποία είχε αρνητικές συνέπειες (π.χ. να μην εισέλθει σε χώρο όπου δέχτηκε ηλεκτροσόκ- ***παθητική αποφυγή***), ή θα θυμηθεί ότι ένα συγκεκριμένο ερέθισμα είναι προειδοποίηση για να αποφύγει ένα επώδυνο ερέθισμα (π.χ. να μεταβεί σε άλλο χώρο για να αποφύγει το ηλεκτροσόκ, όταν ακούσει το προειδοποιητικό ηχητικό ερέθισμα - ***ενεργητική αποφυγή***) ή στην περίπτωση της χρήσης του λαβύρινθου σχήματος Τ θα θυμηθεί σε ποιό σημείο της διάταξης είχε τοποθετηθεί τροφή ή σε ποιόν βραχίονα βρίσκεται η πλατφόρμα διάσωσης στην δοκιμασία στον υδάτινο λαβύρινθο με σκοπό την μελέτη ***χωρικής μάθησης και μνήμης*** [164, 165].

Η μάθηση της παθητικής αποφυγής στους επιμύες π.χ. διεγείρει μια σειρά από βιοχημικά συμβάντα στον ιππόκαμπο τα οποία είναι σημαντικά για την διατήρηση αυτής της μάθησης στη μνήμη. Το πείραμα της παθητικής αποφυγής περιλαμβάνει την εκπαίδευση, σε μία μόνο συνεδρία, επιμύων να αποφεύγουν να περάσουν από μια πόρτα για να εισέλθουν σε ένα διαμέρισμα όπου είχαν δεχτεί ηλεκτροσόκ στα πόδια. Παρόμοια παραδείγματα ανασταλτικής αποφυγής στον άνθρωπο είναι να αποφεύγει να βάζει τα δάχτυλα του σε ηλεκτρικές πρίζες ή να διασχίζει ένα δρόμο χωρίς προηγουμένως να ελέγξει. Βέβαια, η χορήγηση ηλεκτροσόκ στους επίμυες

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

Θεωρείται ένα 'σπάνιο' ή 'δυνατό' συμβάν και προκαλεί αξιοσημείωτες βιοχημικές αλλαγές. Θεωρείται ότι παρόμοιες, μικρότερου βαθμού, βιοχημικές αλλαγές συμβαίνουν σε λιγότερο δραματικές μνήμες σε σχέση με το ηλεκτροσόκ στις οποίες εμπλέκεται μικρότερος αριθμός συνάψεων [164].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

1.2 Ο Ρόλος των Νευροδιαβιβαστών στις Νευροεκφυλιστικές Νόσους

Στα τέλη της δεκαετίας του 1970 ανεξάρτητες μελέτες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι στο βασικό προμετωπιαίο φλοιό ασθενών με τη νόσο του Alzheimer παρουσιάζεται δραματική εκφύλιση των χολινεργικών νευρώνων. Τα ευρήματα τους πυροδότησαν την εξέταση πιθανής εμπλοκής της χολινεργικής λειτουργίας του ΚΝΣ στις λειτουργίες αντίληψης. Πολλές προκλινικές μελέτες χρησιμοποιώντας πειραματικές συμπεριφορικές διατάξεις για την εξέταση της νόσου του Alzheimer εστιάστηκαν στην ανεπάρκεια μνήμης προκαλούμενη είτε από βλάβη χολινεργικών πυρήνων ή χολινεργικών οδών, είτε από αποκλεισμό της κεντρικής χολινεργικής νευροδιαβίβασης. Σχεδόν όλες οι έρευνες από το 1960 μέχρι τα μέσα του 1980 κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η ανακοπή της κεντρικής λειτουργίας του χολινεργικού συστήματος έχει ως συνέπεια την εξασθένηση της μάθησης και της μνήμης, όπως περιγράφεται στην 'χολινεργική υπόθεση της μνήμης' [71]. Την τελευταία δεκαετία, εννοιολογικές αλλαγές και νέοι νευροχημικοί χαρακτηρισμοί της νευροπαθολογίας της νόσου του Alzheimer υποδεικνύουν ότι η 'χολινεργική υπόθεση' δεν είναι αρκετή για να εξηγήσει τους μηχανισμούς που καταλήγουν σε ανεπάρκεια της μάθησης και της μνήμης. Οι διαδικασίες της μάθησης και της μνήμης δεν εξαρτώνται αποκλειστικά από την λειτουργία του χολινεργικού συστήματος, παρά το γεγονός ότι το σύστημα αυτό παίζει σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες αυτές. Έχουν αναγνωριστεί πολλά ακόμη συστήματα νευροδιαβιβαστών, όπως αυτά της ντοπαμίνης, του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA), της νοραδρεναλίνης και της σερετονίνης, τα οποία φαίνεται να εμπλέκονται στην γνωστική λειτουργία. Υποστηρίζεται η ιδέα ότι ο προσδιορισμός της συμπεριφοράς και της γνωσιακής λειτουργίας εξαρτάται από τις αλληλεπιδράσεις (και την ισορροπία) μεταξύ των

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

συστημάτων αυτών. Οι Decker και McGaugh προτείνουν ότι η γνωστική λειτουργία μπορεί να θεωρηθεί ως το προϊόν ενός ολοκληρωμένου συστήματος στο οποίο διάφορα υποσυστήματα είτε μοιράζονται παράλληλους συνεργικούς ρόλους (οι νευροχημικές διαδικασίες που συμβαίνουν παράλληλα σε δύο ή περισσότερα συστήματα συνεισφέρουν στην αντίληψη αθροιστικά) είτε αλληλεπιδρούν μεταξύ τους (διάφοροι νευροδιαβιβαστές ρυθμίζουν ένα δεδομένο νευρωνικό σύστημα για να καθορίσουν μία συγκεκριμένη λειτουργία που σχετίζεται με την αντίληψη) [37]. Είναι δυνατόν μια γνωστική λειτουργία να προκύψει από το συνδυασμό συνέργειας και αλληλεπιδράσεων μεταξύ των νευροδιαβιβαστών [37].

Ποικίλες μελέτες προτείνουν ποικίλους πιθανούς κυτταρικούς στόχους και μηχανισμούς δράσης του μονοξειδίου του αζώτου και θεωρούν ότι δρα ως αγγελιοφόρος στον εγκέφαλο με σημαντική δράση στη μάθηση και στη μνήμη. Η παρούσα μελέτη επικεντρώνεται στην διερεύνηση του ρόλου του αερίου αυτού στην γνωστική λειτουργία και στην εμπλοκή του με στα παραπάνω νευροδιαβιβαστικά συστήματα και κυρίως σε αυτό της σεροτονίνης.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

1.3 Γενική Παρουσίαση του Μονοξειδίου του Αζώτου (Nitric Oxide, $NO^{\cdot}$)

1.3.1 Ιστορική Αναδρομή

Το μονοξειδίο του αζώτου (NO) είναι αέριο το οποίο δρα ως ενδοκυτταρικός αγγελιοφόρος και εμπλέκεται σε ποικίλες φυσιολογικές λειτουργίες, όπως είναι η ρύθμιση του μυϊκού τόνου, συγκόλληση των αιμοπεταλίων και νευροδιαβίβαση.

Η βιολογική δράση του NO διαπιστώθηκε αρχικά στο κυκλοφορικό σύστημα [162]. Αν και η ικανότητα της νιτρογλυκερίνης και άλλων νιτρωδών να ανακουφίζουν τον πόνο στη στηθάγχη ήταν ήδη γνωστή από τον 19° αιώνα [175], οι μηχανισμοί δράσης τους ανακαλύφθηκαν πολύ αργότερα. Το 1980 εξακριβώθηκε ότι η χάλαση των αιμοφόρων αγγείων, ως απάντηση στην ακετυλοχολίνη, προϋποθέτει την απελευθέρωση μιας ουσίας από το ενδοθήλιο, η οποία ονομάστηκε προερχόμενος από το ενδοθήλιο παράγοντας χάλασης [Endothelium Derived Relaxing Factor, (EDRF)] [73]. Μετά από πολλά χρόνια έρευνας, διαπιστώθηκε ότι το EDRF είναι το NO [73, 173]. Το NO είναι ο ενεργός μεταβολίτης της νιτρογλυκερίνης, όπως και άλλων νιτρωδών, ο οποίος προκαλεί τη χάλαση των αιμοφόρων αγγείων ενεργοποιώντας τη γουανιλική κυκλάση (sGC), επάγοντας έτσι το σχηματισμό της 3', 5'-κυκλικής μονοφωσφορικής γουανοσίνης (cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate, cGMP) [229]. Συνεπώς, το NO αποτελεί σημαντικό παράγοντα ρύθμισης της συσταλτικότητας των αγγείων.

Ένα χρόνο μετά τον προσδιορισμό της ταυτότητας του EDRF, παρατηρήθηκε ότι το γλουταμινικό οξύ προκαλεί απελευθέρωση NO, όταν δρα στους

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

ιοντοτροπικούς υποδοχείς τύπου N-μέθυλο-D-ασπαρτικού (N-methyl-D-aspartate, NMDA) των παρεγκεφαλιδικών κυττάρων [74]. Αυτό οδήγησε τον Garthwaite και τους συνεργάτες του στο συμπέρασμα ότι το NO δρα ως αγγελιοφόρος στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) μια και φαρμακολογική αναστολή του συνθετικού ενζύμου συνθάση του NO (NO synthase, NOS) παρεμποδίζει την αύξηση των επιπέδων της cGMP σε τομές εγκεφάλου, κατά τη διέγερση NMDA υποδοχέων [24, 75]. Οι μελέτες από τους Garthwaite και των υπόλοιπων συνεργατών έδειξαν ότι το NO είναι δυνατόν να συνδέει την διέγερση μετασυναπτικών NMDA υποδοχέων με λειτουργικές αλλαγές σε γειτονικές προσυναπτικές απολήξεις και νευρογλοιακά κύτταρα. Μετέπειτα, έρευνες έδειξαν ότι το NO ρυθμίζει την νευρωνική απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* συνθήκες [ανασκόπηση 189]. Συνεπώς, η νευροδιαβίβαση δεν ελέγχεται μόνο από τους προσυναπτικούς αυτό-υποδοχείς και από τους μετασυναπτικούς έτερο-υποδοχείς αλλά και από το NO. Συνολικά έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες που εξετάζουν τη δράση του NO στη νευροενδοκρινική λειτουργία και στη συμπεριφορά [ανασκόπηση 25, 51]. Τα ευρήματα που δείχνουν ότι το NO ρυθμίζει την διεγερσιμότητα και την έκκριση των νευροδιαβιβαστών σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου όπως τον ιππόκαμπο, το ραβδωτό σώμα, τον υποθάλαμο και τον υπομέλαινα τόπο [52], υποδεικνύουν την εμπλοκή του στις διαδικασίες της μνήμης και της μάθησης και κατά επέκταση τον σημαντικό του ρόλο στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

1.3.2 Βιοχημεία του NO

Ιδιότητες του NO

Το NO είναι ένα από τα μικρότερα γνωστά βιολογικά ενεργά μόρια. Είναι ενδογενές αέριο, άχρωμο και παρουσιάζει υψηλή διαλυτότητα στο νερό. Ο χρόνος ημίσειας ζωής του είναι λιγότερος των 5 δευτερολέπτων [162]. Επίσης είναι ένα από τα πιο απλά μόρια με ένα μη-συζευγμένο ηλεκτρόνιο. Το ιδιαίτερο αυτό χημικό γνώρισμα χαρίζει στο NO παραμαγνητικές ιδιότητες και την ικανότητα χημικής αντίδρασης του με ποικίλα άτομα και ελεύθερες ρίζες [ανασκόπηση 1].

Σύνθεση του NO

Το NO παράγεται με τη διαμεσολάβηση διαφορετικών, για κάθε τύπο κυττάρου, ισοενζύμων γνωστών ως συνθάσες του NO (NO synthase, NOS) τα οποία καταλύουν την οξείδωση της L-αργινίνης σε L-κιτρουλίνη και NO η οποία πραγματοποιείται σε δύο στάδια (Εικόνα 1). Αρχικά η L-αργινίνη οξειδώνεται σε N^{ω}-υδροξύ-L-αργινίνη (N^{ω}-hydroxy-L-arginine, NHA) και στη συνέχεια σε L-κιτρουλίνη και NO. Σύμφωνα με την επικρατέστερη άποψη για τον τρόπο που πραγματοποιείται η σύνθεση του NO, η ροή της αντίδρασης είναι η εξής [45]:

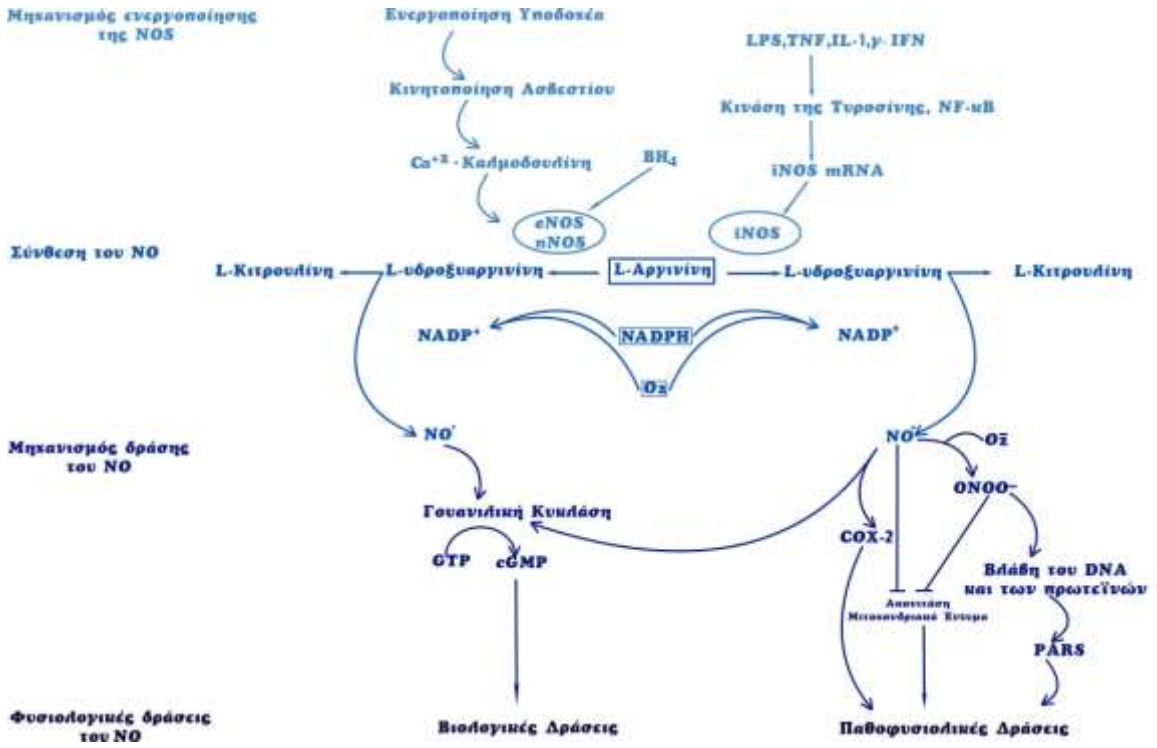
L-αργινίνη + O_2 + NADPH + H^+ → NHA + NADP + H_2O → L-κιτρουλίνη + NO • + $NADP^+$ + H_2O

Έχουν αναγνωριστεί τρία διαφορετικά ισοένζυμα της NOS που κωδικοποιούνται από γονίδια που εντοπίζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα και συντίθενται σε ποικίλους τύπους κυττάρων όπως νευρώνες, ενδοθηλιακά

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

κύτταρα και μακροφάγα [45]. Τα τρία αυτά ισοένζυμα είναι παρόμοια στη δομή, παρουσιάζουν ομολογία μεταξύ τους κατά 50-60% και έχουν εφάμιλλη ειδική δραστικότητα. Οι NOS διακρίνονται σε: **Νευρωνική** (neuronal NOS, **nNOS** ή NOS1), **επαγόμενη** (inducible NOS, **iNOS** ή NOS2) και **ενδοθηλιακή** (endothelial NOS, **eNOS** ή NOS3) NOS. Η ονομασία τους βασίστηκε στον ιστό στον οποίο βρέθηκαν και κλωνοποιήθηκαν για πρώτη φορά, αλλά από τότε έχουν εντοπιστεί και αλλού. Πράγματι, η nNOS βρίσκεται στους νευρώνες αλλά και σε διάφορους άλλους τύπους κυττάρων όπως τους σκελετικούς μύες και το επιθήλιο των αεραγωγών. Η eNOS δεν απαντάται μόνο στα ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά και στο μυοκάρδιο, το σκελετικό μυ και τους νευρώνες. Η έκφραση καθώς και η δράση των δύο αυτών ισοενζύμων ελέγχεται από την αύξηση της συγκέντρωσης του συμπλέγματος ασβεστίου Ca^{+2}/καλμοδουλίνη ως απάντηση σε εξωκυτταρικά ερεθίσματα κι για το λόγο αυτό ονομάζονται δομικές συνθάσες το NO (constitutive NOS, cNOS). Τα μακροφάγα περιέχουν τον τρίτο τύπο του επαγωγικού ισοενζύμου, την iNOS, η οποία εκφράζεται μετά από επαγωγή από τις κυτοχικίνες και η δράση της είναι ανεξάρτητη από την παρουσία αυξημένης συγκέντρωσης του συμπλέγματος Ca^{+2}/καλμοδουλίνη. Πρόσφατα αναγνωρίστηκε και ένας ακόμη τύπος, η μιτοχονδριακή NOS (mitochondrial NOS, mtNOS) αλλά ο ρόλος του δεν έχει ερευνηθεί για την ώρα [1, 76, 77]

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

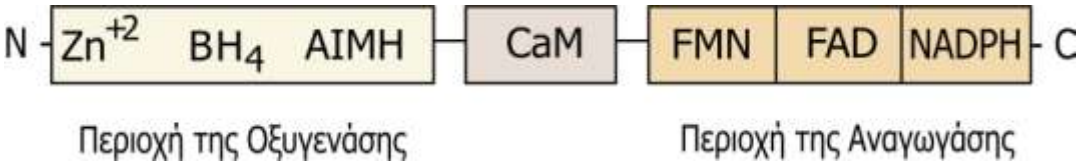


<u>Εικόνα 1:</u> Σχηματική αναπαράσταση των μηχανισμών ενεργοποίησης των ισοενζύμων της NOS, και της σύνθεσης και επακόλουθης δράσης του NO [1].
Συντομογραφίες: BH_4: τετραϋδροβιοπτερίνη, COX-2: κύκλο-οξυγενάση τύπος 2, γ-IFN: γ-Interferon, IL-I: Interleukin-I, LPS: lipopolysaccharide, NF-κB: nuclear factor-κB, PARS: poly-adenosine diphosphate ribose synthase, TNF-α: tumour necrosis factor-α

Τα ισοένζυμα της NOS αποτελούνται από μια αμινοτελική περιοχή με δράση οξυγενάσης (oxygenase domain, NOSox) και μια καρβοξυτελική περιοχή με δράση αναγωγάσης (reductance domain, NOSred) οι οποίες διαχωρίζονται από μια τρίτη περιοχή (caM), υπεύθυνη για τη πρόσδεση της καλμοδουλίνης και συνεπώς σημαντική για την ενεργοποίηση του ενζύμου (Εικόνα 2) [45]. Η περιοχή της αναγωγάσης περιέχει θέσεις πρόσδεσης για τους συμπαράγοντες φλάβινο-αδένινο-δινουκλειοτίδιο (flavin adenine dinucleotide, FAD) φλάβινο μονονουκλεοτίδιο (flavin mononucleotide, FMN) και φωσφορικό-νικοτιναμιδό-αδενινό-δινουκλεοτίδιο στην ανηγμένη μορφή του (NADPH). Η δομή της είναι παρόμοια με αυτή των ενζύμων του κυτοχρώματος P450 και

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

για το λόγο αυτό οι NOS είναι μέλη της οικογένειας αυτής. Η περιοχή της οξυγενάσης είναι το καταλυτικό μέρος για την σύνθεση του NO αφού αποτελεί το υπόστρωμα για την πρόσδεση της L-αργινίνης, της τετραϋδροβιοπτερίνη (tetrahydrobiopterin, BH_4 - υπεύθυνη για την μετακίνηση ηλεκτρονίων) και μιας ομάδας της αίμης (iron protoporphyrin IX). Το ένζυμο ενεργοποιείται με την σύνδεση του ασβεστίου στο μόριο της καλμοδουλίνης. Στη συνέχεια, μετακινούνται ηλεκτρόνια από το υπόστρωμα NADPH στις φλαβίνες και από εκεί στο σύμπλεγμα της αίμης στην περιοχή της οξυγενάσης όπου πραγματοποιείται αναγωγή του σιδήρου. Ο ανηγμένος αιμικός σίδηρος ενώνεται με μοριακό οξυγόνο (O_2) γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την προσθήκη οξυγόνου στο υπόστρωμα και την οξείδωση της L-αργινίνης σε L-κιτρουλίνη και NO [ανασκόπηση 45].



<u>Εικόνα 2:</u> Η γενική δομή των ισοενζύμων της NOS και οι περιοχές πρόσδεσης των παραγόντων και άλλων ρυθμιστών [45]

Η σύνθεση του NO στους νευρώνες διεγείρεται από την εισροή Ca^{+2} η οποία προκαλείται από την ενεργοποίηση κυρίως NMDA υποδοχέων γλουταμινικού οξέος, όπως περιγράφεται παρακάτω [ανασκόπηση 45].

Βιοχημική προσέγγιση του μηχανισμού δράσης του NO

Το NO διαχέεται από το κύτταρο που μόλις παράχθηκε στο κύτταρο-στόχος. Η δράση του περιγράφεται με δύο βασικούς μηχανισμούς. Ο κύριος

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

μηχανισμός δράσης του παραγόμενου από την eNOS ή nNOS NO - όπως έχει αναγνωριστεί για πολλούς ιστούς - εξαρτάται από τον σχηματισμό της cGMP. Το NO ενεργοποιεί το ένζυμο που καταλύει την σύνθεση του cGMP, γνωστό ως διαλυτή γουανιλική κυκλάση (sGC). Η sGC είναι ετεροδιμερές και περιέχει ένα μόριο αίμης. Το NO συνδέεται με τον σίδηρο στο δακτύλιο της πορφυρίνης της αίμης του ενζύμου με επακόλουθο την αναδιαμόρφωση της δομής του και την ενεργοποίηση του. Η αύξηση της cGMP στο ΚΝΣ είναι δυνατό να επηρεάσει την δράση ιοντικών διαύλων ή της φωσφοδιεστεράσης, ή να ενεργοποιήσει πρωτεϊνικές κινάσες που εξαρτώνται από την cGMP [ανασκόπηση 45].

Ο δεύτερος μηχανισμός δράσης είναι ανεξάρτητος από τον σχηματισμό του cGMP. Το NO συναντάται σε τρείς μορφές: ως ελεύθερη ρίζα (NO•) – η πιο συνήθης μορφή, ανιόν (NO^-) ή κατιόν (NO^+). Οι μορφές αυτές διαφέρουν στη σταθερότητα, την ικανότητα να διαπεράσουν βιολογικές δομές και τη χημική αντιδραστικότητα [45, 162].

Το προτιμώμενο αντιδραστήριο για το NO• είναι το ανιόν του υπεροξειδίου O_2^-, το οποίο είναι παραπροϊόν του οξειδωτικού μεταβολισμού των κυττάρων. Το προϊόν της αντίδρασης αυτής είναι ο σχηματισμός υπεροξυνιτρώδους (ONOO-) [12, 13, 64]:

$NO\bullet + O_2^- \rightarrow ONOO-$

Το υπεροξυνιτρώδες είναι σχετικά ασταθές. Η αντίδραση του με ένα πρωτόνιο παράγει το υπεροξύ- νιτρώδες οξύ, το οποίο διαμέσου αντιδράσεων ισομερισμού, αποσυντίθεταικαι παράγεται ελεύθερη ρίζα υδροξυλίου η οποία είναι ιδιαίτερα τοξική και ενεργή [12, 13, 64]:

$ONOO- + H+ \rightarrow ONOOH \rightarrow OH\bullet + NO_2$

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

Επίσης το NO•, είναι δυνατόν να βρίσκεται με την μορφή NO^+ ή NO^- συνδεδεμένο με ένα μόριο μεταφορέα (carrier molecule, CM) με την βοήθεια του οποίου μεταφέρεται προς το μόριο-στόχος σε ιονισμένη κατάσταση [45]:

$NO\bullet + CM \rightarrow CM\text{-}NO^+$ ή $CM\text{-}NO^-$

Το NO αντιδρά ακόμη με μοριακό οξυγόνο και παράγει νιτρικό ανιδρίτη (N_2O_3) το οποίο είτε υδρολύεται παρουσία νερού, ή δρα ως δότης του NO. Οι διάφορες μορφές του NO αντιδρούν με ποικίλες λειτουργικές ομάδες οργανικών μορίων όπως αμιδικά, θειολικά και υδροξυλικά κατάλοιπα προσθέτοντας σε αυτά το μόριο του NO υπό τη μορφή [64]:

- NO^+ (νιτρωδίωση) ή
- NO_2^+ (νίτρωση) ή
- ελεύθερης ρίζας χωρίς μεταβολή του φορτίου του υποστρώματος (νιτροζυλίωση)

Το N_2O_3 εμπλέκεται σε αντιδράσεις οι οποίες παράγουν NO, ONOO-, NO_2 και HNO και έχει δειχτεί ότι συμβάλουν στην οξειδωτική βλάβη του κυττάρου [45].

Το NO έχει πολλούς πιθανούς στόχους στα κύτταρα. Οι παράγοντες οι οποίοι ορίζουν το βιολογικό αποτέλεσμα της δράσης του είναι η συγκέντρωση του NO και του κυτταρικού στόχου καθώς και η ταχύτητα της αντίδρασης του NO με τον κυτταρικό στόχο. Για παράδειγμα, η αντίδραση του με τον σίδηρο της αίμης της sGC είναι ταχύτατη, ενώ η αντίδραση του με την πρωτεΐνη ακονιτάση είναι ιδιαίτερα αργή και για την πραγματοποίηση της απαιτείται τα δύο αντιδραστήρια να βρίσκονται σε υψηλή συγκέντρωση. Αντίθετα, το ONOO- αντιδρά άμεσα με την ακονιτάση. Η βιολογική δράση του NO,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

εξαρτάται ακόμη από το χημικό περιβάλλον το οποίο καθορίζει αν το NO θα αντιδράσει με τον κυτταρικό στόχο ως ελεύθερη ρίζα, υπεροξύ-νιτρώδες ή συνδεμένο με φορέα [162].

