



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΘΗΝΩΝ**

Ιατρική Σχολή Αθηνών

Διπλωματική Εργασία

**ΝΕΥΡΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΕ ΑΡΣΕΝΙΚΟΥΣ ΚΑΙ
ΘΗΛΥΚΟΥΣ ΕΠΙΜΥΕΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΒΝΝ27**

**Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα : Μοριακής και Εφαρμοσμένης
Φυσιολογίας**

Παραβατού Ραφαέλλα

A.M. 20160438

Εργαστήριο Φαρμακολογίας

Ιατρική Σχολή

ΕΚΠΑ

Τριμελής επιτροπή

Υπεύθυνος: Καθ. Μ. Κουτσιλιέρης

Επιβλέπουσα: Επ. Καθ. Χ. Δάλλα

Αναπλ. Καθ. Α. Τσαρμπόπουλος

ΑΘΗΝΑ 2018

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας, στην Ομάδα Νευροψυχοφαρμακολογίας, στην Ιατρική Σχολή Αθηνών στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών “Μοριακή και Εφαρμοσμένη Φυσιολογία” της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη της Επίκουρης Καθηγήτριας κα. Δάλλα Χριστίνα.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως, την καθηγήτρια μου κα. Δάλλα Χριστίνα, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την ερευνητική μου εργασία στο εργαστήριό της, καθώς και για την συνεχή της διάθεση να μου μεταβιβάσει τις γνώσεις της. Εκπονώντας τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριό της κα. Δάλλας, αποκόμισα πολύτιμες γνώσεις, αλλά και εργαστηριακή εμπειρία και διδάγματα για την ορθή εργαστηριακή σκέψη.

Επίσης, ιδιαιτέρως θα ήθελα να ευχαριστήσω το μέλος του εργαστηρίου κ. Κόκρα Νικόλαο για την πολύτιμη βοήθειά του κατά τη διάρκεια της διπλωματικής μου. Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να πω και στα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου/ Ευχαριστώ την κα. Δέσποινα Παπασάββα για τις τεχνικές συμβουλές και τον Τσοπελάκο Αριστείδη που μου δίδαξε τις αρχές της τεχνικής ανάλυσης. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αλεξόπουλο Χάρη, καθώς για τις πολύτιμες συμβουλές του περί του ορθού χειρισμού των πειραματοζώων. Εκτός αυτών, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου την Αθανασοπούλου Γεωργία, την Παπαδάτου Ελένη, την Κλαουδάτου Αντωνία, την Πουλογιαννοπούλου Ελένη και τον Σωτηρόπουλο Μαρίνο για τις ευχάριστες στιγμές που έχουμε μοιραστεί μαζί στο εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα την οικογένεια μου για όλη την αγάπη, τη βοήθεια, την υποστήριξη, το χαμόγελο τους και την εμπιστοσύνη τους σε μένα όλα αυτά τα χρόνια. Σας ευχαριστώ όλους μέσα από την καρδιά μου.

Περίληψη

Η δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA) και ο θειϊκός εστέρας της (DHEAS) παράγονται τόσο στον εγκέφαλο όσο και σε περιφερικούς ιστούς και αδένες, όπως είναι τα επινεφρίδια. Τα νευροστεροειδή και η DHEA έχουν συσχετισθεί με νευροεκφύλιση και νευρωνική προστασία, ενώ η DHEAS έχει επίδραση στη σύνθεση και έκκριση κατεχολαμινών από τα επινεφρίδια. Ωστόσο, τα φυσικά νευροστεροειδή μεταβολίζονται σε ανδρογόνα, οιστρογόνα ή άλλους μεταβολίτες. Για το λόγο αυτό, έχει πραγματοποιηθεί σύνθεση νέων αναλόγων της DHEA που έχουν υποστεί τροποποίηση στις θέσεις C3 ή C17 με σκοπό τη βελτίωση των αντιαποπρωτικών και νευροπροστατευτικών ιδιοτήτων της DHEA. Τέτοιες ουσίες, όπως το BNN27 ονομάζονται μικροτροφίνες και έχουν σχεδιασθεί με σκοπό να μιμούνται τις νευροτροφικές/νευροπροστατευτικές δράσεις της DHEA, αλλά όχι τις ενδοκρινικές της δράσεις (ανδρογονικές και οιστρογονικές). Η παρούσα μελέτη έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ και περιελάβανε δείγματα από εγκεφάλους αρσενικών και θηλυκών επιμύων στους οποίους είχε χορηγηθεί η ουσία BNN27 σε δύο διαφορετικές δόσεις (10 και 30 mg/kg, i.p.) ή έκδοχο με σκοπό να διεκρινιστούν οι πιθανές αντικαταθλιπτικές ή αγχολυτικές δράσεις του BNN27. Οι επίμυες υποβλήθηκαν στις δοκιμασίες της εξαναγκασμένης κολύμβησης, του υπερυψωμένου λαβύρινθου, ανοιχτού πεδίου και φωτεινού/ σκοτεινού κλωβού και δεν βρέθηκε αγχολυτική ή αντικαταθλιπτική δράση του BNN27, παρά μόνο ήπια κατασταλτική δράση μετά από χορήγηση της υψηλής δόσης και στα δύο φύλα. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός αμινοξέων στη περιοχή του ιπποκάμπου και του προμετωπιαίου φλοιού των αρσενικών και θηλυκών επιμύων, στους οποίους είχε χορηγηθεί η ουσία BNN27 ή έκδοχο. Ο προσδιορισμός έγινε μέσω της τεχνικής υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης με ηλεκτροχημικό ανιχνευτή (HPLC- ED). Τα αμινοξέα που αναλύθηκαν ήταν η ασπαραγίνη (ASN), το γλουταμικό οξύ (GLU), η γλουταμίνη (GLN), η ταυρίνη (TAU) και το γ- αμινοβουτυρικό οξύ (GABA). Η στατιστική ανάλυση με two-way ANOVA έδειξε ότι το BNN27 αυξάνει τα επίπεδα της γλουταμίνης στην περιοχή του ιπποκάμπου ανεξάρτητα από τη δόση και το φύλο. Επίσης, τα επίπεδα του γλουταμικού οξέος στις περιοχές του ιπποκάμπου και του προμετωπιαίου φλοιού ήταν υψηλότερα στα αρσενικά σε σχέση με τα θηλυκά πειραματόζωα. Στα υπόλοιπα αμινοξέα δεν βρέθηκε επίδραση του φύλου ή της χορήγησης BNN27 σε οποιαδήποτε δοσολογία. Συμπερασματικά φαίνεται ότι το BNN27 δεν διαθέτει αγχολυτικές ή αντικαταθλιπτικές ιδιότητες και δεν επηρεάζει τα επίπεδα των νευροδιαβιβαστών GABA και γλουταμικού οξέος στον εγκέφαλο. Ωστόσο, η χορήγηση του BNN27 φαίνεται να επηρεάζει τα επίπεδα γλουταμίνης και άρα το γλουταματεργικό σύστημα στον ιππόκαμπο και το εύρημα αυτό μπορεί να σχετίζεται με πιθανή δράση του στη βελτίωση της γνωστικής λειτουργίας σε νευροεκφυλιστικές παθήσεις.

Summary

Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulfate ester (DHEAS) are synthesized in the brain, as well as in peripheral tissues and glands, like the adrenals. Neurosteroids and DHEA in particular, play a role in neurodegeneration and neural protection. Moreover, DHEAS impacts the composition and secretion of catecholamine by the adrenal glands. However, natural neurosteroids are metabolized in androgens, estrogens or other metabolites. In order to avoid endocrine actions and improve the anti-apoptotic and neuroprotective properties of DHEA, novel compounds with analogous properties have been composed with the positions C3 or C17 modified. Compounds like BNN27, are called microtrophins and they are designed to mimic the neurotrophic / neuroprotective properties of DHEA, but not its endocrine properties (androgenic and estrogenic). The current study took place in the Dep. of Pharmacology at the Medical School of the National Kapodistrian University of Athens and it included samples from male and female rat brains which had been injected with two BNN27 (10 and 30 mg/kg, i.p.) or vehicle, in order to identify potential antidepressant and anxiolytic properties of BNN27. Rats were subjected to the forced swim test, elevated plus maze, open field and light/dark tests. BNN27 had no anxiolytic or antidepressant properties, but a mild sedative effect of BNN27 at high dose in both sexes was identified. The goal of this thesis was the qualitative and quantitative identification of amino acids neurotransmitters in the brain areas of the hippocampus and the prefrontal cortex of male and female rats treated with BNN27 or vehicle. The analysis was conducted through the wet technique of chromatography of high pressure with an electrochemical detector (HPLC-ED). The amino acids that were analyzed were asparagine (ASN), glutamic acid (GLU), glutamine (GLN), taurine (TAU) and gamma-aminobutyric acid (GABA). The statistical analysis, using a two-way ANOVA, revealed that BNN27 increases the levels of glutamine in the area of the hippocampus, irrespectively of the dosage and the sex of the animals. Furthermore, the levels of glutamate in the areas of the hippocampus and the prefrontal cortex were higher in males than in females. No effect of BNN27 was identified in the rest of the amino acids' levels. In conclusion, it appears that BNN27 does not exert anxiolytic or antidepressant properties and it does not influence the levels of neurotransmitters GABA and glutamate in the brain. However, BNN27 treatment seems to influence the levels of glutamine and thus indirectly, the glutamatergic system in the hippocampus. This finding may be linked with BNN's possible capacity to improve cognitive function in neurodegenerative disorders.

Περιεχόμενα

Εισαγωγή.....	8
Διαφυλικές διαφορές.....	8
Διαφυλικές διαφορές στην Κατάθλιψη	9
Διαφυλικές διαφορές στη διαταραχή άγχους	11
Διαφυλικές διαφορές στη Μετατραυματική Διαταραχή Στρες	12
Διαφυλικές διαφορές στη Σχιζοφρένεια.....	13
Διαφυλικές διαφορές στη Διπολική Διαταραχή	14
Διαφυλικές διαφορές στην Ιδεοψυχαναγκαστική Διαταραχή.....	16
Στεροειδείς ορμόνες	17
Βιοσύνθεση στεροειδών.....	18
Νευροστεροειδή	20
Βιοσύνθεση Νευροστεροειδών	21
Νευροστεροειδή και GABA-A υποδοχέας.....	24
Νευροστεροειδή και κατάθλιψη.....	27
Νευροστεροειδή και συμπεριφορές άγχους	28
Νευροτροφίνες	29
DHEA	29
Κλινικές μελέτες της DHEA.....	32
Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος	33
Νόσος Αλτσχάιμερ, Γνωστική λειτουργία και Μνήμη.....	32
Εμμηνόπαυση	34
Κατάθλιψη και δυσθυμία	34
Ανάλογο της DHEA (BNN).....	35
Κύκλος γλουταμικού/ γλουταμίνης και γ- αμινοβουτυρικού οξέος	36
Κύκλωμα προμετωπιαίου φλοιού – ιπποκάμπου.....	38
Σκοπός διπλωματικής εργασίας	39
Πειραματική μελέτη.....	39

Συμπεριφορικές μελέτες.....	39
Νευροχημικές μελέτες.....	40
Νευροχημική ανάλυση αμινοξέων	40
Στατιστική ανάλυση	43
Αποτελέσματα Νευροχημικών Πειραμάτων	44
Επίπεδα γλουταμικού οξέος στην περιοχή του ιπποκάμπου	44
Επίπεδα γλουταμίνης στην περιοχή του ιπποκάμπου.....	44
Επίπεδα ασπαραγίνης στην περιοχή του ιπποκάμπου	45
Επίπεδα ταυρίνης στην περιοχή του ιπποκάμπου.....	46
Επίπεδα γ – αμινοβουτυρικού οξέος στην περιοχή του ιπποκάμπου	47
Επίπεδα γλουταμικού οξέος στην περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού	48
Επίπεδα ασπαραγίνης στην περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού	49
Επίπεδα γλουταμίνης στην περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού.....	50
Επίπεδα ταυρίνης στην περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού	51
Επίπεδα γ- αμινοβουτυρικού οξέος στην περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού	52
Συζήτηση.....	54
Βιβλιογραφία	57

Εισαγωγή

Οι ψυχικές διαταραχές αποτελούν κοινές ασθένειες και σε έναν ενήλικα υπάρχει 30% πιθανότητα να εμφανίσει μία από αυτές τις ασθένειες κάποια στιγμή στη ζωή του. Οι ψυχικές διαταραχές μπορεί να επηρεάσουν την ικανότητα ενός ατόμου να δημιουργεί μαθαίνει, να σκέφτεται, να συναναστρέφεται με άλλους ανθρώπους και να εργάζεται. Υπάρχουν διάφορα είδη διαταραχών και η σοβαρότητά τους ποικίλλει. Οι πιο κοινές παθήσεις είναι η κατάθλιψη, οι διαταραχές του άγχους, η ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή, η μετατραυματική διαταραχή τους στρες, η σχιζοφρένεια και η διπολική διαταραχή. Η κάθε διαταραχή εμφανίζει συγκεκριμένη συμπτωματολογία, αλλά πολλές φορές τα συμπτώματα αλληλεπικαλύπτονται μεταξύ των διαταραχών. Συγκεκριμένα, η κατάθλιψη αποτελεί μια συχνή και σοβαρή ασθένεια που επιδρά αρνητικά στα συναισθήματα του ατόμου και στον τρόπο σκέψης και δράσης του. Η κατάθλιψη μεταξύ άλλων χαρακτηρίζεται από αίσθημα λύπης, ανηδονία και προβλήματα στην ικανότητα συνύπαρξης του ατόμου με άλλα άτομα. Τα συμπτώματα μπορεί να είναι από ήπια έως σοβαρά και περιλαμβάνουν διαταραχές ύπνου, υπερκόπωση, αίσθημα ενοχών, διαταραχές της όρεξης, δυσκολία σκέψης και αυτοκτονικό ιδεασμό. Οι παράγοντες που εμπλέκονται στην εμφάνιση της κατάθλιψης και άλλων ψυχικών διαταραχών είναι βιοχημικοί, γενετικοί, περιβαλλοντικοί, προσωπικότητας κ.α.

Οι διαταραχές του άγχους χαρακτηρίζονται από δυσφορία, ανήσυχες σκέψεις και αλλαγές στη φυσιολογία, όπως αύξηση της αρτηριακής πίεσης. Τα άτομα που πάσχουν από διαταραχές του άγχους είναι πιθανό να αποφεύγουν στρεσογόνες καταστάσεις και να αναπτύσσουν αισθήματα αγοραφοβίας ή κλειστοφοβίας. Επιπλέον συμπτώματα που μπορεί να εμφανίζονται είναι η αστάθεια, οι ζαλάδες και η εφίδρωση.

Τα νευροστεροειδή έχειδειχθεί ότι συμμετέχουν στην απάντηση στο στρες, στην επαγρύπνηση, στη γνωστική λειτουργία, στον πόνο και στο συναίσθημα. Οι επιδράσεις των νευροστεροειδών φαίνεται να περιλαμβάνουν άμεσες δράσεις στον εγκέφαλο και στο νωτιαίο μυελό (Zorumski, Paul et al. 2013). Για το λόγο αυτό, τα νευροστεροειδή αποτελούν στόχο νέων θεραπειών για αρκετές ψυχικές διαταραχές.

Διαφυλικές διαφορές

Οι ψυχικές διαταραχές χαρακτηρίζονται από διαφυλικές διαφορές στην εμφάνιση τους, στη συμπτωματολογία τους και στον τρόπο αντιμετώπισης τους. Τα ζωικά μοντέλα χρησιμοποιούνται ευρέως με σκοπό τη μελέτη της νευροβιολογίας των ασθενειών αυτών και την ανακάλυψη νέων θεραπειών. Ωστόσο, υπάρχει έλλειμμα στον αριθμό μελετών με ψυχοτρόπα φάρμακα σε θηλυκά και αρσενικά πειραματόζωα, με σκοπό να διαπιστωθούν διαφυλικές διαφορές στην απόκριση τους. Συνήθως, τα αρσενικά πειραματόζωα χρησιμοποιούνται κυρίως για τις προκλινικές φαρμακολογικές μελέτες και τα υπάρχοντα μοντέλα έχουν αναπτυχθεί με βάση τη συμπεριφορά των αρσενικών πειραματόζωων. Η συμπεριφορά των θηλυκών πειραματόζωων εσφαλμένα θεωρείται παρόμοια με εκείνη των αρσενικών. Επιπλέον, κυρίαρχο αίτιο εξαιτίας του οποίου τα θηλυκά πειραματόζωα εξαιρούνται των πειραματικών διαδικασιών είναι η πιθανή επίδραση του κύκλου του οίστρου στις μετρήσεις. Η μελέτη των δύο φύλων στις πειραματικές διαδικασίες έχει τη

δυνατότητα να ενισχύσει την εγκυρότητα των ζωικών μοντέλων με σκοπό να συνεισφέρουν στη φυλο-εξαρτώμενη πρόληψη, διάγνωση και θεραπεία των νευροψυχιατρικών διαταραχών (Kokras and Dalla 2014).

Διαφυλικές διαφορές στην Κατάθλιψη

Η κατάθλιψη είναι δύο φορές πιο συχνή στις γυναίκες σε σχέση με τους άντρες, με τις γυναίκες να παρουσιάζουν διαφορετική σοβαρότητα συμπτωμάτων (Wittchen, Jacobi et al. 2011). Οι γυναίκες που πάσχουν από κατάθλιψη επιχειρούν συχνότερα να αυτοκτονήσουν, έχουν θυμό, επιθετικότητα και αυξημένη όρεξη και πρόσληψη βάρους. Στην πραγματικότητα, αν και η μελαγχολική κατάθλιψη εμφανίζεται και στα δύο φύλα, η αγχώδης και άτυπη μορφή κατάθλιψης παρουσιάζονται περισσότερο στις γυναίκες (Frank, Carpenter et al. 1988, Marcus, Young et al. 2005, Marcus, Kerber et al. 2008). Είναι γνωστό ότι τα οιστρογόνα επηρεάζουν τα καταθλιπτικά συμπτώματα, συμπεριλαμβανομένου την επιθετικότητα, την αϋπνία, την όρεξη και τη γενική φυσική κατάσταση (Kornstein, Young et al. 2010, Young and Korszun 2010).

Διαφυλικές διαφορές έχουν παρατηρηθεί σε πειραματικά πρότυπα, όπως στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης (FST), αλλά η κατεύθυνση των διαφορών διαφέρει μεταξύ των μελετών. Σε ορισμένες μελέτες οι θηλυκοί επίμυες δείχνουν υψηλότερα επίπεδα ακινησίας κατά την δεύτερη FST δοκιμασία σε σύγκριση με τους αρσενικούς, γεγονός που προσομοιάζει την αυξημένη κατάθλιψη στις γυναίκες. Επιπλέον, μία ακόμη συμπεριφορά που δείχνει σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο φύλων στην δοκιμασία FST είναι η συχνότητα των τιναγμάτων του κεφαλιού, καθώς οι θηλυκοί επίμυες παρουσιάζουν χαμηλότερη συχνότητα τιναγμάτων σε σχέση με τους αρσενικούς (Kokras, Antoniou et al. 2009). Ο κύκλος του οίστρου πιθανότατα διαδραματίζει ρόλο στην απόκριση στην αντικαταθλιπτική θεραπεία, αλλά οι μελέτες με τη χρήση αντικαταθλιπτικών σε θηλυκούς επίμυες σε διαφορετικές φάσεις του κύκλου είναι περιορισμένες. Για παράδειγμα, η χορήγηση του SSRI αντικαταθλιπτικού σερτραλίνη στη χαμηλή δόση των 10 mg / kg σε θηλυκούς επίμυες κατά την μετάβαση από την φάση δίοιστρο σε πρόοιστρο δεν παρουσιάζει κάποιο ευεργετικό αντικαταθλιπτικό αποτέλεσμα. Ωστόσο, η υψηλότερη δόση (40 mg / kg) παρουσιάζει αντικαταθλιπτική επίδραση σε όλες τις φάσεις του κύκλου. Σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα είναι γνωστό ότι υπάρχουν διαφορές του φύλου στη θεραπεία με τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά (Kokras, Antoniou et al. 2009), με εκλεκτικούς αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης (SSRIS) (Allen, D'Anci et al. 2012) και αναστολείς επαναπρόσληψης ντοπαμίνης (Gunther, Rothe et al. 2011).

Αρκετά γονίδια υποδοχέων σεροτονίνης (5-HT) έχουν στοχοποιηθεί στα μοντέλα κατάθλιψης. Διαγονιδιακά αρσενικά και θηλυκά ποντίκια για τους 5-HT_{1A} υποδοχείς παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα ακινησίας, αλλά μόνο τα θηλυκά παρουσιάζουν μεγαλύτερη προτίμηση στην σουκρόζη (Jones and Lucki 2005, Castagne, Moser et al. 2011). Αρσενικά ποντίκια που υπερεκφράζουν τον μετασυναπτικό 5HT_{1A} υποδοχέα εμφανίζουν μειωμένη καταθλιπτική συμπεριφορά, γεγονός που δεν παρατηρείται στα

αντίστοιχα θηλυκά πειραματόζωα. Η αντικαταθλιπτική θεραπεία μειώνει την ακινησία και στα δύο φύλα (Gunther, Rothe et al. 2011). Αντιθέτως, θηλυκά ποντίκια που έχουν έλλειμμα του 5HT_{1B} υποδοχέα παρουσιάζουν μειωμένη καταθλιπτική συμπεριφορά, ενώ τα αρσενικά εμφανίζουν παρόμοια συμπεριφορά με τα αγρίου τύπου της ομάδας ελέγχου. Η αντικαταθλιπτική θεραπεία μειώνει την ακινησία και στα δύο φύλα των διαγονιδιακών 5HT_{1B} ποντικών (Jones and Lucki 2005). Τέλος, τα θηλυκά αλλά και τα αρσενικά 5-HT₃ διαγονιδιακά πειραματόζωα παρουσιάζουν καταθλιπτική συμπεριφορά με ενισχυμένη ακινησία και μειωμένη διάρκεια κολύμβησης κατά τη διάρκεια της δεύτερης δοκιμασίας εξαναγκασμένης κολύμβησης (Bhatnagar, Nowak et al. 2004).

Εκτός από τους σεροτονινεργικούς υποδοχείς, ο BDNF έχει συσχετισθεί με την παθοφυσιολογία της κατάθλιψης. BDNF διαγονιδιακά ποντίκια έχουν χρησιμοποιηθεί ως μοντέλα κατάθλιψης και παρουσιάζουν έντονες διαφυλικές διαφορές. Τα αρσενικά παρουσιάζουν έντονη κινητική δραστηριότητα, αλλά φυσιολογικά επίπεδα καταθλιπτικής συμπεριφοράς. Αντιθέτως, τα θηλυκά εμφανίζουν καταθλιπτική συμπεριφορά με αυξημένη ακινησία στις δοκιμασίες εξαναγκασμένης κολύμβησης και μειωμένη προτίμηση στη σουκρόζη (Monteggia, Luikart et al. 2007). Σε πειράματα που χρησιμοποιήθηκε η τεχνική εξαναγκασμένης κολύμβησης που διεξήχθησαν σε BDNF διαγονιδιακά ποντίκια, το αντικαταθλιπτικό δεσιπραμίνη δεν εμφάνισε αντικαταθλιπτικές ιδιότητες στα δύο φύλα των πειραματόζωων. Κατ' αυτόν τον τρόπο, καταφαίνεται η σημαντικότητα του BDNF στην αντικαταθλιπτική δράση της δραστικής ουσίας στα δύο φύλα (Monteggia, Luikart et al. 2007). Επιπλέον, αρσενικά ποντίκια που έχουν έλλειψη του τύπου II υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (FBGRKO) στο πρόσθιο τμήμα του εγκεφάλου παρουσιάζουν έντονη καταθλιπτική συμπεριφορά στις δοκιμασίες εξαναγκασμένης κολύμβησης και προτίμησης σουκρόζης, ενώ τα θηλυκά δεν παρουσιάζουν όμοια αποτελέσματα (Solomon, Furay et al. 2012). Τέλος, τα θηλυκά πειραματόζωα με έλλειμμα ουροκορτινής 2, ένα ενδογενές πεπτίδιο της οικογένειας corticotropin releasing factor (CRF) πεπτιδίων, εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα ακινησίας στις δοκιμασίες εξαναγκασμένης κολύμβησης και στη δοκιμασία αιώρησης από την ουρά (Chen, Zorrilla et al. 2006).

Η αναζήτηση βιοδεικτών για την κατάθλιψη και την αντικαταθλιπτική απόκριση είναι σε πρώιμο στάδιο καθώς 1) δεν λαμβάνεται υπόψη το φύλο 2) δεν αναζητούνται διαφορετικοί βιοδείκτες για τις γυναίκες και για τους άντρες. Σε μία μέτα-ανάλυση δείχθηκε ότι η δοκιμασία καταστολής με δεξαμεθαζόνη (dexamethasone suppression test) (DST), ο πιο κοινός βιοδείκτης, δεν έχει ιδιαίτερη προγνωστική αξία σε πιθανές διαφυλικές διαφορές. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι ο άξονας υποθάλαμος – υπόφυση – επινεφρίδια παρουσιάζει σημαντικές διαφυλικές διαφορές, σε πειραματικά μοντέλα και σε μελέτες σε ανθρώπους (Kokras, Dalla et al. 2011, Kokras, Dalla et al. 2012, Goel, Workman et al. 2014). Αυτές οι διαφορές πιθανώς να οφείλονται για το γεγονός ότι η δοκιμασία DST / κορτικοεκλυτίνη

είναι προγνωστική για την απόκριση της θεραπείας σε άντρες αλλά όχι στις γυναίκες ασθενείς (Binder, Kunzel et al. 2009). Συμπερασματικά, η κατανόηση της νευροβιολογίας της κατάθλιψης, αναλογιζόμενοι και τις διαφυλικές διαφορές, μπορεί να

οδηγήσει στην ανακάλυψη ευαίσθητων και ασφαλών βιοδεικτών για την ασθένεια και την επιτυχή αντιμετώπιση της.

Από την βιβλιογραφία που παρουσιάστηκε, είναι εμφανές ότι υπάρχουν αξιοσημείωτες διαφορές στα μοντέλα κατάθλιψης, μερικές φορές είτε στα βασικά επίπεδα, είτε κατόπιν έκθεσης στις φαρμακευτικές ουσίες (Dalla, Pitychoutis et al. 2011). Η διαφορετική απόκριση των δύο φύλων πρέπει να λαμβάνεται υπόψη και τα ήδη υπάρχοντα μοντέλα πρέπει να διαμορφωθούν κατάλληλα, έτσι ώστε να είναι αξιόπιστα και για τα θηλυκά και για τα αρσενικά πειραματόζωα.

Διαφυλικές διαφορές στη διαταραχή άγχους

Οι περισσότερες διαταραχές άγχους, συμπεριλαμβανομένου τη διαταραχή πανικού, την αγοραφοβία, την κοινωνική φοβία, τη γενικευμένη αγχώδη διαταραχή και συγκεκριμένες φοβίες έχουν διπλάσιο επιπολασμό στις γυναίκες σε σύγκριση με τους άντρες (Wittchen, Jacobi et al. 2011).

Αρκετά πειραματικά μοντέλα που χρησιμοποιούν τρωκτικά έχουν αναπτυχθεί με σκοπό να μελετηθεί η νευροβιολογία του φόβου και τους άγχους, καθώς και η φαρμακολογία των αγχολυτικών ουσιών (Cryan and Sweeney 2011). Μερικές από αυτές τις δοκιμασίες βασίζονται στη σύγκρουση μεταξύ της τάσης του τρωκτικού να εξερευνήσει για πιθανή ανταμοιβή και στο ένστικτό του να αποφεύγει πιθανές επικίνδυνες καταστάσεις, όπως φωτισμένα ή εκτεθειμένα μέρη. Σε πληθώρα μοντέλων άγχους τα θηλυκά πειραματόζωα παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα άγχους σε σύγκριση με τα αρσενικά πειραματόζωα (Johnston and File 1991).

Θηλυκά πειραματόζωα στη φάση του πρόοιστου παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα άγχους σε σύγκριση με τα αρσενικά (Frye, Petralia et al. 2000). Επιπλέον, στις δοκιμασίες ανοιχτού πεδίου και με την χρήση των τροχών κίνησης τα θηλυκά εμφανίζουν μεγαλύτερη κινητικότητα σε σύγκριση με τα αρσενικά πειραματόζωα (Dawson, Cheung et al. 1975). Στη δοκιμασία υπερυψωμένου λαβύρινθου, μία ευρέως χρησιμοποιούμενη δοκιμασία άγχους, τα θηλυκά παρουσιάζουν συνεχώς μειωμένα επίπεδα άγχους, όπως υποδεικνύεται από την αυξημένη τάση εξερεύνησης στα ανοιχτά, εκτεθειμένα άκρα του λαβυρίνθου (Walf, Koosce et al. 2008). Η ίδια παρατήρηση εφαρμόζεται και στον υπερυψωμένο λαβύρινθο σε σχήμα T. Τα θηλυκά πειραματόζωα είναι γενικώς πιο δραστήρια στις δοκιμασίες ανοιχτού πεδίου και σε άλλες δοκιμασίες άγχους.

Εκτός από τα μοντέλα που προκαλούν άγχος, ενδιαφέρον παρουσιάζει και η κατάσταση χρόνιου στρες. Η κατάσταση αυτή μπορεί να επιτευχθεί από το μητρικό διαχωρισμό και φαίνεται να επηρεάζει περισσότερο τους αρσενικούς παρά τους θηλυκούς απογόνους. Χρησιμοποιώντας το ίδιο παράδειγμα στρες για αρσενικά και θηλυκά, η ερευνητική ομάδα των (Ter Horst, Wichmann et al. 2009) διατύπωσε τη θεωρία ότι τα αρσενικά

γρήγορα υιοθετούν τη συμπεριφορά «μάχης ή φυγής», ενώ τα θηλυκά έχουν την τάση συμπεριφοράς «φροντίδα και συμφιλίωση» (Taylor, Klein et al. 2000).

Αρκετά γενετικά μοντέλα χρησιμοποιούνται με σκοπό να καθοριστεί η νευροβιολογία του άγχους και της θεραπείας του. Στα περισσότερα γενετικά μοντέλα τα αρσενικά παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα άγχους από ότι τα θηλυκά. Πράγματι, τα αρσενικά αλλά όχι τα θηλυκά 5-HTT-/- εμφανίζουν περισσότερο άγχος στο novelty suppressed feeding και στη διαταραχή απόσβεσης φόβου, παρουσιάζοντας μεγαλύτερη ευαισθησία στο ερέθισμα (Olivier, Van Der Hart et al. 2008). Τα αρσενικά BDNF/ 5-HTT διαγονιδιακά ποντίκια καταδεικνύουν αυξημένα επίπεδα άγχους στην δοκιμασία υπερυψωμένου λαβυρίνθου, ενώ δεν υπάρχει καμία αλλαγή για τα θηλυκά (Olivier, Van Der Hart et al. 2008).

Συνολικά, τα μοντέλα των τρωκτικών για το άγχος έχουν μεγάλη ακρίβεια στην προσβλεψιμότητα όσον αφορά στις αγχολυτικές θεραπείες, αλλά δεν προσομοιάζουν την γυναικεία ευαισθησία που εμφανίζεται στους ανθρώπους. Οι διαφυλικές διαφορές που βρίσκονται στη γενική κινητικότητα, προκαλούνται εν μέρη από τις ορμόνες του φύλου, οι οποίες μπορούν να τροποποιήσουν σε μεγάλο βαθμό το άγχος που σχετίζεται με τη συμπεριφορική έκβαση σε δοκιμασίες άγχους που εξαρτώνται κυρίως από την κινητικότητα. Επιπλέον, διαφορές στην στρατηγική αντιμετώπισης του στρες μεταξύ αρσενικών και θηλυκών (Taylor, Klein et al. 2000, Dalla, Pitychoutis et al. 2010) μπορεί να συμβάλουν σημαντικά στις διαφορές του φύλου. Το αποτέλεσμα είναι τα θηλυκά τρωκτικά να εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα άγχους σε πολλά τεστ και τα θηλυκά στη φάση του δίοιστρου να εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα άγχους, σε σύγκριση με τα θηλυκά σε άλλες φάσεις του κύκλου του οίστρου. Σε περιπτώσεις όπου οι δοκιμασίες άγχους είναι ανεξάρτητες από την κινητικότητα, κρίνονται πιο κατάλληλες για την μελέτη των διαφυλικών διαφορών στις διαταραχές του άγχους. Γενικώς, φαίνεται ότι είναι αναγκαία η χρήση παραπάνω των ένα δοκιμασιών με σκοπό να εκτιμηθεί η συμπεριφορά άγχους.

