



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ

Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ομάδα Νευροψυχοφαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή



Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

ΝΕΥΡΟΧΗΜΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΤΟΥ ΦΥΛΟΥ
ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΣΤΟΝ ΕΓΚΕΦΑΛΟ ΕΠΙΜΥΩΝ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Δάλλα Χριστίνα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Φαρμακολογίας, Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Λιάπη Χάρις, Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Ιατρική
Σχολή ΕΚΠΑ

Τσαρμπόπουλος Αντώνης, Καθηγητής
Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ

Μεταπτυχιακός Φοιτητής: Μπαλτιμάς Πέτρος, Χημικός ΕΚΠΑ Α.Μ.:41819

Αθήνα 2020

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος ειδίκευσης «Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική» του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακολογίας της Ιατρικής σχολής του ΕΚΠΑ στην ομάδα Νευροψυχοφαρμακολογίας, υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας κα. Δάλλα Χριστίνα. Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα Αν. Καθηγήτρια κα. Δάλλα Χριστίνα για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριό της καθώς και για την πολύτιμη καθοδήγηση και την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου. Ένα εξίσου μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στο Δρ. Κόκρα Νικόλαο, Ψυχίατρο και Διδάκτωρ Φαρμακολογίας για την πολύτιμη βοήθειά του καθώς και επιστημονική καθοδήγησή του. Οι γνώσεις που αποκόμισα στο εργαστήριο Νευροψυχοφαρμακολογίας αλλά και τα διδάγματα σχετικά με την Ορθή Εργαστηριακή Πρακτική δεν θα ήταν το ίδιο σπουδαία χωρίς την αφοσίωσή του. Δεν θα ήθελα να παραλείψω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου τον Αχιλλέα Παπαδημητρίου και την Παυλίνα Παυλίδη. Τους ευχαριστώ για τις πολύτιμες συμβουλές τους για την βοήθεια που μου παρείχαν καθώς και για τις στιγμές που μοιράστηκα μαζί τους. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα την οικογένειά μου για την απλόχερη στήριξη που μου παρείχε όλα αυτά τα χρόνια, καθώς και για την αμέριστη ηθική συμπαράσταση. Σας ευχαριστώ όλους μέσα από την καρδιά μου.

Abstract

The term stress is used to describe all the requirements (internal or external), which according to the assessment of the individual, put to the test and / or exceed their available capabilities. It has been shown that stress can affect cognitive functions and change the way a person perceives a situation. It can also contribute to the worsening of symptoms of various diseases, such as schizophrenia, attention deficit hyperactivity disorder, etc. The common feature shared by all the above diseases is the inability of the individual to maintain constant attention. So, it can be assumed that there is a relationship between stress and attention. On the other hand, sustained attention is responsible for controlling many different subtypes of perception. Therefore, disorders caused by stress could lead to various cognitive deficits.

What is particularly interesting is that, while it is well known that stress contributes to the reduction of sustained attention, the neurochemical mechanisms by which this is achieved are unknown. One hypothesis is that corticotropin releasing factor (CRF), whose function has been found to be stress-related, has the ability to alter the action of corticosteroid-dependent circuits in the basal forebrain (BF), which are necessary to maintain attention. By researching how and/or if CRF regulates cholinergic functions we could understand better how stress affects cognitive function. To this end, rats were injected with either artificial cerebrospinal fluid (aCSF) or CRF (30 ng or 100 ng) in BF to evaluate the effect of CFR administration on BF.

The main technique used to evaluate the behavioral results of the experiment was the Sustained Attention Task (SAT). At the end of the experiments, the rats were euthanized, and brain tissues were isolated from the PFC and BN (Nucleus Bacalis of Meynert) region. Quantitative and qualitative determination was then performed on the samples from these regions in order to measure the levels of the various neurotransmitters.

The aim of this study was to develop a method to separate adequately and in rapidly amino acids, which are found under normal conditions in nerve cells, and also act as neurotransmitters. The detection was performed by high pressure liquid chromatography with electrochemical detector (HPLC-ED). The amino acids that were

analyzed are glutamic acid (GLU), serine (SER), glycine (GLY), glutamine (GLN), alanine (ALA), taurine (TAU) and γ -aminobutyric acid (GABA).

Due to the fact that CRF was administered to BN, the changes observed at the levels of the various neurotransmitters in this region were more pronounced than the changes that occurred in the PFC. At the same time, in pilot experiments it was observed that the ability to understand the absence of a signal was slightly reduced in the rats that were given CRF. The ability to understand the significance of the absence of a signal was affected by the GABA function. It would therefore be expected that the GABA levels that are present under normal conditions (aCSF) in both BN and PFC to be at equivalent or higher levels than those observed in the rats that received CRF. This hypothesis is consistent with the results that were obtained from the quantitative analysis.

Finally, this new method could be used as a means of confirming various scientific hypotheses and contribute significantly to the validation of an experimental hypothesis, thus making it an extremely important research tool.

Key Words: HPLC-ED, neurochemical assessment, amino acids, rats

Περίληψη

Με τον όρο στρες εννοούνται όλες οι απαιτήσεις (εσωτερικές ή εξωτερικές), που σύμφωνα με την εκτίμηση του ατόμου, θέτουν σε δοκιμασία ή/και ξεπερνούν τις διαθέσιμες δυνατότητές του. Έχει φανεί ότι το στρες μπορεί να επηρεάσει τις γνωστικές λειτουργίες και να αλλάξει τον τρόπο αντίληψης μιας κατάστασης του ατόμου. Επίσης μπορεί να συμβάλει στην επιδείνωση συμπτωμάτων ποικίλων ασθενειών, όπως είναι η σχιζοφρένεια, η διαταραχή ελλειμματικής προσοχής και υπερκινητικότητας κ.α. Το κοινό χαρακτηριστικό που μοιράζονται όλες οι παραπάνω ασθένειες είναι η ανικανότητα του ατόμου να διατηρήσει σταθερή την προσοχή του. Για αυτό κρίνεται λογική η ύπαρξη μιας σχέσης ανάμεσα στο στρες και τη διατήρηση της προσοχής. Από την άλλη πλευρά το σύστημα διατήρησης της προσοχής είναι υπεύθυνο για τον έλεγχο πολλών διαφορετικών υπότυπων της αντίληψης. Συνεπώς διαταραχές οι οποίες προκαλούνται από το στρες θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε διάφορα γνωσιακά ελλείματα.

Είναι γνωστό ότι το στρες προκαλεί μείωση της διατήρησης της προσοχής, ενώ ο νευροχημικός μηχανισμός μέσω του οποίου το επιτυγχάνει αυτό είναι άγνωστος. Μια υπόθεση είναι ότι ο παράγοντας απελευθέρωσης της κορτικοτροπίνης (corticotropin releasing factor, CRF), του οποίου η λειτουργία έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με το στρες, έχει την ικανότητα να αλλάζει την δράση των κορτικο-εξαρτώμενων κυκλωμάτων του βασικού πρόσθιου εγκεφάλου (basal forebrain, BF), τα οποία είναι απαραίτητα για τη διατήρηση της προσοχής. Η μελέτη του πώς και/ή εάν ο CRF ρυθμίζει τις χολινεργικές λειτουργίες θα μπορούσε να συμβάλει στην κατανόηση του πώς το στρες επηρεάζει τη γνωσιακή λειτουργία. Με βάση την παραπάνω υπόθεση, έγινε έκχυση σε αρουραίους είτε τεχνητού εγκεφαλονωτιαίου υγρού (aCSF), είτε CRF (30 ng ή 100 ng) στο BF με σκοπό την εκτίμηση της επίδραση της χορήγησης CFR στο BF.

Η κύρια τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση των συμπεριφορικών αποτελεσμάτων του πειράματος ήταν η τεχνική παρατεταμένη δοκιμασία προσοχής (SAT). Με το πέρας των πειραμάτων οι αρουραίοι θυσιάστηκαν και πραγματοποιήθηκε απομόνωση των εγκεφαλικών ιστών από την περιοχή PFC και BN (Nucleus Basalis of Meynert). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός στα δείγματα που προήλθαν από αυτές τις περιοχές με σκοπό τη μέτρηση των επιπέδων διαφόρων νευροδιαβιβαστών.

Η παρούσα διπλωματική εργασία είχε ως σκοπό την δημιουργία μιας μεθόδου που θα χρησιμοποιείται για τον ικανοποιητικό και χρονικά γρήγορο διαχωρισμό αμινοξέων, τα οποία βρίσκονται υπό φυσιολογικές συνθήκες στα νευρικά κύτταρα, αλλά και έχουν την ικανότητα να δρουν ως νευροδιαβιβαστές. Ο προσδιορισμός έγινε μέσω της τεχνικής υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης με ηλεκτροχημικό ανιχνευτή (HPLC-ED). Τα αμινοξέα που αναλύθηκαν είναι το γλουταμικό οξύ (GLU), η σερίνη (SER), η γλυκίνη (GLY), η γλουταμίνη (GLN), η αλανίνη (ALA), η ταυρίνη (TAU) και το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA).

Λόγω του ότι η χορήγηση του CRF έγινε στο BN, οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν στα επίπεδα των διαφόρων νευροδιαβιβαστών αναμένονταν να είναι περισσότερο εμφανείς σε αυτή την περιοχή σε σχέση με τις μεταβολές που συνέβησαν στο PFC, το οποίο επιβεβαιώθηκε και πειραματικά. Παράλληλα σε προκαταρκτικά πειράματα που έγιναν, παρατηρήθηκε ότι σε αρουραίους που τους είχε χορηγηθεί CRF μειώθηκε ελαφρώς, χωρίς ωστόσο να επηρεαστεί ιδιαίτερα η ικανότητά τους να κατανοούν την απουσία σήματος. Η ικανότητα των αρουραίων να κατανοούν την σημασία της απουσίας σήματος επηρεάζεται από την λειτουργία του GABA. Συνεπώς θα ήταν αναμενόμενο τα επίπεδα του GABA που παρατηρούνται υπό φυσιολογικές συνθήκες (aCSF) τόσο στο BN όσο και στο PFC να είναι σε αντίστοιχα ή υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τους αρουραίους που έλαβαν CRF, το οποίο συμφωνεί με τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από την ποσοτική ανάλυση.

Τέλος, η καινούρια αυτή μέθοδος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ένα μέσο επιβεβαίωσης διαφόρων επιστημονικών υποθέσεων και να συμβάλλει σημαντικά στην πιστοποίηση μια πειραματικής υπόθεσης, καθιστώντας την έτσι ένα εξαιρετικά σημαντικό ερευνητικό εργαλείο.

Λέξεις Κλειδιά: HPLC-ED, νευροχημική εκτίμηση, αμινοξέα, επίμυες

Περιεχόμενα:

Κεφάλαιο 1. HPLC.....	10
➤ 1.1. Εφαρμογές της HPLC.....	10
➤ 1.2. Εξέλιξη της υγρής χρωματογραφίας.....	10
➤ 1.3. Οργανολογία Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης.....	12
○ 1.3.1. Σύστημα αποθήκευσης και επεξεργασίας κινητής φάσεως.....	12
○ 1.3.2. Σύστημα άντλησης της κινητής φάσης.....	13
○ 1.3.3. Συστήματα έγχυσης δείγματος.....	15
○ 1.3.4. Χρωματογραφική στήλη.....	16
○ 1.3.5. Ανιχνευτές.....	20
○ 1.3.6. Πρόγραμμα καταγραφής.....	23
Κεφάλαιο 2. Νευροδιαβιβαστές.....	25
➤ 2.1. Νευρικές συνάψεις.....	25
➤ 2.2 Ηλεκτρικές Συνάψεις.....	26
➤ 2.3 Χημικές συνάψεις.....	27
➤ 2.4. Γενικά και Ιστορικά Στοιχεία Νευροδιαβιβαστών.....	29
➤ 2.5. Είδη Νευροδιαβιβαστικών Ουσιών και Ιδιότητες.....	30
➤ 2.6. Κριτήρια Καθορισμού Ουσίας ως Νευροδιαβιβαστή.....	33
➤ 2.7. Νευροδιαβιβαστές και Νευροτροποποιητές.....	34
➤ 2.8. Πολλαπλότητα Νευροδιαβιβαστών.....	35
➤ 2.9. Κλασσικοί Νευροδιαβιβαστές.....	36
➤ 2.10. Έκλυση του νευροδιαβιβαστή.....	39
➤ 2.11. Υποδοχείς Νευροδιαβιβαστών – Νευροτροποποιητών.....	41
➤ 2.12. Ιονοτροπικοί Υποδοχείς και Υποδοχείς Συζευγμένοι με G Πρωτεΐνες...45	
➤ 2.13. Απομάκρυνση του νευροδιαβιβαστή.....	47
Κεφάλαιο 3. Πειραματική μελέτη.....	51
➤ 3.1. Στρες.....	51

➤ 3.2. Παράγοντας απελευθέρωσης Κορτικοτροπίνης	51
➤ 3.3. CRF και διατήρηση της προσοχής	52
➤ 3.4 Παρατεταμένη Δοκιμασία Προσοχής	52
➤ 3.5. Προκαταρκτικά πειράματα	54
➤ 3.6. Πειραματική διαδικασία	56
➤ 3.7. Αναμενόμενα αποτελέσματα	59
Κεφάλαιο 4. Αντιδραστήρια - Διαλύματα – Εξοπλισμός	61
➤ 4.1. Οργανολογία-Υλικά	61
○ 4.1.1. Σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης	61
○ 4.1.2. Λοιπός εξοπλισμός	63
○ 4.1.3. Αντιδραστήρια – Υλικά	64
➤ 4.2. Παρασκευή διαλυμάτων	66
➤ 4.3. Ομογενοποίηση αγνώστων δειγμάτων προς ανάλυση	69
Κεφάλαιο 5. Σχεδιασμός Αναλυτικής Μεθόδου.....	71
➤ 5.1. Τύπος στήλης	71
➤ 5.2. pH κινητής φάσης	72
➤ 5.3. Ρυθμιστικό διάλυμα (τύπος άλατος)	75
➤ 5.4. Συγκέντρωση άλατος (Ιοντική Ισχύς)	77
➤ 5.5. Συγκέντρωση πρόσθετων (π.χ. Συμπλεκτικό αντιδραστήριο).....	78
➤ 5.6. Συνθήκες Αντίδρασης, Τύπος αντιδραστηρίου	79
○ 5.6.1. Συνθήκες Αντίδρασης	80
○ 5.6.2. Τύπος αντιδραστηρίου, Επιλογή κατάλληλου αντιδρώντος	83
➤ 5.7. Χρήση Αυτόματου δειγματολήπτη	86
➤ 5.8. Χρόνος παραγωγοποίησης και θερμοκρασία αντίδρασης.....	87
➤ 5.9. Συγκέντρωση διαφόρων αντιδραστηρίων	88
➤ 5.10. Θερμοκρασία στήλης και Ταχύτητα ροής	89
➤ 5.11.Επιλογή Νευροδιαβιβαστών	90
➤ 5.12. Καμπύλη Βαθμονόμησης	92

Κεφάλαιο 6. Στατιστική ανάλυση	95
➤ 6.1. Αποτελέσματα από την περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού	95
➤ 6.2. Αποτελέσματα από την περιοχή του εγκεφάλου BN	101
Κεφάλαιο 7. Συζήτηση	109

1.1. Εφαρμογές της HPLC

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) είναι μία από τις πιο διαδεδομένες αναλυτικές τεχνικές διαχωρισμού (Θ.Π. Χατζηγιωάννου, Μ.Α.Κουμπάρης et al., 1990). Η ευαισθησία της, η εύκολη προσαρμογή της σε ακριβούς ποσοτικούς και ποιοτικούς προσδιορισμούς, η καταλληλότητα της για τον διαχωρισμό ποικίλων ενώσεων και ειδικότερα μη πτητικών ή θερμικά ευαίσθητων ουσιών, είναι μόνο μερικοί από τους λόγους για τους οποίους αυτή η τεχνική είναι τόσο διαδεδομένη όπως και αποδεκτή τόσο από την επιστημονική κοινότητα όσο και την βιομηχανία. Η HPLC βρίσκει εφαρμογή στην ανάλυση πολλών τύπων ενώσεων όπως είναι τα αμινοξέα, οι πρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά οξέα, οι υδατάνθρακες, τα φαρμακευτικά σκευάσματα, τα τερπενοειδή, τα φυτοφάρμακα, τα αντιβιοτικά, τα στεροειδή, οι οργανομεταλλικές ενώσεις και μια ποικιλία ανόργανων ουσιών (Swadesh, 2000). Συνεπώς με βάση τα παραπάνω γίνεται κατανοητό ότι η χρήση της HPLC δεν περιορίζεται μόνο σε λιγοστούς και συγκεκριμένους κλάδους όσον αφορά την έρευνα ή την βιομηχανία αλλά αποτελεί αναπόσπαστο εργαλείο ποικίλων τομέων όπως είναι η φαρμακευτική χημεία, η κλινική ανάλυση, η βιοργανική χημεία, η ανάλυση τροφίμων και περιβαλλοντικών δειγμάτων όπως και επίσης η βιοχημική έρευνα κ.α. Τέλος αξίζει να αναφερθεί ότι τα τελευταία χρόνια γίνεται χρήση της HPLC σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (MS). Η καινούρια αυτή τεχνική αυξάνει δραστικά την ποιότητα των αναλύσεων και χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό από την βιομηχανία φαρμάκων λόγω των ιδιαίτερα αυστηρών προδιαγραφών που διέπουν αυτό το πεδίο (Siddiqui et al., 2017).

1.2. Εξέλιξη της υγρής χρωματογραφίας

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης είναι μια εξελιγμένη μορφή της κλασσικής υγρής χρωματογραφίας (Durai Ananda Kumar T et al., 2020) και ορίζεται ως η τεχνική ανάλυσης κατά την οποία ένα μείγμα ενώσεων διαχωρίζεται (κλασματοποιείται) περνώντας μέσα από ένα πορώδες υλικό (στατική φάση). Το πορώδες αυτό υλικό μπορεί να είναι τόσο υγρό, το οποίο είναι χημικά καθλωμένο σε ένα στερεό υπόστρωμα, όσο και στερεό. Για να μπορέσει να περάσει το μείγμα μέσα από τη στατική φάση είναι απαραίτητη η χρήση ενός διαλύματος (κινητή φάση) το οποίο θα παρασύρει το μείγμα διαμέσου αυτής. Η διαβίβαση της κινητής φάσης μέσα από τη

στατική επιτυγχάνεται με τη βοήθεια της βαρύτητας ή με τη χρήση αντλιών χαμηλής πίεσεως.

Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με βάση την ικανότητα που έχει κάθε ένωση του μείγματος να παραμένει τόσο στην στατική όσο και στην κινητή φάση. Δηλαδή το πόσο εύκολα μία ένωση διαλύεται στην κινητή φάση ή προσδένεται στην στατική καθορίζει τον χρόνο έκλουσης της από την στήλη. (Bird, 1989) Οι ενώσεις που ομοιάζουν χημικά περισσότερο με την στατική φάση όταν περνούν διαμέσου αυτής, έχουν την τάση να προσδένονται σε αυτή πιο εύκολα με αποτέλεσμα να παραμένουν μεγαλύτερο χρόνο εντός της στήλης. Από την άλλη πλευρά οι ενώσεις που ομοιάζουν περισσότερο με την κινητή φάση παραμένουν διαλυτές πιο εύκολα σε αυτή με αποτέλεσμα να μην κατακρατούνται τόσο πολύ από την στατική φάση άρα να εκλούνται και νωρίτερα σε σχέση με τις άλλες.

Ένα μειονέκτημα της υγρής χρωματογραφίας είναι ότι η στατική φάση πρέπει να αποτελείται από σχετικώς μεγάλης διαμέτρου σωματίδια, ώστε να μην εμφανίζεται μεγάλη αντίσταση κατά την διάρκεια της ανάλυσης. (Θ.Π. Χατζηιωάννου, Μ.Α.Κουμπάρης et al., 1990). Στην περίπτωση που η αντίσταση ήταν πολύ μεγάλη η κινητή φάση θα ήταν αδύνατον να περάσει μέσα από την στατική με αποτέλεσμα να μην υπάρχει διαχωρισμός. Επιπλέον, επειδή αυτός ο τύπος διαχωρισμού πραγματοποιείται χωρίς την χρήση μια ισχυρής εξωτερικής δύναμης (πίεσης), η διάρκεια του είναι εξαιρετικά μεγάλη (ώρες) κάνοντάς τον υπερβολικά χρονοβόρο, χωρίς πάντα να επιτυγχάνεται ικανοποιητικός διαχωρισμός.

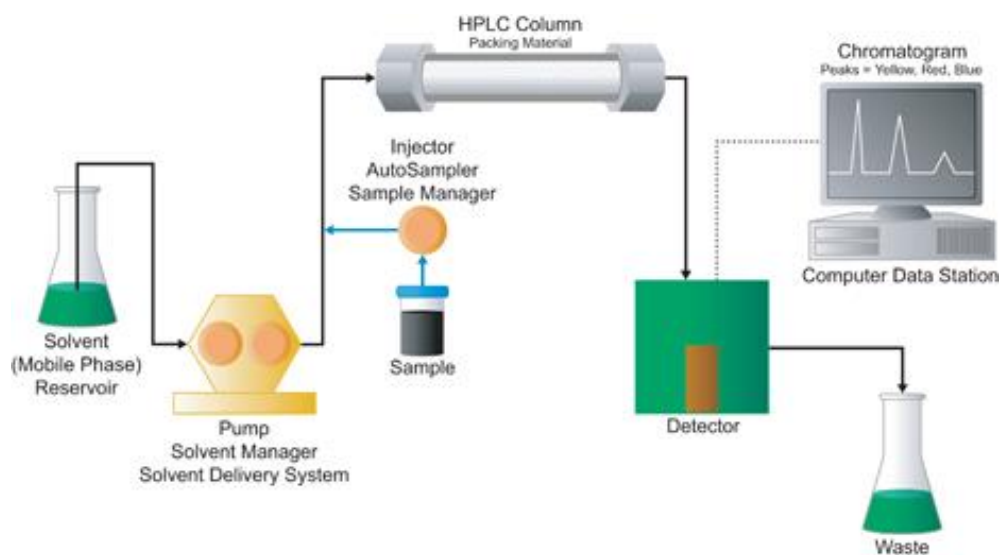
Για να αντιμετωπιστούν όλα τα παραπάνω προβλήματα δημιουργήθηκε μία βελτιωμένη έκδοση αυτής της χρωματογραφίας, κατά την οποία μια εξωτερική πηγή (αντλία) ασκεί πίεση μερικών bar. Στην κλασική υγρή χρωματογραφία χρησιμοποιούνται υάλινες στήλες διαμέτρου 1 έως 5 cm και ύψους 50 έως 500 cm, οι οποίες πληρώνονται (πακετάρονται) με στερεά σωματίδια μεγάλης διαμέτρου. (Skoog et al., 2020) Με την εισαγωγή υψηλής πίεσης η παρούσα οργανολογία ήταν αδύνατον να χρησιμοποιηθεί. Για αυτό κατασκευάστηκαν καινούριου τύπου μεταλλικές στήλες οι οποίες θα μπορούσαν να αντέξουν τις υψηλές πιέσεις. Παράλληλα τα μεγάλης διαμέτρου σωματίδια που απαρτίζουν την στατική φάση αντικαταστάθηκαν από μικρότερης διαμέτρου σωματίδια μέσω των οποίων γινόταν καλύτερος διαχωρισμός. Τέλος η επιπλέον πίεση μείωσε δραστικά τον συνολικό χρόνο της ανάλυσης όπως και

επίσης αύξησε την διαχωριστική ικανότητα. Ο συνδυασμός αυτής της καινούριας μεθόδου με ένα σύστημα ανίχνευσης, αναγνώρισης και καταγραφής των υπό εξέταση ενώσεων είχε ως αποτέλεσμα την δημιουργία μιας νέας τεχνικής, την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography HPLC).

1.3. Οργανολογία Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης

Μια συσκευή HPLC αποτελείται από έξι βασικά τμήματα (Εικόνα 1.3.1.1.) (Skoog et al., 2020)

- Το σύστημα αποθήκευσης και επεξεργασίας κινητής φάσεως
- Το σύστημα άντλησης κινητής φάσης
- Το σύστημα έγχυσης δείγματος
- Την χρωματογραφική στήλη
- Τον ανιχνευτή
- Το πρόγραμμα καταγραφής



Εικόνα 1.3.1.1. : Βασική οργανολογία ενός συστήματος HPLC (Skoog et al., 2020)

1.3.1. Σύστημα αποθήκευσης και επεξεργασίας κινητής φάσεως

Ένα σύγχρονο σύστημα HPLC είναι εφοδιασμένο με ένα ή περισσότερα δοχεία, καθένα από τα οποία έχει την δυνατότητα να αποθηκεύει 500 ή παραπάνω mL διαλύτη. Πριν την προσθήκη του στα αντίστοιχα δοχεία, ο διαλύτης απαερώνεται και φιλτράρεται έτσι ώστε να απομακρυνθούν ο αέρας και τυχαίες προσθήκες (σκόνη). Τόσο ο αέρας όσο και η σκόνη προκαλούν ποικίλα προβλήματα στην λειτουργία της HPLC. Τέτοια προβλήματα μπορεί να είναι αστάθεια της γραμμής βάσης (baseline), αδυναμία επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων, εμφάνιση άγνωστων κορυφών (χρωματογραφικές κορυφές που οφείλουν την ύπαρξη τους σε ενώσεις οι οποίες κανονικά δεν θα έπρεπε να υπάρχουν στο μείγμα που αναλύεται, γνωστές επίσης και ως ghost peaks) κ.α. Σε ειδικές περιπτώσεις μπορούν να οδηγήσουν στη φραγή της στήλης. Για αυτό η απομάκρυνσή τους πριν την εισαγωγή του διαλύτη εντός του μηχανήματος είναι απαραίτητη. Τα φίλτρα αυτά μπορεί να είναι τόσο εξωτερικά (διαφορετική συσκευή) όσο και να αποτελούν κομμάτι της HPLC. Ωστόσο σε οποιοδήποτε περίπτωση το στάδιο του φιλτραρίσματος δεν πρέπει να παραλείπεται.

Ο διαχωρισμός κατά τον οποίο χρησιμοποιείται ένας διαλύτης σταθερής σύστασης καλείται ισοκρατική έκλουση. Συχνά, η απόδοση του διαχωρισμού ενισχύεται σημαντικά με τη βαθμιδωτή έκλουση. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιούνται δύο ή και περισσότερα συστήματα διαλυτών κατά τη διάρκεια διαχωρισμού, τα οποία αν και αναμείξιμα μεταξύ τους διαφέρουν σημαντικά ως προς την πολικότητα και τη σύσταση. Αφού αρχίσει η έκλουση, ο λόγος των διαλυτών μεταβάλλεται με τρόπο προγραμματισμένο. Η αλλαγή επέρχεται είτε σε στάδια είτε συνεχόμενα. Εν ολίγοις η σύσταση της κινητής φάσεως μεταβάλλεται βαθμιαία ή κατά τακτά χρονικά διαστήματα, με τη χρήση μονάδας προγραμματισμού και ελέγχου του συστήματος παροχής. Τα σύγχρονα συστήματα HPLC είναι συχνά εφοδιασμένα με διατάξεις, οι οποίες εισάγουν διαλύτες από δύο ή περισσότερα δοχεία σε θάλαμο ανάμιξης με ρυθμούς που μεταβάλλονται συνεχώς. (Skoog et al., 2020) (Χατζηιωάννου et al., 1990).

1.3.2. Σύστημα άντλησης της κινητής φάσης

Λόγω του ότι η αυξημένη πίεση είναι ένα απαραίτητο συστατικό της HPLC, κρίθηκε αναγκαία η δημιουργία συστημάτων άντλησης τα οποία θα μπορούσαν όχι μόνο να αντλήσουν το διαλύτη αλλά θα είχαν την ικανότητα να δημιουργήσουν πιέσεις ικανές ώστε να γίνει ένας σωστός διαχωρισμός. Κατά συνέπεια οι απαιτήσεις ενός συστήματος άντλησης στην HPLC είναι αυστηρές και περιλαμβάνουν:

- 1) ανάπτυξη πιέσεων μέχρι 6000 psi ή 414 bar
- 2) ροή απαλλαγμένη από παλμούς
- 3) ταχύτητες ροής που κυμαίνονται από 0,1 έως 10 mL/min
- 4) έλεγχο ροής και επαναληψιμότητα ροής σε τάξη μεγέθους 0,5% ή καλύτερη
- 5) το σύστημα θα έπρεπε να είναι φτιαγμένο από υλικά ανθεκτικά στη διάβρωση.

Στην HPLC συναντούμε κυρίως δύο τύπους αντλιών: την κοχλιωτή σύριγγα και την παλινδρομική αντλία. Οι παλινδρομικές αντλίες χρησιμοποιούνται σχεδόν σε όλα τα σύγχρονα εμπορικά όργανα. Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε αντλία δύο πιστονιών Pharmacia LKB - HPLC pump 2248, η οποία συγκαταλέγεται στην κατηγορία των παλινδρομικών αντλιών. (Skoog et al., 2020) (Χατζηιωάννου et al., 1990).

Παλινδρομικές αντλίες

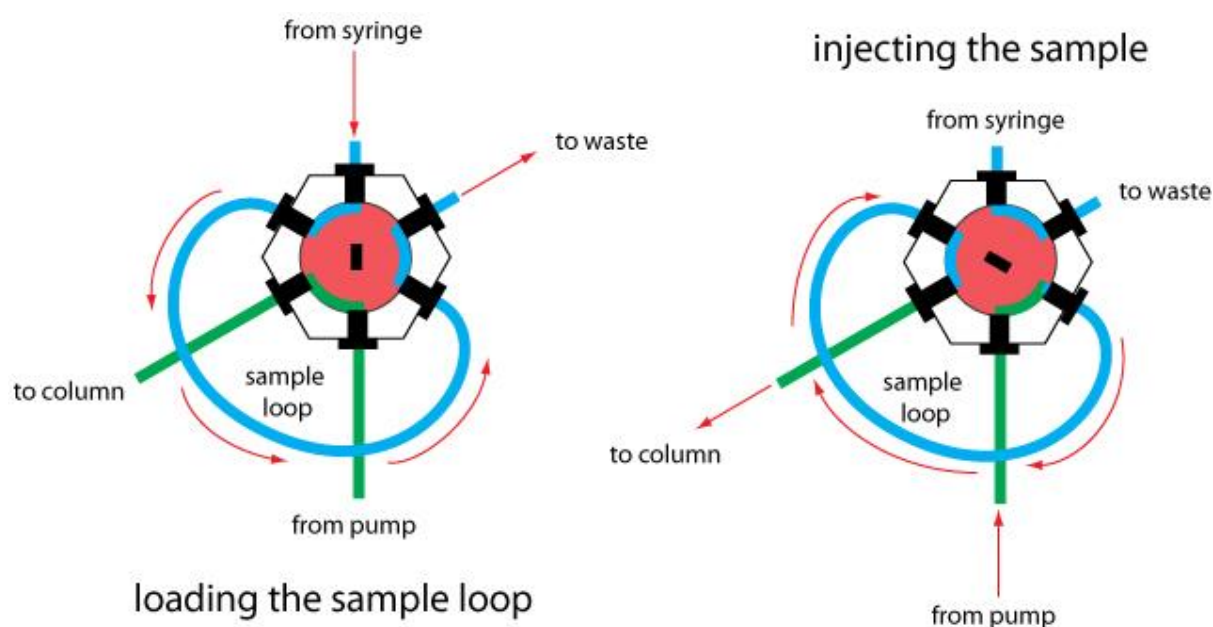
Οι παλινδρομικές αντλίες (reciprocating pumps) αποτελούνται συνήθως από έναν μικρό θάλαμο, στον οποίο ο διαλύτης αντλείται παλινδρομικά με τη βοήθεια ενός μηχανικά κινούμενου εμβόλου. Δύο σφαιρικές βαλβίδες ανοίγουν και κλείνουν εκ περιτροπής και ελέγχουν τη ροή του διαλύτη μέσα και έξω από έναν κύλινδρο. Ο διαλύτης βρίσκεται σε άμεση επαφή με το έμβολο. Εναλλακτικά, μπορεί να μεταδίδεται πίεση στον διαλύτη μέσω ενός εύκαμπτου διαφράγματος, το οποίο με τη σειρά του αντλείται σταδιακά από ένα παλινδρομικό έμβολο. Οι αντλίες αυτές έχουν το μειονέκτημα ότι παράγουν παλμούς ροής, που πρέπει να αποσβένονται επειδή η παρουσία τους γίνεται εμφανής ως θόρυβος στη γραμμή βάσης του χρωματογραφήματος. Για αυτό το λόγο συνήθως, παρεμβάλλεται μία συσκευή αποσβέσεως των παλμών για την εξομάλυνση του χρωματογραφήματος. Η συγκεκριμένη συσκευή δεν είναι απαραίτητο να είναι ξεχωριστό κομμάτι αλλά μπορεί να αποτελεί επέκταση της αντλίας. Επιπρόσθετα με το πέρας της ανάλυσης τα συστήματα καταγραφής έχουν την δυνατότητα μέσω της χρήσης αλγορίθμων να επεξεργάζονται επιπλέον τα καταγεγραμμένα χρωματογραφήματα εξομαλύνοντας ακόμα περισσότερο τους θορύβους που δημιουργούνται από την ροή της κινητής φάσης. Τα σύγχρονα όργανα HPLC, χρησιμοποιούν αντλίες διπλών κεφαλών ή ελλειπτικούς έκκεντρους άξονες για τη μείωση παλμών. Πλεονεκτήματα των παλινδρομικών αντλιών είναι οι μικροί εσωτερικοί όγκοι (35 έως 400 μ L), οι υψηλές πιέσεις (μέχρι 10.000 psi), η εύκολη προσαρμογή σε βαθμιδωτή έκλυση και σταθερές

ταχύτητες ροής, οι οποίες είναι ανεξάρτητες από την οπισθοδρόμηση της στήλης και το ιξώδες του διαλύτη.

1.3.3. Συστήματα έγχυσης δείγματος (injector)

Συχνά, ο περιοριστικός παράγοντας στην επαναληψιμότητα των μετρήσεων στην HPLC είναι ο τρόπος εισαγωγής δειγμάτων προς ανάλυση στη στήλη. Το πρόβλημα επιδεινώνεται με τη διεύρυνση των κορυφών, που προκαλείται από την υπερφόρτωση των στηλών. Συνεπώς, οι όγκοι πρέπει να είναι όσο το δυνατόν πιο μικροί, από μερικές δεκάδες μL έως και $500 \mu\text{L}$. Επιπλέον είναι σημαντικό να εισάγεται το δείγμα χωρίς να προκαλείται αποσυμπίεση του συστήματος.

Η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος εισαγωγής δείγματος στην HPLC βασίζεται σε βρόχους δειγμάτων. Οι διατάξεις αυτές είναι συχνά ένα αλληλένδετο τμήμα ενός υδροχρωματογράφου με βρόχους μεταβλητού όγκου από 1 έως $100 \mu\text{L}$. Με τέτοιου τύπου βρόχους μπορούν να εισαχθούν δείγματα σε πιέσεις μέχρι 7000 psi με εξαιρετικά καλή επαναληψιμότητα (Skoog et al., 2020) (Χατζιωάννου et al., 1990).



Εικόνα 1.3.3.1.: Εικόνα τυπικού βρόγχου εισαγωγής δείγματος. Η συσκευή αλλάζοντας την διαμόρφωσή της μπορεί να εισάγει το δείγμα εντός του κλειστού κυκλώματος της κινητής φάσης. Στην πρώτη περίπτωση η συσκευή βρίσκεται στην κατάσταση φόρτωσης, κατά την οποία το δείγμα τοποθετείται εντός του χώρου

αποθήκευσής του πριν την εισαγωγή στη στήλη (loop), χωρίς να έρχεται σε επαφή με το κινητή φάση. Στην δεύτερη περίπτωση με την αλλαγή της διάταξης, η διαδρομή που ακολουθεί η κινητή φάση αλλάζει έτσι ώστε να περνάει εντός του loop παρασέρνοντας έτσι το δείγμα. (Skoog et al., 2020)

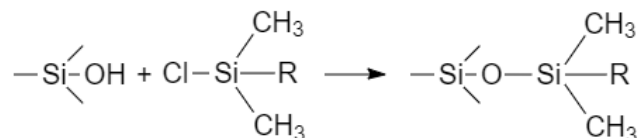
Σήμερα, οι περισσότεροι χρωματογράφοι είναι συνδεδεμένοι με σύστημα αυτόματης έγχυσης (autosampler). Τα συστήματα αυτά είναι ικανά να εισάγουν στην HPLC δείγματα από φιαλίδια που βρίσκονται σε περιστρεφόμενο δίσκο ή από πλάκες χωρητικότητας μικρόλιτρων. Στα όργανα αυτά συμπεριλαμβάνονται βρόχοι δειγμάτων και αντλία τύπου σύριγγας για έγχυση όγκων από 1 μL έως και 1 mL. Επιπλέον, ορισμένα όργανα διαθέτουν χώρους ελεγχόμενης θερμοκρασίας, όπου αποθηκεύονται τα δείγματα και δημιουργούνται χημικά παράγωγα πριν από την έγχυσή τους. Τα μηχανήματα αυτά σε ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό μπορούν να προγραμματισθούν ώστε η λειτουργία τους να γίνεται αυτόματα χωρίς να είναι απαραίτητη η παρουσία του χειριστή καθ' όλη την διάρκεια της ανάλυσης. Για την διεξαγωγή των πειραμάτων αυτής της διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκε HPLC η οποία ήταν συνδεδεμένη με αυτόματο δειγματολήπτη (ESA HPLC Autosampler, Model 542).

1.3.4. Χρωματογραφική στήλη

Οι στήλες χρωματογραφίας είναι το σημαντικότερο κομμάτι ενός μηχανήματος HPLC. Η τεχνική HPLC μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διαχωρισμούς βασισμένους σε προσρόφηση, κατανομή, ιονανταλλαγή και μοριακό αποκλεισμό, και για κάθε μία εφαρμογή διατίθενται κατάλληλες στήλες. Η παρασκευή των στηλών είναι ένα πολύ κρίσιμο στάδιο για την καλή απόδοση της τεχνικής. Τα υλικά στηρίξεως (Corasil, Zipax, Celite, κλπ.) ξηραίνονται πριν από την επικάλυψή τους με την υγρή στατική φάση, ενώ τα στερεά υλικά προσροφήσεως ενεργοποιούνται με πύρωση. Για την ελαχιστοποίηση των λιμνάζοντων χώρων εντός της στήλης, απαιτείται άριστη πλήρωσή της, δηλαδή οι πόροι του υλικού στηρίξεως πρέπει να γεμίζουν τελείως με την υγρή στατική φάση.

Οι περισσότερες στήλες HPLC έχουν μήκος από 5 έως 25 cm και είναι συνήθως ευθύγραμμες. Σε περίπτωση που ο διαχωρισμός δεν είναι επαρκής και χρειάζεται να

Οι πιο χρήσιμες επιστρώσεις για την χρωματογραφία συνδεδεμένης φάσης είναι τα σιλοξάνια, που σχηματίζονται κατά την αντίδραση της υδρολυμένης επιφάνειας με ένα οργανοχλωριωμένο σιλάνιο.



Εικόνα 1.3.4.2.: Αντίδραση σιλανόλης με οργανοχλωριωμένο σιλάνιο με σκοπό την παραγωγή σιλοξανίου, όπου R είναι αλκυλομάδα ή υποκατεστημένη αλκυλομάδα.

Η κάλυψη της επιφάνειας με σιλανοποίηση περιορίζεται σε 4 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ή λιγότερο ομάδων OH, λόγω στερεοχημικών παρεμποδίσεων. Δυστυχώς, οι ομάδες SiOH που δεν αντέδρασαν, προσδίδουν ανεπιθύμητη πολικότητα στην επιφάνεια, η οποία ίσως οδηγήσει στο σχηματισμό ουρών (tailing) στις κορυφές του χρωματογραφήματος, ειδικά στις περιπτώσεις βασικών αναλυτών. Για να ελαττωθεί η επίδραση αυτή, τα υλικά πλήρωσης με βάση τα σιλοξάνια συχνά καλύπτονται (end-capping) με μια επιπλέον αντίδραση με χλωροτριμεθυλοσιλάνιο το οποίο, λόγω του μικρότερου μεγέθους του, δεσμεύει πολλές από τις σιλανολικές ομάδες που δεν αντέδρασαν (Skoog et al., 2020) (Χατζηγιωάννου et al., 1990).

Υλικά πλήρωσης για χρωματογραφία κανονικής και αντίστροφης φάσης

Με βάση τη σχετική πολικότητα της κινητής και της στατικής φάσης διακρίνονται δύο τύποι χρωματογραφίας κατανομής. Οι πρώτες εργασίες στην υγροχρωματογραφία βασίσθηκαν σε στατικές φάσεις υψηλής πολικότητας, όπως ύδωρ ή τριαιθυλενογλυκόλη, κατακρατούμενες σε σωματίδια πυριτίας (silica) ή αλούμινας, ενώ ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε ένας σχετικά μη πολικός διαλύτης, όπως εξάνιο ή ισοπροπυλαιθέρας. Για ιστορικούς λόγους, αυτός ο τύπος χρωματογραφίας αναφέρεται μέχρι σήμερα ως χρωματογραφία κανονικής φάσης (normal-phase chromatography). Στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (reversed-phase chromatography), η στατική φάση είναι μη πολική, συχνά ένας υδρογονάνθρακας, και η κινητή φάση είναι σχετικά πολικός διαλύτης (όπως ύδωρ, μεθανόλη, ακετονιτρίλιο ή τετραυδροφουράνιο ή κάποιο μείγμα τέτοιου τύπου ενώσεων).

Στη χρωματογραφία κανονικής φάσης, το λιγότερο πολικό συστατικό εκλύεται πρώτο. Αύξηση της πολικότητας της κινητής φάσης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του χρόνου έκλουσης. Αντίθετα στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, το πολικότερο συστατικό εμφανίζεται πρώτο αφού κατακρατείται λιγότερο από την μη πολική φάση και με αύξηση της πολικότητας της κινητής φάσης ο χρόνος έκλουσης αυξάνει.

Τα υλικά πλήρωσης στην τεχνική συνδεδεμένης φάσης κατατάσσονται ως υλικά αντίστροφης φάσης όταν η δεσμευόμενη επίστρωση (coating) είναι μη πολική και ως κανονικής φάσης όταν η επίστρωση περιέχει πολικές δραστικές ομάδες. Έχει εκτιμηθεί ότι τα 75% των διαχωρισμών με HPLC εκτελούνται προς το παρόν με στήλες αντίστροφης φάσης. Το κυριότερο πλεονέκτημα των διαχωρισμών αντίστροφης φάσης, είναι το ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί το νερό (ddH₂O) ως κινητή φάση. Το ύδωρ είναι ένας φθηνός διαλύτης, μη τοξικός, διαπερατός από την υπεριώδη ακτινοβολία και συμβατός με βιολογικές ουσίες. Επίσης, η μεταφορά μάζας είναι ταχύτερη με μη πολικές στατικές φάσεις, όπως και η επίτευξη ισορροπίας του διαλύτη κατά τη βαθμιδωτή έκλουση. Συνηθέστερα, η ομάδα R του σιλανίου των επιστρώσεων είναι μια αλυσίδα C₈ (n-οκτύλιο) ή μια αλυσίδα C₁₈ (n-δεκαοκτύλιο).