1.3.3 Νευροανατομία του NO

Η εντόπιση και η γνώση της κατανομής του NO στον εγκέφαλο είναι σημαντική για την κατανόηση της δράσης του στο ΚΝΣ. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός της NOS με την χρήση εκλεκτικών αντισωμάτων για τις διάφορες ισομορφές του ενζύμου έχουν χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό των κυττάρων του ΚΝΣ που παράγουν NO.

Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις της nNOS βρίσκονται στην παρεγκεφαλίδα όπου η nNOS απαντάται στα γλουταμινέργικα κοκκιώδη και στα GABAεργικά κύτταρα. Η nNOS συγκεντρώνεται στον οσφρητικό βολβό και κυρίως στον επικουρικό οσφρητικό βολβό, στον οροφιαίο πυρήνα, στα άνω και κάτω σπειραματικά λοφίδια, στα νησίδια του Callejae, στο κερκοφόρο πυρήνα και το κέλυφος του ραβδωτού σώματος, και στην οδοντωτή έλικα του ιππόκαμπου. Επίσης, η nNOS βρίσκεται σε μεμονωμένα κύτταρα στον εγκεφαλικό φλοιό. Το ένζυμο συναντάται ακόμη, στον πυρήνα της διαγώνιας ταινίας του Broca και στον έσω διαφραγματικό πυρήνα [25].

Η nNOS συνεντοπίζεται με περισσότερους από έναν νευροδιαβιβαστές. Για παράδειγμα, η nNOS που βρίσκεται σε νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού και του ραβδωτού σώματος συνεντοπίζεται με τη σωματοστατίνη και το νευροπεπτίδιο Y [50]. Οι νευρώνες στον οροφιαίο πυρήνα που περιέχουν NOS εκφράζουν εκλεκτικά την ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης ενώ στον

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

υποθάλαμο, ορισμένοι νευρώνες χρωματίζονται θετικά για ωκυτοκίνη και βασοπρεσίνη [71, 72].

Η eNOS, όπως προαναφέρθηκε, δεν βρίσκεται μόνο στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αιμοφόρων αγγείων αλλά και στους νευρώνες. Υψηλές συγκεντρώσεις eNOS εντοπίζονται στα πυραμιδικά κύτταρα των CA1 έως CA3 πεδίων του ιππόκαμπου και στα κοκκιώδη κύτταρα της οδοντωτής έλικας. Αντίθετα, η συγκέντρωση της nNOS είναι πολύ χαμηλή στο CA1 πεδίο ενώ η παρουσία της nNOS στον ιππόκαμπο περιορίζεται στους διάμεσους GABAεργικούς νευρώνες [56]. Σε ορισμένες εγκεφαλικές περιοχές, όπως η παρεγκεφαλίδα και ο οσφρητικός βολβός, τα συνένζυμα eNOS και nNOS συνυπάρχουν στον ίδιο πληθυσμό κυττάρων, σε διαφορετική αναλογία [162].

1.3.4 Φαρμακολογική Προσέγγιση της ρύθμισης του NO στον εγκέφαλο

Όπως αναφέρεται λεπτομερώς παρακάτω, το NO παίζει σημαντικό ρόλο στην φυσιολογία του εγκεφάλου και ασκεί νευροπροστατευτική δράση στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Συνεπώς, πολλές έρευνες στρέφονται στην εξέταση της ευεργετικής αυτής δράσης του αερίου και στην ανακάλυψη χημικών ουσιών που αυξάνουν την διαθεσιμότητα του. Αντιθέτως, η υπέρμετρη σύνθεση του έχει ως ενδεχόμενο την καταστροφή των νευρικών κυττάρων του εγκεφάλου. Για το λόγο αυτό, η διερεύνηση της δράσης ενώσεων που ελαττώνουν την διαθεσιμότητα του NO είναι εξίσου σημαντική για την κατανόηση της παθοφυσιολογικής δράσης του αερίου στον εγκέφαλο. Οποιαδήποτε φαρμακολογική προσέγγιση ικανή να παρεμβαίνει στα διάφορα στάδια παραγωγής, δράσης, ή απενεργοποίησης του NO, είναι άρρηκτα συνδεμένη με την εμφάνιση προβλημάτων. Μία φαρμακολογική παρέμβαση η

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

οποία στοχεύει να μειώσει την βιοδιαθεσιμότητα του NO θα πρέπει να ελαττώνει την υπερβολική παραγωγή του χωρίς να παρακωλύει σημαντικά τους απαραίτητους φυσιολογικούς μηχανισμούς δράσης του. Από την άλλη μεριά, τα φάρμακα που αυξάνουν την διαθεσιμότητα του NO και/ή ενισχύουν ή παρατείνουν τις βιοχημικές διαδικασίες του κυττάρου που εξαρτώνται από το NO, θα πρέπει να δρουν με τέτοιο τρόπο ώστε να αποφεύγεται η μη-ελεγχόμενη παραγωγή του αερίου. Στις προηγούμενες ενότητες διευκρινίστηκε ότι το NO, λόγω της διαφορετικής χημικής υπόστασης στην οποία βρίσκεται, ανάλογα με το χημικό περιβάλλον του κυττάρου στο οποίο δρα, αντιδρά με ποικίλα βιολογικά συστατικά του κυττάρου και συνεπώς επηρεάζει πολλές φυσιολογικές λειτουργίες. Οι πολλαπλές δράσεις του NO οφείλονται επίσης στο γεγονός ότι είναι μικρό μόριο και στην ικανότητα του να διαπερνά κυτταρικές μεμβράνες και να διεισδύει στον ενδοκυτταρικό χώρο με διάχυση. Οι χημικές αυτές ιδιότητες του NO, είναι υπεύθυνες για την δυσκολία που αντιμετωπίζεται κατά την φαρμακολογική προσέγγιση της ρύθμισης του NO σε συγκεκριμένα κύτταρα ή σε συγκεκριμένα στάδια της διαθεσιμότητας του [ανασκόπηση 45].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

Αναστολείς της NOS

Όπως προαναφέρθηκε, τα τρία ισοένζυμα της NOS, nNOS, eNOS και iNOS, είναι παρόμοια στη δομή με ομολογία μεταξύ τους μεγαλύτερη του 50%. Είναι σημαντικό για την κατανόηση της παθοφυσιολογίας του NO και την ανάπτυξη κατάλληλων θεραπευτικών προσεγγίσεων, οι ενώσεις που χρησιμοποιούνται για την αναστολή της NOS να έχουν εκλεκτική δράση. Είναι απαραίτητο δηλαδή, ο αναστολέας να παρεμποδίζει το ισοένζυμο που ορίζουν οι ανάγκες της έρευνας και να μην επηρεάζει τα άλλα δύο. Θεωρητικά, η αναστολή της NOS είναι δυνατόν να επιτευχθεί αποτρέποντας την είσοδο της L-αργινίνης στο κύτταρο ή την μετακίνηση των ηλεκτρονίων μέσω του NADPH και των φλαβινών [84, 97, 153, 155]. Με τον τρόπο αυτό, πραγματοποιείται η αναστολή του ενζύμου χωρίς να επηρεάζονται οι υπόλοιπες κυτταρικές λειτουργίες αλλά έτσι δεν επιτυγχάνεται εκλεκτική αναστολή μεταξύ των ισοενζύμων. Μια προσπάθεια για την επίτευξη εκλεκτικότητας στη δράση των αναστολέων της NOS είναι ο σχεδιασμός μορίων ικανών να αντιδρούν με την ενεργή περιοχή του ενζύμου και τις παρακείμενες σε αυτήν περιοχές, οι οποίες παρουσιάζουν τις περισσότερες διαφορές μεταξύ των ισοενζύμων [47,48].

Ανάλογα της L-αργινίνης χρησιμοποιούνται για την αναστολή της NOS, όπως η L-N νιτροαργινίνη (L-N^G nitroargine, L-NA) και ο μεθυλεστέρας της, N^G-νίτρο-L-αργινίνη (N^G-nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME). Η κατηγορία αυτή των αναλόγων της L-αργινίνης δεν παρουσιάζει ιδιαίτερη επιλεκτικότητα ως προς τα ισοένζυμα της NOS [97]. Μια δεύτερη κατηγορία αναστολέων της NOS περιλαμβάνει ενώσεις οι οποίες δεν προέρχονται από αμινοξέα και διαφέρουν μεταξύ τους στη χημική δομή. Δημοφιλή παραδείγματα είναι ορισμένες ετεροκυκλικές ενώσεις της ιδαζόλης και της ιμιδαζόλης όπως η 7

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

νιτρο-ινδαζόλη (7-nitroindazole, 7-NI) και η τριμεθυλ-φαινυλ-φλουρο-ιμιδαζόλη (trimethylphenylfluoro-imidazole, TRIM) οι οποίες αποτελούν ισχυρούς αναστολείς όλων των ισοενζύμων της NOS *in vitro* [18]. *In vivo* μελέτες, αναφέρουν ότι η 7-NI είναι επιλεκτικός αναστολέας της nNOS [5, 155].

Δότες του NO

Οι δότες του NO είναι ενώσεις που ελευθερώνουν το αέριο στα κύτταρα. Όμως, η δράση και η φαρμακοκινητική των φαρμάκων αυτών είναι περίπλοκη [66, 160]. Το NO, ανάλογα τον δότη από τον οποίο προέρχεται, παράγεται με ή χωρίς τη μεσολάβηση ενζυμικής αντίδρασης και ίσως χρειαστεί οξείδωση, αναγωγή ή αντίδραση με θειόλες του δότη προκειμένου να απελευθερωθεί και να είναι ενεργό [66, 160]. Επίσης, οι δότες του NO διαφέρουν στην ευαισθησία που παρουσιάζουν στο pH, το φως, τη θερμοκρασία, την πίεση οξυγόνου κ.α. Σε ορισμένες περιπτώσεις οι δότες του NO δεν ελευθερώνουν NO αλλά τις οξειδωμένες μορφές του (NO+, NO-) ή την ελεύθερη ρίζα του (NO•) των οποίων η μετατροπή σε NO επηρεάζεται σημαντικά από την αντιδραστικότητα των βιομορίων στο βιολογικό περιβάλλον [45]. *In vitro* και *in vivo* μελέτες λοιπόν οι οποίες εξετάζουν την δράση των δοτών του NO δεν καταλήγουν πάντα σε ασφαλή αποτελέσματα. Η χορήγηση των δοτών του NO *in vitro* παρουσιάζει περιορισμούς που σχετίζονται με τη δυσκολία να υπολογιστεί η πραγματική ποσότητα του NO που συγκεντρώνεται με το πέρασμα του χρόνου λόγω της υψηλής αντιδραστικότητας του μορίου και για τον λόγο αυτό δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστούν πιθανές συστηματικές ανεπιθύμητες ενέργειες. Όσον αφορά δότες που προορίζονται να δράσουν στον εγκέφαλο, η χορήγηση τους *in vivo* είναι ακόμη πιο περίπλοκη λόγω του

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

βαθμού λιποφιλικότητας του δότη που ορίζει την ικανότητα να περάσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό μετά από συστηματική χορήγηση [45].

Υπάρχουν 6 βασικές κατηγορίες φαρμάκων με ικανότητα να δρουν ως δότες του NO [ανασκόπηση 45]:

1. Νιτροπρωσσικό Νάτριο

Χρησιμοποιείται στις επείγουσες καταστάσεις υπέρτασης αλλά μπορεί να προκαλέσει επικίνδυνη συσσώρευση ιόντων κυανίου [11].

2. Οργανικά νιτρώδη

νιτρογλυκερίνη, τρινιτρική γλυκερίνη και δινιτρική ισοσορβίδη

Η απελευθέρωση του NO από τα οργανικά νιτρώδη γίνεται είτε με αντίδραση του φαρμάκου με σουλφυδρυλομάδα είτε μέσω ενζυματικής κατάλυσης [8, 93]

3. S-Νιτρωδοθειόλες (RSNO)

N-ακετυλοπενικιλλαμίνη (S-nitroso-N-acetylpenicillamine, SNAP)

S-νιτρωδογλουταθειόνη (S-nitrosoglutathione, GSNO)

Οι νιτρωδοθειόλες προκύπτουν από νιτρώδωση πρωτογενών, δευτεροταγών ή τριτοταγών θειολών διάφορων οργανικών μορίων όπως πρωτεΐνες. Το NO απελευθερώνεται κατά την διάσπαση τους [3].

4. Συδνονιμίνες

1-morpholine-sydnonimine, SIN-1 ή Μολσιδομίνη

3-morpholine-sydnonimine, SIN-3

Οι συδνονιμίνες είναι ετεροκυκλικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται θεραπευτικά στη στηθάγχη [66]

5. X-[N(O)-NO] X= νουκλεοτίδιο

Οι ενώσεις αυτές περιέχουν στο μόριο τους ένα διμερές NO συνδεδεμένο με ένα νουκλεοτίδιο μέσω ενός ατόμου του αζώτου [45].

6. Σύμπλοκα NO με Μη Στεροειδή Αντιφλεγμονώδη Φάρμακα (ΜΣΑΦ)

NO-ασπιρίνη

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

NO-κετοπροφαίνη

Η χημική τροποποίηση των ΜΣΑΦ με σκοπό την αργή απελευθέρωση του NO είναι μια προσπάθεια για την ελάττωση της εμφάνισης ανεπιθύμητων ενεργειών των φαρμάκων αυτών [160, 31]. Μελέτες έδειξαν ότι τα ΜΣΑΦ ίσως μειώνουν το κίνδυνο εμφάνισης της άνοιας στη νόσο του Alzheimer [163]. Η χορήγηση σκευασμάτων NO-φλουρμπιπροφαίνης σε πειραματόζωα που εξετάζονται σε μοντέλα μνήμης παρουσιάζουν υποσχόμενα αποτελέσματα στην αντιμετώπιση της άνοιας [31].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

1.4 Δράση του NO στο ΚΝΣ

Η διαπίστωση στα τέλη 1980 και αρχές 1990 ότι ένα αέριο είναι δυνατόν να δρα ως νευροδιαβιβαστής, αλλά με διαφορετικό τρόπο από ότι οι κλασικοί νευροδιαβιβαστές, ήταν μία εντελώς νέα ιδέα. Το NO είναι νευρορυθμιστής και ορισμένες από τις διαφορές μεταξύ του NO και των κλασικών νευροδιαβιβαστών είναι [ανασκόπηση 45]:

- Εφόσον το NO είναι ασταθές μόριο, δεν αποθηκεύεται σε συναπτικά κυστίδια, αλλά ούτε οπουδήποτε αλλού εκτενώς. Παράγεται κάθε φόρα σύμφωνα με τις ανάγκες, από την NOS
- Δεν απελευθερώνεται με εξωκύττωση αλλά με διάχυση από τη νευρική απόληξη
- Δεν αντιδρά με υποδοχείς, αλλά διαχέεται στα κύτταρα
- Δεν αντιδρά αναστρέψιμα, αλλά σχηματίζει ομοιοπολικούς δεσμούς με στόχους όπως ένζυμα, άλλες πρωτεΐνες ή μη-πρωτεϊνικούς στόχους
- Η απενεργοποίηση του θεωρείται ότι επιτυγχάνεται με διάχυση ή ομοιοπολική σύνδεση σε διάφορα μόρια

Ένας μεγάλος αριθμός μελετών προτείνουν ποικίλους πιθανούς κυτταρικούς στόχους και μηχανισμούς δράσης του NO (Πίνακας 1). Λόγω των ποικίλων κυττάρων-στόχων και των διαφόρων μηχανισμών δράσης του, το NO είναι δυνατόν να αυξήσει αλλά και να ελαττώσει ταυτόχρονα την διεγερσιμότητα των νευρώνων με συνέπεια να είναι δύσκολο να προβλεφτεί το αποτέλεσμα της δράσης του σε μια συγκεκριμένη περιοχή του εγκεφάλου. Η ικανότητα του NO να διαχέεται και να φτάνει στα κύτταρα ταχύτατα και σχετικά εκτενώς δείχνει ότι είναι δυνατό να δρα ακόμη και σε εγκεφαλικές δομές με χαμηλές ποσότητες του αερίου. Η γρήγορη διάχυση του και η δυνατότητα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

<u>Πίνακας 1:</u> Πιθανοί κυτταρικοί στόχοι της δράσης των διάφορων μορφών του NO [162]

Μορφές του NO	Υποθετικοί Κυτταρικοί Στόχοι
NO• (Νιτρικό Οξείδιο)	**Πρωτεΐνες που περιέχουν αίμη** · sGC · NOS · Κυκλοοξυγενάση 1 &2 · Κυτόχρωμα P450 · Αιμοσφαιρίνη και Μυοσφαιρίνη **Ριβοσυλίωση της μονο-διφωσφορικής αδενοσίνης** · GAPDH
NO• + O_2^- → ONOO- (υπεροξυνιτρώδες)	**Πρωτεΐνες με** · Ακονιτάση · Μιτοχονδριακή Ακονιτάση · Αναγωγάση του ριβονουκλεοτίδιου · Μιτοχονδριακό σύμπλεγμα I · Μιτοχονδριακό σύμπλεγμα II · Φεριτίνη & Τρανσφερίνη **Νίτρωση πρωτεϊνών** · SOD · Neurofilammentes · trk υποδοχείς **Αντίδραση με DNA** · Αποαμίνωση του **DNA** · DNA strand breaks · Ενεργοποίηση της PARS
NO• + CM → CM-NO^+ ή CM-NO^-	**Νιτροσυλίωση Πρωτεϊνών** · G πρωτεΐνες/$p21^{ras}$ · NMDA υποδοχείς · Γλουταθειόνη · Πρωτεϊνική Κινάση · GAPDH · Αδενυλική κυκλάση · Οξειδάση της NADPH · Ενεργοποιητής πλασμινογόνου ιστικού τύπου · Soluble (N-ethyl-malemide-Sensitive Fusion Protein) Attachment Protein (SNAP-25) · GAP-43 · Λευκωματίνη

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

του να ρυθμίζει ποικίλα ενδοκυττάρια μονοπάτια και την νευρωνική δραστηριότητα είναι δείκτες ότι το αέριο αυτό είναι ένας διαδεδομένος αγγελιοφόρος στον εγκέφαλο [162].

1.4.1 Νευροπροστατευτική δράση του NO

Διεγερσιμότητα Νευρώνων

Το NO ρυθμίζει τα προκλητά διεγερτικά δυναμικά πεδίου (stimulation-evoked field excitatory potentials, fEPSPs), τα διεγερτικά μετασυναπτικά δυναμικά (excitatory postsynaptic potential, EPSPs) και την ταχύτητα πυροδότησης των νευρώνων, επιφέροντας αλλαγές στη νευρωνική λειτουργία [ανασκόπηση 189]. Η πλειοψηφία των δράσεων του NO εξαρτάται από την σύνθεση του cGMP. Η ενεργοποίηση του ενζύμου sGC, η αύξηση του σχηματισμού του cGMP και η ρύθμιση των πρωτεϊνικών κινάσεων (protein kinase, PK) αποτελούν το κύριο μονοπάτι μετάδοσης σήματος από το NO [219]. Το NO μέσω της αύξησης του cGMP ρυθμίζει εκτός των πρωτεϊνικών κινασών και πολλούς ιοντικούς διαύλους [63, 181]. Το cGMP ασκεί δράση σε δύο οικογένειες πρωτεϊνών: τις φωσφοδιεστεράσες (phosphodiesterases, PDEs) και τους επαγόμενους από κυκλικά νουκλεοτίδια ιοντικούς διαύλους. Οι φωσφοδιεστεράσες τύπου cG-PDE διεγείρονται από το cGMP, εντοπίζονται σε νευρώνες και προκαλούν υδρόλυση της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cyclic adenosine monophosphate, cAMP). Τα ένζυμα αυτά βρίσκονται σε υψηλά επίπεδα στον εγκεφαλικό φλοιό, τον ιππόκαμπο και τα βασικά γάγγλια [227]. Ιοντικοί δίαυλοι που ενεργοποιούνται από το cGMP, βρέθηκαν αρχικά σε αισθητικούς νευρώνες και στη συνέχεια σε νευρώνες του ιππόκαμπου, της παρεγκεφαλίδας, του οσφρητικού βολβού και της υπόφυσης [17, 23, 60, 69]. Επομένως, η

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

διαμόρφωση της νευρωνικής διεγερσιμότητας και πυροδότησης από το NO μέσω των φωσφοδιεστερασών και των ιοντικών διαύλων ίσως αποτελεί ένα διαδεδομένο φαινόμενο στον εγκέφαλο.

Αντι-αποπτωτική Δράση του NO

Το NO είναι δυνατόν να αναστείλει την απόπτωση των νευρώνων με πολλαπλούς μηχανισμούς. Το cGMP θεωρείται ο κύριος διαμεσολαβητής της νευροπροστατευτικής δράσης του NO. Το cGMP ενεργοποιεί την πρωτεινική κινάση G (protein kinase G, PKG). Η πρωτεινική κινάση G είναι ο σημαντικότερος πρωτεϊνικός υποδοχέας για το cGMP. Πιστεύεται λοιπόν, ότι η δράση του cGMP ενάντια στην κυτταρική απόπτωση επιτυγχάνεται μέσω της PKG [113]. Ο μηχανισμός με τον οποίον η τελευταία αναστέλλει τον κυτταρικό θάνατο δεν έχει τεκμηριωθεί ακόμη. Ορισμένες μελέτες προτείνουν ότι το NO συνδέεται λειτουργικά με την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα, cyclic AMP-response element binding protein (CREB) [ανασκόπηση 45]. Οι Lu και συν. έδειξαν ότι η ενεργοποίηση της πρωτεινικής κινάσης G από το NO συνεισφέρει στην αυξημένη φωσφορυλίωση του CREB που παρατηρείται κατά την όψιμη φάση της μακρόχρονης ενδυνάμωσης στον ιππόκαμπο [134]. Επίσης, το NO εμπλέκεται, διαμέσου του ίδιου μηχανισμού, στη διέγερση μιας ακόμη μορφής της συναπτικής πλαστικότητας, την μακρόχρονη ευαισθητοποίηση των αισθητικών νευρώνων της *Aplysia* [125]. Πολλοί είναι επίσης οι ερευνητές που συμφωνούν με την άποψη ότι η φωσφοριλίωση του CREB είναι ένας από τους μηχανισμούς, με τους οποίους το NO ασκεί δράση τόσο στην νευρωνική επιβίωση όσο και στη συναπτική πλαστικότητα (57, 86, 125, 167].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

Η μεσολάβηση του cGMP δεν είναι ο αποκλειστικός μηχανισμός με τον οποίον το NO προκαλεί πολλαπλές και πολύπλοκες βιολογικές αντιδράσεις. Ένας άλλος τρόπος είναι το ίδιο το αέριο να τροποποιήσει άμεσα διάφορες πρωτεΐνες, το DNA και άλλα μόρια του κυττάρου. Η σύνθεση του NO, κατόπιν ενεργοποίησης NMDA υποδοχέων, διεγείρει την Ras/EPK (extracellular signal receptor kinase) οδό που είναι υπεύθυνη για τη ανάπτυξη της ανοχής σε τοξική προσβολή [67, 80]. Ένα ακόμη σημαντικό παράδειγμα άμεσης δράσης του NO είναι η αύξηση της συγκέντρωσης της αντί-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 από την iNOS και από δότες του αερίου στα ενδοθηλιακά κύτταρα [224]. Το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την δράση της Bcl-2 στην απόπτωση ρυθμίζεται και ελέγχεται από το CREB [233]. Κατά συνέπεια, η δράση της ρυθμίζεται από το ίδιο το NO άμεσα αλλά και έμμεσα μέσω του σχηματισμού του cGMP.

Επίσης, το NO επηρεάζει τη γονιδιακή έκφραση στο στάδιο της μεταγραφής [88, 159, 177] και της μετάφρασης [114, 174] με σκοπό την επιβίωση και την προστασία του νευρικού κυττάρου.

Μακρόχρονη Ενδυνάμωση, Μακρόχρονη Εξασθένηση και Συναπτική Πλαστικότητα

Η διεγερσιμότητα των νευρώνων του ΚΝΣ είναι δυνατόν να τροποποιηθεί *in vitro* με ποικίλους τρόπους. Ο πιο δημοφιλής τρόπος είναι η ηλεκτρική διέγερση, η οποία μπορεί να προκαλέσει ενίσχυση ή εξασθένιση των συναπτικών δυναμικών, ανάλογα με την συχνότητα που εφαρμόζεται. Έτσι, αν χρησιμοποιηθεί υψηλή συχνότητα ηλεκτρικής διέγερσης, η ηλεκτρικά προκαλούμενη ενίσχυση του δυναμικού της σύναψης είναι μεγάλης διάρκειας και ονομάζεται μακρόχρονη ενδυνάμωση (long term potentiation, LTP), ενώ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

αντίθετα χαμηλότερες συχνότητες ηλεκτρικής διέγερσης παρατηρείται μακρόχρονη σε εξασθένηση (long term depression, LTD) των συναπτικών δυναμικών [240]. Η μακρόχρονη ενδυνάμωση και η μακρόχρονη εξασθένιση είναι δύο μορφές της συναπτικής πλαστικότητας. Το NO δρα ως ένας παλίνδρομος αγγελιοφόρος που επηρεάζει τη συναπτική διαβίβαση του προσυναπτικού νευρώνα και ενισχύει έτσι την συναπτική πλαστικότητα [ανασκόπηση 189 & 240].

