



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
Ιατρική Σχολή  
Μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών στις Νευροεπιστήμες

Μεταπτυχιακή εργασία

ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΝΕΩΝ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΩΝ  
ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΕΝΑ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΓΙΑ ΤΗ ΝΟΣΟ  
ΑΛΤΣΧΑΙΜΕΡ

**Ηλέκτρα Παπακωνσταντίνου**

Εργαστήριο Φαρμακολογίας  
Ιατρική Σχολή,  
Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Επιβλέπουσα: Επικ. Καθ. Χριστίνα Δάλλα

Αθήνα 2014

## Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία έχει πραγματοποιηθεί στην Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, στο εργαστήριο Φαρμακολογίας, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών στις Νευροεπιστήμες, το οποίο προσφέρεται από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Κρήτης στο Ηράκλειο.

Θα ήθελα κατ' αρχάς να ευχαριστήσω την τέως διευθύντρια του μεταπτυχιακού προγράμματος, Καθηγήτρια Φαρμακολογίας κα Κική Θερού για την έμπειρη καθοδήγηση και συμπαράσταση, που χωρίς δεύτερη σκέψη προσέφερε σε όλους τους μεταπτυχιακούς φοιτητές του προγράμματος των Νευροεπιστημών, αλλά και για τη φανερό επιθυμία της να μας εμπνεύσει και να μας εμφυσήσει όχι μόνο την αξία της έρευνας, μέσω της αγάπης της προς αυτή, αλλά και την ορθή και ηθική επιστημονική προσέγγιση στην ακαδημαϊκή μας πορεία.

Ευχαριστώ, επίσης, τη νυν διευθύντρια του μεταπτυχιακού προγράμματος, Καθηγήτρια Μοριακής βιολογίας – αναπτυξιακής νευροβιολογίας κα Δόμνα Καραγωγέως για την προθυμία της να βοηθήσει σε κάθε ζήτημα στο οποίο χρειαζόμασταν καθοδήγηση.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, Επίκουρη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας κα Χριστίνα Δάλλα για την ουσιαστική της συμβολή στην εκπόνηση και συγγραφή της παρούσας εργασίας. Για την άρτια επίβλεψη, τις γνώσεις που μου μετέδωσε, την υπομονή και συμπαράστασή της σε κάθε βήμα από την αρχή μέχρι το τέλος, και για την κατανόηση και την ευμενή διάθεση της σε όλες τις δύσκολες στιγμές. Η αγάπη και ενασχόλησή της με την επιστημονική έρευνα στάθηκε για μένα πηγή έμπνευσης και ορατό παράδειγμα για τη συνέχιση και περάτωση της διπλωματικής μου εργασίας.

Θα ήθελα ακόμα, να ευχαριστήσω τον Δρ. Νικόλαο Κόκρα ψυχίατρο, συνεργάτη του Εργ. Φαρμακολογίας της Αθήνας, για τη βοήθεια και καθοδήγηση που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας.

Οι αξίες της ομαδικότητας, της συνεργατικότητας και της σύμπνοιας για την περάτωση ενός στόχου, αποτελούν για μένα αναπόσπαστο μέρος κάθε ερευνητικής εργασίας και αυτό μου το προσέφεραν όλα ανεξαιρέτως τα μέλη του εργαστηρίου φαρμακολογίας. Για το λόγο αυτό, αλλά και για όλες τις στιγμές που περάσαμε μαζί, ευχαριστώ θερμά και είμαι ευγνώμων σε όλους τους ακόλουθους: Αγγελική Πανέρα, Βασίλη Καφετζόπουλο, Δέσποινα Παπασάββα, Έλενα Τζουβέκα, Κατερίνα Δούκα, Μαρία Κορωναίου.

Χωρίς την πνευματική και ψυχική συμπόρευση της οικογένειας και των φίλων, έστω κι εξ' αποστάσεως, η περάτωση των στόχων μου θα ήταν πολύ πιο δύσκολη. Γι' αυτό και τους ευχαριστώ θερμά, που με το δικό του τρόπο ο καθένας από αυτούς με ενθάρρυναν στην ολοκλήρωση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας, αλλά και της μέχρι τώρα ακαδημαϊκής μου πορείας.

<b>Συντομογραφίες</b>	
<b>3xTg</b>	Διαγονιδιακό μοντέλο μυός τριπλής μετάλλαξης
<b>AICD</b>	APP Intracellular Domain
<b>Aph</b>	Anterior pharynx-defective 1, συστατικό συμπλέγματος γ-σεκρετάσης
<b>ApoE</b>	Apolipoprotein E
<b>APP</b>	Amyloid β Precursor Protein
<b>BDNF</b>	Brain-derived Neurotrophic Factor
<b>E2</b>	Οιστραδιόλη
<b>EPSP</b>	Excitatory Postsynaptic Potential
<b>FYN</b>	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase
<b>GSK-3</b>	Glycogen synthase kinase 3
<b>GTP</b>	Guanosine triphosphate protein
<b>LTP</b>	Long-term Potentiation
<b>MAP</b>	Mitogen-activated protein kinase
<b>MAPT</b>	Microtubule-associated protein Tau
<b>MARK</b>	Mammalian MAP/microtubule affinity-regulating kinase
<b>NFT</b>	Neurofibrillary Tangle
<b>NMDA</b>	N-methyl-D-aspartate receptor
<b>PEN-2</b>	Presenilin enhancer 2 protein
<b>PHF</b>	Paired Helical Filaments
<b>PSD-95</b>	Postsynaptic density protein 95
<b>PSEN 1</b>	Presenilin 1
<b>PSEN 2</b>	Presenilin 2
<b>WT</b>	Wild Type
<b>ΚΝΣ</b>	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>A. Εισαγωγή.....</b>	<b>8</b>
1. Νόσος του Αλτσχάιμερ.....	8
1.1. Επιδημιολογία.....	8
1.2. Αιτιολογία – Παράγοντες κινδύνου και προστασίας.....	9
1.3. Μοριακή Παθοφυσιολογία.....	10
1.3.1. APP και πεπτίδιο Αβ.....	10
1.3.2. Πρωτεΐνη Ταυ.....	13
1.3.3. Πρεσενιλίνες.....	17
1.3.4. Οξειδωτικό στρες.....	18
1.3.5. Ασβέστιο.....	20
1.4. Γενετικοί παράγοντες.....	21
1.5. Χολινεργική υπόθεση.....	24
1.6. Φαρμακολογικές προσεγγίσεις.....	25
2. Συμπεριφορικές δοκιμασίες.....	30
2.1. Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου.....	30
2.2. Δοκιμασία φωτός/σκότους.....	31
2.3. Δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου.....	32
2.4. Δοκιμασία λαβυρίνθου Υ.....	34
2.5. Δοκιμασία αιώρησης από την ουρά.....	35
3. Διαγονιδιακό μοντέλο 3xTg για τη νόσο AD.....	35
3.1. Δημιουργία μοντέλου 3xTg.....	36
3.2. Νευροπαθολογικά χαρακτηριστικά μοντέλου 3xTg.....	37
3.3. Συμπεριφορικά χαρακτηριστικά μοντέλου 3xTg.....	40
3.3.1. Βάρος, κινητικός συντονισμός και ισορροπία.....	40
3.3.2. Νευρολογική αξιολόγηση.....	40
3.3.3. Μνήμη και μάθηση.....	41
3.3.4. Εξερευνητική συμπεριφορά.....	41
3.3.5. Κινητικότητα.....	42
3.3.6. Αγχώδης συμπεριφορά.....	42
4. Διαφυλικές διαφορές στη νόσο AD.....	43
4.1. Διαφυλικές διαφορές στο μοντέλο 3xTg.....	47

5. Ολευρωπαϊνή.....	48
5.1. Περιγραφή.....	48
5.2. Ιδιότητες Ολευρωπαϊνης.....	50
6. Σκοπός μελέτης.....	53
<b>B. Υλικά και μέθοδοι.....</b>	<b>54</b>
1. Χειρισμός πειραματοζώων.....	54
2. Αγωγή.....	55
3. Συμπεριφορικές δοκιμασίες.....	56
3.1 Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου.....	56
3.2 Δοκιμασία φωτεινού/σκοτεινού κλωβού.....	57
3.3 Δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου.....	58
3.4 Δοκιμασία λαβυρίνθου Υ.....	60
3.5 Δοκιμασία αιώρησης από την ουρά.....	61
4. Στατιστική ανάλυση.....	62
<b>Γ. Αποτελέσματα.....</b>	<b>63</b>
1. Δοκιμασία Ανοιχτού Πεδίου.....	63
1.1. Μέση ταχύτητα.....	63
1.2. Οριζόντια κινητικότητα.....	64
1.3. Οριζόντια απόσταση.....	64
1.4. Διάρκεια οριζόντιας απόστασης.....	65
1.5. Κάθετη κινητικότητα.....	65
1.6. Διάρκεια κάθετης κινητικότητας.....	66
1.7. Στερεοτυπική συμπεριφορά.....	67
1.8. Διάρκεια στερεοτυπικής συμπεριφοράς.....	67
1.9. Διάρκεια ακινησίας.....	68
1.10. Αριθμός εισόδων στο κέντρο του κλωβού.....	69
1.11. Χρόνος παραμονής στο κέντρο του κλωβού.....	69
1.12. Κινητικότητα στο κέντρο του κλωβού.....	69
1.13. Στερεοτυπική συμπεριφορά στο κέντρο του κλωβού.....	70
2. Δοκιμασία φωτός/σκότους.....	70
2.1. Συνολικές μεταπτώσεις στον κλωβό φωτός/σκότους.....	71

2.2. Χρόνος παραμονής στο φωτεινό διαμέρισμα.....	71
3. Δοκιμασία λαβυρίνθου Υ.....	72
3.1. Χρόνος παραμονής στον εναρκτήριο βραχίονα στην πρώτη συνεδρία...72	
3.2. Χρόνος παραμονής στον δεύτερο (μη εναρκτήριο) βραχίονα στην πρώτη συνεδρία.....	73
3.3. Συνολικές μεταπτώσεις κατά την πρώτη συνεδρία της δοκιμασίας.....	73
3.4. Χρόνος παραμονής στον εναρκτήριο βραχίονα στη δεύτερη συνεδρία.74	
3.5. Χρόνος παραμονής στον γνωστό (μη εναρκτήριο) βραχίονα στη δεύτερη συνεδρία.....	74
3.6. Χρόνος εξερεύνησης νέου βραχίονα στη δεύτερη συνεδρία.....	75
3.7. Συνολικές μεταπτώσεις κατά τη δεύτερη συνεδρία της δοκιμασίας.....	75
4. Δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου.....	76
4.1. Χρόνος εξερεύνησης όμοιων αντικειμένων.....	76
4.2. Χρόνος εξερεύνησης ανόμοιων αντικειμένων.....	76
4.3. Δείκτης προτίμησης νέου αντικειμένου.....	77
4.4. Δείκτης διάκρισης αντικειμένων.....	78
5. Δοκιμασία αιώρησης από την ουρά.....	79
5.1. Χρόνος ακινησίας.....	79
5.2. Χρόνος εμφάνισης ακινησίας.....	79
<b>Δ. Συζήτηση.....</b>	<b>80</b>
<b>Ε. Βιβλιογραφικές αναφορές.....</b>	<b>90</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η επίδραση της ουσίας Ολευρωπαϊνης, στον συμπεριφορικό φαινότυπο αρσενικών και θηλυκών διαγονιδιακών (3xTg) μυών, οι οποίοι φέρουν τρεις μεταλλάξεις στα γονίδια των ανθρώπινων πρωτεϊνών Ταυ, APP και Πρεσενιλίνης 1 και εμφανίζουν τους κύριους φαινότυπους της νόσου Αλτσχάιμερ. Η συμπεριφορά των πειραματοζώων αξιολογήθηκε μέσω των δοκιμασιών Ανοιχτού πεδίου, φωτεινού/σκοτεινού κλωβού, λαβυρίνθου σχήματος Υ, αναγνώρισης νέου αντικειμένου και αιώρησης από την ουρά. Οι 3xTg μύες εμφανίζουν ελλείμματα στην κινητικότητα, ανεξαρτήτως φύλου, τα οποία δεν αναστράφηκαν από τη χορήγηση Ολευρωπαϊνης. Η Ολευρωπαϊνη βελτιώνει όμως σε κάποιο βαθμό την ελαττωμένη εξερευνητική απόκριση των 3xTg μυών σε ένα νέο περιβάλλον. Επίσης, παρατηρήθηκαν διαφυλικές διαφορές στη συμπεριφορά στερεοτυπίας στους 3xTg μύες. Η συμπεριφορά άγχους και η «καταθλιπτικόμορφη» συμπεριφορά δεν επηρεάστηκαν από το γονότυπο, το φύλο ή τη χορήγηση της ουσίας. Στη δοκιμασία νέου αντικειμένου εμφανίστηκαν ήπια γνωσιακά ελλείμματα στους 3xTg μύες, τα οποία αναστράφηκαν από τη χορήγηση Ολευρωπαϊνης.