Ο μηχανισμός με τον οποίο οι επιφάνειες αυτές κατακρατούν τα μόρια των προσδιοζόμενων ουσιών δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως. Ανεξάρτητα από τις λεπτομέρειες του μηχανισμού κατακράτησης, ένα υλικό επίστρωσης συνδεδεμένης φάσης μπορεί να θεωρηθεί ως ένα συμβατικό, φυσικά κατακρατούμενο υγρό.

Οι μεγαλύτερες αλυσίδες παράγουν υλικά πλήρωσης με μεγαλύτερη ικανότητα κατακράτησης. Επιπλέον, οι μεγαλύτερες αλυσίδες επιτρέπουν την εισαγωγή μεγαλύτερης ποσότητας δείγματος. Για παράδειγμα, υλικό C₁₈ κατακρατεί διπλάσια ποσότητα ουσίας απ' ό,τι ένα υλικό C₄, το οποίο παρασκευάστηκε σε παρόμοιες συνθήκες.

Στις περισσότερες εφαρμογές της χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης, η έκλουση πραγματοποιείται με κινητή φάση υψηλής πολικότητας, π.χ. με ένα υδατικό διάλυμα που περιέχει διάφορες συγκεντρώσεις διαλυτών, όπως είναι η μεθανόλη, το ακετονιτρίλιο ή το τετραυδροφουράνιο. Ωστόσο, θα πρέπει να αποφευχθεί η χρήση διαλυμάτων με τιμές pH μεγαλύτερες από περίπου 7,5 διότι η πυρίτια μπορεί να σχηματίσει διαλυτές ενώσεις και να επέλθει η σταδιακή διάλυση της στατικής φάσης. Επιπλέον, σε αλκαλικά διαλύματα μπορεί να υδρολυθεί και το σιλοξάνιο με

αποτέλεσμα την ποιοτική υποβάθμιση ή την πλήρη καταστροφή του υλικού πλήρωσης. Στην περίπτωση όξινων διαλυμάτων, το pH δεν πρέπει να είναι μικρότερο από περίπου 2,5 λόγω της όξινης υδρόλυσης του σιλοξανίου (Skoog et al., 2020).

Προστατευτικές στήλες

Συνήθως για να αυξηθεί ο χρόνος ζωής της αναλυτικής στήλης προηγείται μια μικρή προστατευτική στήλη (guard column) ή προστήλη (pre-column). Η προστήλη απομακρύνει όχι μόνο αιωρούμενα σωματίδια και προσμείξεις από τον διαλύτη, αλλά και συστατικά του δείγματος που συνδέονται με τη στατική φάση κατά μη αντιστρεπτό τρόπο. Η σύσταση του υλικού της προστήλης πρέπει να είναι παρόμοια με αυτό της αναλυτικής στήλης. Ωστόσο το μέγεθος των σωματιδίων είναι συνήθως μεγαλύτερο για να ελαχιστοποιείται η πτώση πίεσης. Οι προστήλες συνήθως μετά από διαρκή και μακροχρόνια χρήση αρχίζουν να μην λειτουργούν όπως πρέπει λόγω της συσσώρευσης σωματιδίων εντός τους. Σε αυτές τις περιπτώσεις είτε πραγματοποιούνται κύκλοι αναγέννησης της στήλης είτε η στήλη απορρίπτεται και αντικαθίσταται με μια καινούρια του ίδιου τύπου. Επομένως η βασική χρήση της προστήλης είναι η προστασία της πιο δαπανηρής αναλυτικής στήλης.

Έλεγχος θερμοκρασίας της στήλης

Η θερμοκρασία αποτελεί έναν από τους βασικούς παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τον χρωματογραφικό διαχωρισμό. Ωστόσο το μέγεθος της επιρροής της θερμοκρασίας καθορίζεται πολλές φορές από τον τύπο της στήλης που χρησιμοποιείται για την ανάλυση. Συνεπώς υπάρχουν εφαρμογές που απαιτείται αυστηρός έλεγχος της θερμοκρασίας της στήλης καθώς επίσης και εφαρμογές όπου οι στήλες μπορούν να λειτουργήσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Παρόλα αυτά τα χρωματογραφήματα που λαμβάνονται με σταθερή θερμοκρασία έχουν πολύ καλύτερη επαναληψιμότητα και οι διαχωρισμοί, λόγω του ότι μπορούν να εν μέρει να ρυθμιστούν από αυτή, είναι καλύτεροι δίνοντας έτσι ένα καλύτερο χρωματογράφημα. Τα σύγχρονα όργανα είναι εφοδιασμένα με θερμαντικά συστήματα, που ελέγχουν τη θερμοκρασία της στήλης στην περιοχή των θερμοκρασιών δωματίου μέχρι τους 150 °C με μεγάλη ακρίβεια. Ένας άλλος τρόπος ακριβής ρύθμισης της θερμοκρασίας είναι η σύνδεση των στηλών με μανδύες ύδατος τροφοδοτούμενους από υδατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας για τον ακριβή έλεγχο της θερμοκρασίας.

1.3.5. Ανιχνευτές

Ο ανιχνευτής στην HPLC είναι ένα από τα πιο κρίσιμα στοιχεία του συστήματος, γιατί κάνει ορατό το διαχωρισμό που επιτυγχάνεται μέσω της στήλης. Οι ανιχνευτές στην HPLC είναι συχνά παραδοσιακά αναλυτικά όργανα προσαρμοσμένα σε κυψελίδες ροής για να μετρούν χαμηλές συγκεντρώσεις αναλυτών. (Skoog et al., 2020) (Χατζηιωάννου et al., 1990).

Ένας ιδανικός ανιχνευτής για την HPLC θα πρέπει να έχει τις παρακάτω ιδιότητες:

- Ικανοποιητική ευαισθησία, με χαμηλά όρια ανιχνεύσεως της τάξεως των ng- μ g
- Σταθερότητα και ικανότητα αναπαραγωγής των αποτελεσμάτων
- Γραμμική απόκριση επεκτεινόμενη σε περιοχή αρκετών τάξεων μεγέθους
- Σύντομους χρόνους απόκρισης ανεξάρτητους από την ταχύτητα ροής
- Αξιοπιστία και ευκολία στη χρήση
- Να μην επηρεάζεται από μεταβολές της θερμοκρασίας και της ταχύτητας ροής του υγρού εκλούσεως
- Παρόμοια απόκριση προς όλες τις διαχωριζόμενες ουσίες ή εναλλακτικά εξαιρετικά προβλέψιμη και εκλεκτική απόκριση για μια ή περισσότερες ομάδες ενώσεων.
- Τέλος θα πρέπει να μην καταστρέφει την υπό εξέταση ουσία κατά την ανίχνευσή της.

Τύποι ανιχνευτών

Υπάρχουν δύο βασικοί τύποι ανιχνευτών για συστήματα HPLC. Αυτοί που ανταποκρίνονται σε μια βασική ιδιότητα (bulk property detectors) της κινητής φάσης, όπως ο δείκτης διάθλασης, η διηλεκτρική σταθερά ή η πυκνότητα, οι τιμές των οποίων επηρεάζονται από την παρουσία των εκλούμενων συστατικών. Αντίθετα υπάρχουν ανιχνευτές που ανταποκρίνονται σε ιδιότητα του εκλουόμενου συστατικού (solute property detectors), όπως είναι η απορρόφηση στο υπεριώδες, ο φθορισμός ή το ρεύμα διάχυσης. Την ιδιότητα αυτή δεν πρέπει να την διαθέτει η κινητή φάση. Στην περίπτωση που η κινητή φάση έχει παρόμοια ιδιότητα το σήμα που λαμβάνεται από την υπό ανάλυση ένωση επικαλύπτεται από το σήμα της κινητής φάσης με αποτέλεσμα να μην μπορεί να γίνει σωστή ανίχνευσή της.

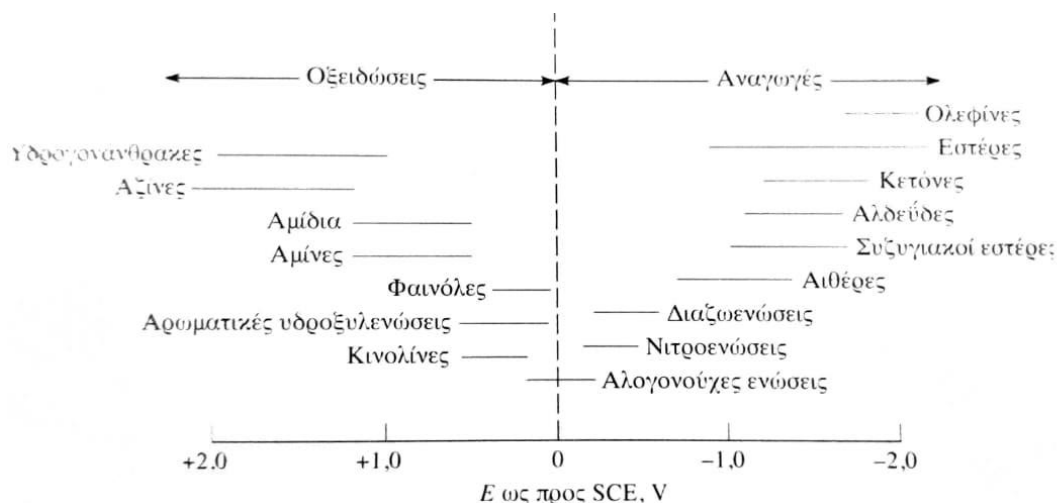
Οι σημαντικότερες κατηγορίες ανιχνευτών είναι οι εξής:

- Ανιχνευτές απορρόφησης UV-ορατού:

- Ανιχνευτές απορρόφησης στην υπεριώδη περιοχή με φίλτρο
- Ανιχνευτές απορρόφησης με δυνατότητες σάρωσης
- Ανιχνευτές απορρόφησης υπερύθρου
- Ανιχνευτές φθορισμού
- Ανιχνευτές δείκτη διάθλασης
- Ανιχνευτές σκέδασης φωτός μετά από εξάτμιση
- Ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές

Όσον αφορά τους ηλεκτροχημικούς ανιχνευτές οι συσκευές αυτές βασίζονται στην αμπερομετρία, τη βολταμμετρία, την κουλομετρία και την αγωγιμομετρία. Αν και οι ηλεκτροαναλυτικές μέθοδοι δεν έχουν ακόμη αξιοποιηθεί στον βαθμό που έχουν αξιοποιηθεί οι οπτικοί ανιχνευτές, φαίνεται να προσφέρουν πλεονεκτήματα, όπως υψηλή ευαισθησία, απλότητα και ευρεία χρήση, σε πολλές περιπτώσεις. Η τελευταία αυτή ιδιότητα φαίνεται και από την εικόνα 1.3.5.1. όπου δείχνονται οι πιθανές περιοχές στις οποίες συμβαίνει οξειδωση ή αναγωγή 16 χαρακτηριστικών οργανικών ομάδων, οι οποίες θα μπορούσαν να ανιχνευτούν με τη χρήση ενός ηλεκτροχημικού ανιχνευτή.

Όπως φαίνεται και από την εικόνα 1.3.5.1. σε αυτό το δυναμικό προκαλείται οξειδωση αμιδίων και αμινών όπως είναι οι ενώσεις που αναλύθηκαν. Ωστόσο ένας σοβαρός περιορισμός των ηλεκτροχημικών ανιχνευτών είναι ότι δεν είναι συμβατοί με τη βαθμιδωτή έκλουση. Ο λόγος που συμβαίνει αυτό είναι ότι με την μεταβολή της σύστασης της κινητής φάσης αλλάζει και η ιοντική ισχύς της. Με την αλλαγή αυτή μεταβάλλεται η γραμμή βάσης που αναγνωρίζει εκείνη την στιγμή ο ανιχνευτής, συνεπώς είναι αδύνατη η ύπαρξη ενός σταθερού baseline άρα και η διεξαγωγή μια χημικής ανάλυσης.



Εικόνα 1.3.5.1.: Ανιχνεύσιμες οργανικές δραστικές ομάδες με αμπερομετρικές μετρήσεις. Οι οριζόντιες γραμμές δείχνουν την περιοχή των δυναμικών οξειδωσης ή αναγωγής, όπου οι ενώσεις που περιέχουν τις αντίστοιχες δραστικές ομάδες, είναι ηλεκτροχημικά δραστικές. (Skoog et al., 2020)

Αξίζει να αναφερθεί ότι οι ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές χρησιμοποιούνται κυρίως σε διαχωρισμούς και προσδιορισμούς ενώσεων βιοχημικού και φαρμακολογικού ενδιαφέροντος, π.χ. ιχνοποσοτήτων κατεχολαμίνων στον εγκέφαλο.

1.3.6. Πρόγραμμα καταγραφής

Στο παρελθόν η αποτύπωση των χρωματογραφικών κορυφών γινόταν με τη χρήση καταγραφέα. Ο καταγραφέας αποτελεί το φθηνότερο και απλούστερο τρόπο αποτύπωσης του χρωματογραφήματος και χαρακτηρίζεται από ταχεία απόκριση. Τα σύγχρονα συστήματα HPLC αντί καταγραφέα, είναι συνδεδεμένα με υπολογιστές οι οποίοι είναι εξοπλισμένοι με αντίστοιχα προγράμματα ανάλυσης μέσω των οποίων γίνεται η συλλογή, αποθήκευση και επεξεργασία των σημάτων των ανιχνευτών, και η παρουσίαση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης. (Χατζηιωάννου et al., 1990).

Η σύγχρονη ερευνητική προσπάθεια όσον αφορά την HPLC επικεντρώνεται, μεταξύ των άλλων, στην αύξηση της ευαισθησίας κατά την ανίχνευση των διαχωριζόμενων συστατικών. Μία αποτελεσματική τεχνική για το σκοπό αυτόν είναι ο σχηματισμός παραγώγων των υπό ανάλυση συστατικών, με ειδικά αντιδραστήρια, τα οποία

παράγωγα μπορούν να ανιχνευθούν σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Με την τεχνική αυτή επεκτείνεται σημαντικά η δυνατότητα εφαρμογής των ανιχνευτών υπεριώδους και φθορισμού. Σε άλλες περιπτώσεις τα παράγωγα αυτά καθιστούν την υπό εξέταση ένωση ανιχνεύσιμη, η οποία σε κανονικές συνθήκες δεν μπορεί να ανιχνευθεί. Τέτοια παράγωγα ενώσεων ανιχνεύονται με την τεχνική της ηλεκτροχημείας. Για παράδειγμα, τα αμινοξέα μπορούν να ανιχνευθούν με μεγάλη ευαισθησία μετά το διαχωρισμό τους, αν προηγουμένως αντιδράσουν με την όρθοφθαλαλδεΐδη. Η αντίδραση σχηματισμού παραγώγων μπορεί να γίνει διάλυμα του δείγματος, πριν από την εισαγωγή του στη στήλη (προ στήλης παραγωγοποίηση). Αυτού του είδους η ανίχνευση θα αναλυθεί περαιτέρω στην πορεία (βλέπε Κεφάλαιο 5.6.).

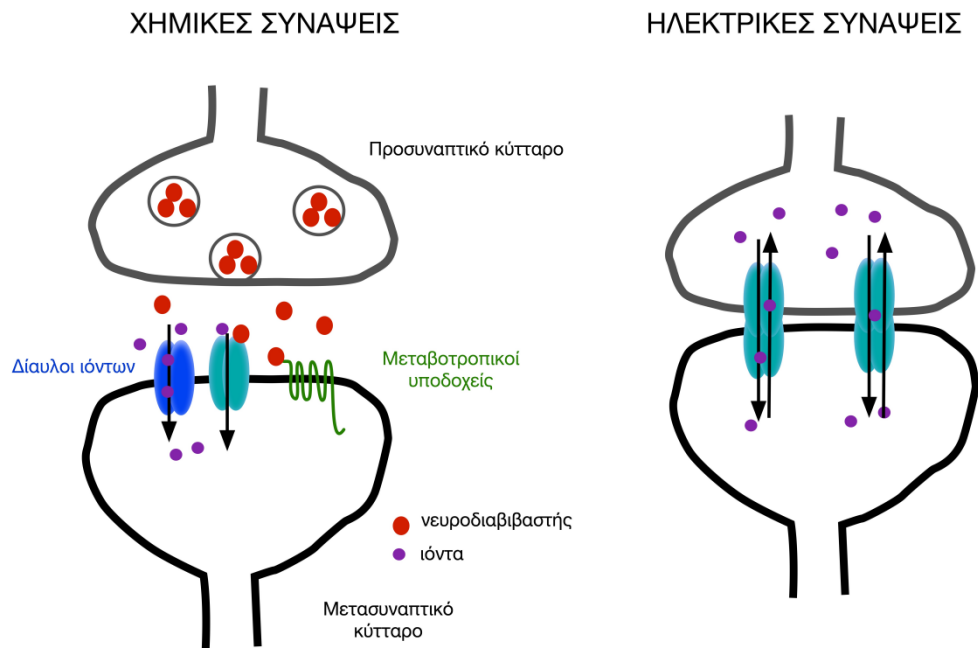
Η HPLC αποτελεί σήμερα την τεχνική επιλογής σε πολλά προβλήματα φαρμακευτικής ανάλυσης, αφού τα δείγματα με τα οποία ασχολείται η φαρμακευτική ανάλυση είναι συνήθως μείγματα (π.χ. σκευάσματα). Εκεί όμως που αξιοποιείται πλήρως η ισχύς της τεχνικής, είναι στην ανάλυση βιολογικών δειγμάτων, τα οποία περιέχουν φυσιολογικά συστατικά, τα χορηγούμενα φάρμακα και τους μεταβολίτες τους. Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις οι ενώσεις που είναι προς ανίχνευση και ανάλυση βρίσκονται συνήθως σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, για αυτό η χρήση μιας αξιόπιστης τεχνικής με χαμηλά όρια ανίχνευσης είναι αναγκαία.

Κεφάλαιο 2. Νευροδιαβιβαστές

2.1. Νευρικές συνάψεις

Στο νευρικό σύστημα υπάρχουν δύο ειδών συνάψεις: οι ηλεκτρικές και οι χημικές συνάψεις (Pereda, 2014). Εικόνα 2.1.1. Το μεγαλύτερο ποσοστό των συνάψεων στο νευρικό σύστημα είναι χημικές. Υπάρχουν πολλές και σημαντικές διαφορές μεταξύ των ηλεκτρικών και χημικών συνάψεων.

- Στις ηλεκτρικές συνάψεις γίνεται άμεση μεταφορά ιόντων μέσω ενός διαύλου που σχηματίζεται μεταξύ των δύο κυττάρων. Με τον σχηματισμό αυτού του διαύλου δημιουργείται μια δίοδος μέσω της οποίας ιόντα από το ένα κύτταρο διαχέονται στο άλλο. Αυτή η μεταφορά ιόντων έχει ως αποτέλεσμα την μεταφορά ιοντικού ρεύματος από το ένα κύτταρο στο άλλο.
- Στις χημικές συνάψεις, τα δύο νευρικά κύτταρα δεν εφάπτονται. Επομένως, για τη μεταφορά του σήματος, το ηλεκτρικό σήμα στο ένα κύτταρο (δυναμικό ενεργείας) μετατρέπεται σε χημικό (νευροδιαβιβαστής), και κατόπιν, σε ηλεκτρικό σήμα (μετασυναπτικό δυναμικό), με την πρόσδεση του νευροδιαβιβαστή στους υποδοχείς του μετασυναπτικού κυττάρου. Ως υποδοχείς νευροδιαβιβαστών ορίζονται τα διαμεμβρανικά μοριακά σύμπλοκα επάνω στα οποία δεσμεύεται ο νευροδιαβιβαστής, ο οποίος έτσι τα ενεργοποιεί και προκαλεί μεταβολές σε κυτταρικές διεργασίες. (Luján, 2005)
- Στις ηλεκτρικές συνάψεις, μεταδίδονται πολύ μικρής ιοντικής ενέργειας σήματα όσο και δυναμικά ενεργείας, ενώ στις χημικές συνάψεις μεταδίδονται μόνο δυναμικά ενεργείας.
- Στις ηλεκτρικές συνάψεις, η μετάδοση του ηλεκτρικού σήματος γίνεται πολύ γρήγορα ενώ στις χημικές συνάψεις, υπάρχει μια χρονική καθυστέρηση.
- Στις χημικές συνάψεις, το ηλεκτρικό σήμα του προσυναπτικού κυττάρου μπορεί να αλλάξει, να μετασχηματιστεί και να εμφανίσει μεγάλη ποικιλομορφία. Αντίθετα, στις ηλεκτρικές συνάψεις το ιοντικό ρεύμα μεταδίδεται από το ένα κύτταρο στο άλλο έχοντας μία μορφή.



Εικόνα 2.1.1.: Σχηματική απεικόνιση των ηλεκτρικών και χημικών συνάψεων (Σιδηροπούλου, 2015)

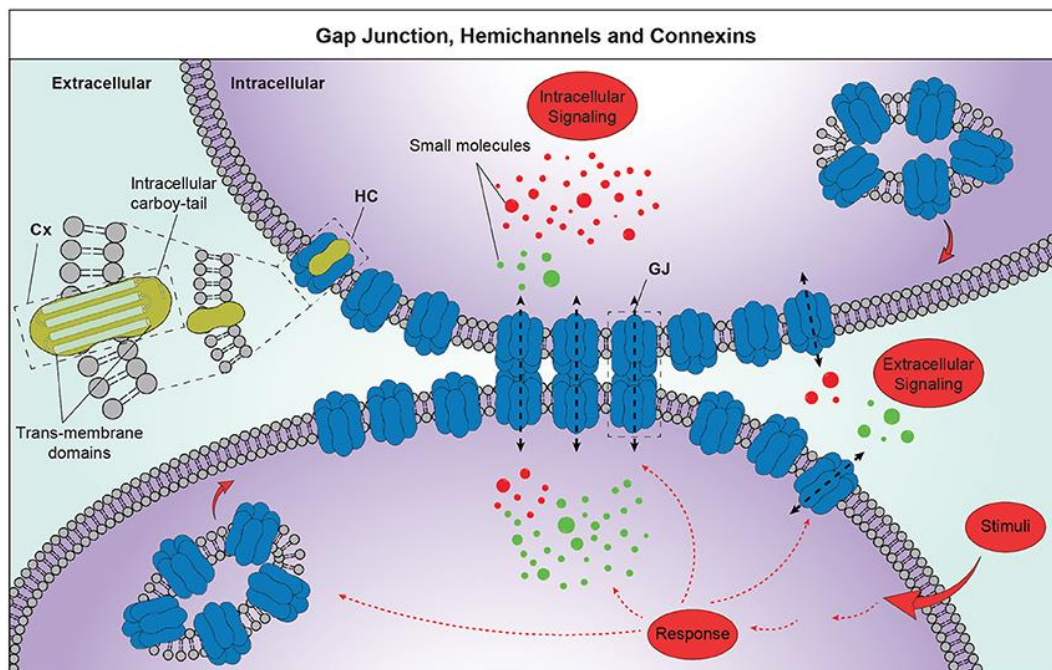
2.2 Ηλεκτρικές Συνάψεις

Οι διάυλοι ιόντων που διαμορφώνουν τις ηλεκτρικές συνάψεις είναι πρωτεΐνες, οι οποίες ονομάζονται κοννεξίνες (Pereda, 2014). Οι κοννεξίνες απαρτίζονται από 6 διαφορετικές υπομονάδες, σε κυκλική διάταξη ώστε να σχηματιστεί ένας διάυλος. Όταν δύο νευρικά κύτταρα συνδέονται με ηλεκτρική σύναψη, τότε το κάθε νευρικό κύτταρο εκφράζει μια ημι-κοννεξίνη, η οποία ευθυγραμμίζεται με την ημι-κοννεξίνη του άλλου κυττάρου. Με αυτό τον τρόπο, σχηματίζεται μια ενιαία κοννεξίνη και δημιουργείται μια χασματοσύνδεση, η οποία επιτρέπει τη διέλευση ιόντων από το ένα κύτταρο στο άλλο (Εικόνα 2.2.1.), επιτρέποντας τη μεταφορά των ηλεκτρικών σημάτων από το ένα κύτταρο στο άλλο.

Ηλεκτρικές συνάψεις έχουν καταγραφεί και έχουν βρεθεί κυρίως σε κατώτερους εξελικτικά οργανισμούς, αλλά και σε μικρότερο βαθμό στο νευρικό σύστημα των θηλαστικών κατά την ανάπτυξη και ακόμη λιγότερο στον ενήλικο εγκέφαλο.

Κύτταρα που χρησιμοποιούν χημικές συνάψεις:

- Συγχρονισμός (διάμεσοι νευρώνες)
- Ολιγοδενδροκύτταρα
- Λεία μυϊκά κύτταρα



Εικόνα 2.2.1.: Σχηματική απεικόνιση των κοννεξινών. (Vicario et al., 2017)

2.3 Χημικές συνάψεις

Στις χημικές συνάψεις, το ηλεκτρικό σήμα (δυναμικό ενεργείας) ενός κυττάρου, μετατρέπεται σε έκλυση νευροδιαβιβαστή. Ο νευροδιαβιβαστής, ο οποίος βρίσκεται μέσα σε κυστίδια, εκλύεται από το νευρικό κύτταρο (A) στη συναπτική σχισμή, δηλαδή στο κενό μεταξύ δύο νευρικών κυττάρων (A κ B) και προσδένεται σε πρωτεΐνες που βρίσκονται στο επόμενο κύτταρο (B) (Εικόνα 2.3.1.).

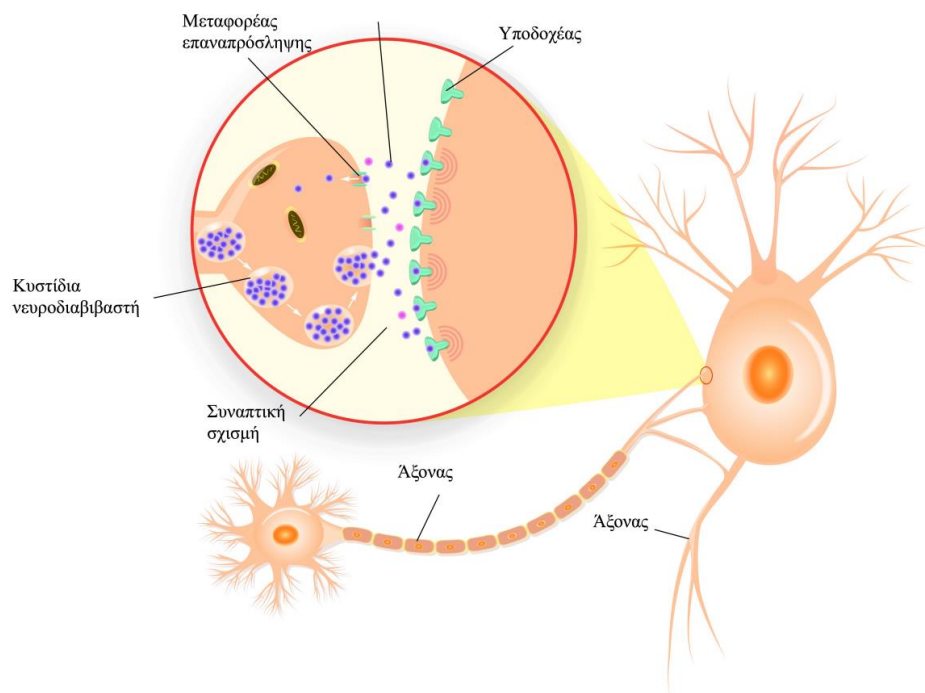
Επομένως, στις χημικές συνάψεις το ηλεκτρικό σήμα (δυναμικό ενεργείας) του νευρώνα A μετατρέπεται σε χημικό σήμα (έκλυση νευροδιαβιβαστή) και ξανά σε ηλεκτρικό, με τη δράση του νευροδιαβιβαστή στους υποδοχείς του στο κύτταρο B. Το κύτταρο A, ονομάζεται προσυναπτικό κύτταρο, γιατί βρίσκεται προ της σύναψης. Αντίστοιχα, το κύτταρο B είναι το μετασυναπτικό κύτταρο αφού βρίσκεται μετά τη συναπτική σχισμή. Η αλλαγή του δυναμικού που προκαλείται στη μεμβράνη του

μετασυναπτικού κυττάρου ονομάζεται μετασυναπτικό δυναμικό. Αν η αλλαγή είναι θετική, τότε ονομάζεται διεγερτικό μετασυναπτικό δυναμικό, ενώ αν η αλλαγή είναι αρνητική ονομάζεται ανασταλτικό μετασυναπτικό δυναμικό.

Υπάρχουν τέσσερα στάδια για την ολοκλήρωση της συναπτικής διαβίβασης:

- A) η σύνθεση του νευροδιαβιβαστή και η αποθήκευση στα κυστίδια
- B) η έκλυση του νευροδιαβιβαστή στη συναπτική σχισμή
- Γ) η πρόσδεση του στους υποδοχείς του νευροδιαβιβαστή και
- Δ) η αποδόμηση ή επαναπρόσληψή του.

Η μετάδοση του ηλεκτρικού σήματος στις χημικές συνάψεις είναι μονόδρομη (σε αντίθεση με τις ηλεκτρικές συνάψεις που μπορεί να γίνεται αμφίδρομη). Επιπλέον στις χημικές συνάψεις, υπάρχει μεγάλη ποικιλομορφία, τόσο στο είδος των νευροδιαβιβαστών που εκλύονται όσο και το είδος των υποδοχέων που βρίσκονται στο μετασυναπτικό κύτταρο. Έτσι, το σήμα μπορεί για παράδειγμα να μειωθεί, να ενισχυθεί, ή να αλλάξει μορφή όταν μεταδίδεται από τον ένα νευρώνα στον άλλο. Συνεπώς για να μπορέσει να γίνει κατανοητό πως μεταδίδεται ένα σήμα μέσω μιας χημικής σύναψης πρέπει πρώτα να αναλυθεί πως λειτουργεί και δρα ο νευροδιαβιβαστής επάνω σε αυτή.



Εικόνα 2.3.1.: Σχηματική αναπαράσταση της χημικής σύναψης (Σιδηροπούλου, 2015)

2.4. Γενικά και Ιστορικά Στοιχεία Νευροδιαβιβαστών

Τόσο η έννοια όσο και ο όρος «νευροδιαβιβαστής» εισήχθησαν μόλις κατά τις αρχές του προηγούμενου αιώνα, όταν ακόμα θεωρούνταν ότι η επικοινωνία τόσο μεταξύ νευρικών και μυϊκών κυττάρων όσο και αυτή μεταξύ νευρικών κυττάρων ήταν αμιγώς ηλεκτρική. Βέβαια, μια απλή ιδέα ότι ένα νεύρο ίσως απελευθερώνει μια χημική ουσία, για να επικοινωνήσει με άλλα κύτταρα είχε εκφραστεί από τον Du Bois-Reymond το 1877. Κάποια χρόνια αργότερα ο George Olivier πειραματιζόμενος, βρήκε ότι εκχύλισμα επινεφριδίων μπορούσαν να αυξάνουν τη διάμετρο υποδερμικών αρτηριών και έτσι οδήγησε στην ταυτοποίηση της ουσίας που ονομάστηκε αδρεναλίνη (Oliver & Schäfer, 1895). Βασιζόμενος πάνω σ' αυτές τις παρατηρήσεις, ο Elliott ήταν ο πρώτος που ρητά και με σαφήνεια πρότεινε το 1904 ότι η χημική ουσία αδρεναλίνη απελευθερώνεται από τις απολήξεις των συμπαθητικών νευρών και δρα επάνω στα μυϊκά κύτταρα που αποτελούν τους στόχους τους. Ωστόσο, η πρώτη ουσία που απομονώθηκε ήταν η ακετυλοχολίνη (Dale, 1954) (LOEWI, 1956), η οποία και προκαλούσε καρδιακό αποκλεισμό. Πλέον, η έρευνα επί των νευροδιαβιβαστικών ουσιών έχει διευρυνθεί εξαιρετικά από το αρχικό σημείο ανακάλυψης των λεγόμενων κλασικών νευροδιαβιβαστών στην τρέχουσα κατάσταση, όπου ως νευροδιαβιβαστές πρέπει να λογίζονται όχι μόνον και μη κλασικά μόρια αλλά και «μη συμβατικά», όπως είναι οι αέριοι νευροδιαβιβαστές, εκφράζοντας έτσι μια πτυχή της συναρπαστικής πορείας ανάπτυξης της νευροεπιστήμης. (Luján, 2005)

Πιο ειδικά νευροδιαβιβαστές καλούνται οι ουσίες οι οποίες χρησιμοποιούνται στο νευρικό σύστημα για την επικοινωνία μεταξύ των νευρικών κυττάρων, αλλά και μεταξύ των νευρικών με τα μυϊκά κύτταρα. Ένας πολύ γενικός ορισμός στον οποίο συμπεριλαμβάνονται όλες οι διαφορετικές περιπτώσεις, προσδιορίζει τον νευροδιαβιβαστή ως μία ουσία η οποία απελευθερώνεται από ένα νευρικό κύτταρο και δρα ως «ερέθισμα» σε ένα άλλο κύτταρο «στόχο». Νευροδιαβιβαστής καλείται μία χημική ουσία η οποία εκκρίνεται, απελευθερώνεται από την προσυναπτική νευρική απόληξη στη συναπτική σχισμή και δρα στη μετασυναπτική περιοχή όπου και πυροδοτεί μια αλληλουχία αντιδράσεων που οδηγούν είτε σε διέγερση είτε σε αναστολή της δραστηριότητας του μετασυναπτικού κυττάρου.

Ο νευροδιαβιβαστής εξασκεί τη δράση του στο μετασυναπτικό κύτταρο μέσω της πρόσδεσής του επί ειδικών μεμβρανικών πρωτεϊνών στη μετασυναπτική μεμβράνη, οι

οποίοι καλούνται υποδοχείς, και η ενεργοποίησή τους έχει ως αποτέλεσμα την μεταβολή της ηλεκτρικής δραστηριότητας της μεμβράνης, αυξάνοντας ή μειώνοντας την πιθανότητα του μετασυναπτικού κυττάρου να δημιουργήσει δυναμικό ενέργειας. Σε ορισμένες περιπτώσεις η ενεργοποίηση του υποδοχέα οδηγεί στην έναρξη ενός καταρράκτη μοριακών διεργασιών εντός του μετασυναπτικού κυττάρου. Επίσης, ο νευροδιαβιβαστής μπορεί να δρα στη μεμβράνη του ίδιου κυττάρου από το οποίο απελευθερώνεται, έχοντας ως πιο συνηθισμένη λειτουργία τη ρύθμιση της απελευθέρωσης μορίων του ίδιου νευροδιαβιβαστή από την απόληξη.

Από την άλλη πλευρά, ένας νευροδιαβιβαστής μπορεί να διαχέεται σε μεγαλύτερη περιοχή και να επηρεάζει τη δραστηριότητα ενός πληθυσμού άλλων κυττάρων. Παραδοσιακά η διακυτταρική επικοινωνία έχει χαρακτηριστικά ένα-προς-ένα μεταξύ των κυττάρων. Αυτό αποτελεί ένα πρότυπο χημικής συναπτικής επικοινωνίας στο νευρικό σύστημα, αλλά όχι τον μοναδικό τρόπο χημικής διακυτταρικής επικοινωνίας στον εγκέφαλο. Έτσι, υπάρχει και ένας πιο διάχυτος τρόπος χημικής επικοινωνίας, στον οποίο μία απελευθερωμένη χημική ουσία μπορεί να διαχέεται σε μεγαλύτερο χώρο από αυτόν της σύναψης και να επηρεάζει ένα σύνολο νευρώνων («μαζική διαβίβαση»). Επίσης, υπάρχουν χημικές ουσίες οι οποίες δεν απελευθερώνονται με τον κλασικό τρόπο, αλλά διαχέονται δια μέσου των πλασματικών μεμβρανών του προσυναπτικού και μετασυναπτικού κυττάρων και επιδρούν σε ενδοκυττάριας θέσεις του δεύτερου. Ακόμα, πρόσφατα έχει βρεθεί ότι υφίσταται χημική επικοινωνία μέσω διαβιβαστών μεταξύ νευρικών και γλοιακών κυττάρων. (Szepesi et al., 2018)

Οι ουσίες που απελευθερώνονται από έναν νευρώνα και δρουν σε άλλους, μπορεί να διακρίνονται σε δύο αδρές κατηγορίες βάσει ορισμένων κριτηρίων, όπως π.χ. η ταχύτητα και η έκταση της δράσης και ο μηχανισμός δράσης, μεταξύ άλλων. Η διάκριση οδηγεί στην περιγραφή των ουσιών είτε ως νευροδιαβιβαστών είτε ως νευροτροποιητών.

2.5. Είδη Νευροδιαβιβαστικών Ουσιών και Ιδιότητες

Στο κεντρικό νευρικό σύστημα υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός ουσιών (>100) οι οποίες απελευθερώνονται από ένα νευρικό κύτταρο και επηρεάζουν τη δραστηριότητα ενός άλλου κυττάρου (Brownlee & Fairweather, 1999). Οι διαβιβαστές αυτοί συμμετέχουν

στις εξαιρετικά απαιτητικές και πολύπλοκες υπολογιστικές λειτουργίες των νευρωνικών δικτύων του εγκεφάλου. Ο μεγάλος αριθμός των νευροδιαβιβαστών κατηγοριοποιείται από χημική άποψη σε λίγες ομάδες. Πολλοί από τους λεγόμενους μείζονες νευροδιαβιβαστές ανήκουν στην ομάδα των αμινοξέων, όπως είναι το γλουταμικό, το γ-αμινοβουτυρικό (GABA) και η γλυκίνη, στις μονοαμίνες, όπως είναι η ντοπαμίνη, η νοραδρεναλίνη και η σεροτονίνη, και στα νευροπεπτίδια, όπως είναι η εγκεφαλίνη και η ενδορφίνη. Στους μείζονες νευροδιαβιβαστές ανήκει, βέβαια, και η ακετυλοχολίνη. Επίσης είναι γνωστό ότι τα αμινοξέα συμμετέχουν και σε άλλες κυτταρικές λειτουργίες, όπως στον μεταβολισμό και στη σύνθεση των πρωτεϊνών. Οι μονοαμίνες συντίθενται από τα αμινοξέα με απομάκρυνση της καρβοξυλικής ομάδας. Πολλοί νευροδιαβιβαστές συντίθενται στην απόληξη και συσκευάζονται εντός των συναπτικών κυστιδίων, ενώ άλλοι συντίθενται στο σώμα και μεταφέρονται μέσω της αξοπλασματικής ροής στην απόληξη. Οι μικρομοριακοί νευροδιαβιβαστές, όπως η ακετυλοχολίνη, συντίθενται στην απόληξη από ένζυμα τα οποία έχουν συντεθεί στο σώμα και έχουν μεταφερθεί στην απόληξη. Στη σύνθεση του διαβιβαστή χρησιμοποιούνται πρόδρομα μόρια, τα οποία προσλαμβάνονται εντός της απόληξης μέσω μεταφορέων.

Μετά την απελευθέρωσή του, ο νευροδιαβιβαστής είτε αποικοδομείται ενζυματικά, είτε μεταφέρεται εντός της απόληξης από ειδικούς μεταφορείς, ώστε να συσσωρευθεί στα συναπτικά κυστίδια. Οι πεπτιδικοί νευροδιαβιβαστές συντίθενται στο σώμα και μπορούν να υποστούν διαδοχικά στάδια ενζυματικής επεξεργασίας μέχρι να φτάσουν στην τελική ενεργή μορφή τους.

Παραδοσιακά, οι νευροδιαβιβαστικές ουσίες διακρίνονται στους λεγόμενους «κλασικούς» και «μη κλασικούς» νευροδιαβιβαστές. Κλασικοί θεωρούνται γενικά μικρομοριακοί νευροδιαβιβαστές που ανακαλύφθηκαν πρώτοι, πριν από τις άλλες ομάδες, και σε αυτούς ανήκουν η ακετυλοχολίνη, οι βιογενείς αμίνες και οι αμινοξικοί νευροδιαβιβαστές. Οι ίδιοι αυτοί μικρομοριακοί κλασικοί νευροδιαβιβαστές μπορούν να θεωρηθούν ως εξελικτικώς και ομοιοστατικώς «συντηρητικά» μόρια, αφού απαντώνται και σε πολύ απλούς οργανισμούς. Επίσης, οι κλασικοί νευροδιαβιβαστές συντίθενται ενζυματικά στην απόληξη και μετά την απελευθέρωσή τους από την απόληξη επαναπροσλαμβάνονται εντός αυτής από ειδικούς μεταφορείς.

Από την άλλη πλευρά, μη κλασικοί θεωρούνται οι διαβιβαστές, όπως είναι τα νευροπεπτίδια, ουσίες που ανακαλύφθηκαν σχετικά πιο πρόσφατα οι οποίες έχουν νευροδιαβιβαστική δράση, που αντίθετα με τους κλασικούς νευροδιαβιβαστές συνήθως δεν συντίθενται στην απόληξη αλλά στο σώμα από ένα πρόδρομο πρωτεϊνικό μόριο και δεν υπάρχει μεταφορέας επαναπρόσληψης στην απόληξη για τις ουσίες αυτές. Επίσης, ορισμένοι από τους μη κλασικούς νευροδιαβιβαστές μπορεί να προέρχονται από άλλες περιοχές στον εγκέφαλο από αυτή στην οποία δρουν, ή ακόμα και από άλλους ιστούς στο σώμα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, το σήμα για την απελευθέρωση μιας τέτοιας ουσίας είναι το ίδιο με αυτό για τη σύνθεσή της, με αποτέλεσμα ο ρυθμός απελευθέρωσης της ουσία αυτής και δράσης της στους στόχους να ακολουθεί τον ρυθμό σύνθεσής της. Πρόσφατα βρέθηκαν κάποιες νευροδιαβιβαστικές ουσίες οι οποίες δεν τηρούν ορισμένα από τα κριτήρια που διαμορφώθηκαν για τους κλασικούς νευροδιαβιβαστές. Τέτοιες ουσίες μπορεί να είναι αέρια, όπως το οξείδιο του αζώτου (NO) και το μονοξείδιο του άνθρακα (CO), αλλά και ενώσεις όπως είναι οι αναπτυξιακοί παράγοντες οι οποίες συμμετέχουν και σε άλλες κυτταρικές διεργασίες, όπως είναι η ανάπτυξη του νευρικού συστήματος και η ενδοκυτταρική διακίνηση των πρωτεϊνών.