Τα δύο αυτά φαινόμενα της μακρόχρονης ενδυνάμωσης και της μακρόχρονης εξασθένησης, συμβαίνουν, μεταξύ άλλων εγκεφαλικών περιοχών, και στον ιππόκαμπο και επιτυγχάνονται με ενεργοποίηση των υποδοχέων του γλουταμινικού οξέος. Το αποτέλεσμα της ενεργοποίησης αυτών των υποδοχέων είναι η σύνθεση του NO στο μετασυναπτικό κύτταρο [20] και στην συνέχεια ο σχηματισμός του cGMP. Το cGMP είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη της μακρόχρονης ενδυνάμωσης. Έρευνες έχουν δείξει ότι αναστολείς της NOS εμποδίζουν τη μακρόχρονη ενδυνάμωση [20, 166, 207) και οι εξωγενείς δότες του NO την διευκολύνουν (89, 166]. Επίσης οι αναστολείς του ενζύμου sGC, ένας από τους κυριότερους στόχους του NO, προκαλεί εξασθένιση της μακρόχρονης ενδυνάμωσης [15]. Το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε με αναστολείς της πρωτεϊνικής κινάσης G (PKG), της οποίας η δράση ελέγχεται από το cGMP. Αντίθετα, ενεργοποιητές της PKG ενίσχυσαν τη μακρόχρονη ενδυνάμωση [40]. Τα ευρήματα μέχρι τώρα συμφωνούν με τη θεωρία ότι το NO συντίθεται στο μετασυναπτικό νευρώνα, διαχέεται στο εξωκυτταρικό χώρο και καταλήγει μέσω αυτού στις απολήξεις του προσυναπτικού νευρώνα για να διεγείρει την παραγωγή cGMP, ρυθμίζοντας με τον τρόπο αυτό την κυτταρική λειτουργία του προσυναπτικού νευρώνα, γεγονός που οδηγεί στην εμφάνιση LTP [189].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

Υπάρχουν μελέτες οι οποίες δεν επιβεβαιώνουν τον ρόλο του NO στη συναπτική πλαστικότητα της παρεγκεφαλίδας [78, 94, 128] ή του ιππόκαμπου [243]. Μία πιθανή εξήγηση των αντικρουόμενων αυτών μελετών είναι τα γεγονός ότι τουλάχιστον στον ιππόκαμπο και συγκεκριμένα στο CA1 πεδίο του, η ανάπτυξη της μακρόχρονης ενδυνάμωσης είναι ανεξάρτητη από την παρουσία του NO, ενώ το αέριο ελέγχει τη μακρόχρονη ενδυνάμωση σε μεγάλο βαθμό στο στιβάδα πολύμορφων κυττάρων [110, 220]. Τέλος, είναι δυνατόν το NO να παίζει τον φυσιολογικό του ρόλο στη συναπτική πλαστικότητα μέσω μηχανισμών δράσης που είναι ανεξάρτητοι από τον σχηματισμό cGMP [123, 243]

Οι περισσότερες συμπεριφορικές έρευνες έχουν δείξει ότι οι αναστολείς της NOS χορηγούμενες σε υψηλές δόσεις μειώνουν τις επιδόσεις των πειραματόζωων σε μοντέλα μάθησης και μνήμης, ενώ οι δότες του NO την ενισχύουν. Οι μελέτες αυτές προτείνουν ότι το NO εμπλέκεται στο σχηματισμό της μακροχρόνιας μνήμης [104] και επηρεάζει κατά προτίμηση την ανάκληση μνήμης, μια διαδικασία η οποία πιστεύεται ότι σχετίζεται με την ανάπτυξη της μακρόχρονης ενδυνάμωσης [ανασκόπηση 189]. Οι Bernabeu και συν. υποστηρίζουν ότι η δραστικότητα της NOS αυξάνεται κατακόρυφα μετά την εκπαίδευση των πειραματόζωων και επιστρέφει στα φυσιολογικά επίπεδα λίγα λεπτά αργότερα [14]. Οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα, έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι το NO και το cGMP ενισχύουν την συναπτική πλαστικότητα σε πολλές εγκεφαλικές περιοχές όπως ο ιππόκαμπος, η αμυγδαλή, ο εγκεφαλικός φλοιός, το ραβδωτό σώμα και η παρεγκεφαλίδα. Επίσης πιστεύεται ότι η nNOS και η eNOS εμπλέκονται στη φυσιολογική αυτή λειτουργία [189].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

1.4.2 Νευροεκφυλιστική Δράση του NO

Ο ρόλος του NO στις διαδικασίες της μάθησης και της μνήμης είναι αντιφατικός. Μια σειρά από μελέτες προτείνουν ότι το αέριο παρουσιάζει νευροεκφυλιστική ή νευροπροστατευτική δράση, ανάλογα τη μορφή με την οποία δρα το αέριο. Πιστεύεται ότι ο μηχανισμός δράσης του NO, που δεν εμπλέκει τον σχηματισμό του cGMP, σχετίζεται με την τοξικότητα του αερίου [ανασκόπηση 45 & 162].

Η χαμηλότερη, από τα φυσιολογικά όρια, συγκέντρωση του NO ή η υπερβολική παραγωγή του μπορεί να είναι εξίσου επικίνδυνη στην πρόκληση βλάβης της γνωστικής λειτουργίας. Οι στόχοι και οι μηχανισμοί του NO που ευθύνονται για την πρόκληση νευροτοξικότητας είναι παρόμοιοι με αυτούς της φυσιολογικής του λειτουργίας. Η νευροτοξικότητα του οφείλεται σε: 1) παραγωγή νιτρογονών, νιτροζοποίηση και απελευθέρωση ελευθέρων ριζών 2) S-νιτροσιλίωση των πρωτεϊνικών σουλφυδρυλομάδων και νίτρωση φαινολικών υπολειμμάτων, 3) υπεροξείδωση των λιπιδίων 4) βλάβη του DNA 5) βλάβη του μιτοχονδρίου 6) νευρωνικό θάνατο και 7) φλεγμονή. Οι μηχανισμοί νευροτοξικότητας του NO περιγράφονται παρακάτω ως γενικές λειτουργίες του αερίου [ανασκόπηση 45].

Βλάβη του DNA

Το NO είναι δυνατόν να δρα με τη μορφή της ελεύθερης ρίζας, του υπεροξυνιτρώδους ή σε ιονισμένη κατάσταση. Έχει παρατηρηθεί ότι η περίσσεια του NO, μέσω του σχηματισμού του υπεροξυνιτρώδους, επιφέρει μονόκλωνα κοψίματα στο DNA [202, 244]. Η βλάβη αυτή του DNA έχει ως συνέπεια την ενεργοποίηση της πολύ(διφωσφορική αδενοσίνη-ριβόζη)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

πολυμεράσης (poly(ADP-ribose)polymerase PARP), ένζυμο σημαντικό για την αποκατάσταση του DNA. Η αυξημένη ενεργοποίηση του ενζύμου προκαλεί υπερβολική κατανάλωση ATP και ενεργειακό έλλειμμα στο κύτταρο [46, 252]. Η βλάβη του DNA προκαλεί επίσης αύξηση της πρωτεΐνης p53 η οποία δρα ως καταστολέας νεοπλάσματος αλλάζοντας έτσι το ρυθμό εκφύλισης των κυττάρων [188]. Οι αλλοιώσεις αυτές που προκαλούν οι διάφορες μορφές του NO, έχουν παρατηρηθεί στον ισχαιμικό εγκέφαλο [61, 100] στη νόσο του Alzheimer [213], στην πολλαπλή σκλήρυνση [133] και στην εκφύλιση των κινητικών νευρώνων [129]. Πρόσφατη μελέτη έδειξε επιπλέον ότι το μιτοχονδριακό DNA είναι πιο ευαίσθητο από το πυρηνικό στη δράση του NO [6].

Υπεροξείδωση των Λιπιδίων της Κυτταρικής Μεμβράνης

Η υπεροξείδωση των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης περιλαμβάνει αλυσιδωτές αντιδράσεις που επιφέρουν την οξείδωση των φωσφολιπιδίων σε υπεροξείδια [98]. Προκαλεί βλάβη στους μεμβρανικούς μεταφορείς, διαταραχή της ομοιόστασης των ιόντων, απώλεια της ακεραιότητας της μεμβράνης, σχηματισμό πόρων διέλευσης (permeability transition pore PTP) στα μιτοχόνδρια, και κυτταρικό θάνατο [ανασκόπηση 139]. Επίσης η υπεροξείδωση των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό δευτερευόντων προϊόντων όπως κυτταροτοξικές αλδεΰδες που αντιδρούν με πρωτεΐνες της μεμβράνης [98, 136]. Το NO πιστεύεται ότι προκαλεί αλλά και αναστέλλει την υπεροξείδωση των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης. Συγκεκριμένα όταν το NO αντιδρά με υπεροξείδιο για να σχηματίσει υπεροξυ-νιτρώδες επιφέρει υπεροξείδωση των λιπιδίων [49, 195]. Από την άλλη μεριά, το NO είναι ισχυρός αναστολέας των αλυσιδωτών αντιδράσεων που καταλήγουν σε υπεροξείδωση των λιπιδίων της μεμβράνης

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

[201] και απομακρύνει ελεύθερες ρίζες υδροξυλίων που ευθύνονται για την έναρξη των αντιδράσεων αυτών [109]. Μελέτες έδειξαν ότι η υπεροξείδωση των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης από το υπεροξυνιτρώδες, εμπλέκεται στον παθογενετικό μηχανισμό της πρεσενιλίνης 1 στη νόσο του Alzheimer [85] και στην εκφύλιση των νευρώνων στη μυοτροπική παράπλευρη σκλήρυνση [118].

Αντιδράσεις με Πρωτεΐνες

Το NO και το υπεροξυνιτρώδες αντιδρούν με τις σουλφυδρυλικές ομάδες της λυσίνης, της μεθειονίνης, της κυστιδίνης και κυρίως της κυστεΐνης και σχηματίζουν S-νιτρωσυλιωμένα παράγωγα, αλλάζοντας έτσι τη δομή και/ή την δραστικότητα πολλών πρωτεϊνών με τρόπο παρόμοιο με αυτόν της φωσφορυλίωσης ή της ακετυλίωσης [85, 106]. Πολλές πρωτεΐνες είναι δυνατόν να νιτροσυλιωθούν [106], όπως είναι η H-ras [119], η αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΰδης [106], η πρωτεϊνική κινάση C [82], οι καασπάσες [226], η τρανσγλουταμινάση ιστικού τύπου [85], και οι NR1 και NR2 υπομονάδες των NMDA υποδοχέων (41, 85]. Η νιτρωσυλίωση έχει ποικίλες δράσεις στην νευρωνική λειτουργία και έτσι είναι δυνατό: 1) να μειώσει την δραστικότητα των καασπασών, αποτρέποντας έτσι την απόπτωση [113, 146, 226], 2) να ελαττώσει την νευροτοξικότητα που σχετίζεται με υπερβολική διέγερση των NMDA υποδοχέων [124] αλλά και 3) να επιφέρει νευρωνική απόπτωση μέσω της ενεργοποίησης των μεταλλοπρωτεϊνασών της θεμέλιας ουσίας [85] και της απενεργοποίησης του πρωτεασώματος [90]. Το υπεροξυνιτρώδες είναι επίσης ικανό να προκαλέσει νίτρωση σε ετεροκυκλικές ενώσεις όπως η τρυπτοφάνη και η γουανίνη ή σε φαινόλες όπως την τυροσίνη [111, 117]. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι η νίτρωση της τυροσίνης είναι ιδιαίτερα επικίνδυνη [116]. Το υπεροξυνιτρώδες

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

ενεργοποιεί τις πρωτεΐνες JNK και p38 οι οποίες διαδραματίζουν θεμελιώδη ρόλο στην απόπτωση αλλά και την ERK1/2 που δρα νευροπροστατευτικά [246]. Νίτρωση έχει παρατηρηθεί στην φυσιολογική γήρανση [216] καθώς επίσης και σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Η παρουσία της νιτροτυροσίνης έχει καταδειχτεί στη νόσο του Alzheimer [218] και στα σώματα του Lewy στη νόσο του Parkison [81].

Βλάβη στα Μιτοχόνδρια

Η βλάβη των μιτοχονδρίων θεωρείται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες και πιστεύεται ότι οι διάφορες μορφές του NO εμπλέκονται στην πρόκληση της βλάβης αυτής [ανασκόπηση 27]. Πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις του NO εμποδίζουν την αναπνοή του μιτοχονδρίου αναστέλλοντας την κυτοχρωμική οξειδάση C. Ακόμη το NO ανταγωνίζεται το οξυγόνο για την ίδια θέση πρόσδεσης στην ανηγμένη μορφή της αίμης a_3, όπως έδειξαν μελέτες σε μιτοχόνδρια, συναπτοσώματα και κύτταρα [22, 26, 28, 42]. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις το NO αναστέλλει το κυτοχρωμικό σύμπλεγμα bc_1 [187]. Το υπεροξυνιτρώδες αναστέλλει μόνιμα την μιτοχονδριακή αναπνοή σε πολλά στάδια [195, 196]. Χαμηλές συγκεντρώσεις του υπεροξυνιτρώδους και μόνο πολύ υψηλές συγκεντρώσεις του NO παρακωλύουν την μιτοχονδριακή αναπνοή παρεμποδίζοντας τη δράση της ακονιτάσης [38, 228] Ακόμη, πιστεύεται ότι το υπεροξυνιτρώδες προκαλεί άνοιγμα PTP πόρων στις μιτοχονδριακές μεμβράνες [171, 172]. Το άνοιγμα των PTP πόρων εμπλέκεται στην απόπτωση και στη νέκρωση των κυττάρων γιατί έχει ως συνέπεια έξοδο ασβεστίου, διόγκωση του μιτοχονδρίου, εκπόλωση της μεμβράνης τους και απελευθέρωση του κυτοχρώματος C [202, 250]. Η έκκριση του κυτοχρώματος C και άλλων πρωτεϊνών προκαλούν

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

κυτταρικό θάνατο [250]. Ο μηχανισμός με τον οποίο το υπεροξυνιτρώδες επιφέρει το άνοιγμα PTP πόρων δεν είναι κατανοητός [27].

Φλεγμονή

Η φλεγμονή είναι ένας ενεργός μηχανισμός άμυνας του οργανισμού ενάντια στις διάφορες προσβολές. Τα μακροφάγα και τα πολύμορφα λευκοκύτταρα παράγουν NO σε περίπτωση φλεγμονής ή άλλων ανοσολογικών αντιδράσεων. Ο ρόλος αυτών των κυττάρων είναι εκτεταμένος και σκοπός είναι η καταστροφή των ξένων κυττάρων ή κυττάρων που έχουν υποστεί βλάβη. Οι διαδικασίες αυτές περιλαμβάνουν την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων NO οι οποίες είναι κυτταροτοξικές [1]. Τα ενεργά κύτταρα γλοίας εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες NO μετά από ενεργοποίηση της iNOS [7]. Οι νευρώνες είναι ευαίσθητοι στα υψηλά επίπεδα του αερίου, σε αντίθεση με τα κύτταρα της γλοίας [21]. Ο μηχανισμός με τον οποίο το NO προκαλεί νευρωνικό θάνατο πιθανόν περιλαμβάνει διεγερτοτοξικής έκκριση γλουταμινικού οξέος και βλάβη στα μιτοχόνδρια [ανασκόπηση 45]. Ακόμη έχει παρατηρηθεί ότι η δράση αυτή του NO εξαρτάται από την ωρίμαση των νευρώνων και την έκφραση των NMDA υποδοχέων [79].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

1.5 Δράση του NO στις Ψυχιατρικές Ασθένειες

Όπως αναφέρεται παρακάτω το NO ρυθμίζει την έκκριση πολλών νευροδιαβιβαστών όπως της σεροτονίνης, της νοραδρεναλίνης και της ντοπαμίνης. Οι νευροδιαβιβαστές αυτοί έχουν μελετηθεί εκτενώς για τον ρόλο τους στην κατάθλιψη. Επίσης η nNOS απαντάται σε περιοχές του εγκεφάλου που σχετίζονται με την κατάθλιψη και το άγχος [ανασκόπηση 142]. Ο Volke και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι ο αναστολέας της NOS, 7-NI, έχει αντικαταθλιπτική και αγχολυτική δράση [232]. Υπάρχουν, και άλλες μελέτες που συμφωνούν με την αγχολυτική δράση του αναστολέα 7-NI [58, 115]. Επίσης πολλοί μελετητές θεωρούν το NO ως μια πρωτοποριακή προσέγγιση της θεραπείας της σχιζοφρένειας. Η φαινκυκλιδίνη είναι ανταγωνιστής των NMDA υποδοχέων και χρησιμοποιείται συχνά σε πειραματικά πρότυπα μελέτης της σχιζοφρένειας σε μύες και επίμυες. Ο Bujas-Bobanovic και συν. έδειξαν ότι οι δότες του NO ανταγωνίζονται την ισχυρή ψυχοσεωμιμητική δράση της φαινκυκλιδίνης [30]. Ακόμη είναι αξιοσημείωτο να αναφερθεί ότι έχει βρεθεί χαμηλή συγκέντρωση της cNOS σε εγκεφάλους ασθενών που απεβίωσαν, οι οποίοι έπασχαν από σχιζοφρένεια και κατάθλιψη [247].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

1.6 Δράση του NO στην Περιφέρεια

Οι ιδιότητες του NO και η ευρεία κατανομή του, επιτρέπουν τη δράση του αερίου σε διάφορα λειτουργικά συστήματα όπως ενδοκρινικό, ουροποιητικό κ.α.

1.6.1 Ενδοκρινικό Σύστημα

Υπάρχουν ενδείξεις ότι το NO εμπλέκεται στη ρύθμιση του υποθάλαμο-υποφυσιο-επινεφριδικού άξονα είτε έμμεσα με τη μεσολάβηση άλλων νευρορυθμιστών ή άμεσα δρώντας στον υποθάλαμο αυξάνοντας την έκκριση της εκλυτικής ορμόνης της κορτικοτροπίνης (Corticotrophin Releasing Hormone, CRH). Η παρατήρηση ότι ο αναστολέας της NOS, L-NAME, ανταγωνίζεται την αύξηση της αδρενοκορτικοτροπινής (Adrenocorticotrophin Hormone, ACTH) που προκαλείται από χορήγηση ωκυτοκίνης υποδηλώνει ότι το NO έχει ενδοκρινική-ανοσοποιητική δράση στον υποθάλαμο-υποφυσιο-επινεφριδικό άξονα. Επίσης, είναι πιθανό να ρυθμίζει την έκκριση της εκλυτικής ορμόνης της γοναδοτροπίνης (Gonadotropin Releasing Hormone, GnRH) και να εμπλέκεται έτσι άμεσα στις διαδικασίες ωορρηξίας [ανασκόπηση 162].

1.6.2 Παρασυμπαθητικό Σύστημα

Το NO ως νευρορυθμιστής παρουσιάζει τις παρακάτω δράσεις:

- Ρυθμίζει άμεσα την στύση [32]
- Προκαλεί χάλαση των λείων μυών του γαστρεντερικού σωλήνα [54, 249]
- Ρυθμίζει την χάλαση των αιμοφόρων αγγείων [73]

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

1.6.3 Αιμοποιητικό Σύστημα

Η διαδικασία δημιουργίας θρόμβου έχει ως έναρξη την μετατροπή του αραχιδονικού οξέος σε προσταγλανδίνη H_2 με τη μεσολάβηση του ενζύμου κυκλοοξυγενάση. Στη συνέχεια, η προσταγλανδίνη H_2 μεταβολίζεται σε θρομβοξάνη A_2 προσδένεται σε υποδοχείς των αιμοπεταλίων προκαλώντας την έκκριση και άλλων ουσιών που επιφέρουν τελικά τη συσσώρευση αιμοπεταλίων [101]. Το NO ενεργοποιεί την κυκλοοξυγενάση, αυξάνοντας με τον τρόπο αυτό την παραγωγή της προσταγλαδίνης H_2 και προάγοντας την περαιτέρω συσσώρευση των αιμοπεταλίων [203].

1.6.4 Κατανάλωση Τροφής

Το NO φαίνεται να επηρεάζει την κατανάλωση τροφής είτε με την μεσολάβηση κεντρικών νευροδιαβιβαστικών συστημάτων [162] είτε περιφερικά (π.χ. προκαλώντας χάλαση των λείων μυών του γαστρεντερικού σωλήνα) είτε με συνδυασμό των δύο αυτών μηχανισμών. Χορήγηση του αναστολέα της NOS, L-NNA, προκαλεί δόσο-εξαρτώμενη ελάττωση της κατανάλωσης τροφής σε νηστικούς μύες [156-158].

1.6.5 Νεοπλασία

Παρά το γεγονός ότι το NO είναι κυτταροτοξικό σε καρκινικά κύτταρα, δύναται να δράσει και ως καρκινογόνο. Το NO, υπό φυσιολογικές συνθήκες, μπορεί να μετατρέψει φυσικές δευτεροταγείς αμίνες σε καρκινογόνους N-νιτρωδοενώσεις [33]. Οι Wink και συν. έδειξαν ότι το NO προκαλεί μεταλλαξηγένεση στην *salmonella typhimurium* μετατρέποντας την 5-μεθυλο-

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

κυτοσίνη σε θυμίνη [245]. Ομοίως το NO επιφέρει μεταλλάξεις σε καλλιέργεια ανθρώπινων κυττάρων. Οι φυσιολογικές καταστάσεις υπό τις οποίες το NO δρα προ- ή αντι-καρκινικά δεν έχουν προσδιοριστεί επακριβώς μέχρι σήμερα [1].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

1.7 Ρύθμιση της Απελευθέρωσης των Νευροδιαβιστών από το NO

Η συνήθης προσέγγιση για την διερεύνηση του NO ως νευρορυθμιστή γίνεται μελετώντας τον τρόπο με τον οποίο οι δότες του NO ή οι αναστολείς της NOS επηρεάζουν την απελευθέρωση ενός νευροδιαβιβαστή.

Οι μηχανισμοί με τους οποίους το NO επηρεάζει την απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών δεν έχουν διερευνηθεί πλήρως. Πιστεύεται ότι το αέριο δρα στις 'δεξαμενές' των συναπτικών κυστιδίων. Επίσης, η δράση του στη νευροδιαβίβαση πιθανόν εμπλέκει ενεργοποίηση του cGMP το οποίο στη συνέχεια διεγείρει την δράση πρωτεϊνικών κινασών που προκαλούν φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών του συναπτικού κυστιδίου και σύντηξή του στην κυτταρική μεμβράνη ή ενεργοποιεί κατιοντικών διαύλων με ανάλογο αποτέλεσμα [96, 154].

1.7.1 Ακετυλοχολίνη (Acetylcholine, Ach)

Μελέτες που χρησιμοποίησαν τις μεθόδους *in vivo* push-pull υπερδιάχυση και μικροδιαπήδησης, έδειξαν ότι αναστολείς της NOS μειώνουν την απελευθέρωση της ακετυλοχολίνη στον βασικό πρόσθιο εγκέφαλο [194] και τον επικλινή πυρήνα του διαφράγματος [190, 191, 193]. Τα ευρήματα αυτά προτείνουν ότι η χολινεργική διαβίβαση στο βασικό πρόσθιο εγκέφαλο και στο κοιλιακό ραβδωτό σώμα αυξάνεται από το ενδογενές NO. Χορήγηση δοτών του NO επίσης αυξάνει την απελευθέρωση ακετυλοχολίνης στο ραχιαίο ραβδωτό σώμα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

Οι Lonart και συν. έδειξαν, ότι ο δότης του NO, υδροξυλαμίνη αυξάνει την έκκριση της ^{3}[H]ακετυλοχολίνης in vitro σε τομές ιππόκαμπου με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο [130]. Όλες οι έρευνες, *in vivo* και *in vitro*, συμφωνούν ότι το NO αυξάνει την έκκριση αυτού του νευροδιαβιβαστή στον εγκέφαλο [189].

Πειράματα με την τεχνική της υπερδιάχυσης έδειξαν ότι η απελευθέρωση της ακετυλοχολίνης στο βασικό πρόσθιο εγκέφαλο αυξάνεται μετά από χορήγηση δοτών του NO, DEA/NO και λινσιδομίνη. Η δράση του NO φαίνεται να οφείλεται στον σχηματισμό cGMP μια και η παρουσία του αναστολέα της sGC, LY-83,583 αναστέλλει την επαγόμενη από το αύξηση της ακετυλοχολίνης [193]. Η επαγόμενη από τους ίδιους δότες του NO απελευθέρωση της ακετυλοχολίνης στον επικλινή πυρήνα του διαφράγματος επίσης εξασθενεί όταν προηγείται υπερδιάχυση των αναστολέων της sGC, LY-83,583 και ODQ [190, 194]. Πειράματα μικροδιαπήδησης έδειξαν ότι η έκκριση της ακετυλοχολίνης στο ραβδωτό σώμα διεγείρεται ποσοτικά ανάλογα με ουσίες που έχουν χημική ομοιότητα με το cGMP [87]. Όλα τα παραπάνω ευρήματα συνηγορούν ότι η επαγόμενη από το NO απελευθέρωση του νευροδιαβιβαστή γίνεται με τη μεσολάβηση του cGMP.

Μελέτες *in vivo* και *in vitro*, προτείνουν ότι το NO αυξάνει την απελευθέρωση του γλουταμινικού οξέος σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού [190, 215]. Οι Prast και συν., σύμφωνα με τα πειράματα τους, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το ενδογενές NO δεν επηρεάζει άμεσα την απελευθέρωση της ακετυλοχολίνης από τους χολινεργικούς νευρώνες αλλά έμμεσα μέσω διέγερσης των γειτονικών νευρώνων που ενεργοποιούνται με αμινοξέα, οι οποίοι με τη σειρά τους αυξάνουν την απελευθέρωση της ακετυλοχολίνης. Το γλουταμινικό οξύ είναι

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

πιθανό να παίζει σημαντικό ρόλο στην αύξηση της απελευθέρωσης της ακετυλοχολίνης από το NO στο κοιλιακό ραβδωτό σώμα [190]. Το NO διεγείρει την απελευθέρωση του γλουταμινικού οξέος. Η παρατήρηση ότι οι χολινεργικοί νευρώνες δεν παρουσιάζουν το σύστημα του cGMP αλλά η απελευθέρωση της ακετυλοχολίνης αυξάνεται από το NO συνηγορεί στην άποψη αυτή [231].

Η αύξηση της απελευθέρωσης της ακετυλοχολίνης που επάγεται από το NO ελέγχεται επίσης από τους παρακείμενους GABAεργικούς νευρώνες. Χαμηλές συγκεντρώσεις του δότη του NO, DEA/NO (20-200 μmol/l), αυξάνουν την απελευθέρωση της ακετυλοχολίνης, ενώ υψηλές (500 μmol/l) την ελαττώνουν. Ο ανταγωνιστής του GABAεργικού υποδοχέα, βικουκουλίνη, δεν αυξάνει μόνο την απελευθέρωση της ακετυλοχολίνης αλλά ανταγωνίζεται επίσης την εξασθένιση που επάγει η υψηλή δόση του DEA/NO. Οπότε η ελάττωση της απελευθέρωσης της ακετυλοχολίνης από την χορήγηση υψηλής δόσης DEA/NO οφείλεται στην ενεργοποίηση των GABAεργικών υποδοχέων [190]. Η άποψη αυτή συμφωνεί με την παρατήρηση ότι το NO αυξάνει την έκκριση του GABA [87].