## ABSTRACT

The aim of the current study was to investigate the effects of compound Oleuropein, on the behavioral phenotype of an AD mouse model (3xTg) which expresses mutated forms of human proteins Tau, APP and Presenilin1. This model exhibits the main pathological aspects of AD. The behavioral screening included the open field, light/dark, Y maze, novel object recognition and tail suspension tests. The 3xTg mice exhibit reduced locomotor activity, which were not reversed by Oleuropein. Howevern oleuropein treatment resulted in the improvement of the reduced exploratory activity of 3xTg mice towards a novel environment. Sex differences were observed in stereotypic behavior of 3xTg mice. Anxiety levels and “depression-like” behavior did not affected by genotype, gender or treatment. In novel object recognition task 3xTg mice showed mild cognitive deficits, which were reversed by Oleuropein treatment.



## A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1. ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ ΑΛΤΣΧΑΪΜΕΡ

#### 1.1. Επιδημιολογία

Η νόσος του Αλτσχάιμερ (AD) αποτελεί την πιο συχνή νευροεκφυλιστική πάθηση, η οποία είναι η κύρια αιτία άνοιας στον δυτικό κόσμο και χαρακτηρίζεται από προοδευτική έκπτωση της γνωσιακής λειτουργίας. Σε αρχικό στάδιο επηρεάζεται η δημιουργία και η ανάκληση πρόσφατων μνημών, αλλά κατά την εξέλιξη της νόσου εκπίπτουν όλες σχεδόν οι νοητικές λειτουργίες, οδηγώντας τους ασθενείς σε αδυναμία περάτωσης των βασικών αναγκών της καθημερινής τους ζωής, εξάρτηση από άλλα φυσικά πρόσωπα του περιβάλλοντος τους και εν τέλει σε πρόωρο θάνατο (Mayeux & Stern, 2012). Τα κύρια νευροπαθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου, τα οποία θα αναλυθούν εκτενώς παρακάτω, είναι οι διαλυτές και νευριτικές πλάκες αμυλοειδούς-β (Αβ) πεπτιδίου που συσσωρεύονται εξωκυττάρια και περικλείονται συνήθως από δυστροφικούς νευρίτες και τα νευροϊνιδιακά έγκλειστα με υπερφωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη Ταυ, συνοδευόμενα από συναπτική δυσλειτουργία, γλοίωση και εν τέλει δυστροφία και θάνατο των νευρικών κυττάρων. Τα παραπάνω νευροπαθολογικά χαρακτηριστικά ωστόσο δεν εξηγούν πλήρως τα κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου και φαίνεται ότι η αλληλεπίδραση γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, συμβάλλουν σε μεγάλο βαθμό στην εμφάνιση και εξέλιξη της νόσου (Mayeux & Stern, 2012).

Πριν την εμφάνιση της νόσου, ένα μεγάλο ποσοστό των ασθενών περνούν από μια κατάσταση γνωστή ως Ήπια Γνωσιακή Δυσλειτουργία. Κατά τη συγκεκριμένη φάση υπάρχει υποκειμενική και αντικειμενική διαταραχή μνήμης, χωρίς να διαταράσσεται η καθημερινή λειτουργικότητα και η γενική γνωσιακή λειτουργικότητα (Mayeux & Stern, 2012).

Η διάγνωση της νόσου, όπως και των λοιπών μορφών άνοιας, τα οποία έχουν καθοριστεί το 1984 από το Εθνικό Ινστιτούτο Νευρολογικών και Επικοινωνιακών Διαταραχών και το Σύνδεσμο Εγκεφαλικού, νόσου Αλτσχάιμερ και σχετιζόμενων διαταραχών, περιλαμβάνουν 3 σημεία: Πρώτον, την προοδευτική επιδείνωση διαταραχής της μνήμης. Δεύτερον, διαταραχή σε περισσότερες από μία νοητικές

λειτουργίες (π.χ. αφασία, απραξία, αγνωσία ή εκτελεστική δυσλειτουργία) και τρίτον, διαταραχή σε μη νοητικά πεδία (στην προσωπικότητα, στο συναίσθημα και στη συμπεριφορά) και στην απώλεια κοινωνικής ή επαγγελματικής λειτουργικότητας. Σημαντικότερα σημεία κατά τη διάγνωση πιθανής AD αποτελούν η παρουσία πρώιμης και σημαντικής διαταραχής της επεισοδιακής μνήμης για διάστημα πέραν των 6 μηνών, η παρουσία ατροφίας του έσω κροταφικού λοβού, οι διαταραχές στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό στα επίπεδα Αβ πεπτιδίου και πρωτεΐνης Ταυ, καθώς και η ύπαρξη της νόσου στην οικογένεια (McKhann et al., 1984).

Περίπου 24 εκατομμύρια άνθρωποι υπολογίζεται ότι πάσχουν από κάποιας μορφής άνοιας και το 70% των περιπτώσεων οφείλεται σε νόσο AD (Ferri et al., 2005). Επίσης η συχνότητα εμφάνισης της AD αναμένεται να διπλασιαστεί μέχρι το 2040. Το ποσοστό εμφάνισης της νόσου αυξάνεται με την ηλικία, με κρίσιμο σημείο την ηλικία των 65 ετών, όπου η συχνότητα εμφάνισης της AD αυξάνεται ραγδαία (Mayeux & Stern, 2012).

## **1.2. Αιτιολογία- Παράγοντες κινδύνου και προστασίας**

Η αιτιολογία της AD παραμένει ακόμη ασαφής. Πολλαπλοί παράγοντες κινδύνου έχουν συσχετισθεί με αύξηση του ρίσκου για την εμφάνιση της AD και αντιθέτως μια σειρά από παράγοντες φαίνεται να επιδρούν προστατευτικά κατά αυτής. Οι παράγοντες κινδύνου που επανειλημμένως έχουν συσχετισθεί με τη νόσο περιλαμβάνουν τις αγγειοεγκεφαλικές παθήσεις, το ιστορικό διαβήτη, την υπέρταση, το κάπνισμα, την παχυσαρκία και την τραυματική κάκωση εγκεφάλου (Doll et al., 2000; Kilander et al., 2000; Koronen et al., 2004; Luchsinger et al. 2001; Mayeux & Stern, 2012; Pendlebury & Rothwell, 2009; Profenno et al., 2009).

Σειρά παραγόντων έχουν προταθεί ότι μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Άτομα με γνωσιακό απόθεμα διατρέχουν μειωμένο κίνδυνο κλινικής εμφάνισης της νόσου. Το υψηλό μορφωτικό επίπεδο, ο προνοσηρός δείκτης ευφυΐας, η συμμετοχή σε κοινές πνευματικές και κοινωνικές δραστηριότητες, καθώς και η ενασχόληση με γνωσιακές δραστηριότητες επηρεάζουν τη γνωσιακή λειτουργικότητα και το γνωσιακό απόθεμα. Εκτός αυτών, η μεσογειακή διατροφή (μειωμένη πρόσληψη λίπους και χοληστερόλης και μειωμένες θερμίδες) και η φυσική δραστηριότητα, αποτελούν επίσης παράγοντες προστασίας (Morris et al.,

2003; Scarmeas et al., 2006; Rovio et al., 2005). Μελέτες σε πειραματόζωα ενισχύουν τα ευρήματα των κλινικών μελετών, εφόσον υποδεικνύουν το ρόλο του εμπλουτισμένου περιβάλλοντος, της σωματικής δραστηριότητας και του ελεγχόμενου προγράμματος διατροφής στην αύξηση της ανθεκτικότητας των νευρώνων κατά της εκφύλισης, στην ενδυνάμωση της διαδικασίας της νευρογένεσης και στη βελτίωση των διαδικασιών μνήμης και μάθησης. Οι παραπάνω παράγοντες πιθανόν να επιδρούν προστατευτικά μέσω μηχανισμών που ενισχύουν την έκλυση του νευροτροφικού παράγοντα BDNF (Mattson et al., 2004).

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι παράγοντες κινδύνου που έχουν συσχετισθεί, καθώς και οι πιθανοί μηχανισμοί, οι οποίοι συμβάλλουν στην εμφάνιση της νόσου (Πίνακας 1) (Mayeux & Stern, 2012).

<b>Πρόγνωση</b>	<b>Πιθανοί μηχανισμοί</b>
Καρδιαγγειακή νόσος	I.Καταστροφή παρεγχύματος II.Στρατηγική θέση III.Αύξηση εναπόθεσης Αβ πεπτιδίου
Κάπνισμα	I.Καρδιαγγειακές επιδράσεις II.Οξειδωτικό στρες
Υπέρταση	Μικροαγγειακή πάθηση
Διαβήτης τύπου II	I.Καρδιαγγειακές επιδράσεις II. Ανταγωνισμός Ινσουλίνης και Αβ πεπτιδίου για καθαρισμό
Παχυσαρκία	Αυξημένο ρίσκο για φλεγμονή και διαβήτη τύπου II
Τραυματική κάκωση κεφαλής	Αύξηση εναπόθεσης Αβ πεπτιδίου και APP

**Πίνακας 1: Παράγοντες κινδύνου που έχουν συσχετισθεί με τη νόσο AD**

### 1.3. Μοριακή Παθοφυσιολογία

#### 1.3.1. APP και πεπτίδιο Αβ

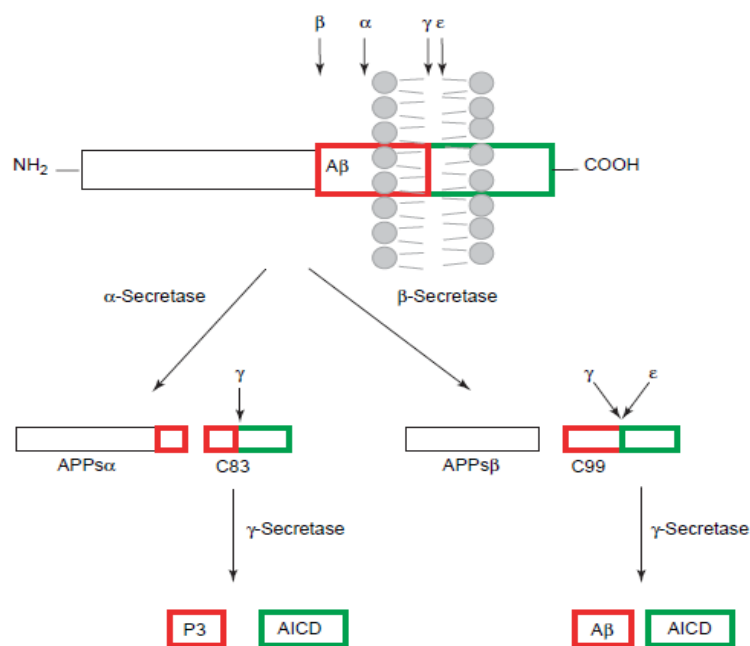
Η παθολογία που σχετίζεται με το πεπτίδιο Αβ είναι το κύριο αντικείμενο της έρευνας που αφορά στο νευροβιολογικό υπόστρωμα της νόσου AD. Υπάρχουν σαφείς ενδείξεις περί τούτου, που προκύπτουν κυρίως από μοριακές γενετικές μελέτες των γονιδίων του APP και των Πρεσενιλίνων 1 (PSEN1) και 2 (PSEN2), που ευθύνονται για τις οικογενείς περιπτώσεις της νόσου και που ρυθμίζουν η καθεμία ένα μέρος του μεταβολισμού του Αβ, οδηγώντας στην προδιάθεση του Αβ για συσσωμάτωση (Scheuner et al., 1996). Επίσης, η ε4 ισομορφή του γονιδίου της απολιποπρωτεΐνης Ε, που αποτελεί τον κύριο παράγοντα κινδύνου για τη βραδείας έναρξη μορφή της νόσου AD, επηρεάζει το βαθμό συσσωμάτωσης του πεπτιδίου Αβ (Bales et al., 1999). Ο κεντρικός ρόλος του Αβ προβάλλεται μέσω της υπόθεσης «καταρράκτη του αμυλοειδούς- β πεπτιδίου», η οποία πρεσβεύει ότι το Αβ πεπτίδιο είναι αυτό που πυροδοτεί όλες τις μορφές της νόσου AD (Hardy & Selkoe, 2002). Παρόλα αυτά δεν είναι ακόμη ξεκάθαρο ποια μορφή του Αβ (μονομερής ή ολιγομερής, ενδοκυττάρια ή έξωκυττάρια) είναι αυτή που αποτελεί τον παθογενετικό παράγοντα.