Ένα κριτήριο διάκρισης των διαβιβαστών μεταξύ τους βασίζεται στο ποιοτικό αποτέλεσμα της δράσης τους επί της ηλεκτρικής κατάστασης της μετασυναπτικής μεμβράνης και της ηλεκτρικής δραστηριότητας του μετασυναπτικού κυττάρου. Δηλαδή, κατά πόσο εκπολώνουν ή υπερπολώνουν τη μεμβράνη και διεγείρουν ή αναστέλλουν το κύτταρο. Έτσι, αναφερόμαστε σε διεγερτικούς και ανασταλτικούς διαβιβαστές, όπως είναι αντίστοιχα το γλουταμικό και το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) (Anwy1, 1999). Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι το κατά πόσο ένας διαβιβαστής θα προκαλέσει εκπόλωση ή υπερπόλωση εξαρτάται από τον συγκεκριμένο υποδοχέα που ενεργοποιεί. Γενικά, ένας νευροδιαβιβαστής δρώντας μέσω των ιονοτροπικών του υποδοχέων προκαλεί αποκλειστικά εκπόλωση ή υπερπόλωση, αφού η επιλεκτικότητα σε ιόντα των διαύλων των υποδοχέων αυτών είναι δεδομένη. Όμως, οι δράσεις ενός διαβιβαστή μέσω συζευγμένων με πρωτεΐνες G (μεταβοτροπικών) υποδοχέων (θα αναλυθεί στη συνέχεια) μπορούν να διαφέρουν ανάλογα τον υποδοχέα που ενεργοποιείται, και ο διαβιβαστής μπορεί σε μία περίπτωση να προκαλεί εκπόλωση, ενώ σε άλλη υπερπόλωση. Αυτό συμβαίνει, γιατί διαφορετικοί τύποι συζευγμένων με πρωτεΐνες G υποδοχείς ενός νευροδιαβιβαστή, συνδέονται με

διαφορετικά σηματοδοτικά ενδοκυττάρια μόρια που επιδρούν σε διαφορετικούς τύπους ιοντικών διαύλων ή ρυθμίζουν έναν τύπο διαύλου. Υπάρχει, επίσης, και η περίπτωση ένας συγκεκριμένα συζευγμένος με πρωτεΐνη G υποδοχέας να συνδέεται με διαφορετικές πρωτεΐνες G σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων, και κατά συνέπεια να εξασκεί διαφορετική επίδραση στα μετασυναπτικά κύτταρα, αναλόγως του τύπου του κυττάρου.

2.6. Κριτήρια Καθορισμού Ουσίας ως Νευροδιαβιβαστή

Για να μπορέσει να θεωρηθεί μια ένωση ότι είναι νευροδιαβιβαστής, θα πρέπει να ικανοποιεί ορισμένα κριτήρια, τα οποία είναι:

1. Κριτήριο *εμφάνισης* της ουσίας. Η προτεινόμενη ως νευροδιαβιβαστής ένωση θα πρέπει να υπάρχει στο κεντρικό νευρικό σύστημα και επίσης πρέπει να είναι αισθητή η παρουσία της στη θεωρούμενη περιοχή δράσης. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό το προσυναπτικό κύτταρο να περιέχει την προτεινόμενη ουσία καθώς και να μπορεί να επιτελέσει τον βιοχημικό μηχανισμό σύνθεσής της.
2. Κριτήριο *απελευθέρωσης* της ουσίας. Η ουσία θα πρέπει να απελευθερώνεται από την αξονική απόληξη μετά από διέγερση του νευρώνα και η απελευθέρωση θα πρέπει να εξαρτάται από την ποσότητα του εκλυόμενου ασβεστίου.
3. Κριτήριο *ύπαρξης ειδικής πρόσδεσης*. Θα πρέπει, να υπάρχουν υποδοχείς στο μετασυναπτικό κύτταρο στους οποίους η ουσία θα προσδέεται ειδικά.
4. Κριτήριο *δράσης αγωνιστή*. Απουθείας εφαρμογή της υποψήφιας ουσίας ή μιας ουσίας η οποία δρα ως αγωνιστής στους υποδοχείς της ουσίας, θα πρέπει να έχει τις ίδιες επιδράσεις στο μετασυναπτικό κύτταρο, όπως αυτές που προκύπτουν μετά από διέγερση του προσυναπτικού κυττάρου.
5. Κριτήριο *δράσης ανταγωνιστή*. Εφαρμογή ενός φαρμακολογικού παράγοντα, ο οποίος δρα ανταγωνιστικά στους υποδοχείς της προτεινόμενης ως νευροδιαβιβαστή ένωσης, θα πρέπει να αποκλείει τη δράση τόσο της προτεινόμενης ουσίας όσο και το αποτέλεσμα της διέγερσης του προσυναπτικού νευρώνα.
6. Κριτήριο *μηχανισμού απενεργοποίησης*. Τέλος, θα πρέπει να υπάρχει ένας μηχανισμός τερματισμού δράσης της ουσίας.

Σε γενικές γραμμές, ουσίες που ικανοποιούν τα πιο πάνω κριτήρια είναι βέβαιο ότι δρουν ως νευροδιαβιβαστές. Επειδή είναι πρακτικά ιδιαίτερα δύσκολο να εξακριβωθούν όλα τα κριτήρια, πολλές ουσίες που φαίνεται να έχουν διαβιβαστική δράση στις συνάψεις αναφέρονται ως υποψήφιοι νευροδιαβιβαστές.

2.7. Νευροδιαβιβαστές και Νευροτροποποιητές

Οι ενώσεις που έχουν ρόλο διαβιβαστή στις συνάψεις ανήκουν είτε στην ομάδα των νευροδιαβιβαστών είτε στην ομάδα των νευροτροποποιητών. Τα κριτήρια που χρησιμοποιούνται για τη διάκριση μεταξύ νευροδιαβιβαστή και νευροτροποποιητή περιλαμβάνουν την ταχύτητα δράσης της ένωσης και το αποτέλεσμα της μεταγωγής του σήματος της νευρωνικής επικοινωνίας. Έτσι, νευροδιαβιβαστής θεωρείται συνήθως μια ουσία που μεταδίδει με ταχύτατο τρόπο την πληροφορία μεταξύ ενός και ενός άλλου νευρικού κυττάρου δρώντας μέσω ιονοτροπικών υποδοχέων, οι οποίοι επιτρέπουν την ταχύτατη διέλευση ιόντων μεταξύ των δύο πλευρών της πλασματικής μεμβράνης και συνεπώς την ταχύτατη ανάπτυξη μετασυναπτικών δυναμικών τα οποία έχουν μικρή διάρκεια (συνήθως λίγες δεκάδες χιλιοστών του δευτερολέπτου: 10 x ms). Αντίστοιχα, μια ουσία είναι νευροτροποποιητής, όταν δεν δρα άμεσα στην κατάσταση ενός μετασυναπτικού κυττάρου, αλλά ουσιαστικά τροποποιεί τη δράση ενός άλλου νευροδιαβιβαστή με το να αυξάνει, να μειώνει ή να επιμηκύνει την αποτελεσματικότητά του. Επίσης, οι νευροτροποποιητές δεν δρουν απαραίτητως μόνο στην αμέσως μετασυναπτική περιοχή από το σημείο απελευθέρωσής τους, αλλά να διαχέονται σε μεγαλύτερες αποστάσεις κάτι που τους δίνει την δυνατότητα να δρουν σε πιο απομακρυσμένα κύτταρα (Branco et al., 2010). Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται «μαζική διαβίβαση» («volume transmission») (Zoli et al., 1999).

Βέβαια, πρέπει να σημειωθεί ότι ο διαχωρισμός μεταξύ νευροδιαβιβαστών και νευροτροποποιητών είναι λεπτός και όχι απόλυτα σαφής. Για παράδειγμα, μια ουσία μπορεί ορισμένες φορές να δρα εντός της σύναψης στην οποία απελευθερώνεται, αλλά σε άλλες περιπτώσεις μπορεί να δρα και σε πιο απομακρυσμένες περιοχές. Επίσης, ένας νευροδιαβιβαστής μπορεί να έχει ταχύτατη και αμφιμονοσήμαντη δράση μέσω ενός τύπου μετασυναπτικού υποδοχέα, ενώ μπορεί να ασκεί πιο βραδεία και διάχυτη δράση μέσω άλλου τύπου υποδοχέα. Ένας νευροτροποποιητής συνήθως δρα μέσω μεταβολοτροπικού (μεταβολοτρόπου) υποδοχέα, που αλληλοεπιδρά δηλαδή με G

πρωτεΐνη, προκαλώντας μετασυναπτικά δυναμικά αργής χρονικής εξέλιξης, με αργή δηλαδή ανάπτυξη και διάρκεια, τάξεις μεγέθους μεγαλύτερες από αυτή των ταχέως μετασυναπτικών δυναμικών. Επίσης, οι νευροτροποποιητές όταν απελευθερωθούν από έναν νευρώνα μπορούν να διαχέονται σε αποστάσεις μεγαλύτερες από αυτήν της συναπτικής σχισμής και να επηρεάζουν περισσότερα κύτταρα, δηλαδή η επικοινωνία είναι μεταξύ ενός και πολλών κυττάρων. Με τον τρόπο αυτό τα κύτταρα που απελευθερώνουν νευροτροποποιητές επηρεάζουν έναν σχετικά μεγάλο πληθυσμό άλλων νευρικών κυττάρων για σχετικά μεγάλο διάστημα, διαμορφώνοντας έμμεσα (αφού δρουν μέσω G πρωτεΐνες) την ηλεκτρική τους δραστηριότητα και ρυθμίζοντας τη διεγερσιμότητα των κυττάρων στόχων τους. Η επίδραση των νευροτροποποιητών επί της ηλεκτρικής κατάστασης της μεμβράνης επηρεάζεται από τη δράση των ενδοκυττάρων μηνυματοφόρων μορίων (που ενεργοποιούνται από τις G πρωτεΐνες και αποτελούν μέρος του λεγόμενου καταρράκτη μεταγωγής σήματος) επάνω στους μεμβρανικούς διαύλους οι οποίοι απαντώνται στην ευρύτερη περιοχή της κυτταρικής μεμβράνης. Επίσης, οι νευροτροποποιητές μεταβάλλουν, τροποποιούν τις ενδογενείς ιδιότητες των κυττάρων μέσω της επαγωγής ενδοκυττάρων καταρρακτών μεταγωγής σήματος και επηρεάζοντας π.χ. τη δραστηριότητα ποικίλων πρωτεϊνοκινασών. Συνεπώς, οι νευροτροποποιητές έχουν πολύ σημαντική δράση στους νευρώνες, αφού μπορούν να ρυθμίσουν ποικιλοτρόπως την υπολογιστική επεξεργασία της εισερχόμενης πληροφορίας του νευρικού κυττάρου, ενισχύοντας, μειώνοντας ή και αλλάζοντας το δυναμικό της επιφανείας του το οποίο με σειρά μεταβάλλει το τρόπο δράση του κυττάρου.

2.8. Πολλαπλότητα Νευροδιαβιβαστών

Η ύπαρξη μεγάλου αριθμού νευροδιαβιβαστικών ουσιών μπορεί να οφείλεται σε διάφορους λόγους και να εξυπηρετεί διακριτές οργανωτικές και λειτουργικές ανάγκες του νευρικού συστήματος. Ένα βασικό στοιχείο στην οργάνωση του εγκεφάλου είναι ότι σε έναν νευρώνα καταλήγουν πολλές απολήξεις άλλων νευρικών κυττάρων. Αυτό σημαίνει ότι ο νευρώνας δεν επικοινωνεί αποκλειστικά και μόνο με ένα κύτταρο αλλά με πολλά ταυτόχρονα, δημιουργώντας έτσι την ανάγκη να μπορεί να διακρίνει και να «κατανοήσει» την κάθε πληροφορία που δέχεται ξεχωριστά. Παρ' ότι η διαφορετική πληροφοριακή σηματοδότηση πραγματοποιείται κυρίως μέσω του σχετικά ειδικού εντοπισμού των διάφορων εισόδων σε συγκεκριμένα τμήματα της μεμβράνης του

νευρώνα (π.χ. διεγερτικές εισόδοι κυρίως στους δενδρίτες και ανασταλτικές στο σώμα), έχει φανεί ότι πολλές διαφορετικές εισόδοι μπορούν να συνυπάρχουν στον ίδιο μεμβρανικό χώρο. Έτσι, η χημική κωδικοποίηση, μέσω της χρήσης διαφορετικών νευροδιαβιβαστών στις διαφορετικές εισόδους και της ύπαρξης αντίστοιχων υποδοχέων στον (μετασυναπτικό) νευρώνα, είναι ένας αποτελεσματικός μηχανισμός για διάκριση των εισόδων από έναν νευρώνα. Ένας άλλος τρόπος/μηχανισμός, μέσω του οποίου δημιουργείται λειτουργική «πολυφωνία» στις εισόδους σε έναν νευρώνα αλλά και γενικότερα στα νευρωνικά δίκτυα, είναι ο συνεντοπισμός, η ύπαρξη δηλαδή δύο ή περισσότερων διαβιβαστών στον ίδιο νευρώνα. Είναι γεγονός ότι μόλις λίγιοι τύποι νευρικών κυττάρων φαίνεται να έχουν μόνον έναν διαβιβαστή, ενώ σε πολλούς άλλους υπάρχουν τρεις ή ακόμα και τέσσερις διαβιβαστές. Είναι πιθανό ότι η πολλαπλότητα νευροδιαβιβαστών σε έναν νευρώνα να χρησιμοποιείται, για να ενεργοποιήσει διαφορετικές λειτουργικές καταστάσεις στο μετασυναπτικό κύτταρο που αποτελεί τον στόχο. Επίσης, υπάρχει η περίπτωση να χρησιμοποιούνται διαφορετικοί διαβιβαστές σε διαφορετικές απολήξεις του ίδιου νευρώνα, όπως και επίσης ένας νευρώνας μπορεί να επικοινωνεί με άλλους νευρώνες τόσο μέσω συναπτικών συνδέσεων όσο και μέσω μη συναπτικών διαμορφώσεων που επιτρέπουν πιο διάχυτη, «μαζική» επικοινωνία.

2.9. Κλασσικοί Νευροδιαβιβαστές

Όπως αναφέρθηκε οι νευροδιαβιβαστές είναι μια οικογένεια πολυάριθμων ενώσεων η οποία με την πάροδο του χρόνου όλο και μεγαλώνει. Παρόλα αυτά υπάρχει μια μικρή ομάδα νευροδιαβιβαστών στην οποία συμπεριλαμβάνονται γενικά μικρομοριακές ενώσεις που ανακαλύφθηκαν πρώτες, πριν από τις άλλες ομάδες, και σε αυτές ανήκουν οι πιο κλασσικοί νευροδιαβιβαστές όπως είναι η ακετυλοχολίνη, οι βιογενείς αμίνες και οι αμινοξικοί νευροδιαβιβαστές. (Veca & Dreisbach, 1988) (Feher, 2012)

Βιογενείς αμίνες (ντοπαμίνη, νοροπινεφρίνη και σεροτονίνη)

Οι χημικοί νευροδιαβιβαστές που ανήκουν στην κατηγορία των βιογενών αμινών έχουν πολλές βιοχημικές ομοιότητες. Είναι όλες μικρά μόρια που σχηματίζονται σε σχετικώς βραχείες βιοσυνθετικές οδούς από πρόδρομα μόρια που προκύπτουν από τον ενδιάμεσο μεταβολισμό βασικών υδατανθρακικών υποστρωμάτων. Η σύνθεση αυτών

των νευροδιαβιβαστών καταλύεται από ένζυμα, τα οποία σχεδόν χωρίς εξαίρεση είναι κυτταροπλασματικά, με το περιοριστικό ένζυμο να είναι συχνά χαρακτηριστικό ενός τύπου νευρώνα αφού συνήθως απουσιάζει από άλλους τύπους νευρώνων.

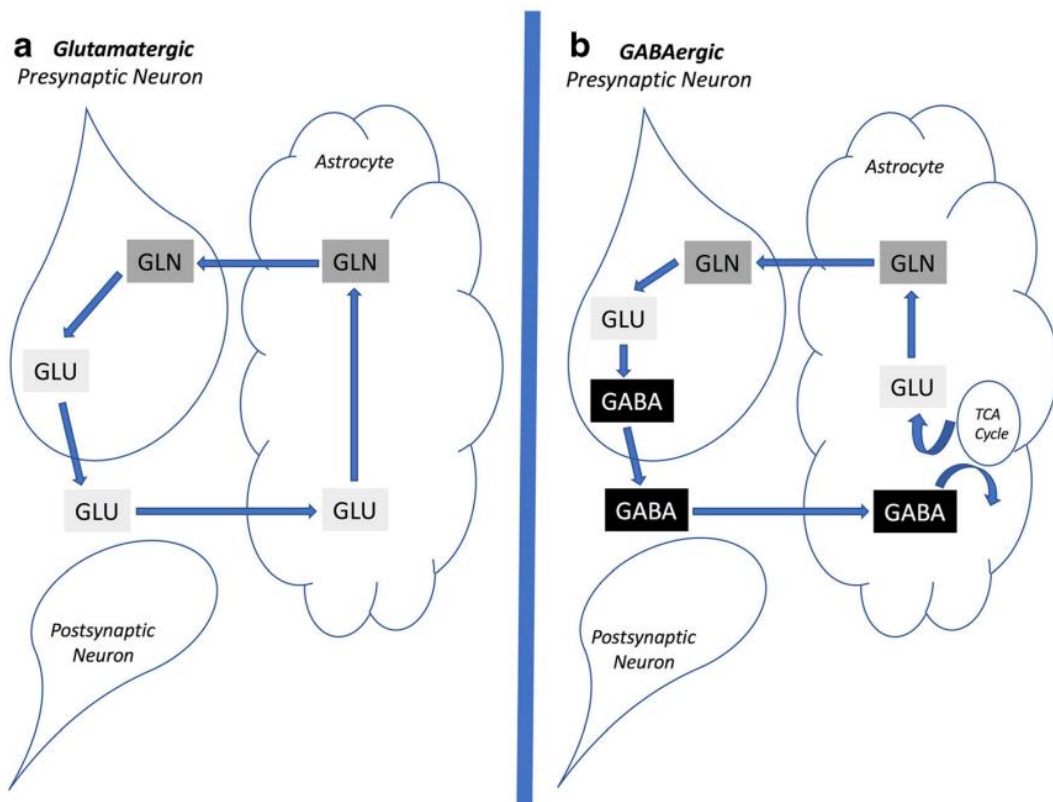
Η ντοπαμίνη και η νοροπινεφρίνη είναι παράγωγα του αμινοξέους τυροσίνη και ανήκουν στην ομάδα των κατεχολαμινών. Η τυροσίνη με τη δράση της υδροξυλάσης της τυροσίνης σχηματίζει την L-DOPA, η οποία με τη δράση μιας αποκαρβοξυλάσης μετατρέπεται σε ντοπαμίνη. Κατόπιν, με την υδροξυλάση β της ντοπαμίνης, η ντοπαμίνη μετατρέπεται σε νοραδρεναλίνη ή νορεπινεφρίνη.

Η σεροτονίνη είναι ένας νευροδιαβιβαστής που παράγεται από την τρυπτοφάνη με τη δράση του ενζύμου υδροξυλάση της τρυπτοφάνης.

Αμινοξέα νευροδιαβιβαστές

Ενώ η ακετυλοχολίνη και οι βιογενείς αμίνες δεν είναι ενδιάμεσα προϊόντα γενικών βιοχημικών οδών και παράγονται σε ορισμένους μόνο νευρώνες, τα αμινοξέα που λειτουργούν ως νευροδιαβιβαστές βρίσκονται σε όλα τα κύτταρα, αφού μπορούν να συντίθενται στους νευρώνες και κανένα από αυτά δεν είναι βασικό αμινοξύ. Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται αμινοξέα όπως το γλουταμικό οξύ η γλυκίνη καθώς επίσης και ενώσεις όπως είναι το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA).

Το γλουταμικό οξύ, ο νευροδιαβιβαστής που απαντάται συχνότερα σε ολόκληρο το νευρικό σύστημα, παράγεται από το α-κετογλουταρικό οξύ, ένα ενδιάμεσο προϊόν στον τρικαρβοξυλικό κύκλο του ενδιάμεσου μεταβολισμού. Αφού απελευθερωθεί, το γλουταμικό οξύ προσλαμβάνεται τόσο από νευρώνες όσο και από τη νευρογλοία. Το γλουταμικό που προσλαμβάνεται από αστροκύτταρα μετατρέπεται σε γλουταμίνη από το ένζυμο συνθετάση της γλουταμίνης. Στη συνέχεια η γλουταμίνη διαχέεται προς τα πίσω στους νευρώνες, που χρησιμοποιούν το γλουταμικό ως νευροδιαβιβαστή. Το γλουταμικό οξύ είναι ο βασικός διεγερτικός νευροδιαβιβαστής στον εγκεφαλικό φλοιό και στον υπόκαμπο, καθώς η δράση του προκαλεί εκπόλωση των νευρώνων. Το γλουταμικό είναι διεγερτικός διαβιβαστής στους ιοντοτρόπους υποδοχείς και τροποποιητικός στους μεταβοτροπικούς υποδοχείς (θα αναλυθούν στην πορεία).



Εικόνα 2.9.1.: Σχηματική αναπαράσταση στην οποία φαίνεται απλοποιημένα ο κύκλος του Γλουταμικού(GLU)-GABA-Γλουταμίνης(GLN) α) στους γλουταμινεργικούς και β) στους GABAεργικούς νευρώνες. Με τον όρο TCA εννοείται ο κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέους ή κύκλος του Krebs. (Nikolaos Kokras et al., 2020)

Η γλυκίνη είναι ο κύριος νευροδιαβιβαστής στους ανασταλτικούς διαμέσους νευρώνες του νωτιαίου μυελού και συντίθεται από τη σερίνη.

Το αμινοξύ γ-αμινοβουτυρικό οξύ συντίθεται από το γλουταμικό, σε μια αντίδραση που καταλύεται από την αποκαρβοξυλάση του γλουταμινικού οξέος. Βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε ολόκληρο το κεντρικό νευρικό σύστημα και είναι ο βασικός ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής στον εγκέφαλο. Η δράση του έχει ως αποτέλεσμα την υπερπόλωση των νευρικών κυττάρων και εκλύεται από διάμεσους νευρώνες στον εγκεφαλικό φλοιό, στον ιπόκαμπο, στο νωτιαίο μυελό και σε άλλες περιοχές του νευρικού συστήματος, όπως από τους νευρώνες των βασικών γαγγλίων και από τα κύτταρα Purkinjee της παρεγκεφαλίδας.

Χημικά η b-αλανίνη θα μπορούσε να θεωρεί μια ενδιάμεση μορφή ανάμεσα στα α-αμινοξέα (γλυκίνη, γλουταμικό οξύ). Αν και είναι ένας νευροδιαβιβαστής ο οποίος δεν απαντάται τόσο συχνά όπως το GABA ή το γλουταμικό η δράση του δεν μπορεί να θεωρηθεί αμελητέα. Βρίσκεται σε όλο το ΚΝΣ και είναι γνωστό ότι απελευθερώνεται μετά από ηλεκτρική διέγερση των νευρώνων. Έχουν καταγραφεί τουλάχιστον 5 διαφορετικοί υποδοχείς με τους οποίους μπορεί να συνδεθεί (2 υποδοχείς τύπου γλυκίνης και 3 υποδοχείς τύπου GABA). Όπως και στην περίπτωση της γλυκίνης και του GABA ο νευροδιαβιβαστής αυτός έχει ανασταλτική δράση για το ΚΝΣ, αφού αναστέλλει την νευρωνική διέγερση. (Tiedje et al., 2010)

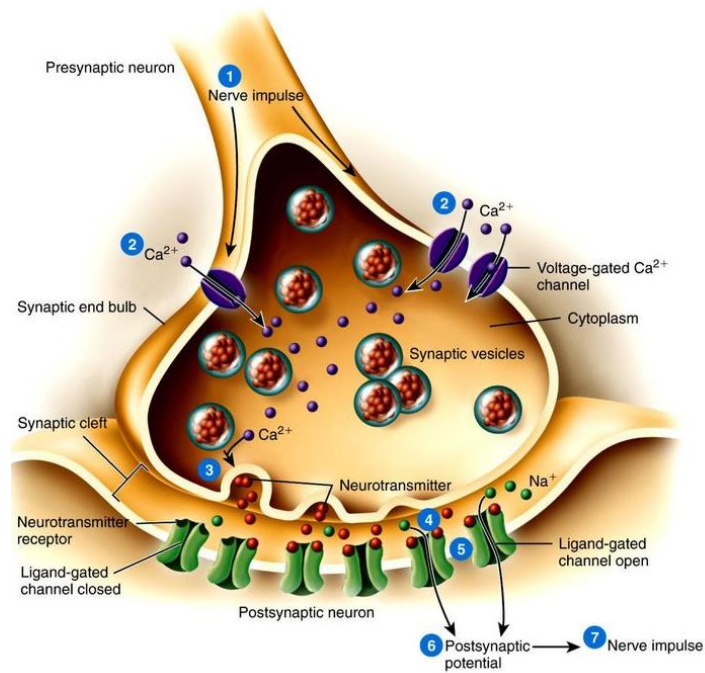
Η ταυρίνη συμβάλλει στη ρύθμιση του όγκου των νευρικών κυττάρων και των αστροκυττάρων μέσω διαφόρων μηχανισμών ώσμωσης. Μέσω αυτών των μηχανισμών μπορεί και μειώνει τη διέγερση των νευρώνων και με αυτόν τον τρόπο αντισταθμίζεται η υπερβολική ενεργοποίηση διεγερτικών στοιχείων. Τέλος έχει παρατηρηθεί ότι έχει την ικανότητα να συνδέεται τόσο με υποδοχείς τύπου GABA όσο και με υποδοχείς τύπου γλυκίνης, προσδίδοντάς της έτσι την δυνατότητα να δρα ανασταλτικά στην μεταγωγή του σήματος. (Oja & Saransaari, 2017)

Ακετυλοχολίνη

Η ακετυλοχολίνη συντίθεται από την χολίνη και το ακέτυλοσυνένζυμο Α με τη βοήθεια του ενζύμου της χολινακετυλοτρανσφεράσης. Η ακετυλοχολίνη εκλύεται από νευρώνες του αυτόνομου νευρικού συστήματος, από τους κινητικούς νευρώνες στη νευρομυϊκή σύναψη, από διάμεσους νευρώνες των βασικών γαγγλίων, και από νευρώνες του βασικού πυρήνα. Μετά την έκλυσή της, η ακετυλοχολίνη αποδομείται από ένα ένζυμο, τη χολινεστεράση.

2.10. Έκλυση του νευροδιαβιβαστή

Όλοι οι νευροδιαβιβαστές πριν την έκκλησή τους αποθηκεύονται σε κυστίδια στα τερματικά του άξονα του νευρώνα που τους εκλύει. Υπάρχουν εξειδικευμένες πρωτεΐνες που επιτρέπουν τη μεταφορά των νευροδιαβιβαστών στα κυστίδια. Αυτές είναι: (Feher, 2012)



Εικόνα 2.10.1.: Σχηματική απεικόνιση νευρική σύναψης όπου παρατηρείται η απελευθέρωση κυστιδίων τα οποία περιέχουν μέσα τους νευροδιαβιβαστές, μετά την έκλυση δυναμικού ενέργειας. (Berg et al., 2002)

- 1) vAChT (vesicular acetylcholine transporter), μεταφορέας ακετυλοχολίνης σε κυστίδια
- 2) VGAT (vesicular GABA transporter), μεταφορέας GABA σε κυστίδια
- 3) vGluT (vesicular glutamate transporter), μεταφορέας του γλουταμικού οξέος στα κυστίδια
- 4) VMAT, μεταφορέας μονοαμινών

Για την επιτυχή έκλυση νευροδιαβιβαστή, απαιτείται η έκλυση δυναμικού ενεργείας από το προσυναπτικό κύτταρο. Το δυναμικό ενεργείας προκαλεί την ενεργοποίηση διαύλων ασβεστίου και την αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου. Το μέγεθος του εισερχόμενου ρεύματος ασβεστίου επηρεάζει την ποσότητα νευροδιαβιβαστή που θα εκλυθεί και κατ' επέκταση το μέγεθος του μετασυναπτικού δυναμικού.

Ο νευροδιαβιβαστής είναι αποθηκευμένος σε κυστίδια, τα οποία βρίσκονται είτε κοντά στην μεμβράνη του τερματικού του άξονα, είτε προσδεμένα πάνω στον κυτταροσκελετό, σε ινίδια κυτταροσκελετού. Το ασβέστιο που εισέρχεται στο

κυτταρόπλασμα προσδένεται σε εξειδικευμένες πρωτεΐνες, όπως η καλμοδουλίνη. Αυτό το σύμπλεγμα ενεργοποιεί μια κινάση η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση μιας πρωτεΐνης, της συναψίνης. Η φωσφορυλίωση της συναψίνης επιτρέπει την απελευθέρωση των κυστιδίων από τον κυτταροσκελετό, και την προσέγγισή τους στην μεμβράνη. Για την ένωση της μεμβράνης του κυστιδίου με την κυτταροπλασματική μεμβράνη κινητοποιούνται διάφορες πρωτεΐνες, όπως οι συνταξίνες, συναπτοφυσίνες και πρωτεΐνες-υποδοχείς των πρωτεϊνών SNAP (soluble NSF attachment protein) (SNARE πρωτεΐνες). Η αλληλεπίδραση αυτών των πρωτεϊνών είναι αυτή που θα επιτρέψει στο κυστίδιο να αγκυροβοληθεί στη συναπτική μεμβράνη. Κατόπιν, συγκεκριμένες πρωτεΐνες σχηματίζουν πόρους συγχώνευσης των δύο μεμβρανών (δηλ. του κυστιδίου και του κυττάρου), ώστε να γίνει η ένωση των δυο μεμβρανών και η απελευθέρωση του νευροδιαβιβαστή στο εξωκυττάριο περιβάλλον.

2.11. Υποδοχείς Νευροδιαβιβαστών - Νευροτροποποιητών

Οι υποδοχείς νευροδιαβιβαστών χωρίζονται σε 3 βασικές κατηγορίες, ανάλογα με τον τρόπο λειτουργίας του υποδοχέα: (González-Espinosa & Guzmán-Mejía, 2014)

- μπορεί να είναι διάλυτοι ιόντων,
- να προσδένονται σε G πρωτεΐνες,
- να έχουν δράση κινάσης της τυροσίνης.

Ανεξάρτητα από τον τρόπο λειτουργίας των υποδοχέων, το τελικό αποτέλεσμα είναι η αλλαγή στο δυναμικό της μεμβράνης του κυττάρου. Οι υποδοχείς που είναι διάλυτοι ιόντων επηρεάζουν άμεσα το δυναμικό της μεμβράνης. Οι υποδοχείς που προσδένονται σε G πρωτεΐνες προκαλούν την ενεργοποίηση ενός ενδοκυττάρου καταρράκτη μέσω του οποίου επηρεάζεται η λειτουργία των διαύλων ιόντων και έτσι να προκαλείται αλλαγή στο δυναμικό της μεμβράνης του μετασυναπτικού κυττάρου, η οποία ονομάζεται μετασυναπτικό δυναμικό.

Το μετασυναπτικό δυναμικό είναι βαθμιδωτό, δηλαδή όσο μεγαλύτερη ποσότητα νευροδιαβιβαστή εκλύεται ή όσο περισσότεροι υποδοχείς υπάρχουν στο μετασυναπτικό κύτταρο, τόσο μεγαλύτερο είναι το μετασυναπτικό δυναμικό. Αν η

δράση των υποδοχέων του νευροδιαβιβαστή έχει ως αποτέλεσμα την καθαρή εισροή θετικών ιόντων, τότε το μετασυναπτικό δυναμικό προκαλεί μια θετική αλλαγή στο δυναμικό της μεμβράνης. Ο νευροδιαβιβαστής και ο υποδοχέας που προκαλούν μια θετική αλλαγή στο δυναμικό της μεμβράνης ονομάζεται διεγερτικός γιατί φέρνει το δυναμικό του μετασυναπτικού κυττάρου στην ουδό για την έκλυση δυναμικού ενεργείας. Κάθε νευροδιαβιβαστής μπορεί να προσδεθεί σε πολλούς υποδοχείς (Πίνακας 2.11.1.)

Πίνακας 2.11.1.: Οι υποδοχείς των νευροδιαβιβαστών

Νευροδιαβιβαστής	Υποδοχείς (ιοντικοί δίαυλοι)	Υποδοχείς που προσδέονται σε G πρωτεΐνες
Ακετυλοχολίνη	Νικοτινικός	Μουσκαρινικός
Ντοπαμίνη	Δ/Υ	D1, D2, D3, D4, D5
Νοραδρεναλίνη	Δ/Υ	α1, α2, β1, β2
Σεροτονίνη	5-HT3	5-HT2-A, B
Γλουταμικό οξύ	AMPA, NMDA, kainite	Μεταβοτροπικοί υποδοχείς (mGluR1-8)
GABA	GABA-A	GABA-B

Με την σύνθεση του νευροδιαβιβαστή ο υποδοχέας αλλάζει την στερεοχημική του δομή. Αυτή η αλλαγή είναι που ενεργοποιεί τον υποδοχέα, ο οποίος με την σειρά του αποστέλλει ένα σήμα εντός του κυττάρου. Το σήμα αυτό μπορεί να οδηγεί είτε στο άνοιγμα ενός διαύλου και τη δίοδο ρεύματος δια μέσου του διαύλου, είτε στην ενεργοποίηση μιας πρωτεΐνης G, με την οποία ο υποδοχέας βρίσκεται συνδεδεμένος στην ενδοκυττάρια πλευρά του. Σε ορισμένες περιπτώσεις ο υποδοχέας μπορεί να έχει ενζυμική δράση ή να είναι συνδεδεμένος με κάποιο ένζυμο. Οι υποδοχείς νευροδιαβιβαστών εντοπίζονται στην περιοχή της μετασυναπτικής μεμβράνης, δηλαδή στη μεμβράνη του μετασυναπτικού κυττάρου απέναντι από την περιοχή της προσυναπτικής απόληξης, απ' όπου απελευθερώνεται ο νευροδιαβιβαστής. Οι υποδοχείς αυτοί καλούνται συναπτικοί υποδοχείς. Μπορούν, επίσης, να βρίσκονται στην ευρύτερη περιοχή της μετασυναπτικής μεμβράνης, η οποία εξαπλώνεται πέραν της στενής περιοχής της συναπτικής σχισμής, δηλαδή έξω από την περιορισμένη περιοχή της σύναψης με τη στενή έννοια, και αυτοί οι υποδοχείς καλούνται εξωσυναπτικοί. Επίσης, υποδοχείς νευροδιαβιβαστών εντοπίζονται και στη μεμβράνη της προσυναπτικής απόληξης, και ο ρόλος τους συνήθως είναι να ρυθμίζουν την

απελευθέρωση του νευροδιαβιβαστή και καλούνται αυτοϋποδοχείς. Οι περισσότεροι υποδοχείς έχουν πολλαπλά σημεία στα οποία δεσμεύονται διαφορετικές ουσίες και τροποποιούν τη δράση του υποδοχέα. Έτσι, εκτός από τη θέση στην οποία προσδένεται/δεσμεύεται, ο νευροδιαβιβαστής, υπάρχουν και άλλες θέσεις επάνω στο πρωτεϊνικό σύμπλοκο που δεσμεύονται άλλες ενδογενείς ουσίες του οργανισμού. Τόσο στις θέσεις δέσμευσης του νευροδιαβιβαστή όσο και στα διαφορετικά σημεία δέσμευσης επάνω στον υποδοχέα, μπορούν να προσδένονται εκτός από τις ενδογενείς ουσίες και άλλες, εξωγενείς φυσικές ουσίες, των οποίων η δράση ποικίλλει και μπορεί να εκτείνεται, από δράση που μιμείται τη δράση του ενδογενούς αγωνιστή-νευροδιαβιβαστή, οπότε αυτές οι ουσίες καλούνται εξωγενείς αγωνιστές, μέχρι τη δράση ως αποκλειστών, δηλαδή ουσιών που αποκλείουν τη φυσιολογική λειτουργία του υποδοχέα. Ένα παράδειγμα εξωγενούς φυσικού αγωνιστή σε υποδοχέα νευροδιαβιβαστή αποτελεί η νικοτίνη, η οποία δρα ως αγωνιστής στον καλούμενο νικοτινικό υποδοχέα της ακετυλοχολίνης, ενώ παράδειγμα φυσικής ουσίας που δρα ως αποκλειστής είναι η πικροτοξίνη η οποία αποκλείει τον διάυλο του ιονοτροπικού υποδοχέα του γ -αμινοβουτυρικού οξέος GABA_A.

Βεβαίως υπάρχουν εξωγενείς (φυσικές ή συνθετικές) ουσίες οι οποίες παρουσιάζουν συγγένεια και δεσμεύονται στο σημείο δέσμευσης της ενδογενούς ένωσης του νευροδιαβιβαστή καταστέλλοντας όμως τη δράση του. Οι ουσίες αυτές καλούνται ανταγωνιστές. Ένα κλασικό παράδειγμα εξωγενούς φυσικού ανταγωνιστή είναι το κουράριο, μια φυσικής προέλευσης ουσία η οποία προσδένεται στη θέση δέσμευσης της ακετυλοχολίνης επάνω στον νικοτινικό της υποδοχέα και την ανταγωνίζεται αποκλείοντας τη δράση της. Επίσης, υπάρχουν εξωγενείς ουσίες οι οποίες μπορούν να μεταβάλλουν τη λειτουργικότητα του υποδοχέα χωρίς να υπάρχει (ή δεν έχει διαπιστωθεί ακόμα) ορισμένο σημείο επάνω στον υποδοχέα στο οποίο να δεσμεύονται. Τέτοια ουσία είναι η αιθυλική αλκοόλη, η οποία ενισχύει τη δράση του ιονοτροπικού υποδοχέα GABA_A. Ακόμα και ένα ιόν μπορεί να δρα τροποποιώντας τη λειτουργικότητα του υποδοχέα. Το πιο διακεκριμένο παράδειγμα συνίσταται στη δράση του ιόντος μαγνησίου (Mg^{2+}), το οποίο κάτω από συνθήκες μεμβρανικού δυναμικού ηρεμίας ή σε πιο αρνητικές τιμές μεμβρανικού δυναμικού (υπερπολωτικά δυναμικά), αποκλείει τη δίοδο άλλων ιόντων δια μέσου του διαύλου του υποδοχέα NMDA του γλουταμικού οξέος. Βεβαίως, υπάρχουν πολλές εξωγενείς ουσίες (εκτός

των ενδογενών) των οποίων η δράση κυμαίνεται μεταξύ της θετικής και αρνητικής αλλοστερικής τροποποίησης. Δηλαδή οι ουσίες αυτές μπορούν να δρουν επάνω στον υποδοχέα σε διαφορετικά σημεία από το σημείο δέσμευσης του νευροδιαβιβαστή, με άλλες να ενισχύουν ενώ άλλες να μειώνουν τη βιολογική του δράση του υποδοχέα, απευθείας ή μεταβάλλοντας τη δράση άλλων μορίων που δρουν πάνω σε αυτόν. Γενικά, οι ουσίες που προάγουν τη δράση του υποδοχέα λέγονται αγωνιστές, ενώ αυτές που την περιορίζουν λέγονται ανταγωνιστές.

Συνήθως, οι υποδοχείς νευροδιαβιβαστών και νευροτροποποιητών σχηματίζουν μακρομοριακά σύμπλοκα με άλλες ενδοκυτταρικές ενώσεις, τα οποία ελέγχουν συγκεκριμένες πτυχές της κυτταρικής κατάστασης και λειτουργίας (Kim & Huganir, n.d.). Εκτός από την κατηγοριοποίηση των υποδοχέων βάσει του εντοπισμού τους στην κυτταρική μεμβράνη (δηλαδή συναπτική, εξωσυναπτική και προσυναπτική) η πιο σημαντική ίσως διαφοροποίηση αφορά τον ρόλο τους στην κυτταρική λειτουργία. Έτσι, όπως αναφέρθηκε οι υποδοχείς διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, του ιονοτροπικούς ή ιονοτρόπους και τους μεταβοτροπικούς ή μεταβολοτρόπους ή υποδοχείς συζευγμένοι με G πρωτεΐνες.