1.7.2 Διεγερτικά και Ανασταλτικά Αμινοξέα

Πολλοί ερευνητές έχουν δείξει ότι οι δότες του NO, όπως η λινσιδομίνη, η SNAP και η υδροξυλαμίνη και το NO ως αέριο, αυξάνουν την απελευθέρωση του γλουταμινικού οξέος, ενώ οι αναστολείς του NOS και ο δότης SNAP την ελαττώνουν [87, 180, 192, 225]. Παρόλα αυτά, η δράση των δοτών του NO στην εκκρινόμενη ποσότητα του γλουταμινικού οξέος εξαρτάται από την ενδογενή συγκέντρωση του NO στον ιστό. Χαμηλές συγκεντρώσεις των δοτών SNAP και υδροξυλαμίνη μειώνουν την έκκριση του γλουταμινικού

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

οξέος στον ιππόκαμπο και στα συναπτοσώματα του ιππόκαμπου αντίστοιχα, ενώ υψηλές την αυξάνουν [208, 211]

Πιστεύεται ότι το cGMP εμπλέκεται στην ρύθμιση της έκκρισης του γλουταμινικού οξέος από το NO. Η μειωμένη εξωκύττωση του γλουταμινικού οξέος ως απάντηση στην μείωση της συγκέντρωσης του NO στις νευρικές απολήξεις του ιππόκαμπου και του εγκεφαλικού φλοιού συνοδεύεται από αύξηση των επιπέδων του cGMP, κάτι που έρχεται σε αντίθεση με την κλασσική σχέση NO-cGMP [211]. Μελέτες όμως έδειξαν ότι η χρήση αναλόγων του cGMP σε υψηλές συγκεντρώσεις ανατρέπει την εξασθενημένη έκκριση του γλουταμινικού οξέος και προτείνουν ότι το cGMP έχει διφασική δράση. Θεωρείται ότι η αύξηση της εκκρινόμενης ποσότητας του γλουταμινικού οξέος πραγματοποιείται με την μεσολάβηση τόσο υψηλών όσο και χαμηλών επιπέδων του cGMP [189].

Το NO ρυθμίζει επίσης την απελευθέρωση των ανασταλτικών αμινοξέων. Η έκκριση του GABA εξαρτάται από την ενδογενή συγκέντρωση του NO. Χαμηλές συγκεντρώσεις του αναστολέα L-NAME αυξάνουν, ενώ χαμηλές συγκεντρώσεις του δότη SNAP ελαττώνουν την ποσότητα του GABA που απελευθερώνεται στον ιππόκαμπο. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει ότι το NO ελαττώνει την έκκριση του αμινοξέος όταν βρίσκεται σε συγκέντρωση που κυμαίνεται στα βασικά επίπεδα του NO. Αντιθέτως, υψηλές συγκεντρώσεις του SNAP αυξάνει την απελευθέρωση του αμινοξέος [189].

Όλα τα παραπάνω ευρήματα καταλήγουν στην ιδέα ότι τα χαμηλά επίπεδα του NO στον ιστό μειώνουν την έκκριση των διεγερτικών και των ανασταλτικών αμινοξέων, ενώ τα υψηλά την αυξάνουν [189].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

1.7.3 Κατεχολαμίνες

Έχουν γίνει πολλές μελέτες σχετικά με τον ρόλο που διαδραματίζει το NO στην έκκριση των κατεχολαμινών, ντοπαμίνη και νοραδρεναλίνη. Παρά το γεγονός ότι τα ευρήματα πολλών ερευνών δεν συμφωνούν μεταξύ τους, όλες οι μελέτες υποστηρίζουν αναμφισβήτητα την άποψη ότι το ενδογενές NO ρυθμίζει την έκκριση των δύο αυτών κατεχολαμινών.

Είναι δύσκολο να τεκμηριωθεί αν η έκκριση της ντοπαμίνης αυξάνεται ή ελαττώνεται από το NO γιατί τα αποτελέσματα των ερευνών είναι αντιφατικά. Κάποιες μελέτες έδειξαν ότι οι δότες του NO αυξάνουν [87, 161] ενώ άλλες ότι μειώνουν την απελευθέρωση της ντοπαμίνης [87,253]. Στις περισσότερες περιπτώσεις η L-αργινίνη βρέθηκε ότι αυξάνει την απελευθέρωση αυτού του νευροδιαβιβαστή [131, 212, 238 253]. Ο West και οι συνεργάτες του παρατήρησαν ότι ο αναστολέας της nNOS, 7-NI, ανταγωνίζεται την αύξηση της εκκρινόμενης ντοπαμίνης από την L-αργινίνη [239]. Παρόλα αυτά ο Silva και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η L-αργινίνη έχει διφασική δράση: χαμηλές συγκεντρώσεις της L-αργινίνης ελαττώνουν πρόσκαιρα την έκκριση της ντοπαμίνης ενώ υψηλές συγκεντρώσεις επιφέρουν σταθερά αυξανόμενη έκκριση. Οι ίδιοι οι ερευνητές έδειξαν ακόμη ότι το 7-NI δεν επηρεάζει τις αλλαγές που προκαλεί η L-αργινίνη στην ποσότητα της ντοπαμίνης [212]. Οι λόγοι για τα αντικρουόμενα αποτελέσματα δεν είναι ξεκάθαροι. Εντούτοις, *in vitro* μελέτες σε τομές ραβδωτού σώματος έδειξαν ότι το NO αυξάνει την έκκριση της ντοπαμίνης [29].

Έχει τεκμηριωθεί ότι τα διεγερτικά αμινοξέα αυξάνουν την απελευθέρωση της ντοπαμίνης στο ραβδωτό σώμα, μέσω της διέγερσης των NMDA υποδοχέων τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* [168, 210]. Η παρατήρηση ότι

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

ανταγωνιστές των NMDA υποδοχέων ελαττώνουν σημαντικά την αύξηση της εκκρινόμενης ντοπαμίνης που προκλήθηκε από τον δότη του NO, SNP, προτείνει ότι το NO ρυθμίζει την έκκριση της κατεχολαμίνης αυτής με την μεσολάβηση των NMDA υποδοχέων [161, 168]. Επίσης, οι ανταγωνιστές των NMDA υποδοχέων μειώνουν την απελευθέρωση της ντοπαμίνης που επιφέρει η L-αργινίνη. Πιστεύεται λοιπόν, ότι το ενδογενές NO αυξάνει την απελευθέρωση της κατεχολαμίνης στο ραβδωτό σώμα μέσω της διέγερσης των νευρώνων από το γλουταμινικό οξύ, όπως περιγράφηκε για την ακετυλοχολίνη. Στην ίδια μελέτη διαπιστώθηκε ότι υψηλές συγκεντρώσεις της L-αργινίνης ανταγωνίζονται την απελευθέρωση της ντοπαμίνης που προκλήθηκε μέσω ενεργοποίησης των NMDA υποδοχέων. Σύμφωνα με αυτήν την παρατήρηση, η σύνθεση μεγάλων ποσοτήτων του NO είναι δυνατόν να επηρεάσει την λειτουργία των NMDA υποδοχέων με αρνητική παλίνδρομη ανατροφοδότηση ή να αυξήσει την απελευθέρωση του GABA [239].

Οι δότες του NO αυξάνουν την απελευθέρωση τόσο της ντοπαμίνης όσο και της νοραδρεναλίνης στον ιππόκαμπο *in vivo* και *in vitro* [189]. Η αύξηση της απελευθέρωσης της νοραδρεναλίνης διεγείρεται από το NMDA, τους δότες του NO ή την L-αργινίνη [107, 122, 222], ενώ οι αναστολείς της NOS ασκούν αντίθετη δράση [107].

1.7.4 Ισταμίνη

Το πρόσθιο τμήμα του υποθαλάμου παρουσιάζει μεγάλη πυκνότητα νευρώνων πλούσιων σε ισταμίνη [235, 236, 241] καθώς και νευρώνων που περιέχουν NOS [200, 229]. Ο Prast και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι δότες του NO μειώνουν την απελευθέρωση της ισταμίνης, σε αντίθεση με τους αναστολείς του που την αυξάνουν. Πιστεύεται ότι η απελευθέρωση της ισταμίνης

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

ελέγχεται από το NO το οποίο φαίνεται ότι συντίθεται μόνιμα στους νευρώνες του υποθαλάμου [189].

Φυσιολογικές συνθήκες	**Μετά τον αποκλεισμό των M1 υποδοχέων**
NO	
↓	
Έκκριση γλουταμινικού οξέος	
↓	
Έκκριση ακετυλοχολίνης	
↓	
Διέγερση M_1 υποδοχέων	διέγερση NMDA υποδοχέων
↓	↓
Ελάττωση της έκκρισης της ισταμίνης	Αύξηση της έκκρισης της ισταμίνης

<u>Εικόνα 3:</u> Ρύθμιση της απελευθέρωσης της Ισταμίνης από το NO

Η μείωση της απελευθέρωση της ισταμίνης που προκαλείται από το NO είναι πιθανόν να οφείλεται στην μεσολάβηση ενός άλλου νευροδιαβιβαστή. Όπως προαναφέρθηκε, το NO αυξάνει την απελευθέρωση της ακετυλοχολίνης. Η ακετυλοχολίνη αναστέλλει την έκκριση της ισταμίνης διεγείροντας τους μουσκαρινικούς υποδοχείς τύπου M_1 στους νευρώνες της ισταμίνης. Ο αποκλεισμός των M_1 υποδοχέων με ατροπίνη, αντιστρέφει την ανασταλτική δράση της λινσιδομίνης στην απελευθέρωση της ισταμίνης. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει ότι το NO ασκεί διπλή επιρροή στην εκκρινόμενη ποσότητα της ισταμίνης: η ελάττωση στην απελευθέρωση της ισταμίνης που επιφέρει το

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

NO οφείλεται στην ακετυλοχολίνη που εκλύεται από τους παρακείμενους χολινεργικούς νευρώνες, ενώ η αύξηση της μετά τον αποκλεισμό των M_1 υποδοχέων οφείλεται στη δράση του γλουταμινικού οξέος [ανασκόπηση 189].

Πράγματι, το γλουταμινικό οξύ [169], όπως και το NMDA και το καϊνικό οξύ αυξάνουν την απελευθέρωση της ισταμίνης στον υποθάλαμο [189]. Αντίθετα, ο αποκλεισμός των NMDA υποδοχέων ελαττώνει την απελευθέρωση [169]. Συνεπώς, η απελευθέρωση της ισταμίνης είναι δυνατόν να ρυθμίζεται από την ενεργοποίηση των NMDA αλλά και των υποδοχέων του AMPA/καϊνικού οξέος. Όλα αυτά τα ευρήματα συναινούν στην άποψη ότι το γλουταμινικό οξύ είναι υπεύθυνο για την αύξηση της απελευθέρωσης της ισταμίνης από δότες του NO μετά τον αποκλεισμό των M_1 υποδοχέων [189] (Εικόνα 3).

1.7.5 Σεροτονίνη (5-hydroxytryptamine, 5-HT)

Οι δότες του NO και η L-αργινίνη αυξάνουν την απελευθέρωση της σεροτονίνης στο ραβδωτό σώμα [87] και στον μέσο οπτικό λοβό, αντίστοιχα [131]. Ο Kaehler και οι συν. έδειξαν ότι οι δότες του NO, λινσιδομίνη, DEA/NO, SNAP, SNOG και SNP επηρεάζουν την απελευθέρωση του νευροδιαβιβαστή διφασικά δηλαδή η διάχυση χαμηλών συγκεντρώσεων δοτών αυτών του NO στον υποθάλαμο μειώνουν την ποσότητα της σεροτονίνης που απελευθερώνεται, ενώ οι υψηλές συγκεντρώσεις προκαλούν το αντίθετο αποτέλεσμα. Επίσης, έδειξαν ότι αναστέλλοντας τον σχηματισμό του cGMP η αυξημένη απελευθέρωση και η μειωμένη απελευθέρωση της σεροτονίνης από την διάχυση υψηλών και χαμηλών συγκεντρώσεων δοτών του NO αντίστοιχα ανατρέπεται. Θεωρείται λοιπόν ότι η διφασική δράση του NO επιτυγχάνεται μέσω του cGMP [108].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

In vitro [214] και *in vivo* [112] μελέτες έδειξαν ότι η απελευθέρωση της σεροτονίνης ελέγχεται από τους NMDA και AMPA/καϊνικού οξέος υποδοχείς. Η παρατήρηση αυτή προτείνει ότι η επαγόμενη απελευθέρωση του γλουταμινικού οξέος είναι υπεύθυνη για τη δράση του NO στην απελευθέρωση της σεροτονίνης.

Η επίδραση του NMDA, του AMPA και του καϊνικού οξέος εξετάστηκαν *in vivo* στην ραφή όπου εντοπίζονται τα σώματα σερετονονινεργικών νευρώνων [214] και NOS [181, 200, 248]. Το NMDA προκαλεί αύξηση στην έκκριση της σεροτονίνης, την οποία αναστέλλει ο ανταγωνιστής των NMDA υποδοχέων, το AP5. Ομοίως με το NMDA, το AMPA και το καϊνικό οξύ αυξάνουν την απελευθέρωση του νευροδιαβιβαστή. Ο ανταγωνιστής των AMPA/καϊνικού οξέος υποδοχέων, DNQX, δεν ανταγωνίζεται μόνο την παραπάνω δράση των αγωνιστών αλλά επίσης προκαλεί συνεχή μείωση της βασικής απελευθέρωσης της σεροτονίνης. Επίσης η δράση του NMDA στην απελευθέρωση της σεροτονίνης δεν επηρεάζεται από την τετροδοτοξίνη. Τα ευρήματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η απελευθέρωση της σεροτονίνης από τους σεροτονινεργικούς νευρώνες στον υπομέλαινα τόπο είναι τονική και προκαλείται από τα διεγερτικά αμινοξέα τα οποία δρουν στους NMDA και AMPA/ καϊνικού οξέος υποδοχείς οποίοι εκφράζονται ως έτερο-υποδοχείς στους νευρώνες αυτούς [214]. Το συμπέρασμα αυτό είναι σημαντικό γιατί υποδηλώνει τον μηχανισμό με τον οποίο το NO αυξάνει την απελευθέρωση της σεροτονίνης.

1.7.6 Αδενοσίνη

Πιστεύεται ότι το ενδογενές NO ρυθμίζει την απελευθέρωση της αδενοσίνης, μολονότι οι πληροφορίες είναι λιγοστές. Η αύξηση της αδενοσίνης από το NO

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

πιθανόν να εκπροσωπεί έναν από τους νευροπροστατευτικούς μηχανισμούς του αερίου [70].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

1.8 Ο Ρόλος των Σεροτονινεργικών Υποδοχέων Τύπου $5HT_{1A}$ στη Μάθηση και τη Μνήμη

Η σεροτονίνη είναι μία αμίνη η οποία εμπλέκεται σε πολλές φυσιολογικές και λειτουργίες όπως ο ύπνος, η όρεξη, η αντίληψη του πόνου, η σεξουαλική λειτουργία, το άγχος, ο εμετός, η υπέρταση, η κινητικότητα του γαστρεντερικού σωλήνα και η διάθεση [206]. Θεωρείται επίσης ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μάθηση και στη μνήμη. Οι πολυάριθμες μελέτες που πραγματοποιηθήκαν τις τελευταίες δεκαετίες τεκμηρίωσαν ότι σεροτονονινεργικές νευρικές οδοί προβάλουν σε περιοχές του εγκεφάλου που εμπλέκονται στις διαδικασίες της μάθησης και της μνήμης και έδειξαν ότι οι αγωνιστές και οι ανταγωνιστές των σεροτονινεργικών υποδοχέων ρυθμίζουν τις διαδικασίες αυτές [147]. Έχουν αναγνωριστεί 7 διαφορετικοί υπότυποι των σεροτονινεργικών υποδοχέων ($5HT_{1-7}$) και καθένας από αυτούς περιλαμβάνει πολλαπλούς τύπους ($5HT_{1A,1B,1D(\alpha),1D(\beta),1E(\alpha),1E(\beta)}$, $5HT_{2A,2B,2C}$, $5HT_{3(\alpha)/3(\beta)}$, $5HT_{4(\alpha)/4(\beta)}$, $5HT_{5A,5B}$, $5HT_{6}$, $5HT_{7(\alpha)/7(\beta)}$. [147, 206].

Οι σεροτονινεργικοί υποδοχείς τύπου $5HT_{1A}$ βρίσκονται στο σώμα, στους δενδρίτες και στους άξονες των νευρικών κυττάρων και λειτουργούν ως προσυναπτικοί αλλά και μετασυναπτικοί στη σύναψη. Αυτοί που εντοπίζονται προσυναπτικά στο σώμα και στους δενδρίτες ονομάζονται σωματοδενδριτικοί. Οι υποδοχείς αυτοί είναι ευαίσθητοι στην ενεργοποίηση τους από την σεροτονίνη που απελευθερώνεται από τον ίδιο τον νευρώνα στον οποίο βρίσκονται και για τον λόγο αυτό είναι γνωστοί ως αυτό-υποδοχείς. Η ενεργοποίηση τους έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση της απελευθέρωσης της σεροτονίνης. Οι αγωνιστές των $5HT_{1A}$ υποδοχέων έχουν διφασική δράση. Η χορήγηση τους σε χαμηλή δόση ενεργοποιεί τους προσυναπτικούς αυτό-υποδοχείς με σκοπό την μείωση της απελευθέρωσης της σεροτονίνης, ενώ η

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

χορήγηση τους σε υψηλή δόση ενεργοποιεί απευθείας τους μετασυναπτικούς υποδοχείς [199].

Ο σεροτονινεργικός υποδοχέας τύπου $5HT_{1A}$ θεωρείται ότι εμπλέκεται στη συμπεριφορά, σε διάφορες ψυχιατρικές ασθένειες, όπως το άγχος και η κατάθλιψη, καθώς επίσης και στη μνήμη και για τον λόγο αυτό έχει μελετηθεί περισσότερο από κάθε άλλον υπότυπο [ανασκόπηση 44]. Παρά την εκτεταμένη διερεύνηση του $5HT_{1A}$ υποδοχέα, ο ακριβής του ρόλος στη μάθηση και τη μνήμη δεν έχει διασαφηνιστεί ακόμη [147].

1.8.1 Εκλεκτική Φαρμακολογική Προσέγγιση των Σεροτονινεργικών Υποδοχέων Τύπου $5HT_{1A}$

(±)-8-hydroxy-2-(di-*n*-propilamino) tetralin (8-OH-DPAT): Εκλεκτικός Αγωνιστής του $5HT_{1A}$ Υποδοχέα

Το 8-OH-DPAT είναι ο πιο δημοφιλής εκλεκτικός αγωνιστής των $5HT_{1A}$ υποδοχέων. Αλλα παραδείγματα αγωνιστών με επιλεκτικότητα στον συγκεκριμένο υπότυπο είναι [199]:

Αλνεσπιρόνη

Επταπιρόνη

Λισοπιτρόνη

Ρεπινοτάνη

LY-293,284

MKC- 242

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

N-[2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-N-(2-pyridinyl) cyclohexanene carboxamide 6trihydrochloride (WAY 100635): Εκλεκτικός Ανταγωνιστής του $5HT_{1A}$ Υποδοχέα

Μέχρι την σύνθεση του WAY 100635, τα περισσότερα φάρμακα που χαρακτηρίζονταν ως ανταγωνιστές του $5HT_{1A}$ υποδοχέα δεν παρουσίαζαν ικανοποιητική εκλεκτικότητα για τους υποδοχείς αυτούς [35] Το WAY 100635 είναι ο πρώτος ανταγωνιστής του $5HT_{1A}$ υποδοχέα με υψηλή εκλεκτικότητα που παρουσιάζει μόνο ανταγωνιστική δράση. Σε συμπεριφορική μελέτη το WAY 100635 ανταγωνίστηκε την δράση του 8-OH-DPAT [35]. Η εκλεκτικότητα του για τις θέσεις πρόσδεσης στον $5HT_{1A}$ υποδοχέα σε σχέση με αυτές του $5HT_7$ υποδοχέα είναι τουλάχιστον 70 φορές πιο υψηλή [35].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

1.8.2 Η Συμμετοχή του $5HT_{1A}$ Υποδοχέα στην Αλληλουχία των Βιοχημικών Συμβάντων στον Ιππόκαμπο για τον Σχηματισμό Μνήμης

Η έναρξη της ακολουθίας των βιοχημικών συμβάντων στην καταχώρηση και συγκράτηση μνήμης της ανασταλτικής αποφυγής περιλαμβάνει την ενεργοποίηση τριών διαφορετικών υποδοχέων του γλουταμινικού οξέος με συνέπεια την αύξηση της δραστικότητα της πρωτεϊνικής κινάσης A, C και G και της πρωτεϊνικής κινάσης II του συμπλέγματος ασβεστίου/καλμοδουλίνης [16, 104]. Ακολουθεί εμπλοκή δεύτερων αγγελιοφόρων και άλλων βιοχημικών δρώμενων που καταλήγουν σε αλλαγές των υπομονάδων και των χαρακτηριστικών πρόσδεσης των υποδοχέων του γλουταμινικού οξέος και στην αύξηση της έκφρασης παραγόντων μεταγραφής. Τα βιοχημικά συμβάντα ρυθμίζονται σε δύο φάσεις: 1) νωρίς μετά την εκπαίδευση από ορμονικούς και νευροχημικούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην επαγρύπνηση για την υιοθέτηση νέας συμπεριφοράς με σκοπό την αποφυγή των δυσάρεστων συνεπειών (π.χ. αποφυγή του επίμυ να εισέλθει στο χώρο που δέχτηκε ηλεκτροσόκ) και 2) 3-6 ώρες κατόπιν της εκπαίδευσης από μηχανισμούς που σχετίζονται με τη διάθεση και την παρόρμηση που ορίζουν την ανάκληση της μνήμης [104].

Η ανάκληση της μνήμης είναι ένας τρόπος για την εκτίμηση της μνήμης. Όπως είναι γνωστό σε όλους από την καθημερινότητα, τα συναισθήματα και η διάθεση επηρεάζουν την ανάκληση μνήμης. Τα συναισθήματα, τα επίπεδα άγχους και η διάθεση ρυθμίζονται από την ισορροπία της δράσης μεταξύ του ντοπαμινεργικού, του νοραδρενεργικού, του χολινεργικού και του σεροτονινεργικού συστήματος σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου. Ο Barros και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι στους επιμύες τα νευρορυθμιστικά

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

συστήματα που εμπλέκονται στα συναισθήματα και στη διάθεση διαμορφώνουν την ανάκληση της μνήμης [9].

Ο Izquierdo και συν. στην ανασκόπηση τους αναφέρουν πως τα βιοχημικά συμβάντα που συμβαίνουν στον ιππόκαμπο για να καθορίσουν μια γνωσιακή λειτουργία όπως αυτή της μνήμης διαμορφώνονται από ντοπαμινεργικούς τύπου D_1 , β-νοραδρενεργικούς και $5HT_{1A}$ υποδοχείς [104]. Πιστεύεται ότι οι D_1 και οι β-νοραδρενεργικοί υποδοχείς αυξάνουν και οι $5HT_{1A}$ υποδοχείς μειώνουν την δραστικότητα της αδενυλικής κυκλάσης η οποία είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση των πρωτεϊνικών κινάσεων [9]. Επίσης οι D_1 και οι β-νοραδρενεργικοί υποδοχείς προάγουν τη μακρόχρονη ενδυνάμωση στο πεδίο CA1 και CA3 αντίστοιχα και οι $5HT_{1A}$ υποδοχείς απορυθμίζουν την πρώιμη φάση της μακρόχρονης ενδυνάμωσης στην οδοντωτή έλικα του ιππόκαμπου [9, 104]. Οι τρείς αυτές κατηγορίες υποδοχέων διεγείρονται από ντοπαμινεργικές, β-νοραδρενεργικές και σεροτονινεργικές οδούς, οι οποίες πιστεύεται ότι ενέχονται στη ρύθμιση της διάθεσης και της παρόρμησης [9, 104]. Ενδεχομένως, οι διαταραχές στη μνήμη που εμφανίζονται σε ασθένειες και οι οποίες επάγονται από τη δυσλειτουργία των συστημάτων αυτών (π.χ. σχιζοφρένεια, κατάθλιψη, νόσος του Alzheimer κ.τ.λ.) να σχετίζονται με τις αλλαγές της ρύθμισης της δεύτερης φάσης στο σχηματισμό μνήμης [9, 104]. Το ντοπαμινεργικό, το νοραδρενεργικό και το σεροτονινεργικό σύστημα επηρεάζουν άμεσα τις βιοχημικές διαδικασίες της μνήμης. Τα βιοχημικά δρώμενα που διαδραματίζονται σε μία σειρά από συνάψεις στον ιππόκαμπο είναι δυνατόν να αλλάξουν, ανάλογα με την άμεση ή έμμεση επιρροή διάφορων νευρορυθμιστών και ορμονών στην περιοχή του ιππόκαμπου [9, 104]. Η παράλληλη δράση της ντοπαμινεργικής, της νοραδρενεργικής και της χολινεργικής οδού στο πεδίο CA1, τον ενδορινικό, τον βρεγματικό φλοιό και

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

την έλικα του προσαγωγίου ευνοεί την ανάκληση μνήμης. Η ενεργοποίηση των $5HT_{1A}$ υποδοχέων έχει το αντίθετο αποτέλεσμα [9].

1.8.3 Η Δράση Αγωνιστών και Ανταγωνιστών των $5HT_{1A}$ Υποδοχέων στη Μνήμη

Πολλές μελέτες εξέτασαν τη δράση διάφορων αγωνιστών και ανταγωνιστών των $5HT_{1A}$ υποδοχέων στις διαδικασίες της μάθησης και της μνήμης. Τα αποτελέσματα μεταξύ των ερευνητών είναι αντικρουόμενα. Η αντίφαση αυτή ίσως να οφείλεται στις διαφορετικές πειραματικές συμπεριφορικές διατάξεις που χρησιμοποιήθηκαν [149-151], στα διαφορετικά πρωτόκολλα χορήγησης φαρμάκου που εφαρμόζονται [141, 148, 151] και σε φάρμακα που παρουσιάζουν παράλληλα ιδιότητες μερικού αγωνιστή και ανταγωνιστή [147]. Ακόμη έχει δειχθεί ότι οι υποδοχείς τύπου $5HT_{1A}$ απαντώνται ως προσυναπτικοί στο ραχιαίο πυρήνα της ραφής και ως μετασυναπτικοί στον ιππόκαμπο και παρουσιάζουν διαφορετικές ιδιότητες [19]. Συνεπώς η ενεργοποίηση προσυναπτικών και μετασυναπτικών $5HT_{1A}$ υποδοχέων πιθανόν να έχει διαφορετική επίδραση στην μνήμη μια και έχει αντίθετο αποτέλεσμα στην απελευθέρωση της σεροτονίνης. Επίσης, η χορήγηση χαμηλής και υψηλής δόσης αγωνιστών $5HT_{1A}$ των υποδοχέων δίνει αντίθετα αποτελέσματα. Μελέτες υποδηλώνουν ότι χορήγηση χαμηλής δόσης του αγωνιστή 8-OH-DPAT ευνοεί τη μνήμη στα πειραματόζωα όταν αυτή αναστέλλεται από φαρμακευτική αγωγή με σκοπολαμίνη ή από μικροχειρουργική βλάβη, ενώ η χορήγηση υψηλής δόσης εντείνει την προκαλούμενη αμνησία από τις παραπάνω μεθόδους. Ακόμη, έχει δειχθεί ότι η διέγερση των $5HT_{1A}$ προσυναπτικών υποδοχέων οδηγεί σε βελτίωση των γνωσιακών επιδόσεων των πειραματόζωων σε πειραματικά πρότυπα μελέτης της μνήμης [34,35,37,43], ενώ η ενεργοποίηση των μετασυναπτικών $5HT_{1A}$

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

υποδοχέων έχει ως συνέπεια τη μείωση των επιδόσεων αυτών [37,43]. Έτσι λοιπόν, πολλοί μελετητές ερεύνησαν την δράση διαφόρων σχημάτων δόσης αγωνιστών, μερικών αγωνιστών και ανταγωνιστών υποδοχέων τύπου $5HT_{1A}$ σε προ- και μετά- συναπτικό επίπεδο και το αποτέλεσμα της χορήγησης τους στη μάθηση και την μνήμη και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι αγωνιστές όπως το 8-OH-DPAT όταν χορηγούνται σε **χαμηλή δόση** δρουν **προσυναπτικά** και **αναστέλλουν την αμνησία** των πειραματόζωων που προκαλείται είτε με χορήγηση φαρμάκων είτε με μικροχειρουργική βλάβη, ενώ οι **υψηλές δόσεις** δρουν **μετασυναπτικά** και έχουν το **αντίθετο αποτέλεσμα** [37].