Το πεπτίδιο Αβ συνιστά το κύριο συστατικό των νευριτικών πλακών στη νόσο AD και προκύπτει από την πρωτεόλυση του πρόδρομου μορίου του αμυλοειδούς πεπτιδίου (Amyloid Precursor Protein ή APP). Οι πλάκες αμυλοειδούς αποτελούν συμπαγείς, σφαιρικές εξωκυττάριας εναποθέσεις αποτελούμενες από το πεπτίδιο Αβ, μοριακού βάρους 4kDa. Οι εξωκυττάριας εναποθέσεις του Αβ πεπτιδίου εντοπίζονται κυρίως στον υπόκαμπο και στην αμυγδαλή και σε συγκεκριμένες φλοιϊκές περιοχές. Οι περισσότερες πλάκες στη νόσο AD είναι διαλυτές και περιέχουν ή είναι περικυκλωμένες από μικρό αριθμό δυστροφικών δενδριτών και αξόνων, ενώ σε λιγότερο συχνές περιπτώσεις εντοπίζονται νευρικές πλάκες, στις οποίες οι δυστροφικοί νευρίτες αποτελούν το κύριο χαρακτηριστικό (LaFerla & Oddo, 2005).

Το APP είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου 1, από την οποία προκύπτει το πεπτίδιο Αβ. Έχει τρεις ισομορφές που αποτελούνται από 695, 751 ή 770 αμινοξέα και οι οποίες προκύπτουν από το εναλλακτικό μάτισμα του μορίου. Οι ισομορφές

751 και 770 εκφράζονται σε μη νευρικά κύτταρα, ενώ στους νευρώνες εκφράζεται μόνο η ισομορφή 695.

Μέσω της πρωτεόλυσης του μορίου του APP δημιουργούνται πεπτιδία που είναι είτε αμυλοειδογενή, είτε όχι. Στο μονοπάτι δημιουργίας του μη αμυλοειδογενούς πεπτιδίου συμμετέχει αρχικά η πρωτεάση  $\alpha$ -σεκρετάση, η δραστηριότητα της οποίας λαμβάνει χώρα μέσα στην αλληλουχία του  $A\beta$  πεπτιδίου και οδηγεί στην εξωκυττάρια απελευθέρωση ενός μεγάλου θραύσματος που περιέχει την περιοχή του αμινοτελικού άκρου του APP ( $sAPP\alpha$ ) και ενός καρβοξυτελικού θραύσματος αποτελούμενο από 83 αμινοξέα (C83) στη μεμβράνη. Το θραύσμα C83 υπόκειται σε περαιτέρω επεξεργασία από το ένζυμο  $\gamma$ -σεκρετάση, δημιουργώντας το πεπτιδίο p3, που είναι μη αμυλοειδογενές και την ενδοκυττάρια περιοχή του APP (APP intracellular domain ή AICD). Στο αμυλοειδογενές μονοπάτι, λαμβάνουν χώρα δύο διαδοχικές ενζυματικές διεργασίες από τη  $\beta$  και  $\gamma$ -σεκρετάση. Η  $\beta$ -σεκρετάση (BACE-1), πρωτεολύει το μόριο του APP στην περιοχή του αμινοτελικού άκρου του  $A\beta$  πεπτιδίου με αποτέλεσμα να προκύπτει ένα μικρότερου μήκους θραύσμα αμινοτελικού άκρου ( $sAPP\beta$ ) και ένα αμυλοειδογενές καρβοξυτελικό άκρο (C99). Η πρωτεόλυση του C99 εν συνεχεία από την  $\gamma$ -σεκρετάση καταλήγει στη δημιουργία ενός καρβοξυτελικού θραύσματος με 50 αμινοξέα και στη δημιουργία του πεπτιδίου  $A\beta$  (Εικόνα 1) (LaFerla & Oddo, 2005).



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση των μονοπατιών επεξεργασίας του μορίου APP (LaFerla & Oddo, 2005).

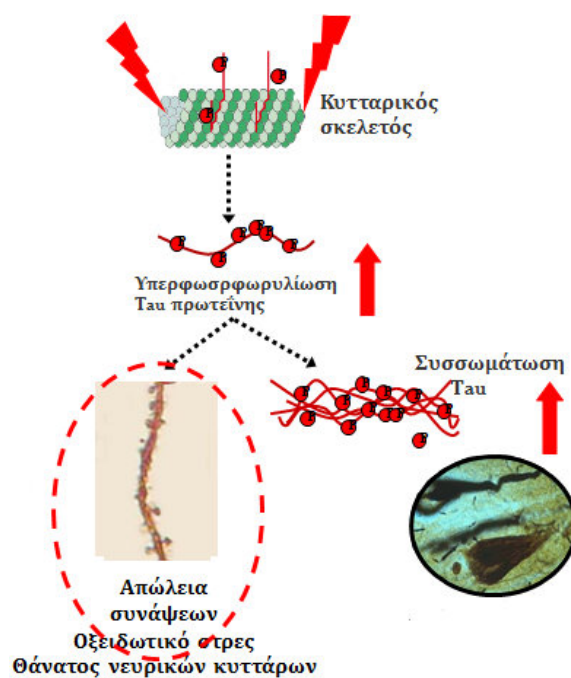
### 1.3.2. Πρωτεΐνη Ταυ

Η φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη Ταυ, αποτελεί τον έναν από τους δύο κύριους νευροπαθολογικούς φαινότυπους που χαρακτηρίζουν τη νόσο AD και όπως φαίνεται από τα υπάρχοντα ερευνητικά ευρήματα, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στα γνωσιακά ελλείμματα που σχετίζονται με την παθοφυσιολογία της νόσου.

Η μορφολογία και η δομική σταθερότητα των νευρώνων διατηρούνται κυρίως από τον κυτταροσκελετό, ο οποίος αποτελείται κατά ένα μεγάλο μέρος από τους μικροσωληνίσκους. Η σταθερότητα των μικροσωληνίσκων οφείλεται σε πρωτεΐνες που σχετίζονται με αυτούς, όπως είναι η Ταυ, που συμμετέχει στον κύκλο σύνδεσης – αποσύνδεσης των μικροσωληνίσκων στους νευρώνες (Lee et al., 2005). Η Ταυ σταθεροποιεί τους μικροσωληνίσκους μέσω προώθησης του πολυμερισμού τους και καταστολής της αποσύνδεσης τους. Στις περιπτώσεις νευροεκφυλιστικών νοσημάτων η περιοχή σύνδεσης με τους μικροσωληνίσκους υπερφωσφορυλιώνεται οδηγώντας σε μικρότερη συγγένεια δέσμευσης (Lee et al., 2005).

Το γονίδιο της πρωτεΐνης Ταυ εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17 και αποτελείται από 16 εξόνια. Οι έξι ισομορφές της Ταυ διαφέρουν στην παρουσία 3 ή 4 επαναλήψεων των αμινοξέων 31 ή 33 στο καρβοξυτελικό άκρο, καθώς επίσης και στο αν έχουν 1, 2 ή καθόλου προσθήκες στο αμινοτελικό άκρο. Έχει προταθεί ότι η μορφή με τις 4 επαναλήψεις στο καρβοξυτελικό άκρο σχετίζεται με την παθολογική δημιουργία των ινιδίων στη νόσο (Gong et al., 2005). Μεταξύ του αμινοτελικού άκρου (projection domain) και του καρβοξυτελικού άκρου (microtubule binding domain) βρίσκεται η βασική περιοχή που είναι πλούσια σε προλίνη. Και οι έξι ισομορφές της πρωτεΐνης που εκφράζονται στον ενήλικο εγκέφαλο, έχουν ένα αμινοτελικό άκρο και ένα καρβοξυτελικό, μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η πρόσδεση στους μικροσωληνίσκους (Kimura et al., 2014). Η φωσφορυλίωση της Ταυ επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό την ικανότητα της να προσδένεται στους μικροσωληνίσκους (Biernat et al., 1993; Lindwall, 1984). Η κύρια της λειτουργία αφορά στη διατήρηση της μορφολογίας του νευράξονα, στον οποίο εκφράζεται κυρίως κατά τη διάρκεια της νευρικής ανάπτυξης (Kimura et al., 2014). Επίσης, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η πρωτεΐνη Ταυ μπορεί να επηρεάσει τη συναπτική λειτουργία, εφόσον αλληλεπιδρά με μετασυναπτικά σηματοδοτικά συμπλέγματα πρωτεϊνών (Pooler et

al., 2014; Hoover et al., 2010). Συγκεκριμένα η Ταυ αλληλεπιδρά με το σύμπλεγμα PSD95/NMDA- υποδοχέα, οδηγώντας σε αλλαγές στη συναπτική λειτουργία (Mondragon-Rodriguez et al., 2012). Η ενεργοποίηση του υποδοχέα NMDA οδηγεί σε φωσφορυλίωση συγκεκριμένων περιοχών της Ταυ, ρυθμίζοντας την αλληλεπίδραση της Ταυ με την Fyn και το σύμπλεγμα PSD95/NMDA-υποδοχέα. Όταν η Ταυ υπερφωσφορυλιώνεται πυροδοτείται μια ανώμαλη μετακίνηση της από τους άξονες στους δενδρίτες και συσσωρεύεται στα σωματοδεντρικά διαμερίσματα των νευρώνων, δημιουργώντας τα λεγόμενα «νευροϊνδιακά έγκλειστα» NFT's. Συνέπεια αυτού είναι η διαταραγμένη λειτουργία του νευρώνα, με απώλεια των συνάψεων και εν τέλει η εκφύλιση τους (Kowall & Kosik, 1987; Sydow et al., 2011) (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση της παθολογίας που σχετίζεται με την πρωτεΐνη Ταυ

Σε παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι η νόσος AD, διαταράσσονται τόσο ο εντοπισμός της Ταυ στις δενδριτικές ακάνθους, διαμεσολαβώντας τη συναπτική δυσλειτουργία και ατροφία, όσο η ισορροπία πρόσδεσης της Ταυ στους μικροσωληνίσκους με αποτέλεσμα την αύξηση της μη-προσδεμένης Ταυ και την εν συνεχεία παθολογική αλλαγή της δομής της που καταλήγει στη συσσωμάτωση και δημιουργία ινιδιακών δομών (Ballatore et al., 2007). Αρχικά υπάρχει ανώμαλη αποδέσμευση της Ταυ από τους μικροσωληνίσκους, είτε λόγω ανισορροπίας

κινασών και φωσφατασών, είτε λόγω μεταλλάξεων στο γονίδιο της tau, είτε λόγω τροποποιήσεων που προωθούν την ανώμαλη αναδίπλωση της και ακόλουθη αύξηση της στο κυτταρόπλασμα. Κατά την ανώμαλη αναδίπλωση της δημιουργούνται αρχικά δομές γνωστές ως προ-έγκλειστα (pre-tangles), ακολούθως ζεύγη ελικοειδών νηματίων (Paired helical filaments) και εν τέλει τα νευροϊνιδιακά έγκλειστα (NFT's) (Galvan et al., 2001; Kuret et al., 2005).

Τα νευροϊνιδιακά έγκλειστα συνιστούν ενδοκυτταρικές, ινιδιακές δομές, αποτελούμενες από συσσωρεύσεις των PHF's που δημιουργούνται από ανώμαλη φωσφορυλίωση της Tau. Ο αριθμός, καθώς και ο χωρικός εντοπισμός των NFT's έχουν συσχετισθεί με την εξέλιξη της άνοιας (Lee et al., 2005). Μετά τη συσσώρευση των PHF's η PHF-Tau υπόκειται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως ουμπικιτινίωση, γλυκοζυλίωση και οξείδωση (Ledesma et al., 1994; Mori et al., 1984; Schweers et al., 1995; Yan et al., 1994).

Πέρα από την αποσταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων η PHF Tau διακόπτει ενδοκυτταρικά διαμερίσματα που είναι απαραίτητα για το φυσιολογικό μεταβολισμό, όπως η μετακίνηση των μιτοχονδρίων προς την περιφέρεια του κυττάρου και η μείωση της πυκνότητας του ενδοπλασματικού δικτύου (Ebner et al., 1998).

Η συσσώρευση των ινιδίων της Tau πρωτεΐνης πιστεύεται ότι περιλαμβάνει 3 στάδια. Αρχικά, λαμβάνει χώρα ο σχηματισμός ολιγομερών της Tau, μέσω της σύνδεσης μονομερών και αυτά τα ολιγομερή είναι διαλυτά στο διάλυμα του σαρκοσυλίου. Σε δεύτερο στάδιο, τα εν λόγω ολιγομερή καθώς αποκτούν την τρισδιάστατη δομή των β-πτυχωτών φύλλων σχηματίζουν συσσωματώματα τα οποία είναι αδιάλυτα και τα οποία γίνονται κοκκώδη ολιγομερή, αποτελούμενα από περίπου 40 μόρια Tau. Εν τέλει, η συγκέντρωσή τους αυξάνεται έτσι ώστε τα ολιγομερή να συντήκονται σχηματίζοντας τα ινίδια της Tau πρωτεΐνης (Kimura et al., 2014).