Γενικά η ονοματολογία των υποδοχέων μπορεί να στηρίζεται σε διάφορα κριτήρια. Ένας απλός τρόπος βασίζεται στη χρήση της ουσίας η οποία θεωρείται ως ο κύριος ενδογενής αγωνιστής του υποδοχέα. Έτσι, οι υποδοχείς στους οποίους δεσμεύεται το γλουταμικό οξύ ή η ακετυλοχολίνη καλούνται αντίστοιχα «γλουταματεργικοί» και «χολινεργικοί». Επίσης, επειδή σε αρκετές περιπτώσεις οι υποδοχείς ανακαλύφθηκαν πριν την ανακάλυψη των ενδογενών ουσιών που τους ενεργοποιούν, έχουν λάβει το όνομα από τις εξωγενείς ουσίες με τη βοήθεια των οποίων ταυτοποιήθηκαν οι υποδοχείς αυτοί. Κλασικά παραδείγματα αποτελούν οι υποδοχείς των οπιοειδών και κανναβινοειδών. Κατ' επέκταση, και οι ενδογενείς αγωνιστές των υποδοχέων αυτών πήραν στη συνέχεια το αντίστοιχο όνομα (ενδογενή οπιοειδή, ενδοκανναβινοειδή). Οι υποδοχείς μπορεί να διακρίνονται με απλό αλφαβητικό τρόπο, ακολουθώντας επίσης τη χρονική εξέλιξη της ανακάλυψής τους, όπως οι υποδοχείς του GABA (GABA_A, GABA_B). Η ανάδειξη της ύπαρξης πολλών υποτύπων ενός υποδοχέα, οι οποίοι διαφέρουν στη σύστασή τους από συγκεκριμένες υπομονάδες, μπορεί να ακολουθείται από μια ονοματολογία βάσει της υπομονάδας που παρέχει τις διαφορετικές ιδιότητες σε έναν συγκεκριμένο υπότυπο. Έτσι μπορούν, για παράδειγμα, να διακρίνονται οι διαφορετικοί υπότυποι του υποδοχέα GABA_A σε α1GABA

α 5GABA α 4GABA κ.λπ. Όταν ένας νευροδιαβιβαστής έχει τόσο ιονοτροπικούς όσο και συζευγμένους με πρωτεΐνες G υποδοχείς (μεταβοτροπικούς), οι τελευταίοι μπορεί να σημαίνονται μέσω του προθέματος m, όπως οι τρεις ομάδες μεταβοτροπικών υποδοχέων του γλουταμικού (mGlu I, mGlu II, mGlu III). Γενικά, επειδή η έρευνα και η ανάδειξη διάφορων υποτύπων είναι μια συνεχώς εξελισσόμενη επιστημονική διεργασία, μπορεί η επιμέρους ονοματολογία των υποτύπων ή των ποικιλιών ενός υποδοχέα να αλλάζει σε κάποιο βαθμό με τον χρόνο, ή ακόμα και να χρησιμοποιούνται εναλλακτικοί τρόποι ονομασίας. Η πρόσφατα αναδειχθείσα πολύ μεγάλη ποικιλία υποτύπων υποδοχέων, οι οποίοι συγκροτούνται μέσω του συνδυασμού ενός αριθμού διαφορετικών πρωτεϊνικών υπομονάδων, αποτελεί ένα πολύ σημαντικό στοιχείο στην κατανόηση της πληθώρας και των ρόλων των υποδοχέων των νευροδιαβιβαστών και των νευροτροποποιητών. Με αυτόν τον τρόπο συγκροτούνται υποδοχείς, οι οποίοι είναι υποτύποι ενός συγκεκριμένου είδους υποδοχέα, έχουν διακριτές μεταξύ τους λειτουργικές ιδιότητες και μπορούν να εντοπίζονται στην ίδια περιοχή ή ακόμα και την ίδια σύναψη ή σε διαφορετικές περιοχές. Ένα εμφαντικό παράδειγμα τέτοιας ποικιλίας υποτύπων υποδοχέων, κυρίως λόγω της διαπιστωμένης (ή προτεινόμενης) διαφορετικής εμπλοκής του καθενός υποτύπου σε διαφορετικές εγκεφαλικές διεργασίες, λειτουργίες, και συμπεριφορές, αποτελεί ο υποδοχέας GABA_A. (Fritschy & Panzanelli, 2014) (Möhler, 2009; Olsen & Sieghart, 2009)

2.12. Ιονοτροπικοί Υποδοχείς και Υποδοχείς Συζευγμένοι με G Πρωτεΐνες

Μια βασική διαφοροποίηση μεταξύ των υποδοχέων των διαβιβαστών εκτός της διεγερτικής ή ανασταλτικής δράσης τους στη δραστηριότητα του μετασυναπτικού νευρώνα, που εκφράζεται μέσω αλλαγής της πιθανότητας πυροδότησης, έγκειται στο κατά πόσο ο υποδοχέας επιτρέπει τη διέλευση ιόντων ή όχι. Έτσι, οι υποδοχείς κατηγοριοποιούνται σε δύο μεγάλες ομάδες, τους ιονοτροπικούς, αυτούς δηλαδή που φέρουν ιοντικό διάυλο και επιτρέπουν διαμεμβρανικώς τη μεταφορά ρεύματος με την ενεργοποίησή τους, και στους υποδοχείς οι οποίοι είναι συζευγμένοι με πρωτεΐνες G στο ενδοκυττάριο τμήμα τους και μέσω αυτών των πρωτεϊνών εξασκούν τις διάφορες κυτταρικές τους δράσεις. Οι ενεργοποιημένες πρωτεΐνες G στη συνέχεια συνδέονται λειτουργικά με άλλα μόρια και συνήθως μεταβάλλουν τη δραστηριότητα άλλων ενδοκυττάρων ενζύμων ή ιοντικών διαύλων. Πολλά από τα ένζυμα στόχους των G

πρωτεϊνών παράγουν δευτερογενή μηνυματοφόρα μόρια, που διαχέονται στο ενδοκυττάριο περιβάλλον και ενεργοποιούν επιπρόσθετα βιοχημικές διεργασίες συμπεριλαμβανομένων πρωτεϊνοκινασών με ποικίλα σηματοδοτικά αποτελέσματα για το κύτταρο. Οι συζευγμένοι με πρωτεΐνες G υποδοχείς είχαν αρχικά ονομαστεί μεταβοτροπικοί, για να περιγραφεί το γεγονός της παραγωγής ενδοκυττάρων μεταβολιτών με τη δέσμευση του διαβιβαστή στον υποδοχέα, αν και αργότερα αποδείχτηκε ότι το βασικό γεγονός της ενεργοποίησης των υποδοχέων αυτών είναι η αλληλεπίδραση με G πρωτεΐνη. Ο όρος «μεταβοτροπικός» συνεχίζει να χρησιμοποιείται σε κάποιο βαθμό. Οι δύο αυτές κατηγορίες υποδοχέων παρουσιάζουν σημαντικές λειτουργικές διαφορές με ιδιαίτερη σημασία για τη νευρωνική δραστηριότητα. Συγκεκριμένα, διαφέρουν στην ταχύτητα ή την αμεσότητα της δράσης τους, στη διάρκεια της επίδρασής τους στη λειτουργία του μετασυναπτικού κυττάρου, και στο ενισχυτικό αποτέλεσμα της δράσης τους. Με ενεργοποίηση ενός ιονοτροπικού υποδοχέα και διάνοιξη του διαύλου του, θα προκληθεί άμεσα ιοντικό ρεύμα το οποίο ταχύτατα μεταβάλλει το μεμβρανικό δυναμικό του μετασυναπτικού κυττάρου. Η παραπάνω διεργασία επιτελείται ταχύτατα, είναι δηλαδή της τάξης των δεκάδων χιλιοστών του δευτερολέπτου. Συνεπώς, οι ιονοτροπικοί υποδοχείς στηρίζουν τις ταχείες και σύντομες δράσεις νευροδιαβιβαστών στο νευρικό σύστημα, όπως είναι το γλουταμικό, το GABA και η ακετυλοχολίνη. Επίσης, η διάρκεια της επίδρασης που θα έχει η ενεργοποίηση των υποδοχέων αυτών στο μετασυναπτικό δυναμικό εξαρτάται γενικά από τη διάρκεια της ενεργοποίησης των διαύλων, η οποία είναι σχετικά σύντομη, το πολύ έως λίγες εκατοντάδες χιλιοστών του δευτερολέπτου. Αντίθετα, οι συζευγμένοι με G πρωτεΐνες υποδοχείς επηρεάζουν το μεμβρανικό δυναμικό του μετασυναπτικού κυττάρου έμμεσα, όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, επιδρώντας (μέσω της συγκεκριμένης πρωτεΐνης G με την οποία είναι συζευγμένοι) σε (μη συναπτικούς) ιοντικούς διαύλους που βρίσκονται στην ευρύτερη περιοχή της μεμβράνης και τροποποιώντας τη δραστηριότητα των διαύλων αυτών. (González-Espinosa & Guzmán-Mejía, 2014)

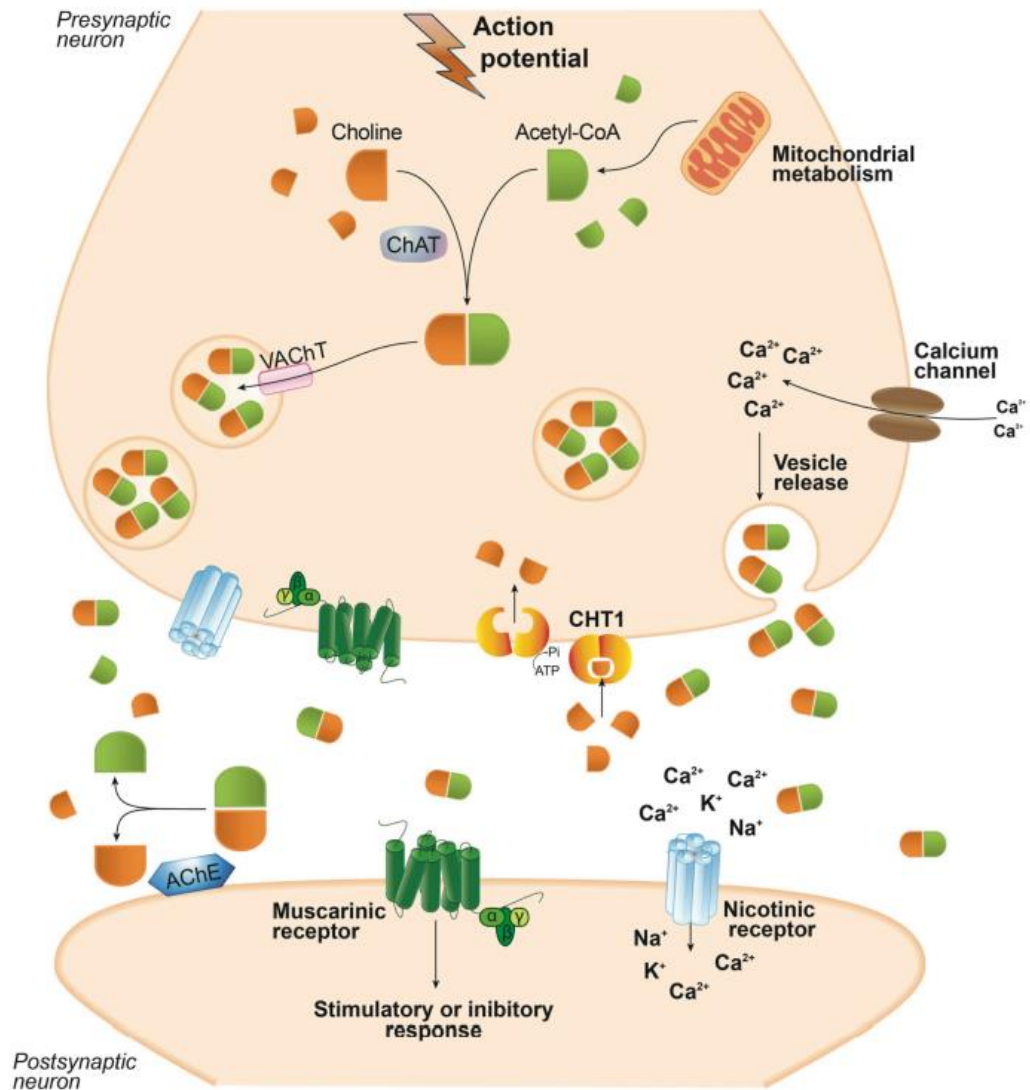
Κατά συνέπεια, η επίδραση των μεταβοτροπικών υποδοχέων στο μεμβρανικό δυναμικό είναι πολύ πιο αργή και επίσης πιο διαρκούσα, αφού συνδέεται με ενεργοποίηση περισσότερο χρονοβόρων βιοχημικών διεργασιών απ'ότι η ενεργοποίηση των ιονοτροπικών υποδοχέων, και μπορεί να εκτείνεται από δευτερόλεπτα μέχρι ώρες ή και περισσότερο. Επίσης, η πυροδότηση της σύνθεσης δευτερογενών ενδοκυττάρων

μηνυμάτων οδηγεί σε ενίσχυση της δράσης των υποδοχέων αυτών. Κυρίως ή αποκλειστικά υποδοχείς συζευγμένοι με πρωτεΐνες G χρησιμοποιούν νευροδιαβιβαστές όπως ντοπαμίνη, νοραδρεναλίνη, σεροτονίνη, νευροπεπτίδια και ενδοκανναβινοειδή.

2.13. Απομάκρυνση του νευροδιαβιβαστή

Η παρουσία του νευροδιαβιβαστή στη σύναψη, και αντίστοιχα η δράση του νευροδιαβιβαστή στους υποδοχείς του μετασυναπτικού νευρώνα, πρέπει να περιορίζεται μόνο σε μερικά msec για τη σωστή λειτουργία και επικοινωνία των νευρικών κυττάρων. Για τον περιορισμό της διάρκειας του νευροδιαβιβαστή πρέπει να υπάρχουν μηχανισμοί άμεσης και γρήγορης απομάκρυνσης του νευροδιαβιβαστή από τη σύναψη. Αυτοί οι μηχανισμοί είναι α) η διάχυση, β) η ενζυμική αποδόμηση και γ) η επαναπρόσληψη του νευροδιαβιβαστή με τη βοήθεια πρωτεϊνών μεταφορέων. Η διάχυση είναι ένας μηχανισμός πολύ αργός και από μόνος του δεν είναι ποτέ επαρκής για τη γρήγορη και αποτελεσματική απομάκρυνση του νευροδιαβιβαστή από τη σύναψη. Η ενζυμική αποδόμηση περιλαμβάνει ένα ένζυμο το οποίο διασπά το νευροδιαβιβαστή στις πρόδρομες ουσίες, οι οποίες επαναπροσλαμβάνονται από τον προσυναπτικό νευρώνα και ανακυκλώνονται.

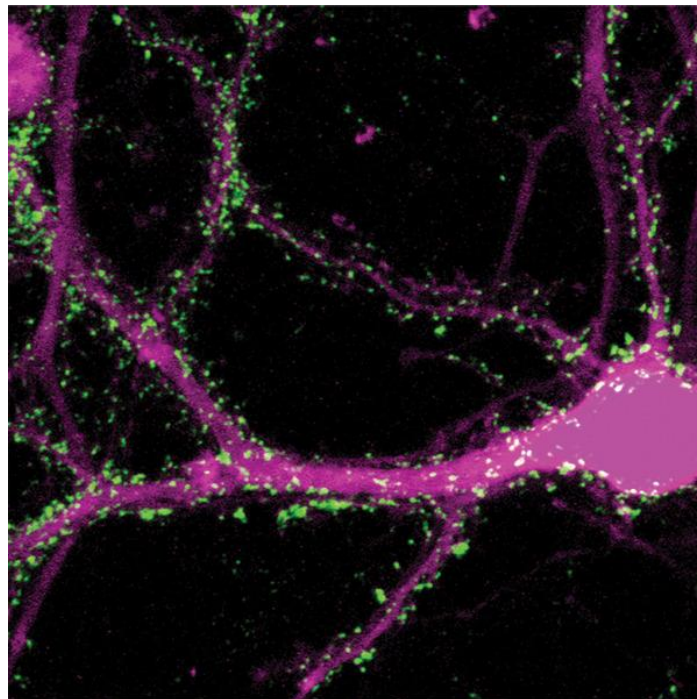
Η *χολινεστεράση* είναι το ένζυμο αποδόμησης της ακετυλοχολίνης, το οποίο βρίσκεται στις χολινεργικές συνάψεις. Η μονοαμινο-οξειδάση (MAO) και η κατεχολο-Ο-μεθυλοτρανσφεράση (COMT) είναι τα ένζυμα αποδόμησης των βιογενών αμινών (νορεπινεφρίνη, ντοπαμίνη και σεροτονίνη). Αυτά τα ένζυμα έχουν και σημαντικό ιατρικό ενδιαφέρον καθώς αναστολείς αυτών των ενζύμων χρησιμοποιούνται ως αντικαταθλιπτικά φάρμακα.



Εικόνα 2.13.1.:). Σχηματική αναπαράσταση βιολογικών διεργασιών που περιλαμβάνουν την νευροδιαβίβαση της ακετυλοχολίνης. Η ακετυλοχολίνη (ACh) συντίθεται στο κυτοσόλιο των χολινεργικών προσυναπτικών νευρώνων από την χολίνη και το ακέτυλο-CoA συνένζυμο μέσω της δράσης της ακετυλοτρανσφεράσης (ChAT). Έπειτα μεταφέρεται σε συναπτικά κυστίδια μέσω του μεταφορέα ακετυλοχολίνης (vAChT) . Η αποπόλωση του προσυναπτικού νευρώνα προάγει την εξωκυττάρωση ACh από συναπτικά κυστίδια στη συναπτική σχισμή, η οποία συνδέεται με νικοτινικούς ή μουσκαρινικούς υποδοχείς, οδηγώντας είτε σε διεγερτική είτε σε ανασταλτική απόκριση. Στη συναπτική σχισμή, το ACh υδρολύεται από το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση (AChE), απελευθερώνοντας οξικό οξύ και χολίνη, η οποία επαναπροσλαμβάνεται στον προσυναπτικό χολινεργικό νευρώνα από τον μεταφορέα χολίνης υψηλής συγγένειας (CHT1). (H. Ferreira-Vieira et al., 2016)

Για την επαναπρόσληψη των νευροδιαβιβαστών μέσω μεταφορέων χρησιμοποιούνται εξειδικευμένες πρωτεΐνες-μεταφορείς για τους διαφορετικούς νευροδιαβιβαστές. Οι βιογενείς αμίνες απομακρύνονται από τη σύναψη και με τη βοήθεια μεταφορέων. Υπάρχουν μεταφορείς της ντοπαμίνης (Dopamine transporter ή DAT), μεταφορείς της σεροτονίνης (Serotonin transporter ή SERT), και μεταφορείς της νορεπινεφρίνης (Norepinephrine transporter ή NET). Ανταγωνιστές αυτών των μεταφορέων έχουν αναπτυχθεί ως αντικαταθλιπτικά φάρμακα, και συγκεκριμένα τα 2^{ης} γενιάς αντικαταθλιπτικά. Η φλουοξετίνη αναπτύχθηκε στα μέσα της δεκαετίας του '90 του προηγούμενου αιώνα και αποτέλεσε το πρώτο αντικαταθλιπτικό με αυτή τη δράση, ως επιλεκτικός αναστολέας της σεροτονίνης. Η μείωση της ενζυμικής αποδόμησης ή της επαναπρόσληψης της σεροτονίνης αυξάνει τα επίπεδα της σεροτονίνης στη σύναψη, κάτι που επιδεινώνει τα συμπτώματα της κατάθλιψης.

Επιπλέον, η δράση πολλών εθιστικών ουσιών επικεντρώνεται στους μεταφορείς επαναπρόσληψης, όπως η κοκαΐνη και η αμφεταμίνη. Η κοκαΐνη προσδένεται και μπλοκάρει το μεταφορέα της ντοπαμίνης, με αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση των επιπέδων του νευροδιαβιβαστή στη σύναψη. Η μεγάλη αύξηση των επιπέδων και της διάρκειας παραμονής της ντοπαμίνης στη σύναψη προκαλεί χρόνιες βλάβες στη λειτουργία του εγκεφαλικού φλοιού και των βασικών γαγγλίων (Σιδηροπούλου, 2015).



Εικόνα 2.12.1.: Απεικόνιση των συνάψεων στους δενδρίτες. Με πράσινο χρώμα έχει γίνει χρώση της συναπτικής πρωτεΐνης bassoon, και με ροζ έχει γίνει χρώση της πρωτεΐνης MAP-2 (microtubule associated protein). (Dieterich et al., 2010)

Γίνεται λοιπόν κατανοητό ότι οι νευροδιαβιβαστές παίζουν καθοριστικό ρόλο στη μεταγωγή σημάτων, άρα και στον τρόπο επικοινωνίας των νευρικών κυττάρων μεταξύ τους καθώς επίσης και άλλους ιστούς. Συνεπώς η περαιτέρω διερεύνησή των ιδιοτήτων τους καθώς και του επακριβή τρόπου λειτουργίας τους είναι απαραίτητη.

Κεφάλαιο 3. Πειραματική μελέτη

3.1. Στρες

Με τον όρο στρες εννοούνται όλες οι απαιτήσεις (εσωτερικές ή εξωτερικές), που σύμφωνα με την εκτίμηση του ατόμου, θέτουν σε δοκιμασία ή/και ξεπερνούν τις διαθέσιμες δυνατότητές του. Είναι γνωστό ότι η έκθεση στο στρες έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ποικίλων φυσιολογικών αντιδράσεων οι οποίες είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση μιας μεγάλης γκάμας αλλαγών τόσο στη συμπεριφορά όσο και στην ομοιόσταση. (Folkman, n.d.) Αυτές οι αλλαγές γίνονται με σκοπό να βοηθήσουν τον οργανισμό να προσαρμοστεί καλύτερα σε μια απειλή πραγματική ή υποθετική ώστε να μπορέσει να την ξεπεράσει. Ωστόσο παρά το γεγονός ότι το στρες αποτελεί έναν εξελικτικό μηχανισμό που δημιουργήθηκε για την προστασία του ατόμου, η συνεχής έκθεση σε αυτό μπορεί να επιφέρει διαφόρου τύπου προβλήματα, κυρίως ψυχολογικής φύσεως. Έτσι έχει φανεί ότι το στρες μπορεί να επηρεάσει τις γνωστικές λειτουργίες και να αλλάξει τον τρόπο αντίληψης μιας κατάστασης του ατόμου. Επίσης μπορεί να συμβάλλει στην επιδείνωση συμπτωμάτων ποικίλων ασθενειών, όπως είναι η σχιζοφρένεια, η διαταραχή ελλειμματικής προσοχής, η υπερκινητικότητα κ.α. (Hoonakker et al., 2017; Magnin & Maurs, 2017) Το κοινό χαρακτηριστικό που μοιράζονται όλες οι παραπάνω ασθένειες είναι η ανικανότητα του ατόμου να διατηρήσει σταθερή την προσοχή του. (Hirvikoski et al., 2009; Holtzman et al., 2013; Newman, n.d.) Για αυτό κρίνεται λογική η ύπαρξη μιας σχέσης ανάμεσα στο στρες και την διατήρηση της προσοχής. Από την άλλη πλευρά το σύστημα διατήρησης της προσοχής είναι υπεύθυνο για τον έλεγχο πολλών διαφορετικών υπότυπων της αντίληψης. Συνεπώς διαταραχές οι οποίες προκαλούνται από το στρες θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε διάφορα γνωστικά ελλείμματα. Αυτό που είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι ότι ενώ είναι γνωστό ότι το στρες μπορεί και βοηθά στην μείωση της διατήρησης της προσοχής, ο νευροχημικός μηχανισμός μέσω του οποίου το επιτυγχάνει αυτό είναι άγνωστος.

3.2. Παράγοντας Απελευθέρωσης Κορτικοτροπίνης

Μια υπόθεση είναι ότι ο παράγοντας απελευθέρωσης της κορτικοτροπίνης (corticotropin releasing factor, CRF), του οποίου η λειτουργία έχει βρεθεί ότι

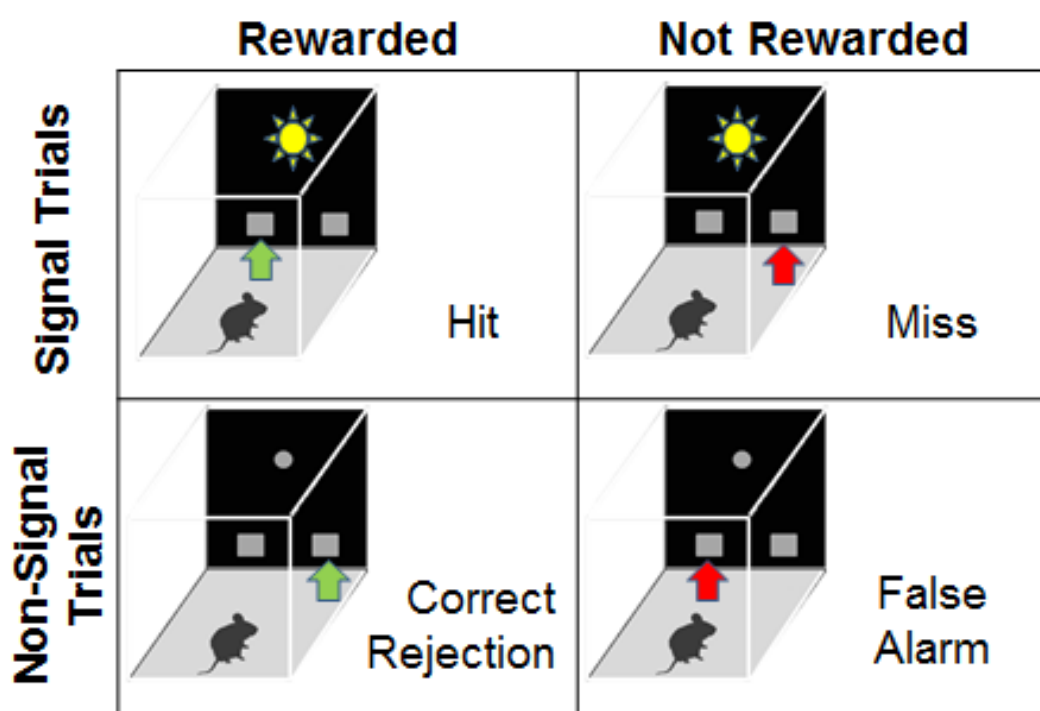
σχετίζεται με το στρες, έχει την ικανότητα να αλλάζει την δράση των κορτικοεξαρτώμενων κυκλωμάτων του βασικού πρόσθιου εγκεφάλου (basal forebrain, BF), τα οποία είναι απαραίτητα για την διατήρηση της προσοχής. Οι περισσότερες από αυτές τις αλλαγές που ενεργοποιούνται από το στρες φαίνεται να ενορχηστρώνονται από τον CRF αφού μπορεί να δρα ρυθμίζοντας την λειτουργία των νευρώνων κάτω από συνθήκες στρες. Επίσης είναι γνωστό ότι η χορήγηση CRF βλάπτει τόσο την επιλεκτική όσο και την παρατεταμένη προσοχή σε αρουραίους. (Cole et al., 2016; Van'T Veer et al., 2012) Αν και έχει φανεί ότι είναι υπεύθυνος για τη ρύθμιση των συναισθηματικών, γνωστικών και συμπεριφορικών λειτουργιών, αφού έχει την ικανότητα να επηρεάζει συστήματα τα οποία εμπλέκονται στη δράση των νευροδιαβαστών, δεν είναι γνωστή η ύπαρξη επίδρασής του στα χολινεργικά συστήματα. Αυτό είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον, δεδομένου ότι οι CRF υποδοχείς φαίνεται να συμμετέχουν σε χολινεργικά συστήματα και είναι γνωστό ότι το στρες μεταβάλλει λειτουργίες που καθορίζονται από τα συστήματα αυτά (π.χ. προσοχή και μνήμη). Έτσι, ερευνώντας πώς/εάν ο CRF ρυθμίζει τις χολινεργικές λειτουργίες θα μπορούσαμε να έρθουμε ένα βήμα πιο κοντά στην κατανόηση του πώς το στρες επηρεάζει τη γνωστική λειτουργία.

3.3. CRF και διατήρηση της προσοχής

Αξίζει να αναφερθεί ότι ασθενείς που πάσχουν από διαταραχές οι οποίες χαρακτηρίζονται από υπερέκκριση CRF, όπως είναι το μετατραυματικό στρες (PTSD) και η κατάθλιψη, έχουν δυσκολία στην διατήρηση της προσοχής. Η παραπάνω παρατήρηση υποδεικνύει την ύπαρξη μιας κλινικής σχέσης μεταξύ του CRF και λειτουργιών οι οποίες ενορχηστρώνονται από το κορτικοεξαρτώμενο σύστημα του BF. (Huralo et al., 2019) Λόγω του ότι η παρατεταμένη προσοχή είναι αναγκαία για την διεξαγωγή άλλων υπότυπων προσοχής, όπως είναι η παράλληλη προσοχή και η επιλεκτική προσοχή, και είναι συσχετισμένη με την επίδοση που εμφανίζει κανείς σε διάφορες διαδικασίες γνωστικής λειτουργίας, οι διαταραχές που προκαλούνται σε αυτή από το CRF θα έχουν ποικίλες επιδράσεις σε όλο το φάσμα των γνωστικών λειτουργιών.

3.4 Παρατεταμένη δοκιμασία προσοχής

Τα πειράματα έλαβαν χώρα στο συνεργαζόμενο εργαστήριο στο Temple University της Φιλαδέλφεια των Η.Π.Α. στο Εργ. της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Debra Bangasser με εξαίρεση την ομογενοποίηση και την ηλεκτροχημική ανάλυση οι οποίες πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Νευροψυχοφαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Χριστίνας Δάλλας. Η συλλογή των ιστών έγινε στο συνεργαζόμενο εργαστήριο στις Η.Π.Α. Τα προζυγισμένα δείγματα στάλθηκαν αποθηκευμένα σε ξηρό πάγο και με το πέρας της παραλαβής αποθηκεύτηκαν στους -80°C . Στόχος των πειραμάτων ήταν η εύρεση εάν ο CRF μπορεί να επηρεάσει τη συμπεριφορά που ρυθμίζεται από το BF και πιο συγκεκριμένα από την υποπεριοχή του BF γνωστή ως nucleus basalis of Meynert, (BN). Τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας την τεχνική παρατεταμένη δοκιμασία προσοχής (Sustained Attention Task, SAT) , όπου οι αρουραίοι εκπαιδεύτηκαν ώστε να μπορούν να αλληλοεπιδρούν με οθόνη αφής εντός λειτουργικών κουτιών εντός των οποίων λάμβαναν χώρα οι δοκιμασίες. Με αυτές τις δοκιμασίες ελεγχόταν η ικανότητα των αρουραίων να παρακολουθούν και να κατανοούν την σημασία διαφόρων επαναλαμβανόμενων και μη σημάτων. (Bangasser et al., 2017; Wicks et al., 2017) Εν συντομία, οι αρουραίοι εκπαιδεύτηκαν να αναγνωρίζουν διαφορετικά σήματα (διάρκειας 500 ms, 50 ms, ή 25 ms με ποικίλα ψευδή σήματα) καθώς επίσης και να κατανοούν τη σημασίας της έλλειψης σήματος.



Εικόνα 3.4.1.: Σχηματική απεικόνιση δοκιμασιών SAT. Ως signal trials ορίζονται οι δοκιμασίες αναγνώρισης σήματος ενώ ως non-signal trials οι δοκιμασίες όπου ελέγχεται η ικανότητα του αρουραίου να κατανοεί την σημασία της απουσίας σήματος.(Bangasser et al., 2017)

Ειδικότερα, η σωστή αναγνώριση δοκιμασιών οπτικού σήματος απαιτεί τη χρήση του χολινεργικού συστήματος του BF, ενώ η σωστή αναγνώριση δοκιμασιών που βασίζονται στην απουσία σήματος απαιτεί τη χρήση του GABAεργικών συστημάτων του BF. Αρχικός στόχος ήταν η εύρεση και η αξιολόγηση της μείωσης της παρατεταμένης προσοχής μου προκλήθηκε από την κεντρική χορήγηση CRF σε αρσενικούς και θηλυκούς αρουραίους. Επειδή έχουν παρατηρηθεί διαφορετικές αποκρίσεις εξαρτώμενες από το φύλο στον τρόπο με τον οποίο μεταφέρεται, ενεργοποιείται και σηματοδοτεί περαιτέρω ο CRF₁ υποδοχέας (CRF₁), που βρίσκεται στην περιοχή του εγκεφάλου locus coeruleus (LC), κρίθηκε αναγκαία η προσθήκη θηλυκών αρουραίων στα πειράματα. Κατά αντιστοιχία είναι πιθανή η εμφάνιση διαφορών στον CFR του BF οι οποίες να οφείλουν την ύπαρξή τους στο διαφορετικό φύλο.

3.5. Προκαταρκτικά πειράματα

Για να ελεγχθεί η επίδραση του κεντρικά χορηγούμενου CRF σε αρουραίους που εκπαιδεύτηκαν να εκτελέσουν SAT, χορηγήθηκαν διαφορετικές δόσεις CRF ή τεχνητού εγκεφαλονωτιαίου υγρού (aCSF, artificial cerebral spinal fluid), το οποίο χρησιμοποιήθηκε σαν placebo/blank, μέσω ενός ενδοεγκεφαλοκοιλιακού (i.c.v.) σωληνίσκου/κάνουλας πριν της διεξαγωγή της δοκιμής SAT.

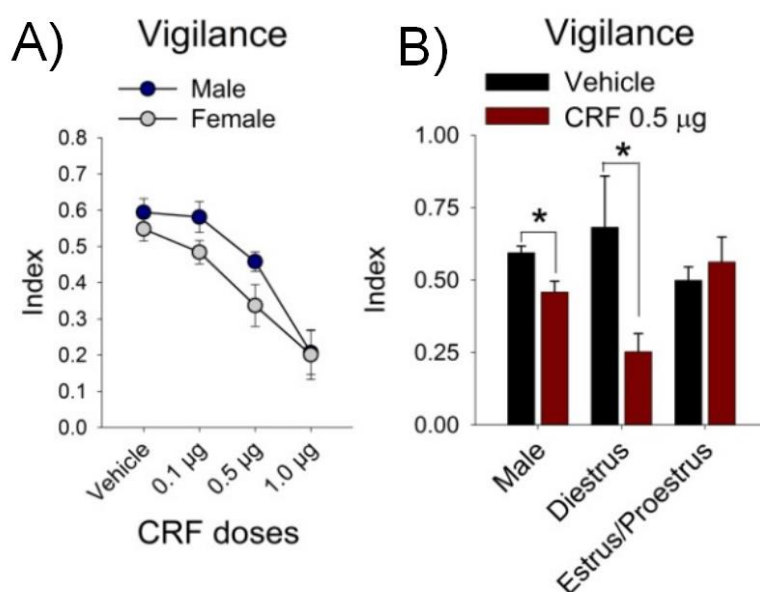
Υπήρξε μια περίοδος αναμονής 1 εβδομάδας μετά την χορήγηση των δόσεων κατά την οποία οι αρουραίοι εξακολουθούσαν να εκτελούν SAT, χωρίς να χορηγηθεί κάποιο επιπλέον φάρμακο. Έτσι, οι αλλαγές στην συνολική επίδοση των δοκιμασιών αποδίδονται στις οξείες αποκρίσεις στο CRF.

Χρησιμοποιώντας τον δείκτη επαγρύπνησης ως μέτρο βαθμονόμησης, δηλαδή το ποσοστό των θετικών(=αληθής) και αρνητικών(=ψευδών) αποκρίσεων στο SAT, μετρήθηκε η συνολική απόδοση της προσοχής και διαπιστώθηκε ότι ο CRF προκάλεσε

δοσολογικά εξαρτώμενη μείωση στη παρατεταμένη προσοχή τόσο στους αρσενικούς όσο και στους θηλυκούς αρουραίους. (Εικόνα 3.5.1.A)

Επιπλέον, στις δοκιμές όπου χορηγήθηκε μέτρια δόση CRF φαίνεται ότι υπάρχει η τάση για μεγαλύτερη μείωση του δείκτη επαγρύπνησης στους θηλυκούς αρουραίους από ότι στους αρσενικούς, το οποίο συμφωνεί με προηγούμενες αναφορές αυξημένης ευαισθησίας των γυναικών στο CRF. (Hupalo et al., 2019)

Παράλληλα λόγω της μεταβολής των ορμονών κατά την διάρκεια του κύκλου του οίστρου διεξήχθη ακόμα μια ανάλυση κατά την οποία ελέγχθηκε η συνεισφορά των κυκλοφορόντων ορμονών των ωοθηκών, συγκρίνοντας τους θηλυκούς αρουραίους στο στάδιο του δίοιστρου του κύκλου του οίστρου, όπου παρατηρούνται χαμηλότερα επίπεδα ορμονών των ωοθηκών, με τους θηλυκούς αρουραίους στα υπόλοιπα στάδια, όπου παρατηρούνται υψηλότερα επίπεδα ορμονών των ωοθηκών. Έτσι εντοπίστηκαν εντυπωσιακά αποτελέσματα επηρεαζόμενα από τον κύκλο του οίστρου, όπως είναι ότι ο CRF μείωσε τον δείκτη επαγρύπνησης κατά την διάρκεια του δίοιστρου, αλλά όχι στον πρόοιστρο ή τον οίστρο. (Εικόνα 3.5.1.B) Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι τα χαμηλά επίπεδα των ορμονών των ωοθηκών αυξάνουν την ευαισθησία της επιβλαβούς δράσης του CRF στην παρατεταμένη προσοχή, και πιθανώς εξηγούν τη σχετικά μικρή διαφυλική διαφορά που παρατηρήθηκε στην αρχική σύγκριση, όταν δεν ελήφθη υπόψη ο κύκλος του οίστρου.



Εικόνα 3.5.1.: A: Η χορήγηση CRF δυσχεραίνει την απόδοση κατά τις δοκιμασίες SAT. Η κεντρική χορήγηση CRF προκαλεί μια δοσοεξαρτώμενη μείωση του δείκτη επαγρύπνησης [$F(3,39)=19.5$, $p<0,001$], ενώ παρατηρείται επίσης η τάση για μια διαφυλικά εξαρτώμενη διαφορά όσον αφορά την δόση των 0.5 μg ($p=0,11$).

B: Παρατηρείται μια σημαντική διαφορά στη μείωση του δείκτη επαγρύπνησης των θηλυκών αρουραίων η οποία οφείλεται στις διαφορετικές ορμόνες οι οποίες παράγονται κατά την διάρκεια του δίοιστρου. [$F(2,26)=7.17$, $p=0,003$]. Τόσο οι αρσενικοί όσο και θηλυκοί αρουραίοι που βρίσκονται στη φάση του δίοιστρου του κύκλου του οίστρου εμφανίζουν μείωση του δείκτη επαγρύπνησης με το πέρασ τις διεξαγωγής SAT μετά τη χορήγηση CRF, ενώ όσον αφορά τους θηλυκούς αρουραίους που βρίσκονται στη φάση του οίστρου ή του πρόοιστρου δεν παρατηρείται κάποια στατιστικά μεγάλη διαφορά ($p<0,05$).

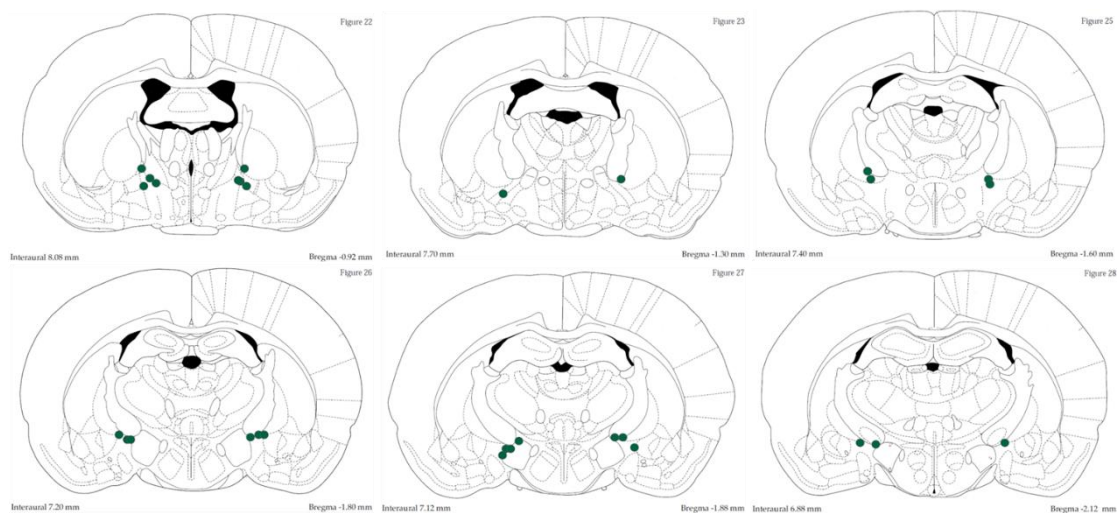
Συλλογικά, αυτές οι μελέτες δείχνουν ότι, σε επίπεδο συμπεριφοράς, η κεντρική χορήγηση CRF μπορεί να επηρεάσει τη παρατεταμένη προσοχή που καθορίζεται από το BF. Ωστόσο, εάν αυτό γίνεται μέσω της άμεσης ρύθμισης του BF μέσω του CRF δεν είναι σαφές.

3.6. Πειραματική διαδικασία

Όπως αναφέρθηκε η χορήγηση του CRF αρχικά έγινε κεντρικά στον εγκέφαλο και άρα το ενιόμενο CRF θα μπορούσε να δράσει σε όλα τμήματα του εγκεφάλου ανεξαιρέτως. Συνεπώς θα έπρεπε με κάποιο τρόπο να βρεθεί αν υπάρχει κάποια υποπεριοχή του εγκεφάλου, η οποία θα ρυθμίζεται ειδικά από το CRF, μεταβάλλοντας την ικανότητα διατήρησης της προσοχής του υποκειμένου. Αναφέρθηκε προηγουμένως ότι η περιοχή nucleus basalis of Meynert του basal forebrain, είναι μια υποπεριοχή η οποία φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της προσοχής. Άρα ελέγχθηκε εάν η χορήγηση CRF σε αυτή την υποπεριοχή ήταν επαρκής για να επηρεάσει την παρατεταμένη προσοχή σε αρσενικούς και θηλυκούς αρουραίους.

Για αυτό το λόγο διεξήχθη το εξής πείραμα κατά το οποίο, εξετάστηκε η επίδραση της χορήγησης CFR στο BF. Ο τρόπος με βάση τον οποίο πραγματοποιήθηκε αυτό το πείραμα, ήταν ερευνώντας το πως η άμεση έγχυση CRF στο BF επηρεάζει την απόδοση SAT σε αρσενικούς και θηλυκούς αρουραίους.

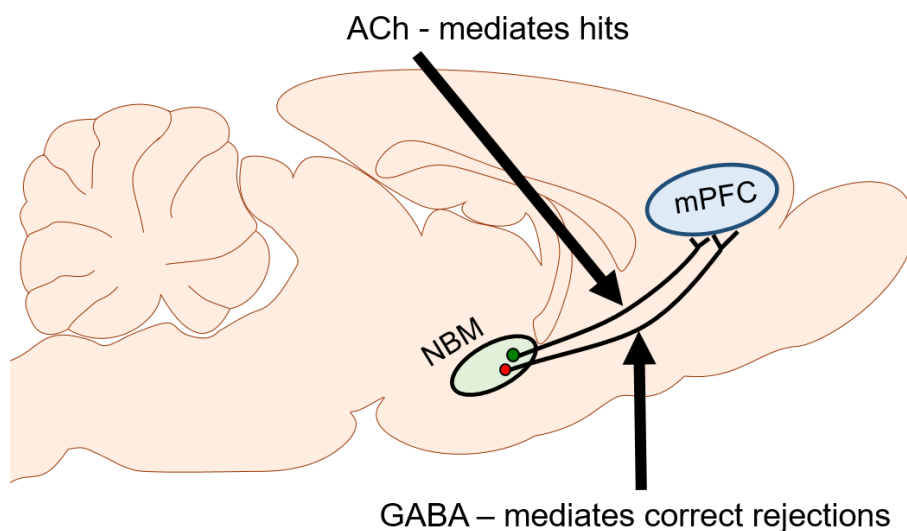
Για το σκοπό αυτό, ενήλικοι (70+ ημέρες) αρσενικοί και θηλυκοί αρουραίοι Sprague-Dawley εκπαιδεύτηκαν σε SAT έως ότου πληρούσαν 3 βασικά κριτήρια: για 3 συνεχόμενες ημέρες, θα έπρεπε το ποσοστό των σωστών αποκρίσεων να είναι >70% και το ποσοστό των σωστών απορρίψεων να είναι >70% καθώς επίσης και οι παραλείψεις δεν θα έπρεπε να ξεπερνούν το 20% των συνολικών δοκιμασιών. Τα ποσοστά αυτά ορίστηκαν και ως «baseline» για τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Στη συνέχεια, εμφυτεύτηκε στους αρουραίους κάνουλα στην περιοχή nBM / SI του BF (A / P = -1,7 και M / L = ± 2,8 από το Bregma και D / V = -7,1 από την επιφάνεια του κρανίου). Μετά την ανάρρωση των αρουραίων και την εκ νέου εκπαίδευση αυτών σε διεξαγωγή δοκιμασιών SAT, έως ότου οι αποκρίσεις τους να υπολογίζονται ξανά στα ποσοστά τα οποία αναφέρθηκαν (baseline), έγινε έγχυση στους αρουραίους είτε τεχνητού εγκεφαλονωτιαίου υγρού (aCSF), είτε CRF (30 ng ή 100 ng με ταχύτητα έγχυσης 0,2 μl / min σε 5 λεπτά). Πιο συγκεκριμένα οι αρουραίοι χωρίστηκαν σε 3 ομάδες και σε κάθε ομάδα έγινε μία δόση. Με το πέρας της έγχυσης οι αρουραίοι συνέχισαν να εκτελούν SAT για ακόμη μία εβδομάδα. Στο τέλος της εβδομάδας αυτής οι αρουραίοι θυσιάστηκαν και πραγματοποιήθηκε απομόνωση των εγκεφαλικών ιστών.



Εικόνα 3.6.1.: Απεικόνιση των σημείων έγχυσης του CRF με την χρήση της κάνουλας.