Διαφυλικές διαφορές στη Μετατραυματική Διαταραχή Στρες

Η μετατραυματική διαταραχή του στρες είναι η ψυχολογική αντίδραση σε ένα οξύ στρεσογόνο γεγονός, απειλητικό για τη σωματική ακεραιότητα, που οδηγεί σε άγχος, αναδρομές, κατάθλιψη, αυτοκτονικό ιδεασμό και άλλα ψυχιατρικά προβλήματα. Αποτελεί μία από τις πιο γνωστές ψυχιατρικές διαταραχές με διαφορά στα δύο φύλα, με τις γυναίκες να εμφανίζουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης της. Ωστόσο, τα ποσοστά ανάρρωσης είναι παρόμοια και στα δύο φύλα. Αρκετοί ερευνητές προσπαθούν να εξηγήσουν τις διαφορές και προτείνουν ότι οι γυναίκες δέχονται περισσότερες ενδεχόμενες απειλές σε σύγκριση με τους άντρες. Επιπροσθέτως, στην προσπάθεια ερμηνείας των διαφυλικών διαφορών στην περίπτωση της μετατραυματικής διαταραχής του στρες, φαίνεται ότι κοινωνικοί και πολιτιστικοί παράγοντες παίζουν ρόλο.

Σύμφωνα με ευρήματα που έχουν δημοσιευτεί φαίνεται ότι τα θηλυκά ποντίκια είναι πιο ευάλωτα από τα αρσενικά (Adamec, Burton et al. 2006). Άλλοι ερευνητές υπαινίσσονται

ότι τα μοντέλα διαταραχής μετατραυματικού στρες είναι βασισμένα σε μεμονωμένες συμπεριφορικές αποκρίσεις αξιολογούμενα από τον υπερυψωμένο λαβύρινθο και την απάντηση στη δοκιμασία του acoustic startle. Οι επίμυες υπόκεινται σε ένα στρες έκθεσης θηρευτή και με βάση αυστηρά κριτήρια επιλογής καθορίζεται ποια πειραματόζωα επηρεάστηκαν από το στρες. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι αρσενικοί και θηλυκοί επίμυες επηρεάζονται το ίδιο από το στρες. Ωστόσο, τα θηλυκά και τα αρσενικά ανταποκρίνονται με διαφορετικό τρόπο, καθώς τα επίπεδα του στρες είναι υψηλότερα στα θηλυκά και το μέγεθος της απόκρισης είναι χαμηλότερο (Mazor, Matar et al. 2009, Cohen and Yehuda 2011). Μελέτες έδειξαν ότι η οξεία χορήγηση του SSRI φλουοξετίνη αυξάνει την απόκριση στο στρες και στα δύο φύλα. Ωστόσο, όταν στους επίμυες χορηγείται φλουοξετίνη για δύο εβδομάδες, ο φόβος εξαιτίας του θηρευτή μειώνεται μόνο στον θηλυκό πληθυσμό που βρίσκεται στην φάση του δίοιστρου, την περίοδο που τα επίπεδα οιστρογόνων είναι χαμηλά (Milad, Igoe et al. 2009). Η φάση του δίοιστρου στα θηλυκά είναι η φάση του κύκλου κατά την οποία παρουσιάζουν εντονότερο φόβο και συνεπώς έχει προταθεί ότι η θεραπεία είναι περισσότερο αποτελεσματική όταν οι αποκρίσεις του φόβου είναι υψηλότερες (Lebron-Milad, Tsareva et al. 2013).

Συνολικά, φαίνεται ότι οι διαφυλικές διαφορές είναι αρκετές στα πειραματικά πρότυπα της διαταραχής του μετατραυματικού στρες και εξαρτώνται από τις συνθήκες παρακολούθησης και τις συμπεριφορικές αποκρίσεις. Γενικώς, οι αρσενικοί επίμυες παρουσιάζουν μεγαλύτερες αποκρίσεις στο ψύχος, ενώ τα θηλυκά είναι περισσότερο ευαίσθητα στο οξύ στρες και παρουσιάζουν εντονότερο φόβο.

Διαφυλικές διαφορές στη Σχιζοφρένεια

Η σχιζοφρένεια, αποτελεί μία σοβαρή ψυχική ασθένεια με χρόνια ακολουθία και διάφορα είδών συμπτωμάτων και παρουσιάζει σημαντικές διαφυλικές διαφορές. Οι άντρες παρουσιάζουν 40% μεγαλύτερες πιθανότητες να εμφανίσουν σχιζοφρένεια και η μέση ηλικία εμφάνισης είναι 3-4 χρόνια νωρίτερα, σε σύγκριση με τις γυναίκες (Hafner 2003). Αντιθέτως, οι γυναίκες εμφανίζουν λιγότερη σοβαρότητα στην πορεία της νόσου με λιγότερες περιπτώσεις νοσηλείας, λιγότερες περιπτώσεις υποτροπής και μεγαλύτερη λειτουργικότητα. Πιθανές εξηγήσεις περιλαμβάνουν τον προστατευτικό ρόλο των οιστρογόνων και την καλύτερη απόκριση των γυναικών στην αντιψυχωσική θεραπεία (Kulkarni, Gavrilidis et al. 2013). Ωστόσο, οι γυναίκες εμφανίζουν περισσότερες παρενέργειες από την αντιψυχωσική θεραπεία σε σύγκριση με τους άντρες. Η σχιζοφρένεια είναι περίπλοκη ασθένεια και δεν μπορεί πλήρως να μελετηθεί με τη χρήση κάποιου ζωικού μοντέλου.

Ένα κλασσικό μοντέλο σχιζοφρένειας είναι τα θετικά συμπτώματα στη θεραπεία των τρωκτικών με αμφεταμίνη, το οποίο επίσης θεωρείται μοντέλο μανίας. Επιπλέον, αρνητικά και γνωστικά συμπτώματα της σχιζοφρένειας μπορεί να μοντελοποιηθούν χορηγώντας στα τρωκτικά NMDA ανταγωνιστές, όπως η φενκυκλιδίνη (PCP), η κεταμίνη και το MK-801 (Krystal, Bennett et al. 2000). Μετά από χορήγηση MK-801, θηλυκοί επίμυες εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στην συμπεριφορά σε σύγκριση με

τους αρσενικούς. Οι θηλυκοί αρουραίοι είναι περισσότερο ευαίσθητοι από τους αρσενικούς, όπως εκτιμήθηκε από την υπερδραστηριότητα, τις στερεοτυπικές συμπεριφορές, την κινητική έλλειψη συντονισμού, τον τρόπο και άλλες παραμέτρους (Nabeshima, Yamaguchi et al. 1984, Wessinger 1995). Αντιθέτως, τα θηλυκά πειραματόζωα δείχνουν λιγότερο άγχος έπειτα από τη διακοπή χορήγησης PCP, ενώ τα αντίθετα αποτελέσματα είναι εμφανή στα αρσενικά (Turgeon, Anderson et al. 2010, Turgeon, Kim et al. 2011). Συμπερασματικά, είναι πιθανό ότι οι διαφυλικές διαφορές εμφανίζονται σε απάντηση στην οξεία χορήγηση NMDA ανταγωνιστών, λόγω των φαρμακοκινητικών διαφορών ανάμεσα σε αρσενικά και θηλυκά πειραματόζωα και ειδικά λόγω του χαμηλού μεταβολισμού των NMDA ανταγωνιστών (Nabeshima, Yamaguchi et al. 1984, Andine, Widermark et al. 1999, Shelnett, Gunnell et al. 1999).

Όσον αφορά τα γενετικά μοντέλα της σχιζοφρένειας, υπάρχουν διάφορα μοντέλα μεταλλαγμένων ποντικών που έχουν μελετηθεί σε συνδυασμό με περιβαλλοντικούς παράγοντες. Παραδείγματος χάρη, latent inhibition έχει εμφανισθεί στα αρσενικά και θηλυκά με έλλειμμα του υποδοχέα ντοπαμίνης 2 (D2). Επιπλέον, τα θηλυκά D1 διαγονιδιακά ποντίκια παρουσίασαν LI, ενώ τα αρσενικά δεν είχαν παρόμοια αποτελέσματα (Bay-Richter, O'Tuathaigh et al. 2009). Το γεγονός αυτό καταδεικνύει τη διαφορά μεταξύ των δυο φύλων στη συσχέτιση με το ντοπαμινεργικό σύστημα. Επιπροσθέτως, τα αρσενικά ποντίκια που έχουν ανεπάρκεια του νευροπεπτιδίου Y, υποδοχέα Y2, παρουσιάζουν έντονη δραστηριότητα και κοινωνική αλληλεπίδραση, ενώ δεν έχουν καμία γνωσιακή διαταραχή και ανεπάρκεια μνήμης. Τα θηλυκά Y2 διαγονιδιακά πειραματόζωα παρουσιάζουν φυσιολογικά επίπεδα κοινωνικής αλληλεπίδρασης και ικανότητες εργασιακής μνήμης (Karl, Chesworth et al. 2010).

Γενικώς, οι συμπεριφορικές ενδείξεις στα μοντέλα σχιζοφρένειας είναι αρκετά ευαίσθητες στη διακύμανση των ορμονών του φύλου. Τέλος, τα πειραματικά πρότυπα της αλληλεπίδρασης των γονιδίων και των περιβαλλοντικών παραγόντων χρειάζονται περαιτέρω αξιολόγηση για αρσενικά και θηλυκά πειραματόζωα.

Διαφυλικές διαφορές στη Διπολική Διαταραχή

Σημαντικές διαφυλικές διαφορές υπάρχουν στην παρουσία και την πορεία της διπολικής διαταραχής. Οι γυναίκες παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης διπολικής διαταραχής τύπου 2, υπομανία και ταχέως κυκλικού τύπου επεισόδια. Επιπλέον, οι γυναίκες εμφανίζουν αργοπορημένα την επιθετικότητα και είναι πιο ευάλωτες στις εποχιακές διακυμάνσεις της διάθεσης. Σημαντικές διαφορές υπάρχουν στα πρότυπα της συννοσηρότητας με τις γυναίκες να πάσχουν πιο συχνά από διαταραχές άγχους και τους άντρες να εμφανίζουν διαταραχές σχετικές με τη χρήση ουσιών. Μέχρι στιγμής, δεν υπάρχουν δεδομένα περί διαφυλικών διαφορών στην απόκριση των σταθεροποιητών διάθεσης, αλλά η θεραπεία της διπολικής διαταραχής σε γυναίκες κατά την κύηση, τη γαλουχία και την περίοδο μετά τον τοκετό παραμένει αμφισβητήσιμη. Η μελέτη της διπολικής διαταραχής με ζωικά μοντέλα αποτελεί μία πρόκληση λόγω των μη κατάλληλων μοντέλων ζώων. Το γεγονός αυτό δυσκολεύει τη μελέτη της νευροβιολογίας των διαφυλικών διαφορών στην ασθένεια.

Τα ζωικά μοντέλα που προσομοιάζουν τη μανία ή την κατάθλιψη είναι περιορισμένα. Η υπερδραστηριότητα συχνά χρησιμοποιείται ως το πρωταρχικό αποτέλεσμα για να εκτιμηθεί η εγκυρότητα των ζωικών μοντέλων για την μανία. Ωστόσο, η αναγνώριση της πολύπλευρης φύσης της μανίας έθεσε την ανάγκη συγκεκριμένων μοντέλων, που να προσομοιώνουν όλα τα συμπτώματα. Για το λόγο αυτό, η υπερδραστηριότητα επαγόμενη από την αμφεταμίνη παραμένει ένα από τα πιο εμπεριστατωμένα και ευρέως χρησιμοποιούμενα μοντέλα στα τρωκτικά για τη μελέτη της μανίας. Οι θηλυκοί επίμυες παρουσιάζουν μεγαλύτερη απόκριση συμπεριφοράς στην αμφεταμίνη ή την κοκαΐνη και δείχνουν μεγαλύτερο βαθμό ευαισθητοποίησης σε σύγκριση με τους αρσενικούς (Becker, Molenda et al. 2001). Αν και οι διαφυλικές διαφορές στην περίπτωση της ευαισθητοποίησης με αμφεταμίνη μπορούν να εξηγηθούν λόγω του μεταβολισμού, οι διαφορές συνεχίζουν να παραμένουν ακόμα και όταν στα αρσενικά χορηγείται μεγαλύτερη ποσότητα αμφεταμίνης με σκοπό να επιτευχθεί συγκρίσιμα επίπεδα αμφεταμίνης στον εγκέφαλο (Robinson, Becker et al. 1982, Robinson 1984, Camp and Robinson 1988, Camp and Robinson 1988, Forgie and Stewart 1994). Επιπλέον, επίμυες που τους έχουν χορηγηθεί οιστρογόνα εμφανίζουν υψηλότερη κινητική δραστηριότητα επαγόμενη από την αμφεταμίνη (Becker and Beer 1986, Becker 1990). Ανάλογα, θηλυκά ποντίκια διαγονιδιακά για την αρωματάση (ArKO), τα οποία στερούνται των οιστρογόνων, παρουσιάζουν μειωμένη κινητικότητα στα πειράματα αμφεταμίνης σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου πειραματόζωα. Συμπερασματικά, η κινητική υπερδραστηριότητα επαγόμενη από την αμφεταμίνη είναι υψηλά συνυφασμένη με τα επίπεδα των οιστρογόνων και για το λόγο αυτό, τα θηλυκά εμφανίζονται πιο ευαίσθητα στις συμπεριφορικές συνέπειες της αμφεταμίνης.

Έχουν προταθεί αρκετά γονιδιακά μοντέλα για την μανία, κυρίως βασισμένα σε ευρήματα από ανθρώπινες μελέτες και φαρμακολογικές γνώσεις γνωστών σταθεροποιητών διάθεσης. Τα διαγονιδιακά ποντίκια με τροποποιήσεις στον μεταφορέα της ντοπαμίνης αποτελούν ένα μοντέλο μανίας, καθώς τα γονίδια της συγκεκριμένης ουσίας έχουν συσχετισθεί με την μανία. Ωστόσο, προηγούμενες μελέτες απέτυχαν να δείξουν τις διαφυλικές διαφορές σε μοντέλο ποντικίου (Ralph-Williams, Paulus et al. 2003). Ένα επιπλέον γονίδιο που φαίνεται να συνδέεται με την μανία, αν και όχι επανειλημμένα, είναι αυτό που είναι υπεύθυνο για τη GSK3. Το ένζυμο αυτό τραβάει την προσοχή των ερευνητών καθώς το λίθιο δρα μέσω αυτού. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκαν διαφυλικές διαφορές σε διαγονιδιακά GSK3 ποντίκια (Prickaerts, Moechars et al. 2006). Το γονίδιο DISC1 συσχετίζεται με την σχιζοφρένεια και τη διπολική διαταραχή (Hodgkinson, Goldman et al. 2004). Θηλυκά ποντίκια που έχουν έλλειμμα των εξωνίων δύο και τρία του συγκεκριμένου γονιδίου παρουσιάζουν αυξημένη υπερδραστηριότητα λόγω έκθεσης σε μεθαμφεταμίνη, σε σύγκριση με τα ποντίκια της ομάδας ελέγχου (Kuroda, Yamada et al. 2011). Αμφότερα τα αρσενικά και θηλυκά ποντίκια εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα άγχους στη δοκιμασία υπερυψωμένου λαβυρίνθου. Διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν τη μεταλλαγμένη ανθρώπινη DISC1 (hDISC1) επίσης παρουσιάζουν διαταραχές συμπεριφοράς που σχετίζονται με το φύλο. Τα αρσενικά ποντίκια εμφανίζουν υψηλή κινητικότητα και αλλαγές στην κοινωνική συμπεριφορά, καθώς τα θηλυκά δείχνουν δυσλειτουργίες στη χωρική μνήμη αναφοράς

κατά την δοκιμασία του υδάτινου λαβυρίνθου κατά Μόρρις (Pletnikov, Ayhan et al. 2008).

Συμπερασματικά, αρκετά μοντέλα διπολικής διαταραχής έχουν προταθεί αλλά κανένα δεν περιγράφει τις εναλλαγές της διάθεσης στη μανία και στην κατάθλιψη. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιούνται ξεχωριστές δοκιμασίες για την κατάθλιψη και την μανία. Η ανάπτυξη μοντέλων που θα περιέγραφαν επακριβώς την διπολική διαταραχή είναι επιτακτική. Στα περισσότερα μοντέλα, τα αποτελέσματα που καταδεικνύουν διαφυλικές διαφορές είναι περιορισμένα. Αντιθέτως, σε προηγούμενη ενότητα αναπτύχθηκαν τα δεδομένα περί διαφορών φύλου στη κατάθλιψη, τα οποία είναι πληθώρα.

Διαφυλικές διαφορές στην Ιδεοψυχαναγκαστική Διαταραχή

Όσον αφορά τη συσχέτιση φύλου και ιδιοψυχαναγκαστικής διαταραχής, τα δεδομένα δείχνουν ότι το αρσενικό φύλο εμφανίζει ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή σε μεγαλύτερο ποσοστό σε μικρότερες ηλικίες, ενώ το ποσοστό είναι σχεδόν ίδιο κατά την ενήλικη ζωή. Στα αγόρια, η διαταραχή εμφανίζεται συχνότερα με τικ και με διαταραχή ελλειμματικής προσοχής – υπερκινητικότητας. Οι γυναίκες εμφανίζουν περισσότερες εμμονές με τις επιμολύνσεις και τις τελετές καθαριότητας, ενώ οι σεξουαλικές εμμονές είναι πιο κοινές μεταξύ των αντρών (Kokras and Dalla 2014). Γενικώς, η ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή στους άντρες έχει μεγαλύτερη επίδραση σε αρκετούς τομείς λειτουργίας επηρεάζοντας την κοινωνική προσαρμογή και τις διαπροσωπικές σχέσεις σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με τις γυναίκες (Mathis, Alvarenga et al. 2011). Αρκετά γενετικά, φαρμακολογικά και συμπεριφορικά μοντέλα υπάρχουν για την συγκεκριμένη διαταραχή, αλλά τα περισσότερα από αυτά δεν έχουν τεκμηριωθεί για τα θηλυκά (Joel 2006, Albelda and Joel 2012, Albelda and Joel 2012).

Ένα ζωικό μοντέλο που έχει αναπτυχθεί για την ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή είναι η το καταναγκαστικό πάτημα μοχλού, το οποίο έχει μελετηθεί σε αρσενικά και θηλυκά πειραματόζωα. Σε μία δοκιμασία κατά την οποία οι επίμυες εκπαιδεύονται να συσχετίζουν το πάτημα ενός μοχλού με ένα τόνο, ένα φως και ανταμοιβή φαγητού, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές όσον αφορά στο φύλο του πειραματόζωου. Ωστόσο, ο κύκλος του οίστρου επηρεάζει την απόσβεση της συμπεριφοράς που πραγματοποιείται όταν η πίεση του μοχλού ακολουθείται από τον τόνο και το φως, αλλά δεν υπάρχει η ανταμοιβή της τροφής.

Η τάση των ποντικών και των επίμυων να θάβουν επιβλαβή και μη αντικείμενα έχει επίσης μελετηθεί στην ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή. Η τάση αυτή έχει δείχθει ότι εξαρτάται από τις ορμόνες του φύλου κατά τον κύκλο του οίστρου. Οι θηλυκοί επίμυες στην φάση του δίοιστρου περνούν περισσότερο χρόνο θάβοντας αντικείμενα, σε σύγκριση με τη φάση του πρόοιστρου (Llaneza and Frye 2009). Τέλος, σε μελέτη που χρησιμοποιήθηκε η δοκιμή θαψίματος ως μοντέλο άγχους, τα θηλυκά πειραματόζωα είχαν την τάση να θάβουν λιγότερα αντικείμενα σε σύγκριση με τα αρσενικά (Goel and Bale 2008). Όσο αφορά τα γενετικά μοντέλα, αρσενικά $ArKO$ ποντίκια που έχουν

έλλειψη οιστρογόνων εμφανίζουν αυξημένη ιδεοψυχαναγκαστική συμπεριφορά όπως αυξημένη αυτοπεριοποίηση (Hill, McInnes et al. 2007). Ωστόσο, τα θηλυκά ποντίκια με έλλειμμα αρωματάσης εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα καταθλιπτικής συμπεριφοράς κατά την δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης (Dalla, Antoniou et al. 2004, Dalla, Antoniou et al. 2005).

Είναι εμφανές ότι χρειάζονται να αναπτυχθούν και να αξιολογηθούν μοντέλα για την ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή και για τα δύο φύλα. Οι μελέτες που έχουν γίνει μέχρι τώρα δείχνουν ότι οι ορμόνες του φύλου έχουν ρόλο στις ιδεοψυχαναγκαστικές συμπεριφορές, ενώ η φάση του κύκλου του οίστρου και η αναπαραγωγική κατάσταση πρέπει να ληφθούν υπόψη.

Στεροειδείς ορμόνες

Οι στεροειδείς ορμόνες ανήκουν σε μία αρχαία οικογένεια σηματοδοτικών μορίων με ποικίλες λειτουργίες, με κυριότερους ρόλους τη ρύθμιση των θηλυκών και αρσενικών αναπαραγωγικών διαδικασιών και την ανάπτυξη. Οι στεροειδείς ορμόνες που βρίσκονται στους ανθρώπους, προέρχονται από το μόριο της χοληστερόλης το οποίο αποτελεί το αφθονότερο λιπίδιο του πλάσματος και είναι το κυριότερο συστατικό των μεμβρανών καθώς και άλλων οργανιδίων. Μικρές τροποποιήσεις στους τέσσερις ενωμένους δακτυλίους του σκελετού της χοληστερόλης έχει ως αποτέλεσμα μόρια με διαφορετικές δραστηριότητες.

Υπάρχουν πέντε κύριες κατηγορίες στεροειδών ορμονών που παράγονται από την χοληστερόλη :

1. Τα προγεσταγόνα, στα οποία ανήκει και η προγεστερόνη. Η ορμόνη αυτή είναι υπεύθυνη για την προετοιμασία του βλεννογόνου της μήτρας για την εμφύτευση του γονιμοποιημένου ωαρίου. Επιπλέον, η προγεστερόνη είναι ουσιώδης για τη διατήρηση της εγκυμοσύνης.
2. Τα γλυκοκορτικοειδή συντίθενται στο φλοιό των επινεφριδίων και εκκρίνονται στην κυκλοφορία του αίματος, όπου τα επίπεδα τους ακολουθούν κιρκάδιο ρυθμό. Η κορτιζόλη, το κύριο γλυκοκορτικοειδές, συντίθεται από την προγεστερόνη μέσω της διαδικασίας της υδροξυλίωσης. Η παραγωγή της επάγεται από στρεσογόνους παράγοντες και χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα. Η κορτιζόλη αντισταθμίζει την ινσουλίνη, συμβάλλοντας στη γλυκονογέννεση με σκοπό την αύξηση της γλυκόζης στο αίμα και αναστέλλει την περιφερική χρήση της γλυκόζης. Επιπλέον, καταστέλλει το ανοσοποιητικό σύστημα, μειώνει το σχηματισμό οστικής μάζας επηρεάζοντας τη μεταφορά του νατρίου εκτός των κυττάρων και επηρεάζει, όπως και η επινεφρίνη τη μνήμη και τη μάθηση.
3. Τα αλατοκορτικοειδή αποτελούν τάξη των κορτικοστεροειδών και επηρεάζουν την ισορροπία των ηλεκτρολυτών και του νερού. Το κυριότερο αλατοκορτικοειδές είναι η αλδοστερόνη, ενώ και άλλες ενδογενείς ορμόνες έχουν τον ίδιο τίτλο, όπως η δεοξυκορτικοστερόνη. Η αλδοστερόνη δρα στα νεφρά προμηθεύοντας ενεργή

απορρόφηση νατρίου και σχετίζεται με την παθητική απορρόφηση του νερού, καθώς και με την απέκκριση καλίου. Η έκκριση της επηρεάζεται κυρίως από την αγγιοτενσίνη II, από την αδρενοκορτικοτρόπο ορμόνη (ACTH) και από τα επίπεδα καλίου.

4. Τα ανδρογόνα, τα οποία είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη των δευτερευόντων φυλετικών χαρακτηριστικών του άρρενος. Η τεστοστερόνη, ένα ανδρογόνο, με τη δράση της στον εγκέφαλο, είναι κυρίαρχη στην ανάπτυξη της ανδρικής σεξουαλικής συμπεριφοράς. Επίσης, είναι σημαντική για τη διατήρηση των όρχεων και την ανάπτυξη της μυϊκής μάζας. Λόγω της τελευταίας δράσης της, η τεστοστερόνη αναφέρεται ως ένα αναβολικό στεροειδές. Από την τεστοστερόνη παράγεται η διϋδροτεστοστερόνη, ένα ισχυρό εμβρυϊκό ανδρογόνο το οποίο προκαλεί την ανάπτυξη και διαφοροποίηση του αρσενικού φαινοτύπου.

5. Τα οιστρογόνα, τα οποία συντίθενται από ανδρογόνα. Η οιστρόνη, ένα οιστρογόνο, προέρχεται από την ανδροστενεδιόνη, ενώ η οιστραδιόλη παράγεται από την τεστοστερόνη. Η οιστραδιόλη είναι υπεύθυνη για τον έμμηνο κύκλο των γυναικών και για την ανάπτυξη των δευτερευόντων χαρακτηριστικών του γυναικείου φύλου. Είναι όμως αξιοσημείωτο ότι τόσο τα ανδρογόνα όσο και τα οιστρογόνα υπάρχουν και στα δύο φύλα.

Οι κύριες θέσεις της σύνθεσης αυτών των τάξεων των ορμονών είναι το ωχρό σωματίο για τα προγεσταγόνα, οι ωθήκες για τα οιστρογόνα, οι όρχεις για τα ανδρογόνα και ο φλοιός των επινεφριδίων για τα γλυκοκορτικοειδή και τα αλατοκορτικοειδή.

Βιοσύνθεση στεροειδών

Η προσθήκη των υδροξυλομάδων παίζει σημαντικό ρόλο στη σύνθεση της χοληστερόλης από το μόριο του σκουαλενίου και στη μετατροπή της χοληστερόλης σε στεροειδείς ορμόνες και χολικά άλατα. Το άτομο του οξυγόνου προέρχεται από το ατμοσφαιρικό οξυγόνο και όχι από το μόριο του νερού. Η υδροξυλίωση χρειάζεται την ενεργοποίηση του οξυγόνου. Στη σύνθεση των στεροειδών ορμονών, η ενεργοποίηση πραγματοποιείται από τα μέλη της οικογένειας του κυτοχρώματος P450, μιας οικογένειας κυτοχρωμάτων που απορροφούν φως με μέγιστο στα 450nm. Οι πρωτεΐνες αυτές βρίσκονται στις μεμβράνες και περιέχουν μια προσθετική ομάδα αίμης. Η αντίδραση υδροξυλίωσης χρειάζεται το NADPH, το O₂ και την πρωτεΐνη αδρενοδοξίνη. Η αδρενοδοξίνη μεταφέρει ένα ηλεκτρόνιο για να αναχθεί η τρισθενής (Fe³⁺) μορφή του σιδήρου του P450 στη δισθενή(Fe²⁺) μορφή του.

Η μεταφορά της χοληστερόλης από την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη στην εσωτερική, όπου το κυτόχρωμα αποκόπτει την πλευρική αλυσίδα της χοληστερόλης είναι ένα κρίσιμο στάδιο στη διαδικασία της στεροειδογένεσης. Η υδατική φάση των δύο αυτών μεμβρανών είναι δύσκολο να διαπεραστεί από τη λιπόφιλη χοληστερόλη χωρίς την παρέμβαση μίας πρωτεΐνης-μεταφορέα. Η διαδικασία πραγματοποιείται από την πρωτεΐνη STARD1, η οποία έχει μικρό χρόνο ημιζωής. Η διαδικασία εισαγωγής

γίνεται με τη δημιουργία σημείων επαφής μεταξύ των δύο μεμβρανών από την STARD1, επιτρέποντας στη χοληστερόλη να μετακινηθεί μεταξύ των μεμβρανών.

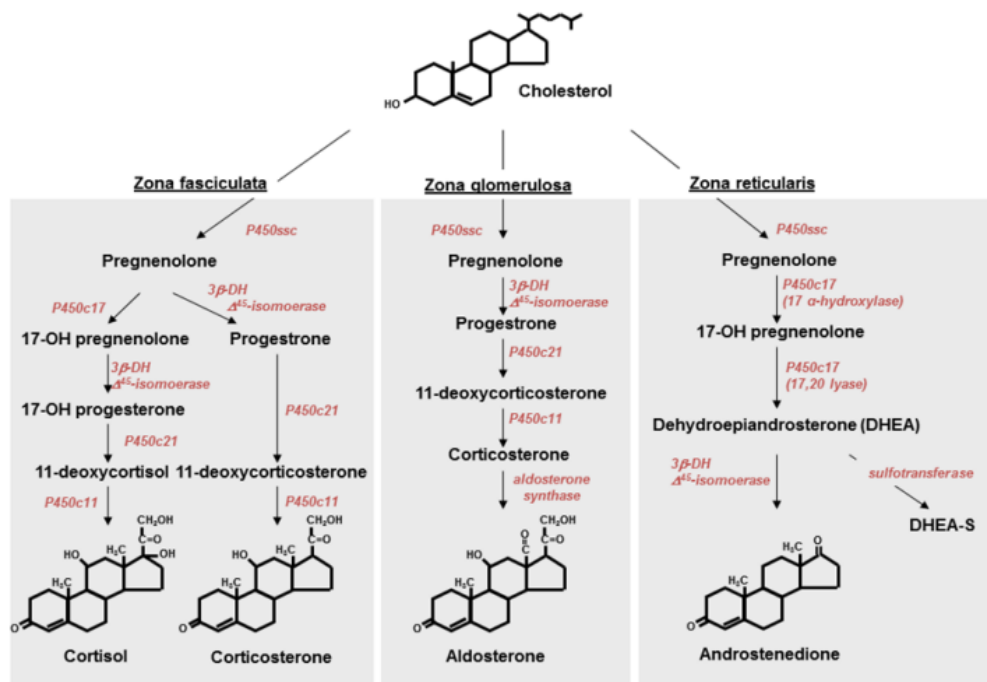
Το πρώτο στάδιο στη σύνθεση είναι η αφαίρεση μίας μονάδας με έξι άτομα άνθρακα από την πλευρική ομάδα της χοληστερόλης, με σκοπό να σχηματιστεί η πρεγνενολόνη. Ο ρυθμός μετατροπής της πρεγνενολόνης καθορίζεται από:

1. Την περίσσεια της χοληστερόλης στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη.
2. Την ποσότητα των ενζύμων σχάσης των πλευρικών αλυσίδων της χοληστερόλης.
3. Στην καταλυτική ικανότητα του κυτοχρώματος P450, το οποίο μπορεί να επηρεαστεί από μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις.

Σε συνέχεια, η προγεστερόνη συντίθεται από την πρεγνενολόνη σε δύο βήματα. Η 3-υδροξυλική ομάδα της πρεγνενολόνης οξειδώνεται προς μια 3-κετονική ομάδα και ο διπλός δεσμός Δ5 ισομερίζεται σε ένα διπλό δεσμό Δ4. Η κορτιζόλη συντίθεται από την προγεστερόνη με υδροξυλίωση των ανθράκων C-17, C21 και C-11. Το αρχικό βήμα στη σύνθεση της αλδοστερόνης είναι η υδροξυλίωση της προγεστερόνης στον C-21. Η προκύπτουσα δεοξυκορτικοστερόνη υδροξυλιώνεται στον C-11. Η οξείδωση της μεθυλικής ομάδας στον C-18 προς αλδεΐδη παράγει την αλδοστερόνη.