Εφόσον η Tau πρωτεΐνη αποσυνδεθεί από τους MT, υπάρχει αυξημένη η πιθανότητα ανώμαλης αναδίπλωσης της. Οι πρώιμες εναποθέσεις της Tau πρωτεΐνης ονομάζονται «προ-έγκλειστα» και δεν έχουν τη δομή των β-πτυχωτών φύλλων, όπως αποδεικνύεται από την αποτυχία χρώσης με δείκτες β-πτυχωτών



φύλλων. Ακολουθώς, αλλαγές στη δομή της πρωτεΐνης οδηγούν στην περαιτέρω συσσώρευση της και σε ενδεχόμενη δημιουργία νευροϊνιδιακών εγκλείστων. Αυτές οι μεταπτώσεις ίσως να διευκολύνονται από ετερογενείς επιδράσεις με μεμβρανικές δομές (Galvan et al., 2001, Kuret et al., 2005).

Πολλαπλοί παθογενετικοί μηχανισμοί είναι πιθανόν να οδηγήσουν στην ανώμαλη συσσώρευση της πρωτεΐνης Tau: Ένας σημαντικός αιτιολογικός παράγοντας είναι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο της πρωτεΐνης (MAPT), οι οποίες προδιαθέτουν τη δημιουργία ινιδίων. Μεταλλάξεις σε περιοχές ιντρονίων, καθώς και σε κωδικοποιούσες περιοχές δύνανται να μεταβάλουν το εναλλακτικό μάτισμα της Tau με τρόπο που να διαταράσσει τη φυσιολογική αναλογία των 3R και 4R ισομορφών, με υπερπαραγωγή της ισομορφής 4R (Goedert & Jakes, 2005; Nacharaju et al., 1999). Η ανισορροπία στα επίπεδα ενεργοποίησης ή ρύθμισης των κινάσων και φωσφατάσων της πρωτεΐνης Tau είναι ένας ακόμη παράγοντας που συνδέεται με τις διαταραχές της πρωτεΐνης. Έχει δειχθεί ότι σε μετέπειτα στάδια της νευροεκφύλισης, η τυπική φωσφορυλίωση συγκεκριμένων περιοχών ενός μορίου της πρωτεΐνης διαταράσσεται με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να φωσφορυλιώνονται ταυτόχρονα πολύ περισσότερα κατάλοιπα. Για αυτό το λόγο οι αναστολείς των κινάσων, όπως η GSK-3 και η MARK συνιστούν στόχους φαρμακολογικών παρεμβάσεων για τη νόσο AD (Churcher, 2006; Mazanetz & Fischer, 2007). Το οξειδωτικό στρες, η φλεγμονή και η τοξικότητα που διαμεσολαβείται από το Αβ πεπτίδιο μπορούν επίσης να συνδράμουν στην ανώμαλη αποκόλληση της πρωτεΐνης Tau από τους μικροσωληνίσκους ( Andersen, 2004; King et al., 2006; Moreira et al., 2005).

Στη νόσο AD το μεγαλύτερο μέρος της παθολογίας που σχετίζεται με την πρωτεΐνη Tau ανευρίσκεται, σύμφωνα με ευρήματα μορφομετρικών αναλύσεων, στα νευρικά διαμερίσματα που είναι γνωστά ως «δυστροφικοί νευρίτες», δηλαδή σε άξονες και δενδρίτες νευρώνων που έχουν καταστραφεί ή εκφυλιστεί. Σε αυτούς τους νευρίτες είναι πιθανόν να σχηματιστούν γλοιακά και νευρικά έγκλειστα, που ακολουθούν την αρχική συσσώρευση ινιδιακών δομών (Mitchell et al., 2000).

Η αποσταθεροποίηση της πρωτεΐνης Tau επηρεάζει τις φυσιολογικές δομικές και ρυθμιστικές λειτουργίες του κυτταροσκελετού, μέσω των οποίων ολοκληρώνεται η

αξονική μεταβίβαση. In vitro μελέτες, έχουν δείξει ότι ουσίες που σταθεροποιούν τους μικροσωληνίσκους είναι ικανές να ελαχιστοποιήσουν το νευροεκφυλιστικό φαινότυπο διαγονιδιακών μοντέλων AD με παθολογία της Tau (Zhang et al., 2005). Έχει επίσης δειχθεί ότι ο αριθμός των NFT's σχετίζεται με το βαθμό των γνωσιακών διαταραχών στη νόσο AD (Arriagada et al., 1992a; Arriagada et al., 1992b). Οι τοξικές επιδράσεις των NFT's προκύπτουν μερικώς από την παρεμπόδιση των κυτταρικών λειτουργιών που προκαλεί η συσσώρευση των ινιδίων μέσα στους νευρώνες, καθώς επίσης και λόγω της απομόνωσης της πρωτεΐνης Tau και άλλων πρωτεϊνών, που συντείνει στη μη φυσιολογική τους λειτουργία.

Συνοπτικά, η υπάρχουσα βιβλιογραφία επιδεικνύει ότι η συναπτική δυσλειτουργία και ατροφία, η φλεγμονή και η απώλεια συνάψεων αποτελούν τα κύρια πρώιμα σημάδια νευροεκφύλισης που προκύπτουν από υπεφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Tau, ενώ τα ινιδιακά έγκλειστα προκύπτουν αργότερα και συμβάλλουν στην εξέλιξη της νόσου, μέσω της παρεμπόδισης κυτταρικών λειτουργιών και λειτουργικά σημαντικών πρωτεϊνών (Ballatore & Trojanowski, 2007).

### 1.3.3. Πρεσενιλίνες

Οι Πρεσενιλίνες (PS1 και PS2) ανακαλύφθηκαν αρχικά ως περιοχές μεταλλάξεων που ήταν υπεύθυνες για την πρώιμη-έναρξης (οικογενή, αυτοσωμική- επικρατής) μορφή της νόσου AD. Αποτελούν διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και είναι συστατικά του συμπλέγματος του ενζύμου γ-σεκρετάσης, η οποία συμμετέχει στην πρωτεόλυση του μορίου του APP και στη δημιουργία του πεπτιδίου Αβ, που είναι πλέον ευρέως αποδεκτό ότι κατέχει καίριο ρόλο στην παθοφυσιολογία της νόσου (De Strooper et al., 2012).

Το γονίδιο της PS1 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 14, ενώ της PS2 στο χρωμόσωμα 1. Οι εν λόγω πρωτεΐνες έχουν 9 διαμεμβρανικές περιοχές και δημιουργούν ένα σταθερό ετεροδιμερές με ένα αμινοτελικό άκρο και ένα καρβοξυτελικό άκρο, κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης τους (Fukumori et al., 2010). Οι Πρεσενιλίνες 1 και 2, μαζί με τρεις ακόμη πρωτεΐνες, την τύπου P διαμεμβρανική πρωτεΐνη Nicastrin, την Aph και την PEN-2 σχηματίζουν το σύμπλεγμα της γ-σεκρετάσης. Απαραίτητη

προϋπόθεση για τη φυσιολογική λειτουργία του συμπλέγματος αποτελεί η λειτουργικότητα της κάθε υπομονάδας ξεχωριστά (Edbauer et al., 2003; Kimberly et al., 2003; Takasugi et al., 2003).

Εντός των πρωτεολυτικών τους διεργασιών είναι και ο ρόλος τους στο σηματοδοτικό μονοπάτι του Notch. Πέρα από τις πρωτεολυτικές τους λειτουργίες, ο ρόλος των πρεσενιλίνων επεκτείνεται και σε άλλες βιολογικές διαδικασίες, όπως στη διαδρομή (trafficking) και στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών, την ομοιόσταση του ασβεστίου και στη ρύθμιση της σηματοδότησης της β-κατενίνης (De Strooper et al., 2012).

Το σύστημα των πρωτεασών, είναι πιθανόν να εμπλέκεται και στο παθογενετικό μονοπάτι της σποραδικής μορφής της νόσου, εφόσον είναι αυτό που συσχετίζεται άμεσα με την αναλογία των πεπτιδίων  $A\beta_{40}/A\beta_{42}$ , που είναι υπεύθυνη για το φαινότυπο των πλακών αμυλοειδούς που παρατηρείται στους ασθενείς της σποραδικής, βραδείας έναρξης, μορφής της νόσου (De Strooper et al., 2012). Ωστόσο δεν έχουν βρεθεί μέχρι τώρα δομικές ή λειτουργικές αλλαγές στις πρεσενιλίνες σε ασθενείς με σποραδική μορφή της νόσου AD. Παρόλα αυτά περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η διατροφή πιθανόν να οδηγούν σε αλλαγές που να προωθούν την πρωτεόλυση μέσω της γ-σεκρετάσης και τη δημιουργία αμυλοειδογενών μορφών του Αβ. Η απενεργοποίηση του συμπλέγματος της γ-σεκρετασης οδηγεί σε διπλάσια συσσώρευση του καρβοξυτελικού θραύσματος του μορίου APP, σε σχέση με φυσιολογικά κύτταρα και δεν οδηγεί σε παραγωγή του Αβ πεπτιδίου (Korap & Ilagan, 2004).

#### 1.3.4. Οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες, το οποίο ορίζεται ως η διαδικασία ανεξέλεγκτης παραγωγής δραστικών ριζών οξυγόνου, καθώς και ο διαταραγμένος κυτταρικός μεταβολισμός ενέργειας φαίνεται να σχετίζονται με τη νόσο AD και άλλες νευροεκφυλιστικές παθήσεις (Mattson, 2004). Σε ασθενείς με AD υπάρχουν αυξημένα επίπεδα οξειδωμένων πρωτεϊνών, λιπιδίων και DNA στα νευρικά κύτταρα, σε περιοχές όπου

υπάρχουν πλάκες Αβ πεπτιδίου και νευροϊνιδιακά έγκλειστα (Butterfield e al., 2001).

Έχουν προταθεί διάφορες πηγές οξειδωτικού στρες στη νόσο AD: Αρχικά, κατά τη διαδικασία συσσωμάτωσης του πεπτιδίου Αβ παράγονται υπεροξειδία υδρογόνου. Αυτή η διαδικασία απαιτεί παρουσία οξυγόνου και ενισχύεται σημαντικά από την παρουσία ιόντων σιδήρου και χαλκού. Η υπεροξειδωση λιπιδίων που διαμεσολαβείται από το πεπτίδιο Αβ διαταράσσει τη λειτουργία των ΑΤΡασών, των μεταφορέων γλουταμικού οξέως και της γλυκόζης, καθώς και τη λειτουργία πρωτεϊνών που συνδέονται με GTP. Μέσω της εν λόγω διατάραξης της ιοντικής ισορροπίας και του ενεργειακού μεταβολισμού, ακόμη και χαμηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες στα οποία υπόκεινται οι μεμβράνες, καθιστούν τους νευρώνες πιο ευάλωτους στη τοξικότητα από διέγερση και στην απόπτωση. Η δυσλειτουργία και η εκφύλιση των συνάψεων που παρατηρούνται στη νόσο AD πιθανόν να σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες που μεσολαβείται από το πεπτίδιο Αβ λόγω του ότι η έκθεση των συνάψεων στο πεπτίδιο Αβ διαταράσσει τη λειτουργία των μεταφορέων ιόντων και γλουταμικού των μεμβρανών και ολοκληρώνει τη μιτοχονδριακή λειτουργία με έναν διαμεσολαβούμενο από το οξειδωτικό στρες μηχανισμό.

Μελέτες απεικόνισης φανερώνουν μειωμένη ενεργοποίηση των ενζύμων που είναι απαραίτητα για το μεταβολισμό, όπως είναι η οξειδάση του κυτοχρώματος C, το σύμπλεγμα της πυρουβικής αφυδρογονάσης και το σύμπλεγμα-κετογλουταρικής αφυδρογονάσης, σε εγκεφάλους ασθενών με νόσο AD (Blass, 2001).