Συγκεκριμένα απομονώθηκαν οι περιοχές του εγκεφάλου PFC και nucleus basalis of Meynert, οι οποίες ομογενοποιήθηκαν όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο 4.3. (Ομογενοποίηση αγνώστων δειγμάτων). Έπειτα πραγματοποιήθηκε ηλεκτροχημική ανάλυση με την χρήση HPLC για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των νευροδιαβιβαστών αυτών των περιοχών. Όπως αναφέρθηκε η αναγνώριση της απουσίας σήματος κατά την διεξαγωγή των δοκιμών SAT βασίζεται στη σωστή λειτουργία των GABAεργικών συστημάτων του BF. Συνεπώς ο ποσοτικός προσδιορισμός του νευροδιαβιβαστή GABA σε αυτούς τους νευρώνες θα μπορούσε να δώσει περαιτέρω πληροφορίες για τον τρόπο λειτουργίας του συστήματος αυτού μετά την προσθήκη CRF. Παράλληλα με τον έλεγχο του GABA εξετάστηκαν και άλλοι νευροδιαβιβαστές, οι οποίοι θα μπορούσαν να δώσουν και αυτοί περαιτέρω πληροφορίες.

Τέλος επιλέχθηκε να εξεταστεί και η περιοχή του εγκεφάλου PFC πέρα από την περιοχή nucleus basalis of Meynert. Από τα προκαταρκτικά πειράματα είχε φανεί ότι ο CRF έχει την ικανότητα να δρα στο BN επηρεάζοντας την νευρική λειτουργία σε αυτήν την περιοχή. Συνεπώς οι χολινεργικοί νευρώνες και ίσως οι GABAεργικοί νευρώνες του BN που επικοινωνούν με το PFC να επηρεάζονται και αυτοί. (Εικόνα 3.6.1.) Από την άλλη πλευρά η απελευθέρωση ακετυλοχολίνης (ACh) στον προμετωπιαίο φλοιό (PFC) έχει φανεί ότι είναι κρίσιμη για την ανίχνευση σήματος. (Eck et al., 2020) Με αυτό τον τρόπο οι αλλαγές που μπορεί να υφίστανται οι χολινεργικοί νευρώνες και ίσως οι GABAεργικοί, θα μπορούσαν να επηρεάσουν την απελευθέρωση ακετυλοχολίνης και GABA αντίστοιχα στο PFC. Συνεπώς τόσο ο ποσοτικός όσο και ο ποιοτικός προσδιορισμός των νευροδιαβιβαστών σε αυτή την περιοχή θα μπορούσε να δώσει περισσότερες απαντήσεις για τον τρόπο λειτουργίας και επικοινωνίας αυτού του συστήματος.



Εικόνα 3.6.2.: Μεταγωγή σήματος από το NMB στο mPFC. Η ACh καθορίζει την ικανότητα αναγνώρισης των διαφορετικών σημάτων (hits) ενώ το GABA ρυθμίζει την ικανότητα αναγνώρισης της έλλειψης σήματος (correct rejections).

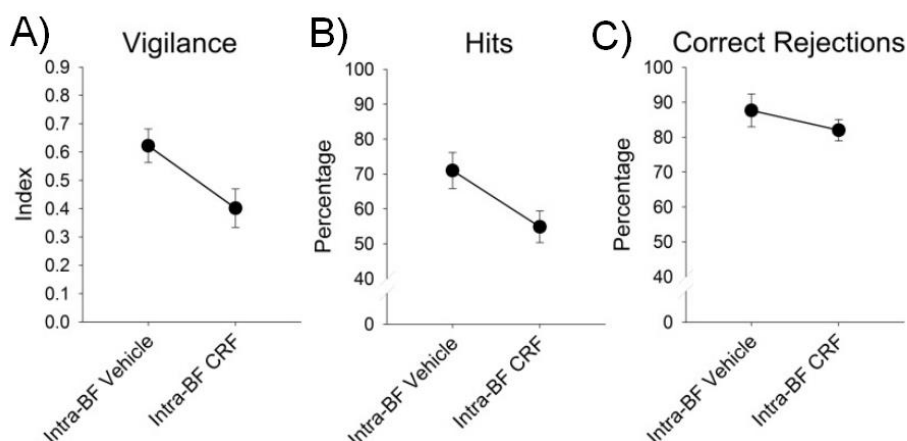
Για τον καθορισμό του αριθμού ζώων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα προηγήθηκε στατιστική ανάλυση (G^* power analysis) που ανέδειξε τον ελάχιστο αριθμό ζώων προκειμένου να εξαχθούν αξιόπιστα πειράματα. Η στατιστική ανάλυση έγινε χρησιμοποιώντας τις παρακάτω παραμέτρους: partial $\eta^2 = 0.2$, $\alpha = 0,05$. Το αποτέλεσμα της ανάλυσης ανέδειξε $n = 8$ ζώα σε κάθε ομάδα για όλα τα πειράματα.

3.7. Συμπεριφορικά αποτελέσματα

Δεδομένου του κρίσιμου ρόλου του BF στη παρατεταμένη προσοχή και την παρουσία CRFr σε αυτήν την περιοχή, αναμενόταν ότι οι ενδο-BF εγχύσεις CRF να προκαλέσουν μια δόσοεξαρτώμενη μείωση της προσοχής σε αρσενικούς και θηλυκούς αρουραίους. Με βάση τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε μια ομάδα αρουραίων ($n = 4$) η παραπάνω πρόταση φαίνεται να ισχύει, με το CRF που εγχέεται απευθείας στο BF να μειώνει τον δείκτη επαγρύπνησης (Εικόνα 3.7.1.A.).

Όπως αναφέρθηκε, οι χολινεργικοί και GABAεργικοί νευρώνες του BF φαίνεται να είναι αυτοί που ελέγχουν την επιτυχία των δοκιμασιών SAT. Με βάση τα πειράματα μικρής κλίμακας φαίνεται ότι η έγχυση CRF επηρεάζει μόνο την ικανότητα των

πειραματόζωων να αναγνωρίζουν τα διαφορετικά σήματα (χολινεργικά συστήματα), χωρίς να επηρεάζεται η ικανότητά του να αναγνωρίζουν την σημασία της απουσίας σήματος (GABAεργικά συστήματα) (Εικόνα 3.7.1.B,C).



Εικόνα 3.7.1.: Δεδομένα στα οποία φαίνεται ότι η εισαγωγή CRF στο BF επηρεάζει την ικανότητα διατήρησης της προσοχής. Κατά την διάρκεια των πειραμάτων χορηγήθηκαν 100ng CRF καθώς και (aCSF) στην περιοχή BF του εγκεφάλου σε αρουραίους Sprague-Dawley. Παρατηρήθηκε ότι η εισαγωγή αυτή μείωσε τον δείκτη επαγρύπνησης [$t(3)=4.48, p=0,021$](A) όπως και επίσης την ικανότητα αναγνώρισης των διαφορετικών σημάτων (hits) [$t(3)=7,09, p=0,006$] (B), χωρίς ωστόσο να παρατηρηθεί μεγάλη διαφορά στην ικανότητα κατανόησης της απουσίας σημάτων (correct rejections) [$t(3) =1.37, p=.264$](C).

Εν κατακλείδι, αυτά τα πειράματα δίνουν απαντήσεις για το εάν ο CRF μπορεί να ρυθμίσει άμεσα μια BF-χολινεργικά καθοριζόμενη συμπεριφορά, βελτιώνοντας έτσι την κατανόησή μας για τα συστήματα που είναι κρίσιμα για τη ρύθμιση του στρες στις διάφορες διαδικασίες προσοχής. Επιπλέον τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων αναμένεται να προωθήσουν αρκετούς κλάδους, καθώς και να συμβάλουν στην κατανόησή μας για το πώς οι παράγοντες άγχους ρυθμίζουν τα συστήματα νευροδιαβιβαστών αλλάζοντας τη γνωστική αντίληψη.

Κεφάλαιο 4. Αντιδραστήρια - Διαλύματα – Εξοπλισμός

4.1. Οργανολογία –Υλικά

4.1.1. Σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκε σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας συζευγμένη με ηλεκτροχημικό ανιχνευτή (HPLC-ECD) αποτελούμενο από τα εξής μέρη:

- Αντλία δύο πιστονίων Pharmacia LKB - HPLC pump 2248

- Ηλεκτροχημικός ανιχνευτής BAS CC-4, εξοπλισμένος με κυψελίδα διπλής ροής που φέρει ηλεκτρόδιο εργασίας υαλώδους άνθρακα (dual glassy carbon crossflow-3mm) και ηλεκτρόδιο αναφοράς Ag/AgCl (Bioanalytical systems, West Lafayette, USA)

- Αμπερομετρικός Ανιχνευτής (BAS LC-4C)

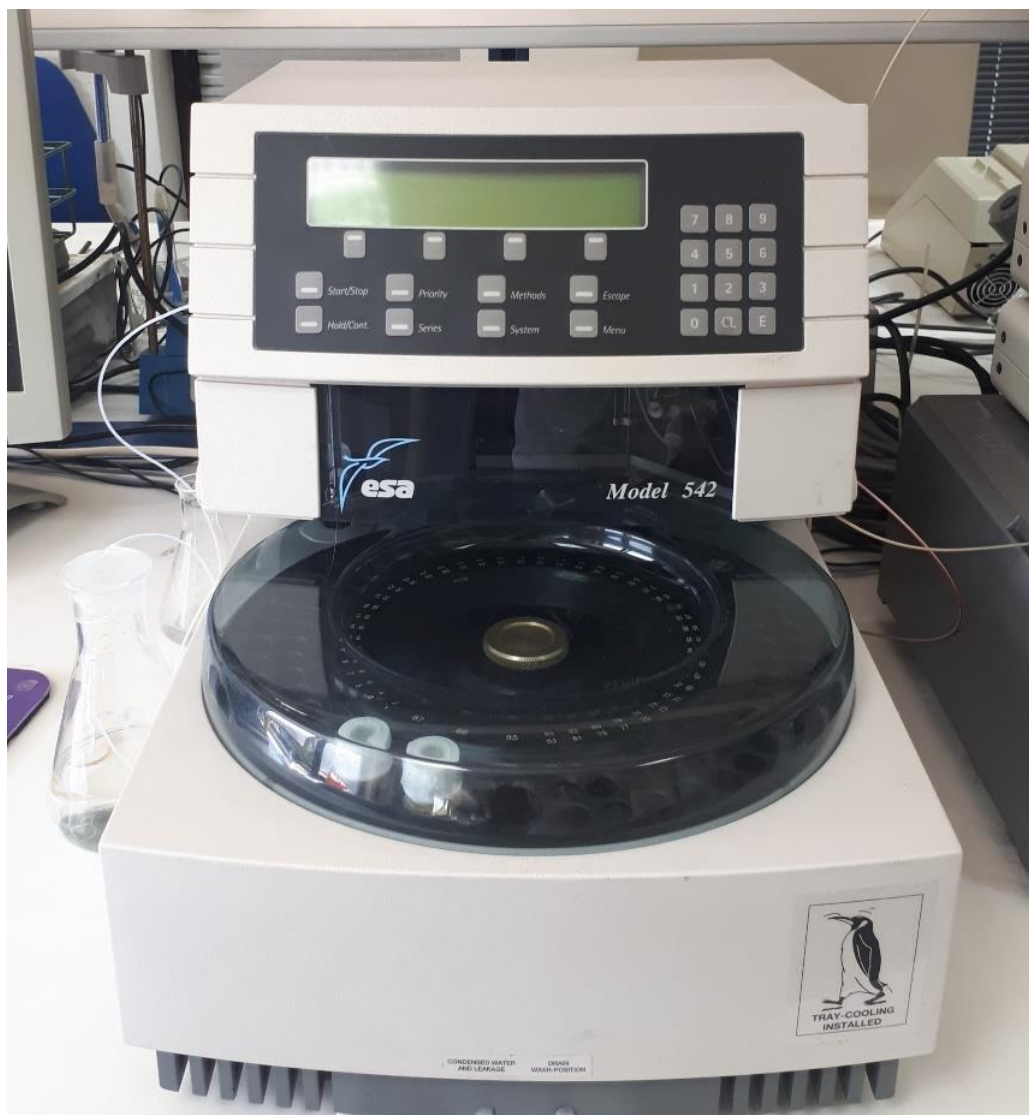
- Αυτόματος δειγματολήπτης (ESA HPLC Autosampler, Model 542)

- Υπολογιστής με εγκατεστημένο πρόγραμμα ελέγχου και επεξεργασίας αποτελεσμάτων (Clarity, Data-Apex, Czech Republic).

- Για τον διαχωρισμό των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε στήλη Thermo Scientific Aquasil C18 Dimension (mm) 250 x 4.6 with Particle Size (μ) 5 .



Εικόνα 4.1.1. : Σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής.



Εικόνα 4.1.2 : Αυτόματος δειγματολήπτης του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής.

4.1.2. Λοιπός εξοπλισμός

Για τη παρασκευή των διαλυμάτων και για την κατεργασία των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συσκευές:

- Συσκευή παραγωγής υπερκάθαρου νερού, τύπου Millipore Direct-Q 3, (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA)

- Ρυθμιζόμενες αναλυτικές πιπέτες 1000 μL , 200 μL (Thermo Scientific Finnpiquette) των 10 μL (Gilson Pipetman) και των 5000 μL (Labmate).
- Συσκευή ανάδευσης Vortex, Heidolph
- Σύστημα διήθησης και απαέρωσης με φίλτρο Titan membrane disk 0,47 μm της εταιρείας Sun sri
- Ηλεκτρονικός αναλυτικός ζυγός ABS 80-4 ακριβείας $\pm 0,0001$ g, (Kern and Sohn GmbH, Balingen, Baden-Württemberg, Germany)
- Πεχάμετρο με συνδυαστικό ηλεκτρόδιο υάλου Schott

4.1.3. Αντιδραστήρια –Υλικά

- ✓ Πρότυπη ουσία γ -αμινοβουτυρικό οξύ καθαρότητας $>99\%$ από την εταιρία Sigma
- ✓ Πρότυπη ουσία L-ασπαραγίνη από την εταιρία Panreac AppliChem
- ✓ Πρότυπη ουσία γλυκίνη από την εταιρία Fluca
- ✓ Πρότυπη ουσία ταυρίνη καθαρότητας $>99\%$ από την εταιρία Sigma
- ✓ Πρότυπη ουσία L-σερίνη καθαρότητας $>99\%$ από την εταιρία Sigma
- ✓ Πρότυπη ουσία L-ασπαραγίνη καθαρότητας $>98\%$ από την εταιρία Sigma
- ✓ Πρότυπη ουσία DL-αργινίνη καθαρότητας $>98\%$ από την εταιρία Sigma
- ✓ Πρότυπη ουσία L-ασπαρτικό οξύ καθαρότητας $>98\%$ από την εταιρία Sigma
- ✓ Πρότυπη ουσία L-γλουταμικό οξύ καθαρότητας $>98\%$ από την εταιρία Sigma

- ✓ Πρότυπη ουσία L-γλουταμίνη καθαρότητας >98% από την εταιρία Sigma
- ✓ Πρότυπη ουσία L-γλουταμίνη καθαρότητας >98% από την εταιρία Sigma
- ✓ Πρότυπη ουσία L-αλανίνη καθαρότητας >98% από την εταιρία Sigma
- ✓ Πρότυπη ουσία L-γλουταμίνη καθαρότητας >98% από την εταιρία Sigma
- ✓ Πρότυπη ουσία L-τυροσίνη καθαρότητας >99% από την εταιρία Sigma
- ✓ Πρότυπη ουσία L-φαινυλαλανίνη καθαρότητας >99% από την εταιρία Sigma
- ✓ Πρότυπη ουσία L-τρυπτοφάνη από την εταιρία Panreac AppliChem
- ✓ Πρότυπη ουσία L-βαλίνη καθαρότητας >98% από την εταιρία Sigma
- ✓ Πρότυπη ουσία L-θρεονίνη από την εταιρία Panreac AppliChem
- ✓ Πρότυπη ουσία L-λευκίνη από την εταιρία Sigma
- ✓ Πρότυπη ουσία L-Ιστιδίνη καθαρότητας >99% από την εταιρία Sigma-Aldrich
- ✓ Πρότυπη ουσία L-ισολευκίνη καθαρότητας >98% από την εταιρία Sigma-Aldrich
- ✓ Πρότυπη ουσία L-λυσίνη καθαρότητας >98% από την εταιρία Sigma
- ✓ Πρότυπη ουσία L- κυστεΐνη καθαρότητας >98% από την εταιρία Sigma
- ✓ Πρότυπη ουσία L-προλίνη καθαρότητας >99,5% από την εταιρία Sigma
- ✓ Πρότυπη ουσία L-μεθιονίνη καθαρότητας >98% από την εταιρία Sigma
- ✓ Βορικό άλας BORAX (Sodium tetraborate) από την εταιρία Sigma

- ✓ Άλας δισουλφιδικού νατρίου (sodium disulfite pure, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) καθαρότητας 98% από την εταιρία Sigma
- ✓ Άλας του σουλφιδικού νατρίου (sodium sulfite pure, Na_2SO_3) καθαρότητας 98% από την εταιρία Sigma
- ✓ Διάλυμα β-μερκαπτοαιθανόλης από την εταιρία Serva
- ✓ Πρότυπη ουσία όρθο-φθαλαδεΐδης καθαρότητας >99% από την εταιρία Sigma-Aldrich
- ✓ Διάλυμα ακετονιτριλίου (ACN), HPLC βαθμού καθαρότητας 99,9% , από την εταιρεία Chem-Lab
- ✓ Διάλυμα υπερχλωρικού οξέος (HClO_4) 70% w/w από την εταιρία Applichem, Panreac .
- ✓ Διένυδρο άλας δινατριούχου αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (disodium salt dihydrate, Na_2EDTA), καθαρότητας $\geq 99\%$ από την εταιρεία Panreac Applichem.
- ✓ Φωσφορικό νάτριο (Sodium dihydrogen Phosphate hydrate, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), από την εταιρεία Merck
- ✓ Κιτρικού Νατρίου (tri-sodium citrate 2-hydrate , $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) από την εταιρεία Panreac.
- ✓ Υπερκάθαρο νερό για HPLC από τη συσκευή παραγωγής νερού Millipore Direct-Q 3

4.2. Παρασκευή διαλυμάτων

Παρασκευή διαλυμάτων παρακαταθήκης (aminoacid stock solutions):

Για την παρασκευή των διαλυμάτων παρακαταθήκης των διαφορετικών αμινοξέων, ζυγίζονται ξεχωριστά 2 mg των πρότυπων ουσιών των αμινοξέων αυτών σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας. Μετά την ζύγισή τους τα mg αυτά μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL όπου και αραιώνονται με μέχρι χαραγής με διάλυμα υπερχλωρικού οξέος (HClO_4) 0,1 M. Έπειτα συλλέγονται σε καθαρά falcon των 10 mL και αποθηκεύονται σε ψυγείο θερμοκρασίας 4°C , ώστε να αποφευχθεί η αποικοδόμησή τους μέχρι ως ότου να γίνει περαιτέρω χρήση τους. Με τον τρόπο αυτό, προκύπτουν διαλύματα παρακαταθήκης διαφορετικών αμινοξέων συγκέντρωσης 2 μg / 10 μL .

Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων εργασίας (standard solution):

Η παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων εργασίας γινόταν καθημερινά πριν τον έλεγχο των αγνώστων δειγμάτων, με σκοπό τον καθορισμό της καμπύλης γραμμικότητας της εκάστοτε ημέρας. Συγκεκριμένα συλλέγονται 100 μL από το κάθε διάλυμα παρακαταθήκης (Γλουταμικό οξύ, σερίνη, ασπαραγίνη, γλυκίνη, γλουταμίνη, αλανίνη, ταυρίνη, αργινίνη, γ -αμινοβουτυρικό οξύ), τα οποία και τοποθετούνται σε καθαρό falcon των 10mL, με τελικό όγκο $9 \cdot 100\mu\text{L} = 900 \mu\text{L}$. Έπειτα στα ήδη υπάρχοντα 900 μL γίνεται προσθήκη 100 μL διαλύματος υπερχλωρικού οξέος (HClO_4) 0,1 M με αποτέλεσμα ο νέος όγκος του διαλύματος να διαμορφωθεί στα (900 μL + 100 μL = 1000 μL = 1 mL). Το συγκεκριμένο διάλυμα ορίζεται αυθαίρετα ως Διάλυμα Νο 1 (1) και αποτελεί το εναρκτήριο διάλυμα με βάση το οποίο παρασκευάζονται περαιτέρω αραιωμένα διαλύματα. Πιο συγκεκριμένα, από το Διάλυμα Νο 1 κατασκευάστηκε το Διάλυμα Νο 2 με τον εξής τρόπο. Από το διάλυμα Νο 1 απομονώνονται 500 μL τα οποία και μεταφέρονται σε καινούριο καθαρό falcon. Έπειτα γίνεται προσθήκη άλλων 500 μL καθαρού διαλύματος υπερχλωρικού οξέους (HClO_4) 0,1 M σε αυτά με τελικό όγκο να διαμορφώνεται εκ νέου στο 1mL. Το καινούριο διάλυμα Νο 2 περιέχει τα ίδια ακριβώς αμινοξέα με το διάλυμα Νο 1 στις ίδιες ακριβώς συνθήκες μόνο που συγκέντρωσή τους είναι η μισή σε σχέση με το Νο 1. Αντιστοίχως παρασκευάζονται τα διαλύματα Νο 3-9. Ανάμεσα στις διάφορες αραιώσεις πραγματοποιείται ανάδευση του νεοσχηματισμένου διαλύματος με vortex.

Πίνακας 4.2.1.: Πίνακας Συγκέντρωσης του κάθε αμινοξέους των πρότυπων διαλυμάτων εργασίας.

Διάλυμα	No	Βαθμίδωση Συγκέντρωσης	Συγκέντρωση κάθε αμινοξέους		
			mg/500μL	μg/500μL	ng/500μL
	1	1	0,01	10	10000
	2	1/2	0,005	5	5000
	3	1/4	0,0025	2,5	2500
	4	1/8	0,00125	1,25	1250
	5	1/16	0,000625	0,625	625
	6	1/32	0,0003125	0,3125	312,5
	7	1/64	0,00015625	0,15625	156,25
	8	1/128	0,000078125	0,078125	78,125
	9	1/256	0,0000390625	0,0390625	39,0625

Τα διαλύματα στα οποία παρατηρείται γραμμική εξάρτηση, μεταξύ της έντασης του σήματος των κορυφών με την συγκέντρωση των διαλυμάτων, είναι τα Διαλύματα Νο 4-8.

Παρασκευή Διαλύματος 0,1 M Borax:

Σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL ογκομετείται η ποσότητα των 50 mL δισαπεσταγμένου νερού (ddH₂O), η οποία και τοποθετείται σε ποτήρι ζέσεως των 100 mL μαζί με μαγνήτη ανάδευσης. Στη συνέχεια ζυγίζονται 1,905 g Borax (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) τα οποία μεταφέρονται στο ποτήρι ζέσεως. Το διάλυμα αφήνεται σε ανάδευση μέχρι πλήρους διάλυσης της σκόνης. Έπειτα συλλέγεται και φυλάσσεται σε ογκομετρική φιάλη, καλυμμένη με αλουμινόχαρτο σε θερμοκρασία δωματίου.

Παρασκευή διαλύματος 0,03 M θειώδους Νατρίου (Na₂SO₃):

Σε ογκομετρική φιάλη ογκομετρείται η ποσότητα των 10 mL ddH₂O, η οποία και τοποθετείται σε ποτήρι ζέσεως των 50 mL μαζί με μαγνήτη ανάδευσης. Στη συνέχεια ζυγίζονται 0,0395 g Na₂SO₃ τα οποία μεταφέρονται στο ποτήρι ζέσεως. Το διάλυμα αφήνεται σε ανάδευση μέχρι πλήρους διάλυσης της σκόνης. Έπειτα συλλέγεται και φυλάσσεται σε ογκομετρική φιάλη στο ψυγείο.

Παρασκευή διαλύματος 0,0337 M όρθο-φθαλαλδεΐδης (OPA):

Με ακρίβεια ζυγίζονται 0,025 g OPA (Sigma-Aldrich) τα οποία και τοποθετούνται σε falcon των 10 mL. Ακολουθεί προσθήκη 5500 μL Διαλύματος Borax 0,1 M και το διάλυμα ανακατεύεται σε vortex μέχρι ολοκληρωτικής διάλυσης της σκόνης ~ 5 min . Έπειτα στο διάλυμα προστίθεται με πιπέτα ακριβείας 30 μL διαλύματος 0,03 M θειώδους Νατρίου (Na₂SO₃) και ακολουθεί εκ νέου ανάδευση στο vortex.

Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος κινητής φάσης:

Σε ογκομετρικό κύλινδρο του 1 L ογκομετρείται η ποσότητα 1 L ddH₂O, η οποία και τοποθετείται σε ποτήρι ζέσεως του 1 L μαζί με μαγνήτη ανάδευσης. Παράλληλα ζυγίζονται 14,7 g Κιτρικού Νατρίου (Na₃C₆H₅O₇) και 6,9 g μονόξινου Φωσφορικού Νατρίου (Na₂HPO₄) τα οποία και μεταφέρονται στο ποτήρι ζέσεως. Έπειτα ζυγίζονται 200 mg EDTA τα οποία και διαλύονται στο υπάρχων διάλυμα. Το διάλυμα αφήνεται σε ανάδευση μέχρι πλήρους διάλυσης των διαφόρων συστατικών. Στην πορεία ρυθμίζεται το pH του στην τιμή 5,6 με την χρήση 6 M HCl. Το διάλυμα συλλέγεται σε γυάλινη φιάλη και φυλάσσεται στο ψυγείο.

4.3. Ομογενοποίηση

Ομογενοποίηση αγνώστων δειγμάτων προς ανάλυση:

Αρχικά γίνεται λήψη των ιστών και συλλογή τους σε προζυγισμένα erpendorf. Μετά την περισυλλογή τα erpendorf ξαναζυγίζονται σε ζυγό ακριβείας με σκοπό την εύρεση του μεικτού βάρους (βάρος δείγματος + βάρος erpendorf). Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να γίνει υπολογισμός του καθαρού βάρους του ιστού (βάρος ιστού = (βάρος δείγματος + βάρος erpendorf) - βάρος Erpendorf)). Στην περίπτωση όπου δεν είναι δυνατόν να

πραγματοποιηθεί η ομογενοποίηση την ίδια μέρα τα δείγματα φυλάσσονται στους -80°C . Συνεχίζοντας γίνεται προσθήκη διαλύματος υπερχλωρικού οξέους (HClO_4) 0,1 M. Στους ιστούς που συλλέχθηκαν από το από την περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού (δείγματα PFC) γίνεται προσθήκη 400 μL διαλύματος υπερχλωρικού οξέους (HClO_4) 0,1 M ενώ στα δείγματα που συλλέχθηκαν από την περιοχή του εγκεφάλου BN (δείγματα BN) γίνεται προσθήκη 120 μL υπερχλωρικού οξέους 0,1 M. Τα erpendorf αναδεύονται σε υπέρηχους, έπειτα συλλέγονται και φυγοκεντρώνονται για 45 λεπτά στις 15000 στροφές/min. Με το πέρας της φυγοκέντρωσης απομονώνεται το υπερκείμενο υγρό με πιπέτα και τοποθετείται σε καινούρια Eppendorf, τα οποία και φυλάσσονται στους -80°C . Το υπερκείμενο αυτό αποτελεί το άγνωστο δείγμα ανάλυσης.

Κεφάλαιο 5. Σχεδιασμός Αναλυτικής Μεθόδου

Η παρούσα διπλωματική εργασία είχε ως σκοπό την δημιουργία μιας μεθόδου που θα ήταν ικανή να χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό αμινοξέων, τα οποία όχι μόνο βρίσκονται υπό φυσιολογικές συνθήκες στα νευρικά κύτταρα, αλλά έχουν την ικανότητα να δρουν ως νευροδιαβιβαστές. Ο καθορισμός των ιδιοτήτων (σταθερότητα, διαχωριστική ικανότητα κα.) μια τέτοιας μεθόδου επηρεάζεται από ποικίλους παράγοντες όπως είναι η συγκέντρωση συστατικών, η θερμοκρασία, το pH κα., για αυτό κρίθηκε αναγκαίο κατά την δημιουργία της να εξεταστεί ο κάθε παράγοντας ξεχωριστά και έπειτα συνδυαστικά όλοι μεταξύ τους. Ο σκοπός ήταν να βρεθεί ο βέλτιστος συνδυασμός κατά τον οποίο θα μπορούσε να επιτευχθεί ένας ικανοποιητικός αλλά και γρήγορος χρονικά διαχωρισμός.

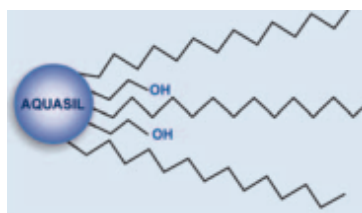
Πίνακας 5.1.: Παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την αποδοτικότητα μιας μεθόδου

HPLC Method	Παράγοντες
	pH κινητής φάσης
	Συγκέντρωση διαφόρων αντιδραστηρίων, τύπος αντιδραστηρίου
	Συγκέντρωση Άλατος (Ιοντική Ισχύς)
	Ρυθμιστικό Διάλυμα (Τύπος Άλατος)
	Συγκέντρωση πρόσθετων (π.χ. συμπλεκτικό αντιδραστήριο)
	Ταχύτητα ροής
	Θερμοκρασία στήλης
	Τύπος στήλης (παρτίδες ή/και προμηθευτές)
	Παράγοντες ανίχνευσης πχ UV: μήκος κύματος (λ_{max})
	Ικανότητες μηχανολογικού εξοπλισμού: (αυτόματος δειγματολήπτης)

Στη συνέχεια θα αναλυθούν ξεχωριστά οι διαφορετικοί παράγοντες καθώς επίσης και το πως διαμορφώθηκαν αυτοί κατά την διάρκεια της διπλωματικής εργασίας:

5.1. Τύπος στήλης

Ο τύπος της στήλης που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Thermo Scientific Aquasil C18 Dimension (mm) 250 x 4.6 with Particle Size (μ) 5. Η επιλογή της συγκεκριμένης στήλης έγινε με βάση την ικανότητά της να μπορεί να διαχωρίζει οργανικές ενώσεις σε υδατικά διαλύματα. Ειδικότερα ο συγκεκριμένος τύπος στήλης έχει την δυνατότητα να διατηρεί μια αρκετά καλή διαχωριστική ικανότητα (~110 ώρες συνεχή χρήση) σε έως και 100% υδατικά διαλύματα. Αυτή η ικανότητα της στήλης οφείλεται στο γεγονός ότι η σύσταση της στατικής της φάσης δεν είναι αποκλειστικά υδρόφοβες C18 ανθρακικές αλυσίδες, αλλά συμπεριλαμβάνεται σε αυτή ένα μικρό ποσοστό ανθρακικών αλυσίδων που στο τελευταίο άκρο τους έχουν εκτεθειμένη μια ελεύθερη υδροξυλομάδα. Με αυτό τον τρόπο αυτές οι πιο υδρόφιλες αλυσίδες βοηθούν ώστε να μην υπάρχει 'σπάσιμο της φάσης' ακόμα και σε 100% υδατικό διάλυμα, κάτι το οποίο ήταν επιθυμητό αφού το κύριο συστατικό της κινητής φάσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ddH₂O. Παρόλα αυτά η συνεχή χρήση της στήλης σε ποσοστά ACN μικρότερα του 5% φαίνεται να δυσχεραίνει σταδιακά την διαχωριστική της ικανότητα, με αποτέλεσμα να κρίνεται απαραίτητο να γίνονται ανά τακτά χρονικά διαστήματα κύκλοι αναγέννησης της στήλης ώστε να την επαναφέρουν στην αρχική της κατάσταση. Για να αποφευχθούν και αυτοί οι κύκλοι, αλλά επίσης και η χρήση της στήλης σε συνθήκες οι οποίες δεν είναι ιδανικές για αυτήν, τέθηκε το όριο του 4% ACN στο οποίο φαίνεται η στήλη να λειτουργεί χωρίς να υπάρχει κάποιο πρόβλημα.

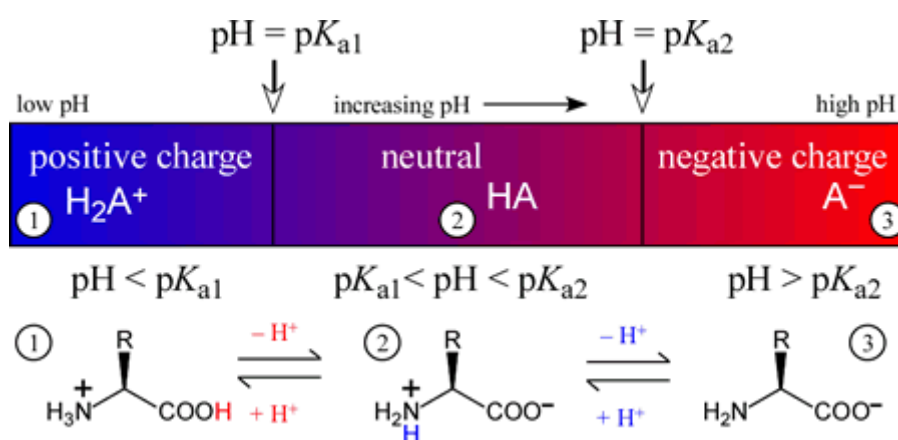


Εικόνα 5.1.1.: Εικονική αναπαράσταση των ανθρακικών αλυσίδων που αποτελούν την στατική φάση της στήλης.

5.2. pH κινητής φάσης

Αποτελεί τον σημαντικότερο παράγοντα αφού η επίδρασή του είναι καθοριστική στην διαχωριστική ικανότητα της μεθόδου. Πιο συγκεκριμένα το pH έχει την ικανότητα να

καθορίζει το φορτίο που έχουν τα αμινοξέα κατά την διάρκεια του διαχωρισμού τους. Τα αμινοξέα από την φύση τους είναι επαμφοτερίζοντες ενώσεις, το οποίο σημαίνει ότι φέρουν τουλάχιστον δύο διαφορετικές πλευρικές ομάδες στο μόριο τους, που τους δίνουν την δυνατότητα να δράσουν τόσο σαν οξέα όσο και σαν βάσεις. Αυτές είναι η αμινομάδα η οποία σε σχετικά ουδέτερο pH όπως είναι το αίμα μπορεί και δρα σαν βάση δεσμεύοντας κατιόντα υδρογόνου, ενώ αντιθέτως η καρβοξυλομάδα στις ίδιες συνθήκες δρα σαν οξύ διώχνοντας το κατιόν υδρογόνου. Ωστόσο τόσο η πρόσληψη όσο και η αποβολή κατιόντων υδρογόνου (H^+) προσδίδουν φορτία στην ένωση, με την πρόσληψη να την φορτίζει θετικά ενώ η αποβολή να την φορτίζει αρνητικά.



Εικόνα 5.2.1.: Διαμόρφωση φορτίου αμινοξέους σε διαφορετικά pH, σε όξινα pH το αμινοξύ φορτίζεται θετικά, σε βασικά αρνητικά ενώ σε ουδέτερα διαλύματα το αμινοξύ εμφανίζει τόσο θετικό όσο και αρνητικό φορτίο (Nelson DL & Cox MM)

Αντιστοίχως το προϊόν της αντίδρασης του ορα με το εκάστοτε αμινοξύ ή αμίνη θα έχει την ικανότητα να αλλάζει το φορτίο του αναλόγως των συνθηκών που βρίσκεται. Συνεπώς γίνεται κατανοητό ότι το pH μπορεί να καθορίσει την συνολική πολικότητα του προϊόντος της αντίδρασης, κάνοντας το πιο θετικά ή πιο αρνητικά φορτισμένο. Η αλλαγή αυτής της πολικότητας όχι μόνο αλλάζει τις φυσικοχημικές ιδιότητες (σχήμα στο χώρο, συνολικό φορτίο κα.) της ένωσης αλλά επηρεάζει και τον τρόπο πρόσδεσής της, συνεπώς και τον τρόπο αλληλεπίδρασής της με τη στατική φάση της στήλης. Σαν αποτέλεσμα αλλάζει ο χρόνος κατακράτησης της ένωσης εντός της στήλης, το οποίο με την σειρά του επηρεάζει τον χρόνο που χρειάζεται η ένωση για να φτάσει στον ανιχνευτή. Άρα ήταν απαραίτητο να βρεθεί ένα pH, κατά το οποίο τα προϊόντα της

αντίδρασης του ορα με τα αμινοξέα δεν θα έχουν μεταξύ τους τον ίδιο τον ίδιο χρόνο έκλουσης, συνεπώς οι χρωματογραφικές κορυφές τους δεν θα αλληλεπικαλύπτονται.

Λόγω των προδιαγραφών της στήλης το εύρος του pH έπρεπε να περιοριστεί μεταξύ των τιμών 2 και 8. Σε περίπτωση που κρινόταν αναγκαία η χρήση κάποιου pH έξω από το εύρος αυτό, θα έπρεπε να επιλεγθεί κάποιο διαφορετικό είδος στήλης, διότι η χρήση της συγκεκριμένης στήλης σε pH εκτός αυτών των ορίων που αναφέρθηκαν, έχει ως αποτέλεσμα την σταδιακή αποσύνθεση της στατικής φάσης δηλαδή στην καταστροφή της στήλης.

Για αυτό το λόγο επιλέχθηκε να γίνουν πειράματα σε τιμές pH 4 έως pH 7 που έχει φανεί ότι τα αμινοξέα μπορούν να διαχωριστούν επαρκώς χωρίς να υπάρχει κάποιο πρόβλημα (Bongiovanni et al., 2001; Melo et al., 2015)

Παρατηρήσεις:

Σε ιδιαίτερα υψηλά pH = 6,5-7 δεν μπόρεσε να γίνει η ανίχνευση των όξινων αμινοξέων (γλουταμικό οξύ και ασπαρτικό οξύ). Λόγω του ότι το γλουταμικό οξύ ήταν απαραίτητο να συμπεριληφθεί στη μέθοδο αυτή, το συγκεκριμένο εύρος τιμών απορρίφθηκε.

Σε ενδιάμεσα pH = 6-6,5 δεν μπόρεσε να γίνει διαχωρισμός του ασπαρτικού οξέος και του γλουταμικού αφού τα αμινοξέα είχαν πολύ κοντινούς χρόνους έκλουσης.

Σε πιο όξινα pH = 4-5 το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) είχε εξαιρετικά μεγάλο χρόνο έκλουσης >30min, κάτι το οποίο με τη σειρά του καθιστούσε την μέθοδο εξαιρετικά χρονοβόρα σε αυτά τα πλαίσια.

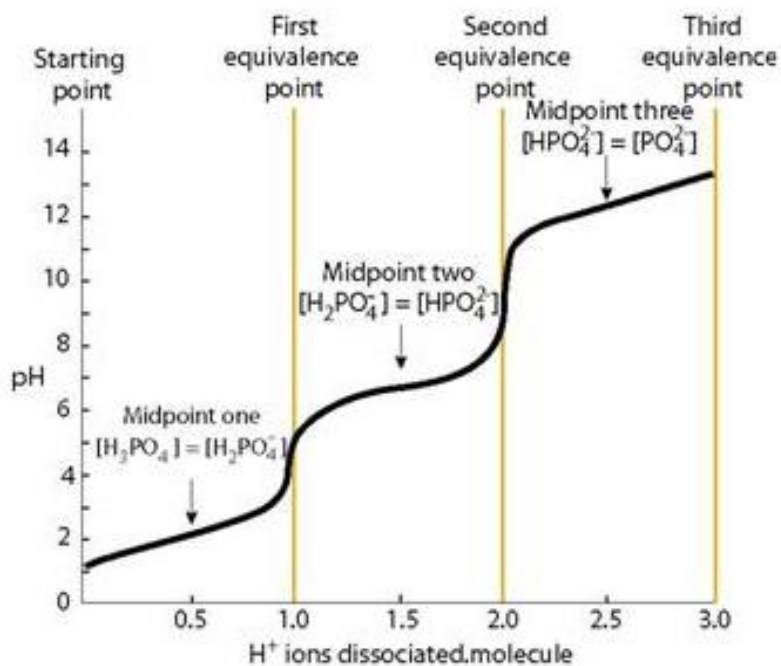
Καταλήγοντας, το εύρος pH = 5-6 έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα αφού σε αυτό υπήρξε σχετικά ικανοποιητικός διαχωρισμός των υπό ανάλυση αμινοξέων, για αυτό και πραγματοποιήθηκαν περισσότερα πειράματα εντός του εύρους αυτού.

Συγκεκριμένα σε τιμή pH = 5,8 οι χρόνοι έκλυσης μεταξύ του γλουταμικού και του ασπαρτικού οξέος καθώς επίσης και της αργινίνης με το GABA είναι πολύ κοντινοί, οδηγώντας σε αλληλοεπικάλυψη των κορυφών τους. Ενώ σε τιμή pH = 5,4 παρατηρείται αλληλοεπικάλυψη των κορυφών της σερίνης με του γλουταμικού οξέους. Ωστόσο η ενδιάμεση τιμή του 5,6 κατάφερε να δώσει τα καλύτερα αποτελέσματα αφού υπήρξε τέλειος διαχωρισμός μεταξύ των κορυφών χωρίς να υπάρξει κάποιου είδους αλληλοεπικάλυψη. Για αυτό το λόγο επιλέχθηκε αυτή η τιμή για την διεξαγωγή των πειραμάτων.

5.3. Ρυθμιστικό διάλυμα (τύπος άλατος)

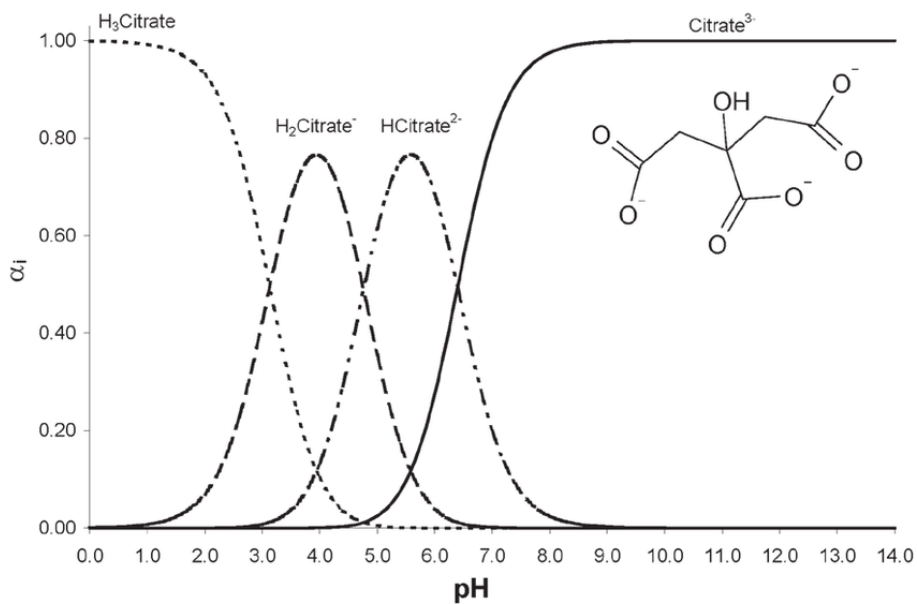
Αρχικά επιλέχθηκε το φωσφορικό νάτριο (Na_2HPO_4) ως κύριο συστατικό του ρυθμιστικού διαλύματος. Ωστόσο με την επιλογή της τιμής 5,6 για pH της μεθόδου παρατηρήθηκε πρόβλημα με την ταχύτητα αποκατάστασης του baseline, μετά την εισαγωγή του δείγματος ανάλυσης. Η λύση αυτού του προβλήματος επετεύχθη με την εισαγωγή του κιτρικού οξέος σαν δεύτερο ρυθμιστικό διάλυμα.