Η προγεστερόνη χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για τη σύνθεση των οιστρογόνων και των ανδρογόνων. Η σύνθεση των ανδρογόνων αρχίζει με την υδροξυλίωση της προγεστερόνης στον C-17, και συνεχίζεται με τη διάσπαση της πλευρικής αλυσίδας για να παραχθεί η ανδροστενεδιόνη. Η τεστοστερόνη σχηματίζεται με αναγωγή της κετονικής ομάδας στη θέση 17 της ανδροστενεδιόνης. Τα οιστρογόνα συντίθενται από τα ανδρογόνα, με αφαίρεση της μεθυλικής ομάδας C-19 και τον σχηματισμό ενός αρωματικού δακτυλίου. Ο σχηματισμός του αρωματικού δακτυλίου καταλύεται από το ένζυμο αρωματάση, της ομάδας P450.

Γενικά, δραστικές αλλαγές στη βιοσύνθεση των στεροειδών προκύπτουν από αλλαγές στην μεταφορά της χοληστερόλης στο κυτόχρωμα P450, καθώς και σε μακροπρόθεσμες αλλαγές στην ποσότητα των ενζύμων.



Σύνθεση στεροειδών ορμονών στο φλοιό των επινεφριδίων. Στην στηλιδωτή ζώνη (zonafasciculata), στη σπειροειδή ζώνη (zonaglomerulosa) και στη δικτυωτή ζώνη (zonareticularis), μία σειρά ενζυματικών αντιδράσεων παράγει τα γλυκοκορτικοειδή, τα αλατικορτικοειδή και τα ανδρογόνα, αντίστοιχα (Ortsater, Sjöholm et al. 2012).

Νευροστεροειδή

Τα νευροστεροειδή είναι στεροειδείς ορμόνες που συντίθενται εκ νέου στους νευρώνες και τα κύτταρα της γλοίας, και οι μεταβολίτες τους δρουν στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα. Οι ορμόνες μπορούν να ρυθμίζουν την εγκεφαλική λειτουργία με παρακρινή και αυτοκρινή μηχανισμό μέσω μεμβρανικών ή πυρηνικών υποδοχέων (Plassart-Schiess and Baulieu 2001). Τα συνηθισμένα νευροστεροειδή έχουν την ικανότητα να δρουν ως αρνητικοί ή θετικοί ρυθμιστές των υποδοχέων των νευροδιαβιβαστών όπως του υποδοχέα του γ - αμινο βουτυρικού οξέος A (GABAA), του υποδοχέα του N-μεθυλ-D-ασπαρτικού οξέος (NMDA), του υποδοχέα του α-αμινο-5-υδροξυ-3-μεθυλ-4-ισοξαολιπροπιονικού (AMPA), σίγμα-1 (σ1), νικοτινικούς, μουσκαρινικούς και σεροτονινεργικούς υποδοχείς. Επιπλέον, έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων και σηματοδοτικά μονοπάτια (Wojtal, Trojnar et al. 2006).

Η νευροπροστασία περιλαμβάνει μηχανισμούς προστασίας έναντι νευρωνικού τραυματισμού ή εκφύλισης του κεντρικού ή/και του περιφερικού νευρικού συστήματος. Όλες αυτές οι διαδικασίες μπορούν να είναι αποτέλεσμα οξέων διαταραχών (όπως το εγκεφαλικό ή ο τραυματισμός του κεντρικού νευρικού συστήματος) ή χρόνιων νευροεκφυλιστικών διαδικασιών (όπως στην πορεία της νόσου Αλτσχάιμερ, Πάρκινσον και Χάντιγκτον). Προς το παρόν, μεγάλο εύρος νευροπροστατευτικών προϊόντων είναι διαθέσιμο ή βρίσκεται υπό έρευνα. Αρκετά από αυτά μπορούν πιθανώς να

χρησιμοποιηθούν για πάνω από μία ασθένεια, καθώς αρκετοί από τους μηχανισμούς της νευροεκφύλισης είναι όμοιοι (Borowicz, Piskorska et al. 2011).

Βασισμένοι στα δομικά χαρακτηριστικά, τα νευροστεροειδή μπορούν να ταξινομηθούν στα πρεγνένιανευροστεροειδή, όπως η αλλοπρεγνανολόνη και 3α,21-διϋδροξυ-5α-πρεγναν-20-όνη (THDOC), στα ανδροστάνια νευροστεροειδή, όπως η ανδροστανεδιόλη και η ετιοχολανολόνη, και στα θειϊκά νευροστεροειδή, όπως η θειϊκή πρεγνενολόνη (PS) και η θειϊκή δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEAS). Σύμφωνα με μελέτες αποκαλύφθηκε ότι η προγεστερόνη και η δεοξυκορτικοστερόνη (DOC) χρησιμεύουν ως πρόδρομα μόρια για τα ενδογενή νευροστεροειδή, την αλλοπρεγνανολόνη και την διϋδροξυ-5α-πρεγναν-20-όνη (THDOC) αντίστοιχα. Τα ανδρογόνα που προέρχονται από την τεστοστερόνη, όπως η ανδροστενεδιόλη και οιστραδιόλη, θεωρούνται ως νευροστεροειδή.

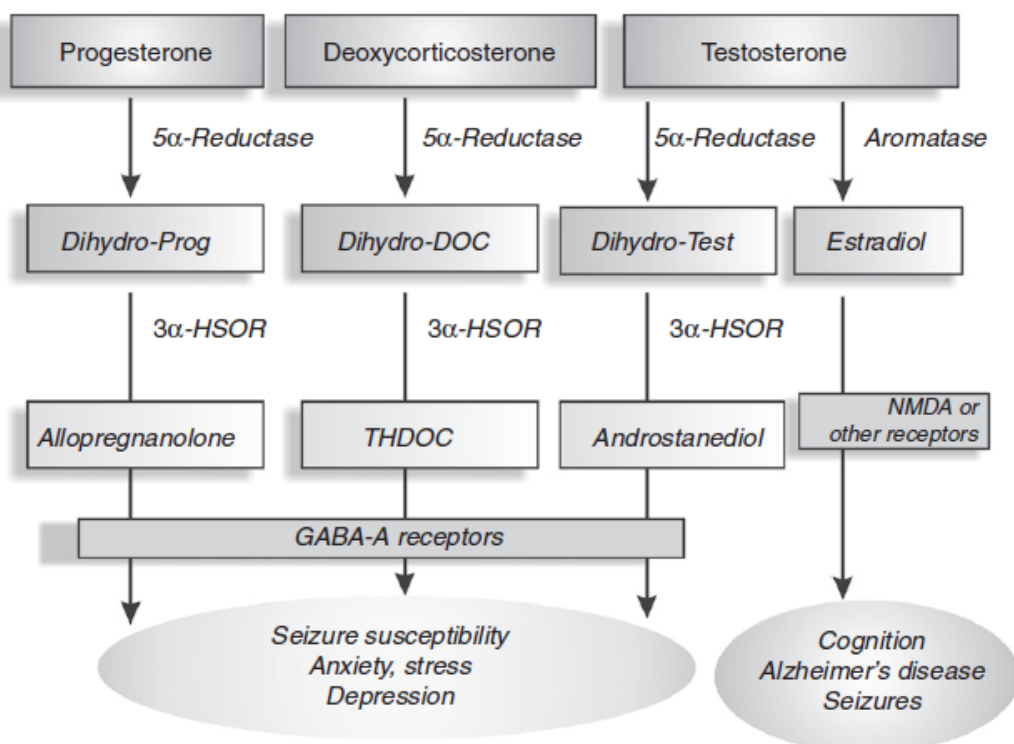
Γενικώς, τα άμεσα αποτελέσματα των νευροστεροειδών δεν σχετίζονται λόγω δράσης τους στους κλασσικούς υποδοχείς στεροειδών ορμονών οι οποίοι ρυθμίζουν τη μεταγραφή των γονιδίων. Επιπλέον, καθαυτά τα νευροστεροειδή δεν είναι ενεργά σε ενδοκυττάρια υποδοχείς στεροειδών. Τα νευροστεροειδή έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν την διέγερση του εγκεφάλου αντιδρώντας με μεμβρανικούς υποδοχείς νευρώνων και ιοντικών καναλιών, κυρίως με υποδοχείς GABA-A (Reddy 2003).

Βιοσύνθεση Νευροστεροειδών

Τα νευροστεροειδή είναι αναχθέν μεταβολίτες στον Α δακτύλιο των στεροειδών ορμονών της προγεστερόνης, DOC και της τεστοστερόνης. Τα στεροειδή που δρουν ως πρόδρομα μόρια των νευροστεροειδών παράγονται κυρίως στις γονάδες, τον φλοιό των επινεφριδίων και στην μονάδα εμβρύου – πλακούντα. Αρκετά νευροστεροειδή συμπεριλαμβανομένου και της αλλοπρεγνανολόνης, THDOC και της ανδροστενεδιόλης παράγονται από διαδοχική αναγωγή του γονικού στεροειδούς από την 5α αναγωγή και την 3α υδροξυστεροειδική οξυδοαναγωγή (3α – HSOR). Αυτές οι μετατροπές συμβαίνουν στους περιφερικούς ιστούς όπως στους ενδοκρινείς αναπαραγωγικούς ιστούς, το ήπαρ και το δέρμα, τα οποία είναι άφθονα στις δύο αναγωγικές δραστηριότητες (Do Rego, Seong et al. 2009). Δεδομένου ότι τα νευροστεροειδή είναι λιποφιλικά μόρια μπορούν να διαπεράσουν γρήγορα τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και αυτό έχει ως αποτέλεσμα αυτά που παράγονται στους περιφερικούς ιστούς να συσσωρεύονται στον εγκέφαλο και να επηρεάζουν την λειτουργία του (Schumacher, Robel et al. 1996).

Τα ένζυμα που παράγουν τα νευροστεροειδή είναι παρόντα σε διάφορες περιοχές του ανθρώπινου εγκεφάλου, όπως υποδεικνύει και ο κατώτερος πίνακας. Η δραστηριότητα της 5α αναγωγής έχει χαρακτηριστεί στους νευρώνες και στα κύτταρα της γλοίας, αμφότερα (Melcangi, Poletti et al. 1998, Petratos, Hirst et al. 2000). Στους ανθρώπους, τα ένζυμα της 5α αναγωγής και της 3^α HSOR έχουν ανιχνευθεί στο νεοφλοιό και στην υποφλοιώδη λευκή ουσία, καθώς και σε ιστούς ιπποκάμπου (Stoffel-Wagner 2001, Stoffel-Wagner, Watzka et al. 2003). Στεροειδείς πρόδρομες ουσίες εισέρχονται εύκολα

στον εγκέφαλο, έτσι ώστε δεξαμενές πρόδρομων ουσιών που συντίθενται περιφερικά να είναι άμεσα διαθέσιμες για την τοπική βιοσύνθεση νευροστεροειδών. Δεδομένου ότι η δραστηριότητα του 3α HSOR είναι πολύ μεγαλύτερη από εκείνη της 5α αναγωγάσης, το στεροειδές 5α αναγωγάση συμμετέχει στο αργό στάδιο της βιοσύνθεσης των νευροστεροειδών.



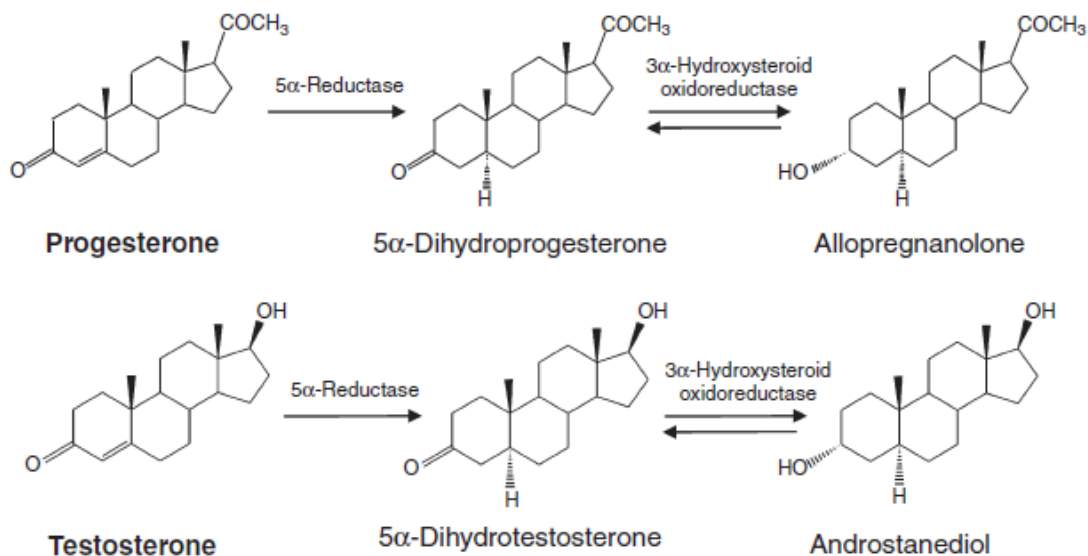
Εικόνα 1: Βιοσυνθετικό μονοπάτι των νευροστεροειδών στον ανθρώπινο εγκέφαλο και η επίδρασή τους στον εγκέφαλο. Η 5^α αναγωγάση μετατρέπει την προγεστερόνη, τεστοστερόνη και δεοξυκορτικοστερόνη στα 5^α-διυδρο-αναχθέν στεροειδή, τα οποία υδροξυλιώνονται στη θέση 3^α από την 3^α-HSOR. Έπειτα, η τεστοστερόνη μετατρέπεται σε 17β-οιστραδιόλη από τα ένζυμα της αρωματάσης. Τα ένζυμα που εμπλέκονται με την βιοσύνθεση και τον μεταβολισμό των νευροστεροειδών βρίσκονται στον ανθρώπινο εγκέφαλο.

Τα νευροστεροειδή παράγονται από τα πρόδρομα στεροειδή εκ νέου από τα κύτταρα της γλοίας και σε πρωταρχικούς νευρώνες. Τα αστροκύτταρα του εγκεφάλου και οι νευρώνες εκφράζουν τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450, τα οποία μετατρέπουν τη χοληστερόλη σε πρεγνενολόνη, η οποία είναι απαραίτητο ενδιάμεσο προϊόν για την παραγωγή νευροστεροειδών. Από τη στιγμή που θα συντεθεί η πρεγνενολόνη μπορεί να μετατραπεί σε διαφορετικών τύπων στεροειδείς ορμόνες μέσω ειδικών ενζύμων. Αρχικά, η πρεγνενολόνη μπορεί να μετατραπεί σε προγεστερόνη, μέσω του 3βHSD, ή μπορεί να υδροξυλιωθεί στη θέση 7 από το κυτόχρωμα P450c17. Υπάρχει εκλεκτικότητα

υποστρώματος για την αντίδραση υδροξυλίωσης στη θέση 17, με μερικά είδη να προτιμούν τα Δ5 στεροειδή (π.χ. πρεγνενολόνη), ενώ άλλα να προτιμούν τα Δ4 στεροειδή (π.χ. προγεστερόνη). Η 17-υδροξυ-πρεγνενολόνη μπορεί να μετατραπεί στο νευροστεροειδές DHEA μέσω του P450c17, το οποίο μετατρέπεται τότε σε ανδρογόνα, από το εκλεκτικό 17βHDDs, για να σχηματίσει την ανδροστεναδιόλη και την τεστοστερόνη, μέσω της 3βHSD. Η P450 αρωματάση μετατρέπει την τεστοστερόνη σε οιστραδιόλη, ενώ η 5α αναγωγή πραγματοποιεί την αντίδραση της τεστοστερόνης σε DHT.

Η προγεστερόνη μεταβολίζεται σε γλυκοκορτικοειδή, αλατοκορτικοειδή ή σε νευροδραστικά στεροειδή από μία πλειάδα ενζύμων. Η σύνθεση των γλυκοκορτικοειδών, της κορτικοστερόνης στα τρωκτικά και της κορτιζόλης στους ανθρώπους, αλλά και των αλατοκορτικοειδών, της αλδοστερόνης, απαιτεί την αντίδραση υδροξυλίωσης στη θέση 21 από το P450c11. Η αντίδραση αυτή, ακολουθείται από τη δράση της ειδικής για κάθε ζώνη P450c11. Η P450c11β είναι ειδική στην zona fasciculata/reticularis με σκοπό την παραγωγή κορτικοστερόνης, ενώ η P450c11AS στην zona glomerulosa για την παραγωγή της αλδοστερόνης. Στους ανθρώπους, η σύνθεση των γλυκοκορτικοειδών απαιτεί την αντίδραση υδροξυλίωσης στην θέση 17 της πρεγνενολόνης, και όχι την δραστηριότητα της 17,20 λυάσης η οποία θα παράγει την DHEA. Έτσι, η ρύθμιση της δραστηριότητας της 17 υδροξυλάσης έναντι της 17,20 λυάσης θα καθορίσει αν τα επινεφρίδια θα παράγουν γλυκοκορτικοειδή ή το νευροστεροειδές DHEA.

Η σύνθεση άλλων νευροστεροειδών περιλαμβάνει δύο ένζυμα, την 5α αναγωγή και την 3α υδροξυστερο δε-υδρογονάση (3α HSD). Η προγεστερόνη, η δεοξυκορτικοστερόνη και η τεστοστερόνη είναι όλα υποστρώματα για την 5α αναγωγή. Έτσι, όλες αυτές οι ουσίες μπορούν να μετατραπούν στα αναχθέν στη θέση 5 παράγωγα τους, την 5α δι-υδρο-προγεστερόνη (DHP), 5αδι-υδροδεόξυκορτικοστερόνη (DH DOC) και την δι-υδροτεστοστερόνη, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, αυτά τα στεροειδή μπορούν να μετατραπούν στα αναχθέν στην 3α θέση παράγωγά τους, με τη βοήθεια του ενζύμου 3α HSD. Τα τρωκτικά έχουν μία μοναδική 3α HSD η οποία πραγματοποιεί όλες τις αντιδράσεις, ενώ οι άνθρωποι έχουν διάφορα γονίδια παραγωγής της 3α HSD τα οποία παρουσιάζουν εκλεκτικότητα υποστρώματος (Griffin and Mellon 1999). Συμπερασματικά, η ανάπτυξη και η εκλεκτική έκφραση για κάθε κύτταρο όλων αυτών των στερεογόνων ενζύμων θα καθορίσει ποια στεροειδή και νευροστεροειδή θα συντεθούν σε ένα συγκεκριμένο ιστό σε μία συγκεκριμένη στιγμή της εξέλιξης.



Εικόνα 2: Βιοσύνθεση νευροστεροειδών παραγώγων προγεστερόνης και τεστοστερόνης. Η ανδροστανεδιόλη παράγεται από την τεστοστερόνη με αναγωγή στις θέσεις 5- και 3- του Α στεροειδούς δακτυλίου. Η αλλοπρεγνανολόνη παράγεται από την προγεστερόνη από αναγωγή στις θέσεις 5- και 3- του Α στεροειδούς δακτυλίου. Η ανδροστανεδιόλη διαφέρει από την αλλοπρεγνανολόνη από μία 17β- υδροξυλο ομάδα σε αντίθεση με την 17β-μεθυλ-καρβονυλική ομάδα.

Νευροστεροειδή και GABA-A υποδοχέας

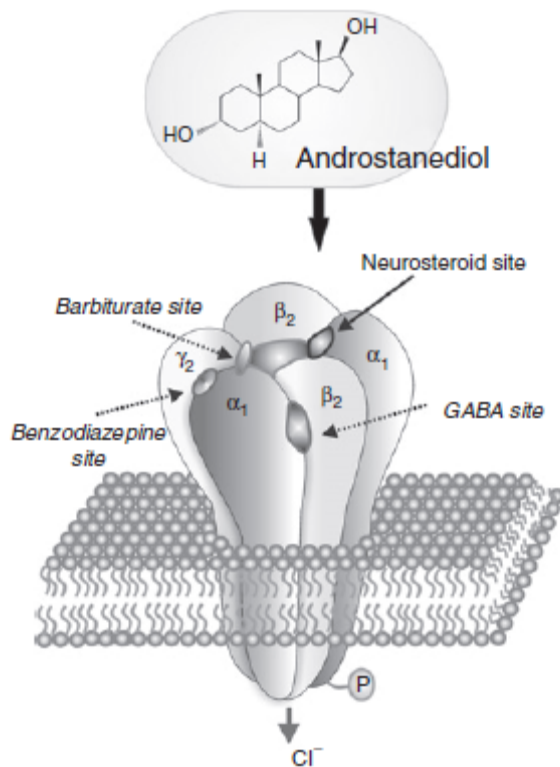
Οι GABA-A υποδοχείς είναι κύριος στόχος των νευροστεροειδών. Τα νευροστεροειδή μπορεί να λειτουργήσουν ως θετικοί ή αρνητικοί ρυθμιστές της δραστηριότητας του υποδοχέα, με βάση την χημική δομή του μορίου του στεροειδούς (Majewska 1992, Reddy 2003). Ο υποδοχέας GABA-A, ένας υποτύπος υποδοχέα για τους GABA νευροδιαβιβαστές, εμπλέκεται στη συναπτική αναστολή στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Δομικά, οι GABA-A υποδοχείς είναι ετεροπενταμερή με πέντε πρωτεϊνικές υπομονάδες που σχηματίζουν τα ιοντικά κανάλια χλωρίου (εικόνα). Υπάρχουν επτά διαφορετικού τύπου υπομονάδες, μερικές από τις οποίες έχουν πολλαπλές παραλλαγές. Ο νευροδιαβιβαστής GABA ενεργοποιεί το άνοιγμα του ιοντικού καναλιού χλωρίου, επιτρέποντας την εισχώρηση ιόντων χλωρίου και τελικά οδηγεί σε υπερπόλωση. Υπάρχουν δύο τύποι ανασταλτικών νευροδιαβιβαστών που ρυθμίζονται μέσω των GABA-A υποδοχέων: συναπτική (φασική) και εξωσυναπτική (τονική) αναστολή. Τα νευροστεροειδή ρυθμίζουν τους συναπτικούς και εξωσυναπτικούς GABA-A υποδοχείς, και τελικά ενισχύονται τόσο τα φασικά όσο και τα τονικά ρεύματα. Η φασική αναστολή προκύπτει από την ενεργοποίηση της γ2-υπομονάδας που περιέχεται σε υποδοχείς στην σύναψη με διακοπτόμενη απελευθέρωση υψηλών επιπέδων GABA από τα προσυναπτικά τελικά νεύρα. Σε αντίθεση, η τονική αναστολή προκύπτει από τη συνεχή ενεργοποίηση των υποδοχέων που περιέχουν τη δ-υπομονάδα που βρίσκονται εκτός της συναπτικής σχισμής μέσω των χαμηλών επιπέδων GABA. Η δ-υπομονάδα βρίσκεται στους

δενδρίτες της οδοντωτής έλικας του ιππόκαμπου και αποδίδει σημαντικά λειτουργικά χαρακτηριστικά στους υποδοχείς GABA-A. Σε αντίθεση με τους συναπτικούς υποδοχείς, οι οποίοι ενεργοποιούνται περιοδικά από συγκεντρώσεις (mM) απελευθερωμένου GABA από τα αξονικά τερματικά των GABAεργικών νευρώνων, οι εξωσυναπτικοί GABA-A υποδοχείς ενεργοποιούνται από τυχαία μόρια GABA που ξεφεύγουν την επαναπρόσληψη από τους GABA διαβιβαστές. Η τονική αναστολή διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της διέγερσης ρυθμίζοντας τα βασικά της επίπεδα.

Τα νευροστεροειδή όπως η αλλοπρεγνανολόνη, η THDOC και η ανδροστενεδιόλη είναι θετικοί αλλοστερικοί ρυθμιστές των GABA-A υποδοχέων (Reddy and Rogawski 2002, Akk, Covey et al. 2009, Reddy and Jian 2010). Οι ρυθμιστικές επιδράσεις των νευροστεροειδών συμβαίνουν μέσω πρόσδεσης σε σημεία του GABA-A υποδοχέα που βρίσκονται στη διαμεμβρανική περιοχή των α- και β- υπομονάδων (Hosie, Wilkins et al. 2006). Το σημείο πρόσδεσης των νευροστεροειδών στον υποδοχέα φαίνεται να είναι διαφορετικό από αυτό πρόσδεσης του GABA, των βενζοδιαζεπινών και των βαρβιτουρικών. Παρόλο που το ακριβές σημείο πρόσδεσης παραμένει άγνωστο, είναι γνωστό ότι πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των νευροστεροειδών διαδραματίζει μία καλά διατηρημένη γλουταμίνη στη θέση 241 του M1 τομέα στην α υπομονάδα (Hosie, Clarke et al. 2009). Η έκθεση σε νευροστεροειδή ενισχύει την πιθανότητα διάνοιξης των ιόντων καλίου στον υποδοχέα, έτσι ώστε ο μέσος χρόνος διάνοιξης να αυξηθεί και ο μέσος χρόνος κλεισίματος να μειωθεί. Έτσι, οδηγεί στην αύξηση της ροής του χλωρίου εντός του καναλιού, καταλήγοντας σε μείωση της νευρωνικής διέγερσης.

Οι GABA-A υποδοχείς πιστεύεται ότι περιέχουν δύο σημεία για αγωνιστές GABA και παρουσιάζουν θετική ή αρνητική συνέργια με άλλους ρυθμιστές. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι την ύπαρξη τουλάχιστον τριών περιοχών σύνδεσης νευροστεροειδών στον GABA-A υποδοχέα:

1. Έναν για αλλοστερική ενίσχυση των ρευμάτων που προκαλούνται από την αλλοπρεγνανολόνη
2. Ένα για την άμεση ενεργοποίηση από την αλλοπρεγνανολόνη
3. Ένα για την ανταγωνιστική δράση των σουλφονιωμένων νευροστεροειδών



Εικόνα 3: Τα νευροστεροειδή έχουν συγκεκριμένες αλλοστερικές θέσεις πρόσδεσης στον GABA-A υποδοχέα, ο οποίος αποτελεί πενταμερή δομή που περιλαμβάνει τις 2α, 2β και 1γ ή δ υπομονάδες που σχηματίζουν κανάλια ιόντων χλωρίου. Οι θέσεις πρόσδεσης των νευροστεροειδών είναι διαφορετικές από τις θέσεις των βενζοδιαζεπινών και των βαρβιτουρικών.

Ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες έχουν χρησιμοποιηθεί για να επιβεβαιώσουν ότι τα νευροστεροειδή σε μικρές συγκεντρώσεις, της τάξης των νανομόλαρ, μπορούν να δράσουν ως αλλοστερικοί ρυθμιστές της λειτουργίας του υποδοχέα. Επιπλέον, τα νευροστεροειδή αυξάνουν την πιθανότητα διάνοιξης του καναλιού χλωρίου του υποδοχέα, γεγονός που επιτρέπει την μεγάλη εισροή ιόντων χλωρίου αυξάνοντας την αναστολή της GABAεργικής νευροδιαβίβασης. Αυτά τα αποτελέσματα συμβαίνουν σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις των νευροστεροειδών. Αποτελεσματικά, τα επίπεδα των ενδογενών νευροστεροειδών συνεχώς ρυθμίζουν τη λειτουργία του GABA-A υποδοχέα.

Τα νευροστεροειδή ρυθμίζουν τις περισσότερες ισομορφές του GABA-A υποδοχέα, συμπεριλαμβανομένου και του ανασυνδυασμένου υποδοχέα. Το γεγονός αυτό ξεχωρίζει τα νευροστεροειδή από τις βενζοδιαζεπίνες, οι οποίες δρουν μόνο σε GABA-A υποδοχείς που έχουν γ2 υπομονάδες και δεν περιέχουν α4 ή α6 υπομονάδες. Γενικώς, η α-υπομονάδα μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα των νευροστεροειδών, καθώς η γ-υπομονάδα μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα και την δραστηριότητα της ρύθμισης που ασκούν τα νευροστεροειδή στον GABA-A υποδοχέα. Ωστόσο, οι υποδοχείς που περιέχουν την δ-υπομονάδα παρουσιάζουν μεγαλύτερη

ευαισθησία στις αποκρίσεις τους. Διαγονιδιακά ποντίκια που έχουν έλλειψη της δ-υπομονάδας εμφανίζουν αρκετά μειωμένη ευαισθησία στα νευροστεροειδή. Η δ-υπομονάδα δεν αποτελεί δομικό μέρος της θέσης πρόσδεσης, αλλά φαίνεται να επηρεάζει τη μεταγωγή της δράσης των νευροστεροειδών μετά την πρόσδεση τους στον υποδοχέα. Κατά τη διάρκεια της νευρωνικής δραστηριότητας, υπάρχει άμεση απελευθέρωση νευροδιαβιβαστή GABA από ενεργούς νευρώνες, οι οποίοι αλληλεπιδρούν περισυναπτικά και εξωσυναπτικά με υποδοχείς που περιέχουν την δ-υπομονάδα. Γενικώς, η δράση των νευροστεροειδών φαίνεται να επηρεάζει τους συναπτικούς, αλλά και περισυναπτικούς/ εξωσυναπτικούς GABA-A υποδοχείς.

Σε μεγάλες συγκεντρώσεις (>10 μM), τα νευροστεροειδή μπορούν να ενεργοποιήσουν τα κανάλια του GABA-A υποδοχέα, ακόμα και χωρίς την ύπαρξη του GABA. Αυτή η δράση τους μιμείται τα βαρβιτουρικά αλλά όχι τις βενζοδιαζεπίνες. Το γεγονός αυτό αποτελεί σημαντική φαρμακολογική παρατήρηση για τα εξωγενώς χορηγούμενα νευροστεροειδή, αλλά δεν σχετίζεται με την δράση των ενδογενών νευροστεροειδών τα οποία υπάρχουν σε αρκετά χαμηλές συγκεντρώσεις.

Τα νευροστεροειδή που έχουν συνδεθεί με ομάδες θείου στην θέση C3 έχουν ανασταλτικές δράσεις στους GABA-A υποδοχείς. Η DHEAS μπλοκάρει τον υποδοχέα σε μικρές micromolar συγκεντρώσεις. Αυτά τα νευροστεροειδή δρουν ως μη ανταγωνιστικοί ανταγωνιστές του υποδοχέα, μέσω αλληλεπίδρασης με μία θέση που διαφέρει από αυτή των νευροστεροειδών. Η αρνητική δράση των νευροστεροειδών στους GABA-A υποδοχείς πραγματοποιείται μέσω μείωσης της συχνότητας διάνοιξης του καναλιού, αν και ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητός. Δεδομένης της αφθονίας στον εγκέφαλο, φαίνεται λογικό ότι η DHEAS μπορεί να δράσει ως ενδογενής νευρορυθμιστής.

Νευροστεροειδή και κατάθλιψη

Τα νευροστεροειδή φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην κατάθλιψη. Έπειτα από μελέτες σε ζωικά μοντέλα με τη χρήση της φλουοξετίνης, ενός εκλεκτικού αναστολέα επαναπρόσληψης σεροτονίνης και ευρέως χρησιμοποιούμενου αντικαταθλιπτικού, δείχθηκε ότι αυξάνονται τα επίπεδα αλλοπρεγνανολόνης στον εγκέφαλο, ενώ η άμεση χορήγηση αλλοπρεγνανολόνης αναστέλλει την καταθλιπτική συμπεριφορά σε ζωικά μοντέλα κατάθλιψης. Συνεπώς, εκδηλώνεται ενδιαφέρον για το ρόλο της αλλοπρεγνανολόνης στην εκδήλωση της αντικαταθλιπτικής δράσης της φλουοξετίνης και στην παθοφυσιολογία της κατάθλιψης. Κατά την διαδικασία της κοινωνικής απομόνωσης στα ποντίκια προσομοιώνονται ορισμένα συμπτώματα της κατάθλιψης. Οι συγκεντρώσεις της αλλοπρεγνανολόνης μειώνονται στον μετωπιαίο φλοιό αυτών των πειραματοζώων εν μέρει λόγω μειωμένης έκφρασης του ενζύμου 5α-αναγωγάση, το οποίο αποτελεί βασικό ένζυμο για την παραγωγή της αλλοπρεγνανολόνης.