Μελέτες σε πειραματόζωα δείχνουν εμπλοκή των διαταραγμένων μεταβολικών λειτουργιών. Διαγονιδιακά μοντέλα μυών με μετάλλαξη στο μόριο του APP φαίνεται ότι έχουν μειωμένα επίπεδα μεταβολισμού της γλυκόζης σε περιοχές του εγκεφάλου που σχετίζονται με τις γνωσιακές διεργασίες, γεγονός που υποδεικνύει ότι πιθανόν οι διαταραγμένες διεργασίες του APP να συμβάλλουν στη διαταραχή του ενεργειακού μεταβολισμού (Dodart et al., 1999). Ο ρόλος του διαταραγμένου μεταβολισμού στις παθογενετικές δράσεις της επεξεργασίας του APP φαίνεται να έχει πρώιμη έναρξη, εφόσον σε μύες με μεταλλαγμένη μορφή του μορίου APP είναι

μειωμένη η ανοχή στην υποξία, ακόμα και πριν την εκδήλωση των συμπτωμάτων της νόσου AD (Buchner et al., 2002).

Ένας πιθανός μηχανισμός μέσω του οποίου το οξειδωτικό στρες και ο ενεργειακός μεταβολισμός δρουν παθογενετικά στη νόσο του AD είναι η προώθηση της αμυλοειδογένεσης μέσω της επεξεργασίας του APP, που καταλήγει σε συσσώρευση της νευροτοξικής μορφής του Αβ πεπτιδίου (Gabuzda et al., 1994). Ο εν λόγω μηχανισμός δύναται να συμβάλει σε αυξημένη παραγωγή αμυλοειδούς πεπτιδίου στη βραδείας-έναρξης μορφή της νόσου, εφόσον το οξειδωτικό στρες και ο διαταραγμένος μεταβολισμός αυξάνονται καθώς αυξάνεται και η ηλικία (Mattson, 2004).

#### 1.3.5. Ασβέστιο

Ερευνητικά δεδομένα, τόσο σε ασθενείς, όσο και σε μοντέλα της νόσου AD, σε συνδυασμό με τον κύριο ρόλο του ασβεστίου στη μνήμη, μάθηση και νευροτοξικότητα, ενισχύουν την υπόθεση για εμπλοκή του ασβεστίου στη νόσο AD.

Η ελλιπής ρύθμιση της ομοιόστασης του ασβεστίου που παρατηρείται σε νευρώνες επηρεασμένους από τη νόσο, συμβάλλει δραματικά στη δυσλειτουργία και στο θάνατο αυτών των νευρώνων (Gabuzda et al., 1994). Για παράδειγμα, νευρώνες με νευροϊνιδιακά έγκλειστα έχουν μεγάλη ποσότητα ιόντων ασβεστίου, καθώς επίσης και υπερδραστηριοποίηση πρωτεασών και κινασών που σχετίζονται με το ασβέστιο (Saito et al., 1993). Επίσης, μεταλλάξεις στην PS1 και στο APP διαταράσσουν την κυτταρική ομοιόσταση του ασβεστίου, τόσο *in vitro* (Mattson & Chan, 2003), όσο και *in vivo* (Eckert et al., 2001).

Η επεξεργασία του APP πιθανόν να αποσταθεροποιεί την ομοιόσταση του ασβεστίου μέσω της παραγωγής του πεπτιδίου Αβ<sub>42</sub> και της μείωσης των επιπέδων του sAPPα (Gabuzda et al., 1994) ή μέσω επαγωγής οξειδωτικού στρες που διαταράσσει τις αντλίες ασβεστίου στη μεμβράνη και αυξάνει κατά συνέπεια την εισροή του μέσω των εξαρτώμενων από το δυναμικό καναλιών ασβεστίου και ιοντοτροπικών υποδοχέων γλουταμικού οξέως. Ορισμένα ευρήματα φανερώνουν επίσης συμμετοχή του Αβ πεπτιδίου στην αύξηση και απορρύθμιση του ασβεστίου

μέσω δημιουργίας καναλιών ή μέσω ενεργοποίησης υποδοχέων που επηρεάζουν την εισροή ασβεστίου (Le et al., 2001; Mattson & Chan, 2003).

#### **1.4. Γενετικοί παράγοντες**

Η νόσος AD διαχωρίζεται σε δυο μορφές, ανάλογα με το αν εμφανίζεται σε οικογένειες και οφείλεται σε μεταλλάξεις συγκεκριμένων γονιδίων ή αν εμφανίζεται σε ύστερη ηλικία και δεν είναι ξεκάθαροι οι γενετικοί αιτιολογικοί παράγοντες.

Είναι πλέον γνωστό ότι η οικογενής μορφή της νόσου AD εμφανίζεται σε οικογένειες και κληρονομείται με τρόπο αυτοσωμικό επικρατή. Η συχνότητα εμφάνισης αυτής της μορφής της νόσου έχει ένα σχετικά μεγάλο εύρος που κυμαίνεται μεταξύ του 10% και 50% των συνολικών περιπτώσεων (Selkoe, 2001). Το μεγάλο εύρος οφείλεται εν μέρει στο ότι σε μια νόσο που εμφανίζεται κυρίως σε μεγαλύτερες ηλικίες, όπως η νόσος AD, είναι δύσκολο να εξακριβωθεί η συχνότητα και ο ρόλος των γονιδιακών παραγόντων που συμβάλλουν στη νόσο. Πέραν τούτου, το γεγονός ότι δεν οφείλεται ένα μοναδικό γονίδιο για τη νόσο, αλλά κάθε γονίδιο συμβάλλει, σε διαφορετικό βαθμό ανάλογα με την περίπτωση, καθιστά επίσης δύσκολη την ανίχνευση του σε γενετικές επιδημιολογικές μελέτες (Selkoe, 2001). Παρόλο που η συμβολή των γενετικών παραγόντων στη νόσο δεν είναι απολύτως εξακριβωμένη, το γεγονός ότι φαινοτυπικά υπάρχει τεράστια ομοιότητα ανάμεσα στην οικογενή και σποραδική της μορφή, οδηγεί στο συμπέρασμα πως οι μεταλλάξεις που σχετίζονται με την εμφάνιση της οικογενούς μορφής, πιθανόν να έχουν άμεση σχέση και με την παθογένεση της τυπικής μη-οικογενούς μορφής της AD (Selkoe, 2001).

Ο πρώτος γονιδιακός παράγοντας που έχει βρεθεί να σχετίζεται αιτιολογικά με τη νόσο είναι μια παρανοηματική (missense) μετάλλαξη στο μόριο του APP (Goate et al., 1991). Η εν λόγω μετάλλαξη είναι σπάνια και προκαλεί πρόωμη έναρξη της νόσου, συνήθως στη δεκαετία των 50 ετών. Οι μέχρι τώρα γνωστές μεταλλάξεις που εντοπίζονται στο μόριο είναι είτε ακριβώς πριν την περιοχή που πρωτεολύει η β-σεκρετάση, είτε πριν την περιοχή που δραστηριοποιείται η γ-σεκρετάση, κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο του μορίου. Οι τρόποι μέσω των οποίων οι μεταβολές στο

γονίδιο του APP μπορούν να προδιαθέσουν για τη νόσο AD είναι δύο: Πρώτον, μέσω διαφορετικών πρωτεολυτικών διεργασιών των τριών σεκρετάσων που επάγουν οι μεταλλάξεις και δεύτερον, μέσω της υπερέκφρασης του φυσιολογικού APP, που οφείλεται σε αυξημένη ποσότητα του γονιδίου (π.χ. σε περίπτωση διπλασιασμού του χρωμοσώματος 21, όπως συμβαίνει στο σύνδρομο Down).

Η πιο συχνή αιτία εμφάνισης της αυτοσωμικής επικρατούς μορφής της νόσου AD είναι οι σημειακές παρανοηματικές μεταλλάξεις στις πρεσενιλίνες. Η πρεσενιλίνη 1 (PS1) εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 14q και μεταλλάξεις στην PS1 προκαλούν νόσο με πρώιμη έναρξη, γύρω στα 40 έως 50 έτη και εμφανίζουν ταχύτατη εξέλιξη. Στο γονίδιο της πρεσενιλίνης 2 (PS2), που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1, έχουν εντοπιστεί μέχρι τώρα τρεις μεταλλάξεις, που σχετίζονται επίσης με πρώιμης έναρξης μορφή της νόσου σε κάποιες οικογένειες (Hardy, 1997).

Τέλος, το αλληλίο ε4 της απολιποπρωτεΐνης E (ApoE) συνιστά ένα κύριο γενετικό προδιαθεσιακό παράγοντα για την εμφάνιση της ύστερης έναρξης μορφής της νόσου AD. Η απολιποπρωτεΐνη E αποτελεί πρωτεΐνη μεταφοράς λιπιδίων και παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση της χοληστερόλης στο πλάσμα. Στους ανθρώπους υπάρχουν 3 αλληλίες: ε2, ε3 και ε4. Οι ισομορφές που προκύπτουν από τα τρία αλληλία διαφέρουν μόνο κατά ένα αμινοξύ, αλλά η πιο συχνή ισομορφή είναι η ε3 (Mahley, 1988; Plump & Breslow, 1995). Η πρωτεΐνη ApoE εκφράζεται στον εγκέφαλο και συντίθεται κυρίως από αστροκύτταρα και μικρογλοία (Boyles et al., 1985; Nakai et al., 1996; Stone et al., 1997). Μελέτες διερεύνησης πρωτεϊνών στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό που δεσμεύονται με το πεπτίδιο Αβ οδήγησαν στην ταυτοποίηση του ApoE ως μιας τέτοιας πρωτεΐνης, καθώς επίσης και στον εντοπισμό του χρωμοσώματος στο οποίο ανευρίσκεται, το 19q (Strittmatter et al., 1993). Έχει δειχθεί ότι άτομα που έχουν κληρονομήσει ένα ή δύο αλληλία ε4 της απολιποπρωτεΐνης E έχουν αυξημένες πιθανότητες εμφάνισης της νόσου, σε σχέση με άτομα που έχουν τα αλληλία ε2 και ε3. Ασθενείς με τη νόσο AD έχουν συχνότερα, σε σχέση με τον υπόλοιπο πληθυσμό, το αλληλίο ε4. Ως εκ τούτου, φαίνεται πως η ύπαρξη του αλληλίου ε2 πιθανόν να επιδρά προστατευτικά κατά της εμφάνισης της νόσου (Corder et al., 1994).

Επίσης, σειρά ευρημάτων επιδεικνύει συστηματική συσχέτιση μεταξύ του γονότυπου ApoE4 και αυξημένων επιπέδων διάχυτων νευρικών πλακών πεπτιδίου Αβ στον εγκέφαλο (Bales et al., 1997; Gearing et al., 1996; Holtzman et al., 1999). Το ApoE4 φαίνεται να οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων του πεπτιδίου Αβ<sub>40</sub>, μέσω της ελλιπούς εκκαθάρισης του στον εγκέφαλο (Gearing et al., 1996). Σε *in vitro* μελέτες με τη χρήση συνθετικών πεπτιδίων έχει δειχθεί ότι η παρουσία της πρωτεΐνης ApoE4 οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα ινιδιογένεσης, σε σχέση με την ύπαρξη ApoE3 (Evans et al., 1995; Ma et al., 1994). *In vivo* μελέτες με διαγονιδιακά μοντέλα παρέχουν επίσης στήριξη στην υπόθεση ότι το ApoE4 σχετίζεται με προδιάθεση για τη νόσο AD. Μύες οι οποίοι εκφράζουν το αλληλίο ε4 φαίνεται να έχουν μειωμένη νευρική ανάπτυξη και διατήρηση των νευρώνων (Nathan et al., 1994). Επίσης, διαγονιδιακοί μύες που εκφράζουν την ανθρώπινη μεταλλαγμένη μορφή του APP όταν διασταυρώνονται με μύες στους οποίους έχει απαλειφθεί το γονίδιο ApoE παράγουν απογόνους οι οποίοι έχουν μειωμένα επίπεδα συσσώρευσης Αβ πεπτιδίου σε σχέση με τους γονείς τους, γεγονός που υποδηλώνει ότι η απουσία του ApoE μειώνει την προδιάθεση του Αβ πεπτιδίου για συσσωμάτωση σε πλάκες (Bales et al., 1997). Τέλος, διαγονιδιακοί μύες που υπολείπονται ενδογενώς την πρωτεΐνη ApoE και εκφράζουν την ανθρώπινη ApoE3 ή ApoE4, μαζί με τη μεταλλαγμένη ανθρώπινη μορφή του APP αναπτύσσουν λιγότερες εναποθέσεις Αβ πεπτιδίου, συγκριτικά με μύες που δεν εκφράζουν το ApoE (Holtzman et al., 1999).