Μελέτες που συμφωνούν με την παραπάνω υπόθεση είναι πολλές, όπως αυτή του Meneses και των συνεργατών του [149] που υποστήριξαν με τα ευρήματα τους ότι το 8-OH-DPAT διευκολύνει την αποθήκευση της μνήμης (learning consolidation) όταν δρα προσυναπτικά. Οι Jacobs και Azmitia αναφέρουν ότι η διέγερση προσυναπτικών $5HT_{1A}$ υποδοχέων επιφέρει μείωση της έκκρισης και της απελευθέρωσης της σεροτονίνης [4, 105]. Ο Marrosu και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι χαμηλές δόσεις 8-OH-DPAT αυξάνουν τα θ κύματα του ιππόκαμπου που εμπλέκονται, εκτός άλλων, και στις διαδικασίες της μάθησης και της μνήμης [138]. Ο Jordan και οι συνεργάτες του χρησιμοποιώντας στην έρευνα τους τον μερικό αγωνιστή των υποδοχέων $5HT_{1A}$ OPC-14523, έδειξαν ότι η χορήγηση του πρώτα ενεργοποιεί τους σωματοδενδρικούς αυτουποδοχείς και μόνο σε πολύ υψηλότερες δόσεις διεγείρει τους μετασυναπτικούς [147]. Το WAY 100635 ανταγωνίζεται την αμνησία προκαλούμενη από τη σκοπολαμίνη [97], από μικροχειρουργική βλάβη της ψαλίδας [94] ή από αποκλεισμό των NMDA υποδοχέων [10]. Πιστεύεται ότι το WAY 100635 αναστέλλει την ανεπάρκεια μνήμης γιατί παρεμποδίζει μετασυναπτικούς $5HT_{1A}$ υποδοχείς [97]. Πολλοί είναι οι ερευνητές που υποστηρίζουν ότι η δράση ανταγωνιστών των $5HT_{1A}$

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

υποδοχέων ίσως αποτελεί μία νέα βάση για την συμπτωματική θεραπεία του εκφυλισμού της μνήμης στον άνθρωπο [97, 147].

Οι $5HT_{1A}$ υποδοχείς φαίνεται να διαδραματίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στη μάθηση και τη μνήμη με την εμπλοκή τους στην απελευθέρωση της ακετυλοχολίνης. Όπως συζητήθηκε στην αρχή, η εκφύλιση της χολινεργικής λειτουργίας επιφέρει εξασθένηση της μάθησης και της μνήμης. Η αύξηση λοιπόν της ενδογενούς ακετυλοχολίνης μπορεί να βελτιώσει τις γνωστικές λειτουργίες [35].

Ο ιππόκαμπος δέχεται σεροτονινεργικές προβολές από τον ραχιαίο και το μέσο πυρήνα της ραφής [4] καθώς και χολινεργικές προβολές από το έσω διάφραγμα [126]. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο συστημάτων στην περιοχή του ιππόκαμπου και ο ρόλος τους στον έλεγχο της συμπεριφοράς και της γνωσιακής λειτουργίας έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών τα τελευταία χρόνια [34- 37, 43, 44, 59, 65, 140, 147-151, 170, 183]. Έρευνες σε πειραματόζωα έχουν δείξει ότι η σεροτονίνη ρυθμίζει την απελευθέρωση της ακετυλοχολίνης από τους χολινεργικούς νευρώνες στον βασικό αμυγδαλοειδή πυρήνα μέσω των $5HT_{1A}$ υποδοχέων αλλά δεν έχει διευκρινιστεί ο επακριβής της ρόλος στην απελευθέρωση της ακετυλοχολίνης.

Ο Cassel και ο Jeltsch στην ανασκόπηση τους αναφέρουν ότι η σεροτονίνη ρυθμίζει κατασταλτικά την χολινεργική λειτουργία όταν ενεργοποιούνται προσυναπτικοί $5HT_{1A}$ υποδοχείς [37]. Η ενεργοποίηση των προσυναπτικών σωματοδενδριτικών $5HT_{1A}$ υποδοχέων που βρίσκονται σε σεροτονινεργικούς νευρώνες της ραφής από το 8-OH-DPAT οδηγεί σε ελάττωση της απελευθέρωσης της σεροτονίνης με αποτέλεσμα την μείωση της αναστολής

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

που επιφέρει η σεροτονίνη στους χολινεργικούς νευρώνες στον βασικό αμυγδαλοειδή πυρήνα των επιμύων. Με άλλα λόγια, η ενεργοποίηση των $5HT_{1A}$ αυτό-υποδοχέων αυξάνει την απελευθέρωση της σεροτονίνης στην αμυγδαλή [44, 105]. Τα ευρήματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με το γεγονός ότι η διέγερσή των προσυναπτικών υποδοχέων τύπου $5HT_{1A}$ αυξάνει τις γνωσιακές επιδόσεις σε πειραματόζωα που τους προκλήθηκε αμνησία με χορήγηση σκοπολαμίνης [148-150]. Από την άλλη μεριά, οι $5HT_{1A}$ υποδοχείς στον εγκεφαλικό φλοιό και τον ιππόκαμπο εντοπίζονται κυρίως ως μετασυναπτικοί, δηλαδή βρίσκονται σε μη σεροτονινεργικούς νευρώνες και η ενεργοποίηση τους με 8-OH-DPAT αυξάνει την απελευθέρωση της ακετυλοχολίνης [44, 242].

Ένας ακόμη λόγος που δεν έχει διευκρινιστεί εάν η σεροτονίνη αυξάνει ή μειώνει την απελευθέρωση της ακετυλοχολίνης ίσως είναι το γεγονός ότι και άλλοι υπότυποι των σεροτονινεργικών υποδοχέων εκτός του $5HT_{1A}$ εμπλέκονται στην διαμόρφωση της χολινεργικής λειτουργίας από την σερονονίνη, οι οποίοι παρουσιάζουν αντίθετες δράσεις: οι $5HT_{1A}$ υποδοχείς αυξάνουν και οι $5HT_{1B}$ υποδοχείς μειώνουν την έκκριση της ακετυλοχολίνης στον ιππόκαμπο. Συνεπώς, το χολινεργικό σύστημα βρίσκεται υπό την επιρροή ισορροπημένης δράσης των δύο αυτών τύπων [37]. Πιστεύεται ότι η ρύθμιση του χολινεργικού συστήματος από την σεροτονίνη όπως και η δράση του υποδοχέα τύπου $5HT_{1A}$ είναι αποτέλεσμα ενός πολύπλοκου πολυσυναπτικού βρόγχου στον οποίο εμπλέκονται διάφοροι νευροδιαβιβαστές όπως το γλουταμινικό οξύ και η νοραδρεναλίνη αλλά και διάφορες περιοχές του εγκεφάλου [37, 147].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

1.8.4 Ρύθμιση της Λειτουργίας των $5HT_{1A}$ Υποδοχέων στη Μάθηση και τη Μνήμη από το NO

Έως σήμερα η δράση του NO στο σεροτονινεργικό σύστημα είχε μελετηθεί στην υπερφαγία των μύων. Για παράδειγμα το L-NAME αναστέλλει την υπερφαγία στους μύες που προκαλεί η χορήγηση του 8-OH-DPAT [223, 251]. Η παρούσα μελέτη είναι πρωτότυπη. Μελετάται για πρώτη φορά η αλληλεπίδραση του $5HT_{1A}$ υποδοχέα με το νιτρεργικό σύστημα. Συμπεριφορικές μελέτες σε επίμυες του Meneses και συν. υποδηλώνουν προτείνουν ότι 8-OH-DPAT προκαλεί γνωσιακά ελλείμματα [148-50, 178]. Όπως συζητήθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο το NO πιθανόν ρυθμίζει την απελευθέρωση της σεροτονίνης. Μέχρι τώρα δεν έχει πραγματοποιηθεί μελέτη η οποία να εξετάζει την αλληλεπίδραση του σεροτονινεργικού συστήματος και του νιτρεργικού συστήματος με σκοπό να καθορίσει την γνωσιακή λειτουργία.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

2. Σκοπός της Εργασίας

1) να αξιολογηθεί η δράση του 8-OH-DPAT επί της μνήμης στους επίμυες χρησιμοποιώντας τη διαδικασία της Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου (ΑΝΑ).

2) να αξιολογηθεί η ανταγωνιστική δράση του WAY 100635 στην επαγόμενη αμνησία να ανταγωνιστεί την αμνησία που προκαλεί η χορήγηση του 8-OH-DPAT στους επίμυες στην διαδικασία ΑΝΑ για να εξακριβωθεί η εμπλοκή του 5-HT_{1A} υποδοχέα στην αναγνωριστική μνήμη.

3) να αξιολογηθεί η ανταγωνιστική δράση της μολσιδομίνης στην επαγόμενη αμνησία να ανταγωνιστεί την αμνησία που προκαλεί η χορήγηση του 8-OH-DPAT στους επίμυες στην διαδικασία ΑΝΑ για να εξακριβωθεί η εμπλοκή του νιτρεργικού συστήματος στην δράση του 5-HT_{1A} υποδοχέα στην αναγνωριστική μνήμη.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Πειραματόζωα

Αρσενικοί ενήλικες επίμυες Wistar (Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα) ηλικίας τριών μηνών και βάρους 300-350 γραμμαρίων χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη αυτή. Τα πειραματόζωα φυλάσσονταν σε κλουβιά τύπου Makrolon (35x45x20 εκ.) σε ομάδες των τριών, σε κανονικές συνθήκες (θερμοκρασία: 21±1°C, υγρασία: 50-55%, εναλλαγή ημερήσιου κύκλου κάθε 12 ώρες με έναρξη της φωταγώγησης στης 7:00 πμ.) με ελεύθερη πρόσβαση σε φαγητό και νερό. Τα πειράματα πραγματοποιηθήκαν μεταξύ των ωρών 9:00 και 13:00. Η παρατήρηση της συμπεριφοράς των επίμυων και η αξιολόγηση των μετρήσεων έγινε από την προσωπική μου συμμετοχή στη μελέτη αγνοώντας την φαρμακευτική αγωγή που χορηγούνταν στα πειραματόζωα σε κάθε πείραμα.

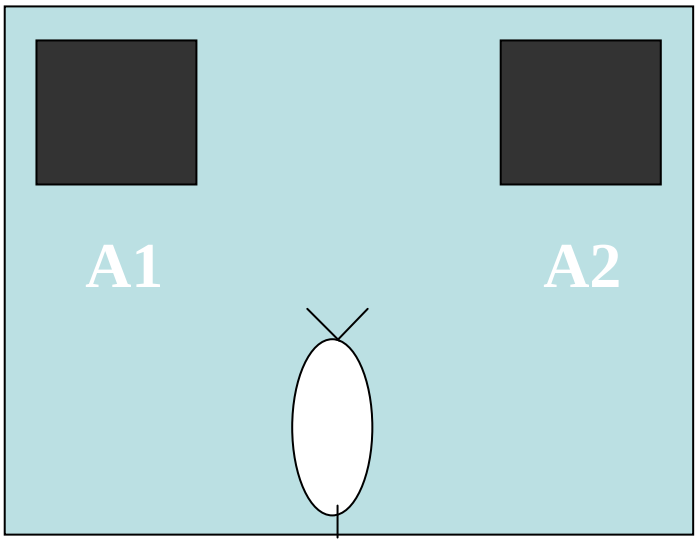
Οι διαδικασίες που αφορούσαν την διαχείριση και την φροντίδα των πειραματόζωων ήταν σε συμμόρφωση με τις διεθνείς οδηγίες σε συγκατάθεση με τους εθνικούς και διεθνείς νόμους και πολιτικές.

3.2 Πειραματική Διάταξη Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου

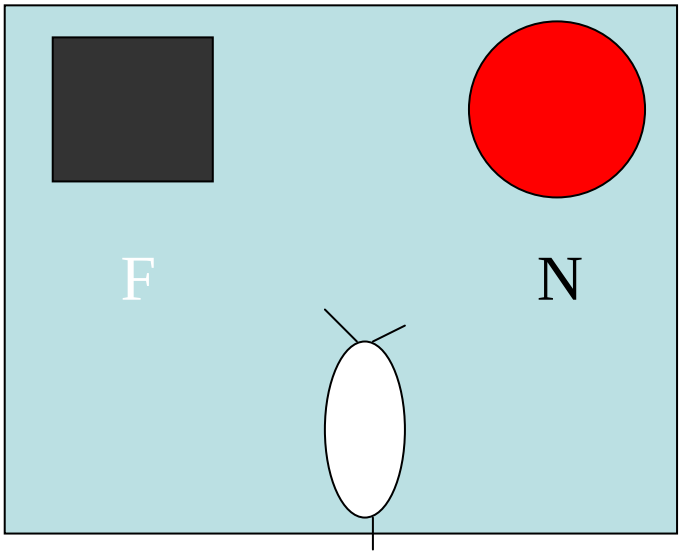
Η πειραματική διάταξη αποτελούνταν από ένα σκούρο ανοιχτό κουτί φτιαγμένο από πλεξιγκλάς (50x50x50 εκ.) [62] φωτιζόμενο από μία λάμπα των 60 watt σε απόσταση 60 εκ. από πάνω του. Η ένταση του φωτισμού ήταν όμοια σε όλα τα σημεία της διάταξης. Τα αντικείμενα αναγνώρισης ήταν φτιαγμένα από γυαλί, πλαστικό ή μέταλλο και είχαν την μορφή κύβου, πυραμίδας ή κυλίνδρου. Το ύψος τους έφτανε τα 7 εκ. και ήταν αδύνατον να

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

μετακινηθούν από τα πειραματόζωα. Οι κύβοι ήταν από μέταλλο, οι πυραμίδες από γυαλί και οι κύλινδροι από πλαστικό. Το κάθε αντικείμενο υπήρχε σε τριπλό αντίγραφο.



T1



T2

<u>Εικόνα 4:</u> Πειραματική διάταξη της Διαδικασίας Αναγνώρισης Νέου Αντικειμένου [T1-Δοκιμή Εκπαίδευσης] ο επίμυς εισάγεται στο κέντρο της διάταξης και αφήνεται να εξερευνήσει δύο όμοια αντικείμενα (A1, A2). [T2- Δοκιμή Επιλογής] ο επίμυς εισάγεται ξανά, μετά την περίοδο αναμονής, στο κέντρο της διάταξης και αφήνεται να εξερευνήσει δύο διαφορετικά αντικείμενα: ένα αντίγραφο του γνώριμου (F) και ένα νέο (N). [ITI-περίοδος Αναμονής μεταξύ T1 και T2] ο επίμυς μετά τη δοκιμή T1 επιστρέφει στο κλουβί για 3 ώρες μέχρι τη δοκιμή T2]

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

Η πραγμάτωση της πειραματικής διαδικασίας της αναγνώρισης νέου αντικειμένου έγινε όπως περιγράφεται από τους A. Ennaceur και J. Delacour [62]. Μια εβδομάδα πριν την έναρξη των πειραμάτων, ο ερευνητής έρχεται σε επαφή με τους επίμυες δύο φορές την ημέρα. Μια ημέρα πριν την δοκιμασία, επιτρέπεται στους επίμυες να εξερευνήσουν την πειραματική διάταξη για δύο λεπτά. Την ημέρα της δοκιμασίας, οι επίμυες έχουν μια συνεδρία διάρκειας δύο λεπτών μέσα στην διάταξη στην οποία δύο όμοια αντικείμενα (π.χ. δύο πλαστικοί κύλινδροι) τοποθετούνται σε δύο αντικρινές γωνίες σε απόσταση 10 εκατοστών από τα τοιχώματα. Στην δοκιμασία αυτή, κατά την δοκιμή εκπαίδευσης ("sample" trial: T1), ο επίμυς εισάγεται στο κέντρο της διάταξης και αφήνεται να εξερευνήσει τα δύο όμοια αντικείμενα. Μετά την δοκιμασία T1, ο επίμυς επιστρέφει στο κλουβί του και το διάλειμμα μέχρι την επόμενη δοκιμή (intertrial interval: ITI) διαρκεί τρεις ώρες. Στην συνέχεια, πραγματώνεται η δοκιμή της επιλογής ("choice" trial: T2). Στην δοκιμασία T2, ένα νέο αντικείμενο (N), διαφορετικό από το γνώριμο (Γ) σε υφή και σχήμα (π.χ. μεταλλικός κύβος) αντικαθιστά το ένα από τα δύο αντικείμενα που χρησιμοποιήθηκαν στην δοκιμασία T1. Οπότε οι επίμυες εκτίθενται ξανά σε δύο αντικείμενα: σε ένα αντίγραφο του γνώριμου και σε ένα νέο. Μέσω αυτής της συμπεριφορικής διαδικασίας μελετάται η ικανότητα των επίμυων να αναγνωρίσουν μια σειρά από νέα ερεθίσματα σε οικείο περιβάλλον [62]. Οι συνδυασμοί τοποθέτησης των αντικειμένων και η τοποθεσία αυτών επιλέγεται κατάλληλα ώστε να αποφευχθούν πιθανές "προκαταλήψεις" που σχετίζονται με την προτίμηση των πειραματόζωων ως προς συγκεκριμένο αντικείμενο ή τοποθεσία. Η διάταξη και τα αντικείμενα καθαρίζονται διεξοδικά μετά από κάθε δοκιμασία για την αποφυγή οσμών που θα μπορούσαν να αποσυντονίσουν τα ζώα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

Η εξερεύνηση από τους επίμυες ορίστηκε ως ακολούθως: κατευθύνοντας την μύτη τους προς το αντικείμενο σε απόσταση μέχρι 2 εκατοστά και/ ή ακουμπώντας το με την μύτη. Η περιστροφή των επίμυων γύρω από το αντικείμενο ή η εναπόθεση τους πάνω σε αυτό δεν καταγράφεται ως εξερεύνηση. Ο χρόνος που αναλώνεται από τους επίμυς εξερευνώντας το κάθε αντικείμενο κατά την διάρκεια των δύο δοκιμών Τ1 και Τ2 καταγράφονταν με ένα χρονόμετρο. Από την μέτρηση αυτή, υπολογίστηκε μια σειρά από μεταβλητές: ο συνολικός χρόνος που αναλώθηκε για την εξερεύνηση των δύο όμοιων αντικειμένων στην δοκιμασία Τ1 και αυτός που αναλώθηκε για την εξερεύνηση των δύο διαφορετικών αντικειμένων, του γνώριμου και του νέου στην δοκιμασία Τ2. Οι χρόνοι εξερεύνησης εξετάστηκαν σύμφωνα με το είδος του αντικειμένου και την τοποθεσία του για να εκτιμηθεί εάν οι επίμυες εκδήλωσαν προτίμηση σε κάποιο από τα είδη των αντικειμένων ή στην θέση τοποθέτησης τους στην διάταξη. Η δυνατότητα του πειραματόζωου να διακρίνει το γνώριμο αντικείμενο από το νέο, μετρήθηκε συγκρίνοντας τον χρόνο που αναλώθηκε να εξερευνά το γνώριμο αντικείμενο και τον χρόνο που χρειάστηκε για την εξερεύνηση του νέου. Ο χρόνος αυτός μπορεί να προκαταβάλλεται από διαφορετικά επίπεδα συμπεριφοράς και για τον λόγο αυτό υπολογίστηκε ο δείκτης διάκρισης (Discrimination index, D): D= N- Γ/N + Γ. Ο δείκτης διάκρισης D αντιπροσωπεύει την διαφορά στον χρόνο εξερεύνησης, ο οποίος εκφράζει το ποσοστό του συνολικού χρόνου που αναλώθηκε στην εξερεύνηση και των δύο αντικειμένων στην δοκιμασία Τ2 [39]. Επιπρόσθετα, καταγράφηκε ο συνολικός αριθμός βημάτων του κάθε επίμυ κατά την διάρκεια κάθε δοκιμασίας με ένα αυτόματο μετρητή για να απεικονίσει την κινητικότητα τους.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

3.3 Φάρμακα

Η 8-OH-DPAT (Sigma, USA) και το WAY 100635 (Sigma, USA) χορηγήθηκαν σε αραίωση με διάλυμα φυσιολογικού ορού (NaCl 0.9%) υποδόρια (s.c.) και ενδοπεριτοναϊκά (i.p.) σε όγκο 0.5ml σε κάθε επίμυ, αντίστοιχα. Οι δόσεις της 8-OH-DPAT που χορηγήθηκαν ήταν 0,1mg/kg, 0.3 mg/kg και 1 mg/kg και του WAY 100635 0.3mg/kg και 1mg/kg. Οι δόσεις του WAY 100635 επιλέχθηκαν σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη η οποία έδειξε ότι αυτές οι δόσεις ανταγωνίστηκαν γνωσιακά ελλείμματα σε επίμυες [184].

Η μολσιδομίνη (Sigma Tau, Milan, Italy) αραιώθηκε σε διάλυμα φυσιολογικού ορού (NaCl 0.9%) και χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά σε όγκο 0.5ml σε κάθε επίμυ. Οι δόσεις της μολσιδομίνης (2mg/kg και 4 mg/kg) επιλέχθηκαν σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη η οποία έδειξε ότι οι δόσεις αυτές ήταν δραστικές κατά της αμνησίας και δεν προκάλεσαν παρενέργειες [147, 182, 184, 185, 186]. Τα πειραματόζωα μάρτυρες έλαβαν 0.5 ml διάλυμα φυσιολογικού ορού (NaCl 0.9%).

Είναι γνωστό ότι οι αγωνιστές του $5HT_{1A}$ υποδοχέα προκαλούν υπερκινητικότητα και επιφέρουν ένα χαρακτηριστικό σύνδρομο, το σεροτονινεργικό σύνδρομο στους μύς και στους επίμυες [65]. Οπότε, είναι πιθανό αυτοί οι παράγοντες να παρεμβάλλονται στην μαθησιακή επίδοση των επίμυων. Σε μια προσπάθεια να αποφευχθεί η πιθανότητα να επηρεαστεί η επίδοση των επίμυων από αυτές τις προαναφερθείσας παρενέργειες της χορήγησης της 8-OH-DPAT, αυξήθηκε το διάστημα μεταξύ των δοκιμασιών, ITI, από μία ώρα σε τρείς ώρες χωρίς να επηρεάσει την μνήμη των πειραματοζώων μαρτύρων.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

3.4. Πείραμα 1: Αξιολόγηση της δράσης διαφόρων δόσεων της 8-OH-DPAT στις επιδόσεις επίμυων στην διαδικασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου (ΑΝΑ)

Οι επίμυες χωρίστηκαν τυχαία σε 4 ομάδες (N=9 επίμυες ανά ομάδα), σύμφωνα με την φαρμακευτική αγωγή που έλαβαν αμέσως μετά το τέλος της δοκιμασίας T1, ως ακολούθως:

1. διάλυμα φυσιολογικού ορού (NaCl 0.9%)
2. 8-OH-DPAT 0,1mg/kg
3. 8-OH-DPAT 0,3mg/kg
4. 8-OH-DPAT 1mg/kg

3.5. Πείραμα 2: Αξιολόγηση της ανταγωνιστικής δράσης διαφόρων δόσεων του WAY 100635 στην επαγόμενη αμνησία από τη χορήγηση της 8-OH-DPAT στην διαδικασία ΑΝΑ στους επίμυες

Οι επίμυες χωρίστηκαν τυχαία σε 6 ομάδες (N=8 επίμυες ανά ομάδα), σύμφωνα με την φαρμακευτική αγωγή που έλαβαν αμέσως μετά το τέλος της δοκιμασίας T1, ως ακολούθως:

1. διάλυμα φυσιολογικού ορού + διάλυμα φυσιολογικού ορού
2. διάλυμα φυσιολογικού ορού + WAY 100635 0,3mg/kg
3. διάλυμα φυσιολογικού ορού + WAY 100635 1mg/kg
4. διάλυμα φυσιολογικού ορού + 8-OH-DPAT 0,3mg/kg
5. 8-OH-DPAT 0.3mg/kg + WAY 100635 0,3mg/kg
6. 8-OH-DPAT 0.3mg/kg + WAY 100635 1mg/kg

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

3.6. Πείραμα 3: Αξιολόγηση της ανταγωνιστικής δράσης διαφόρων δόσεων της μολσιδομίνης στην επαγόμενη αμνησία από τη χορήγηση της 8-OH-DPAT στην διαδικασία ΑΝΑ στους επίμυες

Οι επίμυες χωρίστηκαν τυχαία σε 6 ομάδες (N=10 επίμυες ανά ομάδα), σύμφωνα με την φαρμακευτική αγωγή που έλαβαν αμέσως μετά το τέλος της δοκιμασίας Τ1, ως ακολούθως:

1. διάλυμα φυσιολογικού ορού + διάλυμα φυσιολογικού ορού
2. διάλυμα φυσιολογικού ορού + Μολσιδομίνη 2mg/kg
3. διάλυμα φυσιολογικού ορού + Μολσιδομίνη 4mg/kg
4. διάλυμα φυσιολογικού ορού + 8-OH-DPAT 0,3mg/kg
5. 8-OH-DPAT 0.3mg/kg + Μολσιδομίνη 2mg/kg
6. 8-OH-DPAT 0.3mg/kg + Μολσιδομίνη 4mg/kg

3.7. Στατιστική Ανάλυση

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα. Η προτίμηση των πειραματόζωων ως προς τα αντικείμενα ή τη τοποθεσία τους αναλύθηκε από το Student's *t*-test για κάθε πειραματική ομάδα. Στο πείραμα 1, η κινητικότητα και οι συνολικοί χρόνοι εξερεύνησης κατά την διάρκεια της δοκιμασίας Τ2 αναλύθηκαν με ανάλυση διακύμανσης με μία μεταβλητή (one-way analysis of variance, one-way ANOVA) και εκ των υστέρων αναλύσεις έγιναν με το τεστ του Duncan. Η μεταβλητή ήταν το 8-OH-DPAT (3 επίπεδα). Στα πειράματα 2 και 3, η κινητικότητα και οι συνολικοί χρόνοι εξερεύνησης κατά την διάρκεια της δοκιμασίας Τ2 αναλύθηκαν με ανάλυση διακύμανσης με δύο μεταβλητές (two-way analysis of variance, two-way

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

ANOVA). Οι μεταβλητές ήταν 8-OH-DPAT (3 επίπεδα) και WAY 100635 (3 επίπεδα) στο πείραμα 2 και 8-OH-DPAT (3 επίπεδα) και μολσιδομίνη (3 επίπεδα) στο πείραμα 3. Εκ των υστέρων συγκρίσεις έγιναν με το τεστ του Tukey.