Πράγματι, η μείζων κατάθλιψη στους ανθρώπους σχετίζεται με τη διαταραχή της ισορροπίας αρκετών ενδογενών νευροστεροειδών. Στους ασθενείς που πάσχουν από κατάθλιψη τα επίπεδα αλλοπρεγνανολόνης στο πλάσμα του αίματος και στο

εγκεφαλονωτιαίο υγρό είναι μειωμένα, ενώ οι συγκεντρώσεις του THDOC είναι υψηλότερες. Αμφότερα τα μειωμένα επίπεδα της αλλοπρεγνανολόνης και οι υψηλές συγκεντρώσεις της THDOC μπορούν να επανέλθουν στα φυσιολογικά επίπεδα με τη χρήση της φλουοξετίνης. Επιπλέον, τα αντικαταθλιπτικά που έχουν ανάλογη δράση με την φλουοξετίνη ανεβάζουν τα επίπεδα της αλλοπρεγνανολόνης πιθανώς μέσω άμεσης ενεργοποίησης τους 3α-HSOR, ενός σημαντικού ενζύμου για τη σύνθεση των 3α-αναχθέντων νευροστεροειδών. Η DHEAS και το PS (pregnenolone sulfate) όπως και η DHEA έχουν αντικαταθλιπτικά αποτελέσματα τόσο σε ζωικά μοντέλα όσο και σε ανθρώπους. Επίσης, η DHEA και η PS ενισχύουν την γνωστική λειτουργία των ζώων.

Η κατάθλιψη κατά τη περίοδο της εγκυμοσύνης και στην περίοδο μετά τον τοκετό είναι σχετικά συχνή, ενώ δεν έχει ακόμα διαλευκανθεί η παθοφυσιολογία της ασθένειας. Η εγκυμοσύνη σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα νευροστεροειδών που προέρχονται από την προγεστερόνη, τα οποία μειώνονται ραγδαία μετά τον τοκετό. Εφόσον τα νευροστεροειδή έχουν αγχολυτική δράση, η απότομη μείωσή τους πιθανώς να συμβάλει στις διαταραχές άγχους.

Νευροστεροειδή και συμπεριφορές άγχους

Τα νευροστεροειδή εμπλέκονται στη φυσιολογική αντίδραση στο στρες. Το στρες επάγει την υποθαλαμική απελευθέρωση της κορτικοεκλυτίνης (CRH), η οποία επάγει την έκκριση της αδρενοκορτικοτρόπου ορμόνης (ACTH) από την περιοχή της πρόσθιας υπόφυσης. Όπως και η κορτιζόλη, η ACTH ενισχύει τη σύνθεση της επινεφριδιακής DOC, η οποία για να ενεργοποιηθεί χρειάζεται μία αναγωγή στον Α-δακτύλιο. Το νευροστεροειδές THDOC παράγεται από την DOC που υπάρχει στην κυκλοφορία του αίματος από τις δύο συνεχόμενες αναγωγές στον Α- δακτύλιο, όπως στην περίπτωση παραγωγής της προγεστερόνης σε αλλοπρεγνανολόνη. Σε αντίθεση με την αλλοπρεγνανολόνη, η οποία υπάρχει στον εγκέφαλο ακόμα και μετά από γοναδεκτομή, η THDOC φαίνεται να παράγεται μόνο από τα επινεφρίδια.

Τα επίπεδα της THDOC και της αλλοπρεγνανολόνης στο πλάσμα και τον εγκέφαλο αυξάνονται γρήγορα έπειτα από οξύ στρες. Φυσιολογικά, τα επίπεδα της THDOC κυμαίνονται μεταξύ 1-5 nM, αλλά αυξάνονται στα 15 – 30 nM έπειτα από οξύ στρες και μπορεί να φτάσουν τις τιμές 40-60 nM κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Αμφότερες η αλλοπρεγνανολόνη και η THDOC φτάνουν τις μέγιστες τιμές τους κατά τη διάρκεια του άγχους. Τα επίπεδα της THDOC φτάνουν τις μέγιστες τιμές 10 – 30 λεπτά μετά από την έναρξη του στρεσογόνου ερεθίσματος στα πειραματόζωα. Έτσι, η THDOC θεωρείται συστατικό της απάντησης στο στρες του συστήματος υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια.

Επιπλέον, τα νευροστεροειδή παίζουν σημαντικό ρόλο στην ομοιοστατική ρύθμιση των GABA-A υποδοχέων κατά τη διάρκεια της εφηβείας. Οι υποδοχείς που περιέχουν α4δ-υπομονάδες σχετίζονται με την εφηβεία. Αυτού του τύπου οι υποδοχείς εκφράζονται εξωσυναπτικά στους δενδρίτες και έχουν χαμηλή έκφραση στον εγκέφαλο, ενώ παρουσιάζουν μεγάλο βαθμό πλαστικότητας. Οι υποδοχείς αυτοί αποτελούν έναν στόχο

των ενδογενών νευροστεροειδών, όπως της αλλοπρεγνανολόνης, η οποία απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια του στρες. Η έκφραση των GABA-A υποδοχέων που περιέχουν την α4δ-υπομονάδα στην περιοχή CA1 του ιπποκάμπου καθορίζεται από τα επίπεδα των νευροστεροειδών.

Νευροτροφίνες

DHEA

Η δεϋδροεπιανδροστερόνη και τα θειϊκά άλατα της αποτελούν τις πιο διαδεδομένες στεροειδείς ορμόνες στην συστηματική κυκλοφορία των ανθρώπων (Arbo, Ribeiro et al. 2018) . Η παραγωγή τους εξαρτάται από την ηλικία. Η συγκέντρωση των ουσιών αυτών είναι η μέγιστη στις ηλικίες των 25 – 30 χρόνων, και έκτοτε σταδιακά μειώνεται, ενώ στην ηλικία των 70 – 80 χρόνων η ποσότητα τους δεν ξεπερνάει το 10% της μέγιστης.

Το κύριο μέρος της παραγωγής αυτών των ορμονών αποτελούν τα επινεφρίδια. Προέρχονται από μόρια χοληστερόλης, μέσω μιας διαδικασίας που διεκπεραιώνεται μέσω πολλών σταδίων και ενζύμων. Το πρώτο στάδιο παραγωγής της DHEA είναι η μετατροπή της χοληστερόλης σε πρεγνενολόνη, η οποία καταλύεται από το μιτοχονδριακό ένζυμο διάσπασης πλευρικής αλυσίδας χοληστερόλης CYP11A1, το οποίο βρίσκεται στα μιτοχόνδρια. Η μετατροπή της προγνενολόνης (P5) σε DHEA γίνεται με τη βοήθεια των ενζύμων του κυτοχρώματος P450c17. Στο σημείο αυτό καταλύονται οι αντιδράσεις 17α – υδροξυλίωσης, με βάση την οποία γίνεται η μετατροπή της πρεγνενολόνης σε 17- OH πρεγνενολόνη, και την αντίδραση 17,20 – λύασης για την μετατροπή της 17- OH πρεγνενολόνη σε DHEA. Το σύνολο των αντιδράσεων αυτών πραγματοποιείται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Fiore, Inman et al. 2004). Ο σχηματισμός της DHEAS καταλύεται από το ένζυμο σουλφοτρανσφεράση (HST, SULT2A1), που ονομάζεται DHEA σουλφονοτρανσφεράση. Η μετατροπή της DHEAS σε DHEA μπορεί να γίνει μέσω του ενζύμου της σουλφατάσης (STS) (εικόνα 4)

Οι τρεις βιοχημικές συνέπειες της σουλφονίωσης της DHEA είναι ότι 1) η DHEAS έχει μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης με την αλβουμίνη και μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής στην κυκλοφορία σε σύγκριση με την DHEA (Longcope 1996) , 2) η DHEAS αποτελεί ένα βιολογικώς ανενεργό μόριο 3) η συγκομιδή της DHEAS από το κύτταρο απαιτεί ενεργή μεταφορά με τη χρήση της οικογένειας οργανικών ανιόντων (Mueller, Gilligan et al. 2015).

Μικρή ποσότητα της DHEA(S) παράγεται στις γονάδες με τη χρήση του ίδιου ενζύμου. Η σύνθεση των δύο ουσιών στα σημεία αυτά, δηλαδή τα επινεφρίδια και τις γονάδες, πραγματοποιείται στα αντιπροσωπευτικά πρωτεύοντα, στους ανθρώπους και τους πιθήκους. Σε αντίθεση, άλλα είδη όπως οι επίμυες και τα ποντίκια, δεν παράγουν τη DHEA(S) στα σημεία αυτά, υπό φυσιολογικές συνθήκες.

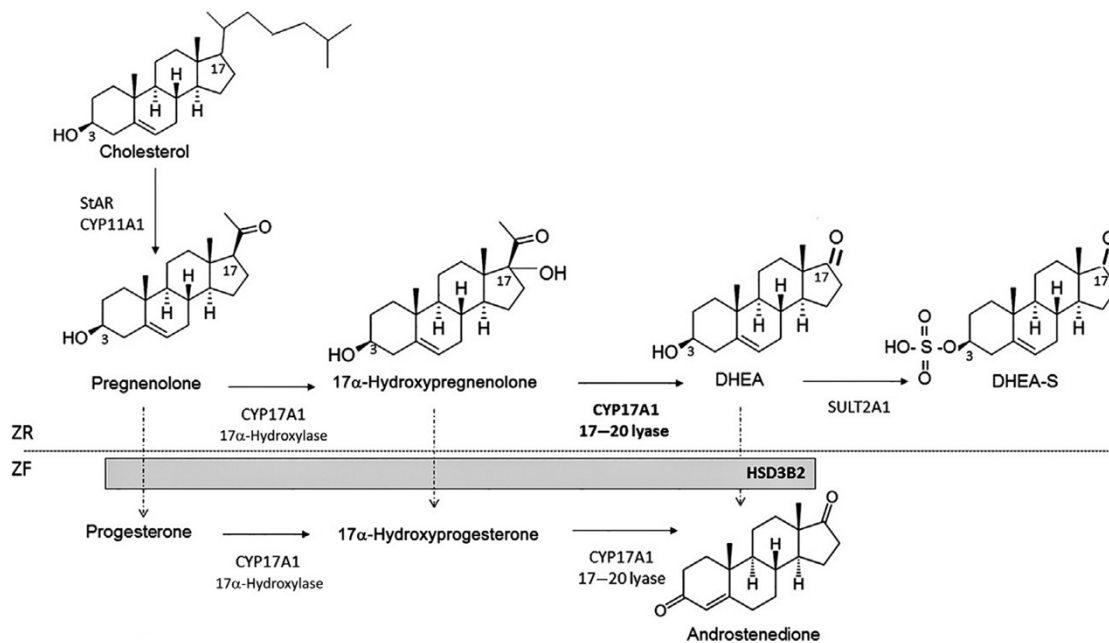
Παράλληλα με τα επινεφρίδια και τις γονάδες, η DHEA(S) παράγεται εκ νέου και σε διάφορες περιοχές του ανθρώπινου εγκεφάλου, όπως σε νευρώνες του φλοιού, του υποκάμπου και του υποθαλάμου και στη γλοία. Η πρώτη ένδειξη ότι οι νευρώνες μπορούν να συνθέσουν διάφορα στεροειδή έγινε από τον ερευνητή Baulieu και τους συνεργάτες του οι οποίοι παρατήρησαν ότι τα επίπεδα της DHEA στο κεντρικό νευρικό σύστημα επιμύων ήταν μεγαλύτερα από αυτά στον ορό του αίματος και παρέμειναν υψηλά ακόμα και μετά την γοναδεκτομή (Auchus 2004, Starka, Duskovala et al. 2015) (Baulieu and Robel 1998). Αυτός ο τύπος στεροειδών ονομάστηκε ως «νευροστεροειδή» για να διαχωριστούν από τα στεροειδή που παράγονται στην περιφέρεια.

Ο φυσιολογικός ρόλος της DHEA στον εγκέφαλο είναι τοπικός – παρακρινής, ενώ της DHEA που παράγεται στα επινεφρίδια είναι συστηματικός. Η DHEA και το θεικό παράγωγο της μετατρέπονται σε ανδρογόνα και/ ή οιστρογόνα από περιφερειακά όργανα στόχους όπως οι γονάδες, ο εγκέφαλος, οι ιστοί, το στήθος, το δέρμα, τους λεμφαδένες και τον λιπώδη ιστό. Ο ρυθμός μετατροπής των ουσιών αυτών εξαρτάται από το επίπεδο έκφρασης των διαφόρων στεροειδικών και μεταβολικών ενζύμων σε καθένα από αυτά τα περιφερειακά όργανα. Αν και τα μόρια DHEA(S) αποτελούν από τα πιο διαδεδομένα στεροειδή στο ανθρώπινο σώμα δεν έχει ανακαλυφθεί κάποιος πυρηνικός στεροειδικός ορμονικός υποδοχέας υψηλής συγγένειας. Ωστόσο, αρκετές μελέτες καταδεικνύουν την σύνδεση της DHEA σε διάφορους ενδοκυτταρικούς υποδοχείς όπως τον υποδοχέα ανδρογόνων (AR) (Lu, Mo et al. 2003, Chen, Knecht et al. 2005), τους οιστρογονικούς υποδοχείς Α (ERα) και Β (ERβ) και άλλους υποδοχείς (Webb, Geoghegan et al. 2006), με μικρότερη συγγένεια σύνδεσης σε σύγκριση με τους προσδέτες των υποδοχέων. Επιπλέον, η δράση των DHEA(S) επεκτείνεται και σε άλλους υποδοχείς όπως του GABA(A), της γλυκίνης, του N – μέθυλ – D ασπαρτικού (NMDA), του γλουταμικού, των νευροτροφινών, των μουςκαρινικών και των ιονικών καναλιών όπως του καλίου, του ασβεστίου και του νατρίου (Starka, Duskovala et al. 2015)

Οι δράσεις των μορίων DHEA και DHEAS έχουν αποφέρει θετικά αποτελέσματα σε πληθώρα μοντέλα ασθενειών σε πειραματικά πλαίσια. Η ομάδα των (Li, Klein et al. 2001) κατέδειξε ότι η χορήγηση DHEA στους επίμυες παρουσίασε μειωμένη βλάβη στην περιοχή CA1 του υποκάμπου μετά από πρόσθια ισχαιμία σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Σύμφωνα με μελέτες τα μόρια DHEA(S) παρουσιάζουν νευροπροστατευτική δράση έναντι πειραματικών μοντέλων εγκεφαλικού τραύματος προστατεύοντας την ακεραιότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, μειώνοντας τις γνωστικές διαταραχές, τις συμπεριφορικές αλλαγές και τον σχηματισμό οιδήματος μετά το τραύμα (Hoffman, Virmani et al. 2003, Milman, Zohar et al. 2008)((Juhász-Vedres, Rozsa et al. 2006). Στη περίπτωση τραυματισμού της σπονδυλικής στήλης θηλυκά ποντίκια στα οποία έχει χορηγηθεί DHEA είχαν καλύτερη αποκατάσταση, βελτιωμένο συντονισμό μεταξύ δεξιάς και αριστερής πλευράς και κινητικό έλεγχο σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου στην οποία χορηγούνταν διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) (Fiore, Inman et al. 2004). Επιπροσθέτως, η νευρογένεση και η νευρωνική επιβίωση μπορούν να επιτευχθούν μέσω των ουσιών DHEA(S). Οι δύο δράσεις αυτές είναι πιθανό να επιτελούνται μέσω αλλαγής στον νευροτροφικό παράγοντα του εγκεφάλου (BDNF) (Maninger, Wolkowitz et al. 2009).

Οι DHEA(S) μπορούν επίσης, να επηρεάσουν τη σύνθεση και έκκριση κατεχολαμινών. Οι νευροπροστατευτικές επιδράσεις της DHEA μπορεί να περιλαμβάνουν αλληλεπιδράσεις με το ντοπαμινεργικό και σεροτονινεργικό σύστημα, εφόσον είναι γνωστό ότι η DHEA ρυθμίζει το ρυθμό ανακύκλωσης αυτών των νευροδιαβιβαστών στο ραβδωτό σώμα και στον επικλινή πυρήνα του διαφράγματος (Perez-Neri, Mendez-Sanchez et al. 2008). Σύμφωνα με μία μελέτη σε υπέρβαρους θηλυκούς αρουραίους που τους είχε χορηγηθεί ένεση DHEA 200 mg / kg, η DHEA αυξάνει τα επίπεδα της ντοπαμίνης (DA), σεροτονίνης (5HT) και 5 - HIAA, ενώ φαίνονται μειώσεις των επιπέδων νορεπινεφρίνης (NE) και επινεφρίνης (EPI) στον παρακοιλιακό πυρήνα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Svec and Porter 1997) . Στα πλαίσια της ίδιας έρευνας, η χορήγηση DHEA δεν επιδρά στα επίπεδα των νευροδιαβιβαστών στον πλάγιο ή μεσοκοιλιακό υποθάλαμο. Μέσω των μελετών αυτών, καταφαίνεται ότι η διάρκεια ή/και η δόση της χορήγησης DHEA μπορεί να έχουν διαφορετική έκβαση των αποτελεσμάτων. Σε παλαιότερη μελέτη έχουν αποδειχθεί οι αντιοξειδωτικές επιδράσεις της DHEA(S). Κατά το οξειδωτικό στρες υπάρχουν μεγάλες συγκεντρώσεις ενεργών και τοξικών ουσιών στον ιστό. Η χορήγηση DHEA προστάτευσε τις κυτταρικές σειρές ιπποκάμπου αρουραίων από την τοξικότητα οξειδωτικών μέσων όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου και το νιτροπρωσσικό νάτριο (Bastianetto, Ramassamy et al. 1999).

Τα επίπεδα της DHEA φαίνεται να διαδραματίζουν ρόλο και στην ασθένεια του Alzheimer, καθώς η παραπάνω ουσία μπορεί να δράσει νευροπροστατευτικά έναντι της τοξικότητας της αμυλοειδούς β – πρωτεΐνης σε in vitro μελέτες (Cardounel, Regelson et al. 1999). Σε συνέχεια με την προηγούμενη μελέτη, η ομάδα των ερευνητών (Li, Xu et al. 2010) έδειξε ότι η DHEA επάγει την ανάπτυξη νέων νευρώνων σε νεογεννηθείς νευρώνες στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου, μέσω μηχανισμού που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των σ1 υποδοχέων και την τροποποίηση της PI3K/Akt σηματοδότησης. Παράλληλα, σε πειραματικά μοντέλα κατά της ασθένειας του Πάρκινσον σε ποντίκια και μαιμούδες, η DHEA προστατεύει τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες έναντι της χορήγησης 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine (MPTP) και βελτιώνει το μέσο παρκινσονικό σκορ (Belanger, Gregoire et al. 2006) (Litim, Morissette et al. 2016).



Εικόνα 4: Νευροστεροειδογένεση στην επινεφρίδικη zonareticularis (ZR) .

Η βιοσύνθεση της DHEA ξεκινά με τη μετατροπή της χοληστερόλης σε πρεγνενολόνη, η οποία καταλύεται από το μιτοχondριακό ένζυμο διάσπασης πλευρικής αλυσίδας χοληστερόλης CYP11A1. Η μετατροπή της προγνενολόνης σε DHEA γίνεται με τη βοήθεια των ενζύμων του κυτοχρώματος P450c17. Στο σημείο αυτό καταλύονται οι αντιδράσεις 17α - υδροξυλίωσης, με βάση την οποία γίνεται η μετατροπή της πρεγνενολόνης σε 17- OH πρεγνενολόνη, και την αντίδραση 17,20 - λύασης για την μετατροπή της 17- OH πρεγνενολόνη σε DHEA. Ο σχηματισμός της DHEAS καταλύεται από το ένζυμο σουλφοτρανσφεράση (HST , SULT2A1), που ονομάζεται DHEA σουλφονοτρανσφεράση. Η μετατροπή της DHEAS σε DHEA μπορεί να γίνει μέσω του ενζύμου της σουλφατάσης (STS).

Κλινικές μελέτες της DHEA

Το επινεφριδιακό ανδρογόνο που ονομάζεται δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA) έχει συσχετισθεί με πληθώρα φυσιολογικών διαδικασιών. Ωστόσο, συχνά θεωρείται πρόδρομος ορμόνη με κύριο ρόλο της να λειτουργεί ως ρυθμιστής της σύνθεσης ανδρογόνων και οιστρογόνων. Οι χαρακτηρισμοί της ορμόνης ως «πηγή νεότητας», καθώς και η διαθεσιμότητα των συμπληρωμάτων DHEA στη διατροφή έχουν θέσει την έρευνα στις επιδράσεις της DHEA επίκαιρη και επιτακτική. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ζωικά μοντέλα έχουν δείξει τις ευεργετικές ιδιότητες της χορήγησης DHEA σε διάφορες λειτουργίες, όπως τη γνωστική λειτουργία και τη μνήμη. Όμως η μετάφραση των αποτελεσμάτων των ζωικών προκλινικών μελετών στους ανθρώπους είναι περίπλοκη καθώς στις περισσότερες μελέτες χρησιμοποιούνται τρωκτικά, τα οποία παράγουν χαμηλή ποσότητα DHEA. Η αλληλεπίδραση της DHEA με άλλες ορμόνες, η έλλειψη πλήρως ανεξάρτητου μηχανισμού δράσης και οι διαφορές ανάμεσα στα ζωικά μοντέλα και στον άνθρωπο επιφέρουν χαώδη αποτελέσματα. Οι

μελέτες σε ανθρώπους έχουν διερευνήσει τα οφέλη της DHEA σε αρκετές ασθένειες χρησιμοποιώντας ποικίλους πληθυσμούς με διαφορές στην κατάσταση υγείας, το φύλο και την ηλικία.

Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος

Για την μελέτη του συστηματικού ερυθηματώδους λύκου πραγματοποιήθηκε τυχαιοποιημένη, διπλή, τυφλή και ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο δοκιμή σε ενήλικες γυναίκες με ήπιας ή μέτρια μορφής ασθένεια. Καθημερινώς, χορηγούνταν δόση των 200 mg DHEA μέσω του στόματος για 24 βδομάδες. Στην κλινική δοκιμή συμμετείχαν εκατό πενήντα τρεις γυναίκες, εκ των οποίων οι πενήντα πέντε έλαβαν εικονικό φάρμακο και οι πενήντα οκτώ την ουσία. Ο αριθμός των εξάψεων ήταν σημαντικά μειωμένος στην ομάδα θεραπείας (18.3% παρουσίαζε εξάψεις), σε σύγκριση με την ομάδα που λάμβανε το εικονικό φάρμακο (33.9% παρουσίαζε εξάψεις). Επιπλέον, σύμφωνα με τις αξιολογήσεις της ασθένειας η ομάδα που λάμβανε την DHEA εμφάνισε βελτίωση σε σύγκριση με την ομάδα που λάμβανε το εικονικό φάρμακο (Chang, Lan et al. 2002). Σε άλλες κλινικές δοκιμές για τον ερυθηματώδη λύκο, η θεραπεία με DHEA σταθεροποίησε την εξέλιξη της νόσου, μείωσε τις εισαγωγές στα νοσοκομεία και επέτρεψε τη μείωση δόσης των κορτικοστεροειδών (van Vollenhoven, Engleman et al. 1995, Petri, Lahita et al. 2002).

Νόσος Αλτσχάιμερ, Γνωστική λειτουργία και Μνήμη

Οι επιπτώσεις της νόσου Αλτσχάιμερ ξεκινούν περίπου στην ηλικία των 60 χρόνων, την περίοδο που τα επίπεδα της DHEA(S) είναι πολύ χαμηλά σε σχέση με την νεότερη ηλικία. Η DHEA(S) ασκεί προστατευτικές δράσεις στους νευρώνες του ιππόκαμπου από την τοξικότητα που επάγεται από τα γλυκοκορτικοειδή (Kimonides, Spillantini et al. 1999, Heffelfinger and Newcomer 2001). Με αυτό τον τρόπο, μειωμένη δράση της DHEA(S) μπορεί να επιτρέψει στην κορτιζόλη να ασκήσει περισσότερη δραστηριότητα γλυκοκορτικοειδούς, η οποία τελικώς μπορεί να επηρεάσει τη μνήμη, τη γνωστική λειτουργία και τη διάθεση (McEwen, de Leon et al. 1999, Heffelfinger and Newcomer 2001).

Η πιθανή αντι-γλυκοκορτικοειδής δράση της DHEA αξιολογήθηκε με τη διεξαγωγή μελέτης με τη χρήση εικονικού φαρμάκου σε 75 ηλικιωμένους άντρες και γυναίκες. Καθημερινώς, χορηγούνταν δόση των 50 mg DHEA από του στόματος για 2 βδομάδες. Έπειτα, τα άτομα συμμετείχαν σε τυποποιημένη δοκιμασία κοινωνικού άγχους (Trier Social Stress Test). Τα άτομα αυτά ολοκλήρωσαν δύο δοκιμασίες μνήμης και μία δοκιμασία προσοχής πριν και μετά την έκθεση τους στη δοκιμασία άγχους. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ομάδα που είχε λάβει DHEA απέδωσε καλύτερα στη δοκιμασία προσοχής, ενώ δεν παρουσιάστηκαν διαφορές στη δοκιμασία μνήμης πριν και μετά τη δοκιμασία άγχους στην ομάδα της DHEA.

Σε επόμενη τυχαιοποιημένη, διπλά τυφλή και ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο μελέτη μελετήθηκαν 30 γυναίκες, ηλικιών 39 – 70. Καθημερινώς, χορηγούταν δόση 50 mg DHEA από του στόματος για 4 εβδομάδες. Η ομάδα που λάμβανε την DHEA παρουσίασε καλύτερη αναγνωριστική μνήμη αντικειμένων. Ωστόσο, δεν είναι ξεκάθαρο αν τα αποτελέσματα είναι κλινικώς σημαντικά.

Εμμηνόπαυση

Οι γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση εμφανίζουν επίπεδα μισής ποσότητας DHEA σε σύγκριση με γυναίκες στην ηλικία των 20 ετών, λόγω της μειωμένης λειτουργίας των επινεφριδίων. Σε μελέτη διάρκειας ενός χρόνου που πραγματοποιήθηκε σε ομάδα 20 γυναικών χορηγήθηκαν 10 mg DHEA ημερησίως ή 50 μg συνδυασμού οιστραδιόλης και προγεστερόνης. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν θετικά αποτελέσματα μετά από συνδυασμό των δύο θεραπειών σε 12 γυναίκες με χαμηλά επίπεδα DHEA(S). Η θεραπεία με DHEA έδειξε σημαντική αύξηση στα επίπεδα των ανδρογόνων, συγκροτημένη αύξηση στα οιστρογόνα και μεγάλη μείωση στα επίπεδα της κορτιζόλης. Ο συνδυασμός των δύο θεραπειών απέδωσε μεγαλύτερη αύξηση της οιστραδιόλης και της τεστοστερόνης και ακόμα χαμηλότερα επίπεδα κορτιζόλης. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, συμπεραίνεται ότι τα 10mg DHEA φαίνεται να είναι η κατάλληλη δόση για την υποκατάσταση της έλλειψης των ανδρογόνων.

Κατάθλιψη και δυσθυμία

Η συσχέτιση μεταξύ του μειωμένου λόγου της DHEA του αίματος προς τα επίπεδα κορτιζόλης στα ηλικιωμένα άτομα και της κατάθλιψης είναι γνωστή. Σε τυχαιοποιημένη, διπλά τυφλή και ελεγχόμενη με τη χρήση εικονικού φαρμάκου μελέτη συμπεριλήφθηκαν 12 άντρες και 3 γυναίκες, οι οποίοι έπασχαν από δυσθυμία. Κατά τη διάρκεια της μελέτης, χορηγήθηκαν 90 mg ημερησίως είτε το εικονικό φάρμακο για 6 εβδομάδες είτε η DHEA για 3 εβδομάδες και ακολούθως 450 mg DHEA για τρεις εβδομάδες. Τρεις εβδομάδες μετά το πέρας της θεραπείας, το 47% των ατόμων που έλαβαν DHEA μείωσε κατά 50% τα επίπεδα της κατάθλιψης, σε σύγκριση με την άλλη ομάδα που παρουσίασε μόνο 7% μείωση. Μετά από 6 εβδομάδες, το 60% των ασθενών αποκρίθηκε στην θεραπεία με DHEA, ενώ το ποσοστό για την εικονική ομάδα ήταν στο 20%. Τα αυξημένα επίπεδα DHEA(S) συσχετίστηκαν με την απάντηση στην θεραπεία για τους άντρες και τις γυναίκες. Επιπλέον, δεν υπήρχε συσχέτιση των αποτελεσμάτων με την δόση καθώς δεν υπήρξε βελτίωση των συμπτωμάτων με μεγαλύτερες δόσεις.

Η ερευνητική ομάδα των Wolkowitz et al πραγματοποίησε μία διπλά τυφλή, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο μελέτη που διήρκεσε 6 εβδομάδες, παρακολουθώντας 22 ασθενείς (12 άντρες και 10 γυναίκες) με μείζον κατάθλιψη. Η πρώτη ομάδα έλαβε 30 mg DHEA για δύο εβδομάδες, έπειτα 30 mg δύο φορές την ημέρα για δύο εβδομάδες και 30 mg τρεις φορές την ημέρα για δύο εβδομάδες. Οι ασθενείς είτε λάμβαναν σταθερές δόσεις αντικαταθλιπτικής αγωγής είτε καμία αγωγή. Η ομάδα στην οποία χορηγήθηκε DHEA

παρουσίασε άνω του 50% μείωση στα συμπτώματα της κατάθλιψης, συγκρινόμενη με την ομάδα του εικονικού φαρμάκου.

Σε ελεγχόμενη από εικονικό φάρμακο έρευνα που διεξήχθη σε 30 ασθενείς με σχιζοφρένια οι οποίοι λάμβαναν αντιψυχωσική θεραπεία, χορηγήθηκε για 6 βδομάδες DHEA τιτλοδοτημένη στα 100 mg ημερησίως. Τα αποτελέσματα έδειξαν υψηλότερη επίπεδα DHEA στο αίμα και μεγαλύτερη επίδραση στις γυναίκες.

Ανάλογο της DHEA (BNN)

Η έλλειψη αποτελεσματικών μεθόδων αντιμετώπισης των νευροεκφυλιστικών ασθενειών έχει οδηγήσει στην προσπάθεια ανάπτυξης μεθόδων που εξασφαλίζουν την νευρωνική λειτουργία, επιβίωση και προστασία είτε στοχεύοντας την απόπτωση είτε την νευρογένεση. Τα φυσικά νευροστεροειδή, όπως η DHEA, κατέχουν σημαντικές νευροπροστατευτικές και νευρογεννητικές ιδιότητες σε πειράματα που διεξήχθησαν *in vivo* και *in vitro* σε πειραματόζωα (Calogeropoulou, Avlonitis et al. 2009). Η DHEA, όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί ενδιάμεσο προϊόν για την βιοσύνθεση ανδρογόνων και οιστρογόνων. Επιπλέον, η DHEA έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με αρκετούς υποδοχείς νευροδιαβιβαστών και στεροειδικών ορμονών. Μέσω αυτού, καταφαίνεται ότι η χορήγηση φυσικών νευροστεροειδών μπορεί να επηρεάσει το ενδοκρινικό σύστημα, αυξάνοντας την πιθανότητα εμφάνισης όγκων που εξαρτώνται από τα οιστρογόνα και τα ανδρογόνα.

Μέσω όλων αυτών, γίνεται εμφανής η ανάγκη για τη δημιουργία τεχνητών νευροστεροειδών που θα έχουν τις επιθυμητές αντιαποπτωτικές και νευροπροστατευτικές ιδιότητες, αλλά χωρίς τις ανεπιθύμητες παρενέργειες των φυσικών νευροστεροειδών. Με αυτό το σκοπό, η ομάδα των ερευνητών Calogeropoulou et al. 2009 συνέθεσε μια σειρά 17 - σπύρο παραγώγων της DHEA με τροποποιήσεις στις θέσεις C3 και C7 με στόχο να βελτιώσουν τις νευροπροστατευτικές ιδιότητες της αρχικής ουσίας.