Μέχρι τώρα υπάρχει ομοφωνία απόψεων σχετικά με την εμπλοκή των 4 γονιδίων που προαναφέρθηκαν στη νόσο AD. Παρόλα αυτά υπάρχουν ενδείξεις για εμπλοκή επιπρόσθετων γονιδίων στη νόσο, όπως είναι το γονίδιο της α<sub>2</sub> macroglobulin (α<sub>2</sub>M) στο χρωμόσωμα 21 (Blacker et al., 1998). Επίσης, το γεγονός ότι πολλές οικογένειες με φαινότυπο της νόσου δεν παρουσιάζουν μεταλλάξεις σε κάποιο από τα προαναφερθέντα 5 γονίδια ενισχύει την υπόθεση ότι άλλοι γονιδιακοί παράγοντες ενδεχομένως να συμβάλλουν στην εμφάνιση της νόσου και να κληρονομούνται ακόμη και με τρόπο επικρατή (Selkoe, 2001).

Η συστηματική συσχέτιση της διαδικασίας της πρωτεόλυσης του APP και των ιδιοτήτων συσσωμάτωσης των παραγώγων του Αβ που προκύπτουν από την εν λόγω διαδικασία, μέσω της ταυτοποίησης των προδιαθεσιακών γονιδίων, οδήγησαν στην κατανόηση των βασικών παθογενετικών μηχανισμών της νόσου. Τα



προαναφερθέντα κύρια 4 γονίδια των οποίων αδιαμφισβήτητα οι μεταλλάξεις σχετίζονται με τη νόσο, έχουν συσχετισθεί με αύξηση της παραγωγής ή και εναπόθεσης του Αβ πεπτιδίου, παρέχοντας στήριξη στην υπόθεση ότι οι εναποθέσεις του Αβ αποτελούν πρώιμο αλλά απαραίτητο γεγονός στη γένεση της νόσου. Τα παρακάτω ευρήματα στηρίζουν την υπόθεση αυτή: πρώτον, μελέτες αποδεικνύουν ότι μεταλλάξεις στο μόριο του APP αυξάνουν τη δημιουργία πεπτιδίων Αβ<sub>42</sub>. Διπλή μετάλλαξη σε 2 αμινοξέα που βρίσκονται στην περιοχή ακριβώς πριν την περιοχή δράσης της β-σεκρετάσης («Σουηδική» μετάλλαξη του APP) προκαλεί αυξημένη πρωτεόλυση από την β-σεκρετάση και δημιουργία αυξημένων επιπέδων πεπτιδίων Αβ<sub>40</sub> και Αβ<sub>42</sub>. Επίσης, πέντε μεταλλάξεις στο καρβοξυτελικό άκρο στην περιοχή δράσης της γ-σεκρετάσης έχουν τις ίδιες επιδράσεις στην παραγωγή του πεπτιδίου Αβ. Δεύτερον, ευρήματα που δείχνουν ότι οι μεταλλάξεις στις πρεσενιλίνες οδηγούν σε αυξημένη παραγωγή πεπτιδίου Αβ<sub>42</sub> στο πλάσμα (Citron et al., 1997; Duff et al., 1996), καθώς επίσης και σε καλλιέργειες ινοβλαστικών κυττάρων του δέρματος σε άτομα που έχουν μεταλλάξεις στις Πρεσενιλίνες (Scheuner et al., 1996). Και τρίτο, η ύπαρξη του αλληλίου ApoE4 αυξάνει τα σταθερά επίπεδα του πεπτιδίου Αβ στον εγκέφαλο, όπως φαίνεται από μελέτες σε κύτταρα (Evans et al., 1995; Gearing et al., 1996; Ma et al, 1994), σε πειραματόζωα (Holtzman et al., 1999) και σε ανθρώπους (Gearing et al., 1996; Rebeck et al., 1993; Schmechel et al., 1993).

### **1.5. Χολινεργική υπόθεση**

Εκτενής αριθμός μελετών σε ανθρώπους έχουν επιδείξει το ρόλο των χολινεργικών μονοπατιών στο βασικό και ραμφοειδή προσθεγκέφαλο, στις λειτουργίες της συνειδητής προσοχής, της μνήμης εργασίας και σε επιπρόσθετες μνημονικές λειτουργίες (Perry et al., 1999). Για περισσότερο από μια 20ετία μελέτες εγκεφάλων ασθενών με τη νόσο AD επανειλημμένως εντοπίζουν ανωμαλίες στα συγκεκριμένα κυκλώματα, οι οποίες φαίνεται να συσχετίζονται σε ψηλό βαθμό με το βαθμό της γνωσιακής έκπτωσης των ασθενών. Μελέτες με πειραματόζωα στηρίζουν επίσης τη «χολινεργική υπόθεση», εφόσον ανταγωνιστές των χολινεργικών υποδοχέων, δηλαδή αντιμουσκαρινικές ουσίες όπως η ατροπίνη μπορούν να διαταράξουν τις

μνημονικές επιδόσεις σε συμπεριφορικά πειράματα (χωρικής μνήμης, μνήμης εργασίας κ.α.) σε τρωκτικά (Decker & McGaugh, 1991). Επίσης, μελέτες με εκλεκτικούς μουσκαρινικούς ανταγωνιστές, όπως η πιρενζιπίνη και νικοτινικούς ανταγωνιστές, όπως η μεκαμυλαμίνη, σε πρωτεύοντα παρουσιάζουν παρόμοιες επιδράσεις. Επίσης, στήριξη στη «χολινεργική υπόθεση» για τη νόσο AD δίνουν ευρήματα που αφορούν στη δημιουργία βλάβης στα χολινεργικά μονοπάτια από το βασικό προσθεγκέφαλο προς τον νεοφλοιό ή τον ιππόκαμπο και επιδεικνύουν πρόκληση μνημονικών διαταραχών. Σήμερα, χορηγούνται αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης για αντιμετώπιση των γνωσιακών διαταραχών των ασθενών, με χαμηλή αποτελεσματικότητα και ανεκτά επίπεδα παρενεργειών (Terry & Buccafusco, 2003).

Φαίνεται επίσης πως οι μερικοί αγωνιστές επιλεκτικοί για τον M1 τύπο μουσκαρινικού υποδοχέα αυξάνουν την παραγωγή μη αμυλοειδογενούς APP και μειώνουν τα επίπεδα του Αβ πεπτιδίου, μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκουν την πρωτεϊνική κινάση C και MAP κινασών (Muller et al., 1997; Fisher et al., 2008). Οι αγωνιστές του M1 υποδοχέα μπορούν επίσης να μειώσουν την φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Ταυ, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (Genis et al., 1999; Sadot et al., 1996). Τέλος, η ενεργοποίηση νικοτινικών χολινεργικών υποδοχέων μπορεί να δράσει νευροπροστατευτικά, πιθανόν μέσω πρόωθησης διεργασιών που αυξάνουν τα ενδοκυττάρια επίπεδα ασβεστίου και τη σύνθεση νευροτροφικών παραγόντων (Dajas-Bailador et al., 2000; Jonnala et al., 2002).

#### **1.6. Φαρμακολογικές προσεγγίσεις**

Παρόλα τα ερωτήματα που μένουν αναπάντητα σχετικά με τον παθογενετικό καταρράκτη που οδηγεί στις γνωσιακές διαταραχές των ασθενών με τη νόσο AD, η υπάρχουσα γνώση, έχει οδηγήσει σε πολλαπλές, αλλά μερικώς αποτελεσματικές φαρμακολογικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση της AD.

Οι φαρμακολογικές προσεγγίσεις που έχουν εγκριθεί μέχρι σήμερα για την αντιμετώπιση του AD είναι οι αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης, του ενζύμου που αποκικοδομεί την ακετυλοχολίνη, η οποία θεωρείται ότι είναι μειωμένη στους

ασθενείς με AD, καθώς και οι ανταγωνιστές των NMDA υποδοχέων του γλουταμικού οξέως, οι οποίοι αποτρέπουν την τοξικότητα που προκαλείται από διέγερση (Cummings, 2004). Παρόλο που οι παραπάνω προσεγγίσεις έχουν μέτρια και παροδική δράση στην εκδήλωση και εξέλιξη της νόσου, εντούτοις φαίνεται ότι τα υπάρχοντα φάρμακα είναι ικανά να αυξήσουν το διάστημα κατά το οποίο ο ασθενής παραμένει χωρίς νοσοκομειακή φροντίδα (Lopez et al., 2009).

Η χολινεργική νεύρωση είναι γνωστό ότι διαταράσσεται σε ασθενείς με τη νόσο AD και η απώλεια χολινεργικών νευρώνων έχει συσχετισθεί με τα γνωσιακά ελλείμματα που παρουσιάζουν οι ασθενείς (Farlow & Evans, 1998). Για αυτό το λόγο, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, μια κατηγορία φαρμάκων που χορηγείται συχνά την αντιμετώπιση της νόσου AD στοχεύει στα χολινεργικά συστήματα του ΚΝΣ. Οι αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης στοχεύουν στην αναστολή του ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης, σε μετασυναπτικούς χολινεργικούς νευρώνες, έτσι ώστε να μειωθεί η αποδόμηση της ακετυλοχολίνης στο συναπτικό χάσμα και να αυξηθεί η δράση της στους χολινεργικούς μετασυναπτικούς υποδοχείς. Οι αναστολείς ακετυλοχολινεστεράσης χρησιμοποιούνται ευρέως ως χρόνιες παρεμβάσεις σε ήπιας σοβαρότητας περιπτώσεις. Προκλινικές και κλινικές μελέτες, καθώς και μελέτες απεικόνισης τεκμηριώνουν ότι οι αναστολείς ακετυλοχολινεστεράσης δρουν προστατευτικά, καθυστερώντας την πορεία της παθολογίας, μέσω της μείωσης των επιπέδων του πρόδρομου μορίου του Αβ πεπτιδίου (APP) και των αμυλοειδογενών παραγώγων και είναι ικανοί να παρέχουν μερική νευροπροστασία (Francis et al., 2005; Krishnan et al., 2003; Lopez et al., 2002; Morri et al., 2006; Nordberg, 2006). Πέραν των αναστολέων της ακετυλοχολινεστεράσης, έχει προταθεί η χορήγηση άλλων μορίων, τα οποία όμως δεν έχουν περάσει στην κλινική πράξη. Αυτά περιλαμβάνουν το πρόδρομο μόριο της ακετυλοχολίνης και αγωνιστές μουσκαρινικών υποδοχέων που ενεργοποιούν μετασυναπτικούς χολινεργικούς υποδοχείς, τα οποία βελτιώνουν τις γνωσιακές ικανότητες και φαίνεται να μειώνουν την παραγωγή Αβ, ενώ παράλληλα αυξάνουν την παραγωγή νευροτροφικών παραγόντων (Caccamo et al., 2006; Fisher et al., 2008; Mulugeta et al., 2003).

Ένας αριθμός θεραπευτικών προσεγγίσεων υπό έρευνα βασίζεται στην μείωση της παραγωγής ή στην ενίσχυση του καθαρισμού του Αβ πεπτιδίου, μέσω της αναστολής των ενζύμων της β- και γ-σεκρετάσης (Citron, 2010; De Strooper et al.,

2010; Golde et al., 2011). Μια άλλη κατηγορία φαρμάκου, ρυθμίζει την πρωτεόλυση του APP μέσω της γ-σεκρετάσης, με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να μειώνεται η παραγωγή Αβ<sub>42/43</sub> και να απελευθερώνονται μικρότερα σε μέγεθος πεπτίδια Αβ, που είναι λιγότερο τοξικά (Golde et al., 2011; Karran et al., 2011). Παρόλα αυτά ένας αναστολέας της γ-σεκρετάσης και ένας τροποποιητής της γ-σεκρετάσης, οι οποίοι βρίσκονταν στην τρίτη φάση κλινικών δοκιμών, δεν εγκρίθηκαν λόγω ανεπιθύμητων ενεργειών και αναποτελεσματικότητας αντίστοιχα (Green et al., 2009; Schor 2011).

Επιπροσθέτως, μια άλλη προσέγγιση στην πρόληψη και θεραπεία της νόσου AD βασίζεται στην διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος, με στόχο την ελαχιστοποίηση της ποσότητας του Αβ πεπτιδίου στον εγκέφαλο. Τα μέχρι τώρα πειραματικά ευρήματα δείχνουν ότι ανοσοποίηση με αντισώματα της ανθρώπινης μορφής κατά του Αβ<sub>42</sub> ή απλή ανοσοποίηση με αντισώματα κατά του Αβ, οδηγούν σε απομάκρυνση των πλακών Αβ από τους εγκεφάλους μυών με μεταλλαγμένο APP. Αυτή η προσέγγιση είναι επίσης ικανή να βελτιώσει τα μνημονικά ελλείμματα σε πειραματόζωα (Hock et al., 2003; Kotilinek et al., 2002; McLaurin et al., 2002). Πέραν της βελτίωσης που επιφέρει, η ανοσοποίηση μπορεί να προλάβει την παθολογία των ιστών, μέσω αναστολής της δημιουργίας των πλακών του Αβ πεπτιδίου και της επακόλουθης γλοιώσης και δυστροφίας των νευριτών (Selkoe, 2001). Σε ανθρώπους η κλινική δοκιμή της ενεργής ανοσοποίησης προκάλεσε σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες από το ανοσοποιητικό και ως εκ τούτου σταμάτησε (Gilman et al., 2005). Αντιθέτως, η παθητική ανοσοποίηση ήταν πιο ανεκτή κατά τη φάση II των κλινικών δοκιμών και συνεχίζεται η δοκιμή της στην επόμενη φάση (Sperling et al., 2011).