Πιο συγκεκριμένα το εύρος της ρυθμιστικής ικανότητας του $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ορίζεται μεταξύ pH = 5,8-8,0. Συνεπώς όταν η κινητή φάση έχει τιμή pH=5,6 το συγκεκριμένο διάλυμα δεν έχει την κατάλληλη ρυθμιστική ικανότητα να διατηρήσει σταθερό το pH του, που με την σειρά του δημιουργεί μια σχετική αστάθεια στο baseline μετά την εισαγωγή του δείγματος. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται η αδυναμία ταχείας επαναφοράς του baseline, το οποίο με την σειρά του δυσχεραίνει την διαδικασία την διαδικασία της βαθμονόμησης (calibration). Το πρόβλημα αυτό έρχεται να ενισχύσει το γεγονός ότι το διάλυμα προς ανάλυση είναι αναγκαίο να βρίσκεται σε ισχυρά βασικές συνθήκες (θα αναλυθεί περαιτέρω στην πορεία). Για αυτό ήταν αναγκαίο να γίνει επιλογή ενός νέου ρυθμιστικού διαλύματος, που θα είχε την ικανότητα να διατηρήσει σταθερό το pH του και κατά συνέπεια το baseline, μετά την εισαγωγή του δείγματος.



Εικόνα 5.3.1.: Γραφική απεικόνιση του εύρος ρυθμιστικής ικανότητας διαφορετικών τιμών pH φωσφορικών διαλυμάτων. Στην απεικόνιση παρατηρείται η ύπαρξη τριών περιοχών στις οποίες το διάλυμα φωσφορικών έχει την ικανότητα να διατηρεί το pH του σταθερό και δύο εύρη περιοχών στις οποίες η μεταβολή του pH του είναι εξαιρετικά απότομη. (J. Mendham , R.C. Denney)

Το buffer κιτρικού είναι ένα διάλυμα που έχει εύρος ρυθμιστικής ικανότητας σε τιμές $\text{pH} = 3,0-6,6$ (Heller et al., 2012) καθιστώντας το έτσι ένα εξαιρετικά σταθερό διάλυμα στην τιμή 5,6. Ωστόσο η χρήση εξ ολοκλήρου του κιτρικού ως διάλυμα της κινητής φάσης φαίνεται να μειώνει αισθητά τον χρόνο έκλουσης όλων των συστατικών, φέρνοντας έτσι πιο κοντά τις κορυφές των αμινοξέων στο χρωματογράφημα, προκαλώντας έτσι μερική αλληλοεπικάλυψη μεταξύ τους.



Εικόνα 5.3.2.: Εύρος ρυθμιστικής ικανότητας διαλύματος κιτρικών. Από το διάγραμμα φαίνεται ότι από τιμή $\text{pH}=3$ έως $\text{pH}=7$ στο διάλυμα κιτρικών συνυπάρχουν 3 διαφορετικές ιοντικές μορφές του άλατος, κάνοντας το εξαιρετικά σταθερό σε αυτό το εύρος pH . (Heller et al., 2012)

Για αυτό το λόγο αποφασίστηκε η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος να είναι κατά το ήμισυ φωσφορικό 0,05 M και κατά το υπόλοιπο ήμισυ κιτρικό 0,05 M, στην οποία φαίνεται ότι το διάλυμα έχει αρκετά ισχυρή ρυθμιστική ικανότητα ώστε να διατηρεί το pH του σταθερό χωρίς να μειώνει δραστικά τον χρόνο έκλουσης των ενώσεων.

5.4. Συγκέντρωση άλατος (Ιοντική Ισχύς)

Λόγω των προδιαγραφών της στήλης η συνολική συγκέντρωση του ρυθμιστικού θα ήταν καλό να περιοριστεί μεταξύ των τιμών 0,05-0,1 M. Σε πειράματα που έγιναν με τιμή συγκέντρωσης 0,05 M, με σκοπό την αύξηση της έντασης των κορυφών των ενώσεων προς ανάλυση, δεν παρατηρήθηκε καμία σχετική διαφορά σε σχέση με την τιμή 0,1 M. Ωστόσο φαίνεται πως η μείωση της συγκέντρωσης και κατ' επέκταση ιοντικής ισχύς του ρυθμιστικού διαλύματος, μειώνει την ρυθμιστική ικανότητα του διαλύματος που όπως αναφέρθηκε προκαλεί αστάθεια στο baseline.

Από την άλλη πλευρά η αύξηση της συγκέντρωσης της κινητής φάσης, θα δημιουργούσε περαιτέρω προβλήματα αφού η στήλη δεν έχει φτιαχτεί να λειτουργεί σε τέτοιες συνθήκες, με το πιο πιθανό αποτέλεσμα να είναι η φραγή της. Για αυτό το λόγο επιλέχθηκε η χρήση διαλύματος με συγκέντρωση 0,1 M.

5.5. Συγκέντρωση πρόσθετων (π.χ. Συμπλεκτικό αντιδραστήριο)

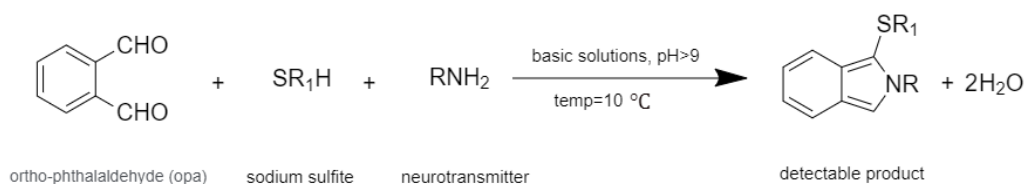
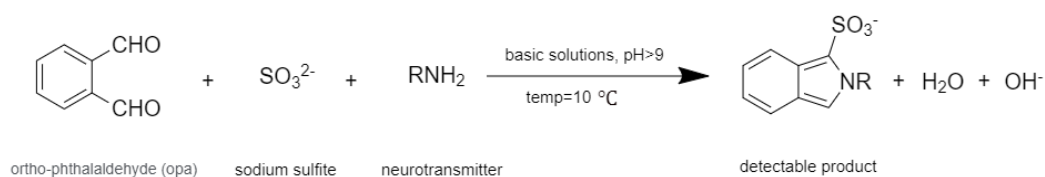
Ένα επιπρόσθετο συστατικό που χρησιμοποιήθηκε στην κινητή φάση ήταν το αιθυλοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA). Το EDTA είναι ο γνωστότερος εκπρόσωπος μιας σειράς ενώσεων, οι οποίες ονομάζονται αμινοπολυκαρβοξυλικά οξέα και χαρακτηρίζονται από μια εξαιρετικά έντονη συμπλεκτική ικανότητα ως προς τα περισσότερα μεταλλοϊόντα. Ειδικότερα λόγω της φύσης των αμινομάδων και των καρβοξυλομάδων που υπάρχουν στο μόριο του μπορεί και δρα σαν χηλικός υποκαταστάτης, σχηματίζοντας χηλικά σύμπλοκα με ελεύθερα κατιόντα μετάλλων. Έτσι το EDTA έχει την ικανότητα να δεσμεύει τα ελεύθερα μεταλλοϊόντα που υπάρχουν εντός της στήλης αδρανοποιώντας τα. Τα ιόντα αυτά υπό κανονικές συνθήκες μπορούν και οξινίζουν ελαφρώς την στήλη, διαταράσσοντας ελαφρώς την συνοχή του pH εντός της, κάτι που με την σειρά του δυσχεραίνει τον χρωματογραφικό διαχωρισμό. Επίσης, μπορούν και σχηματίζουν ασθενείς δεσμούς με οργανικές ενώσεις, δηλαδή δημιουργούν σύμπλοκα με αυτές, το οποίο οδηγεί στην περαιτέρω κατακράτηση των ουσιών αυτών εντός της στήλης. Το αποτέλεσμα αυτών των αλληλοεπιδράσεων δεν είναι μόνο η αύξηση του χρόνου έκλουσης αλλά και η διάρκεια έκλουσης της εκάστοτε ένωσης που αναλύεται, κάτι που οδηγεί στην εμφάνιση πιο κοντών και ευρείων κορυφών, στις οποίες είναι αδύνατον να υπάρξει επαρκής διαχωρισμός. Με την προσθήκη του EDTA επιτυγχάνεται η δημιουργία πιο ψηλών και βραχέων χρονικά κορυφών κάτι το οποίο είναι επιθυμητό σε κάθε χρωματογραφικό διαχωρισμό, καθώς επίσης παύουν να υπάρχουν αλληλοεπικαλύψεις μεταξύ των κορυφών.

Ωστόσο σε μεγάλες συγκεντρώσεις το EDTA μπορεί να δράσει σαν αποδιατακτικός παράγοντας για την αντίδραση του ορα με τα αμινοξέα. Για αυτό το λόγο έγιναν 4 διαφορετικά πειράματα. Επιλέχθηκαν οι ποσότητες 5, 10, 20, 30 mg EDTA/ 100mL κινητής φάσης. Παρατηρήθηκε ότι όσο αυξάνονταν τα mg του EDTA/ mL κινητής φάσης, τόσο βελτιωνόταν η εικόνα του χρωματογραφήματος με την βέλτιστη να

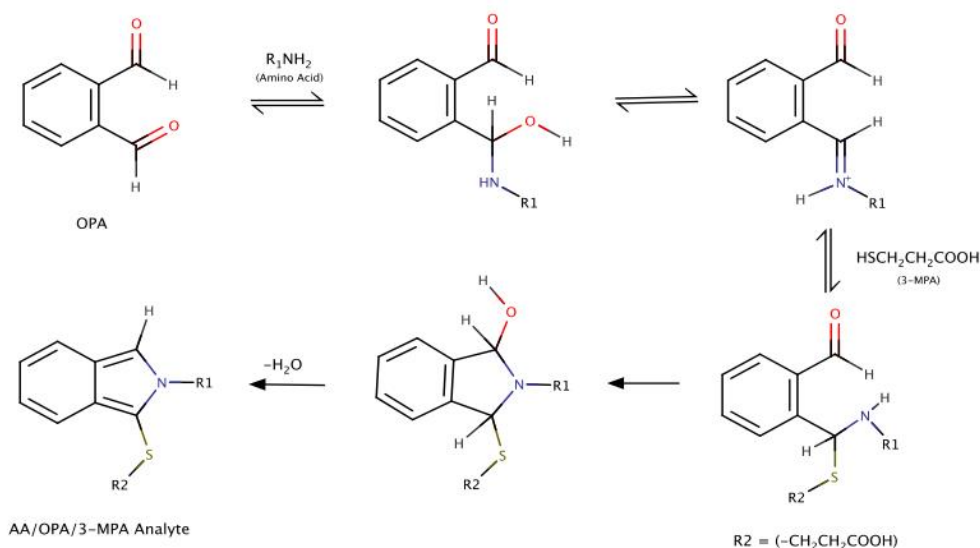
λαμβάνεται από το διάλυμα των 20 mg . Ανάμεσα στα διαλύματα των 20 mg με τα 30 mg δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά. Για αυτό επιλέχθηκε η χρήση των 20 mg EDTA/ 100mL κινητής ή διαφορετικά 200 mg EDTA/ 1L.

5.6. Συνθήκες Αντίδρασης, Τύπος αντιδραστηρίου

Όπως φαίνεται και από τις εικόνες 5.6.1.,2. για να μπορέσει να γίνει η αντίδραση της παραγωγοποίησης είναι απαραίτητη η ύπαρξη μιας αμινομάδας (νευροδιαβιβαστής), το αντιδραστήριο όρθο-φθαλαλδεΐδη (opa) καθώς επίσης και η ύπαρξη μιας πηγής θείου. Επίσης για να μπορέσει να πραγματοποιηθεί η αντίδραση πρέπει οι συνθήκες που επικρατούν στο διάλυμα να είναι αρκετά βασικές. Σε περίπτωση που το περιβάλλον δεν είναι αρκετά βασικό, η αντίδραση δεν μπορεί να ολοκληρωθεί, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να γίνει ανίχνευση των ενώσεων από την HPLC .



Εικόνα 5.6.1. και 2.: Αντίδραση όρθο-φθαλαλδεΐδης με αμινοξύ υπό την παρουσία θειώδους νατρίου και πηγή θειώλης αντίστοιχα σε βασικές συνθήκες



Εικόνα 5.6.3.: Μηχανισμός αντίδρασης όρθο-φθαλαλδεΐδης με αμινοξύ υπό την παρουσία θειόλης (μερκαπτοπροπιονικό οξύ) (Cuchiaro & Laurens, 2019)

5.6.1. Συνθήκες Αντίδρασης

Παρατηρήθηκε ότι σε συνθήκες $pH < 8$ δεν μπορεί να υπάρξει προϊόν, ενώ αντιθέτως σε συνθήκες $pH > 9$ η απόδοση της αντίδρασης βελτιστοποιείται. (Zandy et al., 2017) Πιο συγκεκριμένα το διάλυμα που δημιουργείται μετά την ανάμιξη του διαλύματος oρα με το δείγμα (standard ή άγνωστο) θα πρέπει να έχει βασικό pH. Άρα το διάλυμα oρα θα πρέπει να είναι αρκετά βασικό, ώστε να μπορέσει να υπερνικήσει το όξινο περιβάλλον (υπερχλωρικό) του δείγματος, αλλά επίσης μετά από αυτή την εξουδετέρωση το τελικό διάλυμα θα πρέπει να έχει ιδανικά $pH > 9$. Ωστόσο όσο μεγαλύτερο είναι το pH του τελικού διαλύματος, τόσο πιο δύσκολο θα είναι να ανταπεξέλθει το ρυθμιστικό διάλυμα της κινητής φάσης στην εισαγωγή του. Συνεπώς όπως αναφέρθηκε το διάλυμα πριν την εισαγωγή του στον χρωματογράφο πρέπει να είναι βασικό ώστε να μπορεί να γίνει η αντίδραση της παραγωγοποίησης, ωστόσο δεν πρέπει να είναι πολύ βασικό γιατί η ιοντική ισχύς της κινητής φάσης ίσως να μην επαρκεί για την ταχεία εξουδετέρωσή του, αυξάνοντας έτσι τον χρόνο που χρειάζεται για να αποκατασταθεί το baseline.

Με βάση τα παραπάνω επιλέχθηκαν 3 πιθανά διαλύματα:

A) Διάλυμα καυστικού νατρίου (NaOH) με pH 10 και 11

B) Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με pH 9, 10 και 11

Γ) Διαλύματος 0,1 M Borax με pH 10,3

Διάλυμα καυστικού νατρίου:

Λόγω του ότι το συγκεκριμένο διάλυμα δεν έχει καθόλου ρυθμιστική δυνατότητα κρίθηκε απαραίτητη η χρήση ενός έντονα βασικού διαλύματος. Κατά την διάρκεια της αντίδρασης μεταξύ του ορα και των νευροδιαβιβαστών καταναλώνονται ανιόντα υδροξυλίου. Αυτό σημαίνει ότι όσο προχωράει η αντίδραση τα ανιόντα που υπάρχουν ελεύθερα στο διάλυμα μειώνονται, μειώνοντας έτσι το pH σταδιακά. Έτσι πρέπει η αρχική ποσότητα των ελεύθερων υδροξυλίων να επαρκεί για να γίνει η αντίδραση καθώς επίσης με το πέρας της αντίδρασης να υπάρχει επιπλέον ποσότητα η οποία να κρατά το $\text{pH} > 8$. Στην περίπτωση όπου τα υπάρχοντα υδροξυλικά δεν επαρκούν για να διατηρήσουν το $\text{pH} > 8$ η αντίδραση διακόπτεται και δεν μπορεί να υπάρξει προϊόν, ασχέτως αν υπάρχει περίσσεια όλων των αντιδρώντων. Με αυτόν τον τρόπο εισάγονται σφάλματα στη μέθοδο, αφού η ποσότητα των νευροδιαβιβαστών που θα υπολογιζόταν θα ήταν αναληθής.

Και τα δύο διαλύματα καυστικού νατρίου που εξετάστηκαν δεν έδωσαν θετικά αποτελέσματα, δηλαδή δεν παρατηρήθηκαν χρωματογραφικές κορυφές. Συνεπώς η ποσότητα των υδροξυλίων φαίνεται ότι δεν ήταν επαρκής για να ολοκληρωθεί η αντίδραση της παραγωγοποίησης. Για αυτό επιλέχθηκε η χρήση ενός ρυθμιστικού διαλύματος ως μέσο διάλυσης του ορα, το οποίο λόγω της ρυθμιστικής του ικανότητας θα μπορούσε να διατηρήσει σχετικά σταθερό το pH ακόμα και μετά την εισαγωγή του όξινου διαλύματος υπερχλωρικού.

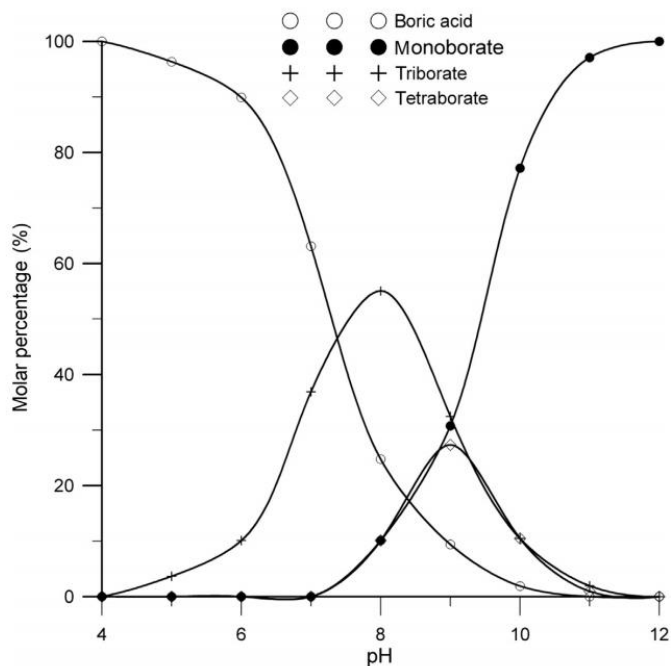
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών:

Όπως αναφέρθηκε για την παρασκευή της κινητής φάσης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα φωσφορικών και κιτρικών. Για αυτό η χρήση ενός ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών ως μέσο διάλυσης του ορα κρίθηκε λογική, μιας και το διάλυμα αυτό ομοιάζει εξαιρετικά στην κινητή φάση. Συνεπώς η απορρόφηση αυτού του διαλύματος από την κινητή φάση μετά την εισαγωγή του θα ήταν πολύ πιο εύκολη σε σχέση με ένα

άλλο διάλυμα, με αποτέλεσμα να μην υπάρχουν προβλήματα όπως αστάθεια στο baseline κα. Αρχικά έγινε σύγκριση μεταξύ των pH 9 και 10, με το τελευταίο να αποδίδει τα καλύτερα αποτελέσματα, δηλαδή παρατηρήθηκαν πιο ισχυρές κορυφές, κάτι που σημαίνει ότι η επιπλέον ποσότητα των υδροξυλίων βοηθά σε καλύτερες αποδόσεις. Για αυτό και αποφασίστηκε να φτιαχτεί ένα διάλυμα με pH=11 και να συγκριθεί με αυτό των 10. Αντίστοιχα υπήρξαν καλύτερα αποτελέσματα ξανά. Έτσι κρίθηκε ότι η ποσότητα των υδροξυλίων ακόμα και σε pH=11 θα μπορούσε να μην ήταν επαρκής για να γίνει τελείως η αντίδραση. Όπως και στο καυστικό νάτριο έτσι και το φωσφορικό σε εύρος τιμών pH = 9 έως 11 χάνει την ρυθμιστική του ικανότητα και την ανακτά ξανά σε τιμή pH > 11,5 . Εν ολίγοις το διάλυμα φωσφορικών έχει την δυνατότητα να δρα σαν ρυθμιστικό διάλυμα σε τιμές pH 1,0 - 3,5, 5,8 - 8 και 11,5 - 13 όπως φαίνεται και στην Εικόνα 5.3.1. Ωστόσο η χρήση ενός τέτοιου διαλύματος με pH=12 πιθανότατα να δημιουργούσε περαιτέρω προβλήματα στο μέλλον. Αρχικά ένα τέτοιο διάλυμα θα ήταν πολύ δύσκολο να εξουδετερωθεί ταχέως από την κινητή φάση και επιπλέον η δημιουργία του θα ήταν εξαιρετικά δύσκολη. Σε υψηλές τιμές pH το πεχάμετρο χάνει την ικανότητά του να ανιχνεύει ορθώς το pH του διαλύματος με αποτέλεσμα η τιμή που θα αναγραφόταν σε αυτό κατά την διάρκεια της εξουδετέρωσης να μην ήταν η αληθινή. Συνεπώς ο υπολογισμός του πραγματικού pH θα ήταν αδύνατος.

Διάλυμα 0,1 M Borax

Για αυτό το λόγο αποφασίστηκε η χρήση διαλύματος 0,1 M Borax με pH 10,3 το οποίο εμφανίζει ρυθμιστική ικανότητα σε αυτό το εύρος pH. Συνεπώς με τη χρήση αυτού του διαλύματος υπάρχει επάρκεια υδροξυλίων ώστε να μπορέσει να πραγματοποιηθεί η αντίδραση δίνοντας τα καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τα άλλα δύο διαλύματα. Παράλληλα μετά την εισαγωγή του στον χρωματογράφο δεν παρατηρήθηκε κάποιο πρόβλημα, το οποίο σημαίνει ότι η ιοντική ισχύς της κινητής φάσης επαρκεί για να το εξουδετερώσει.



Εικόνα 5.6.1.1.: Εύρος ρυθμιστικής ικανότητας βορικού οξέος (Dydo & Turek, 2015)

5.6.2. Τύπος αντιδραστηρίου, Επιλογή κατάλληλου αντιδρώντος

Αμινομάδα (νευροδιαβιβαστής): Λόγω του ότι αποτελεί πλευρική ομάδα των ενώσεων προς ανίχνευση, η επιλογή κάποιου διαφορετικού αντιδραστηρίου που θα μπορούσε να την αντικαταστήσει είναι αδύνατη.

όρθο-φθαλαλδεΐδη (ora)

Η όρθο-φθαλαλδεΐδη είναι μια ένωση η οποία έχει την ικανότητα να αντιδρά με αμινομάδες καθιστώντας τες ηλεκτροενεργές. Με αυτόν τον τρόπο ενώσεις όπως είναι τα αμινοξέα, τα οποία υπό κανονικές συνθήκες δεν θα μπορούσαν να ανιχνευτούν από το ηλεκτρόδιο, γίνονται ανιχνεύσιμα. Η όρθο-φθαλαλδεΐδη δεν είναι η μοναδική ένωση που έχει αυτή την ικανότητα αλλά υπάρχουν και άλλες ενώσεις που μπορούν να δράσουν με παρόμοιο τρόπο όπως είναι , οι ναυθαλέν-2,3-δικαρβοξυλαλδεΐδη (NDA) καθώς και η ανθρακενο-2,3-δικαρβοξυλαλδεΐδη (ADA) (Gyimesi-Forrás et al., 2005) . Ωστόσο οι τελευταίες ενώσεις χρησιμοποιούνται κυρίως σε HPLC αναλύσεις όπου η ανίχνευση γίνεται μέσω φθορισμού. Από την άλλη πλευρά η όρθο-φθαλαλδεΐδη είναι γνωστό ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε HPLC-ED καθώς επίσης είναι μια ένωση η

οποία έχει δοκιμαστεί ποικίλες φορές για αντίστοιχα πειράματα στο παρελθόν από το δυναμικό της ομάδας Νευροψυχοφαρμακολογίας, του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας, Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ (Nikolaos Kokras et al., 2020) χωρίς να υπάρχουν προβλήματα. Για αυτό και επιλέχθηκε εκ νέου για την μέθοδο αυτή.

Θειομάδα

Όπως αναφέρθηκε για να μπορέσει να ολοκληρωθεί η συγκεκριμένη αντίδραση είναι απαραίτητη η ύπαρξη μιας θειομάδας. Στο παρελθόν υπήρχε η τάση για χρήση διαφόρων θειολών με το πιο κλασσικό παράδειγμα να αποτελεί η β-μερκαπτοαιθανόλη C_2H_6OS . Ωστόσο έχει παρατηρηθεί ότι τα προϊόντα της αντίδρασης της παραγωγοποίησης με την χρήση της μερκαπτοαιθανόλης έχουν μικρό χρόνο ημιζωής, είναι δηλαδή εξαιρετικά ασταθή και η ανίχνευσή τους θα πρέπει να γίνεται ταχέως. Για αυτό τον λόγο τα τελευταία χρόνια έχει υπάρξει στροφή στην χρήση τόσο της αιθανοθειόλης όσο και του 3-μερκαπτοπροπιονικού οξέους ως πηγές θείου τα οποία έχουν την τάση να δίνουν πολύ πιο σταθερά προϊόντα. (Molnár-Perl, 2001) Μια ακόμα εναλλακτική είναι ότι αντίδραση αυτή μπορεί να ολοκληρωθεί παρουσία και άλλων θειομάδων όπως είναι το θειώδες νάτριο $NaSO_3$ καθώς και το μεταθειώδες νάτριο $Na_2S_2O_5$ αποφεύγοντας έτσι όλα τα αρνητικά τα οποία παρουσιάζονται με την χρήση θειολών. (Zandy et al., 2017)

Στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε η χρήση τόσο της β-μερκαπτοαιθανόλης όσο και του θειώδες όσο και του μεταθειώδες νατρίου με σκοπό την εύρεση του καταλληλότερου αντιδραστήριου, με το οποίο θα μπορούσαν να παρθούν τα καλύτερα αποτελέσματα.

β-μερκαπτοαιθανόλη

Όπως αναφέρθηκε και στην παρασκευή του θειώδους νατρίου (Κεφάλαιο 4, *Παρασκευή διαλύματος 0,03 M θειώδους Νατρίου (Na_2SO_3)*), αρχικά έγινε παρασκευή διαλύματος 10mL 0,03M β-μερκαπτοαιθανόλης. Επιλέχθηκε η ποσότητα των 50μL ως αρχική προσθήκη στο διάλυμα του ορα (5,5mL διαλύματος Borax με 25mg ορα). Με την χρήση της συγκεκριμένης ποσότητας φάνηκε ότι το σήμα που λαμβάνεται από τις κορυφές δεν ήταν επαρκές ώστε να μπορέσει να γίνει ποσοτικοποίησή τους. Για αυτό

και έγινε χρήση περαιτέρω ποσότητας (διπλάσιας 100 μL) αυτού του αντιδραστηρίου, χωρίς ωστόσο να παρατηρηθεί κάποιο καλύτερο αποτέλεσμα. Από την άλλη πλευρά με τη χρήση λιγότερης ποσότητας (υποδιπλάσια 25 μL) δεν ανιχνεύτηκε καμία ποσότητα των αντιδρώντων από τον χρωματογράφο, αρά η ποσότητα δεν επαρκούσε για να γίνει η αντίδραση. Λόγω της ήδη υπάρχουσας γνώσης ότι η μερκαπτοαιθανόλη έχει την τάση να δίνει ασταθή προϊόντα, όπως και επίσης ότι για την μερική σταθεροποίηση αυτών μπορεί να γίνει η χρήση κάποιου οργανικού διαλύτη, επιλέχθηκε να γίνει σταδιακή προσθήκη αιθανόλης καθαρότητας HPLC με σκοπό την βελτίωση των αποτελεσμάτων (Bailey et al., n.d.). Ωστόσο η προσπάθεια αυτή δεν απέφερε θετικά αποτελέσματα, για αυτό και απορρίφθηκε το συγκεκριμένο αντιδραστήριο.

Θειώδες και μεταθειώδες νάτριο

Κατά αντιστοιχία παρασκευάστηκαν διαλύματα των 10mL συγκέντρωσης 0,03M τόσο της μιας ένωσης όσο και της άλλης. Όπως και με την μερκαπτοαιθανόλη έγινε αρχικά προσθήκη 50 μL από το κάθε διάλυμα για την παρασκευή του διαλύματος (OPA). Και στις δύο περιπτώσεις φάνηκε ότι η ποσότητα του αντιδραστηρίου ήταν επαρκής για να προκαλέσει υπερχειλίση (overflow) στη στήλη, με την διαφορά ότι στην περίπτωση του μεταθειώδους το σήμα της υπερχειλίσης να είναι πολύ πιο έντονο. Για αυτό το λόγο παρασκευάστηκαν νέα διαλύματα (OPA) στα οποία έγινε προσθήκη 25 μL από το κάθε διάλυμα. Στην περίπτωση όπου το διάλυμα εξεταζόταν μόνο του (blank), παρατηρήθηκε ότι το σήμα της υπερχειλίσης είχε μειωθεί πάρα πολύ. Επιπλέον όταν το διάλυμα αντιδρούσε με σε αναλογία 1:1 με διάλυμα stock ή με κάποιο άγνωστο δείγμα το σήμα της υπερχειλίσης εξαφανιζόταν τελείως στην περίπτωση του θειώδους ενώ στην περίπτωση του μεταθειώδους εμφανιζόταν αμυδρά. Αυτό συνέβαινε επειδή η νέα ποσότητα που θειώδους καταναλωνόταν τελείως κατά την διάρκεια της αντίδρασης. Έτσι η επιπλέον εκείνη ποσότητά του, που προκαλούσε την υπερχειλίση δεν υφίστατο πια στο διάλυμα, κάτι που ωθούσε στην εξαφάνιση του σήματος της υπερχειλίσης. Ωστόσο αυτό σημαίνει ότι υπάρχει μια σχετικά μικρή ποσότητα των νευροδιαβιβαστών ή οποία δεν αντέδρασε, γιατί έχει καταναλωθεί όλη η ποσότητα του θειώδους. Για αυτό με διάφορες δοκιμές φάνηκε ότι η προσθήκη 30 μL στο διάλυμα (OPA) είναι αρκετή ώστε να μην παρατηρηθεί υπερχειλίση της στήλης, χωρίς ωστόσο να υπάρχουν ελεύθερα μόρια νευροδιαβιβαστών στο διάλυμα τα οποία δεν αντέδρασαν. Όπως γίνεται κατανοητό το μεταθειώδες νάτριο απορρίφθηκε λόγω του ότι το σήμα

που έδινε στον ανιχνευτή ακόμα και μετά την μείωση της ποσότητάς του ήταν αρκετά αισθητό. Κάτι το οποίο είναι λογικό αφού παρατηρώντας τον μοριακό τύπο των ενώσεων αυτών ουσιαστικά η συγκέντρωση των θειομάδων του μεταθειώδους είναι η διπλάσια σε σχέση με αυτή του θειώδους. Αναλογικά η υποδιπλάσια τιμή του μεταθειώδους σε σχέση με το θειώδες θα έπρεπε να δίνει αντίστοιχα αποτελέσματα δηλαδή κατά αντιστοιχία η προσθήκη 15μL διαλύματος συγκέντρωσης 0,03M μεταθειώδους στο διάλυμα ορα.

5.7. Χρήση Αυτόματου δειγματολήπτη

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με την χρήση αυτόματου δειγματολήπτη (ESA HPLC Autosampler, Model 542). Με βάση τις προδιαγραφές του δειγματολήπτη, η ποσότητα της ένεσης του δείγματος προς ανάλυση έπρεπε να ήταν μεγαλύτερη των 15 μL. Σε μικρότερες ποσότητες το μηχάνημα δεν μπορεί να διατηρήσει την ακρίβεια του, δίνοντας όχι μόνο λανθασμένα αποτελέσματα αλλά και μη επαναλήψιμα.

Επιπροσθέτως ορίστηκε να γίνεται έκπλυση της σύριγγας με ddH₂O ανάμεσα στα διάφορα δείγματα. Αυτό έγινε με σκοπό την αποφυγή μεταφοράς συστατικών από το ένα δείγμα στο επόμενο, δημιουργώντας έτσι σφάλματα στις αναλύσεις.

Μετά τον καθαρισμό με ddH₂O, ακολουθούσε έκπλυση της σύριγγας με το δείγμα προς ανάλυση. Μια μικρή ποσότητα αυτού του δείγματος 10 μL χρησιμοποιούταν, ώστε το εσωτερικό της σύριγγας να αποκτήσει την ίδια σύσταση με το προς εξέταση δείγμα. Η ποσότητα αυτή στην πορεία απορριπτόταν από το δειγματολήπτη. Με αυτό τον τρόπο αποτρεπόταν μια πιθανή αραίωση του δείγματος από το υπολειπόμενο ddH₂O που θα μπορούσε να είχε μείνει εντός της σύριγγας μετά την πρώτη έκπλυση/καθαρισμό της. Για καλύτερα αποτελέσματα ορίστηκε η τιμή της ένεσης να είναι τα 20 μL, που στην προκειμένη περίπτωση ήταν και ο μέγιστος όγκος του loop. Παράλληλα από την γραμμή εντολών επιλέχθηκε κάθε ένεση να γίνεται υπό μορφή full loop, το οποίο σημαίνει ότι ο δειγματολήπτης για κάθε ένεση θα χρειαζόταν $20 \times 3 = 60\mu\text{L}$. Κατά αντιστοιχία η επιπλέον ποσότητα των 40μL χρησιμοποιείται για την έκπλυση του loop, ενώ τα τελευταία εναπομείναντα 20μL είναι αυτά που αναλύονται, αποτελούν δηλαδή την ποσότητα που θα εισαχθεί εντός του χρωματογράφου. Δηλαδή το loop, ο χώρος αποθήκευσης του δείγματος πριν την εισαγωγή του στην κινητή φάση, αποκτά την ίδια

σύσταση με το διάλυμα προς ανάλυση, προσδίδοντας έτσι μεγαλύτερη ακρίβεια στην μέθοδο.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η αντίδραση της παραγωγοποίησης γίνεται με την ανάμιξη δύο διαλυμάτων, με το πρώτο να είναι το διάλυμα ορα και το δεύτερο να είναι το δείγμα (stock ή άγνωστο). Λόγω της υψηλής συγκέντρωσης νευροδιαβιβαστών στο άγνωστο δείγμα, κρίθηκε αναγκαίο να εισαχθεί μια περαιτέρω αρραίωση στο διάλυμα αυτό. Από το άγνωστο δείγμα λήφθηκε χειροκίνητα η ποσότητα των 5 μL και τοποθετήθηκε σε vial κατάλληλο για χρήση από τον αυτόματο δειγματολήπτη. Στην συνέχεια έγινε αυτόματα προσθήκη 45 μL διαλύματος υπερχλωρικού (HClO_4) 0,1 M με αποτέλεσμα ο όγκος του αγνώστου να γίνει 50 μL και το αρχικό δείγμα να αραιωθεί 10 φορές. Έπειτα ακολούθησε η προσθήκη 50 μL διαλύματος ορα μαζί με ανάμιξη, με τον τελικό όγκο να γίνεται αντίστοιχα 100 μL . Με αυτόν τον τρόπο το άγνωστο δείγμα αραιώθηκε $100(\text{τελικός όγκος})/5(\text{αρχικός όγκος αγνώστου}) = 20$ φορές.

Αξίζει να αναφερθεί ότι η επιλογή των 5 μL δεν έγινε τυχαία, αφού αποτελεί τον μισό όγκο πιπέτας ακριβείας εύρους 0-10 μL . Πρόκειται δηλαδή για ένα όγκο ο οποίος μπορεί να ληφθεί με ακρίβεια. Ειδικότερα μικρότερες ποσότητες πχ 1, 2 μL εισάγουν πιο εύκολα σφάλμα αραιώσης, ενώ η χρήση μεγαλύτερων ποσοτήτων, παρά το γεγονός ότι θα προσέδιδαν μεγαλύτερη ακρίβεια στην μέθοδο, απαιτούν περαιτέρω κατανάλωση αντιδραστηρίων, που στην προκειμένη περίπτωση δεν είναι απαραίτητο. Πιο συγκεκριμένα το κέρδος της περαιτέρω ακριβείας είναι εξαιρετικά μικρό μετά τα 5 μL και δεν δικαιολογεί την περαιτέρω κατανάλωση επιπλέον αντιδραστηρίων.

Τέλος η ανάμιξη διαλυμάτων ίσων όγκων (50 μL + 50 μL) δεν έγινε μόνο με σκοπό την διευκόλυνση των πράξεων της αραιώσης του αγνώστου αλλά ήταν απαραίτητη αφού το τελικό διάλυμα έπρεπε να είχε τελικό όγκο τουλάχιστον τα 70 μL . Συνεπώς η δημιουργία ενός διαλύματος 100 μL τηρούσε όλες τις προϋποθέσεις, για αυτό και επιλέχθηκε αυτή σαν τελική ποσότητα.

5.8. Χρόνος παραγωγοποίησης και θερμοκρασία αντίδρασης

Για την ολοκλήρωση της αντίδρασης, μετά την ανάμιξη των διαλυμάτων, είναι απαραίτητο το καινούριο διάλυμα να αφηθεί για 15 λεπτά τουλάχιστον στις

προκαθορισμένες συνθήκες πριν την εισαγωγή του στο χρωματογράφο. Σε δοκιμή που έγινε με το διάλυμα να εισάγεται σε χρόνο μικρότερο των 10 λεπτών, οι κορυφές που παρατηρήθηκαν ήταν αισθητά μικρότερες από αυτές των 15 λεπτών, ενώ όταν έγινε εισαγωγή του διαλύματος σε χρόνο μικρότερο των 5 λεπτών δεν παρατηρήθηκαν καθόλου κορυφές. Από την άλλη πλευρά όταν το δείγμα εισήχθη με το πέρα των 20 λεπτών δεν υπήρξε διαφορά σε σχέση με το χρωματογράφημα των 15 λεπτών. Συνεπώς τα 15 λεπτά ορίστηκαν ως το χρονικό όριο που απαιτείται για να γίνει η αντίδραση. Λόγω του ότι η μέθοδος κρίθηκε να έχει χρονικό περιορισμό 30 λεπτών, ρυθμίστηκε τα διαλύματα να ανακατεύονται από τον αυτόματο δειγματολήπτη αμέσως μετά την εισαγωγή του προηγούμενου διαλύματος. Με αυτό τον τρόπο τα διαλύματα θα είχαν ~25 λεπτά να αντιδράσουν πριν αναλυθούν, το οποίο όπως αναφέρθηκε είναι ένα επαρκές χρονικό διάστημα για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση.

Αρχικά επιλέχθηκε η αντίδραση να γίνεται σε συνθήκες δωματίου. Ωστόσο παρατηρήθηκε ότι στην διάρκεια του χρόνου υπήρξε μερική εξάτμιση των δειγμάτων προς ανάλυση με αποτέλεσμα τα δείγματα που αναλύονταν τελευταία να δίνουν εσφαλμένες τιμές. Για αυτό το λόγο με την χρήση του αυτόματου δειγματολήπτη ρυθμίστηκε η θερμοκρασία στην οποία λαμβάνει χώρα η παραγωγοποίηση να είναι 10°C, κατά την οποία δεν παρατηρήθηκε εξάτμιση δειγμάτων.

5.9. Συγκέντρωση διαφόρων αντιδραστηρίων

Όπως αναφέρθηκε η ποσότητα του θειώδους που χρησιμοποιήθηκε καθορίστηκε από την ικανότητά του να επαρκεί για την ολοκλήρωση της αντίδρασης καθώς επίσης και από την έλλειψη εμφάνισης επιπλέον σήματος που θα επισκίαζε όλα τα υπόλοιπα. Αντίστοιχα για την όρθο-φθαλαδεΰδη ήταν αναγκαία η εύρεση μιας ποσότητας η οποία θα επαρκούσε για να γίνει η αντίδραση, χωρίς ωστόσο να γίνει σπατάλη αυτής της ένωσης.

Αντίστοιχα σε αυτή την περίπτωση παρασκευάστηκαν αρχικά 3 διαφορετικά διαλύματα των 5mL. Στο πρώτο διάλυμα έγινε διάλυση 10 mg ora, στο δεύτερο 25 και στο τρίτο 50. Όσον αφορά το δεύτερο και το τρίτο διάλυμα η επιλογή των ποσοτήτων αυτών δεν έγινε τυχαία αλλά με βάση την παρούσα βιβλιογραφία που υπάρχει όσον αφορά αυτή την αντίδραση (Nikolaos Kokras et al., 2020) (Vasanits et al., 2000). Το

πρώτο διάλυμα έγινε με σκοπό τον αποκλεισμό ύπαρξης μιας καλύτερης εκδοχής από τις ήδη υπάρχουσες.

Όσον αφορά το πρώτο διάλυμα, οι χρωματογραφικές κορυφές που αποτυπώθηκαν μετά την χρήση του, είχαν πολύ μικρή ισχύ, κάτι που υποδεικνύει ότι η ποσότητα της όρθο-φθαλαλδεΰδης δεν επαρκεί για να ολοκληρωθεί τελείως η αντίδραση.

Ανάμεσα στο δεύτερο και τρίτο διάλυμα, 25 mg και 50 mg ora αντίστοιχα, δεν παρατηρήθηκαν μεγάλες διαφορές. Η ένταση των χρωματογραφικών κορυφών υπολογίστηκε τόσο στην δεύτερη όσο και στην τρίτη περίπτωση και φάνηκε ότι ήταν στα ίδια επίπεδα. Αυτό σημαίνει ότι και στις δύο περιπτώσεις η αντίδραση είχε ολοκληρωθεί, με μόνη διαφορά την εμφάνιση μιας σχετικά πιο έντονης κορυφής στα ~16 λεπτά στο διάλυμα των 50 mg.

Η συγκεκριμένη κορυφή είναι χαρακτηριστική της ύπαρξης αδέσμευτης όρθο-φθαλαλδεΰδης εντός του διαλύματος, κάτι το οποίο με την σειρά του υποδηλώνει ότι αυτή η ένωση βρίσκεται σε περίσσεια και στις δύο περιπτώσεις, με την περίπτωση του τρίτου διαλύματος να είναι πιο έντονη. Με σκοπό την αποφυγή έντονης εμφάνισής της πραγματοποιήθηκε μια περαιτέρω αραίωση στο διάλυμα των 25 mg, όπου προστέθηκαν 0,5 mL διαλύματος Borax 0,1 M με τον τελικό όγκο να γίνεται 5,5 mL. Αυτή η αραίωση μείωσε αισθητά την ένταση της κορυφής, δίνοντας έτσι καλύτερα χρωματογραφικά αποτελέσματα.