Τα συνθετικά 17 – σπύρο παράγωγα της DHEA συνδέονται στους TrkA και p75NTR υποδοχείς, με σκοπό να προαχθεί η TrkA φωσφορυλίωση και η αποικοδόμηση του p75NTR από την πρωτεΐνη τελεστή, RhoGDI. Σε αντίθεση με την DHEA, τα συνθετικά 17 – σπύρο παράγωγα της δεν παρουσιάζουν συγγένεια πρόσδεσης με τον υποδοχέα ER, τους ανδρογονικούς υποδοχείς, τους TrkB και TrkC. Ως συνέπεια, οι ουσίες αυτές δεν μεταβολίζονται γρήγορα στα προϊόντα με ανδρογονική και οιστρογονική δράση. Με βάση αυτές τις ιδιότητες, οι νέες συνθετικές ουσίες ονομάστηκαν «νευροστεροειδείς μικρονευροτροφίνες». Τα νέα παράγωγα έχουν τη δυνατότητα να δράσουν ως μόρια – οδηγοί στην ανάπτυξη μικρών βιοδιαθέσιμων μορίων του ΚΝΣ, είτε ως αγωνιστές ή ανταγωνιστές στους υποδοχείς νευροτροφινών για την αντιμετώπιση νευροεκφυλιστικών ασθενειών.

Σε αντίθεση με την DHEA, τα συνθετικά 17 – σπύρο παράγωγά της δεν παρουσιάζουν συγγένεια πρόσδεσης με τον υποδοχέα ER, τους ανδρογονικούς υποδοχείς, τους TrkB και TrkC. Αμφότερες οι DHEA και τα παράγωγά της, έχουν την δυνατότητα να διασώσουν την απώλεια των εξαρτώμενων NGF-αισθητήριους εμβρυονικούς νευρώνες σε *ngf* $-/-$ ποντίκια. Οι συνθετικές μικρονευροτροφίνες εμποδίζουν την ανάπτυξη EAE στα ποντίκια, δρώντας στα T λεμφοκύτταρα και αναστέλλοντας την νευροτοξική Th17 αντίδραση. Επιπλέον, προστατεύουν τον αμφιβληστροειδή χιτώνα σε ένα *ex vivo* μοντέλο ισχαιμίας και στο μοντέλο διαβητικής ρετινοπάθειας. Τα μόρια που αναφέρθηκαν παρουσιάζουν νευρογενετικά αποτελέσματα σε *in vivo* και σε *in vitro* μελέτες. Έχουν την ιδιότητα να αυξάνουν τον αριθμό των BrdU – θετικών νευρώνων στον ιππόκαμπο ενήλικων ποντικιών και την παραγωγή αλλά όχι την διαφοροποίηση των εμβρυονικών νευρικών βλαστοκυττάρων.

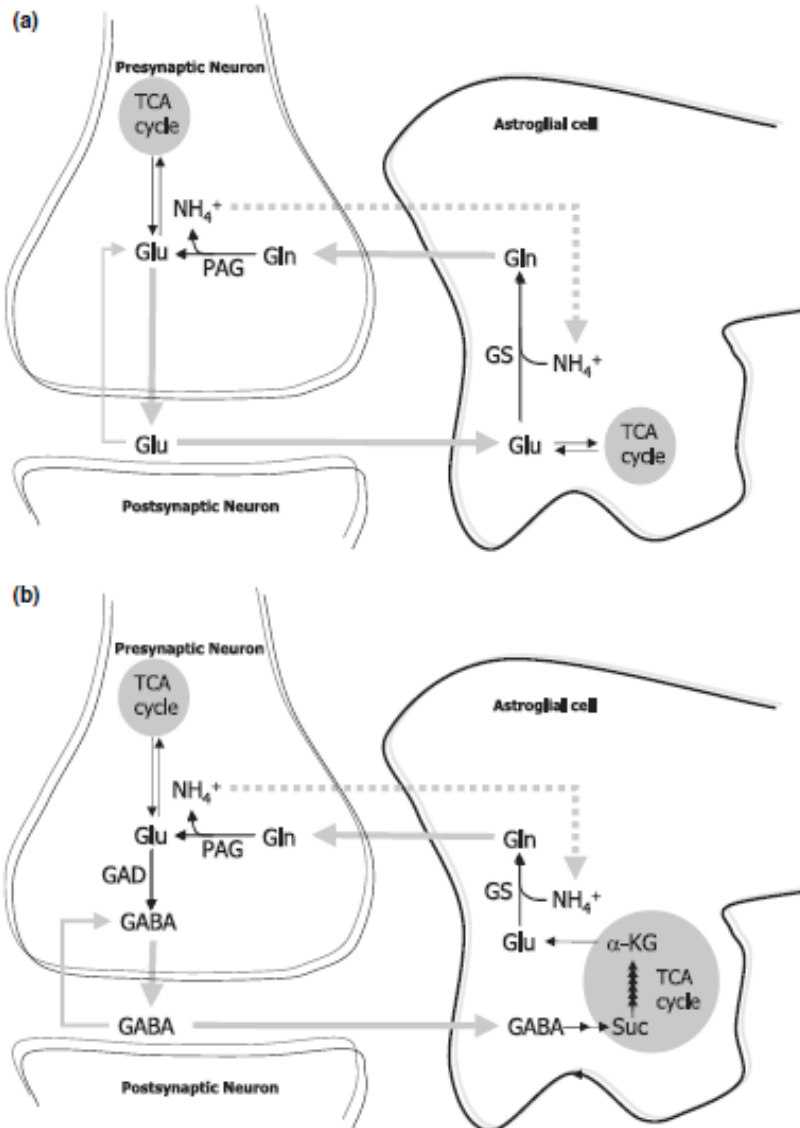
Οι NGF και DHEA δρουν αποτελεσματικά στην προστασία των νευρωνικών κυττάρων κατά της απόπτωσης. Οι αντιαποπτωτικές τους δράσεις ξεκινούν στη μεμβράνη του πλάσματος, και ακολουθούνται από τον μεταγραφικό έλεγχο αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl – 2 μέσω ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF – B και CREB. Αυτές οι ομοιότητες στη διαδικασία μεταγωγής του σήματος που ενεργοποιούνται από την DHEA και τον NGF καταδεικνύουν σημαντικό ρόλο στους NGF υποδοχείς για τις αντιαποπτωτικές δράσεις της DHEA. Συνθετικά μόρια που δρουν ως αγωνιστές του NGF υποδοχέα με πιθανή νευροπροστατευτική δράση μπορούν να αποτελέσουν νέες θεραπευτικές μεθόδους.

Κύκλος γλουταμικού/ γλουταμίνης και γ- αμινοβουτυρικού οξέος

Στους νευρώνες υπάρχουν δύο πηγές γλουταμικού οξέος. Η μία είναι η πρόσληψη γλουταμικού από τους μεταφορείς του γλουταμικού οξέος (EAAC1), οι οποίοι βρίσκονται στους προσυναπτικούς τερματικούς GABAεργικούς νευρώνες. Η δεύτερη πηγή προέρχεται από τον κύκλο γλουταμίνης- γλουταμικού οξέος των αστροκυττάρων, όπου το γλουταμικό προσλαμβάνεται από τα αστροκύτταρα μέσω του ειδικού μεταφορέα γλουταμικού οξέος (GLT-1).

Ο διαχωρισμός των αποθεμάτων γλουταμίνης και γλουταμικού οξέος στα αστροκύτταρα και στους νευρώνες, οδήγησε στην πρόταση ότι υπάρχει ένας κύκλος γλουταμίνης και γλουταμικού οξέος που δραστηριοποιείται στους γλουταμεργικούς νευρώνες και στα αστροκύτταρα. Ο κύκλος αυτός στην γλουταματεργική σύναψη φαίνεται στην εικόνα 5. Ο νευροδιαβιβαστής που απελευθερώνεται προσλαμβάνεται από τα αστροκύτταρα, και τελικά μετατρέπεται σε γλουταμίνη μέσω του ειδικού ενζύμου, της συνθετάσης της γλουταμίνης. Στη συνέχεια, ο νευροδιαβιβαστής απελευθερώνεται στον εξωκυττάριο χώρο, από τον οποίο λαμβάνεται από τους νευρώνες και μετατρέπεται εκ νέου σε γλουταμικό από την γλουταμινάση. Στην GABA-εργική σύναψη (εικόνα 5b), το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) λαμβάνεται από τα αστροκύτταρα και καταβολίζεται σε σουκινικό μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέος με τη δράση της GABA τρανσαμινάσης. Η γλουταμίνη μπορεί να συντεθεί από το σουκινικό, μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέος, μετά από την συμπύκνωση του ακετύλο- CoA με το οξαλοξικό σχηματίζοντας το

κιτρικό οξύ και τελικά στη σύνθεση του α- κετογλουταρικού και του γλουταμικού οξέος. Το γλουταμικό οξύ στους γκαμπαεργικούς νευρώνες μετατρέπεται σε γ-αμινοβουτυρικό οξύ μέσω της αποκαρβοξυλάσης του γλουταμικού. Για κάθε μόριο γλουταμικού οξέος ή γ- αμινοβουτυρικού οξέος που εισέρχεται στον κύκλο, παράγεται ένα μόριο αμμωνίας στους νευρώνες. Τα αυξημένα επίπεδα αμμωνίας έχουν κατασταλτικά αποτελέσματα για αρκετές κυτταρικές λειτουργίες.



Εικόνα 5: σχηματική απεικόνιση του κύκλου γλουταμίνης- γλουταμικού στην σύναψη του γλουταμικού (a) , και του κύκλου γλουταμίνης- γ- αμινοβουτυρικού οξέος (GABA) στην σύναψη του GABA (b) (Bak, Schousboe et al. 2006).

Κύκλωμα προμετωπιαίου φλοιού – ιπποκάμπου

Οι επιπτώσεις της κατάθλιψης στην συναπτική δραστηριότητα διαφαίνονται σε αρκετές περιοχές του εγκεφάλου, όπως ο ιππόκαμπος, ο προμετωπιαίος φλοιός και η αμυγδαλή. Ο ιππόκαμπος αποτελεί μία από τις περισσότερο μελετημένες δομές του εγκεφάλου. Αρχικά, ο ιππόκαμπος αποτελεί μέρος του μεσομεταιχμιακού συστήματος και δρα σε συνέργεια με περιοχές του εγκεφάλου που σχετίζονται με το συναίσθημα, όπως η αμυγδαλή. Επιπλέον, ο ιππόκαμπος ρυθμίζει τον άξονα υποθάλαμο-υπόφυση-επινεφρίδια, ο οποίος σχετίζεται με το άγχος και την κατάθλιψη. Επίσης, θεωρείται ότι ο ιππόκαμπος παίζει σημαντικό ρόλο στην καταγραφή της μνήμης και στην διαδικασία ανάκτησής της. Συγκεκριμένα, η πλαστικότητα των συνάψεων του ιπποκάμπου φαίνεται ότι εμπλέκεται σημαντικά την μνήμη/μάθηση.

Οι περιοχές του ιπποκάμπου και του προμετωπιαίου φλοιού συνδέονται με μία προβολή νευρώνων. Η δραστηριότητα του κυκλώματος των δύο περιοχών παρουσιάζει ευαισθησία στο στρες, και το κύκλωμα παίζει σημαντικό ρόλο στην κατάθλιψη, την σχιζοφρένεια και τη διαταραχή του άγχους. Επιπλέον, σχετίζεται με την αμυγδαλή και την εκτελεστική λειτουργία (Godsil, Kiss et al. 2013). Η προβολή του ιπποκάμπου στον προμετωπιαίο φλοιό γίνεται απευθείας, χωρίς να μεσολαβεί κάποια άλλη περιοχή. Ωστόσο, η προβολή του προμετωπιαίου φλοιού στον ιππόκαμπο δεν γίνεται απευθείας. Στη προβολή γίνεται μέσω μίας πολυσυναπτικής οδού που διέρχεται από το nucleus reuniens (RE) του θαλάμου (Kafetzopoulos, Kokras et al. 2018).

Σκοπός διπλωματικής εργασίας

Με δεδομένη την πιθανή ευεργετική δράση των νευροστεροειδών στην κατάθλιψη και στις διαταραχές άγχους έγινε στο παρελθόν στο Εργ. Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ εκτίμηση των πιθανών αντικαταθλιπτικών ή αγχολυτικών ιδιοτήτων της ουσίας BNN27. Η ουσία αυτή έχει σχεδιασθεί, έτσι ώστε να μιμείται τις νευροτροφικές, αλλά όχι τις ενδοκρινείς δράσεις της DHEA. Το BNN27 παράχθηκε στο Ίδρυμα Ερευνών από την ομάδα της Δρ. Θεοδώρας Καλογεροπούλου και δόθηκε στην ομάδα Νευροψυχοφαρμακολογίας στο Εργ. Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ στα πλαίσια συνεργασίας με τον Καθηγητή Φαρμακολογίας κ. Αχιλλέα Γραβάνη.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός αμινοξέων σε υπόκαμπο και φλοιό επίμυων, στους οποίους είχε χορηγηθεί η ουσία BNN27. Ο προσδιορισμός έγινε μέσω της τεχνικής υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης με ηλεκτροχημικό ανιχνευτή (HPLC- ED). Τα αμινοξέα που αναλύθηκαν είναι η ασπαραγίνη (ASN), το γλουταμινικό οξύ (GLU), η γλουταμίνη (GLN), η ταυρίνη (TAU) και το γ- αμινοβουτυρικό οξύ (GABA).

Πειραματική μελέτη

Συμπεριφορικές μελέτες

Στο παρελθόν στο Εργ. Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ πραγματοποιήθηκαν δύο πειραματικές διαδικασίες με σκοπό να προσδιορισθεί η πιθανή δράση της ουσίας BNN27 στην κινητικότητα, εξερευνητικότητα, άγχος και κατάθλιψη.

Το πείραμα 1 περιλάμβανε 19 αρσενικούς και 18 θηλυκούς επίμυες που χωρίστηκαν σε 3 ομάδες φαρμάκου και μία εκδόχου (πίνακας). Οι ομάδες αυτές υποβλήθηκαν στις δοκιμασίες με συγκεκριμένη χρονική ακολουθία. Συγκεκριμένα, την πρώτη ημέρα υποβλήθηκαν στη δοκιμασία του ανοιχτού πεδίου, τη δεύτερη ημέρα στη δοκιμασία φωτεινού / σκοτεινού κλωβού, ενώ μετά από 6 μέρες υποβλήθηκαν στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης. Μετά από 3 εβδομάδες θανατώθηκαν με αποκεφαλισμό με τη βοήθεια εργαστηριακής λαιμητόμου μικρών ζώων σε ξεχωριστό δωμάτιο.

Πείραμα 1

Ομάδες	Αγωγή	Αρσενικοί επίμυες	Θηλυκοί επίμυες
Ομάδα Δ0	100% DMSO	7	6
Ομάδα Δ10	10 mg/kg BNN27	6	6
Ομάδα Δ30	30 mg/kg BNN27	6	6

Το πείραμα 2 περιλάμβανε 28 αρσενικούς και 30 θηλυκούς επίμυες που υποβλήθηκαν σε διαφορετικές δοκιμασίες με συγκεκριμένη χρονική αλληλουχία. Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε 2 ομάδες φαρμάκου και 1 ομάδα ελέγχου (πίνακας). Δημιουργήθηκαν δύο ομάδες που περιλάμβαναν πειραματόζωα και από τις τρεις εβδομάδες. Ειδικότερα, η πρώτη ομάδα, την πρώτη μέρα υποβλήθηκε στη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου, τη δεύτερη

μέρα στη δοκιμασία του φωτεινού/σκοτεινού κλωβού, τη τρίτη μέρα στη δοκιμασία υπερυψωμένου λαβυρίνθου, την τέταρτη μέρα στη δοκιμασία hole board, ενώ μετά από 9 μέρες υποβλήθηκε στη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης. Η δεύτερη ομάδα, την πρώτη μέρα υποβλήθηκε στη δοκιμασία φωτεινού/ σκοτεινού κλωβού, την τρίτη μέρα στη δοκιμασία του υπερυψωμένου λαβυρίνθου και την τέταρτη μέρα στη δοκιμασία hole board. Μετά από 3 βδομάδες η πρώτη ομάδα πειραματοζώων θανατώθηκε με αποκεφαλισμό και έγινε συλλογή ορού αίματος και απομόνωση των εγκεφάλων.

Πείραμα 2

Ομάδες	Αγωγή	Αρσενικοί επίμυες	Θηλυκοί επίμυες
Ομάδα Δ0	100% DMSO	10	10
Ομάδα Δ10	10 mg/kg BNN27	9	10
Ομάδα Δ30	30 mg/kg BNN27	9	10

Νευροχημικές μελέτες

Όπως προαναφέρθηκε μετά το πέρας των συμπεριφορικών δοκιμασιών οι επίμυες θανατώθηκαν, αφαιρέθηκαν οι εγκεφαλοι τους και απομονώθηκαν οι περιοχές του προμετωπιαίου φλοιού (PFC) και του ιπποκάμπου (HIPPO). Οι απομονωθέντες ιστοί τοποθετήθηκαν σε προ-ζυγισμένα σωληνάκια και προσδιορίστηκε το βάρος τους.

Η ομογενοποίηση των ιστών έγινε με την χρήση 0,1N διαλύματος υπερχλωρικού οξέος (HClO₄). Για την παρασκευή 1 L του συγκεκριμένου διαλύματος χρησιμοποιούνται 750mg μεταδιθειώδους νατρίου (Na₂S₂O₅) , 500mg αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTA) και 8,6 ml υπερχλωρικού οξέος (HClO₄) διαλυμένα σε 1L ύδατος καθαρότητας HPLC. Οι τρεις περιοχές του εγκεφάλου τοποθετήθηκαν σε 300μL διαλύματος 0,1N υπερχλωρικού οξέος (HClO₄) και διαλυτοποιήθηκαν με τη χρήση υπερήχων. Το προκύπτον ομογενοποιημένο δείγμα φυγοκεντρήθηκε στους 14000 rpm για 30 min στους 0°C. Έπειτα, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε eppendorfs και φυλάσσεται στους -80°C μέχρι την ανάλυση.

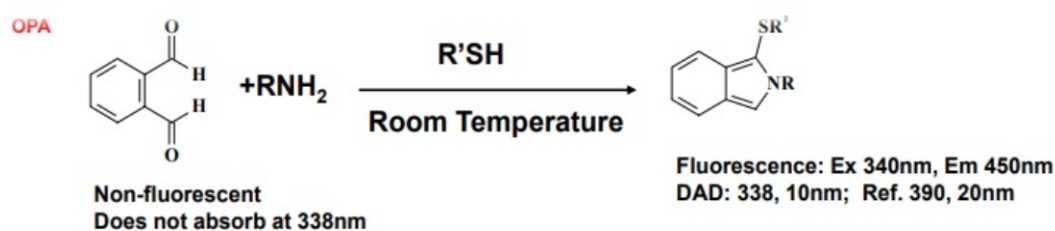
Νευροχημική ανάλυση αμινοξέων

Για τη νευροχημική ανάλυση των αμινοξέων επιλέχθηκε η μέθοδος της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με τη χρήση ηλεκτρονικού ανιχνευτή (HPLC – ED). Η στατική φάση που χρησιμοποιήθηκε είναι πολικής φύσεως, για το λόγο αυτό η χρωματογραφική μέθοδος που ακολουθήθηκε είναι κανονικής φάσης.

Ακολούθησε η παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος, όπως συνήθως. Για την προετοιμασία 1L ρυθμιστικού διαλύματος χρησιμοποιούνται 1L ύδατος καθαρότητας HPLC, 13.8gr ένυδρου φωσφορικού νατρίου (NaH₂PO₄ H₂O) και 0.19gr αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTA). Το pH ρυθμίζεται στην τιμή 5.6 με τη χρήση διαλύματος υδροξυδίου του νατρίου (NaOH) 3M. Το διάλυμα αναδεύεται επαρκώς και φυλάσσεται στους 4°C. Η κινητή φάση παρασκευάζεται καθημερινά και απαερώνεται πριν τη χρήση με τη βοήθεια αντλίας κενού. Η κινητή φάση παρασκευάζεται από την ανάμιξη του ρυθμιστικού διαλύματος με κατάλληλης αναλογίας διαλύματος ακετονιτριλίου (ACN), με σκοπό να αποκτήσει περιεκτικότητα 4.5 – 5 %

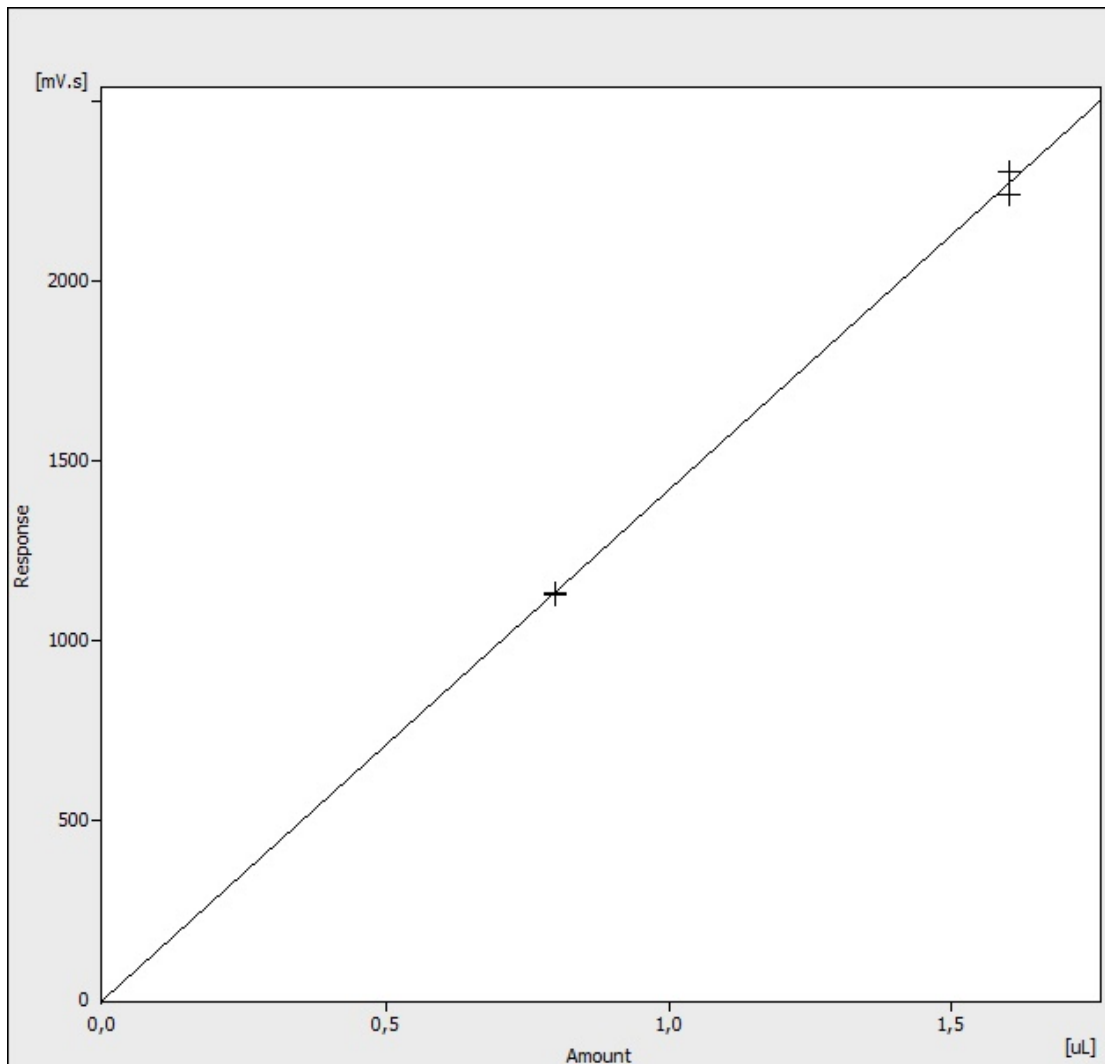
προκειμένου να επιτευχθεί ο καλύτερος διαχωρισμός. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση των πειραμάτων είναι AQUASILC18 με διαστάσεις 250 x 4.6 και διάμετρο πόρων 5μm (Thermo Electron, UK). (Kokras, Antoniou et al. 2009, Bessinis, Dalla et al. 2013, Kokras, Pastromas et al. 2018)

Τα πρότυπα διαλύματα ετοιμάζονται καθημερινώς. Για την προετοιμασία τους διαλύονται 10μL από το stock κάθε αμινοξέος σε τελικό όγκο 1mL διαλύματος ύδατος καθαρότητας HPLC. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις με σκοπό την παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων επιθυμητής συγκέντρωσης. Πριν την εισαγωγή κάθε πρότυπου διαλύματος ή δείγματος στο σύστημα HPLC, πραγματοποιείται η διαδικασία της παραγωγοποίησης. Κατά τη διαδικασία αυτή, τα αμινοξέα αντιδρούν με την ορθο-φθαλδεύδη (OPA) με σκοπό να προκύψει σύμπλοκο το οποίο θα είναι εμφανές στο σύστημα HPLC. Η αντίδραση της παραγωγοποίησης πραγματοποιείται με τη χρήση 50μL δείγματος και 10μL διαλύματος OPA, για δέκα λεπτά σε σκοτεινές συνθήκες. Στο τέλος της αντίδρασης, πραγματοποιείται εισαγωγή του δείγματος στο σύστημα. Τέλος, διενεργείται η βαθμονόμηση του συστήματος με διαφορετικές συγκεντρώσεις πρότυπων διαλυμάτων.



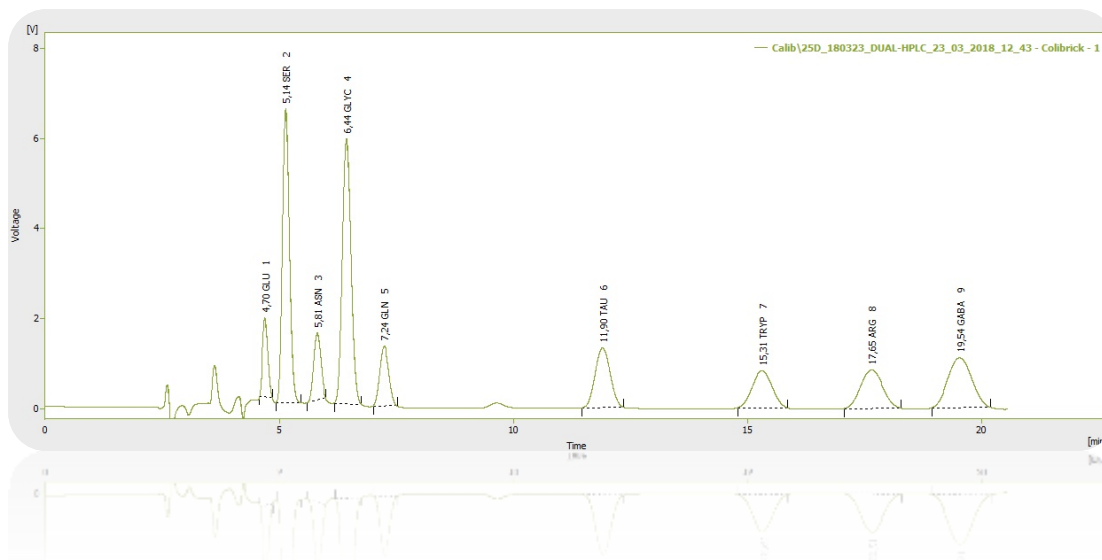
Εικόνα 6: Σχήμα αντίδρασης όρθο – φθαλδεύδης (OPA) με αμινοξέα. Το OPA αντιδρά με πρωτοταγείς αμίνες των αμινοξέων, πεπτίδια και πρωτεΐνες με σκοπό την ανίχνευση μέσω φθορισμού και την ποσοτικοποίηση των ουσιών. Το αντιδραστήριο OPA παρέχει υψηλής ευαισθησίας τεχνική ανίχνευσης των αμινοξέων.

Μετά το χρωματογραφικό διαχωρισμό, τα διαλύματα αναφοράς και τα δείγματα αναλύονται στον ηλεκτροχημικό ανιχνευτή ο οποίος παραμένει σε σταθερό δυναμικό +800 mV. Για τις αναλύσεις σε αυτή τη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε υαλώδης άνθρακας ως ηλεκτρόδιο εργασίας και Ag/AgCl ως ηλεκτρόδιο αναφοράς. Σε όλη τη διαδικασία των πειραμάτων η θερμοκρασία κυμαινόταν μεταξύ των τιμών 20 - 25 °C. Η ανάλυση πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας αντλία LKB2248 (Pharmacia Sweden), η οποία είναι συζευγμένη με ηλεκτροχημικό ανιχνευτή BAS LC4 B (Bioanalytical Systems, USA)



Γράφημα 1: Εικόνα της καμπύλης βαθμονόμησης. Στον έναν άξονα απεικονίζεται η ποσότητα της άγνωστης ουσίας (μg) και στον άλλον άξονα η απόκριση του συστήματος στην ουσία αυτή (mV s). Στην καμπύλη φαίνονται οι δύο αραιώσεις των πρότυπων διαλυμάτων.

Τέλος, το σύστημα HPLC ήταν συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε με σκοπό την ποσοτικοποίηση των ουσιών. Η ποσοτικοποίηση έγινε με την περιογή κάτω από την καμπύλη του χρωματογραφήματος (AUC) για κάθε ουσία σε σύγκριση με την αντίστοιχη των εξωτερικών πρότυπων διαλυμάτων αναφοράς. Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων είναι το Clarity (Data Apex, Czech Republic). Το όριο ανίχνευσης ήταν 1 pg/ 27 μL, όσο δηλαδή ο όγκος κάθε ένεσης.



Εικόνα 7: Χρωματογράφημα αναφοράς (calibration standard). Απεικόνιση ενός χρωματογραφήματος όπου διακρίνονται οι κορυφές των αμινοξέων του γλουταμικού οξέος (GLU), της σερίνης (SER), της ασπαραγίνης (ASN), της γλυκίνης (GLYC), της γλουταμίνης (GLN), της ταυρίνης (TAU), της τρυπτοφάνης (TRYP), της αργινίνης (ARG) και του γ – αμινοβουτυρικό οξύ (GABA).

Στατιστική ανάλυση

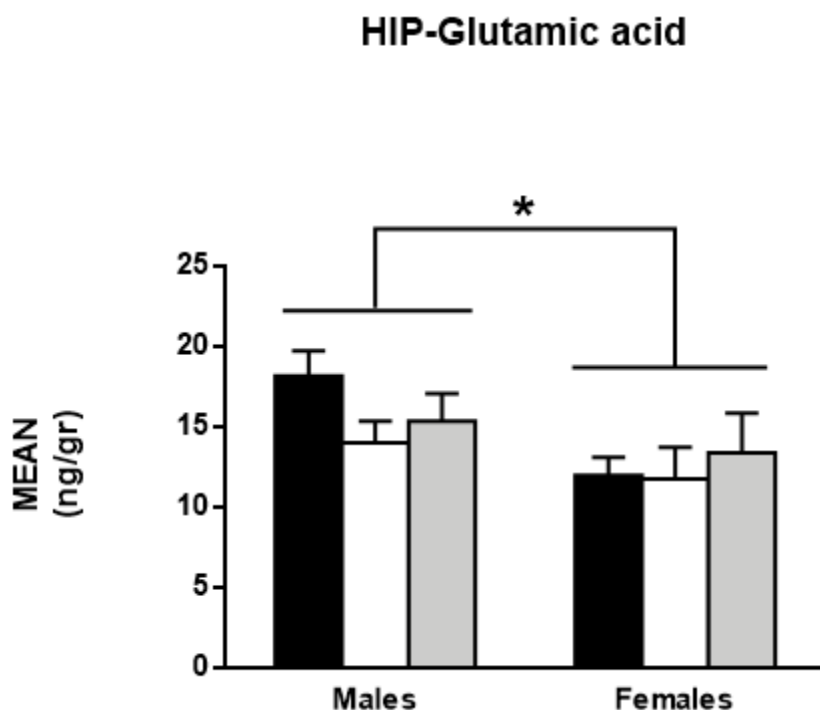
Η στατιστική ανάλυση έγινε χρησιμοποιώντας την ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων (two- way ANOVA). Οι δύο ανεξάρτητοι παράγοντες που μελετήθηκαν είναι το φύλο (αρσενικό, θηλυκό) και η θεραπεία (έκδοχο, BNN27 10mg/kg και BNN27 30 mg/kg). Όταν τα αποτελέσματα δεν επάγονταν στις παραδοχές της ανάλυσης διακύμανσης εφαρμόστηκαν περαιτέρω διορθώσεις, όπως η δοκιμασία Levene.