Στο πείραμα 1, ο δείκτης διάκρισης D αξιολογήθηκε με ανάλυση διακύμανσης με μια μεταβλητή και για τις εκ των υστέρων αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το τεστ του Duncan. Η μεταβλητή ήταν το 8-OH-DPAT (3 επίπεδα). Στα πειράματα 2 και 3 ο δείκτης διάκρισης D αξιολογήθηκε με ανάλυση διακύμανσης δύο μεταβλητών. Οι μεταβλητές ήταν 8-OH-DPAT (3 επίπεδα) και WAY 100635 (3 επίπεδα) στο πείραμα 2 και 8-OH-DPAT (3 επίπεδα) και μολσιδομίνη (3 επίπεδα) στο πείραμα 3. Για τις εκ των υστέρων συγκρίσεις χρησιμοποιήθηκε το τεστ του Tukey.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

4. Αποτελέσματα

Καμία διαφορά δεν βρέθηκε εντός οποιασδήποτε ομάδας όταν συγκρίθηκε ο χρόνος εξερεύνησης σύμφωνα με το σχήμα και την ύφη των αντικειμένων και την τοποθεσίας τους στην διάταξη.

Πείραματα	**Πειραματικές Ομάδες**	**N**	t-A1	t-A2
Πείραμα 1	VEH	9	7.44 ±0.5	8 ±0.8
	8-OH-DPAT	9	7.8 ±1	7.1 ±0.6
	8-OH-DPAT	9	7.6 ±0.4	7.2 ±0.8
Πείραμα 2	VEH + VEH	8	7.1 ±1	7.1 ±0.7
	VEH + WAY 0.3	8	6.6 ±0.5	7.6 ±0.8
	VEH + WAY 1	8	6.5 ±0.6	7.6 ±0.9
	8-OH-DPAT 1 + VEH	8	6.4 ±0.7	6.9 ±0.4
	8-OH-DPAT 1+ WAY 0.3	8	6.1 ±0.6	7.1 ±0.7
	8-OH-DPAT 1 + WAY 1	8	6.5 ±0.5	6.8 ±0.8
Πείραμα 3	VEH + VEH	10	8 ±0.8	7.1 ±0.6
	VEH + MOL 2	10	8.4 ±0.8	7.8 ±0.9
	VEH + MOL 4	10	8.1 ±0.7	8 ±0.8
	8-OH-DPAT 1+ VEH	10	8.4 ±0.8	8 ±0.7
	8-OH-DPAT 1+ MOL 2	10	7.3 ±0.6	7.2 ±0.8
	8-OH-DPAT 1+MOL 4	10	7.9 ±0.7	7.5 ±0.5

***Πίνακας 2:* Σύγκριση του χρόνου εξερεύνησης των 2 ομοίων αντικειμένων, A1 και A2, κατά την διαδικασία T1. Το A1 και το A2 είναι είτε δύο μεταλλικοί κύβοι, είτε δύο γυάλινες πυραμίδες, είτε δύο πλαστικοί κύλινδροι**

t-A1: χρόνος εξερεύνησης του αντικειμένου A1 στη δοκιμασία T1
t-A2: χρόνος εξερεύνησης του όμοιου αντικειμένου με το A1, A2 στην δοκιμασία T1

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

4.1. Πείραμα 1: Αξιολόγηση της δράσης διαφόρων δόσεων της 8-OH-DPAT στις επιδόσεις επίμυων στην διαδικασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου

Χορήγηση 8-OH-DPAT 1mg/kg αύξησε την κινητικότητα, προκάλεσε διάρροια και συχνουρία στα πειραματόζωα. Οπότε αυτή η δόση απορρίφθηκε και η μελέτη συνεχίστηκε με τις δόσεις 0,1mg/kg και 0,3mg/kg.

Η ανάλυση της κινητικότητας (ανάλυση της διακύμανσης με μία μεταβλητή) κατά την διάρκεια της δοκιμασίας Τ2 δεν έδειξε καμία διαφορά μεταξύ των διάφορων ομάδων [F(2,24) = 0,4, P = 0,6] (σχεδιάγραμμα 1Α). Παρά το γεγονός ότι οι επίμυες στους οποίους χορηγήθηκαν 8-OH-DPAT φαίνονταν ότι εξερευνούσαν λιγότερο στην δοκιμασία Τ2 σε σύγκριση με αυτούς στους οποίους χορηγήθηκαν διάλυμα φυσιολογικού ορού, δεν προέκυψε διαφορά, στατιστικά σημαντική, μεταξύ των ομάδων αυτών [F (2, 24) = 3, P = 0,07, σχήμα 1Β]. Τα αποτελέσματα από τον δείκτη διάκρισης D έδειξαν ότι οι επίμυες που έλαβαν φυσιολογικό ορό διέκριναν καλύτερα το νέο από το γνώριμο αντικείμενο από ότι οι επίμυες στους οποίους χορηγήθηκαν 0,1 mg/kg και 0,3 mg/kg 8-OH-DPAT αντίστοιχα [F(2, 24) = 9,5, P < 0,01; Duncan's post-hoc test, P < 0,05] (σχήμα 1Γ).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

Fig. 1A

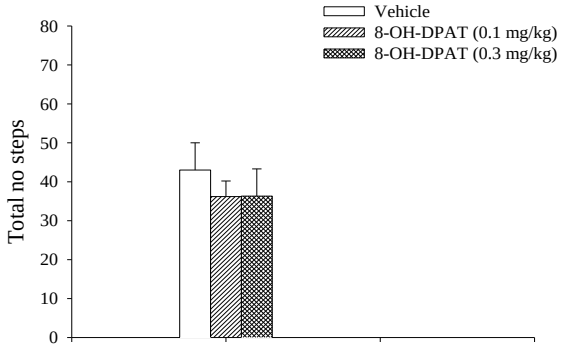


Fig. 1B

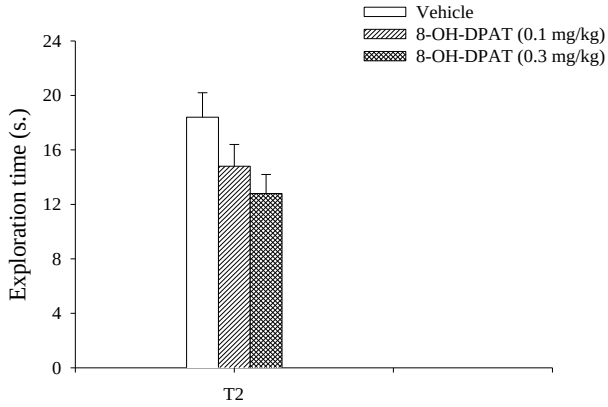
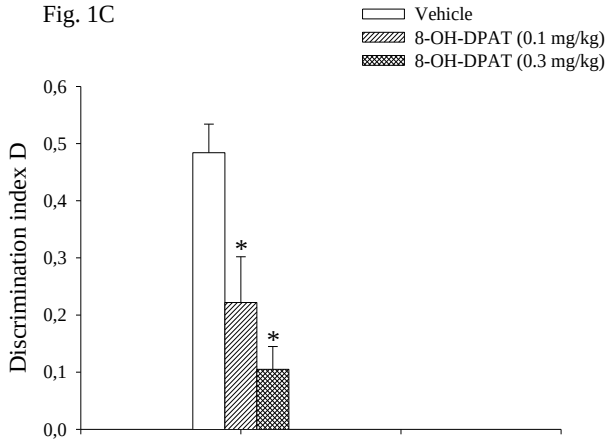


Fig. 1C



Σχεδιάγραμμα 1: *Οι ομάδες έλαβαν δ/μα φυσιολογικού ορού και 8-OH-DPAT αμέσως μετά την δοκιμασία T1 υποδορίως. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα.* ***(Α)*** *Συνολικός αριθμός βημάτων* ***(Β)*** *Συνολικός χρόνος που αναλώθηκε από την κάθε ομάδα των επιμύων στην εξερεύνηση και των δύο αντικειμένων στην δοκιμασία T2.* ***(Γ)*** *Δείκτης διάκρισης D, η επίδοση όπως εκφράστηκε για την κάθε ομάδα επιμύων στην δοκιμασία T2.* P<0.05 σε σύγκριση με όλες τις υπόλοιπες ομάδες*

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

4.2. Πείραμα 2: WAY 100635 και 8-OH-DPAT

Αξιολόγηση των δεδομένων μέσω της ανάλυσης της διακύμανσης με δύο μεταβλητές έδειξε ότι η κινητικότητα των επίμυων δεν επηρεάστηκε από τη χορήγηση του 8-OH-DPAT [$F(5, 42) = 1,1$, $P = 0,3$, n.s.] ή του WAY 100635 [$F(5, 42) = 1,7$, $P = 0,2$, n.s.]. Επίσης, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο μεταβλητών, δηλαδή του 8-OH-DPAT και του WAY 100635 [$F(5, 42) = 0,5$, $P = 0,6$, n.s.] (σχεδιάγραμμα 2Α).

Οι συνολικοί χρόνοι εξερεύνησης, όπως έδειξε η στατιστική ανάλυση (ανάλυση διακύμανσης με δύο μεταβλητές) δεν αλλοιώθηκαν από τη χορήγηση του 8-OH-DPAT [$F(5, 42) = 0,07$, $P = 0,8$, n.s.] ή του WAY 100635 [$F(5, 42) = 0,09$, $P = 0,9$, n.s.]. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική διπλή αλληλεπίδραση μεταξύ της χορήγησης της 8-OH-DPAT και του WAY 100635 [$F(5, 42) = 0,13$, $P = 0,9$, n.s.] (σχεδιάγραμμα 2Β).

Τα στοιχεία του δείκτη διάκρισης D έδειξαν σημαντική επίδραση της χορήγηση του 8-OH-DPAT [$F(5, 42) = 8,9$, $P < 0,01$], ενώ η χορήγηση του WAY 100635 [$F(2,24) = 2,4$, $P = 0,1$, n.s.] δεν είχε σημαντική ενέργεια στον δείκτη. Επίσης, σημειώθηκε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο παραπάνω φαρμάκων [$F(5, 42)= 3,8$, $P< 0,05$]. Όλες οι πειραματικές ομάδες, εκτός αυτής που χορηγήθηκε διάλυμα φυσιολογικού ορού και 8-OH-DPAT, διέκριναν σημαντικά καλύτερα το νέο από το γνώριμο αντικείμενο [Tukey's post-hoc test, $P < 0,05$ ενάντια στην ομάδα που χορηγήθηκε διάλυμα φυσιολογικού ορού και 8-OH-DPAT, σχεδιάγραμμα 2Γ].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

Fig. 2A

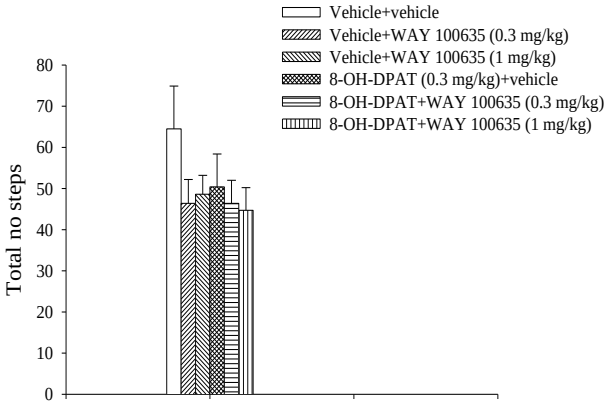


Fig. 2B

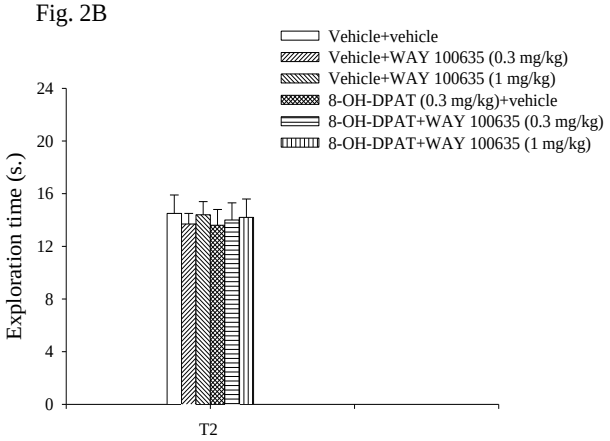
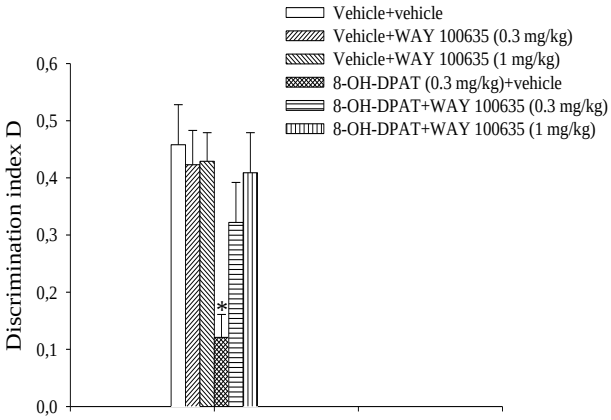


Fig. 2C



***Σχεδιάγραμμα 2**: Οι ομάδες έλαβαν 8-OH-DPAT και WAY100635 αμέσως μετά την δοκιμασία Τ1 υποδορίως και ενδοπεριτονϊακά αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα. **(Α)** Συνολικός αριθμός βημάτων **(Β)** συνολικός χρόνος που αναλώθηκε από την κάθε ομάδα των επιμύων στην εξερεύνηση και των δύο αντικειμένων στην δοκιμασία Τ2. **(Γ)** Δείκτης διάκρισης D, η επίδοση όπως εκφράστηκε για την κάθε ομάδα επιμύων στην δοκιμασία Τ2. * P<0.05 σε σύγκριση με όλες τις υπόλοιπες ομάδες*

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

4.3. Πείραμα 3: Μολσιδομίνη και 8-OH-DPAT

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων (ανάλυση διακύμανσης με δύο μεταβλητές) έδειξε ότι η κινητικότητα των επίμυων δεν επηρεάστηκε από το 8-OH-DPAT [F(5, 54) = 0,4, P = 0,5, n.s.] ή από την μολσιδομίνη [F(5, 54) = 2,2, P = 0,1, n.s.]. Επίσης, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διπλή αλληλεπίδραση μεταξύ της 8-OH-DPAT και της μολσιδομίνης [F(5, 54)= 0,3, P=0,7, n.s.] (σχεδιάγραμμα 3Α).

Οι συνολικοί χρόνοι εξερεύνησης, όπως έδειξε η ανάλυση διακύμανσης με δύο μεταβλητές δεν αλλοιώθηκαν από τη χορήγηση του 8-OH-DPAT [F(5, 54)= 2,2, P=0,2, n.s.] ή από της μολσιδομίνης [F(5, 54) = 0,08, P = 0,5, n.s.]. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης δεν έδειξαν στατιστική σημαντική διπλή αλληλεπίδραση μεταξύ της 8-OH-DPAT και της μολσιδομίνης [F(5, 54) = 0,7, P = 0,5, n.s.] (σχεδιάγραμμα 3Β).

Τα δεδομένα του δείκτη διάκρισης D έδειξαν σημαντική επίδραση της χορήγησης της 8-OH-DPAT [F(5, 54) = 5.7, P < 0,01] και της μολσιδομίνης [F(5, 54) = 4,2, P < 0,05] αλλά δεν φανερώνουν σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο παραπάνω φαρμάκων[F(5, 54) = 1,7, P = 0,2, n.s.]. Όλες οι πειραματικές ομάδες, εκτός αυτής που χορηγήθηκε διάλυμα φυσιολογικού ορού και 8-OH-DPAT, διέκριναν σημαντικά καλύτερα το νέο από το γνώριμο αντικείμενο [Tukey's post-hoc test, P < 0,05 έναντι της ομάδας που χορηγήθηκε διάλυμα φυσιολογικού ορού και 8-OH-DPAT, σχεδιάγραμμα 3Γ].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

Fig. 3A

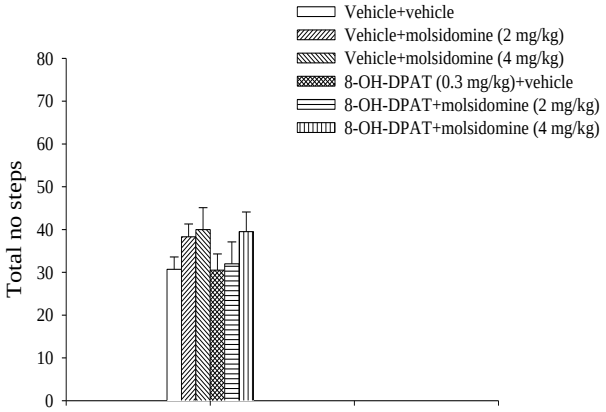


Fig. 3B

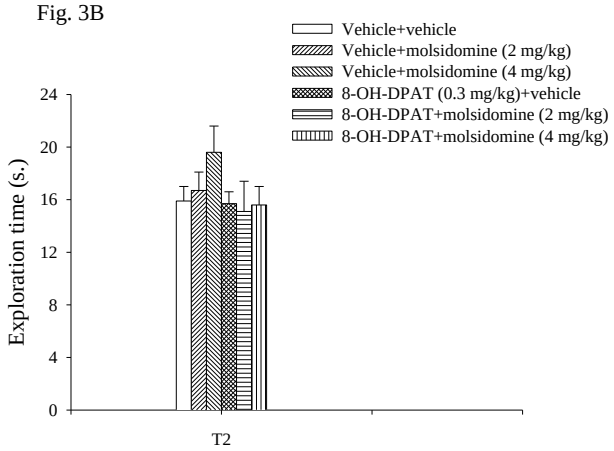
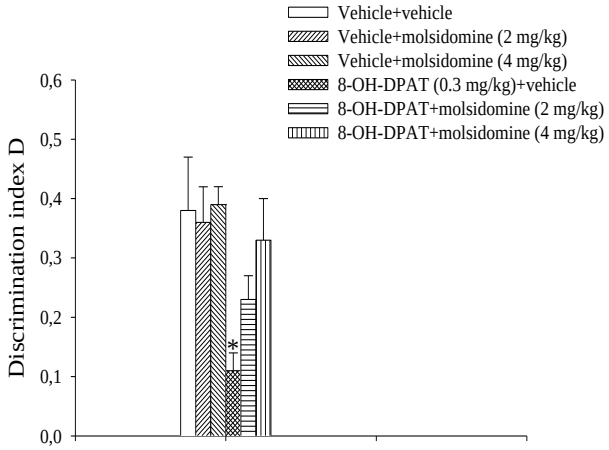


Fig. 3C



Σχεδιάγραμμα 3: *Οι ομάδες έλαβαν 8-OH-DPAT και μολσιδομίνη αμέσως μετά την δοκιμασία T1 υποδορίως και ενδοπεριτονϊακά αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα.* ***(Α)*** *Συνολικός αριθμός βημάτων* ***(Β)*** *συνολικός χρόνος που αναλώθηκε από την κάθε ομάδα των επιμύων στην εξερεύνηση και των δύο αντικειμένων στην δοκιμασία T2.* ***(Γ)*** *Δείκτης διάκρισης D, η επίδοση όπως εκφράστηκε για την κάθε ομάδα επιμύων στην δοκιμασία T2. * P<0.05 σε σύγκριση με όλες τις υπόλοιπες ομάδες*

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

5. Συζήτηση

Η δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου δεν περιλαμβάνει παράγοντες ανταμοιβής ή τιμωρίας, αλλά βασίζεται στην έμφυτη περιέργεια των επίμυων να προτιμούν τα νέα άγνωστα ερεθίσματα και δεν φαίνεται να επηρεάζεται από άλλους παράγοντες [62].

Η χορήγηση της 8-OH-DPAT (0.1 και 0.3 mg/kg) αμέσως μετά το πρώτο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας της αναγνώρισης νέου αντικειμένου προκάλεσε δόσο-εξαρτώμενα ελλείμματα επίδοσης των επίμυων στη δοκιμασία αυτή. Η χορήγηση του φαρμάκου σε υψηλότερη δόση (1 mg/kg) αύξησε την κινητικότητα των πειραματόζωων και τους προκάλεσε διάρροια και συχνουρία με αποτέλεσμα η δόση αυτή να απορριφθεί από την μελέτη.

Προηγούμενες μελέτες [65, 230, 234] αναφέρουν ότι τα ελλείμματα αναγνωριστικής μνήμης που προκαλούνται από την χορήγηση της 8-OH-DPAT στους επίμυες συνοδεύεται συχνά από παρενέργειες στην κινητικότητα τους κάνοντας δύσκολο τον προσδιορισμό της δράσης επί των γνωσιακών ελλειμμάτων. Η παρούσα μελέτη αξιολόγησε την δράση διαφόρων δόσεων της 8-OH-DPAT (0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg και 1 mg/kg) επί της αναγνωριστικής μνήμης. Η 8-OH-DPAT διατάραξε την επίδοση των ζώων χορηγούμενη στην υψηλότερη δόση παρουσιάζοντας ως παρενέργεια ιδιαίτερα αυξημένη κινητικότητα. Επίσης τα πειραματόζωα στην δόση του 1 mg/kg δεν παρουσίασαν καμία τάση για εξερεύνηση. Η δράση της 8-OH-DPAT στην μελέτη αυτή είναι ξεκάθαρη γιατί η χορήγηση της σε δόσεις 0,1 mg/kg και 0,3 mg/kg προκάλεσε αμνησία στους επίμυες χωρίς παρενέργειες στην κινητικότητα και χωρίς να διαταράξει την έμφυτη τάση τους για εξερεύνησης. Επίσης, είναι απίθανο η δράση της 8-OH-DPAT κατά την διάρκεια της

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

δοκιμασίας της αναγνώρισης να οφείλεται σε παρουσία υπολειμμάτων του φαρμάκου γιατί το φάρμακο έχει βραχεία ημίσεια ζωή (περίπου 25 λεπτά) [176] και η αξιολόγηση της δράσης του επί της μνήμης γίνεται τρεις ώρες αργότερα.

Η χορήγηση του ανταγωνιστή WAY 100635 (0.3 και 1 mg/kg) αμέσως μετά το στάδιο της εκπαίδευσης ανταγωνίστηκε επιτυχώς τα ελλείμματα αναγνωριστικής μνήμης των επιμύων που προκάλεσε η χορήγηση της 8-OH-DPAT. Το γεγονός ότι ο αγωνιστής και ο ανταγωνιστής επηρέασαν την επίδοση των ζώων αντικατοπτρίζει την δράση τους στην ρύθμιση των διαδικασιών της μνήμης μετά την εκπαίδευση (αποθήκευση και/ή ανάκληση πληροφοριών). Δεδομένου ότι, η χορήγηση του WAY 100635 έγινε περιφερικά, δεν αποκλείεται η πιθανότητα μη ειδικοί παράγοντες να επηρέασαν την συμπεριφορά των επιμύων. Όμως, κάτι τέτοιο μπορεί να απορριφθεί ως υπόθεση, δεδομένου ότι δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην κινητικότητα και στην ικανότητα εξερεύνησης μεταξύ των διαφορετικών ομάδων πειραματόζωων.

Το παραπάνω αποτέλεσμα συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες [36, 170] στις οποίες βρέθηκε ο ανταγωνιστής WAY 100635 να ανταγωνίζεται τα ελλείμματα μνήμης που προκάλεσε η 8-OH-DPAT και προτείνει την εμπλοκή του $5HT_{1A}$ υποδοχέα στην αναγνωριστική μνήμη.

Η εμπλοκή του NO στις φαρμακολογικές δράσεις που παρατηρούνται μετά την ενεργοποίηση του $5HT_{1A}$ υποδοχέα εξετάστηκε χρησιμοποιώντας έναν ισχυρό δότη του NO, την μολσιδομίνη. Τα πειραματόζωα στα οποία χορηγήθηκαν διάλυμα φυσιολογικού ορού και αυτά που χορηγήθηκαν μολσιδομίνη απέδωσαν ομοίως καλά στην δοκιμασία της αναγνώρισης νέου

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

αντικειμένου. Επίσης η μολσιδομίνη (2 και 4 mg/kg) εξάλειψε τα ελλείμματα αναγνωριστικής μνήμης που προκάλεσε η χορήγηση του 8-OH-DPAT.

Επειδή η μολσιδομίνη χορηγήθηκε ενδοπεριτονάϊκά θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι μη ειδικοί παράγοντες ίσως επηρέασαν την συμπεριφορά των ζώων. Το γεγονός όμως ότι η μολσιδομίνη δεν επηρέασε τα επίπεδα κινητικότητας και εξερεύνησης των ζώων μας επιτρέπει να αποκλείσουμε αυτήν την υπόθεση.

Ο Πιτσίκας και συνεργάτες έδειξαν την μολσιδομίνη να αυξάνει τις γνωσιακές επιδόσεις στην διαδικασία της ANA [186] αλλά και να ανταγωνίζεται την επαγόμενη αμνησία από την χορήγηση σκοπολαμίνης στη διαδικασία της ANA και της παθητικής αποφυγής [185] και την επαγόμενη αμνησία από την χορήγηση αναστολέα της NOS, L-NAME, στην διαδικασία ANA [182]. Ο Πιτσίκας και συνεργάτες επίσης έδειξαν το WAY 100635 να ανατρέπει την αμνησία που προκάλεσε στην διαδικασία της ANA [183]. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας συμφωνούν και επεκτείνουν τις παραπάνω μελέτες, μια και για πρώτη φορά εξετάστηκε η δράση της μολσιδομίνης επί της δράσης αγωνιστή των 5-HT_{1A} υποδοχέων στη μνήμη. Οι μηχανισμοί με τους οποίους η μολσιδομίνη ανταγωνίζεται τα γνωσιακά ελλείμματα των πειραματόζωων που προκαλεί η χορήγηση του 8-OH-DPAT αξίζουν να διερευνηθούν περαιτέρω.