Τέλος πρέπει να αναφερθεί ότι η παρασκευή του συγκεκριμένου διαλύματος γινόταν εκ νέου κάθε εβδομάδα. Η όρθο-φθαλαλδεΰδη είναι μια ένωση εξαιρετικά φωτοευαίσθητη, το οποίο σημαίνει ότι σε συνθήκες έντονου φωτός έχει την τάση να οξειδώνεται. Όταν συμβαίνει αυτό χάνει την ικανότητά της να αντιδρά με τα αμινοξέα και της αμίνες με αποτέλεσμα να μην μπορεί να γίνει ανίχνευση των τελευταίων. Για να αποφευχθεί αυτό το πρόβλημα παρασκευαζόταν καινούριο διάλυμα όρθο-φθαλαλδεΰδης κάθε 7 μέρες.

5.10. Θερμοκρασία στήλης και Ταχύτητα ροής

Με βάση τις προδιαγραφές της στήλης η κατάλληλη ροή στην οποία μπορούν να παρθούν τα καλύτερα αποτελέσματα, όπου υπάρχει και επαρκής διαχωρισμός ανάμεσα στις ενώσεις χωρίς να δημιουργείται οποιουδήποτε είδους tailing, είναι ανάμεσα σε 0,8 - 1,0 mL flow/min. Κατά την δημιουργία της μεθόδου έγιναν πειράματα σε όλο το εύρος αυτών των τιμών με τον καλύτερο διαχωρισμό να πραγματοποιείται σε flow 0,95 - 1,0 mL/min. Στις τιμές ροής 0,8-0,95 mL/min αυξάνεται η διάρκεια του διαχωρισμού των ενώσεων. Επιπλέον με την σταδιακή μείωση της ροής παρατηρήθηκε μερική αλληλοεπικάλυψη των κορυφών. Στο εύρος 0,95-1,0 mL/min η αλληλοεπικάλυψη των κορυφών εξαφανίζεται, με τον καλύτερο διαχωρισμό να επιτυγχάνεται στο 1,0 mL/min.

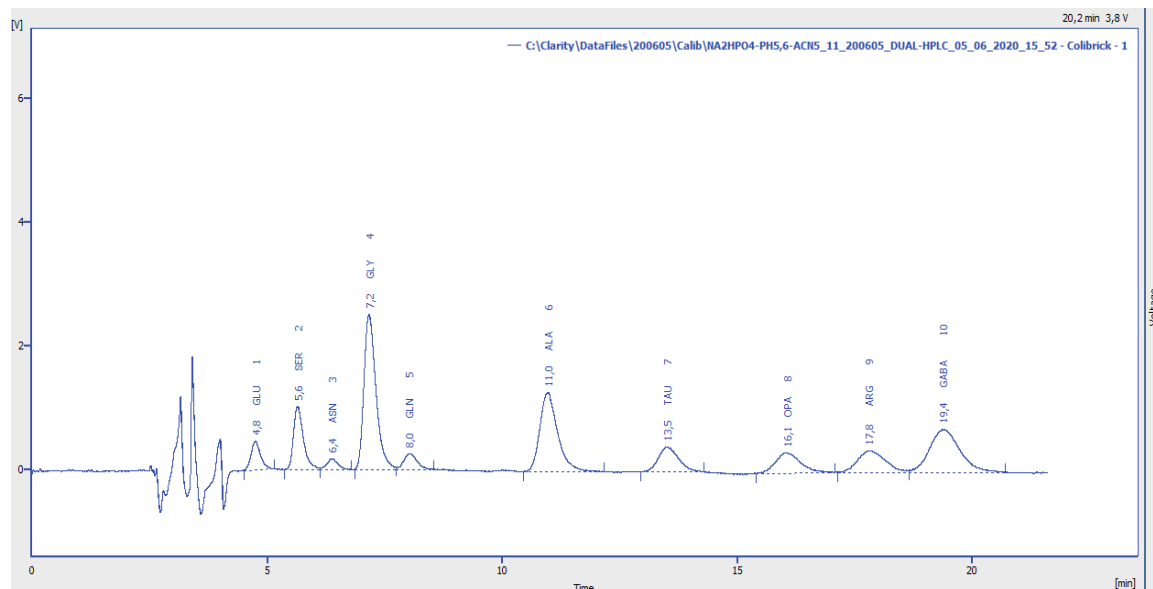
Όσον αφορά την θερμοκρασία, αρχικά έγινε η απόπειρα τα παρθούν τα αποτελέσματα σε θερμοκρασία δωματίου 25 °C. Ωστόσο σε αυτή τη θερμοκρασία ο χρόνος έκλουσης των προϊόντων μειώνεται αισθητά, με αποτέλεσμα να υπάρχει εξαιρετικά έντονη αλληλοεπικάλυψη των κορυφών ειδικότερα των ενώσεων που εκλούνται σχετικά νωρίς. Το φαινόμενο αυτό να γίνεται ακόμα πιο έντονο με την άνοδο της θερμοκρασίας. Για αυτό το λόγο ρυθμίστηκε η θερμοκρασία περιβάλλον να είναι 20 - 21°C. Με αυτόν τον τρόπο επετεύχθη η μη ύπαρξη αλληλοεπικάλυψης κορυφών, ενώ ο χρωματογραφικός διαχωρισμός είχε συνολική διάρκεια 20 - 22 λεπτά. Πιθανότατα με περαιτέρω μείωση της θερμοκρασίας να μπορούσαν να παρθούν ακόμα καλύτερα αποτελέσματα, ωστόσο αυτό θα είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου της χρωματογραφικής μεθόδου κάνοντας την ανάλυση εξαιρετικά χρονοβόρα.

5.11.Επιλογή Νευροδιαβιβαστών

Τέλος πρέπει να αναφερθεί ότι η ανάπτυξη αυτή της μεθόδου έγινε με βάση την ικανότητα διαχωρισμού και ποσοτικοποίηση κάποιων συγκεκριμένων νευροδιαβιβαστών-αμινοξέων. Οι νευροδιαβιβαστές αυτοί ήταν:

- γ-αμινοβουτυρικό οξύ
- γλουταμικό οξύ
- γλουταμίνη
- ταυρίνη

Ωστόσο όπως φαίνεται στην Εικόνα 5.11.1., παρατηρείται και η ύπαρξη περαιτέρω αμινοξέων. Τα αμινοξέα αυτά αν και δεν κρίθηκαν αναγκαία για την μελέτη των πειραμάτων, αποφασίστηκε να συμπεριληφθούν, εφόσον θα μπορούσα να δώσουν παραπάνω πληροφορίες.



Εικόνα 5.11.1.: 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 αλανίνης (ALA), της ταυρίνης (TAU), της όρθο-φθαλαδεύδης (OPA), της αργινίνης (ARG) και του γ-αμινοβουτυρικού οξέους (GABA).

Παράλληλα έγινε η προσπάθεια εύρεσης των χρόνων έκλουσης και άλλων αμινοξέων όπως είναι το ασπαρτικό οξύ, η τυροσίνη, η κυστεΐνη κα. Από αυτά τα αμινοξέα, άλλα είχαν εξαιρετικά μικρούς χρόνους έκλουσης με αποτέλεσμα οι κορυφές τους να συμπίπτουν με τις κορυφές του front, δηλαδή τις κορυφές που εμφανίζονται πρώτες στο χρωματογράφημα και ανήκουν στα υπόλοιπα στοιχεία του διαλύματος προς ανάλυση όπως είναι τα διάφορα αλάτια πχ. borax, άλλα είχαν εξαιρετικά μεγάλους χρόνους έκλουσης, ενώ στα υπόλοιπα που δοκιμάστηκαν δεν ανιχνεύτηκε κανένα προϊόν αντίδρασής τους με την όρθο-φθαλαδεύδη. Όσον αφορά την τελευταία περίπτωση πιθανότατα σε αυτές τις συνθήκες δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί η αντίδραση παραγωγοποίησης για αυτά τα αμινοξέα, ή διαφορετικά το προϊόν αντίδρασής τους δεν είναι ηλεκτροενεργό ώστε να γίνει ανιχνεύσιμο από τον ανιχνευτή.

Συγκεκριμένα τα αμινοξέα που:

- ✧ Είχαν εξαιρετικά μικρούς χρόνους έκλουσης ήταν: το ασπαρτικό οξύ
- ✧ Είχαν αρκετά μεγάλους χρόνους έκλουσης (>40 min) ήταν: η τυροσίνη, η βαλίνη, η κυστεΐνη και η μεθειονίνη
- ✧ Δεν ανιχνεύτηκαν ήταν: η θρεονίνη, η λευκίνη, η φαινυλαλανίνη, η ισολευκίνη και η προλίνη

Εξαιρώντας το ασπαρτικό οξύ κανένα από τα υπόλοιπα αμινοξέα δεν ανιχνεύτηκε στα άγνωστα δείγματα για αυτό το λόγο επιλέχθηκε να μην συμπεριληφθούν σε αυτή τη μέθοδο.

5.12. Καμπύλη Βαθμονόμησης

Όπως έχει αναφερθεί η HPLC μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για τον ποιοτικό προσδιορισμό μιας ένωσης όσο και για τον ποσοτικό προσδιορισμό της. Για να μπορέσει να πραγματοποιηθεί ο ποιοτικός προσδιορισμός είναι απαραίτητη η εφαρμογή μιας κατάλληλης μεθόδου μέσω της οποίας η ένωση θα μπορέσει να ανιχνευτεί. Από την άλλη πλευρά όσον αφορά τον ποσοτικό προσδιορισμό της ένωσης, δεν είναι απαραίτητη μόνο η σωστή μέθοδος αλλά επίσης η υπό εξέταση ένωση θα πρέπει να βρίσκεται εντός συγκεκριμένου εύρους συγκέντρωσης. Πιο συγκεκριμένα θα πρέπει σε αυτό το εύρος η σχέση μεταξύ της έντασης του σήματος, που ανιχνεύεται από το ηλεκτρόδιο, να είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση των αμινοξέων των πρότυπων διαλυμάτων (standards solutions). Διαφορετικά αν η συγκέντρωση της υπό ανίχνευση ουσίας είναι πολύ μεγάλη, η ένταση του σήματος που θα καταγράψει ο ανιχνευτής δεν θα αντικατοπτρίζει την αληθινή ποσότητα της ένωσης που βρίσκεται εντός του διαλύματος. Ο λόγος που συμβαίνει αυτό είναι επειδή το ηλεκτρόδιο έχει ένα όριο ανίχνευσης, πάνω από το οποίο είναι αδύνατον να δώσει σωστά αποτελέσματα. Πιο συγκεκριμένα στην HPLC-ED το ηλεκτρόδιο δεν προλαβαίνει να οξειδώσει όλη την ποσότητα της ένωσης που ανιχνεύεται, με αποτέλεσμα το σήμα που αποστέλλει να είναι ελλιπές και κατά συνέπεια ψευδές. Για αυτό έγιναν πολλαπλοί έλεγχοι διαφορετικών τιμών συγκεντρώσεων των πρότυπων διαλυμάτων (standards solutions)

με σκοπό την εύρεση των τιμών, στις οποίες η συγκέντρωση των αμινοξέων εμφανίζει γραμμική συνάρτηση με τις εντάσεις των σημάτων που λαμβάνονται από αυτά.

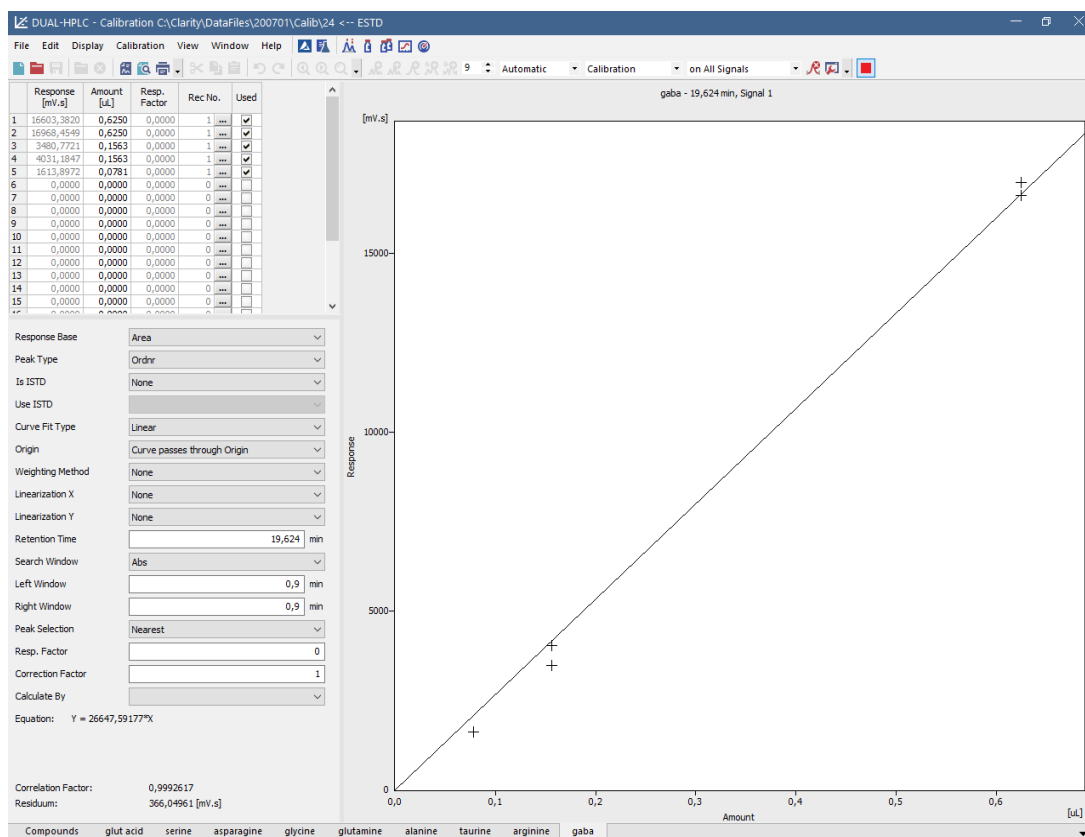
Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 4 στην Παρασκευή των standards solutions, τα διαλύματα στα οποία παρατηρείται γραμμική εξάρτηση, μεταξύ της έντασης του σήματος των κορυφών με την συγκέντρωση των διαλυμάτων, είναι τα Διαλύματα Νο 4-8.

Πίνακας 5.12.1.: Συγκεντρώσεων Νευροδιαβιβαστών πρότυπων διαλυμάτων, στα οποία υπάρχει γραμμική εξάρτηση της έντασης του σήματος με την συγκέντρωση

Διάλυμα Νο	Συγκέντρωση αμινοξέος ανά standard solution (mM)				
	4	5	6	7	8
Γλουταμικό οξύ	0,016992	0,008496	0,004248	0,002124	0,001062
Σερίνη	0,023789	0,011895	0,005947	0,002974	0,001487
Ασπαραγίνη	0,018922	0,009461	0,004731	0,002365	0,001183
Γλυκίνη	0,016651	0,008326	0,004163	0,002081	0,001041
Γλουταμίνη	0,017107	0,008553	0,004277	0,002138	0,001069
Αλανίνη	0,028062	0,014031	0,007015	0,003508	0,001754
Ταυρίνη	0,019976	0,009988	0,004994	0,002497	0,001249
Αργινίνη	0,014351	0,007176	0,003588	0,001794	0,000897
GABA	0,024244	0,012122	0,006061	0,003030	0,001515

Η Καμπύλη Βαθμονόμησης κατασκευαζόταν καθημερινά μέσω του προγράμματος ελέγχου και επεξεργασίας αποτελεσμάτων Clarity, με την χρήση των διαλυμάτων που αναφέρθηκαν. Αντίστοιχα τα άγνωστα διαλύματα αραιώθηκαν έως ότου η συγκέντρωση των νευροδιαβιβαστών τους να βρίσκεται ανάμεσα στη μεγαλύτερη τιμή συγκέντρωσης του πρότυπου διαλύματος και στην μικρότερη. Έτσι εξασφαλίστηκε ότι η ποσότητα που ανιχνεύεται, βρίσκεται εντός ενός εύρους τιμών στο οποίο η ένταση του σήματος έχει γραμμική σχέση με την συγκέντρωση. Συνεπώς οι τιμές που ανιχνεύτηκαν είναι αληθείς. Αν δεν είχε γίνει η αραιώση 1:20 (Κεφάλαιο 5, Χρήση Αυτόματου δειγματολήπτη) των άγνωστων δειγμάτων και η συγκέντρωση των αγνώστων είχε διατηρηθεί σε μεγαλύτερα επίπεδα, τα αποτελέσματα που θα

λαμβάνονταν θα ήταν ψευδή. Συγκεκριμένα θα υπήρχε αρνητικό σφάλμα, σύμφωνα με το οποίο οι ποσότητες που θα ανιχνεύονταν θα ήταν πολύ μικρότερες από τις αληθινές.



Εικόνα 5.12.1.: Καμπύλη Γραμμικότητας του νευροδιαβιβαστή GABA. Στον οριζόντιο άξονα καταγράφεται η τιμή της συγκέντρωσης, ενώ στο κάθετο άξονα η τιμή της έντασης.

Παρατήρηση: στο κάτω μέρος αριστερά της εικόνας αναγράφεται η τιμή του correlation factor=0,9992617. Η συγκεκριμένη τιμή είναι μια εξαιρετικά καλή τιμή αφού προσεγγίζει πολύ την τιμή 1, στην οποία η γραμμικότητα θα ήταν τέλεια.

Κεφάλαιο 6. Στατιστική ανάλυση

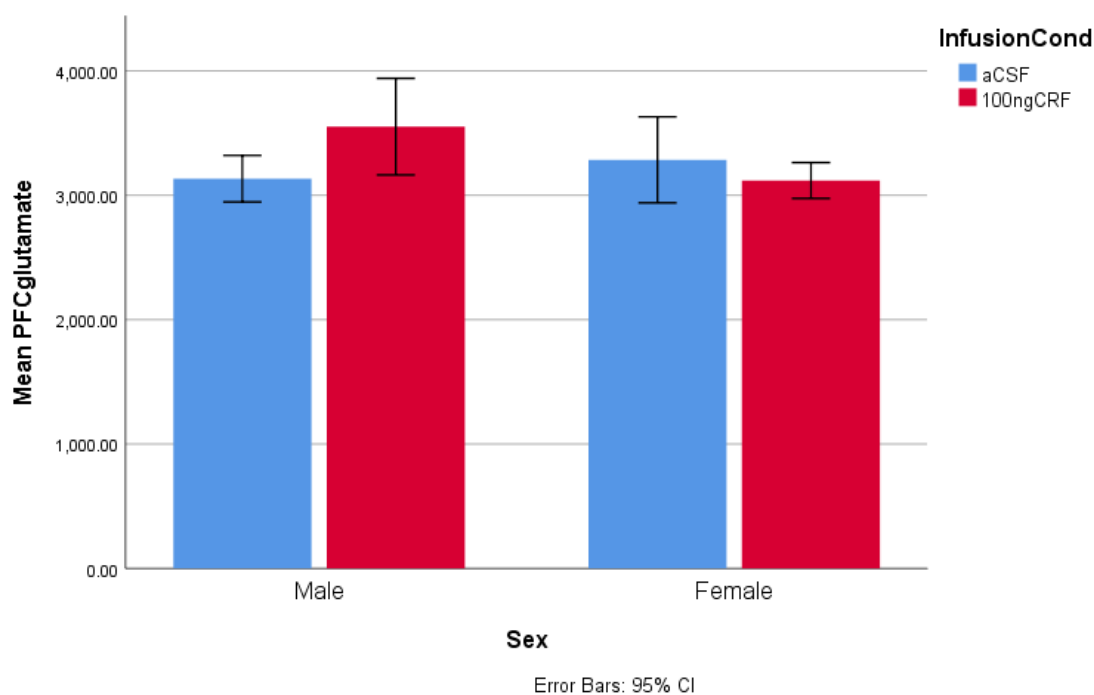
Η στατιστική ανάλυση έγινε χρησιμοποιώντας την ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων (two- way ANOVA). Οι δύο ανεξάρτητοι παράγοντες που μελετήθηκαν ήταν το φύλο (αρσενικό, θηλυκό) και η θεραπεία (aCSF , CRF 100ng).

Αποτελέσματα Νευροχημικών Πειραμάτων

6.1. Αποτελέσματα από την περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού (PFC)

Επίπεδα γλουταμικού οξέους στην περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού

Τόσο το φύλο όσο και η χορήγηση CRF δεν έχουν στατιστικά σημαντική επίδραση στα επίπεδα του γλουταμικού οξέος στον προμετωπιαίο φλοιό [$p=0,648$, $p=0,611$ αντίστοιχα]. Παράλληλα δεν παρατηρείται αλληλεπίδραση του φύλου με τη χορήγηση του CRF [$p=0,294$]

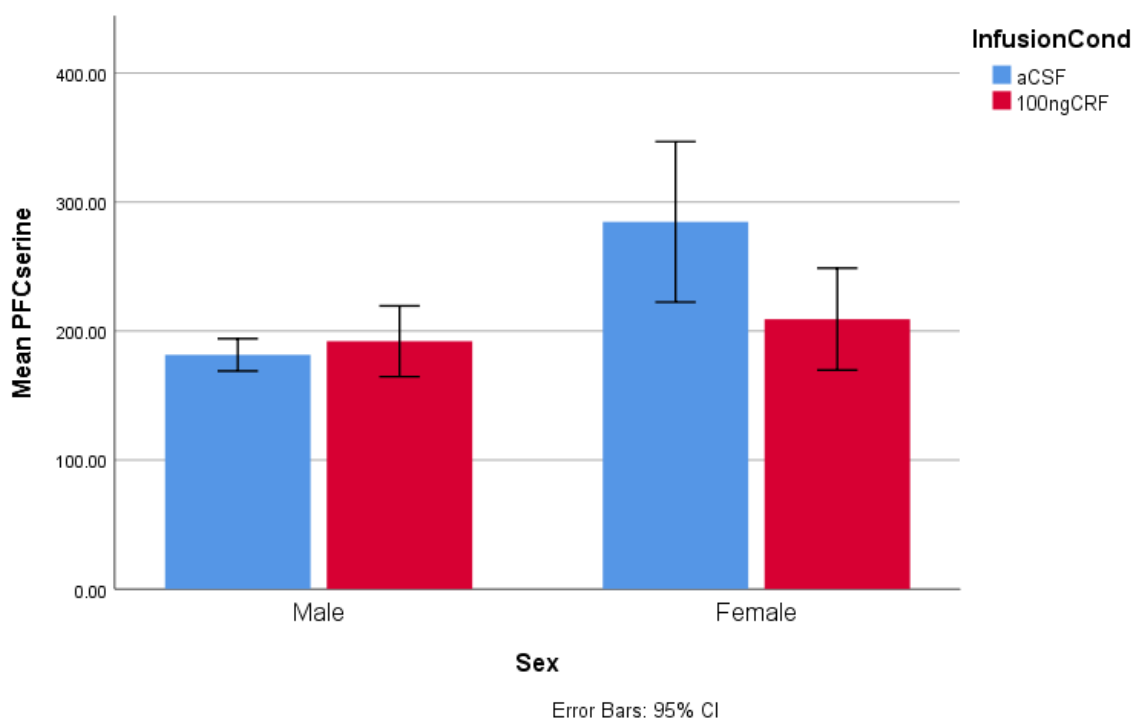


Γράφημα 6.1.1.: Απεικόνιση μέσης τιμής επιπέδων του γλουταμικού οξέους στον προμετωπιαίο φλοιό. Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί και θηλυκοί αρουραίοι στους οποίους χορηγήθηκε έκδοχο (aCSF) ή η ουσία CRF 100ng.

Επίπεδα σερίνης στην περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού

Τόσο το φύλο όσο και η χορήγηση CRF δεν έχουν στατιστικά σημαντική επίδραση στα επίπεδα της σερίνης στον προμετωπιαίο φλοιό [$p=0,145$, $p=0,426$ αντίστοιχα].

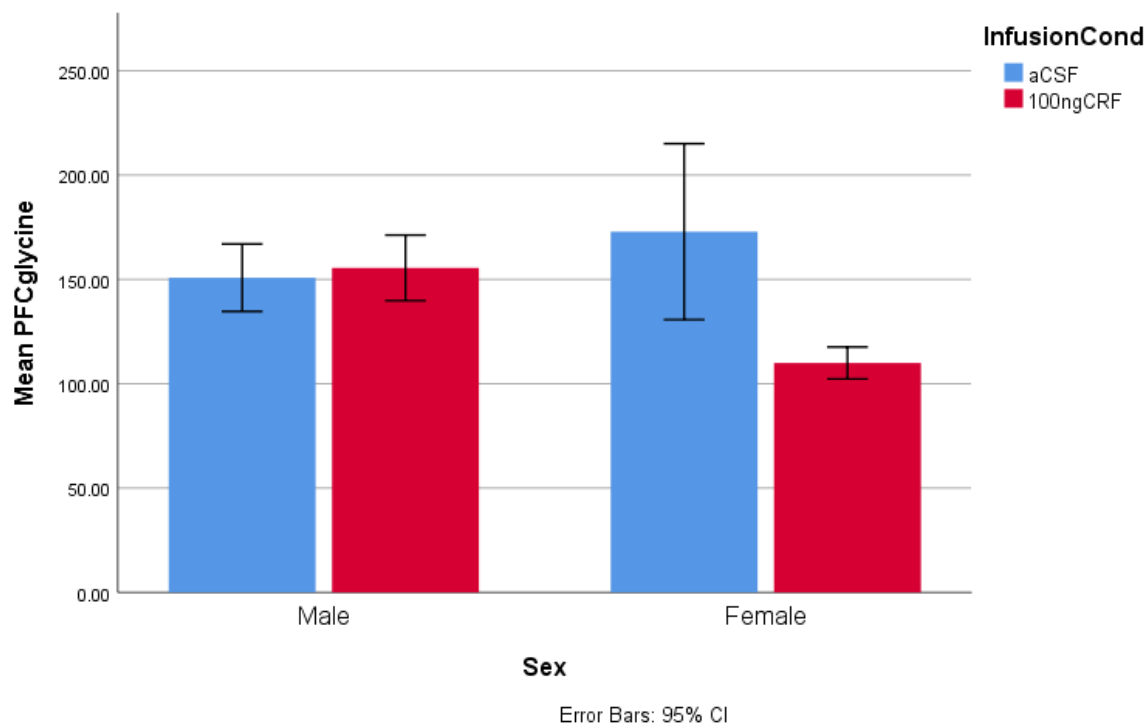
Παράλληλα δεν παρατηρείται αλληλεπίδραση του φύλου με τη χορήγηση του CRF [$p=0,294$]



Γράφημα 6.1.2.: Απεικόνιση μέσης τιμής επιπέδων της σερίνης στον προμετωπιαίο φλοιό. Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί και θηλυκοί αρουραίοι στους οποίους χορηγήθηκε έκδοχο (aCSF) ή η ουσία CRF 100ng.

Επίπεδα γλυκίνης στην περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού

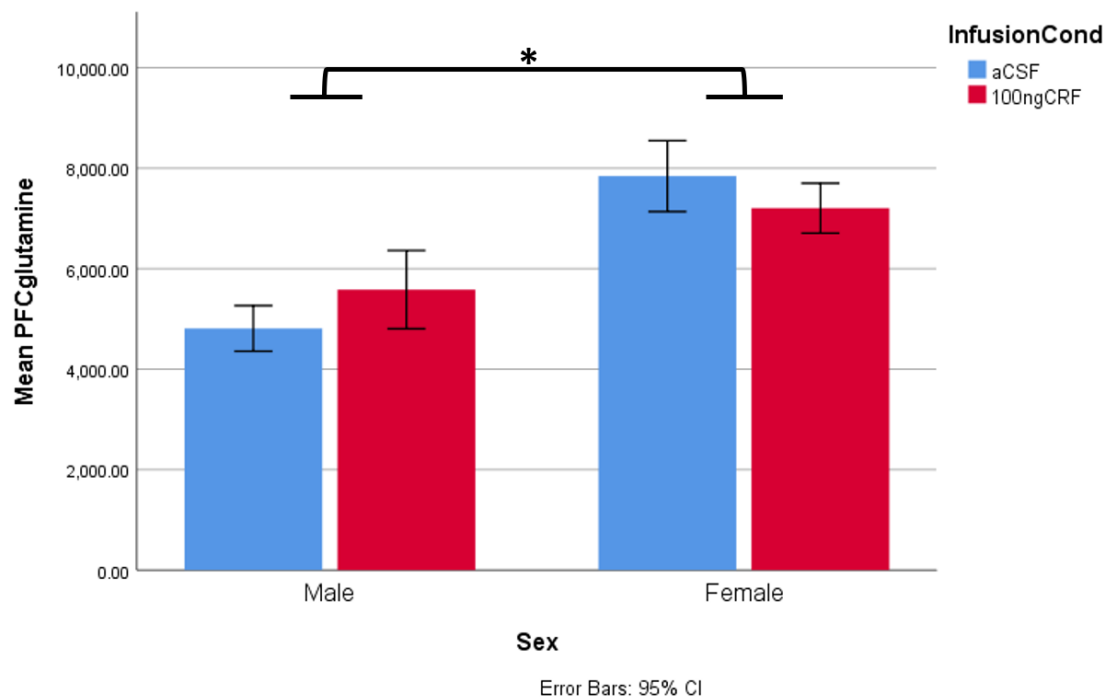
Τόσο το φύλο όσο και η χορήγηση CRF δεν έχουν στατιστικά σημαντική επίδραση στα επίπεδα της γλυκίνης στον προμετωπιαίο φλοιό [$p=0,613$, $p=0,215$ αντίστοιχα]. Παράλληλα δεν παρατηρείται αλληλεπίδραση του φύλου με τη χορήγηση του CRF [$p=0,151$]



Γράφημα 6.1.3.: Απεικόνιση μέσης τιμής επιπέδων της γλυκίνης στον προμετωπιαίο φλοιό. Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί και θηλυκοί αρουραίοι στους οποίους χορηγήθηκε έκδοχο (aCSF) ή η ουσία CRF 100ng.

Επίπεδα γλουταμίνης στην περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού

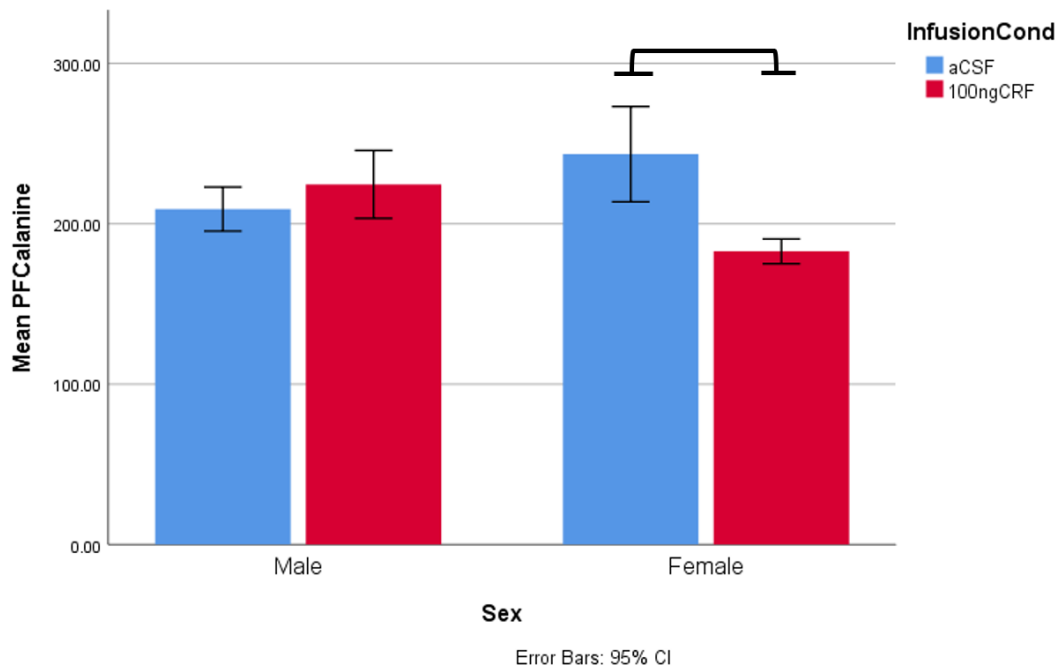
Η χορήγηση CRF δεν έχει στατιστικά σημαντική επίδραση στα επίπεδα της γλουταμίνης στον προμετωπιαίο φλοιό. [$p=0,914$]. Παράλληλα δεν παρατηρείται αλληλεπίδραση του φύλου με τη χορήγηση του CRF [$p=0,261$]. Ωστόσο το φύλο έχει στατιστικά σημαντική επίδραση στα επίπεδα της γλουταμίνης στον προμετωπιαίο φλοιό [$F(1, 30)=14.290$, $p=0,001$].



Γράφημα 6.1.4.: Απεικόνιση μέσης τιμής επιπέδων της γλουταμίνης στον προμετωπιαίο φλοιό. Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί και θηλυκοί αρουραίοι στους οποίους χορηγήθηκε έκδοχο (aCSF) ή η ουσία CRF 100ng. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει την κύρια επίδραση του φύλου και υπογραμμίζει τη στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε αρσενικούς και θηλυκούς αρουραίους, με επίπεδο σημαντικότητας $p \leq 0,05$.

Επίπεδα αλανίνης στην περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού

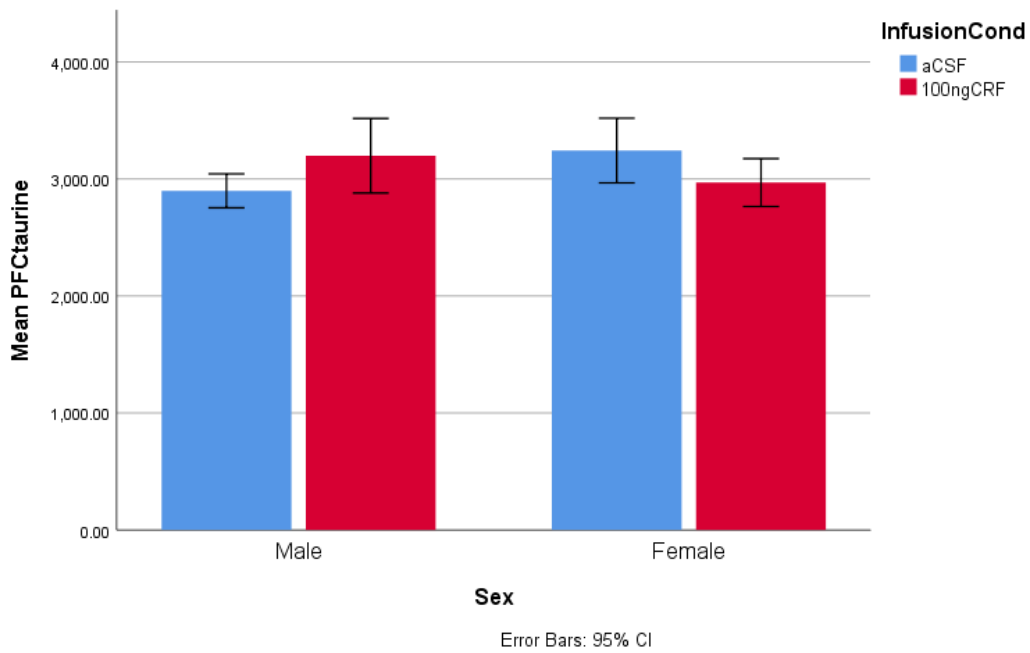
Τόσο το φύλο όσο και η χορήγηση CRF δεν έχουν στατιστικά σημαντική επίδραση στα επίπεδα της αλανίνης στον προμετωπιαίο φλοιό [$p=0,845$, $p=0,241$ αντίστοιχα]. Ωστόσο τείνει να παρατηρηθεί αλληλεπίδραση του φύλου με τη χορήγηση του CRF [$p=0,054$].



Γράφημα 6.1.5.: Απεικόνιση μέσης τιμής επιπέδων της αλανίνης στον προμετωπιαίο φλοιό. Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί και θηλυκοί αρουραίοι στους οποίους χορηγήθηκε έκδοχο (aCSF) ή η ουσία CRF 100ng.

Επίπεδα ταυρίνης στην περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού

Τόσο το φύλο όσο και η χορήγηση CRF δεν έχουν στατιστικά σημαντική επίδραση στα επίπεδα της ταυρίνης στον προμετωπιαίο φλοιό [$p=0,814$, $p=0,957$ αντίστοιχα]. Παράλληλα δεν παρατηρείται αλληλεπίδραση του φύλου με τη χορήγηση του CRF [$p=0,247$].

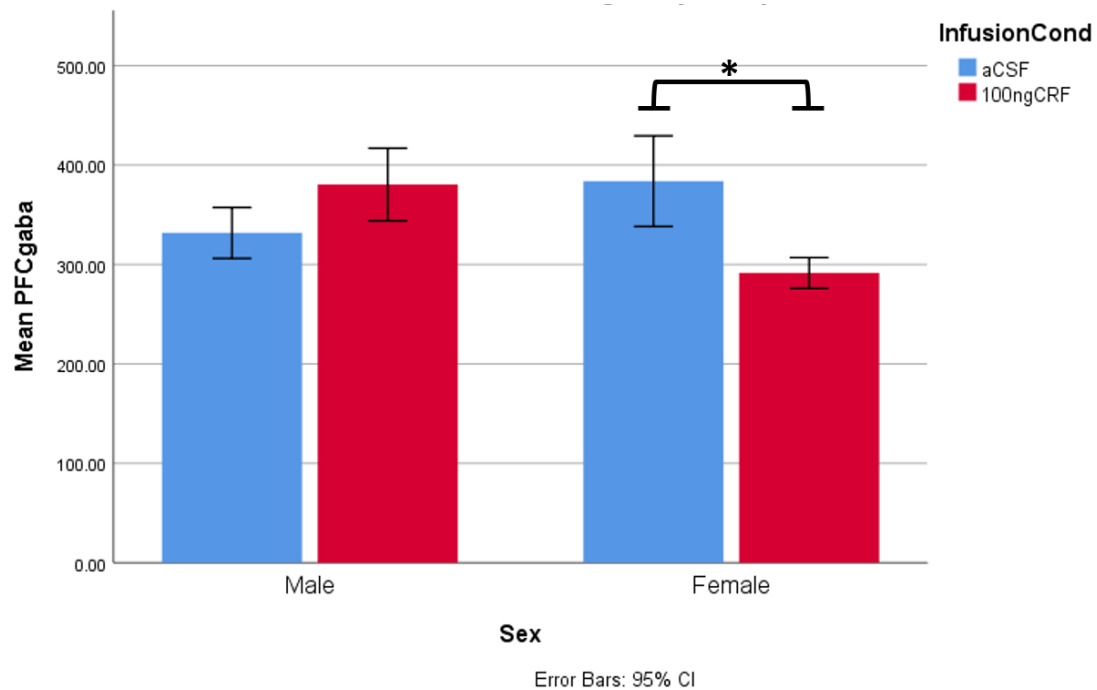


Γράφημα 6.1.6.: Απεικόνιση μέσης τιμής επιπέδων της ταυρίνης στον προμετωπιαίο φλοιό. Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί και θηλυκοί αρουραίοι στους οποίους χορηγήθηκε έκδοχο (aCSF) ή η ουσία CRF 100ng.

Επίπεδα GABA στην περιοχή του προμετωπιαίου φλοιού

Τόσο το φύλο όσο και η χορήγηση CRF δεν έχουν στατιστικά σημαντική επίδραση στα επίπεδα του GABA στον προμετωπιαίο φλοιό [$p=0,561$, $p=0,493$ αντίστοιχα].

Ωστόσο παρατηρείται αλληλεπίδραση του φύλου με τη χορήγηση του CRF [$p=0,032$].



Γράφημα 6.1.7.: Απεικόνιση μέσης τιμής επιπέδων του γ-αμινοβουτυρικού οξέος στον προμετωπιαίο φλοιό. Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί και θηλυκοί αρουραίοι στους οποίους χορηγήθηκε έκδοχο (aCSF) ή η ουσία CRF 100ng. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει την επίδραση της χορήγησης του CRF μόνο στα θηλυκά, με επίπεδο σημαντικότητας $p \leq 0,05$.

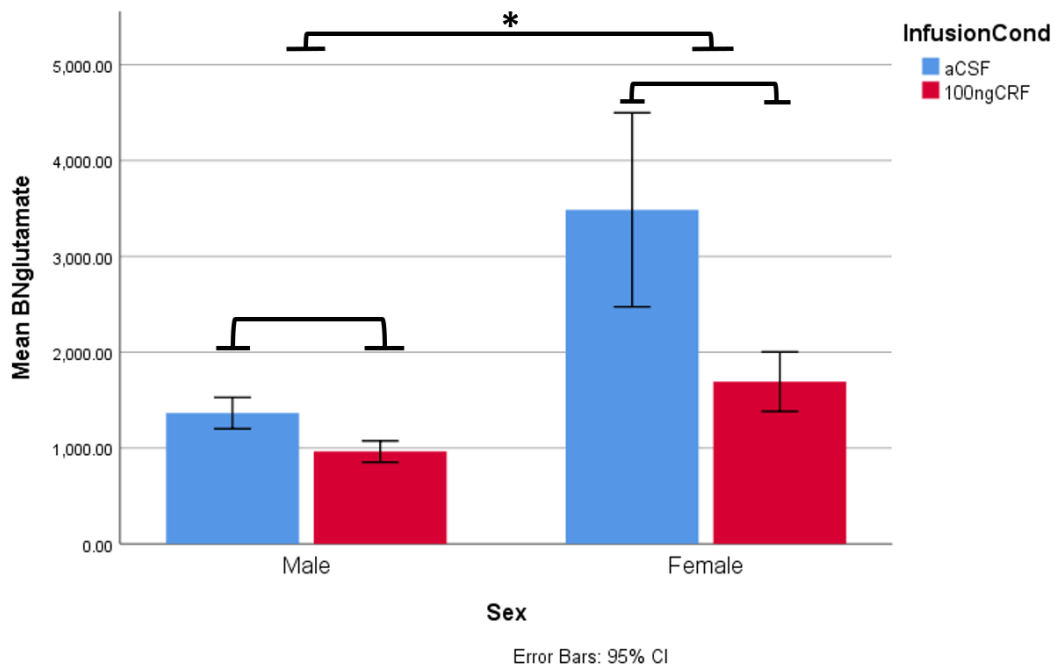
6.2. Αποτελέσματα από την περιοχή του εγκεφάλου BN (nucleus basalis of Meynert)

Επίπεδα γλουταμικού οξέος στην περιοχή του εγκεφάλου BN

Το φύλο έχει στατιστικά σημαντική επίδραση στα επίπεδα του γλουταμικού οξέος στο BN [F(1, 27)=6.377, $p=0,018$].

Επίσης η χορήγηση CRF έχει την τάση να εμφανίσει σημαντική επίδραση στα επίπεδα του γλουταμικού οξέους στο BN [F(1, 27)=3.778, $p=0,062$].