Αποτελέσματα Νευροχημικών Πειραμάτων

Επίπεδα γλουταμικού οξέος στην περιοχή του ιπποκάμπου

Η χορήγηση του BNN27 δεν έχει επίδραση στα επίπεδα γλουταμικού οξέος στον ιππόκαμπο [$F_{(2,51)}= 0,751$; $p=0,477$]. Ωστόσο, η two-way ANOVA έδειξε επίδραση του φύλου στα επίπεδα γλουταμικού οξέος του ιπποκάμπου, με τα αρσενικά πειραματόζωα να έχουν συνολικά υψηλότερα επίπεδα γλουταμικού οξέος σε σχέση με τα θηλυκά [$F_{(1,51)}= 5,516$; $p= 0,023$].

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του Lavene's test. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για να εξετάσει την ισότητα της διακύμανσης των μεταβλητών και στην προκειμένη περίπτωση ήταν μη στατιστικά σημαντική. Συγκεκριμένα, η τιμή του p με βάση τα mean/ median/ median with adjusted df/ trimmed mean είναι 0,37/ 0,669/ 0,669/ 0,468 αντίστοιχα.



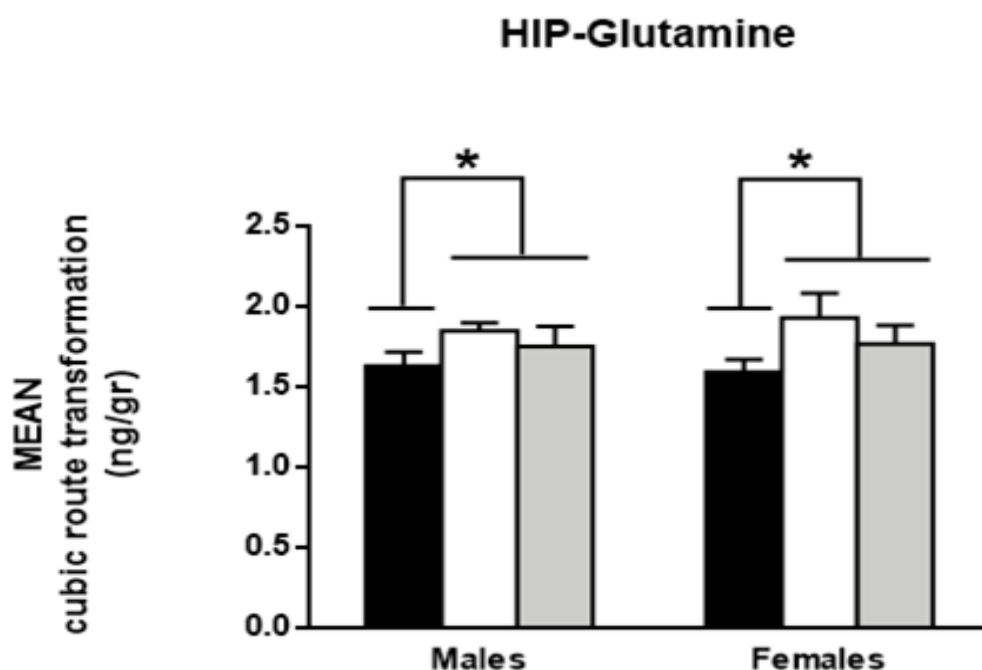
Γράφημα 2: Απεικόνιση μέσης τιμής επιπέδων του γλουταμικού οξέος (GLU) στον ιππόκαμπο. Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί και θηλυκοί επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε το έκδοχο και η ουσία BNN27 σε δύο δόσεις, 10 mg/kg και 30 mg/kg. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει την κύρια επίδραση του φύλου και υπογραμμίζει τη στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε αρσενικούς και θηλυκούς επίμυες, με επίπεδο σημαντικότητας $p \leq 0,05$.

Επίπεδα γλουταμίνης στην περιοχή του ιπποκάμπου

Η χορήγηση του BNN είχε στατιστικά σημαντική επίδραση στα επίπεδα γλουταμίνης στον ιππόκαμπο των αρσενικών και θηλυκών επιμύων [$F_{(2,51)}= 3,195$; $p=0,049$]. Ωστόσο, η two-way ANOVA δεν έδειξε στατιστικά σημαντική επίδραση του φύλου στα επίπεδα της γλουταμίνης [$F_{(1,51)}= 0,005112$; $p=0,822$], ούτε της αλληλεπίδρασης φαρμάκου και φύλου [$F_{(2,51)}= 0,1407$; $p=0,869$].

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του Lavene's test. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για να εξετάσει την ισότητα της διακύμανσης των μεταβλητών και στην προκειμένη περίπτωση ήταν στατιστικά σημαντική. Συγκεκριμένα, η τιμή του p με βάση mean/ median/ median with adjusted df/ trimmed mean είναι 0,018/ 0,104/ 0,123/ 0,03 αντίστοιχα.

Λόγω της σημαντικότητας που παρουσιάζει το Levene's test [Based on mean ($p= 0,018$) ; Based on trimmed mean ($p= 0,03$)], πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός των τιμών στην κυβική τους ρίζα, προκειμένου να ικανοποιηθεί η απαίτηση της ANOVA για ίση μεταβλητότητα των τιμών μεταξύ των ομάδων που συγκρίνονται. Μετά την μετατροπή, η τιμή p του Levene's test ήταν 0,08/ 0,134/ 0,14/ 0,091 για το mean/ median/ median with adjusted df/ trimmed mean αντίστοιχα.

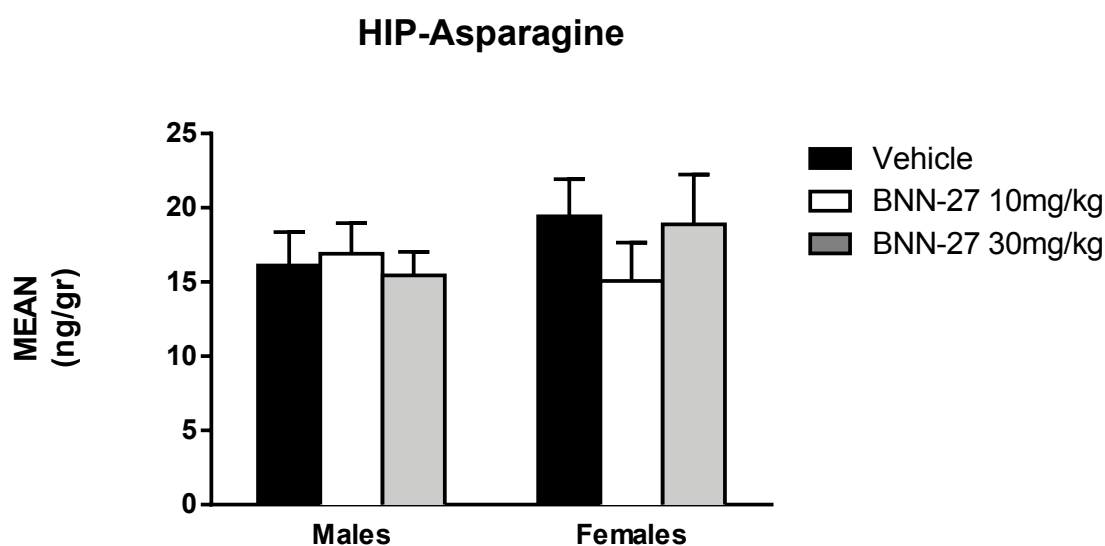


Γράφημα 3: Απεικόνιση μέσης τιμής επιπέδων της γλουταμίνης (GLN) στον ιππόκαμπο. Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί και θηλυκοί επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε το έκδοχο και η ουσία BNN27 σε δύο δόσεις, των 10 mg/kg και 30 mg/kg. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει την κύρια επίδραση του φαρμάκου και υπογραμμίζει τη στατιστικά σημαντική $p \leq 0,05$.

Επίπεδα ασπαραγίνης στην περιοχή του ιπποκάμπου

Στην περίπτωση της ασπαραγίνης δεν παρατηρείται σημαντική επίδραση της χορήγησης BNN [$F_{(2,51)}= 0,769$; $p=0,769$] ή του φύλου [$F_{(1,51)}= 0,656$; $p=0,422$] και δεν υπήρχε αλληλεπίδραση φαρμάκου και φύλου [$F_{(2,51)}= 0,763$; $p=0,471$] στα επίπεδα της ασπαραγίνης στην περιοχή του ιπποκάμπου.

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του Lavene's test. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για να εξετάσει την ισότητα της διακύμανσης των μεταβλητών και στην προκειμένη περίπτωση δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Συγκεκριμένα, η τιμή του p με βάση mean/ median/ median with adjusted df/ trimmed mean είναι 0,478/ 0,588/ 0,590/ 0,515 αντίστοιχα.



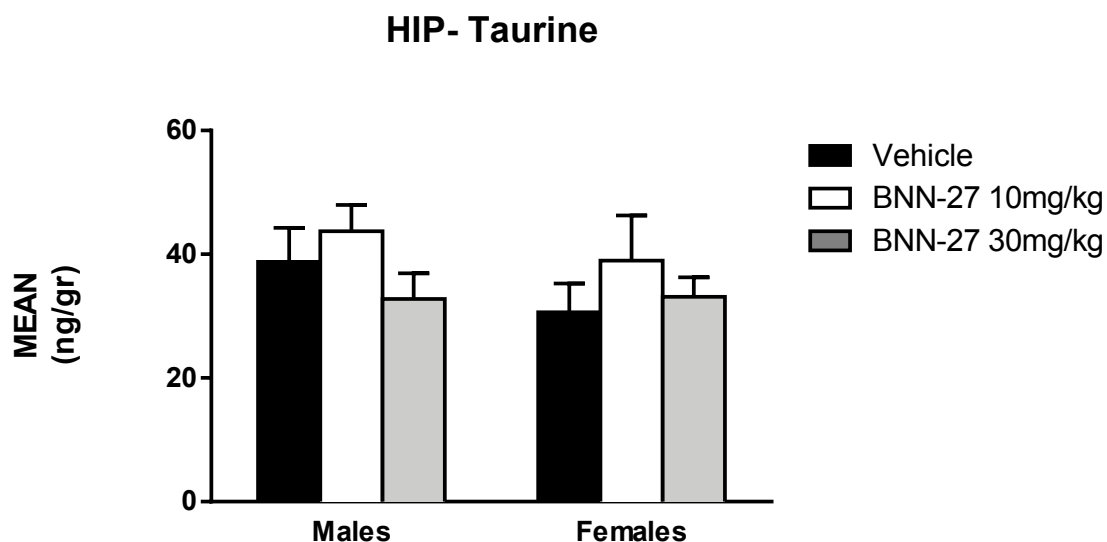
Γράφημα 4: Απεικόνιση μέσης τιμής επιπέδων της ασπαραγίνης (ASN) στον ιππόκαμπο. Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί και θηλυκοί επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε το έκδοχο και η ουσία BNN27 σε δύο δόσεις, των 10 mg/kg και 30 mg/kg.

Επίπεδα ταυρίνης στην περιοχή του ιπποκάμπου

Στην περίπτωση της ταυρίνης δεν παρατηρείται σημαντική επίδραση του BNN27 [$F_{(2,47)}= 1,628$; $p=0,207$], του φύλου [$F_{(1,47)}= 1,034$; $p=0,314$], και δεν υπήρχε αλληλεπίδραση BNN και φύλου [$F_{(2,47)}= 0,353$; $p=0,704$] στα επίπεδα της ταυρίνης στην περιοχή του ιπποκάμπου.

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του Lavene's test. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για να εξετάσει την ισότητα της διακύμανσης των

μεταβλητών και στην προκειμένη περίπτωση δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Συγκεκριμένα, η τιμή του p με βάση mean/ median/ median with adjusted df/ trimmed mean είναι 0,330/ 0,902/ 0,901/ 0,493 αντίστοιχα.



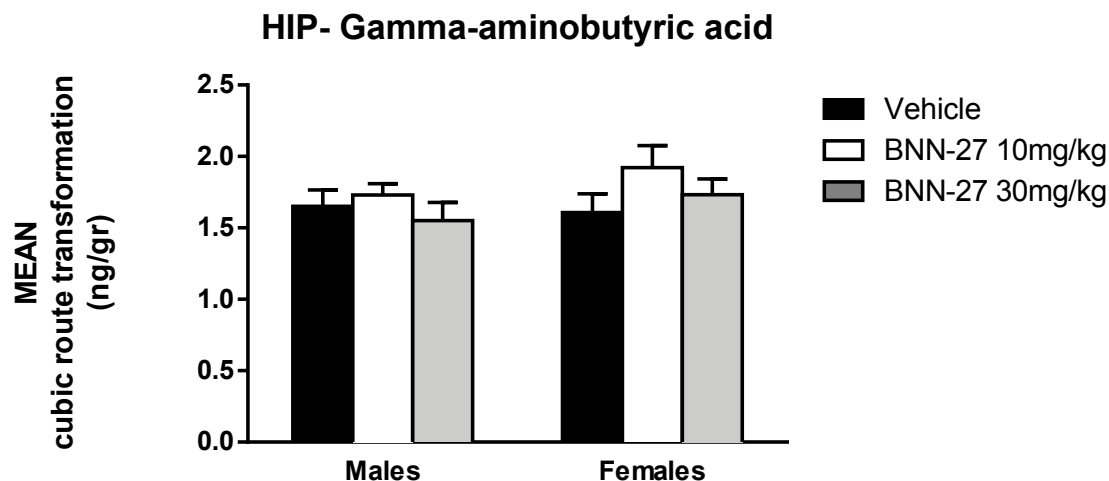
Γράφημα 5: Απεικόνιση μέσης τιμής επιπέδων της ταυρίνης (TAU) στον ιππόκαμπο. Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί και θηλυκοί επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε έκδοχο ή η ουσία BNN27 σε δύο δόσεις, 10 mg/kg και 30 mg/kg.

Επίπεδα γ – αμινοβουτυρικού οξέος στην περιοχή του ιπποκάμπου

Στην περίπτωση του γ – αμινοβουτυρικού οξέος (GABA) δεν παρατηρείται σημαντική επίδραση του BNN [$F_{(2,51)}= 1,624$; $p=0,207$], του φύλου [$F_{(1,51)}= 1,119$; $p=0,295$], και δεν υπήρχε αλληλεπίδραση φαρμάκου και φύλου [$F_{(2,51)}= 0,564$; $p=0,572$] στα επίπεδα του GABA στην περιοχή του ιπποκάμπου.

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του Lavene's test. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για να εξετάσει την ισότητα της διακύμανσης των μεταβλητών και στην προκειμένη περίπτωση ήταν στατιστικά σημαντική. Συγκεκριμένα, η τιμή του p με βάση mean/ median/ median with adjusted df/ trimmed mean είναι 0,003/ 0,415/ 0,416/ 0,010 αντίστοιχα.

Λόγω της σημαντικότητας που παρουσιάζει το Levene's test [Based on mean ($p= 0,003$); Based on trimmed mean ($p= 0,010$)], πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός των τιμών στην κυβική τους ρίζα, προκειμένου να ικανοποιηθεί η απαίτηση της ANOVA για ίση μεταβλητότητα των τιμών μεταξύ των ομάδων που συγκρίνονται. Μετά την μετατροπή, η τιμή p του Levene's test ήταν 0,455/ 0,883/ 0,883/ 0,5 για το mean/ median/ median with adjusted df/ trimmed mean αντίστοιχα.



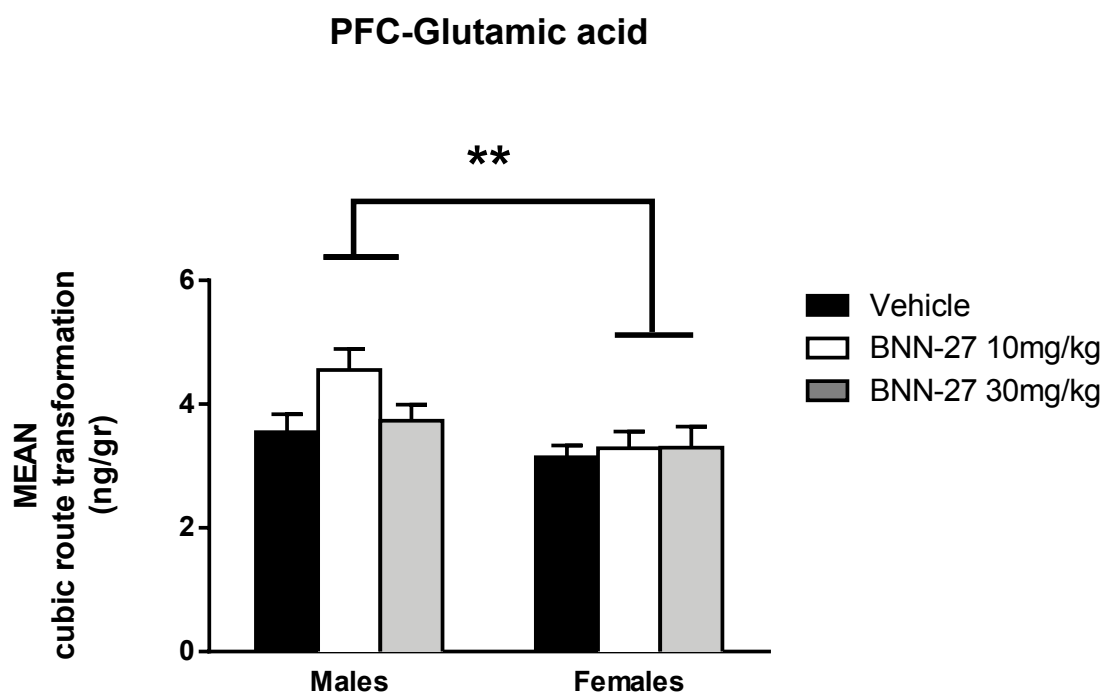
Γράφημα 6: Απεικόνιση μέσης τιμής επιπέδων του γ – αμινοβουτυρικού οξέος (GABA) στον ιππόκαμπο. Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί και θηλυκοί επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε το έκδοχο και η ουσία BNN27 σε δύο δόσεις, των 10 mg/kg και 30 mg/kg.

Επίπεδα γλουταμικού οξέος στην περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού

Η χορήγηση της ουσίας δεν έχει σημαντική επίδραση στα επίπεδα γλουταμικού οξέος στον ιππόκαμπο [$F_{(2,52)} = 2,075$; $p = 0,136$] και δεν υπάρχει αλληλεπίδραση ουσίας και φύλου [$F_{(2,52)} = 1,406$; $p = 0,2543$]. Ωστόσο, στην ίδια ανάλυση παρατηρείται επίδραση του φύλου στα επίπεδα γλουταμικού οξέος του προμετωπιαίου φλοιού, με τα αρσενικά να εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τα θηλυκά [$F_{(1,52)} = 8,820$; $p = 0,0045$].

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του Levene's test. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για να εξετάσει την ισότητα της διακύμανσης των μεταβλητών και στην προκειμένη περίπτωση ήταν στατιστικά σημαντική. Συγκεκριμένα, η τιμή του p με βάση mean/ median/ median with adjusted df/ trimmed mean είναι 0,014/ 0,215/ 0,224/ 0,024 αντίστοιχα.

Λόγω της σημαντικότητας που παρουσιάζει το Levene's test [Based on mean ($p = 0,014$); Based on trimmed mean ($p = 0,024$)], πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός των τιμών στην κυβική τους ρίζα, προκειμένου να ικανοποιηθεί η απαίτηση της ANOVA για ίση μεταβλητότητα των τιμών μεταξύ των ομάδων που συγκρίνονται. Μετά την μετατροπή, η τιμή p του Levene's test ήταν 0,352/ 0,78/ 0,779/ 0,412 για το mean/ median/ median with adjusted df/ trimmed mean αντίστοιχα.

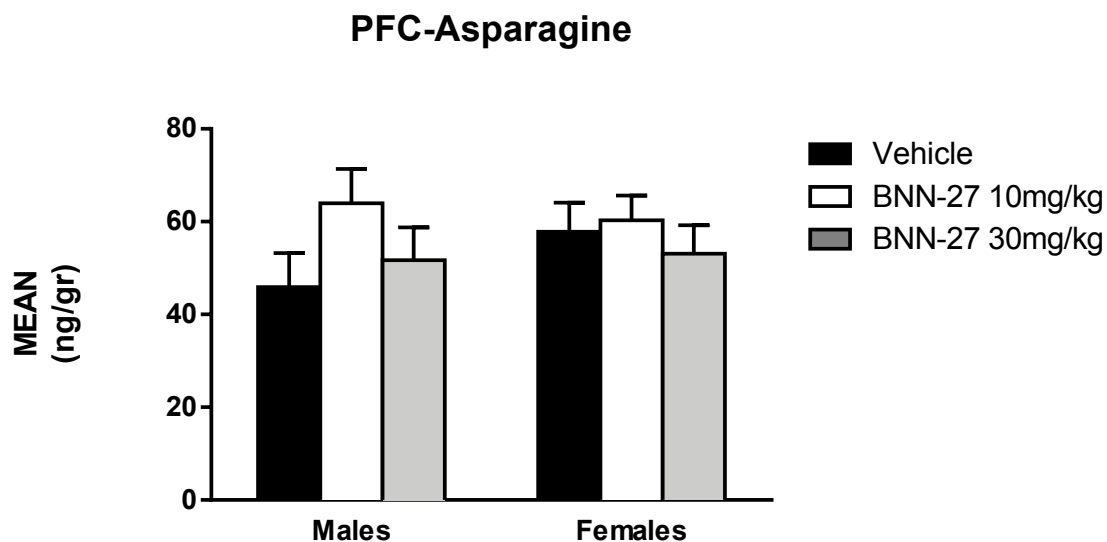


Γράφημα 7: Απεικόνιση μέσης τιμής επιπέδων του γλουταμικού οξέος (GLU) στον προμετωπιαίο φλοιό. Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί και θηλυκοί επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε το έκδοχο και η ουσία BNN27 σε δύο δόσεις, των 10 mg/kg και 30 mg/kg. Ο διπλός αστερίσκος (**) υποδηλώνει την κύρια επίδραση του φύλου και υπογραμμίζει τη στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ αρσενικών και θηλυκών επιμύων, με επίπεδο σημαντικότητας $0,01 \leq p \leq 0,05$.

Επίπεδα ασπαραγίνης στην περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού

Στην περίπτωση της ασπαραγίνης δεν παρατηρείται σημαντική επίδραση του BNN [F_(1,52)= 1,510; p=0,2303], του φύλου [F_(1,52)= 0,3546 ; p=0,5541], και δεν υπάρχει αλληλεπίδραση ουσίας και φύλου [F_(2,51)= 0,7218 ; p=0,4907] στα επίπεδα της ασπαραγίνης στην περιοχή του ιπποκάμπου.

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του Lavene's test. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για να εξετάσει την ισότητα της διακύμανσης των μεταβλητών και στην προκειμένη περίπτωση δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Συγκεκριμένα, η τιμή του p με βάση mean/ median/ median with adjusted df/ trimmed mean είναι 0,636/ 0,770/ 0,769/ 0,673 αντίστοιχα.

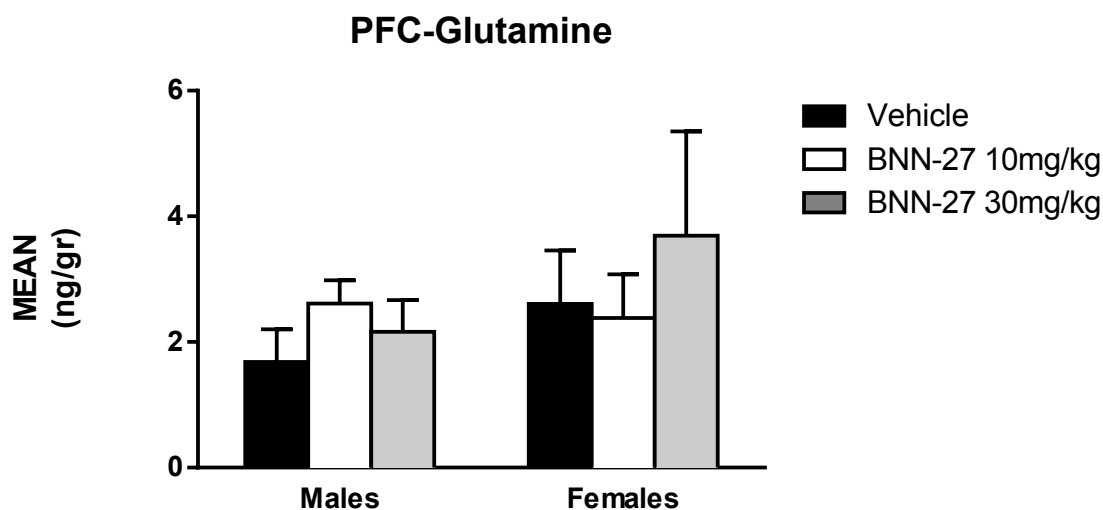


Γράφημα 8: Απεικόνιση μέσης τιμής επιπέδων της ασπαραγίνης (Asn) στον προμετωπιαίο φλοιό. Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί και θηλυκοί επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε το έκδοχο και η ουσία BNN27 σε δύο δόσεις, των 10 mg/kg και 30 mg/kg.

Επίπεδα γλουταμίνης στην περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού

Στην περίπτωση της γλουταμίνης δεν παρατηρείται σημαντική επίδραση του BNN [F_(2,52)= 0,3898 ; p=0,6791] , του φύλου [F_(1,52)= 1,042 ; p=0,3121], και δεν υπάρχει αλληλεπίδραση φαρμάκου και φύλου [F_(2,52)= 0,5047 ; p=0,6066] στα επίπεδα της γλουταμίνης στην περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού.

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του Lavene's test. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για να εξετάσει την ισότητα της διακύμανσης των μεταβλητών και στην προκειμένη περίπτωση δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Συγκεκριμένα, η τιμή του p με βάση mean/ median/ median with adjusted df/ trimmed mean είναι 0,300/ 0,864/ 0,860/ 0,704 αντίστοιχα.



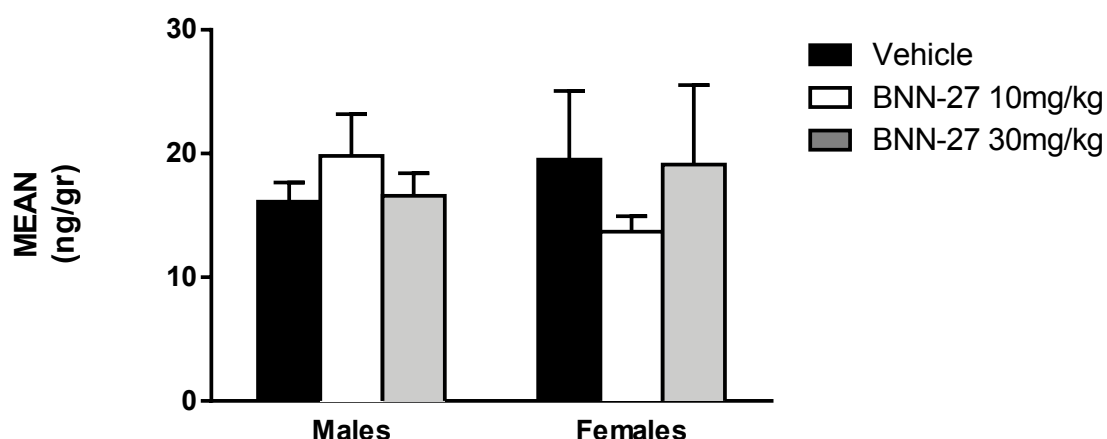
Γράφημα 9: Απεικόνιση μέσης τιμής επιπέδων της γλουταμίνης (Gln) στον προμετωπιαίο φλοιό. Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί και θηλυκοί επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε το έκδοχο και η ουσία BNN27 σε δύο δόσεις, των 10 mg/kg και 30 mg/kg.

Επίπεδα ταυρίνης στην περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού

Στην περίπτωση της ταυρίνης δεν παρατηρείται σημαντική επίδραση του BNN [$F_{(2,52)}=0,05165$; $p=0,9497$], του φύλου [$F_{(1,52)}=0,0006282$; $p=0,9801$] και δεν υπάρχει αλληλεπίδραση BNN και φύλου [$F_{(2,52)}=0,9213$; $p=0,4044$] στα επίπεδα της ταυρίνης στην περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού.

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του Lavene's test. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για να εξετάσει την ισότητα της διακύμανσης των μεταβλητών και στην προκειμένη περίπτωση δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Συγκεκριμένα, η τιμή του p με βάση mean/ median/ median with adjusted df/ trimmed mean είναι 0,237/ 0,727/ 0,726/ 0,545 αντίστοιχα.

PFC-Taurine

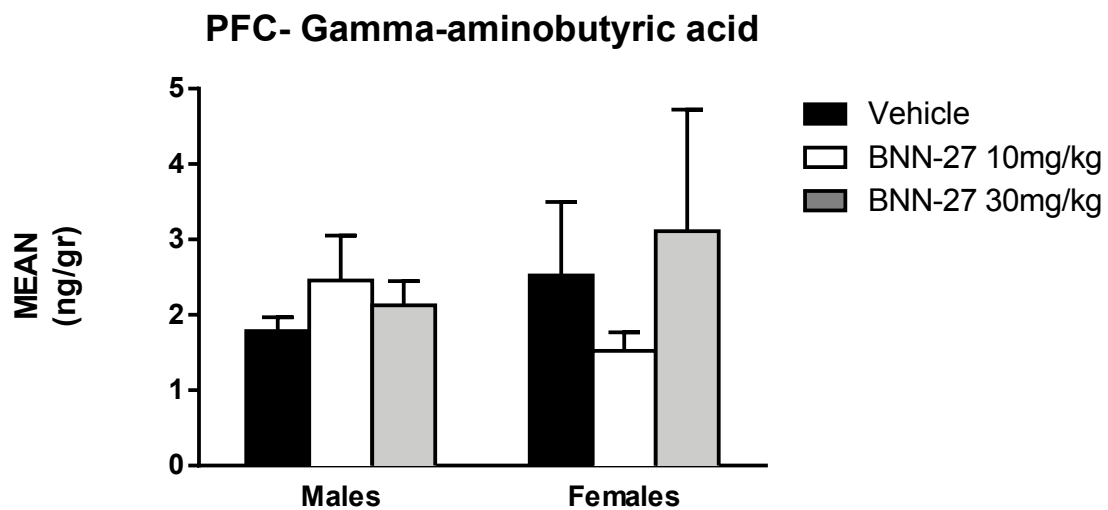


Γράφημα 10: Απεικόνιση μέσης τιμής επιπέδων της ταυρίνης (Tau) στον προμετωπιαίο φλοιό. Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί και θηλυκοί επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε το έκδοχο και η ουσία BNN27 σε δύο δόσεις, των 10 mg/kg και 30 mg/kg.

Επίπεδα γ - αμινοβουτυρικού οξέος στην περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού

Στην περίπτωση του γ – αμινοβουτυρικού οξέος (GABA) δεν παρατηρείται σημαντική επίδραση του BNN [$F_{(2,52)}= 0,3039$; $p=0,7393$] , του φύλου [$F_{(1,52)}= 0,1467$; $p=0,7033$], και δεν υπάρχει αλληλεπίδραση φαρμάκου και φύλου [$F_{(2,52)}= 0,7742$; $p=0,4663$] στα επίπεδα του GABA στην περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού.

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του Lavene's test. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για να εξετάσει την ισότητα της διακύμανσης των μεταβλητών και στην προκειμένη περίπτωση δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Συγκεκριμένα, η τιμή του p με βάση mean/ median/ median with adjusted df/ trimmed mean είναι 0,089/ 0,723/ 0,722/ 0,403 αντίστοιχα.



Γράφημα 11: Απεικόνιση μέσης τιμής επιπέδων του γ- αμινοβουτυρικού οξέος (Gaba) στον προμετωπιαίο φλοιό. Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί και θηλυκοί επίμνες, στους οποίους χορηγήθηκε το έκδοχο και η ουσία BNN27 σε δύο δόσεις, των 10 mg/kg και 30 mg/kg.