Παρά το γεγονός ότι μέχρι σήμερα οι κλινικές δοκιμές για φάρμακα που στοχεύουν στην πρωτεΐνη Ταυ ήταν πολύ λιγότερες από αυτές που έχουν ως στόχο το Αβ πεπτίδιο, τα τελευταία χρόνια αυξάνονται σταθερά (Morris et al., 2011). Η φαινοθειαζίνη κυανού μεθυλενίου κατά τη δεύτερη φάση κλινικής δοκιμής σε ασθενείς με AD φάνηκε να καθυστερεί την εξέλιξη της νόσου, μέσω αναστολής των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων της Ταυ ή πιθανώς μέσω μείωσης της διαλυτής Ταυ (Gura, 2008; Schirmer et al., 2011). Επίσης κινάσες της Ταυ πρωτεΐνης αποτελούν πιθανούς θεραπευτικούς στόχους στη νόσο AD, αλλά δεν έχουν φτάσει ακόμη σε προχωρημένες κλινικές μελέτες. Αυτό οφείλεται στο ότι οι εν λόγω κινάσες έχουν πολλαπλά υποστρώματα, πέρα από την Ταυ και ως εκ τούτου είναι

πιθανές οι ανεπιθύμητες επιδράσεις (Huang & Mucke, 2012). Εναλλακτική προσέγγιση για τη ρύθμιση της φωσφορυλίωσης της Tau πρωτεΐνης είναι η μείωση των επιπέδων της. Σε μύες φαίνεται ότι η συνολική μείωση των επιπέδων της Tau δεν επιφέρει σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες και μειώνει *in vivo* τις γνωσιακές διαταραχές που προκύπτουν από το πεπτίδιο Αβ και το ApoE (Morris et al., 2011). Επίσης, η αποδόμηση της Tau μπορεί να ενισχυθεί μέσω ανοσοποίησης. Σε διαγονιδιακούς μύες φαίνεται ότι η ενεργή ανοσοποίηση μειώνει τα νευροϊνδιακά έγκλειστα που δημιουργεί η Tau και βελτιώνεται η νευρωνική δυσλειτουργία (Asuni et al., 2007). Μόρια που σταθεροποιούν τους μικροσωληνίσκους έδειξαν θετικά αποτελέσματα σε προκλινικές και κλινικές δοκιμές. Μειώνουν την τοξικότητα που μεσολαβείται από το Αβ πεπτίδιο, τις διαταραχές στη συναπτική μεταφορά και τις κινητικές διαταραχές (Zhang et al, 2005), βελτιώνουν την πυκνότητα των μικροσωληνίσκων και τις γνωσιακές διεργασίες (Brunden et al., 2010) και μειώνουν την υπερφωσφορυλίωση της Tau σε διαγονιδιακούς μύες (Vulih-Shultzman et al., 2007).

Η πρόσληψη στατινών, που μειώνουν τη βιοσύνθεση της χοληστερόλης, φαίνεται να σχετίζεται με μειωμένο ρίσκο εμφάνισης της νόσου AD (Jick et al., 2000; Wolozin et al., 2000). Μελέτες σε κύτταρα και πειραματόζωα φανερώνουν μείωση στα επίπεδα του Αβ πεπτιδίου, μετά από χορήγηση στατινών (Simons, 1998). Επίσης, η αναστολή του ενζύμου ακετυλοτρανσφεράση της χοληστερόλης, που εμπλέκεται στη διαδικασία ρύθμισης της ομοιόστασης της χοληστερόλης, μειώνει τα επίπεδα του ολικού Αβ πεπτιδίου, αλλά και του Αβ42 (Fassbender 2001; Puglielli, 2001). Σε μια πιλοτική μελέτη με ασθενείς ήπιας AD, η ατορβαστατίνη παρείχε μερική κλινική βελτίωση μετά από χορήγηση έξι μηνών και ενός έτους στους ασθενείς (Sparks et al., 2005). Παρόλα αυτά, εκτενέστερες κλινικές δοκιμές που έχουν γίνει μέχρι στιγμής δεν βρίσκουν κάποια σύνδεση μεταξύ χορήγησης στατινών και της νόσου AD (Shepherd et al., 2002; Zandi et al., 2005).

Λαμβάνοντας υπόψη τη θεωρία του οξειδωτικού στρες που σχετίζεται με την εμφάνιση της νόσου, η χρήση αντιοξειδωτικών ουσιών, αναστολέων ασβεστίου ή άλλων τροποποιητών συγκεκριμένων σηματοδοτικών μονοπατιών, θα μπορούσε να παρέχει προστασία στους νευρώνες από τις μεταγενέστερες επιπτώσεις της ενδοκυττάριας και εξωκυττάριας συσσώρευσης του Αβ πεπτιδίου (Jama et al., 1996;

Perrig et al., 1997; Rotkamp et al., 2000; Zandi et al., 2004). Παρόλα αυτά μελέτες με χορήγηση βιταμίνης E, ως μορίου που θεωρητικά μειώνει τις ελεύθερες ρίζες, δεν έχουν καταλήξει σε ομοφωνία (Fillenbaum et al., 2005). Η χρόνια χορήγηση βιταμίνης E μόνη της ή σε συνδυασμό με σελλεγγιλίνη, που είναι αναστολέας της μονοαμινοξειδάσης B, φαίνεται ότι καθυστερεί την εξέλιξη της νόσου και τη σοβαρότητα των διαταραχών που εμφανίζονται σε ασθενείς με μέτριας σοβαρότητας AD (Fillenbaum et al., 2005). Σε μια μελέτη με ασθενείς που ήταν στο στάδιο της ήπιας γνωσιακή διαταραχής, η χορήγηση βιταμίνης E δεν απέτρεψε την εξέλιξη της νόσου AD (Petersen et al., 2005).

Η εναπόθεση του Αβ πεπτιδίου και η επακόλουθη δημιουργία πλακών στον εγκέφαλο συσχετίζεται με απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος που περιλαμβάνει έκκριση κυτοκινών, έκφραση χημοκινών και έκκριση οξειδίου αζώτου που διαμεσολαβεί αποπτωτικούς μηχανισμούς (Dickson et al., 1993; Griffin et al., 1989). Ορισμένες μελέτες δείχνουν ότι τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα μπορούν να μειώσουν την επαγωγή της φλεγμονής και την αύξηση μικρογλοίας και αστροκυττάρων και κατά συνέπεια την παραγωγή Αβ 1-42 (Breitner et al., 1994). Η χρήση τους στη νόσο AD όμως δεν είναι ευρεία (ADAPT, 2006).

Άλλη φαρμακολογική παρέμβαση που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της νόσου είναι η αναστολή της τοξικότητας από διέγερση μέσω ανταγωνιστών των NMDA υποδοχέων του γλουταμικού οξέως. Το γλουταμικό είναι ο κύριος διεγερτικός νευροδιαβιβαστής στο φλοιό και στον ιππόκαμπο και η γλουταμινική συνθετάση φαίνεται να οξειδώνεται στον εγκέφαλο ασθενών με νόσο AD, οδηγώντας σε περίσσεια γλουταμικού που καταλήγει να γίνεται τοξική (Shah et al., 2008). Η υπερβολική ενεργοποίηση των μεταβοτροπικών υποδοχέων του γλουταμικού αυξάνει την ευαλωτότητα των νευρώνων στην εκφύλιση. Για αυτό και η χορήγηση ενός μορίου που αναστέλλει την ενεργοποίηση των υποδοχέων NMDA, όπως είναι η μεμαντίνη, μπορεί να προλάβει την παθολογική ενεργοποίηση και να διατηρήσει τη φυσιολογική λειτουργία των υποδοχέων (Kornhuber et al., 1989; Misztal et al., 1996; Wenk et al., 1996; Zajackowski et al., 1996). Η Μεμαντίνη είναι το πιο συχνά χορηγούμενο φάρμακο στη νόσο AD, κατάλληλο για πρώιμες, αλλά και προχωρημένες φάσεις της νόσου. Φαίνεται να παρέχει βελτίωση των συμπτωμάτων, μέσω επίδρασης στη λειτουργία του ιπποκάμπου (Parsons et al.,

1999). Τέλος, κλινικές δοκιμές δείχνουν ότι μπορεί να βελτιώσει τα νευροψυχολογικά και γνωσιακά ελλείμματα ασθενών με AD (Reisberg et al., 2003; Tariot et al., 2004).

## **2. ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ**

Τα πειραματικά μοντέλα που προσομοιάζουν τις νευροψυχιατρικές διαταραχές χρησιμοποιούνται ευρέως με κοινώς αποδεκτά κριτήρια εγκυρότητας, παρά τις κριτικές που έχουν δεχτεί (Bourin et al., 2007). Τα πειραματικά μοντέλα μπορούν να φανούν χρήσιμα στη μελέτη της συμπεριφοράς (φυσιολογικής ή παθολογικής) και στη θεραπευτική απόκριση στα φάρμακα.

### **2.1. Δοκιμασία Ανοιχτού πεδίου**

Η δοκιμασία ανοιχτού πεδίου προκαλεί μια αυθόρμητη απόκριση σε ένα ήπια στρεσογόνο ερέθισμα, όπως είναι η έκθεση σε ένα άγνωστο περιβάλλον (Bourin et al., 2007). Οι κύριες πηγές στρες κατά τη συγκεκριμένη δοκιμασία είναι δύο: ο αποχωρισμός του πειραματοζώου από το κοινωνικό του περιβάλλον (τον κλωβό του στον οποίο συστεγάζεται ομαδικά) και η έκταση του πειραματικού κλωβού (ανοιχτό πεδίο), που είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή του κλωβού στον οποίο διαμένει το ζώο (Prut & Belzung, 2003). Η δοκιμασία έχει προταθεί από τον Hall (1934), αρχικά για επίμυες και συνίσταται στην τοποθέτηση του πειραματόζωου σε ένα ελεγχόμενο άγνωστο περιβάλλον, έτσι ώστε να αποτρέπεται η διαφυγή, με σκοπό την παρατήρηση πολλαπλών συμπεριφορικών μοτίβων (Walsh & Cummins, 1976). Εκτός από την οριζόντια κινητικότητα, παρατηρούνται επίσης, η κάθετη κινητικότητα των ζώων (ανασηκώσεις στα δύο πίσω άκρα), που υποδηλώνει την τάση τους για εξερεύνηση του νέου περιβάλλοντος, η στερεοτυπική συμπεριφορά, όπως είναι η «αυτοπεριποίηση», που οφείλεται σε αυξημένη ντοπαμινεργική λειτουργία και φαίνεται να μειώνεται μετά τη χορήγηση αντιψυχωσικών φαρμάκων (Seeger et al, 1995), η ταχύτητα και ο χρόνος παραμονής τους στο κέντρο του κλωβού και η διάρκεια απραξίας. Τέλος, αξιολογείται η τάση των ζώων να παραμένουν στην περιφέρεια του πεδίου, μακριά από το κέντρο, γνωστό ως «θιγμοταξία», που υποδηλώνει άγχος (Bourin et al., 2007).

Στην εν λόγω δοκιμασία οι φαρμακολογικές παρεμβάσεις με χορήγηση ουσιών με πιθανή αγχολυτική δράση δεν αυξάνουν απαραίτητα την εξερευνητική συμπεριφορά των πειραματοζώων, αλλά μπορούν να μειώσουν την επαγόμενη από το στρες αναστολή της εξερευνητικότητας (Bourin et al., 2007). Σε αντιδιαστολή με δοκιμασίες που προκαλούν εξαρτημένες αντιδράσεις άγχους (όπως είναι η έκθεση σε ηλεκτροσόκ στο πόδι), στις ανεξάρτητες αποκρίσεις, όπως είναι η δοκιμασία ανοιχτού πεδίου, δεν παρεμβάλλονται μηχανισμοί μνήμης/μάθησης ή πόνου. Ως εκ τούτου τα αποτελέσματα της πειραματικής παρέμβασης γίνονται ευκολότερα κατανοητά. Ένας σημαντικός παράγοντας που θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη είναι οι ατομικές διαφορές των πειραματοζώων που επηρεάζουν την κινητικότητα τους (Antonίου et al., 2008). Επίσης θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη επιδράσεις άλλων μεταβλητών στη συμπεριφορά του ζώου, όπως είναι η στέρηση τροφής ή νερού, η επίδραση ενός φαρμάκου στις αισθητήριες λειτουργίες του ζώου, όπως είναι η απτική (η οποία είναι απαραίτητη για την επαφή του ζώου με τα τοιχώματα και πιθανή έκπτωση αυτής της αίσθησης οδηγεί σε τάση αυξανόμενων εισόδων στο κέντρο του πειραματικού κλωβού), η ένταση του φωτισμού κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, καθώς και παρεμβολή στον ημερήσιο κύκλο των πειραματοζώων (Pruet & Belzung, 2003).