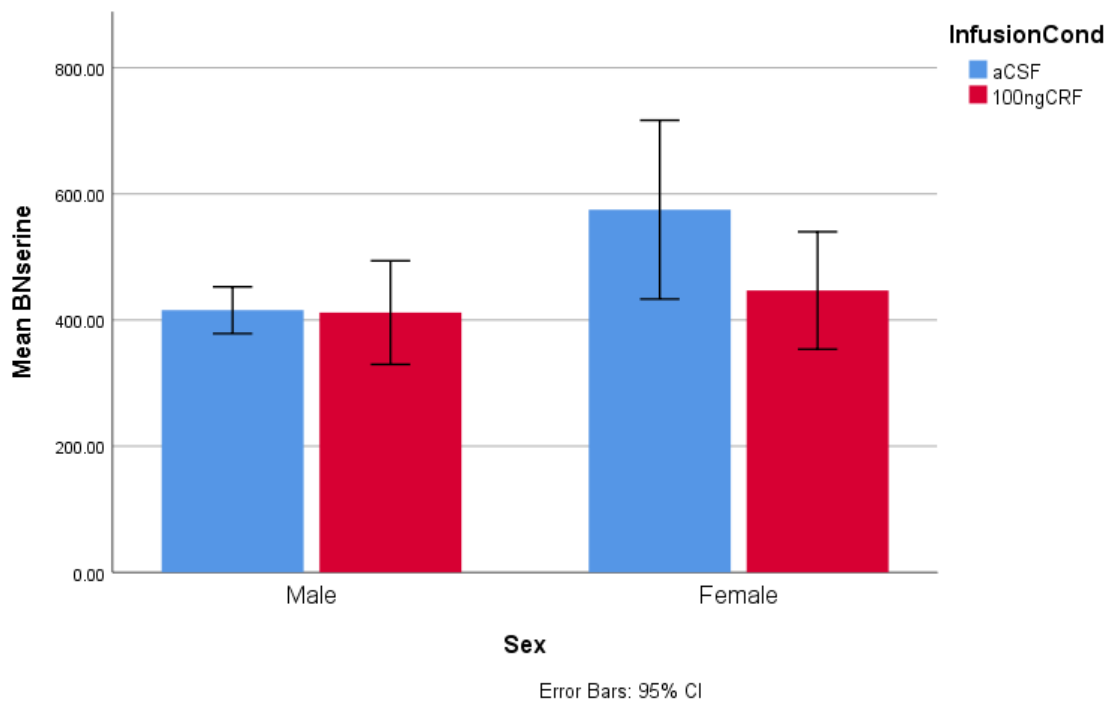
Ωστόσο δεν παρατηρείται αλληλεπίδραση του φύλου με τη χορήγηση του CRF [$p=0,228$]



Γράφημα 6.2.1.: Απεικόνιση μέσης τιμής επιπέδων του γλουταμικού οξέος στο BN. Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί και θηλυκοί αρουραίοι στους οποίους χορηγήθηκε έκδοχο (aCSF) ή η ουσία CRF 100ng. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει την κύρια επίδραση του φύλου και υπογραμμίζει τη στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε αρσενικούς και θηλυκούς αρουραίους, με επίπεδο σημαντικότητας $p \leq 0,05$.

Επίπεδα σερίνης στην περιοχή του εγκεφάλου BN

Τόσο το φύλο όσο και η χορήγηση CRF δεν έχουν στατιστικά σημαντική επίδραση στα επίπεδα της σερίνης στο BN [$p=0,342$, $p=0,517$ αντίστοιχα]. Παράλληλα δεν παρατηρείται αλληλεπίδραση του φύλου με τη χορήγηση του CRF [$p=0,542$].



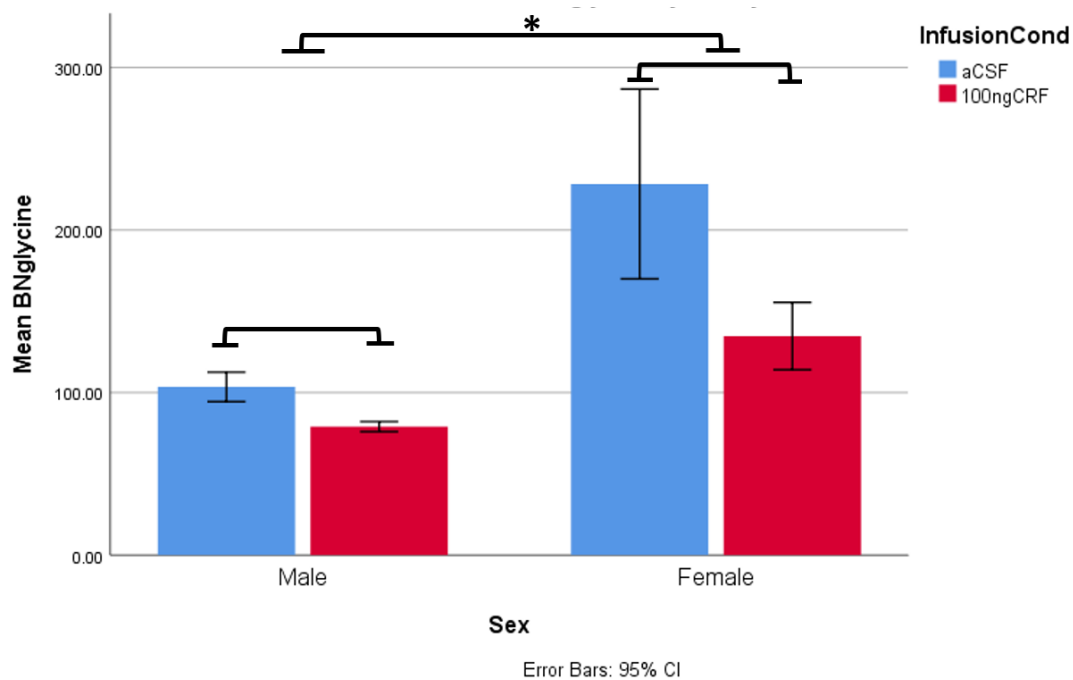
Γράφημα 6.2.2.: Απεικόνιση μέσης τιμής επιπέδων της σερίνης στο BN. Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί και θηλυκοί αρουραίοι στους οποίους χορηγήθηκε έκδοχο (aCSF) ή η ουσία CRF 100ng.

Επίπεδα γλυκίνης στην περιοχή του εγκεφάλου BN

Το φύλο έχει στατιστικά σημαντική επίδραση στα επίπεδα της γλυκίνης στο BN [$F(1, 27)=7.481, p=0,011$].

Επίσης η χορήγηση CRF έχει την τάση να εμφανίσει σημαντική επίδραση στα επίπεδα της γλυκίνης στο BN [$F(1, 27)=3.196, p=0,085$].

Ωστόσο δεν παρατηρείται αλληλεπίδραση του φύλου με τη χορήγηση του CRF [$p=0,151$].



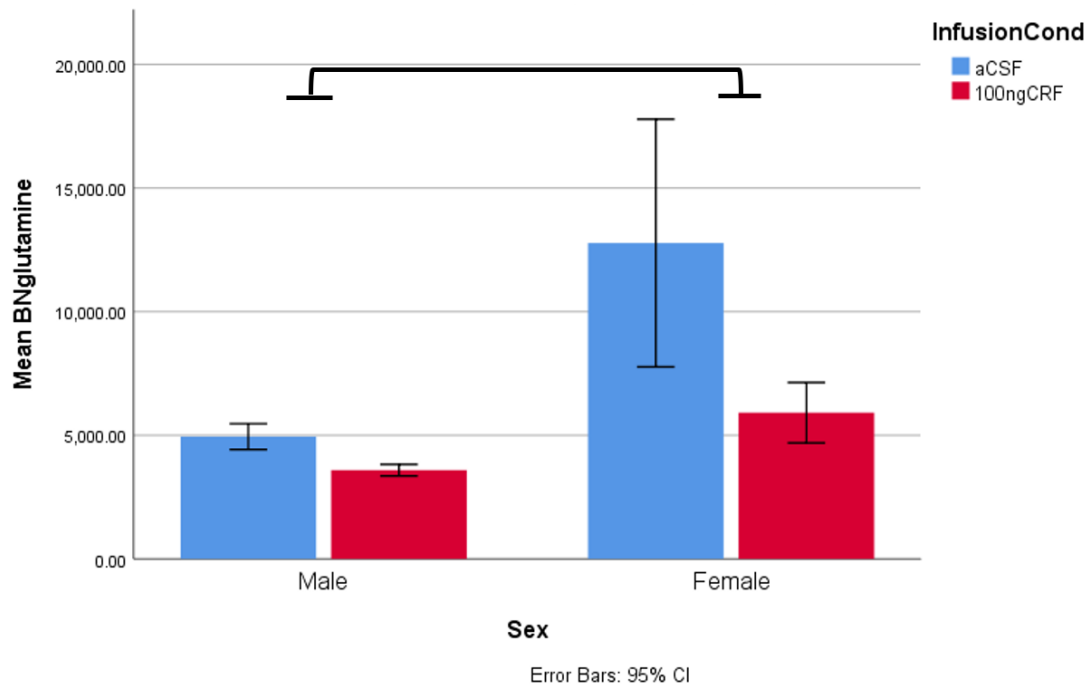
Γράφημα 6.2.3.: Απεικόνιση μέσης τιμής επιπέδων της γλυκίνης στο BN. Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί και θηλυκοί αρουραίοι στους οποίους χορηγήθηκε έκδοχο (aCSF) ή η ουσία CRF 100ng. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει την κύρια επίδραση του φύλου και υπογραμμίζει τη στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε αρσενικούς και θηλυκούς αρουραίους, με επίπεδο σημαντικότητας $p \leq 0,05$.

Επίπεδα γλουταμίνης στην περιοχή του εγκεφάλου BN

Η χορήγηση CRF δεν έχει στατιστικά σημαντική επίδραση στα επίπεδα της γλουταμίνης στον προμετωπιαίο φλοιό. [$p=0,142$]

Παράλληλα δεν παρατηρείται αλληλεπίδραση του φύλου με τη χορήγηση του CRF [$p=0,320$].

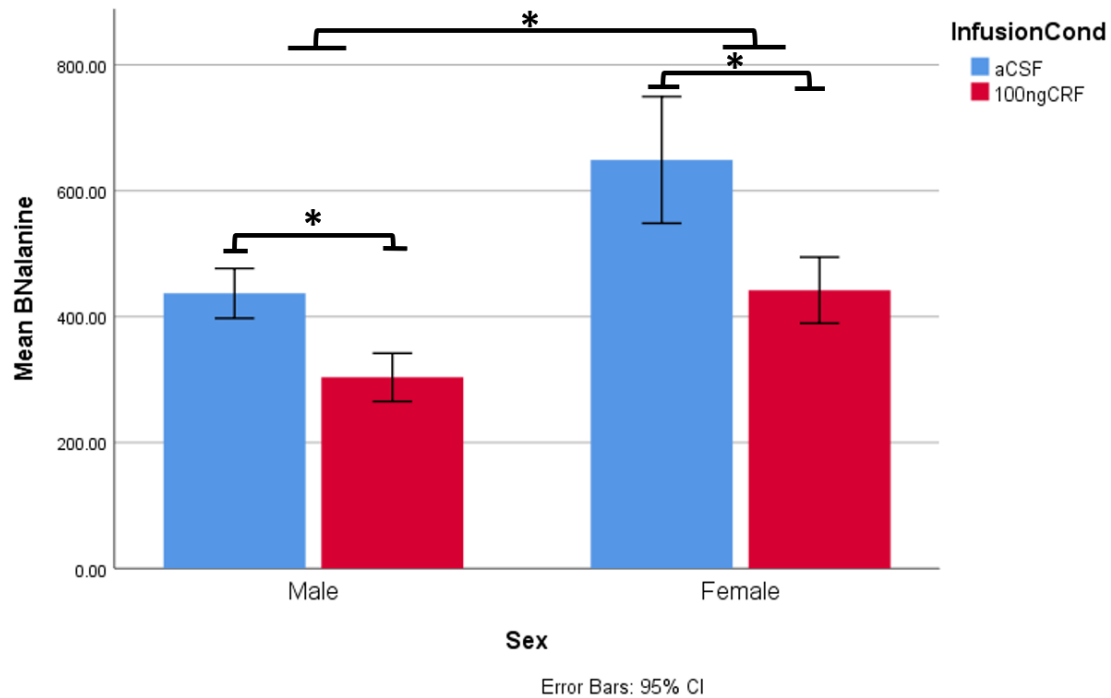
Ωστόσο το φύλο τείνει να έχει στατιστικά σημαντική επίδραση στα επίπεδα της γλουταμίνης στον προμετωπιαίο φλοιό [$F(1, 27)=3.496, p=0,072$].



Γράφημα 6.2.4.: Απεικόνιση μέσης τιμής επιπέδων της γλουταμίνης στο BN. Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί και θηλυκοί αρουραίοι στους οποίους χορηγήθηκε έκδοχο (aCSF) ή η ουσία CRF 100ng.

Επίπεδα αλανίνης στην περιοχή του εγκεφάλου BN

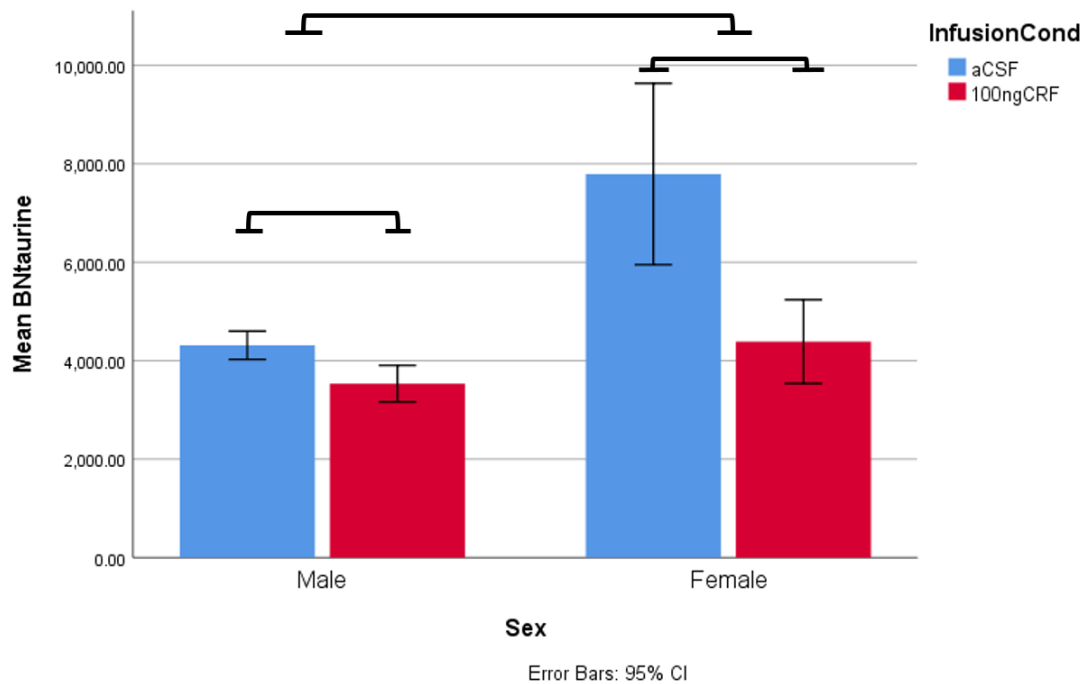
Τόσο το φύλο όσο και η χορήγηση CRF έχουν στατιστικά σημαντική επίδραση στα επίπεδα της αλανίνης στο BN [$F(1,27)=7.111$, $p=0,013$, $F(1,27)=6.712$, $p=0,015$ αντίστοιχα]. Ωστόσο δεν παρατηρείται αλληλεπίδραση του φύλου μετά την χορήγηση του CRF [$p=0,580$].



Γράφημα 6.2.5.: Απεικόνιση μέσης τιμής επιπέδων της αλανίνης στο BN. Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί και θηλυκοί αρουραίοι της οποίους χορηγήθηκε έκδοχο (aCSF) ή η ουσία CRF 100ng. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει την κύρια επίδραση του φύλου και της χορήγησης CRF και υπογραμμίζει τη στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε αρσενικούς και θηλυκούς αρουραίους, με επίπεδο σημαντικότητας $p \leq 0,05$. Επίσης υποδηλώνει την εμφάνιση σημαντικής επίδρασης στα επίπεδα της αλανίνης με τη χορήγηση CRF. $p \leq 0,05$.

Επίπεδα ταυρίνης στην περιοχή του εγκεφάλου BN

Τόσο το φύλο όσο και η χορήγηση CRF τείνουν να έχουν στατιστικά μεγάλη επίδραση στα επίπεδα της ταυρίνης στον προμετωπιαίο φλοιό [$F(1,27)=3.862$, $p=0,060$, $F(1,27)=3.601$, $p=0,068$ αντίστοιχα]. Ωστόσο δεν παρατηρείται αλληλεπίδραση του φύλου με τη χορήγηση του CRF [$p=0,244$].



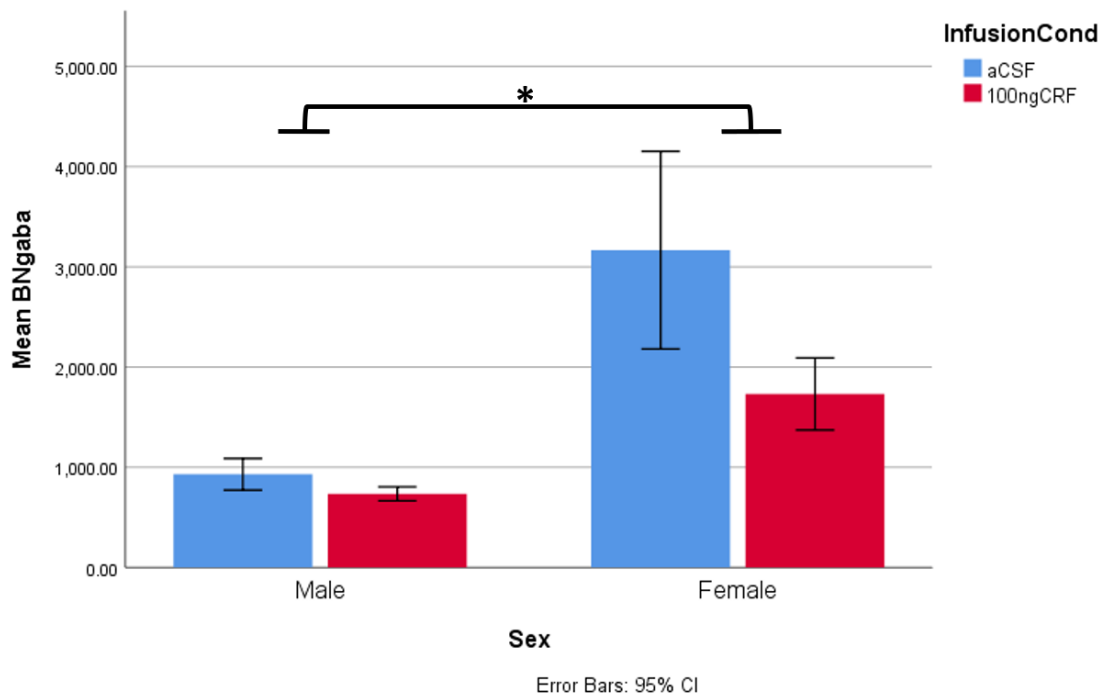
Γράφημα 6.2.5.: Απεικόνιση μέσης τιμής επιπέδων της ταυρίνης στο BN. Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί και θηλυκοί αρουραίοι της οποίους χορηγήθηκε έκδοχο (aCSF) ή η ουσία CRF 100ng.

Επίπεδα GABA στην περιοχή του εγκεφάλου BN

Η χορήγηση CRF δεν έχει στατιστικά σημαντική επίδραση στα επίπεδα του GABA στον προμετωπιαίο φλοιό. [p=0,158]

Παράλληλα δεν παρατηρείται αλληλεπίδραση του φύλου με τη χορήγηση του CRF [p=0,279].

Ωστόσο το φύλο έχει στατιστικά σημαντική επίδραση στα επίπεδα του GABA στον προμετωπιαίο φλοιό [F(1, 27)=8.314, p=0,008].



Γράφημα 6.2.7.: Απεικόνιση μέσης τιμής επιπέδων του GABA στο BN. Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί και θηλυκοί αρουραίοι στους οποίους χορηγήθηκε έκδοχο (aCSF) ή η ουσία CRF 100ng. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει την κύρια επίδραση του φύλου και υπογραμμίζει τη στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε αρσενικούς και θηλυκούς αρουραίους, με επίπεδο σημαντικότητας $p \leq 0,05$.

Κεφάλαιο 7. Συζήτηση

Κατά τη διάρκεια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, πραγματοποιήθηκε ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός αμινοξέων στον προμετωπιαίο φλοιό και στην περιοχή του εγκεφάλου γνωστή ως nucleus basalis of Meynert, σε δείγματα που προήλθαν από θηλυκούς και αρσενικούς αρουραίους, στους οποίους είχε χορηγηθεί η ουσία CRF. Ο προσδιορισμός έγινε μέσω της τεχνικής υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης με ηλεκτροχημικό ανιχνευτή (HPLC-ED). Τα αμινοξέα που αναλύθηκαν είναι το γλουταμικό οξύ (GLU), η σερίνη (SER), η γλυκίνη (GLY), η γλουταμίνη (GLN), η αλανίνη (ALA), η ταυρίνη (TAU) και το γ -αμινοβουτυρικό οξύ (GABA). Η νευροχημική και στατιστική ανάλυση έδειξε διαφυλικές διαφορές τόσο στα δείγματα PFC όσο και στα δείγματα BN.

Αποτελέσματα προμετωπιαίου φλοιού:

Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στον PFC ήταν λιγότερες σε σχέση με αυτές του BN. Επειδή η χορήγηση του CRF έγινε στο BF, είναι αναμενόμενο οι μεταβολές που προκαλεί αυτή η ουσία να είναι πιο εμφανείς στην περιοχή αυτή παρά στο PFC. Μία υπόθεση που αναλύθηκε και νωρίτερα στο 3^ο κεφάλαιο είναι ότι ο CRF έχει την ικανότητα να δρα στο BN επηρεάζοντας την νευρική λειτουργία σε αυτήν την περιοχή. Συνεπώς οι χολινεργικοί νευρώνες του BN που επικοινωνούν με το PFC επηρεάζονται και αυτοί. Από την άλλη πλευρά η απελευθέρωση ακετυλοχολίνης (ACh) στον PFC έχει φανεί ότι είναι κρίσιμη για την ανίχνευση σήματος. (Eck et al., 2020) Με αυτό τον τρόπο οι αλλαγές που μπορεί να υφίστανται οι χολινεργικοί νευρώνες, θα μπορούσαν να επηρεάσουν την απελευθέρωση ακετυλοχολίνης στο PFC. Αυτή η επιρροή θα μπορούσε να γίνει αντιληπτή ελέγχοντας την ποσότητα των νευροδιαβιβαστών που υπάρχουν υπό φυσιολογικές συνθήκες στον προμετωπιαίο φλοιό και συγκρίνοντάς τους, με τις ποσότητες που υπάρχουν μετά τη χορήγηση του CRF.

Η νευροχημική και στατιστική ανάλυση έδειξε ότι το φύλο έχει στατιστικά σημαντική επίδραση στα επίπεδα της γλουταμίνης στον προμετωπιαίο φλοιό. Πιο ειδικά όσον αφορά τις φυσιολογικές τιμές (aCSF) τα θηλυκά εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα

γλουταμίνης στο προμετωπιαίο φλοιό σε σχέση με τα αρσενικά. Αυτή η σχέση παρατηρείται επίσης και στους αρουραίους στους οποίους έχει χορηγηθεί CRF.

Επιπλέον παρατηρείται αλληλεπίδραση του φύλου με τη χορήγηση του CRF. Η χορήγηση CRF φαίνεται να αυξάνει τα επίπεδα του GABA που υπάρχουν στον προμετωπιαίο φλοιό των αρσενικών αρουραίων, ενώ μειώνει τα επίπεδα του GABA των θηλυκών. Η ίδια τάση φαίνεται να παρατηρείται και στα επίπεδα της αλανίνης. Ένα συμπέρασμα που μπορεί να ληφθεί από αυτά τα αποτελέσματα είναι ότι ο CRF επηρεάζει με διαφορετικούς μηχανισμούς τα αμινοξέα GABA και αλανίνης στο, προμετωπιαίο φλοιό στους αρσενικούς με τους θηλυκούς αρουραίους, αναδεικνύοντας έτσι τη διαφυλική διαφορά.

Αποτελέσματα από την περιοχή του εγκεφάλου BN (nucleus basalis of Meynert):

Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στα δείγματα που πάρθηκαν από αυτή την περιοχή είναι πιο έντονες. Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι όσον αφορά το αμινοξύ αλανίνη παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά και στα δύο φύλα μεταξύ των αρουραίων που έλαβαν aCSF σε σχέση με αυτούς που έλαβαν CRF, με τους τελευταίους να εμφανίζουν μείωση των επιπέδων της αλανίνης. Αντίστοιχα όσον αφορά τα αμινοξέα γλουταμικό, γλυκίνη και ταυρίνη υπάρχει η τάση να παρατηρηθεί διαφορά, με τα επίπεδα τους να μειώνονται αντίστοιχα.

Επιπλέον παρατηρείται ότι τόσο η γλυκίνη όσο και η αλανίνη και το γλουταμικό εμφανίζουν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα επίπεδα στους θηλυκούς αρουραίους σε σχέση με τους αρσενικούς τόσο στα δείγματα aCSF όσο και στα CRF. Η ίδια τάση τείνει να παρατηρηθεί και στα επίπεδα των αμινοξέων γλουταμίνη, ταυρίνη και GABA.

Στο κεφάλαιο 3, αναφέρθηκε ότι η ικανότητα των αρουραίων να κατανοούν την σημασία της απουσίας σήματος επηρεάζεται από την λειτουργία του GABA. Από προκαταρκτικά πειράματα που έγιναν παρατηρήθηκε ότι σε αρουραίους που τους είχε χορηγηθεί CRF μειώθηκε ελαφρώς, χωρίς ωστόσο να επηρεαστεί ιδιαίτερα, η ικανότητά τους να κατανοούν την απουσία σήματος. (βλέπε Εικόνα 3.7.1. C) Άρα θα ήταν λογικό οι ποσότητες του GABA που υπάρχουν υπό φυσιολογικές συνθήκες (aCSF) τόσο στο BN όσο και στο PFC να είναι σε αντίστοιχα επίπεδα ή υψηλότερα σε

σχέση με τους αρουραίους που έλαβαν CRF, κάτι το οποίο φαίνεται να συμφωνεί από τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από την παρούσα ποσοτική ανάλυση. Αν και το CRF φαίνεται να αντιδρά διαφορετικά στα επίπεδα του GABA στο PFC των αρσενικών και των θηλυκών αρουραίων αυτή η διαφορετική δράση δεν είναι ικανή να δώσει στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδά τους όταν συγκρίνονται οι τιμές aCSF με τις CRF. Επιπλέον στα δείγματα που πάρθηκαν από το BN παρατηρείται τάση προς μείωση των επιπέδων του μετά την εισαγωγή του CRF. Αυτή η τάση για μείωση μπορεί να είναι αυτή που προκαλεί την μικρή σχετικά μείωση της ικανότητας των αρουραίων να κατανοούν την απουσία σήματος, που παρατηρήθηκε στο προκαταρκτικό πείραμα.

Επιπλέον το γεγονός ότι παρατηρούνται διαφορές και σε άλλους νευροδιαβιβαστές-αμινοξέα δεν θα έπρεπε να θεωρηθεί αμελητέο. Ειδικότερα τα αποτελέσματα που πάρθηκαν για το αμινοξύ αλανίνη θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην περαιτέρω κατανόηση της λειτουργίας του BN, εφόσον και οι γνώσεις που υπάρχουν για αυτόν είναι εξαιρετικά περιορισμένες.

Τέλος, πρέπει να τονιστεί η σημαντική διαφορά που παρατηρείται στα επίπεδα των νευροδιαβιβαστών στο BN των αρσενικών και των θηλυκών αρουραίων. Σχεδόν σε όλους τους νευροδιαβιβαστές που εξετάστηκαν παρατηρήθηκε σημαντικά μεγαλύτερη ποσότητα των επιπέδων στους θηλυκούς αρουραίους σε σχέση με τους αρσενικούς. Με αυτή την παρατήρηση αντικατοπτρίζεται η κύρια επίδραση του φύλου στα επίπεδα αυτών. Τα διαφορετικά αυτά επίπεδα πιθανώς να υποδηλώνουν διαφορετικούς μηχανισμούς λειτουργίας ανάμεσα στα δύο φύλα. Για παράδειγμα, υπάρχουν διαφορές του φύλου σε διαταραχές διάθεσης και άγχους (N Kokras & Dalla, 2014). Επίσης, ο τρόπος με τον οποίο αντιδρούν οι γυναίκες ενάντια στις διαφορετικές μορφές του στρες είναι διαφορετικός σε σχέση με τον οποίο αντιδρούν οι άνδρες. Άρα η ξεχωριστή μελέτη και ανάπτυξη θεραπειών με βάση το φύλο κρίνεται απαραίτητη. Η καταγραφή τέτοιων διαφυλικών διαφορών όπως αυτές που παρατηρήθηκαν στο κεφάλαιο 6.2. βοηθούν στην περαιτέρω κατανόηση του διαφορετικού τρόπου λειτουργίας του εγκεφάλου με βάση το φύλο και ίσως κάποια στιγμή να βοηθήσουν στην ανάπτυξη φυλο-εξαρτώμενων θεραπειών.

Εν κατακλείδι, η αναλυτική μέθοδος που αναπτύχθηκε κατά την διάρκεια της παρούσας διπλωματικής εργασίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό

αμινοξέων, τα οποία όχι μόνο βρίσκονται υπό φυσιολογικές συνθήκες στα νευρικά κύτταρα, αλλά έχουν την ικανότητα να δρουν ως νευροδιαβιβαστές. Τόσο η ποιοτική όσο και η ποσοτική ανάλυση αυτών των αμινοξέων θα μπορούσαν να δώσουν απαντήσεις στον τρόπο λειτουργίας του εγκεφάλου, εφόσον μέσω του προσδιορισμού τους μπορούν να γίνουν αντιληπτές οι μεταβολές των συγκεντρώσεών τους σε διάφορες διαταραχές και φαρμακολογικές παρεμβάσεις. Εν ολίγοις η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα μέσο επιβεβαίωσης διαφόρων επιστημονικών υποθέσεων και να συμβάλει σημαντικά στην πιστοποίηση μια πειραματικής υπόθεσης, καθιστώντας την έτσι ένα εξαιρετικά σημαντικό ερευνητικό εργαλείο.

Βιβλιογραφία

- Anwyl, R. (1999). *Metabotropic glutamate receptors: Electrophysiological properties and role in plasticity*. 38.
- Bailey, B., Plante, M., Crafts, C., Gamache, P., Waraska, J., & Acworth, I. (n.d.). *Analysis of Neuroactive Amino Acids Using UHPLC and Electrochemical Detection*. 4.
- Bangasser, D. A., Wicks, B., Waxler, D. E., & Eck, S. R. (2017). Touchscreen Sustained Attention Task (SAT) for Rats. *Journal of Visualized Experiments*, 127, 56219. <https://doi.org/10.3791/56219>
- Berg, J. M., Stryer, L., & Tymoczko, J. L. (2002). *Biochemistry. 5th edition*. W. H. Freeman 2002. <http://lib.ugent.be/catalog/ebk01:3450000000002008>
- Bird, I. M. (1989). High performance liquid chromatography: Principles and clinical applications. *BMJ*, 299(6702), 783–787. <https://doi.org/10.1136/bmj.299.6702.783>
- Bongiovanni, R., Yamamoto, B. K., & Jaskiw, G. E. (2001). Improved method for the measurement of large neutral amino acids in biological matrices. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 754(2), 369–376. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00629-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00629-0)
- Branco, L. G. S., Carnio, E. C., & Pittman, Q. J. (2010). Gaseous neurotransmitters and their role in anapnoea. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, 2, 948–960.
- Brownlee, D., & Fairweather, I. (1999). Exploring the neurotransmitter labyrinth in nematodes. *Trends in Neurosciences*, 22, 16–24. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(98\)01281-8](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(98)01281-8)
- Cole, R. D., Kawasumi, Y., Parikh, V., & Bangasser, D. A. (2016). Corticotropin releasing factor impairs sustained attention in male and female rats. *Behavioural Brain Research*, 296, 30–34. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.08.023>

- Cuchiaro, H., & Laurens, L. M. L. (2019). Total Protein Analysis in Algae via Bulk Amino Acid Detection: Optimization of Amino Acid Derivatization after Hydrolysis with *O*-Phthalaldehyde 3-Mercaptopropionic Acid (OPA-3MPA). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *67*(19), 5672–5679. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00884>
- Dale, H. (1954). The beginnings and the prospects of neurohumoral transmission. *Pharmacological Reviews*, *6*, 7–13.
- Dieterich, D. C., Hodas, J. J. L., Gouzer, G., Shadrin, I. Y., Ngo, J. T., Triller, A., Tirrell, D. A., & Schuman, E. M. (2010). In situ visualization and dynamics of newly synthesized proteins in rat hippocampal neurons. *Nature Neuroscience*, *13*(7), 897–905. <https://doi.org/10.1038/nn.2580>
- Durai Ananda Kumar T, Sai Charan, Venkateswarlu A, & Supriya Reddy K. (2020). Evolution of liquid chromatography: Technologies and applications. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, *11*(3), 3204–3211. <https://doi.org/10.26452/ijrps.v11i3.2449>
- Dydo, P., & Turek, M. (2015). Boron Removal Using Ion Exchange Membranes. In *Boron Separation Processes* (pp. 249–265). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63454-2.00011-3>
- Eck, S. R., Xu, S.-J., Telenson, A., Duggan, M. R., Cole, R., Wicks, B., Bergmann, J., Lefebvre, H., Shore, M., Shepard, K. A., Akins, M. R., Parikh, V., Heller, E. A., & Bangasser, D. A. (2020). Stress Regulation of Sustained Attention and the Cholinergic Attention System. *Biological Psychiatry*, *88*(7), 566–575. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2020.04.013>
- Feher, J. (2012). Cells, Synapses, and Neurotransmitters. In *Quantitative Human Physiology* (pp. 375–388). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800883-6.00034-3>
- Folkman, S. (n.d.). *Personal Control and Stress and Coping Processes: A Theoretical Analysis*.

- Fritschy, J.-M., & Panzanelli, P. (2014). GABA_A receptors and plasticity of inhibitory neurotransmission in the central nervous system. *European Journal of Neuroscience*, 39(11), 1845–1865. <https://doi.org/10.1111/ejn.12534>
- González-Espinosa, C., & Guzmán-Mejía, F. (2014). Basic Elements of Signal Transduction Pathways Involved in Chemical Neurotransmission. In *Identification of Neural Markers Accompanying Memory* (pp. 121–133). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408139-0.00008-0>
- Gyimesi-Forrás, K., Leitner, A., Akasaka, K., & Lindner, W. (2005). Comparative study on the use of ortho-phthalaldehyde, naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde and anthracene-2,3-dicarboxaldehyde reagents for α -amino acids followed by the enantiomer separation of the formed isoindolin-1-one derivatives using quinine-type chiral stationary phases. *Journal of Chromatography A*, 1083(1–2), 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.06.012>
- H. Ferreira-Vieira, T., M. Guimaraes, I., R. Silva, F., & M. Ribeiro, F. (2016). Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Current Neuropharmacology*, 14(1), 101–115. <https://doi.org/10.2174/1570159X13666150716165726>
- Heller, A., Barkleit, A., Foerstendorf, H., Tsushima, S., Heim, K., & Bernhard, G. (2012). Curium(iii) citrate speciation in biological systems: A europium(iii) assisted spectroscopic and quantum chemical study. *Dalton Transactions*, 41(45), 13969. <https://doi.org/10.1039/c2dt31480k>
- Hirvikoski, T., Lindholm, T., Nordenström, A., Nordström, A.-L., & Lajic, S. (2009). High self-perceived stress and many stressors, but normal diurnal cortisol rhythm, in adults with ADHD (attention-deficit/hyperactivity disorder). *Hormones and Behavior*, 55(3), 418–424. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2008.12.004>
- Holtzman, C. W., Trotman, H. D., Goulding, S. M., Ryan, A. T., MacDonald, A. N., Shapiro, D. I., Brasfield, J. L., & Walker, E. F. (2013). Stress and neurodevelopmental processes in

the emergence of psychosis. *Neuroscience*, 249, 172–191.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.12.017>

Hoonakker, M., Daignon-Camus, N., & Bonnefond, A. (2017). Sustaining attention to simple visual tasks: A central deficit in schizophrenia? A systematic review: Sustained attention in schizophrenia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1408(1), 32–45. <https://doi.org/10.1111/nyas.13514>

Hupalo, S., Bryce, C. A., Bangasser, D. A., Berridge, C. W., Valentino, R. J., & Floresco, S. B. (2019). Corticotropin-Releasing Factor (CRF) circuit modulation of cognition and motivation. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 103, 50–59.

<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.06.010>

Kim, J. H., & Huganir, R. L. (n.d.). *Organization and regulation of proteins at synapses*. 7.

Kokras, N., & Dalla, C. (2014). Sex differences in animal models of psychiatric disorders: Sex differences in models of psychiatric disorders. *British Journal of Pharmacology*, 171(20), 4595–4619. <https://doi.org/10.1111/bph.12710>

Kokras, Nikolaos, Dioli, C., Paravatou, R., Sotiropoulos, M. G., Delis, F., Antoniou, K., Calogeropoulou, T., Charalampopoulos, I., Gravanis, A., & Dalla, C. (2020). Psychoactive properties of BNN27, a novel neurosteroid derivate, in male and female rats. *Psychopharmacology*, 237(8), 2435–2449.

<https://doi.org/10.1007/s00213-020-05545-5>

LOEWI, O. (1956). On the intraneural state of acetylcholine. *Experientia*, 12, 331–333.

<https://doi.org/10.1007/BF02165331>

Luján, R. (2005). From Molecules to Networks: An Introduction to Cellular and Molecular Neuroscience, John H. Byrne, James L. Roberts (Eds.). Elsevier Academic Press (2004). *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 29, 228–229.

<https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2004.12.002>

- Magnin, E., & Maurs, C. (2017). Attention-deficit/hyperactivity disorder during adulthood. *Revue Neurologique*, 173(7–8), 506–515.
<https://doi.org/10.1016/j.neurol.2017.07.008>
- Melo, A., Kokras, N., Dalla, C., Ferreira, C., Ventura-Silva, A. P., Sousa, N., & Pêgo, J. M. (2015). The positive effect on ketamine as a priming adjuvant in antidepressant treatment. *Translational Psychiatry*, 5(5), e573–e573.
<https://doi.org/10.1038/tp.2015.66>
- Möhler, H. (2009). Role of GABAA receptors in cognition. *Biochemical Society Transactions*, 37(6), 1328–1333. <https://doi.org/10.1042/BST0371328>
- Molnár-Perl, I. (2001). Derivatization and chromatographic behavior of the o-phthaldialdehyde amino acid derivatives obtained with various SH-group-containing additives. *Journal of Chromatography A*, 913(1–2), 283–302.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)01200-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)01200-0)
- Newman, C. (n.d.). *Life Events and the 1-Year Prevalence of Major Depressive Episode, Generalized Anxiety Disorder, and Panic Disorder in a Community Sample*. 7.
- Oja, S. S., & Saransaari, P. (2017). Significance of Taurine in the Brain. In D.-H. Lee, S. W. Schaffer, E. Park, & H. W. Kim (Eds.), *Taurine 10* (Vol. 975, pp. 89–94). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-024-1079-2_8
- Oliver, G., & Schäfer, E. A. (1895). On the physiological action of extract of the suprarenal capsules. *Proc Physiol Soc.*, 9, i–iv.
- Olsen, R. W., & Sieghart, W. (2009). GABAA receptors: Subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology*, 56(1), 141–148.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.07.045>
- Pereda, A. (2014). Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nature Reviews. Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.1038/nrn3708>

- Siddiqui, M. R., AlOthman, Z. A., & Rahman, N. (2017). Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review. *Arabian Journal of Chemistry*, *10*, S1409–S1421. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.04.016>
- Skoog, D., Holler, F., & Nieman, T. (2020). *Principles of Instrumental Analysis / D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman*.
- Swadesh, J. K. (2000). HPLC: Practical and industrial applications, second edition. In *HPLC: Practical and Industrial Applications, Second Edition* (p. 461). <https://doi.org/10.1201/9781420042665>
- Szepesi, Z., Manouchehrian, O., Bachiller, S., & Deierborg, T. (2018). Bidirectional Microglia–Neuron Communication in Health and Disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*, 323. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00323>
- Tiedje, K. E., Stevens, K., Barnes, S., & Weaver, D. (2010). Alanine as a small molecule neurotransmitter. *Neurochemistry International*, *57*, 177–188. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.06.001>
- Van'T Veer, A., Yano, J. M., Carroll, F. I., Cohen, B. M., & Carlezon, W. A. (2012). Corticotropin-Releasing Factor (CRF)-Induced Disruption of Attention in Rats Is Blocked by the κ -Opioid Receptor Antagonist JDTC. *Neuropsychopharmacology*, *37*(13), 2809–2816. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.151>
- Vasanits, A., Kutlan, D., Sass, P., & Molnar-Perl, I. (2000). Retention/quantitation properties of the o-phthaldialdehyde–3-mercaptopropionic acid and the o-phthaldialdehyde–N-acetyl-l-cysteine amino acid derivatives in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, *870*(1–2), 271–287. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00942-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00942-5)
- Veca, A., & Dreisbach, J. H. (1988). Classical neurotransmitters and their significance within the nervous system. *Journal of Chemical Education*, *65*(2), 108. <https://doi.org/10.1021/ed065p108>

Vicario, N., Zappalà, A., Calabrese, G., Gulino, R., Parenti, C., Gulisano, M., & Parenti, R.

(2017). Connexins in the Central Nervous System: Physiological Traits and Neuroprotective Targets. *Frontiers in Physiology*, *8*, 1060.

<https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01060>

Wicks, B., Waxler, D. E., White, K. M., Duncan, N., Bergmann, J., Cole, R. D., Parikh, V., &

Bangasser, D. A. (2017). Method for testing sustained attention in touchscreen operant chambers in rats. *Journal of Neuroscience Methods*, *277*, 30–37.

<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2016.12.003>

Zandy, S. L., Doherty, J. M., Wibisono, N. D., & Gonzales, R. A. (2017). High sensitivity HPLC

method for analysis of in vivo extracellular GABA using optimized fluorescence parameters for o-phthalaldehyde (OPA)/sulfite derivatives. *Journal of*

Chromatography B, *1055–1056*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.04.003>

Zoli, M., Jansson, A., Syková, E., Agnati, L., & Fuxe, K. (1999). Volume transmission in the CNS

and its relevance for neuropsychopharmacology. *Trends in Pharmacological*

Sciences, *20*, 142–150. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(99\)01343-7](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(99)01343-7)

Σιδηροπούλου, Κ. (2015). *Βασικές αρχές λειτουργίας του νευρικού συστήματος.pdf*.

Nelson DL & Cox MM.

Lehninger Principles of Biochemistry - 7th ed

J. Mendham , R.C. Denney , J. D. Barnes , M.J.K. Thomas

Vogel's Quantitative Chemical Analysis (6th Edition) 6th Edition

Θ.Π. Χατζηιωάννου, Μ.Α.Κουππάρης (1990). Ενόργανη Ανάλυση