Συζήτηση

Κατά τις συμπεριφορικές μελέτες που είχαν διεξαχθεί στο παρελθόν στο Εργ. Φαρμακολογίας παρατηρήθηκε δόσοεξαρτώμενη επίδραση του BNN27, με τη δόση των 30 mg/kg να προκαλεί καταστολή στη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου και τη δοκιμασία φωτός/σκότους. Επιπλέον, μέσω της δοκιμασίας του ανοιχτού πεδίου, της δοκιμασίας φωτός/σκότους, τη δοκιμασία υπερυψωμένου λαβυρίνθου και τη δοκιμασία holeboard, φάνηκε ότι το BNN27 δεν προκαλεί αγχολυτικές ή αγχογόνες δράσεις. Κατά τη δοκιμασία της εξαναγκασμένης κολύμβησης έγινε εμφανές ότι η ουσία δεν έχει αντικαταθλιπτικές δράσεις. Τέλος, το BNN27 δεν εμφανίζει διαφορετική απόκριση στα δύο φύλα.

Κατά τη διάρκεια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, πραγματοποιήθηκε ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός αμινοξέων σε ιππόκαμπο και φλοιό θηλυκών και αρσενικών επίμυων, στους οποίους είχε χορηγηθεί η ουσία BNN27. Ο προσδιορισμός έγινε μέσω της τεχνικής υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης με ηλεκτροχημικό ανιχνευτή (HPLC- ED). Τα αμινοξέα που αναλύθηκαν είναι η ασπαραγίνη (ASN), το γλουταμικό οξύ (GLU), η γλουταμίνη (GLN), η ταυρίνη (TAU) και το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA). Η νευροχημική και στατιστική ανάλυση έδειξε διαφυλικές διαφορές στα επίπεδα του γλουταμικού οξέος στην περιοχή του ιπποκάμπου και του προμετωπιαίου φλοιού, με τα θηλυκά πειραματόζωα να παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα γλουταμικού οξέος. Επιπλέον, η χορήγηση του BNN27 αυξάνει τα επίπεδα της γλουταμίνης στην περιοχή του ιπποκάμπου, χωρίς να φαίνεται εξάρτηση από την δόση του BNN27 και το φύλο.

Ένας προτεινόμενος τρόπος δράσης του BNN27 είναι, πιθανόν, μέσω της λειτουργίας του ως αλλοστερικός ρυθμιστής των υποδοχέων GABA_A, παρόμοια με αυτή των βενζοδιαζεπινών που έχουν ήπια κατασταλτική δράση. Ο υποδοχέας GABA_A διαθέτει θέση σύνδεσης των νευροστεροειδών και είναι γνωστό πως η DHEA προσδένεται σε αυτόν, δρώντας ως ρυθμιστής του υποδοχέα. Η πρόσδεση αυτή επηρεάζει τα επίπεδα ιόντων χλωρίου και την υπερπόλωση των νευρώνων.

Παρόλο που σε ορισμένες μελέτες έχει δειχθεί ότι τα επίπεδα του γ-αμινοβουτυρικού οξέος στην περιοχή του ιπποκάμπου μειώνονται μετά από χρόνια ήπια στρες (Gronli, Fiske et al. 2007) και ότι τα επίπεδα και η λειτουργία του συστήματος του γ-αμινοβουτυρικού οξέος επανέρχονται στα φυσιολογικά επίπεδα μετά την χορήγηση αντικαταθλιπτικής θεραπείας (Holm, Nieto-Gonzalez et al. 2011) στην παρούσα μελέτη φάνηκε ότι δεν υπάρχουν αλλαγές στα επίπεδα του γ-αμινοβουτυρικού οξέος μετά την χορήγηση της ουσίας BNN27. Επίσης, όπως προαναφέρθηκε δεν εμφανίστηκε αγχολυτική δράση μέσω του υποδοχέα GABA_A μετά από χορήγηση της ουσίας BNN27. Άρα, τα αποτελέσματα της παρούσας νευροχημικής ανάλυσης συμφωνούν με τα αποτελέσματα των συμπεριφορικών δοκιμασιών, καθώς το BNN27 δεν προκαλεί αγχολυτικές δράσεις.

Ο κύκλος γλουταμικού οξέος-γλουταμίνης έχει δείχθει ότι αποτελεί έναν ενδογενή μηχανισμό ρύθμισης της απελευθέρωσης του γ-αμινοβουτυρικού οξέος στην περιοχή του ιπποκάμπου (Liang, Carlson et al. 2006). Πιθανώς, τα σημαντικά αυξημένα επίπεδα της γλουταμίνης στον ιππόκαμπο να προκαλούν την απελευθέρωση του γ-αμινοβουτυρικού οξέος και τελικά τη δράση του στους GABA_A υποδοχείς. Παρόλα αυτά, τα επίπεδα του γ-αμινοβουτυρικού οξέος στην περιοχή του ιπποκάμπου δεν εμφάνισαν σημαντική αλλαγή και δεν εκδηλώθηκαν αγχολυτικές δράσεις της ουσίας BNN27 κατά τις συμπεριφορικές δοκιμασίες.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η δόση των 30 mg/kg BNN27 προκάλεσε καταστολή στην δοκιμασία ανοιχτού πεδίου και στη δοκιμασία φωτός/σκοτάδι. Έχει βρεθεί ότι η χορήγηση ταυρίνης μπορεί να επηρεάσει την κινητικότητα και να προκαλέσει αγχώλυση στη συμπεριφορική δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (Sanberg and Ossenkopp 1977). Ωστόσο, τα επίπεδα ταυρίνης μετά τη χορήγηση BNN27 στις περιοχές του ιπποκάμπου και του προμετωπιαίου φλοιού δεν εμφανίζουν σημαντική αλλαγή στην παρούσα μελέτη. Μία εξήγηση είναι ότι οι δύο προαναφερθείσες περιοχές του εγκεφάλου δεν αποτελούν κέντρα ελέγχου της κίνησης του πειραματόζωου. Η καταστολή που προκαλεί η δόση των 30mg/kg του BNN27 ενδέχεται να οφείλεται στην αλλαγή των επιπέδων της ταυρίνης στα βασικά γάγγλια, τα οποία εμπλέκονται στον έλεγχο της κίνησης.

Επιπλέον, ένας προτεινόμενος μηχανισμός αντικαταθλιπτικής δράσης φαίνεται να είναι μέσω των υποδοχέων του γλουταμικού NMDA. Ουσίες όπως η κεταμίνη, έχουν την ιδιότητα να δρουν στους υποδοχείς του γλουταμικού NMDA και να εμφανίζουν άμεση αντικαταθλιπτική δράση. Ο τρόπος δράσης είναι μέσω ρύθμισης της συναπτικής απελευθέρωσης του γλουταμικού οξέος, ενισχύοντας την σηματοδότηση των AMPA υποδοχέων και μπλοκάροντας τους εξωσυναπτικούς NMDA υποδοχείς. Με τη δράση της κεταμίνης και παρόμοιων ουσιών, αυξάνονται τα εξωκυττάρια επίπεδα του γλουταμικού οξέος στην περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού. Η αύξηση της απελευθέρωσης του γλουταμικού φαίνεται να είναι κρίσιμη για την αντικαταθλιπτική δράση (Krystal, Sanacora et al. 2013). Ωστόσο, μέσω της νευροχημικής ανάλυσης φάνηκε ότι δεν υπάρχουν αλλαγές στα επίπεδα του γλουταμικού οξέος μετά την χορήγηση της ουσίας BNN27. Επίσης, δεν εμφανίζεται αντικαταθλιπτική δράση στην περίπτωση χορήγησης της ουσίας BNN27. Τα αποτελέσματα της νευροχημικής ανάλυσης συμφωνούν με τα αποτελέσματα των συμπεριφορικών δοκιμασιών, καθώς δεν παρουσιάστηκαν αντικαταθλιπτικές δράσεις του BNN27.

Επίσης, η σημαντική διαφορά των επιπέδων του γλουταμικού οξέος στην περιοχή του ιπποκάμπου και του προμετωπιαίου φλοιού αναδεικνύουν την σημαντικότητα πραγματοποίησης φαρμακολογικών πειραμάτων και στα δύο φύλα. Ένας πιθανός λόγος των διαφορών του φύλου είναι η εναλλαγή των ορμονών του φύλου στα θηλυκά πειραματόζωα. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τυχαία θηλυκά σε διάφορες φάσεις του κύκλου με σκοπό την εκπροσώπηση όλων των φάσεων του κύκλου. Διαφυλικές διαφορές στα επίπεδα του γλουταμικού οξέος στις περιοχές του ιπποκάμπου και του προμετωπιαίου φλοιού έχουν αναφερθεί και σε προηγούμενες μελέτες (Kokras, Antoniou et al. 2009, Kokras, Pastromas et al. 2018)

Επιπροσθέτως, η ουσία BNN27 έχει μελετηθεί για τη δράση της στην μνήμη αναγνώρισης (Pitsikas and Gravanis 2017). Στη μελέτη περιλαμβάνονταν δοκιμασίες όπως η αναγνώριση νέου αντικειμένου, μία μέθοδο μη χωρικής αναγνωριστικής μνήμης και την δοκιμασία νέας τοποθεσίας του αντικειμένου. Στις μελέτες αυτές φάνηκε ότι το BNN27 μπορεί να ρυθμίζει διαφορετικές πτυχές της έκδηλης μνήμης, πιθανότατα δρώντας μέσω του χολινεργικού συστήματος, το οποίο δεν μελετήθηκε στην παρούσα εργασία.

Επιπλέον, έχει μελετηθεί η επίδραση του BNN27 σε νευρωνικά και κύτταρα γλοίας με σκοπό να αποσαφηνιστούν οι δράσεις του στην απόπτωση και την φλεγμονή στην διαβητική ρετινοπάθεια σε διαγονιδιακούς επίμυες (Iban-Arias, Lisa et al. 2018). Οι μελέτες έδειξαν ότι το BNN27 δεν είχε επίδραση στον κυτταρικό θάνατο, αλλά ανέστρεψε την ενεργοποίηση των κυττάρων της γλοίας που προκαλείται από τον διαβήτη, μείωσε τις προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες και αύξησε τις αντι-φλεγμονώδεις κυτοκίνες. Επίσης, έχει δειχθεί ότι το BNN27 αλληλεπιδρά και ενεργοποιεί τον TrkA υποδοχέα του NGF, επάγοντας την νευρωνική επιβίωση και μέσω του NGF επιτυγχάνεται η αξονική ανάπτυξη (Pediaditakis, Efstathopoulos et al. 2016). Ένας επιπλέον υποδοχέας που αλληλεπιδρά με το BNN27 είναι ο p75NTR ρυθμίζοντας την ανάπτυξη των νευρωνικών κυττάρων. Σε αντίθεση με το BNN27 το BNN20, το οποίο ανάλογο του BNN27 και της DHEA, δρα μέσω του TrkB υποδοχέα προστατεύοντας τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες και επαναφέροντας τα επίπεδα του BDNF στα φυσιολογικά (Botsakis, Mourtzi et al. 2017).

Συμπερασματικά, με βάση την παρούσα μελέτη και τη βιβλιογραφία προτείνεται να διεξαχθούν περισσότερες συμπεριφορικές μελέτες με χρόνια χορήγηση του BNN27 με σκοπό να διαλευκανθούν οι νευροπροστατευτικές του και άλλες δράσεις. Επιπλέον, μελλοντικές μελέτες θα μπορούσαν να συμπεριλάβουν τη μελέτη των υποδοχέων του γλουταμικού οξέος και του γ-αμινοβουτυρικού οξέος με τη χρήση της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, καθώς και τη νευροχημική ανάλυση των νευροδιαβιβαστών σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου, όπως είναι το ραβδωτό σώμα, ο υποθάλαμος και τα βασικά γάγγλια.

Βιβλιογραφία

1. Adamec, R., P. Burton, J. Blundell, D. L. Murphy and A. Holmes (2006). "Vulnerability to mild predator stress in serotonin transporter knockout mice." *Behav Brain Res* 170(1): 126-140.
2. Adamec, R., P. Burton, J. Blundell, D. L. Murphy and A. Holmes (2006). "Vulnerability to mild predator stress in serotonin transporter knockout mice." *Behav Brain Res* 170(1): 126-140.
3. Akk, G., D. F. Covey, A. S. Evers, J. H. Steinbach, C. F. Zorumski and S. Mennerick (2009). "The influence of the membrane on neurosteroid actions at GABA(A) receptors." *Psychoneuroendocrinology* 34 Suppl 1: S59-66.
4. Akk, G., D. F. Covey, A. S. Evers, J. H. Steinbach, C. F. Zorumski and S. Mennerick (2009). "The influence of the membrane on neurosteroid actions at GABA(A) receptors." *Psychoneuroendocrinology* 34 Suppl 1: S59-66.
5. Albelda, N. and D. Joel (2012). "Animal models of obsessive-compulsive disorder: exploring pharmacology and neural substrates." *Neurosci Biobehav Rev* 36(1): 47-63.
6. Albelda, N. and D. Joel (2012). "Animal models of obsessive-compulsive disorder: exploring pharmacology and neural substrates." *Neurosci Biobehav Rev* 36(1): 47-63.
7. Albelda, N. and D. Joel (2012). "Current animal models of obsessive compulsive disorder: an update." *Neuroscience* 211: 83-106.
8. Albelda, N. and D. Joel (2012). "Current animal models of obsessive compulsive disorder: an update." *Neuroscience* 211: 83-106.
9. Allen, P. J., K. E. D'Anci, R. B. Kanarek and P. F. Renshaw (2012). "Sex-specific antidepressant effects of dietary creatine with and without sub-acute fluoxetine in rats." *Pharmacol Biochem Behav* 101(4): 588-601.
10. Allen, P. J., K. E. D'Anci, R. B. Kanarek and P. F. Renshaw (2012). "Sex-specific antidepressant effects of dietary creatine with and without sub-acute fluoxetine in rats." *Pharmacol Biochem Behav* 101(4): 588-601.
11. Andine, P., N. Widermark, R. Axelsson, G. Nyberg, U. Olofsson, E. Martensson and M. Sandberg (1999). "Characterization of MK-801-induced behavior as a putative rat model of psychosis." *J Pharmacol Exp Ther* 290(3): 1393-1408.
12. Andine, P., N. Widermark, R. Axelsson, G. Nyberg, U. Olofsson, E. Martensson and M. Sandberg (1999). "Characterization of MK-801-induced behavior as a putative rat model of psychosis." *J Pharmacol Exp Ther* 290(3): 1393-1408.
13. Bak, L. K., A. Schousboe and H. S. Waagepetersen (2006). "The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer." *J Neurochem* 98(3): 641-653.
14. Bay-Richter, C., C. M. O'Tuathaigh, G. O'Sullivan, D. M. Heery, J. L. Waddington and P. M. Moran (2009). "Enhanced latent inhibition in dopamine receptor-deficient mice is sex-specific for the D1 but not D2 receptor subtype: implications for antipsychotic drug action." *Int J Neuropsychopharmacol* 12(3): 403-414.

15. Bay-Richter, C., C. M. O'Tuathaigh, G. O'Sullivan, D. M. Heery, J. L. Waddington and P. M. Moran (2009). "Enhanced latent inhibition in dopamine receptor-deficient mice is sex-specific for the D1 but not D2 receptor subtype: implications for antipsychotic drug action." *Int J Neuropsychopharmacol* 12(3): 403-414.
16. Becker, J. B. (1990). "Estrogen rapidly potentiates amphetamine-induced striatal dopamine release and rotational behavior during microdialysis." *Neurosci Lett* 118(2): 169-171.
17. Becker, J. B. (1990). "Estrogen rapidly potentiates amphetamine-induced striatal dopamine release and rotational behavior during microdialysis." *Neurosci Lett* 118(2): 169-171.
18. Becker, J. B. and M. E. Beer (1986). "The influence of estrogen on nigrostriatal dopamine activity: behavioral and neurochemical evidence for both pre- and postsynaptic components." *Behav Brain Res* 19(1): 27-33.
19. Becker, J. B. and M. E. Beer (1986). "The influence of estrogen on nigrostriatal dopamine activity: behavioral and neurochemical evidence for both pre- and postsynaptic components." *Behav Brain Res* 19(1): 27-33.
20. Becker, J. B., H. Molenda and D. L. Hummer (2001). "Gender differences in the behavioral responses to cocaine and amphetamine. Implications for mechanisms mediating gender differences in drug abuse." *Ann N Y Acad Sci* 937: 172-187.
21. Becker, J. B., H. Molenda and D. L. Hummer (2001). "Gender differences in the behavioral responses to cocaine and amphetamine. Implications for mechanisms mediating gender differences in drug abuse." *Ann N Y Acad Sci* 937: 172-187.
22. Bessinis, D. P., C. Dalla, N. Kokras, P. M. Pitychoutis and Z. Papadopoulou-Daifoti (2013). "Sex-dependent neurochemical effects of environmental enrichment in the visual system." *Neuroscience* 254: 130-140.
23. Bessinis, D. P., C. Dalla, N. Kokras, P. M. Pitychoutis and Z. Papadopoulou-Daifoti (2013). "Sex-dependent neurochemical effects of environmental enrichment in the visual system." *Neuroscience* 254: 130-140.
24. Bhatnagar, S., N. Nowak, L. Babich and L. Bok (2004). "Deletion of the 5-HT₃ receptor differentially affects behavior of males and females in the Porsolt forced swim and defensive withdrawal tests." *Behav Brain Res* 153(2): 527-535.
25. Bhatnagar, S., N. Nowak, L. Babich and L. Bok (2004). "Deletion of the 5-HT₃ receptor differentially affects behavior of males and females in the Porsolt forced swim and defensive withdrawal tests." *Behav Brain Res* 153(2): 527-535.
26. Binder, E. B., H. E. Kunzel, T. Nickel, N. Kern, A. Pfennig, M. Majer, M. Uhr, M. Ising and F. Holsboer (2009). "HPA-axis regulation at in-patient admission is associated with antidepressant therapy outcome in male but not in female depressed patients." *Psychoneuroendocrinology* 34(1): 99-109.
27. Binder, E. B., H. E. Kunzel, T. Nickel, N. Kern, A. Pfennig, M. Majer, M. Uhr, M. Ising and F. Holsboer (2009). "HPA-axis regulation at in-patient admission is associated with antidepressant therapy outcome in male but not in female depressed patients." *Psychoneuroendocrinology* 34(1): 99-109.

28. Borowicz, K. K., B. Piskorska, M. Banach and S. J. Czuczwar (2011). "Neuroprotective actions of neurosteroids." *Front Endocrinol (Lausanne)* 2: 50.
29. Borowicz, K. K., B. Piskorska, M. Banach and S. J. Czuczwar (2011). "Neuroprotective actions of neurosteroids." *Front Endocrinol (Lausanne)* 2: 50.
30. Botsakis, K., T. Mourtzi, V. Panagiotakopoulou, M. Vreka, G. T. Stathopoulos, I. Pediaditakis, I. Charalampopoulos, A. Gravanis, F. Delis, K. Antoniou, D. Zisimopoulos, C. D. Georgiou, N. T. Panagopoulos, N. Matsokis and F. Angelatou (2017). "BNN-20, a synthetic microneurotrophin, strongly protects dopaminergic neurons in the "weaver" mouse, a genetic model of dopamine-denervation, acting through the TrkB neurotrophin receptor." *Neuropharmacology* 121: 140-157.
31. Camp, D. M. and T. E. Robinson (1988). "Susceptibility to sensitization. I. Sex differences in the enduring effects of chronic D-amphetamine treatment on locomotion, stereotyped behavior and brain monoamines." *Behav Brain Res* 30(1): 55-68.
32. Camp, D. M. and T. E. Robinson (1988). "Susceptibility to sensitization. II. The influence of gonadal hormones on enduring changes in brain monoamines and behavior produced by the repeated administration of D-amphetamine or restraint stress." *Behav Brain Res* 30(1): 69-88.
33. Camp, D. M. and T. E. Robinson (1988). "Susceptibility to sensitization. I. Sex differences in the enduring effects of chronic D-amphetamine treatment on locomotion, stereotyped behavior and brain monoamines." *Behav Brain Res* 30(1): 55-68.
34. Camp, D. M. and T. E. Robinson (1988). "Susceptibility to sensitization. II. The influence of gonadal hormones on enduring changes in brain monoamines and behavior produced by the repeated administration of D-amphetamine or restraint stress." *Behav Brain Res* 30(1): 69-88.
35. Castagne, V., P. Moser, S. Roux and R. D. Porsolt (2011). "Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice." *Curr Protoc Neurosci* Chapter 8: Unit 8 10A.
36. Castagne, V., P. Moser, S. Roux and R. D. Porsolt (2011). "Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice." *Curr Protoc Neurosci* Chapter 8: Unit 8 10A.
37. Chang, D. M., J. L. Lan, H. Y. Lin and S. F. Luo (2002). "Dehydroepiandrosterone treatment of women with mild-to-moderate systemic lupus erythematosus: a multicenter randomized, double-blind, placebo-controlled trial." *Arthritis Rheum* 46(11): 2924-2927.
38. Chang, D. M., J. L. Lan, H. Y. Lin and S. F. Luo (2002). "Dehydroepiandrosterone treatment of women with mild-to-moderate systemic lupus erythematosus: a multicenter randomized, double-blind, placebo-controlled trial." *Arthritis Rheum* 46(11): 2924-2927.
39. Chen, A., E. Zorrilla, S. Smith, D. Rousso, C. Levy, J. Vaughan, C. Donaldson, A. Roberts, K. F. Lee and W. Vale (2006). "Urocortin 2-deficient mice exhibit

- gender-specific alterations in circadian hypothalamus-pituitary-adrenal axis and depressive-like behavior." *J Neurosci* 26(20): 5500-5510.
40. Chen, A., E. Zorrilla, S. Smith, D. Rousso, C. Levy, J. Vaughan, C. Donaldson, A. Roberts, K. F. Lee and W. Vale (2006). "Urocortin 2-deficient mice exhibit gender-specific alterations in circadian hypothalamus-pituitary-adrenal axis and depressive-like behavior." *J Neurosci* 26(20): 5500-5510.
 41. Cohen, H. and R. Yehuda (2011). "Gender differences in animal models of posttraumatic stress disorder." *Dis Markers* 30(2-3): 141-150.
 42. Cohen, H. and R. Yehuda (2011). "Gender differences in animal models of posttraumatic stress disorder." *Dis Markers* 30(2-3): 141-150.
 43. Cryan, J. F. and F. F. Sweeney (2011). "The age of anxiety: role of animal models of anxiolytic action in drug discovery." *Br J Pharmacol* 164(4): 1129-1161.
 44. Cryan, J. F. and F. F. Sweeney (2011). "The age of anxiety: role of animal models of anxiolytic action in drug discovery." *Br J Pharmacol* 164(4): 1129-1161.
 45. Dalla, C., K. Antoniou, Z. Papadopoulou-Daifoti, J. Balthazart and J. Bakker (2004). "Oestrogen-deficient female aromatase knockout (ArKO) mice exhibit depressive-like symptomatology." *Eur J Neurosci* 20(1): 217-228.
 46. Dalla, C., K. Antoniou, Z. Papadopoulou-Daifoti, J. Balthazart and J. Bakker (2005). "Male aromatase-knockout mice exhibit normal levels of activity, anxiety and "depressive-like" symptomatology." *Behav Brain Res* 163(2): 186-193.
 47. Dalla, C., K. Antoniou, Z. Papadopoulou-Daifoti, J. Balthazart and J. Bakker (2004). "Oestrogen-deficient female aromatase knockout (ArKO) mice exhibit depressive-like symptomatology." *Eur J Neurosci* 20(1): 217-228.
 48. Dalla, C., K. Antoniou, Z. Papadopoulou-Daifoti, J. Balthazart and J. Bakker (2005). "Male aromatase-knockout mice exhibit normal levels of activity, anxiety and "depressive-like" symptomatology." *Behav Brain Res* 163(2): 186-193.
 49. Dalla, C., P. M. Pitychoutis, N. Kokras and Z. Papadopoulou-Daifoti (2010). "Sex differences in animal models of depression and antidepressant response." *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 106(3): 226-233.
 50. Dalla, C., P. M. Pitychoutis, N. Kokras and Z. Papadopoulou-Daifoti (2011). "Sex differences in response to stress and expression of depressive-like behaviours in the rat." *Curr Top Behav Neurosci* 8: 97-118.
 51. Dalla, C., P. M. Pitychoutis, N. Kokras and Z. Papadopoulou-Daifoti (2010). "Sex differences in animal models of depression and antidepressant response." *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 106(3): 226-233.
 52. Dalla, C., P. M. Pitychoutis, N. Kokras and Z. Papadopoulou-Daifoti (2011). "Sex differences in response to stress and expression of depressive-like behaviours in the rat." *Curr Top Behav Neurosci* 8: 97-118.
 53. Dawson, J. L., Y. M. Cheung and R. T. Lau (1975). "Developmental effects of neonatal sex hormones on spatial and activity skills in the white rat." *Biol Psychol* 3(3): 213-229.
 54. Dawson, J. L., Y. M. Cheung and R. T. Lau (1975). "Developmental effects of neonatal sex hormones on spatial and activity skills in the white rat." *Biol Psychol* 3(3): 213-229.

55. Do Rego, J. L., J. Y. Seong, D. Burel, J. Leprince, V. Luu-The, K. Tsutsui, M. C. Tonon, G. Pelletier and H. Vaudry (2009). "Neurosteroid biosynthesis: enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides." *Front Neuroendocrinol* 30(3): 259-301.
56. Do Rego, J. L., J. Y. Seong, D. Burel, J. Leprince, V. Luu-The, K. Tsutsui, M. C. Tonon, G. Pelletier and H. Vaudry (2009). "Neurosteroid biosynthesis: enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides." *Front Neuroendocrinol* 30(3): 259-301.
57. Forgie, M. L. and J. Stewart (1994). "Six differences in the locomotor-activating effects of amphetamine: role of circulating testosterone in adulthood." *Physiol Behav* 55(4): 639-644.
58. Forgie, M. L. and J. Stewart (1994). "Six differences in the locomotor-activating effects of amphetamine: role of circulating testosterone in adulthood." *Physiol Behav* 55(4): 639-644.
59. Frank, E., L. L. Carpenter and D. J. Kupfer (1988). "Sex differences in recurrent depression: are there any that are significant?" *Am J Psychiatry* 145(1): 41-45.
60. Frank, E., L. L. Carpenter and D. J. Kupfer (1988). "Sex differences in recurrent depression: are there any that are significant?" *Am J Psychiatry* 145(1): 41-45.
61. Frye, C. A., S. M. Petralia and M. E. Rhodes (2000). "Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and 3alpha,5alpha-THP." *Pharmacol Biochem Behav* 67(3): 587-596.
62. Frye, C. A., S. M. Petralia and M. E. Rhodes (2000). "Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and 3alpha,5alpha-THP." *Pharmacol Biochem Behav* 67(3): 587-596.
63. Godsil, B. P., J. P. Kiss, M. Spedding and T. M. Jay (2013). "The hippocampal-prefrontal pathway: the weak link in psychiatric disorders?" *Eur Neuropsychopharmacol* 23(10): 1165-1181.
64. Goel, N. and T. L. Bale (2008). "Organizational and activational effects of testosterone on masculinization of female physiological and behavioral stress responses." *Endocrinology* 149(12): 6399-6405.
65. Goel, N. and T. L. Bale (2008). "Organizational and activational effects of testosterone on masculinization of female physiological and behavioral stress responses." *Endocrinology* 149(12): 6399-6405.
66. Goel, N., J. L. Workman, T. T. Lee, L. Innala and V. Viau (2014). "Sex differences in the HPA axis." *Compr Physiol* 4(3): 1121-1155.
67. Goel, N., J. L. Workman, T. T. Lee, L. Innala and V. Viau (2014). "Sex differences in the HPA axis." *Compr Physiol* 4(3): 1121-1155.
68. Griffin, L. D. and S. H. Mellon (1999). "Selective serotonin reuptake inhibitors directly alter activity of neurosteroidogenic enzymes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(23): 13512-13517.

69. Griffin, L. D. and S. H. Mellon (1999). "Selective serotonin reuptake inhibitors directly alter activity of neurosteroidogenic enzymes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(23): 13512-13517.
70. Gronli, J., E. Fiske, R. Murison, B. Bjorvatn, E. Sorensen, R. Ursin and C. M. Portas (2007). "Extracellular levels of serotonin and GABA in the hippocampus after chronic mild stress in rats. A microdialysis study in an animal model of depression." *Behav Brain Res* 181(1): 42-51.
71. Gunther, L., J. Rothe, A. Rex, J. P. Voigt, M. J. Millan, H. Fink and B. Bert (2011). "5-HT(1A)-receptor over-expressing mice: genotype and sex dependent responses to antidepressants in the forced swim-test." *Neuropharmacology* 61(3): 433-441.
72. Gunther, L., J. Rothe, A. Rex, J. P. Voigt, M. J. Millan, H. Fink and B. Bert (2011). "5-HT(1A)-receptor over-expressing mice: genotype and sex dependent responses to antidepressants in the forced swim-test." *Neuropharmacology* 61(3): 433-441.
73. Hafner, H. (2003). "Gender differences in schizophrenia." *Psychoneuroendocrinology* 28 Suppl 2: 17-54.
74. Hafner, H. (2003). "Gender differences in schizophrenia." *Psychoneuroendocrinology* 28 Suppl 2: 17-54.
75. Heffelfinger, A. K. and J. W. Newcomer (2001). "Glucocorticoid effects on memory function over the human life span." *Dev Psychopathol* 13(3): 491-513.
76. Heffelfinger, A. K. and J. W. Newcomer (2001). "Glucocorticoid effects on memory function over the human life span." *Dev Psychopathol* 13(3): 491-513.
77. Hill, R. A., K. J. McInnes, E. C. Gong, M. E. Jones, E. R. Simpson and W. C. Boon (2007). "Estrogen deficient male mice develop compulsive behavior." *Biol Psychiatry* 61(3): 359-366.
78. Hill, R. A., K. J. McInnes, E. C. Gong, M. E. Jones, E. R. Simpson and W. C. Boon (2007). "Estrogen deficient male mice develop compulsive behavior." *Biol Psychiatry* 61(3): 359-366.
79. Hodgkinson, C. A., D. Goldman, J. Jaeger, S. Persaud, J. M. Kane, R. H. Lipsky and A. K. Malhotra (2004). "Disrupted in schizophrenia 1 (DISC1): association with schizophrenia, schizoaffective disorder, and bipolar disorder." *Am J Hum Genet* 75(5): 862-872.
80. Hodgkinson, C. A., D. Goldman, J. Jaeger, S. Persaud, J. M. Kane, R. H. Lipsky and A. K. Malhotra (2004). "Disrupted in schizophrenia 1 (DISC1): association with schizophrenia, schizoaffective disorder, and bipolar disorder." *Am J Hum Genet* 75(5): 862-872.
81. Holm, M. M., J. L. Nieto-Gonzalez, I. Vardya, K. Henningsen, M. N. Jayatissa, O. Wiborg and K. Jensen (2011). "Hippocampal GABAergic dysfunction in a rat chronic mild stress model of depression." *Hippocampus* 21(4): 422-433.
82. Hosie, A. M., L. Clarke, H. da Silva and T. G. Smart (2009). "Conserved site for neurosteroid modulation of GABA A receptors." *Neuropharmacology* 56(1): 149-154.