Πειραματικές μελέτες αποδεικνύουν ότι ενεργοποίηση της σεροτονινεργικής δραστηριότητας προκαλεί γνωσιακές διαταραχές. Αντίθετα, η υπολειτουργικότητα του σεροτονινεργικού συστήματος διευκολύνει τις διαδικασίες μνήμης [ανασκόπηση 140]. Το NO ρυθμίζει την έκκριση της σεροτονίνης σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου [189]. Έχει παρατηρηθεί με την μέθοδο της μικροδιάλυσης ότι χαμηλές συγκεντρώσεις δοτών του NO

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

μειώνουν την έκκριση της σεροτονίνης στη ραφή [217], ενώ την αυξάνουν στον ιππόκαμπο [209] και στο πρόσθιο λοβό [217] και ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις των δοτών του NO προκαλούν αντίθετα αποτελέσματα [209, 217, 237]. Το συμπέρασμα από αυτές τις μελέτες αντανακλά την πολυπλοκότητα της λειτουργικής αντίδρασης μεταξύ του NO και της σεροτονίνης και προτείνει ότι το NO ίσως παρουσιάζει διεγερτική αλλά και κατευναστική δράση σε *in vivo* συνθήκες.

Συνοψίζοντας, η παρούσα μελέτη καταδεικνύει ότι οι μετασυναπτικοί $5HT_{1A}$ υποδοχείς εμπλέκονται στις διαδικασίες της αναγνωριστικής μνήμης και από όσο γνωρίζουμε, για πρώτη φορά μέχρι την χρονική στιγμή που πραγματοποιήθηκε η μελέτη δείξαμε ότι ο δότης του NO, η μολσιδομίνη ανταγωνίζεται τις διαταραχές μνήμης που προκαλεί η ενεργοποίηση των σεροτονινεργικών $5HT_{1A}$ υποδοχέων τύπου. Τα τελευταία ευρήματα υποστηρίζουν την λειτουργική αλληλεπίδραση μεταξύ του σεροτονινεργικού υποδοχέα τύπου $5HT_{1A}$ και του νιτρεργικού συστήματος και συμφωνούν με άλλες νευροχημικές μελέτες που δείχνουν με την μέθοδο της μικροδιάλυσης ότι οι δότες του NO μειώνουν την σεροτονινεργική διαβίβαση στον ιππόκαμπο [217, 237].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

6. Διεξαγωγή Περαιτέρω Μελετών για την Διερεύνηση του Ρόλου του NO στην Ψυχομιμητική δράση των ανταγωνιστών των NMDA υποδοχέων

Μετά την ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης αξιολογήθηκε η ανταγωνιστική δράση της μολσιδομίνης στην ψυχομιμητική δράση του MK-801, ενός στην ανταγωνιστή των NMDA υποδοχέων, στη δοκιμασία της αναγνώρισης νέου αντικειμένου. Μελετήθηκε η ικανότητα της μολσιδομίνης να ανατρέψει την ψυχομιμητική δράση του MK-801 στην διαδικασία της Αναγνώρισης των Αντικειμένων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μολσιδομίνη ανταγωνίζεται τις γνωσιακές διαταραχές των ζώων που προκάλεσε το MK-801 και προτείνουν ότι το NO πιθανόν να εμπλέκεται στην ψυχομιμητική δράση των ανταγωνιστών των NMDA υποδοχέων.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

7. Βιβλιογραφία

[1] Al-Sadoni H, Ferro A. S- Nitrothiols: a class of nitric-oxide donor drugs. Cli Sci 2000;98:507-520

[2] Arancio O, Kiebler M., Lee CJ, Lev-Ram V, Tsien RY, Kandel ER, Hawkings RD. Nitric Oxide acts directly in the presynaptic neuron to produce long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Cell*1996; 87: 1025-1035.

[3] Arnelle DR, Stamler JS. NO+, NO, and NO- donation by S-nitrosothiols: implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. Arch Biochem Biophys 1995; 318: 279- 285

[4] Azmitia, E.C., & Whitaker-Azmitia, P.M. Anatomy, cell biology, and plasticity of serotonergic system. In E. F. Bloom & D. J. Kupfer (Eds.), Psychopharmacology: The fourth generation of progress. New York: Raven. 1995; pp. 443-449

[5] Babbedge RC, Bland Ward PA, Hart SL, Moore Pk. 7-Nitroindazole. Br J Pharmacol 1993; 110: 225- 228

[6] Balligner SW, Patterson C, Yan CN, Doan R, Burow DL, Young CG, Yakes FM, Van Houten B, Ballinger CA, Freeman BA, Rungue MS. Hydrogen peroxide- and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells. Circ. Res. 2000; 86: 960- 966

[7] Bal-Price, A.; Brown, G.C. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. *J. Neurosci.* 2001; 21: 6480-91.

[8] Bannet BM, McDonald BJ, Nigam R, Simon WC. Biotransformation of organic nitrates and vascular smooth muscle cell function. Trends Pharmacol Sci 1994; 15: 245- 249

[9] Barros D., Souza T., De David T., Choi H., Aguzzoli A., Madche C., ArdehghiP., Medina J.,Izquierdo I. Simulataneous modulation of retrieval by dopaminergic D1,β- noradrenergic, serotonergic-1A and cholinergic muscarinic receptors in cortical structures of the rat. Behav Brain Res 2001;124:1-7

[10] Bartolomeno, A. C., Morris, H., Moyer. J. A., & Boast, C. A. Attenuated MK-801-indduced impairment of radial maze performance in rats: A possible model predicting efficacy in Alzheimer's disease. Society of Neuroscience Abstract 1996;22,143.

[11] Bates JN, Baker MT, Guerra R Jr, Harrison DG. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. Biochem Pharmacol 1991;42 :S157- S165

[12] Beckman, J.S. Peroxynitrite versus hydroxyl radical: the role of nitric oxide in superoxide-dependent cerebral injury. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1994; 738: 69- 75.

[13] Beckman, J.S.; Koppenol, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.*,1996; 271: C1424- 37.

[14] Bernabeu R, Levi de Stein ML, Fin C, Izquiredo I, Medina JH. Role of hippocampal NO in acquisition and consolidation of inhibitory avoidance learning. Neuroreport, 1995;6: 1498-1500.

[15] Bernabeu R, Schroder N, Quevedo J, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH. Further evidence for the involvement of a hippocampal cGMP/cGMP-dependent protein kinase cascade in memory consolidation. NeuroReport 1997

[16] Bernabeu, R., Cammarota, M., Izquierdo, I., & Medina J.H. Involvement of glutamate AMPA receptors and cAMP/protein kinase A/CREB-P pathway in memory consolidation of an aversive learning task in rats. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, in press (1997b).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

[17] Biel M, Sautter A, Ludwing A, Hofmann F, Zong X. Cyclic nucleotide-gated channels-mediators of NO-cGMP regulated processes. Naunym-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 1998; 358: 140-144
[18] Bland Ward PA, Moore PK. 7-Nitro indazole derivatives are potent inhibitors of brain, endothelium and inducible isoforms of nitric oxide synthase. Life Sci 1995;57: 131- 135
[19] Blier, P., Lista, A., & De Montigny, C. Differential properties of pre- and postsynaptic 5-hydroxytryptaminelA receptors in the dorsal raphe and hippocampus. Effect of spiper-one. Journal of Pharmacology Experimental Therapeutic. 1993; 265:7-15.
[20] Bohme GA, Bon Ch, Stutzman J-M, Doble A, Blanchard J-C. Possible involvement of NO in long-term potentiation. Eur J Pharmacol 1991; 199: 379-381
[21] Bolanos, J.P.; Heales, S.J.; Land, J.M.; Clark, J.B. Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: differential susceptibility of neurones and astrocytes in primary culture. *J. Neurochem.* 1995; 64: 1965 -72.
[22] Bolanos, J.P.; Peuchen, S.; Heales. S.J.; Land, J.M.; Clark, J.B. Nitric oxide-mediated inhibition of the mitochondrial respiratory chain in cultured astrocytes.*J. Neurochem,* 1994; 63: 910- 26.
[23] Bradley J. Li. J, Zhang Y, Bakin R, Matsuzaki O. Expression and analysis of subunits of olfactory cyclic nucleotide-gated channel through modification of sulphydryl groups by NO compounds. Neuron 1995; 16: 377-385
[24] Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 9030-9033
[25] Bredt DS. Molecular characterization of nitric oxide synthase. In:Vincent S, Eds. Nitric oxide in the nervous system. New York: Academic Press, 1995:1-21
[26] Brown G.C. Nitric oxide as a competitive inhibitor of oxygen consumption in the mitochondrial respiratory chain. *Acta Physiol. Scan.*, 2000; 168: 667-74.
[27] Brown, G.C. Nitric oxide and mitochondrial respiration. Biochim. *Biophys. Acta,* 1999; 1411: 351- 69.
[28] Brown, G.C.; Cooper, J.M. Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett.*, 1994; 356: 395.
[29] Büyükuysal. R.L. Effect of nitric oxide donors on endogenous dopamine release from rat striatal slices. I. Requirement to antioxidants in the medium. Fandam. Clin. Pharmacol. II. 1997; 519 – 527.
[30] Bujas-Bobanovic M, Bird DC, Robertson HA, Dursun SM. Blockade of phencyclidine-induced effects by a nitric oxide donor. Br J Pharmacol. 2000 Jul;130(5):1005-12.
[31] Burgaud JL, Ongini E, Del Soldato P. Nitric oxide-releasing drugs: a novel class of effective and safe therapeutic agents. Ann N.Y.Acad Sci 2002; 962: 360- 371
[32] Burnett AL, Nelson RJ, Calvin DC, Liu J-X, Demas GE, Klein SL, Kriegsfeld LJ, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH. Nitric oxide dependent penile erection in mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Mol Med* 1996; 2: 288-296.
[33] Butler, A.R. and Williams, D.H.L. The physiological role of nitric oxide. J. Chem. Soc. Rev.22, 1993; 233-241.
[34] Carli M, Balducci C, Millan MJ, Bonalumi P, and Samanin R. S 15535, a benzodioxopiperazine acting as presynaptic agonist and postsynaptic 5-HT1A receptor antagonist, prevents the impairment of spatial learning caused by intrahippocampal scopolamine . Br J Pharmacol 1999;128:1207-1214.
[35] Carli M, Bonalumi P, Samanin R. Stimulation of 5-HTIA receptors in the dorsal raphe reverses the impairment of spatial learning caused by intrahippocampal scopolamine in rats. Eur J Neurosci 1998; 53:527-30.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

[36] Carli M, Luschi R, Garofalo P, Samanin R. 8-Hydroxy-OH-DPAT impairs spatial but not visual learning in a water maze by stimulating the 5-HT1A receptor in the hippocampus. Behav Brain Res 1995;67:67-74.
[37] Cassel, J.C., & Jeltsch, H. Serotonergic modulation of cholinergic function in the central nervous system: Cognitive Implications. Neuroscience. 1995;69:1-41.
[38] Castro, L.; Rodriguez, M.; Radi, R. Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 29409-15.
[39] Cavoy A, Delacour J. Spatial but not object recognition is impaired by aging in rats. Physiol Behav 1993;53:527-30.
[40] Chien W., Liang K., Teng C., Kuo S., Lee F., Fu W. enhancement of long-term potentiation by a potent nitric oxide-guanylyl cyclise activator, 3-(5-hydroxymethyl-2-furyl)-1-benzyl-indazole. Mol Pharmacol 2003;63: 1322-1328
[41] Choi YB, Lipton SA. Redox modulation of the NMDA receptor. Cell. Mol. Life Sci. 2000; 57: 1535- 1541
[42] Cleeter, M.W.; Cooper, J.M.; Darley-Usmar, V.M.; Moncada. S.; Shapira, A.H. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett.*, 1994; 345: 50- 4.
[43] Cole, B. J., Jones, G. H., & Turner, J.D. 5-HA_{1A} receptor agonists improve the performance of normal and scopolamine-impaired rats in an operant delayed matching to position task. Psychopharmacology. 1994;116: 135-142.
[44] Consolo S., Ramponi S., Ladinsky H., Baldi G. A critical role for D1 receptors inthe 5HT1A-mediated facilitation of in vivo acetylcholine release in the rat cortex. Brain Res 1996;707:320-323
[45] Contestabile A., Monti B., Contestabile A. Ciani E. Brain nitric oxide and itw dual role in neurodegeneration/neuroprotection: Understanding molecular Mechanisms to devise drug approaches. Cur Medic Chem 2003; 10:1241-1253
[46] Cosi C, Suzuki H, Milani D, Facci L, Menegazzi M, Vantini G, Kanai Y, Skaper SD.
[47] Crane BR, Arvai AS, Gachhui R, Wu C, Ghosh DK, Getzoff ED, Tainer JA. The structure of nitric oxide synthase oxygenase domain and inhibitor complexes. Science 1997; 278: 425-431
[48] Crane BR, Arvai AS, Ghosh DK, Wu C, Getzoff ED, Stuehr DJ, Tainer JA. Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate. Science 1998; 279: 2121- 2126
[49] Darley- Usmar VM, Hogg N, O' Leary VJ, Wilson MT, Moncada S. The simultaneous generation of superoxide and nitric oxide can initiate lipid peroxidation in human low density lipoprotein. Free Radic. Res. 1992; 17: 9-20
[50] Dawson TM, Bredt DS, Fotuhi S, Hwang PM, Snyder SH. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissue. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88:7797-7801
[51] Dawson TM, Dawson VL. Nitric oxide synthase: Role as a transmitter/mediator in the brain and endocrine system. Annu Rev Med 1996; 47: 219-227
[52] Dawson TM, Snyder SH. Gases as biological messengers: Nitric oxide and carbon monoxide in the brain. J Neurosci 1994; 14: 5147-5159
[53] Dawson, V.L. and Dawson, T.M. Nitric oxide actions in neurochemistry. Neurochem. Int. 1996;29:97-110.
[54] Desai KM, Sessa WC, Vane JR. Involvement of nitric oxide in the reflex relaxation of the stomach to accommodate food or fluid. *Nature 1991; 351: 477-479.*
[55] Dev KK, Morris BJ. Modulation of AMPA binding sites by nitric oxide. J Neurochem 1994; 63: 946-952

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

[56] Dinerman JL, Dawson TM, Schell MJ, Snowman A, Snyder SH. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: Implications for synaptic plasticity. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 4214- 4218
[57] Ding JM, Faiman LE, Hurst WJ, Kuruashkina LR, Gillete MU. Resetting the biological clock: Mediation of nocturnal CREB phosphorylation through light, glutamate and nitric oxide. J Neurosci 1997; 17:667-675
[58] Dunn RW, Reed TA, Copeland PD, Frye CA. The nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole displays enhanced anxiolytic efficacy without tolerance in rats following subchronic administration. Neuropharmacology. 1998 Jul;37(7):899-904.
[59] Early B., Glennon M., Lally M., Leonard B.E. and Juniem J.L. Autoradiographic distribution of cholinergic muscarinic receptors and serotonin(2) receptors in olfactory bulbectomized (OB) rats after chronic treatment with mianserin and desipramine. Hum. Psychopharmac. Clin. Exp. 1995;9:397-407.
[60] El Husseini AE, Bladen C, Vincent SR. Expression of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel in the rat brain. NeuroReport 1995; 6: 1131-1135
[61] Eliasson MJ, Bao J, Pieper A, Wang ZQ, Dawson TM, Snyder SH, Dawson VL. Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. Nat. Med. 1997; 3: 1089- 1095
[62] Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. Behavioral data. Behav Brain Res 1988;31:47-59
[63] Erdemli G, Krnjevie K. Nitric oxide tonically depresses a voltage- and Ca-dependent outward current in hippocampal slices. Neurosci Lett 1995; 201:57-60
[64] Espey, M.G.; Miranda, K.M.; Thomas, D.D.; Xavier, S.; Citrin, D.; Vitek, M.P.; Wink, D.A. A chemical perspective on the interplay between NO, reactive oxygen species, and reactive nitrogen oxide species. Ann. N.Y. Acad. Sci.; 2002; 962: 195- 206.
[65] Evenden JL, Angeby-Moller K. Effects of 8-hydroxy-2(di-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT) on locomotor activity and rearing of mice and rats. Psychopharmacology 1990;102:485-91.
[66] Feelisch M.The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. Naunym-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 1998; 358: 113-122
[67] Finkbeiner S, Greenberg ME. Ca+2 – dependent route to Ras: mechanisms for neuronal survival, differentiation and plasticity. Neuron 1996; 16:233-236
[68] Finlay. J.M., Zigmond, M.J. A critical analysis of neurochemical methods for monitoring transmitter dynamics in the brain. In: Bloom. F.F. Kupfer. D.J. (Eds.). Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress. Raven Press, New York. 1995; pp. 29-39.
[69] Finn JT, Grunwald ME, Yau KW. Cyclic nucleotide-gated ion channels: an extended family with diverse functions. Ann Rev Physiol 1996; 58: 395-426
[70] Fischer, H., Prast. H., Philippu. A. Adenosine release in the ventral striatum of the rat is modulated by endogenous nitric oxide. Eur. J. Pharmacol.1995; 275: R5-R6.
[71] Francis P., Palmer A.M., Snape M.Wilcock G.K The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress.. J Neurol Psychiatry. 1999;66:137-147
[72] Fukuda T, Hanley DF, Wilson DA, Dawson VL, Dawson TM. Immunohistochemical localization of neuronal nitric oxide synthase in the hippothalamus and neurohypophysis of the rat. Neurosci Lett 1997, abstract
[73] Furchgott RF, ZawadzkiJV. *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.* Nature 1980; 288: 373-376

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

[74] Garthwaite J, Charles SL, Chess- Williams R. *Endothelium- derived relaxing factor on activation of NMDA receptors suggests role of intercellular messenger in the brain.* Nature 1988; 336: 385-388
[75] Garthwaite J, Garthwaite G, Palmer RM, Moncada S. *NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in the rat brain slices.* Eur J Pharmacol 1989; 172: 413-416
[76] Ghafourifar, P. and Richter, CNitric oxide synthaseactivity in mitochondria.FEBS Lett. . 1997;418:291-296
[77] Giulivi, C., Poderoso, J.J. and Boveris, A. Production of nitric oxide by mitochondria. J. Biol. Chem. 1998;273:11038-11043.
[78] Glaum SR, Slater NT, Rossi DJ, Miller RJ. Role of metabotropic glutamate (ACPD) receptors at the parallel fibre-Purkinje cell synapse. J Neurophysiol 1992; 68: 1453-1462
[79] Golde, S.; Chandran, S.; Brown, G.C.; Compston, Aa. Different pathways for iNOS-mediated toxicity in vitro dependent on neuronal maturation and NMDA receptor expression. J. Neurochem, 2002, 82, 269- 82.
[80] Gonzalez- Zulueta M, Feld AB, Klesse LJ, Kalb RG, Dillman JF, Parada LF, Dawson TM, Dawsom VL. Requirement for nitric oxide activation of p21(ras)/extracellular regulated kinase in neuronal ischemic preconditioning. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 436
[81] Good PG, Hsu A, WernerP, Perl DP, Olanow CW. Widespread Nitration of Pathological Inclusions in Neurodegenerative Synucleinopathies. J. Neuropathol Exp. Neurol. 1998; 57: 338- 342
[82] Gopalakrishna R, Chen ZH, GundimedaU. Nitric oxide and nitric oxide-generating agents induce a reversible inactivation of protein kinase C activity and phorbol ester binding. J Biol. Chem. 1993; 268: 27180- 27185
[83] Green LC, TannenbaumSR, Goldmann P. *Nitrate synthesis in the germ free and conventional rat.* Science 1981;212: 56-58
[84] Griffith OW, Gross SS. In: methods in nitric oxide research. Feelish M, Stamler JS. Eds Wiley Chichester UK 1996; 187-208
[85] Gu Z. Kaul M, Kridel SJ, Cui J, Strongin A, Smith JW, Liddington RC, Lipton SA. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. Science. 2002;16:297(5584):1186-90.
[86] Gudi T, Casteel D, Vinson C, Boss GR, Pilz RB. NO activation of fos promoter elements requires nuclear translocation of G-kinase I and CREB phosphorylation but is independent of MAP kinase activation. Oncogene 2000; 19:6324-6333
[87] Guevara – Guzman. R., Emson. P.C., Kendrick. K.M. Modulation of in vivo striatal transmitter release by nitric oxide and cyclic GMP. J. Neurochem. 1994; 62: 807-810.
[88] Haby C, Lisovosky F, Aunis D, Zwiller J. Stimulation of the cyclic GMP pathway by NO induces expression of the immediate early genes c-fos and junB in PC12 cells. J Neurochem. 1994;62(2):496-501.
[89] Haley JE, Wilcox GL, Chapman PF. The role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. Neuron 1992; 8:211-216
[90] Halliwell B. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? Ann. N.Y. Acad. Sci. 2002; 962: 182- 194
[91] Hanbauer. I., Wink. D., Osawa. Y., Edelman. G.M., Gally. J.A. Role of nitric oxide in NMDA-evoked release of [^{3}H]-dopamine from striatal slices. NeuroReport 1992;3: 409-412.
[92] Harder, J.A., Maclean, C.J., Alder, J.T., Francis, P.T., & Ridley, R.M. The 5-HT_{1A} antagonist, WAY 100635, ameliorates the cognitive impairment induced by fornix transaction in the marmoset. Psychopharmacology. 1996;127:245-254.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

[93] Harrison DG, Bates JN. The nitrovasodilators. New ideas about old drugs. Circulation 1993; 87: 1461- 1467
[94] Hemart N, Daniel H, Jailard D, Crepel F. Receptors and second messengers involved in long-term depression in the rat cerebellar slices in vitro: a reappraisal. Eur J Pharmacol 1995; 7: 45-53
[95] Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z. M*acrophage cytotoxicity: Role of L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite.* Science 1987; 235: 473-476
[96] Hirsch DB, Stiner JP, Dawson TM, Mammen A, Hayek E, Snyder SH. Neurotransmitter release regulaated by nitric oxide in PC-12 cells and brain synaptosomes. *Curr Biol* 1993; 3: 749-754.
[97] Hobbs AJ, Higgs A, Moncada S. Inhibtion Of Nitric-oxide Synthase as a otential therapeutic target. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1999; 39: 191-220
[98] Hogg N, Kalyanaraman B. Mechanism in the reaction of cytochrome c oxidase with organic hydroperoxides: an ESR spin-trapping investigation. Biochem. Biophys. Acta. 1999; 1411: 378- 384
[99] Hokfelt T, Ceccatelli S, Gustafsson L, Hulting A-L, Verge V, Villar M, Xu X-J, Xu Z-Q, Wiesenfeld-Hallin Z, Zhang X. Plasticity of NO synthase expression in the nervous and endocrine systems. *Neuropharmacology* 1994; 33: 1221-1227.
[100] Huang D, Shenoy A, Cui J, Huang W, Liu PK. In situ detection of AP sites and DNA strand breaks bearing 3'-phosphate termini in ischemic mouse brain. FASEB J. 2000; 14: 407- 417
[101] Human Pharmacology. Molecular to clinical. BrodyT., Larner J., Minneman K.Mosby-Year Book, USA 3rd edition. p303
[102] Ignaro LJ, Buga GM, Wood KS, Chaudhuri G. *Endothelium- derived relaxing factor produced and released from artery and veins in nitric oxide.* Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 9265-9269
[103] Imperat. A., Obinu, M.Z., Dazzi. L., Gessa. G.L. Does dopamine exert a tonic inhibitory control on the release of striatal acetylcholine in vivo? Eur. J. Pharmacol. 1994; 251: 271-179.
[104] Izqierdo I., Medina J. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampusand itw connection to activity in other brain structures. Neurobiology of learning and memory 1997;68:285-316
[105] Jacobs, B. L., & Azmitia, E. C. Structure and function of the brain serotonin system. Physiological Reviews. 1992;72:165-229.
[106] Jaffrey SR, Erdjument- Bromage H, Ferris CD, Tempst P, Snyder SH. Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. Nat. Cell. Biol. 1993; 3: 193-197
[107] Jones. N.M., Loiacono, R.E., Beart. P.M. Roles of nitric oxide as an intra- and interneuronal messenger at NMDA release – regulating receptors : evidence from studies of the NMDA-evoked release of , [^{3}H]noradrenaline and D-[^{3}H]aspartate from rat hippocampal slices. J. Neurochem. 1995;64: 2057-2063.
[108] Kaehler. S.T., Singewald. N., Sinner. C., Philippu. A. Nitric oxide modulates the release of serotonin in the rat hypothalamus. Brain Res.1999;835: 349-349.
[109] Kanner J, harel S, Granit R. Nitric oxide as an antioxidant. Arch. Biochem. Biophys. 1991; 289: 130- 136
[110] Kantor DB, Lanzrein M, Stary SJ, Sandoval GM, Smith WB, Sullivan BM, Davidson N, Schuman EM. A role for endothelial NO synthase in LTP revealed by adenovirus-mediated inhibition and rescue. Science 1996; 274: 1744-1748
[111] Kelm M, Dahmann R, Wink D, Feelisch M. The nitric oxide/superoxide assay. Insights into the biological chemistry of the NO/O-2. interaction. J. Biol. Chem. 1997; 272: 9922-9932
[112] Kendrick K.M., Guevara-Guzman R. Dela Riva C., ChristensenJ.,OstergaardK.,Emson P.C. NMDA and kainate-evoked release of nitric oxide and classical transmittersin the rat stratium: in vivo evidence that nitric oxide may play a neuroprotective role. Eur J neurosci 1996;8:2619-2634