83. Hosie, A. M., L. Clarke, H. da Silva and T. G. Smart (2009). "Conserved site for neurosteroid modulation of GABA A receptors." *Neuropharmacology* 56(1): 149-154.
84. Hosie, A. M., M. E. Wilkins, H. M. da Silva and T. G. Smart (2006). "Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites." *Nature* 444(7118): 486-489.
85. Hosie, A. M., M. E. Wilkins, H. M. da Silva and T. G. Smart (2006). "Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites." *Nature* 444(7118): 486-489.
86. Iban-Arias, R., S. Lisa, N. Mastrodimou, D. Kokona, E. Koulakis, P. Iordanidou, A. Kouvarakis, M. Fothiadaki, S. Papadogkonaki, A. Sotiriou, H. E. Katerinopoulos, A. Gravanis, I. Charalampopoulos and K. Thermos (2018). "The Synthetic Microneurotrophin BNN27 Affects Retinal Function in Rats With Streptozotocin-Induced Diabetes." *Diabetes* 67(2): 321-333.
87. Joel, D. (2006). "Current animal models of obsessive compulsive disorder: a critical review." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30(3): 374-388.
88. Joel, D. (2006). "Current animal models of obsessive compulsive disorder: a critical review." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30(3): 374-388.
89. Johnston, A. L. and S. E. File (1991). "Sex differences in animal tests of anxiety." *Physiol Behav* 49(2): 245-250.
90. Johnston, A. L. and S. E. File (1991). "Sex differences in animal tests of anxiety." *Physiol Behav* 49(2): 245-250.
91. Jones, M. D. and I. Lucki (2005). "Sex differences in the regulation of serotonergic transmission and behavior in 5-HT receptor knockout mice." *Neuropsychopharmacology* 30(6): 1039-1047.
92. Jones, M. D. and I. Lucki (2005). "Sex differences in the regulation of serotonergic transmission and behavior in 5-HT receptor knockout mice." *Neuropsychopharmacology* 30(6): 1039-1047.
93. Kafetzopoulos, V., N. Kokras, I. Sotiropoulos, J. F. Oliveira, H. Leite-Almeida, A. Vasalou, V. M. Sardinha, Z. Papadopoulou-Daifoti, O. F. X. Almeida, K. Antoniou, N. Sousa and C. Dalla (2018). "The nucleus reuniens: a key node in the neurocircuitry of stress and depression." *Mol Psychiatry* 23(3): 579-586.
94. Karl, T., R. Chesworth, L. Duffy and H. Herzog (2010). "Schizophrenia-relevant behaviours in a genetic mouse model for Y2 deficiency." *Behav Brain Res* 207(2): 434-440.
95. Karl, T., R. Chesworth, L. Duffy and H. Herzog (2010). "Schizophrenia-relevant behaviours in a genetic mouse model for Y2 deficiency." *Behav Brain Res* 207(2): 434-440.
96. Kimonides, V. G., M. G. Spillantini, M. V. Sofroniew, J. W. Fawcett and J. Herbert (1999). "Dehydroepiandrosterone antagonizes the neurotoxic effects of corticosterone and translocation of stress-activated protein kinase 3 in hippocampal primary cultures." *Neuroscience* 89(2): 429-436.
97. Kimonides, V. G., M. G. Spillantini, M. V. Sofroniew, J. W. Fawcett and J. Herbert (1999). "Dehydroepiandrosterone antagonizes the neurotoxic effects of

- corticosterone and translocation of stress-activated protein kinase 3 in hippocampal primary cultures." *Neuroscience* 89(2): 429-436.
98. Kokras, N. and C. Dalla (2014). "Sex differences in animal models of psychiatric disorders." *Br J Pharmacol* 171(20): 4595-4619.
 99. Kokras, N. and C. Dalla (2014). "Sex differences in animal models of psychiatric disorders." *Br J Pharmacol* 171(20): 4595-4619.
 100. Kokras, N., C. Dalla and Z. Papadopoulou-Daifoti (2011). "Sex differences in pharmacokinetics of antidepressants." *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 7(2): 213-226.
 101. Kokras, N., C. Dalla and Z. Papadopoulou-Daifoti (2011). "Sex differences in pharmacokinetics of antidepressants." *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 7(2): 213-226.
 102. Kokras, N., C. Dalla, A. C. Sideris, A. Dendi, H. G. Mikail, K. Antoniou and Z. Papadopoulou-Daifoti (2012). "Behavioral sexual dimorphism in models of anxiety and depression due to changes in HPA axis activity." *Neuropharmacology* 62(1): 436-445.
 103. Kokras, N., C. Dalla, A. C. Sideris, A. Dendi, H. G. Mikail, K. Antoniou and Z. Papadopoulou-Daifoti (2012). "Behavioral sexual dimorphism in models of anxiety and depression due to changes in HPA axis activity." *Neuropharmacology* 62(1): 436-445.
 104. Kokras, N., K. Antoniou, A. Polissidis and Z. Papadopoulou-Daifoti (2009). "Antidepressants induce regionally discrete, sex-dependent changes in brain's glutamate content." *Neurosci Lett* 464(2): 98-102.
 105. Kokras, N., K. Antoniou, A. Polissidis and Z. Papadopoulou-Daifoti (2009). "Antidepressants induce regionally discrete, sex-dependent changes in brain's glutamate content." *Neurosci Lett* 464(2): 98-102.
 106. Kokras, N., K. Antoniou, C. Dalla, S. Bekris, M. Xagoraris, D. H. Ovestreet and Z. Papadopoulou-Daifoti (2009). "Sex-related differential response to clomipramine treatment in a rat model of depression." *J Psychopharmacol* 23(8): 945-956.
 107. Kokras, N., K. Antoniou, C. Dalla, S. Bekris, M. Xagoraris, D. H. Ovestreet and Z. Papadopoulou-Daifoti (2009). "Sex-related differential response to clomipramine treatment in a rat model of depression." *J Psychopharmacol* 23(8): 945-956.
 108. Kokras, N., N. Pastromas, D. Papasava, C. de Bournonville, C. A. Cornil and C. Dalla (2018). "Sex differences in behavioral and neurochemical effects of gonadectomy and aromatase inhibition in rats." *Psychoneuroendocrinology* 87: 93-107.
 109. Kokras, N., N. Pastromas, D. Papasava, C. de Bournonville, C. A. Cornil and C. Dalla (2018). "Sex differences in behavioral and neurochemical effects of gonadectomy and aromatase inhibition in rats." *Psychoneuroendocrinology* 87: 93-107.
 110. Kornstein, S. G., E. A. Young, A. T. Harvey, S. R. Wisniewski, J. L. Barkin, M. E. Thase, M. H. Trivedi, A. A. Nierenberg and A. J. Rush (2010). "The

- influence of menopause status and postmenopausal use of hormone therapy on presentation of major depression in women." *Menopause* 17(4): 828-839.
111. Kornstein, S. G., E. A. Young, A. T. Harvey, S. R. Wisniewski, J. L. Barkin, M. E. Thase, M. H. Trivedi, A. A. Nierenberg and A. J. Rush (2010). "The influence of menopause status and postmenopausal use of hormone therapy on presentation of major depression in women." *Menopause* 17(4): 828-839.
 112. Krystal, J. H., A. Bennett, D. Abi-Saab, A. Belger, L. P. Karper, D. C. D'Souza, D. Lipschitz, A. Abi-Dargham and D. S. Charney (2000). "Dissociation of ketamine effects on rule acquisition and rule implementation: possible relevance to NMDA receptor contributions to executive cognitive functions." *Biol Psychiatry* 47(2): 137-143.
 113. Krystal, J. H., A. Bennett, D. Abi-Saab, A. Belger, L. P. Karper, D. C. D'Souza, D. Lipschitz, A. Abi-Dargham and D. S. Charney (2000). "Dissociation of ketamine effects on rule acquisition and rule implementation: possible relevance to NMDA receptor contributions to executive cognitive functions." *Biol Psychiatry* 47(2): 137-143.
 114. Krystal, J. H., G. Sanacora and R. S. Duman (2013). "Rapid-acting glutamatergic antidepressants: the path to ketamine and beyond." *Biol Psychiatry* 73(12): 1133-1141.
 115. Kulkarni, J., E. Gavrilidis, R. Worsley, T. Van Rheenen and E. Hayes (2013). "The role of estrogen in the treatment of men with schizophrenia." *Int J Endocrinol Metab* 11(3): 129-136.
 116. Kulkarni, J., E. Gavrilidis, R. Worsley, T. Van Rheenen and E. Hayes (2013). "The role of estrogen in the treatment of men with schizophrenia." *Int J Endocrinol Metab* 11(3): 129-136.
 117. Kuroda, K., S. Yamada, M. Tanaka, M. Iizuka, H. Yano, D. Mori, D. Tsuboi, T. Nishioka, T. Namba, Y. Iizuka, S. Kubota, T. Nagai, D. Ibi, R. Wang, A. Enomoto, M. Isotani-Sakakibara, N. Asai, K. Kimura, H. Kiyonari, T. Abe, A. Mizoguchi, M. Sokabe, M. Takahashi, K. Yamada and K. Kaibuchi (2011). "Behavioral alterations associated with targeted disruption of exons 2 and 3 of the *Discl* gene in the mouse." *Hum Mol Genet* 20(23): 4666-4683.
 118. Kuroda, K., S. Yamada, M. Tanaka, M. Iizuka, H. Yano, D. Mori, D. Tsuboi, T. Nishioka, T. Namba, Y. Iizuka, S. Kubota, T. Nagai, D. Ibi, R. Wang, A. Enomoto, M. Isotani-Sakakibara, N. Asai, K. Kimura, H. Kiyonari, T. Abe, A. Mizoguchi, M. Sokabe, M. Takahashi, K. Yamada and K. Kaibuchi (2011). "Behavioral alterations associated with targeted disruption of exons 2 and 3 of the *Discl* gene in the mouse." *Hum Mol Genet* 20(23): 4666-4683.
 119. Kyratsas, C., C. Dalla, E. Anderzhanova, A. Polissidis, N. Kokras, K. Konstantinides and Z. Papadopoulou-Daifoti (2013). "Experimental evidence for sildenafil's action in the central nervous system: dopamine and serotonin changes in the medial preoptic area and nucleus accumbens during sexual arousal." *J Sex Med* 10(3): 719-729.

120. Lebron-Milad, K., A. Tsareva, N. Ahmed and M. R. Milad (2013). "Sex differences and estrous cycle in female rats interact with the effects of fluoxetine treatment on fear extinction." *Behav Brain Res* 253: 217-222.
121. Lebron-Milad, K., A. Tsareva, N. Ahmed and M. R. Milad (2013). "Sex differences and estrous cycle in female rats interact with the effects of fluoxetine treatment on fear extinction." *Behav Brain Res* 253: 217-222.
122. Liang, S. L., G. C. Carlson and D. A. Coulter (2006). "Dynamic regulation of synaptic GABA release by the glutamate-glutamine cycle in hippocampal area CA1." *J Neurosci* 26(33): 8537-8548.
123. Llaneza, D. C. and C. A. Frye (2009). "Progestogens and estrogen influence impulsive burying and avoidant freezing behavior of naturally cycling and ovariectomized rats." *Pharmacol Biochem Behav* 93(3): 337-342.
124. Llaneza, D. C. and C. A. Frye (2009). "Progestogens and estrogen influence impulsive burying and avoidant freezing behavior of naturally cycling and ovariectomized rats." *Pharmacol Biochem Behav* 93(3): 337-342.
125. Majewska, M. D. (1992). "Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABAA receptor. Mechanism of action and physiological significance." *Prog Neurobiol* 38(4): 379-395.
126. Majewska, M. D. (1992). "Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABAA receptor. Mechanism of action and physiological significance." *Prog Neurobiol* 38(4): 379-395.
127. Marcus, S. M., E. A. Young, K. B. Kerber, S. Kornstein, A. H. Farabaugh, J. Mitchell, S. R. Wisniewski, G. K. Balasubramani, M. H. Trivedi and A. J. Rush (2005). "Gender differences in depression: findings from the STAR*D study." *J Affect Disord* 87(2-3): 141-150.
128. Marcus, S. M., E. A. Young, K. B. Kerber, S. Kornstein, A. H. Farabaugh, J. Mitchell, S. R. Wisniewski, G. K. Balasubramani, M. H. Trivedi and A. J. Rush (2005). "Gender differences in depression: findings from the STAR*D study." *J Affect Disord* 87(2-3): 141-150.
129. Marcus, S. M., K. B. Kerber, A. J. Rush, S. R. Wisniewski, A. Nierenberg, G. K. Balasubramani, L. Ritz, S. Kornstein, E. A. Young and M. H. Trivedi (2008). "Sex differences in depression symptoms in treatment-seeking adults: confirmatory analyses from the Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression study." *Compr Psychiatry* 49(3): 238-246.
130. Marcus, S. M., K. B. Kerber, A. J. Rush, S. R. Wisniewski, A. Nierenberg, G. K. Balasubramani, L. Ritz, S. Kornstein, E. A. Young and M. H. Trivedi (2008). "Sex differences in depression symptoms in treatment-seeking adults: confirmatory analyses from the Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression study." *Compr Psychiatry* 49(3): 238-246.
131. Mathis, M. A., P. Alvarenga, G. Funaro, R. C. Torresan, I. Moraes, A. R. Torres, M. L. Zilberman and A. G. Hounie (2011). "Gender differences in obsessive-compulsive disorder: a literature review." *Rev Bras Psiquiatr* 33(4): 390-399.

132. Mathis, M. A., P. Alvarenga, G. Funaro, R. C. Torresan, I. Moraes, A. R. Torres, M. L. Zilberman and A. G. Hounie (2011). "Gender differences in obsessive-compulsive disorder: a literature review." *Rev Bras Psiquiatr* 33(4): 390-399.
133. Mazor, A., M. A. Matar, Z. Kaplan, N. Kozlovsky, J. Zohar and H. Cohen (2009). "Gender-related qualitative differences in baseline and post-stress anxiety responses are not reflected in the incidence of criterion-based PTSD-like behaviour patterns." *World J Biol Psychiatry* 10(4 Pt 3): 856-869.
134. Mazor, A., M. A. Matar, Z. Kaplan, N. Kozlovsky, J. Zohar and H. Cohen (2009). "Gender-related qualitative differences in baseline and post-stress anxiety responses are not reflected in the incidence of criterion-based PTSD-like behaviour patterns." *World J Biol Psychiatry* 10(4 Pt 3): 856-869.
135. McEwen, B. S., M. J. de Leon, S. J. Lupien and M. J. Meaney (1999). "Corticosteroids, the Aging Brain and Cognition." *Trends Endocrinol Metab* 10(3): 92-96.
136. McEwen, B. S., M. J. de Leon, S. J. Lupien and M. J. Meaney (1999). "Corticosteroids, the Aging Brain and Cognition." *Trends Endocrinol Metab* 10(3): 92-96.
137. Melcangi, R. C., A. Poletti, I. Cavarretta, F. Celotti, A. Colciago, V. Magnaghi, M. Motta, P. Negri-Cesi and L. Martini (1998). "The 5alpha-reductase in the central nervous system: expression and modes of control." *J Steroid Biochem Mol Biol* 65(1-6): 295-299.
138. Melcangi, R. C., A. Poletti, I. Cavarretta, F. Celotti, A. Colciago, V. Magnaghi, M. Motta, P. Negri-Cesi and L. Martini (1998). "The 5alpha-reductase in the central nervous system: expression and modes of control." *J Steroid Biochem Mol Biol* 65(1-6): 295-299.
139. Milad, M. R., S. A. Igoe, K. Lebron-Milad and J. E. Novales (2009). "Estrous cycle phase and gonadal hormones influence conditioned fear extinction." *Neuroscience* 164(3): 887-895.
140. Milad, M. R., S. A. Igoe, K. Lebron-Milad and J. E. Novales (2009). "Estrous cycle phase and gonadal hormones influence conditioned fear extinction." *Neuroscience* 164(3): 887-895.
141. Monteggia, L. M., B. Luikart, M. Barrot, D. Theobald, I. Malkovska, S. Nef, L. F. Parada and E. J. Nestler (2007). "Brain-derived neurotrophic factor conditional knockouts show gender differences in depression-related behaviors." *Biol Psychiatry* 61(2): 187-197.
142. Monteggia, L. M., B. Luikart, M. Barrot, D. Theobald, I. Malkovska, S. Nef, L. F. Parada and E. J. Nestler (2007). "Brain-derived neurotrophic factor conditional knockouts show gender differences in depression-related behaviors." *Biol Psychiatry* 61(2): 187-197.
143. Nabeshima, T., K. Yamaguchi, K. Yamada, M. Hiramatsu, Y. Kuwabara, H. Furukawa and T. Kameyama (1984). "Sex-dependent differences in the pharmacological actions and pharmacokinetics of phencyclidine in rats." *Eur J Pharmacol* 97(3-4): 217-227.

144. Nabeshima, T., K. Yamaguchi, K. Yamada, M. Hiramatsu, Y. Kuwabara, H. Furukawa and T. Kameyama (1984). "Sex-dependent differences in the pharmacological actions and pharmacokinetics of phencyclidine in rats." *Eur J Pharmacol* 97(3-4): 217-227.
145. Olivier, J. D., M. G. Van Der Hart, R. P. Van Swelm, P. J. Dederen, J. R. Homberg, T. Cremers, P. M. Deen, E. Cuppen, A. R. Cools and B. A. Ellenbroek (2008). "A study in male and female 5-HT transporter knockout rats: an animal model for anxiety and depression disorders." *Neuroscience* 152(3): 573-584.
146. Olivier, J. D., M. G. Van Der Hart, R. P. Van Swelm, P. J. Dederen, J. R. Homberg, T. Cremers, P. M. Deen, E. Cuppen, A. R. Cools and B. A. Ellenbroek (2008). "A study in male and female 5-HT transporter knockout rats: an animal model for anxiety and depression disorders." *Neuroscience* 152(3): 573-584.
147. Ortsater, H., A. Sjöholm and A. Rafacho (2012). Regulation of Glucocorticoid Receptor Signaling and the Diabetogenic Effects of Glucocorticoid Excess. *State of the Art of Therapeutic Endocrinology*.
148. Padiaditakis, I., P. Efstathopoulos, K. C. Prousis, M. Zervou, J. C. Arevalo, V. I. Alexaki, V. Nikolettou, E. Karagianni, C. Potamitis, N. Tavernarakis, T. Chavakis, A. N. Margioris, M. Venihaki, T. Calogeropoulou, I. Charalampopoulos and A. Gravanis (2016). "Selective and differential interactions of BNN27, a novel C17-spiroepoxy steroid derivative, with TrkA receptors, regulating neuronal survival and differentiation." *Neuropharmacology* 111: 266-282.
149. Petratos, S., J. J. Hirst, S. Mendis, P. Anikijenko and D. W. Walker (2000). "Localization of p450scc and 5alpha-reductase type-2 in the cerebellum of fetal and newborn sheep." *Brain Res Dev Brain Res* 123(1): 81-86.
150. Petratos, S., J. J. Hirst, S. Mendis, P. Anikijenko and D. W. Walker (2000). "Localization of p450scc and 5alpha-reductase type-2 in the cerebellum of fetal and newborn sheep." *Brain Res Dev Brain Res* 123(1): 81-86.
151. Petri, M. A., R. G. Lahita, R. F. Van Vollenhoven, J. T. Merrill, M. Schiff, E. M. Ginzler, V. Strand, A. Kunz, K. J. Gorelick, K. E. Schwartz and G. L. S. Group (2002). "Effects of prasterone on corticosteroid requirements of women with systemic lupus erythematosus: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial." *Arthritis Rheum* 46(7): 1820-1829.
152. Petri, M. A., R. G. Lahita, R. F. Van Vollenhoven, J. T. Merrill, M. Schiff, E. M. Ginzler, V. Strand, A. Kunz, K. J. Gorelick, K. E. Schwartz and G. L. S. Group (2002). "Effects of prasterone on corticosteroid requirements of women with systemic lupus erythematosus: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial." *Arthritis Rheum* 46(7): 1820-1829.
153. Pitsikas, N. and A. Gravanis (2017). "The novel dehydroepiandrosterone (DHEA) derivative BNN27 counteracts delay-dependent and scopolamine-induced recognition memory deficits in rats." *Neurobiol Learn Mem* 140: 145-153.

154. Plassart-Schiess, E. and E. E. Baulieu (2001). "Neurosteroids: recent findings." *Brain Res Brain Res Rev* 37(1-3): 133-140.
155. Plassart-Schiess, E. and E. E. Baulieu (2001). "Neurosteroids: recent findings." *Brain Res Brain Res Rev* 37(1-3): 133-140.
156. Pletnikov, M. V., Y. Ayhan, O. Nikolskaia, Y. Xu, M. V. Ovanesov, H. Huang, S. Mori, T. H. Moran and C. A. Ross (2008). "Inducible expression of mutant human DISC1 in mice is associated with brain and behavioral abnormalities reminiscent of schizophrenia." *Mol Psychiatry* 13(2): 173-186, 115.
157. Pletnikov, M. V., Y. Ayhan, O. Nikolskaia, Y. Xu, M. V. Ovanesov, H. Huang, S. Mori, T. H. Moran and C. A. Ross (2008). "Inducible expression of mutant human DISC1 in mice is associated with brain and behavioral abnormalities reminiscent of schizophrenia." *Mol Psychiatry* 13(2): 173-186, 115.
158. Prickaerts, J., D. Moechars, K. Cryns, I. Lenaerts, H. van Craenendonck, I. Goris, G. Daneels, J. A. Bouwknecht and T. Steckler (2006). "Transgenic mice overexpressing glycogen synthase kinase 3beta: a putative model of hyperactivity and mania." *J Neurosci* 26(35): 9022-9029.
159. Prickaerts, J., D. Moechars, K. Cryns, I. Lenaerts, H. van Craenendonck, I. Goris, G. Daneels, J. A. Bouwknecht and T. Steckler (2006). "Transgenic mice overexpressing glycogen synthase kinase 3beta: a putative model of hyperactivity and mania." *J Neurosci* 26(35): 9022-9029.
160. Ralph-Williams, R. J., M. P. Paulus, X. Zhuang, R. Hen and M. A. Geyer (2003). "Valproate attenuates hyperactive and perseverative behaviors in mutant mice with a dysregulated dopamine system." *Biol Psychiatry* 53(4): 352-359.
161. Ralph-Williams, R. J., M. P. Paulus, X. Zhuang, R. Hen and M. A. Geyer (2003). "Valproate attenuates hyperactive and perseverative behaviors in mutant mice with a dysregulated dopamine system." *Biol Psychiatry* 53(4): 352-359.
162. Reddy, D. S. (2003). "Pharmacology of endogenous neuroactive steroids." *Crit Rev Neurobiol* 15(3-4): 197-234.
163. Reddy, D. S. (2003). "Pharmacology of endogenous neuroactive steroids." *Crit Rev Neurobiol* 15(3-4): 197-234.
164. Reddy, D. S. and K. Jian (2010). "The testosterone-derived neurosteroid androstenediol is a positive allosteric modulator of GABAA receptors." *J Pharmacol Exp Ther* 334(3): 1031-1041.
165. Reddy, D. S. and K. Jian (2010). "The testosterone-derived neurosteroid androstenediol is a positive allosteric modulator of GABAA receptors." *J Pharmacol Exp Ther* 334(3): 1031-1041.
166. Reddy, D. S. and M. A. Rogawski (2002). "Stress-induced deoxycorticosterone-derived neurosteroids modulate GABA(A) receptor function and seizure susceptibility." *J Neurosci* 22(9): 3795-3805.
167. Reddy, D. S. and M. A. Rogawski (2002). "Stress-induced deoxycorticosterone-derived neurosteroids modulate GABA(A) receptor function and seizure susceptibility." *J Neurosci* 22(9): 3795-3805.
168. Robinson, T. E. (1984). "Behavioral sensitization: characterization of enduring changes in rotational behavior produced by intermittent injections of

- amphetamine in male and female rats." *Psychopharmacology (Berl)* 84(4): 466-475.
169. Robinson, T. E. (1984). "Behavioral sensitization: characterization of enduring changes in rotational behavior produced by intermittent injections of amphetamine in male and female rats." *Psychopharmacology (Berl)* 84(4): 466-475.
170. Robinson, T. E., J. B. Becker and S. K. Presty (1982). "Long-term facilitation of amphetamine-induced rotational behavior and striatal dopamine release produced by a single exposure to amphetamine: sex differences." *Brain Res* 253(1-2): 231-241.
171. Robinson, T. E., J. B. Becker and S. K. Presty (1982). "Long-term facilitation of amphetamine-induced rotational behavior and striatal dopamine release produced by a single exposure to amphetamine: sex differences." *Brain Res* 253(1-2): 231-241.
172. Sanberg, P. R. and K. P. Ossenkopp (1977). "Dose-response effects of taurine on some open-field behaviors in the rat." *Psychopharmacology (Berl)* 53(2): 207-209.
173. Schumacher, M., P. Robel and E. E. Baulieu (1996). "Development and regeneration of the nervous system: a role for neurosteroids." *Dev Neurosci* 18(1-2): 6-21.
174. Schumacher, M., P. Robel and E. E. Baulieu (1996). "Development and regeneration of the nervous system: a role for neurosteroids." *Dev Neurosci* 18(1-2): 6-21.
175. Shelnutt, S. R., M. Gunnell and S. M. Owens (1999). "Sexual dimorphism in phencyclidine in vitro metabolism and pharmacokinetics in rats." *J Pharmacol Exp Ther* 290(3): 1292-1298.
176. Shelnutt, S. R., M. Gunnell and S. M. Owens (1999). "Sexual dimorphism in phencyclidine in vitro metabolism and pharmacokinetics in rats." *J Pharmacol Exp Ther* 290(3): 1292-1298.
177. Solomon, M. B., A. R. Furay, K. Jones, A. E. Packard, B. A. Packard, A. C. Wulsin and J. P. Herman (2012). "Deletion of forebrain glucocorticoid receptors impairs neuroendocrine stress responses and induces depression-like behavior in males but not females." *Neuroscience* 203: 135-143.
178. Solomon, M. B., A. R. Furay, K. Jones, A. E. Packard, B. A. Packard, A. C. Wulsin and J. P. Herman (2012). "Deletion of forebrain glucocorticoid receptors impairs neuroendocrine stress responses and induces depression-like behavior in males but not females." *Neuroscience* 203: 135-143.
179. Stoffel-Wagner, B. (2001). "Neurosteroid metabolism in the human brain." *Eur J Endocrinol* 145(6): 669-679.
180. Stoffel-Wagner, B. (2001). "Neurosteroid metabolism in the human brain." *Eur J Endocrinol* 145(6): 669-679.
181. Stoffel-Wagner, B., M. Watzka, S. Steckelbroeck, M. Ludwig, H. Clusmann, F. Bidlingmaier, E. Casarosa, S. Luisi, C. E. Elger and S. Beyenburg (2003). "Allopregnanolone serum levels and expression of 5 alpha-reductase and 3

- alpha-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms in hippocampal and temporal cortex of patients with epilepsy." *Epilepsy Res* 54(1): 11-19.
182. Stoffel-Wagner, B., M. Watzka, S. Steckelbroeck, M. Ludwig, H. Clusmann, F. Bidlingmaier, E. Casarosa, S. Luisi, C. E. Elger and S. Beyenburg (2003). "Allopregnanolone serum levels and expression of 5 alpha-reductase and 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms in hippocampal and temporal cortex of patients with epilepsy." *Epilepsy Res* 54(1): 11-19.
 183. Taylor, S. E., L. C. Klein, B. P. Lewis, T. L. Gruenewald, R. A. Gurung and J. A. Updegraff (2000). "Biobehavioral responses to stress in females: tend-and-befriend, not fight-or-flight." *Psychol Rev* 107(3): 411-429.
 184. Taylor, S. E., L. C. Klein, B. P. Lewis, T. L. Gruenewald, R. A. Gurung and J. A. Updegraff (2000). "Biobehavioral responses to stress in females: tend-and-befriend, not fight-or-flight." *Psychol Rev* 107(3): 411-429.
 185. Ter Horst, G. J., R. Wichmann, M. Gerrits, C. Westenbroek and Y. Lin (2009). "Sex differences in stress responses: focus on ovarian hormones." *Physiol Behav* 97(2): 239-249.
 186. Ter Horst, G. J., R. Wichmann, M. Gerrits, C. Westenbroek and Y. Lin (2009). "Sex differences in stress responses: focus on ovarian hormones." *Physiol Behav* 97(2): 239-249.
 187. Turgeon, S. M., D. Kim, M. Pritchard, S. Salgado and A. Thaler (2011). "The effects of phencyclidine (PCP) on anxiety-like behavior in the elevated plus maze and the light-dark exploration test are age dependent, sexually dimorphic, and task dependent." *Pharmacol Biochem Behav* 100(1): 191-198.
 188. Turgeon, S. M., D. Kim, M. Pritchard, S. Salgado and A. Thaler (2011). "The effects of phencyclidine (PCP) on anxiety-like behavior in the elevated plus maze and the light-dark exploration test are age dependent, sexually dimorphic, and task dependent." *Pharmacol Biochem Behav* 100(1): 191-198.
 189. Turgeon, S. M., N. Anderson and K. O'Loughlin (2010). "Phencyclidine (PCP) produces sexually dimorphic effects on voluntary sucrose consumption and elevated plus maze behavior." *Pharmacol Biochem Behav* 95(2): 173-178.
 190. Turgeon, S. M., N. Anderson and K. O'Loughlin (2010). "Phencyclidine (PCP) produces sexually dimorphic effects on voluntary sucrose consumption and elevated plus maze behavior." *Pharmacol Biochem Behav* 95(2): 173-178.
 191. van Vollenhoven, R. F., E. G. Engleman and J. L. McGuire (1995). "Dehydroepiandrosterone in systemic lupus erythematosus. Results of a double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial." *Arthritis Rheum* 38(12): 1826-1831.
 192. van Vollenhoven, R. F., E. G. Engleman and J. L. McGuire (1995). "Dehydroepiandrosterone in systemic lupus erythematosus. Results of a double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial." *Arthritis Rheum* 38(12): 1826-1831.
 193. Walf, A. A., C. J. Koonce and C. A. Frye (2008). "Estradiol or diarylpropionitrile decrease anxiety-like behavior of wildtype, but not estrogen receptor beta knockout, mice." *Behav Neurosci* 122(5): 974-981.

194. Walf, A. A., C. J. Koonce and C. A. Frye (2008). "Estradiol or diarylpropionitrile decrease anxiety-like behavior of wildtype, but not estrogen receptor beta knockout, mice." *Behav Neurosci* 122(5): 974-981.
195. Wang, C., J. Xu, G. Zhou, Q. Qu, G. Yang and X. Hu (2007). "Electrochemical detection coupled with high-performance liquid chromatography in pharmaceutical and biomedical analysis: a mini review." *Comb Chem High Throughput Screen* 10(7): 547-554.
196. Wessinger, W. D. (1995). "Sexual dimorphic effects of chronic phencyclidine in rats." *Eur J Pharmacol* 277(1): 107-112.
197. Wessinger, W. D. (1995). "Sexual dimorphic effects of chronic phencyclidine in rats." *Eur J Pharmacol* 277(1): 107-112.
198. Wittchen, H. U., F. Jacobi, J. Rehm, A. Gustavsson, M. Svensson, B. Jonsson, J. Olesen, C. Allgulander, J. Alonso, C. Faravelli, L. Fratiglioni, P. Jennum, R. Lieb, A. Maercker, J. van Os, M. Preisig, L. Salvador-Carulla, R. Simon and H. C. Steinhausen (2011). "The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010." *Eur Neuropsychopharmacol* 21(9): 655-679.
199. Wittchen, H. U., F. Jacobi, J. Rehm, A. Gustavsson, M. Svensson, B. Jonsson, J. Olesen, C. Allgulander, J. Alonso, C. Faravelli, L. Fratiglioni, P. Jennum, R. Lieb, A. Maercker, J. van Os, M. Preisig, L. Salvador-Carulla, R. Simon and H. C. Steinhausen (2011). "The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010." *Eur Neuropsychopharmacol* 21(9): 655-679.
200. Wojtal, K., M. K. Trojnar and S. J. Czuczwar (2006). "Endogenous neuroprotective factors: neurosteroids." *Pharmacol Rep* 58(3): 335-340.
201. Wojtal, K., M. K. Trojnar and S. J. Czuczwar (2006). "Endogenous neuroprotective factors: neurosteroids." *Pharmacol Rep* 58(3): 335-340.
202. Young, E. and A. Korszun (2010). "Sex, trauma, stress hormones and depression." *Mol Psychiatry* 15(1): 23-28.
203. Young, E. and A. Korszun (2010). "Sex, trauma, stress hormones and depression." *Mol Psychiatry* 15(1): 23-28.
204. Zorumski, C. F., S. M. Paul, Y. Izumi, D. F. Covey and S. Mennerick (2013). "Neurosteroids, stress and depression: potential therapeutic opportunities." *Neurosci Biobehav Rev* 37(1): 109-122.