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

[113] Kim PK, Kwon YG, Chung HT, Kim YM. Regulation of Caspases by Nitric Oxide. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2002; 962: 42- 52
[114] Kim YM, Kim TH, Seol DW, Talanian RV, Billiar TR. Pediatric Critical Care Medicine: Basic Science and Clinical Evidence. J. Biol. Chem. 1998; 273: 31437- 31441
[115] Klamer D, Engel JA, Svensson L. The nitric oxide synthase inhibitor, L-NAME, block phencyclidine-induced disruption of prepulse inhibition in mice. Psychopharmacology (Berl). 2001 Jul;156(2-3):182-6.
[116] Klotz LO, Schroeder P, Sies H. Peroxynotrine is a potent inhibitor of NF-κ B activation triggered by inflammatory stimuli in cardiac and endothelial cell lines. Free Radic. Biol. Med. 2002; 33: 737-743
[117] Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. Chem. Res. Toxicol. 1992; 5: 834-842
[118] Kruman II, Pedersen WA, Springer JE, Matsson MP.
[119] Lander HM, Ogiste JS, Pearce SF, Levi R, Novogrodsky A. Nitric oxide-stimulated guanine nucleotide exchange on p21ras. J. Biol. Chem. 1995; 270: 717- 720
[120] Larkman. A.U., Jack. J.J. Synaptic plasticity: hippocampal LTP. Curr. Opin. Neurobiol. 1995;5: 324-334.
[121] Laurence. A.J., Jarrott. B. Nitric oxide increases interstitial excitatory amino acid release in the rat dorsomedial medulla oblongata. Neurosci. Lett.1993;151: 126-129.
[122] Lauth. D., Hertting. G., Jackisch. R. Involvement of nitric oxide synthase in 3.4-diaminopyridine-evoked noradrenaline release in rat hippocampus. Eur. J. Pharmacol. 1993; 236:165-166.
[123] Lev- Ram V, Wong ST, Storm DR, Tsien RY. A new form of cerebellar long-term potentiation is post-synaptic and depends on nitric oxide but not c AMP. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 8389-8993
[124] Levy DI, Sucher NJ, Lipton SA. Redox modulation of NMDA receptor-mediated toxicity in mammalian central neurons. Neurosci. Lett. 1990; 110: 291-296
[125] Lewin MR, Walters ET. Cyclic GMP pathway is critical for inducing long-term sensitization of nociceptive sensory neurons. Nature Neurosci 1999; 2:18-23
[126] Lewis P. R. and Shute C.C. The cholinergic limbic system: projections to hippocampal formation, medial subfornical organ and supra-optic crest. Brain 1967;90:521-540.
[127] Li S, Quock RM. Effects of a nitric oxide donor on behavior and interaction with nitrous oxide in the mouse light/dark exploration test. Eur J Pharmacol. 2002 Jun 28;447(1):75-8.
[128] Linden DJ Connor JA. Long-term depression of glutamate currents in cultured cerebellar purkinje neurons do not require nitric oxide signalling. Eur J Neurosci 1992; 4: 10-15
[129] Liu Z, Martin LJ. Motor neurons rapidly accumulate DNA single-strand breaks after in vitro exposure to nitric oxide and peroxynitrite and in vivo axotomy. J Comp Neurol. 2001;26:432(1):35-60.
[130] Lonart. G., Wang. J., Johnson. K.M. Nitric oxide induces neurotransmitter release from hippocampal slices. Eur. J. Pharmacol. 1992;220: 271-272.
[131] Lorrain. D.S., Hull, E.M. Nitric oxide increases dopamine and serotonin release in the medial preoptic area. NeuroReport 1993;5: 87-89.
[132] Lorrain. D.S., Matuszewich. L., Howard. R.V., Du. J., Hull. E.M. Nitric oxide promotes medial preoptic dopamine release during male rat copulation. NeuroReport , 1996;8: 31 – 34.
[133] Lu F, Selak M, O' Connor J, Croul S, Lorenzana C, Butunoi C, Kalman B. Oxidative damage to mitochondrial DNA and activity of mitochondrial enzymes in chronic active lesions of multiple sclerosis. J. Neurol. Sci. 2000; 177: 95- 103

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

[134] Lu JF, Kandel ER, Hawkins RD. TITLE. J Neurosci 1999; 696: 140
[135] Manzoni O, Prezeau L, Marin P, Deshager S, Bockaert J, Fagni L. Nitric oxide-induced blockade of NMDA receptors. Neuron 1992; 8: 653-662
[136] Mark RJ, Lovell MA, Markesbery WR, Uchida K, Mattson MP. A Role for 4-Hydroxynonenal, an Aldehydic Product of Lipid Peroxidation, in Disruption of Ion Homeostasis and Neuronal Death Induced by Amyloid β-Peptide. J. Neurochem. 1997; 68: 255- 264
[137] Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD, Wishnok JS. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: Nitric oxide is an intermediate. Biochemistry 1988; 27: 8706-8711
[138] Marrosu, F., Formal, C.A., Metzler, C. W., Jacobs, B.L. 5-HT_{1A} agonists induced hippocampal theta activity in freely moving cats: Role of presynaptic 5-HT_{1A} receptors. Brain Research. 1996;739:192-200.
[139] Mattson MP. The Role of Apoptosis in Neurodegenerative Diseases. Trends Neurol. Sci. 1998; 21: 53- 57
[140] McEntee WJ, Crook Th. Serotonin memory and the aging brain. Psychopharmacology 1991;103:143-9.
[141] McGaugh, J.L. Dissociating learning and performance: Drug and hormone enhancement of memory storage . Brain Research Bulletin. 1989;23: 339-345.
[142] McLeod TM, López-Figueroa AL, López-Figueroa MO. Nitric oxide, stress, and depression. Psychopharmacol Bull. 2001;35(1):24-41.
[143] Meffert MK, Calakos NC, Scheller RH, Schulman H. Nitric oxide modulaates synaptic vesicle docking/fusion reactions. *Neuron* 1996; 16: 1229-1236.
[144] Meffert MK, Premack BA, Schulman H. Nitric oxide stimulates Ca^{2+} -independent synaptic vesicle release. *Neuron* 1994; 12: 1235-1244.
[145] Melino G, Catani MV, Corazzari M, Guerrieri P, Bernassola F. Nitric oxide can inhibit apoptosis or switch it into necrosis. Cell. Mol. Life Sci. 2000; 57: 612-622
[146] Melino G, Nistico A, Finazzi A. S-nitrosylation regulates apoptosis. Nature 1997; 388: 432- 433
[147] Meneses A, Hong E. 5-HT1A receptors modulate the consolidation of learning in normal and cognitively impaired rats. Neurobiol Learn Mem 1999;71:207-18.
[148] Meneses, A., & Hong, E. A pharmacological analysis of serotonergic receptors: Effects of their activation or blockade in learning. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry. 1997a;21:273-296.
[149] Meneses, A., & Hong, E. Mechanisms of action of 8-OH –DPAT on learning and memory. Pharmacology Biochemistry Behavior. 1994b;49:1083-1086.
[150] Meneses, A., & Hong, E. Modification of 8-OH –DPAT effect on learning by manipulation of the assay conditions. Behavioral Neural Biology. 1994a; 61: 29-35.
[151] Meneses, A., & Hong, E. Role of 5-HT_{1A} receptors in the acquisition, consolidation, and retrieval of learning. CNS Drug Review, (1997b), 3, 68-82.
[152] Meyer CR, Spangler EL. Patel n, London ED, Ingram DK. Imaired Learning in rats in a 14-unit T-maze by 7-nitroindazple, a neuronal nitric oxide synthase inhibitor, is attenuated by the nitric oxide donor, mosidomine. Eur Pharmacol 1998;341:17-22.
[153] Moncada S, Higgs EA. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide.FASEB J. 1995; 9 :1319- 1330
[154] Montague PR, Gancayco CD, Winn MJ, Marchase RB, Friedlander MJ. Role of NO production in NMDA receptor – mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. *Science* 1994; 263: 973-977.
[155] Moore PK, Wallace P, Gaffen Z, Hart SL, Babbedge RC. nhibition of rat cerebellar nitric oxide synthase by 7-nitro indazole and related substituted indazoles. Br J Pharmacol 1993; 110: 219- 224

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

[156] Morley JE, Farr SA, Suarez MD, Flood JF. Nitric oxide synthase inhibition and food intake : Effects on motivation to eat in female mice. *Pharmacol Biochem Behav* 1995; 50: 369-373.
[157] Morley JE, Flood JF. Competitive antagonism of nitric oxide synthase causes wight loss in mice. *Life Sci* 1992; 51: 1285-1289.
[158] Morley JE, Flood JF. Evidence that nitric oxide modulates food intake in mice. *Life Sci* 1991; 49: 707-711.
[159] Morris BJ. *In situ* hybridization of astrocytes and neurons cultured *in vitro.* J Biol. Chem. 1995; 270: 24740
[160] Muscara MN, Wallace JL. Nitric oxide V: therapeutic potential of nitric oxide donors and inhibitors. Am J Physiol 1999; 276: G1313- G1316
[161] Nakahara. K., Yokoo, H., Yoshida. M., Tanaka, M., Shigemori, M. Effect of nitric oxide on central dopaminergic neurons. No. To. Shinkei. , 1994;46: 1147-1153.
[162] Nelson JR, Kriegsfield JL, Dawson LV, Dawson MT. *Effects of Nitric Oxide on neuroendocrine function and behavior.* Frontiers in neuroendocrinology 1997; 18: 463-491
[163] Neuroinflammation Working Group, The. Brain inflammation and oxidative stress in a transgenic mouse model of Alzheimer-like brain amyloidosis. Neurobiol Aging 2000; 21: 383- 421
[164] Νευροεπιστήμη και συμπεριφορά. Kandel E.R., Scwartz J.H., Jessel T.M. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης. 2η Εκδοση. 2000. σελ 3,5-6
[165] Νευροεπιστήμη της συμπεριφοράς. Παναγής Γ. Εκδόσεις Πασχαλίδη. 2002. κεφάλαιο 3. σελ. 97
[166] O' Dell TJ, Hawkins RD, Kandel ER, Arancio O. Tests of the roles of two diffusible substances in LTP: Evidence for NO as a possible early retrograde messenger. Proc Nat Acad Sci USA 1991; 88: 11285-11289
[167] Ohki K, Yoshida K, Hagiwara M, Harada T, Takamura M, Ohashi T, Matsuda H, Imaki J. Nitric oxide induces c-fos gene expression via cyclic AMP response element binding protein (CREB) phosphorylation in rat retinal pigment epithelium. Brain Res 1995; 696: 140-144
[168] Ohno, M., Arai. L., Watanabe. S. W-methyl-D-aspartate stimulates dopamine release through nitric oxide formation in the nucleus accumbens of rats. Brain Res. , 1995;699: 332-335.
[169] Okakura. K., Yamatodani. A., Mochizuki. T., Horu. A., Wada. Hl. Glatamatergic regulation of histamine release from rat hypothalamus. Eur. J.Pharmacol.1992; 213: 189-192.
[170] Otano A, Garcia-Osta A, Ballaz S, Frechilla D, Del Rio J. Facilitation by 8-OH-DPAT of passive avoidance performance in rats after inactivation of 5-HT1A receptors. Br J Pharmacol 1999;128:1691-8.
[171] Packer, M.A.; Murphy, M.P. Peroxynitrite formed by simultaneous nitric oxide and superoxide generation causes cyclosporin-A-sensitive mitochondrial calcium efflux and depolarisation. Eur. J. Biochem., 1995; 234: 231- 9.
[172] Packer, M.A.; Murphy, M.P. Peroxynitrite causes calcium efflux from mitochondria which is prevented by Cyclosporin A. *FEBS Lett.*, 1994; 345: 237-40.
[173] Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium- derived relaxing factor.* Nature 1987; 327: 524-526
[174] Pantopoulos K, Hentze MW. Nitric oxide signaling to iron-regulatory protein: direct control of ferritin mRNA translation and transferrin receptor mRNA stability in transfected fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci USA 1995; 92: 1267-1271
[175] Parker JA. *Organic nitrates: new formulations and their clinical advantages.* Am J cardiology 1996; 77: 38C-40C

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

[176] Perry KW, Fuller RW. Determination of brain concentration of 8-hydroxy-2-)di-n-propylamino)tetralin by liquid chromatography with electrochemical detection. Biochem Pharmacol 1989;38:3169-73.
[177] Peunova N, Enikolopov G. Nitric oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cells. Nature 1993; 364: 450- 453
[178] Philippu. A. Use of push-pull cannulae to determine the release of endogenous neurotransmitters in distinct brain areas of anaesthetized and freely moving animals. In: Marsden, C.A. (Eds) Measurement of Neurotransmitter Release in Vivo. Wiley. Chichester. 1984;pp. 3-37.
[179] Philippu. A., Prast. H., Singewald. N. Identification and dynamics of neuronal modulation and function in brain structures and nuclei by continuous determination of transmitter release rates using the push-pull superfusion technique: a compelling approach to in vivo brain research. Sci. Pharm. , 1996;64: 609-618.
[180] Philippu. A., Prast. H., Singewald. N. Modulation of the neurotransmitter release in the brain by amino acids. Pharmacol. Toxicol.1997;80 (Suppl. 1),
[181] Pineda. J., Kogan, J.H., Aghajanian, G.K. Nitric oxide and carbon monoxide activate locus coeruleus neurons through a cGMP-dependent protein kinase: involvement of a nonselective cationic channel. J. Neurosei.1996;16: 1389-1399.
[182] Pitsikas N, Rigamonti AE, Cella SG, Cella SG, Muller EE. Molsidomine attenuates Nω- nitro-L-argininemethylester-induced deficits in a memory task in the rat. Eur J Pharmacol 2002;452:83-6
[183] Pitsikas N, Rigamonti AE, Cella SG, Cella SG, Muller EE. The 5-HT1A receptor antagonist WAY 100635 improves rats performance in different models of amnesia evaluatedby the object recognition task. Brain Res 2003; 983:215-22.
[184] Pitsikas N, Rigamonti AE, Cella SG, Cella SG, Muller EE. The GABAB receptor and recognition memory:possible modulation of its behavioral effects by the nitrergic system. Neuroscience 2003;118:1121-7
[185] Pitsikas N, Rigamonti AE, Cella SG, Locatelli V, Sala ME, Muller EE. Effects of molsidomine on scopolamine-induced amnesia and hypermotility in the rat. Eur J Pharmacol 2001;426:193-200.
[186] Pitsikas N, Rigamonti AE, Cella SG, Muller EE. Effects of the nitric oxide donor molsidomine on different memory components as assessed in the object-recognition task in the rat. Psychopharmacology 2002;162:239-45
[187] Poderoso, J.J.; Lisdero, C.; Schopfer, F.; Riobo, N.; Carreras, M.C.; Cadenas, E.; Boveris. The regulation of mitochondrial oxygen uptake by redox reactions involving nitric oxide and ubiquinol.A. J. Biol. Chem., 1999; 274: 37709- 16.
[188] Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. A model for p53-induced apoptosis. Nature 1997; 389: 300- 305
[189] Prast H, Philippu A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. Progr Neurobiol 2001;64:51-68.
[190] Prast H, Tran MH, Fischer H, Philippu A. Nitric oxide-induced release of acetylcholine in the nucleus accumbens: role of cyclic GMP, glutamate, and GABA. JNeurochem. 1998;71(1):266-273.
[191] Prast. H. Has nitric oxide a significant role as a modulator of neurotransmission in the nucleus accumbens? Auton. Pharmacol. 1997;17: 288-289.
[192] Prast. H., Fischer. H., Grass. K., Philippu. A. Nitric oxide is a modulator of acetylcholine and glutamate release in the ventral striatum. In: Louilot. A., Durkin. T., Spaminato. U., Cador. M. (Eds). Monotoring Molecules in Neuroscience.1994a; pp. 261-262.
[193] Prast. H., Fischer. H., Werner. E., Werner-Felmayer. G., Philippu. A. Nitric oxide modulates the relase of acetylcholine in the ventral striatum of the freely moving rats. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 1995;352:67-72.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

[194] Prast. H., Philipu. A. Nitric oxide releases acetylcholine in the basal forebrain. Eur. J. Pharmacol. 1992;216: 139-140.
[195] Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. Arch . Biochem. Biophys. 1991; 288: 481- 487
[196] Radi, R.; Rodriguez, M.; Castro, L.; Telleri, R. Arch. Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. Biochem. Biophys. 1994; 308: 89- 95.
[197] Rauch M, Schmid HA, deVente J, Simon E. Electrophysiological and immunocytochemical evidence for a cGMP-mediated inhibition of subfornical organ neurons by nitric oxide. J Neurosci 1997; 17: 363-371.
[198] Reid IA, Chiu XJ. Nitric oxide and the control of renin secretion. Fund Clin Pharmacol 1995; 9: 309-323.
[199] www.wikipedia.org/wiki/5-HT1A_receptor
[200] Rodrigo. J., Springall. D.R., Uttenthal. O., Bentura. M.L., Abadia-Molina, F., Riveros-Moreno, V., Martinez-Murillo, R., Polak. J.M., Moncada. S. Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 1994;345: 175-221.
[201] Rubbo H, Pathasarathy S, Barnes S, Kirk M, Kalyanaraman BA. Nitric oxide inhibition of lipoxygenase-dependent liposome and low-density lipoprotein oxidation: termination of radical chain propagation reactions and formation of nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. Arch. Biochem. Biophys. 1995;
[202] Salgo MG, Stone K, Squadrito GL, Battista JR, Pryor WA. Peroxynitrite causes DNA nicks in plasmid pBR322. Biophys. Res. Commun. 1995; 210: 1025- 1030
[203] Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 7240-7244.
[204] Salvemini, D., de Nucci, G., Gryglewski, R. J. ans Vane, J.R. Humanneutrophils and monocular cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor. Proc. Natl. Acad. Sci. Usa.,1989;86: 6328-6332.
[205] Satoh. S., Kimura. T., Toda. M., Mackaawa. M, Ono. S., Narita. H., Muyazaki. H., Murayama. T., Nomura. Y. Involvement of L-type-like amino acid transporters in S-nitrocysteine-stimulated noradrenaline release on the rat hippocampus. J. Neurochem. 1997;69, 2197-2205.
[206] Saxena P. Serotonin receptors: subtypes, functional responses and therapeutic relevance Pharmac Ther 1995;66:339-368
[207] Schuman EM, Madison DV. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. Science 1991; 254: 1503-1506
[208] Segieth J, Pearce B, Fowler L, Whitton PS. Regulatory role of nitric oxide over hippocampal 5-HT release in vivo. Naunyn Schmiedeber's Arch Pharmacol 2001;363:302-6.
[209] Segieth. J., Getting, S.J., Biggs. C.S., Whitton. P.S. Nitric axide regulates excitatory amino acid release in a biphasic manner in freely moving rats. Neurosci. Lett. 1995;200;101-104
[210] Segovia. G., Mora.F. Role of nitric oxide in modulating the release of dopamine, glutamate, and GABA in striatum of the freely moving rat. Brain Res. Bull. 1998;45:275-279
[211] Sequeira. S.M., Ambrosio. A.F., Malva. J.O., Carvalho. A.P., Carvalho. C.M. Modulation of glutamate release from rat hippocampal synaptosomes by nitric oxide. Nitric Oxide.1997;315-329.
[212] Silva. M.T., Rose. S., Hindmarsh. J.G., Jenner. P., Marsden. C.D. I-Arginine produces NO-independent increases in dopamine efflux in rat striatum. NeuroReport, 1998;9:49-152.
[213] Simic G, Lucassen PJ, Krsnik Z, Kruslin B, Kostovic I, Winblad B. nNOS expression in reactive astrocytes correlates with increased cell death related

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

DNA damage in the hippocampus and entorhinal cortex in Alzheimer's disease. Exp. Neurol. 2000; 165: 12- 26
[214] Singewald. N., Phlippu. A. Release of neurotransmitters in the locus coeruleus. Prog. Neurobiol. , 1998;56:237-267.
[215] Sistiaga. A., Miras-Portugal, M.T., Sanchez-Prieto, J. Modulation of glutamate release by a nitric oxide/cyclic GMP-dependent pathway. Eur. J. Pharmacol. , 1997 ;321:7-257.
[216] Sloane JA, Hollander W, Moss MB, Rosene DL, Abraham CR. Increased microglial activation and protein nitration in white matter of the aging monkey. Neurobiol. Aging 1999; 20: 395- 405
[217] Smith JCE, Whitton PS. Nitric oxide modulates N-methyl-D-aspartate-evoked serotonin release in the raphe nuclei and frontal cortex of the freely moving rat. Neurosci Lett 2000;291:5-8
[218] Smith MA, Richey Harris PL, Sayre LM, Beckman JS, Perry G. Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. J. Neurosci. 1997; 17: 2653-2657
[219] Smolenski A, Burckhardt AM, Fingenthaler M, Butt E, Gambaryan S, Lohmann S, Walter U. Fuctional anlysis of c-GMP- dependent protein kinase I and II as mediators of NO/ c-GMP effects. Naunym-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 1998; 358:134-139
[220] Son H, Hawkins RD, Martin K, Kiebler M, Huang PL, Fishman MC, Kandel ER. Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. Cell 1996; 87: 1015-1023
[221] Steward, V.C.; Heslegrave, A.J.; Brown, G.C.; Clark, J.B.; Heales. S.J. Nitric oxide-dependent damage to neuronal mitochondria involves the NMDA receptor. Eur. J. Neurosci. 2002; 15: 458-64.
[222] Stout. A.K., Woodward. J.J. Differential effects of nitric oxide gas and nitric oxide donors on depolarisation-induced release of [^{3}H]norepinephrine from rat hippocampal slices. Neuropharmacol. 1994;33:1367-1374
[223] Sugimoto Y., Noma T., Yoshikawa T., Yamada J. Effects of a nitric oxide synthase inhibitor on hypophagia induced by the peripheral 5-HT receptor aganists alpha-methyl-5-HT and 5-carboxamidotryptamine. Biol Pharm Bull; 2000: 23: 1514-6
[224] Suschek CV, Krischel V, Bruch- Gerharz D, Berendji D, Krutmann J, Kroncke KD, Kolb- Bachofen VJ. Nitric oxide fully protects against UVA-induced apoptosis in tight correlation with Bcl-2 up-regulation. Biol Chem 1999; 274: 6130- 6137
[225] Takita M., Kaneko h., Suzuki S.S., Akamatsu M. Lasting effect of NO on glutamate release in rat stratium revealed by continuous brain dialysis. NeuroReport 1997; 8:567-570
[226] Tenneti L, D' Emilia DM, Lipton SA. Suppression of neuronal apoptosis by *S*-nitrosylation of caspases . Neurosci. Lett. 1997; 236: 139- 142
[227] Thomas MK, Franets SH, Boobo SJ, Gettys DW, Corbin JD. Partial mapping of cyclic nucleotide and studies of regulatory mechanisms of phosphodiesterases using cyclic nucleotide analogues. Adv Second messenger Phosphoprotein Res; 25: 45-53
[228] Thomson, L.; Trujillo, M; Telleri, R.; Radi. R. Arch. Kinetics of cytochrome c2+ oxidation by peroxynitrite: implications for superoxide measurements in nitric oxide-producing biological systems. Biochem. Biophys., 1995; 308: 491-7.
[229] Toda N. Nitric oxide and the regulation of the cerebral arterial tone. In: Vincent S, Eds. Nitric oxide in the nervous system. New York: Academic Press, 1995: 207-226

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

[230] Tricklebank MD, Forler C, Fozard JR. The involvement of subtypes of the 5-HT1A receptor and catecholaminergic system in the behavioural response to 8-hydroxy-2-(di-n-prpylamino)tetralin in the rat. Eur J Pharmacol 1984;84:247-58.
[231] Vincent. S.R., Kimura. H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. Neuroscience.1992;46: 55-784.
[232] Volke V, Wegener G, Bourin M, Vasar E. Antidepressant- and anxiolytic-like effects of selective neuronal NOS inhibitor 1-(2-trifluoromethylphenyl)-imidazole in mice. Behav Brain Res. 2003 Mar 18;140(1-2):141-7.
[233] Walton MR, Dragunow I. Is CREB a key to neuronal survival? Trends Neurosci 2000; 23: 48-53
[234] Warburton EC, Harrison AA, Robbins Everitt BJ. Contrasting effects of systemic and intracerebral infusions of the 5-HTiA receptor agonist 8-OH-DPAT on spatial short-term working memory in rats. Behav Brain Res 1997;130:575-80.
[235] Watanabe. T., Taguchi, Y., Hayashi. H., Tanaka. J., Shiosaka. S., Tohyama. M., Kubota. H., Terano. Y., Wada. H. Evidence for the presence of a histaminergic neuron system in the rat brain: an immunohistochemical analysis. Neurosci. Lett. 1983;39:249-254.
[236] Watanabe. WT., Taguchi. Y., Shiosaka. S., tanaka. J., Kubota. H., Terano. Y., Tohyama. M., Wada. H. Distribution of the histaminergic neuron system in the central nervous system of rats: a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker, Brain Res. 1984;295: 13-25.
[237] Wegener G, Volke V, Rosenberg R. Endogenous nitric oxide decreases hippocampal levels of serotonin and dopamine in vivo. Br J Pharmacol 2000;130575-80.
[238] West A.R., Galloway, M.P. Nitric oxide and potassium chloride-facilitated striatal dopamine efflux in vivo: role of calcium-dependent release mechanisms. Neurochem. Int. 1998;33: 493-501.
[239] West A.R., Galloway. M.P. Inhibition of glutamate reuptake potentiates endogenous nitric oxide-facilitated dopamine efflux in the rat striatum: an in vivo microdialysis study. Neurosci. Lett. 1997a;230: 21-24.
[240] Wieraszko A, Clarke MJ, Lang DR, Lopew LGF, Franko DW. The influence of NO- containing ruthenium complexes on mouse hippocampal evoked potentials in vitro. Life Sci 2001; 68: 1535-1544
[241] Wilcox. B.J., Seybold. V.S., 1982. Localization of neuronal histamine in rat brain, Neurosci. Lett. 29, 105-110.
[242] Wilkinson, L.O., Middlemiss, D.N. and Hutson, P.H., 5-HT_{1A} receptor activation increase hippocampal acetylcholine efflux and motor activity in the guinea pig: agonist efficacy influences functional activity in vivo, J. Pharmacol Exp. Ther. 1994;270:656-663.
[243] Williams JH, Li Y-G, Nayak A, Errington ML, Murphy K, Bliss TVP. The suppression of long- term potentiation in rat hippocampus by inhibitors of nitric oxide synthase is temperature and age dependent. Neuron 1993; 11: 877-884
[244] Wink D, Kasprzak KS, Maragos CM, Elespuru RK, Misra M, Dunams TM, Cebula TA, Koch WH, Anrews AW, Allen J, Keefer L. DNA deamination ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. Science 1991; 254: 1001-1003
[245] Wink, D. A., Kasprzak, K.S., Maragos, C.M. et al. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. Science 1991; 254:1001-1003.
[246] Xia Z, Zweier JL. Direct measurement of nitric oxide generation from nitric synthase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997; 94:12705-12710
[247] Xing G, Chavko M, Zhang LX, Yang S, Post RM.Decreased calcium-dependent constitutive nitric oxide synthase (cNOS) activity in prefrontal cortex in schizophrenia and depression. Schizophr Res. 2002 Nov 1;58(1):21-30

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1

[248] Xu Z.O., Pieribona V.A., Zhang X., Grinler S. A functional role of nitric oxide in locus coreleus immunohistochemical and electrophysiological studies. Exp Brain Res 1994;98:75-83
[249] Yamoto S, Saha JK, Goyal RK. Role of nitric oxide in lower esophageal sphincter relaxation to swallowing. *Life Sci* 1993; 50: 1263-1272.
[250] Yu, S.W.; Wang, H.; Poitras, M.F.; Coombs, C.; Bowers, W.J.; Federoff, .J.; Poirier, G.G.; Dawson, T.M.; Dawson, V.L. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science,* 2002; 297: 259-63.
[251] Yamada J Sugimoto Y., Kunitomo M. A nitric oxide inhibitor reduces hyperphagia induced in rats by the 5-HT1A receptor agonist 8-OH-DPAT, independently of hypothalamic serotonin metabolism. Eur J Pharmacol. 2000;402(3):247-50
[252] Zhang J, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH. Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. Science 1994; 263:687- 689
[253] Zhu, X.Z., Luo, L.G. Effect of nitroprusside (nitric oxide) on endgenous dopamine release from rat striatal slices. J. Neurochem. 1992;59: 932-935

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
21/05/2024 06:25:57 EEST - 3.141.30.1