## **2.2. Δοκιμασία Φωτεινού/Σκοτεινού κλωβού**

Η δοκιμασία Φωτός/Σκότους έχει προταθεί από τον Crawley (1981) και συνίσταται στην τοποθέτηση του πειραματοζώου σε ένα κλωβό, ο οποίος αποτελείται από δύο διαμερίσματα, ένα φωτεινό και ένα σκοτεινό. Παρατηρούνται οι συνολικές μεταπτώσεις του ζώου, καθώς και ο χρόνος παραμονής του σε καθένα από τα δύο διαμερίσματα (Crawley et al., 1981). Η δοκιμασία βασίζεται στην εγγενή τάση των τρωκτικών να αποστρέφονται το έντονο φως και να προτιμούν το σκοτάδι. Βασίζεται επίσης στην αυθόρμητη εξερευνητική συμπεριφορά που επιδεικνύουν απέναντι σε ήπιους στρεσογόνους παράγοντες, όπως είναι το νέο περιβάλλον ή το φως. (Bourin & Hascoet, 2003).

Η παραμονή των τρωκτικών στο φως αποτελεί αγχογόνο ερέθισμα, ως εκ τούτου ένα ζώο με υψηλά επίπεδα στρες αναμένεται ότι θα παραμείνει περισσότερη ώρα στο σκοτεινό, παρά στο φωτεινό διαμέρισμα. Συχνή είναι η μέτρηση του ποσοστού



του χρόνου, καθώς και της εξερευνητικής συμπεριφοράς του πειραματοζώου, στο κάθε διαμέρισμα (Hascoet & Bourin, 1998). Συγκεκριμένα, οι κύριοι παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της αγχολυτικής δράσης μιας φαρμακολογικής παρέμβασης είναι: ο χρόνος που χρειάστηκε για την πρώτη μεταπτώση από το φωτεινό στο σκοτεινό διαμέρισμα, ο αριθμός των μεταπτώσεων μεταξύ των δύο διαμερισμάτων, η κινητικότητα στο φωτεινό και στο σκοτεινό διαμέρισμα και ο χρόνος παραμονής στο κάθε διαμέρισμα. Ο χρόνος παραμονής σε κάθε διαμέρισμα αντανακλά την αποστροφή που δείχνει το ζώο για το ένα διαμέρισμα, ενώ οι μεταπτώσεις αποτελούν δείκτη εξερευνητικής δραστηριότητας του πειραματοζώου (Belzung et al., 1987; Bourin & Hascoet, 2003). Για παράδειγμα, μια επαγόμενη αύξηση, από μια προς μελέτη ουσία, της παραμονής στο φωτεινό διαμέρισμα καταδεικνύει πιθανή αγχολυτική δράση. Αύξηση στις μεταπτώσεις του πειραματοζώου, χωρίς ταυτόχρονη αύξηση της αυθόρμητης κινητικότητας, επίσης υποδηλώνει αγχώλυση. Αν όμως η φαρμακολογική παρέμβαση προκαλεί επίσης αυξημένη κινητικότητα και αυξημένο αριθμό μεταπτώσεων, σε σχέση πάντοτε με την ομάδα ελέγχου, τότε η ουσία θεωρείται ότι έχει κυρίως ψυχοδιεγερτικές επιδράσεις και θα πρέπει να επανελεγχθούν οι εν δυνάμει αγχολυτικές του δράσεις.

Συνεπώς, η δοκιμασία φωτός/σκότους αποτελεί ένα χρήσιμο και έγκυρο μέσο για την *in vivo* αξιολόγηση της επίδρασης αγχολυτικών ουσιών, τόσο κλασσικών, όσο και άτυπων, σε πειραματικά μοντέλα. Η σύντομη διάρκεια της δοκιμασίας, η ευχρηστία, καθώς και το γεγονός ότι δεν προαπαιτείται προηγούμενη εκπαίδευση ή εξοικείωση των πειραματοζώων, αποτελούν επίσης σημαντικά πλεονεκτήματα της μεθόδου.

### **2.3. Δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου**

Η δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου αναφέρεται σε μια διαδικασία κατά την οποία αξιολογείται η ικανότητα μνήμης του πειραματοζώου, μέσω της αναγνώρισης ενός αντικειμένου, με το οποίο το ζώο δεν έχει έρθει ξανά σε επαφή προηγουμένως. Βασίζεται στην εγγενή τάση που έχουν τόσο οι μύες, όσο και οι επίμυες, και που ανέφερε πρώτος ο Berlyne (1950), να αλληλεπιδρούν περισσότερο με ένα νέο, άγνωστο αντικείμενο, παρά με ένα οικείο αντικείμενο (Bevins & Besheer, 2006).

Η δοκιμασία εκτελείται σε δύο φάσεις. Στην πρώτη φάση το πειραματόζωο τοποθετείται στον πειραματικό κλωβό και έρχεται σε επαφή με δύο όμοια μεταξύ τους αντικείμενα, τα οποία αφήνεται ελεύθερο να εξερευνήσει για ένα καθορισμένο χρονικό διάστημα (συνήθως 5 ή 10 λεπτά). Ακολούθως, επιστρέφει στον κλωβό του για μια χρονική περίοδο, η οποία καθορίζεται με βάση τον εκάστοτε πειραματικό σχεδιασμό. Κατά τη δεύτερη φάση της δοκιμασίας το πειραματόζωο τοποθετείται ξανά στον πειραματικό κλωβό και έρχεται πάλι σε επαφή με δύο αντικείμενα. Το ένα αντικείμενο είναι το οικείο, με το οποίο είχε αλληλεπιδράσει κατά την πρώτη φάση της δοκιμασίας και το δεύτερο αντικείμενο είναι άγνωστο προς το πειραματόζωο. Η αναγνώριση των αντικειμένων αξιολογείται με βάση τη διάρκεια εξερεύνησης του νέου αντικειμένου σε σχέση με το οικείο (Bevins & Besheer, 2006).

Το διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ των δύο συνεδριών της δοκιμασίας καθορίζεται με βάση το στόχο του πειραματιστή. Σε περίπτωση που επιθυμείται η αξιολόγηση της βραχύχρονης μνήμης αναγνώρισης, τότε το χρονικό διάστημα μεταξύ των συνεδριών είναι μία ή μιάμιση ώρα. Σε περίπτωση αξιολόγησης της μακρόχρονης μνήμης αναγνώρισης (ή μιας οξείας φαρμακολογικής παρέμβασης), το διάστημα μπορεί να αυξηθεί στο ένα εικοσιτετράωρο.

Οι παράμετροι που αξιολογούνται είναι οι ακόλουθοι: ο συνολικός χρόνος εξερεύνησης των δύο αντικειμένων στις δύο συνεδρίες, ο Δείκτης Προτίμησης του νέου αντικειμένου και ο Δείκτης Διάκρισης μεταξύ των αντικειμένων. Ο δείκτης προτίμησης του νέου αντικειμένου αναφέρεται στο χρόνο που το ζώο εξερευνά το νέο αντικείμενο σε σχέση με το συνολικό χρόνο εξερεύνησης των αντικειμένων. Ο δείκτης διάκρισης μεταξύ των αντικειμένων αναφέρεται στη διαφορά του χρόνου εξερεύνησης του νέου αντικειμένου με το χρόνο εξερεύνησης του παλαιού αντικειμένου, σε σχέση με το συνολικό χρόνο εξερεύνησης των αντικειμένων (Bevins & Besheer, 2006).

Η δοκιμασία Αναγνώρισης νέου αντικειμένου χρησιμοποιείται συχνά για τη μελέτη διαγονιδιακών μοντέλων, καθώς και για την εκτίμηση των επιπτώσεων του γήρατος και της ανάπτυξης. Ένας αριθμός παραγόντων, καθιστά αυτή τη δοκιμασία προτιμητέα. Η δοκιμασία βασίζεται στη φυσική προδιάθεση των ζώων για

εξερεύνηση νέων αντικειμένων, δεν απαιτεί προηγούμενη εκπαίδευση των πειραματοζώων, ούτε έκθεση σε δυσάρεστα ερεθίσματα ή στέρησης τροφής και νερού και έχει υψηλό δείκτη εγκυρότητας, λόγω της αναπαραγωγής του σε πολλά εργαστήρια με διαφοροποιημένες πειραματικές παραμέτρους (Bevins & Besheer, 2006).

#### **2.4. Δοκιμασία Λαβύρινθου τύπου Y**

Ο λαβύρινθος σχήματος Y αποτελεί μια συμπεριφορική δοκιμασία κατάλληλη για αξιολόγηση της αυθόρμητης εναλλαγής (Spontaneous Alternation), που βασίζεται στην τάση του πειραματοζώου να εξερευνά ένα νέο περιβάλλον. Όλα τα τρωκτικά έχουν την προδιάθεση υπό κανονικές συνθήκες να εξερευνούν ένα νέο βραχίονα, παρά κάποιο που έχουν επισκεφθεί ξανά, όταν τοποθετηθούν σε ένα λαβύρινθο οποιουδήποτε τύπου (Hughes, 2004).

Ο συγκεκριμένος λαβύρινθος αποτελείται από τρεις βραχίονες, σε απόσταση 120° ο καθένας και η δοκιμασία ολοκληρώνεται με δύο συνεδρίες. Κατά την πρώτη συνεδρία το πειραματόζωο έχει πρόσβαση μόνο σε δύο από τους τρεις βραχίονες, ενώ στη δεύτερη συνεδρία το πειραματόζωο αποκτά πρόσβαση και στον τρίτο βραχίονα. Και στις δύο συνεδρίες το πειραματόζωο αφήνεται ελεύθερο να εξερευνήσει το λαβύρινθο και αξιολογείται η συμπεριφορά εναλλαγής.

Φυσιολογικά WT πειραματόζωα τείνουν να έχουν αυξημένο αριθμό μεταπτώσεων μεταξύ βραχιόνων, σε σχέση με διαγονιδιακά πειραματόζωα (Hsiao et al., 1996). Επίσης, η τάση για εναλλαγή μειώνεται σημαντικά σε περίπτωση υπολειτουργίας του ιπποκάμπου (Roberts et al., 1962). Χρησιμοποιείται συχνά και για την αξιολόγηση της χωρικής μνήμης, λόγω του ότι η εναλλαγή προϋποθέτει την ενθύμηση της μετάβασης σε ένα βραχίονα (Hudges, 2004). Η παρούσα δοκιμασία έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε φαρμακολογικές μελέτες αξιολόγησης της μνήμης με χορήγηση αγωνιστών των NMDA υποδοχέων γλουταμικού οξέως (Maurice et al., 1996; Ragozzino et al., 1996), Αβ πεπτιδίου (Hooper et al., 1996), παραγόντων φλεγμονής (Haus-Wegrzyniak et al., 1998) και χολινεργικών παραγόντων (Hughes et al., 1982).

Σε μια παραλλαγή της εν λόγω δοκιμασίας, τα πειραματόζωα αφήνονται να εξερευνησουν ελεύθερα εξαρχής τους τρεις βραχίονες για ένα προκαθορισμένο χρονικό διάστημα, σε μια μόνο συνεδρία. Η συγκεκριμένη μη-διακοπτόμενη παραλλαγή είναι λιγότερο αγχογόνος και επιτρέπει την ταυτόχρονη αξιολόγηση της κινητικότητας του πειραματοζώου, παρόλα αυτά καθιστά δυσκολότερη τη ρύθμιση των χαρακτηριστικών που σχετίζονται με τη μνήμη, όπως το χρονικό διάστημα μεταξύ των μεταβάσεων ή τον έλεγχο παραμέτρων που επηρεάζουν τις μεταβάσεις (Hudges, 2004).

### **2.5. Δοκιμασία Αιώρησης από την ουρά**

Η δοκιμασία Αιώρησης από την ουρά προτάθηκε το 1985 από το Steru και τους συνεργάτες του, ως μέθοδος αξιολόγησης της αντικαταθλιπτικής δράσης φαρμακολογικών παραγόντων σε μύες (Steru et al., 1985). Η δοκιμασία βασίζεται στο γεγονός ότι τα πειραματόζωα όταν υποβληθούν σε ένα βραχείας διάρκειας οξύ στρες (όπως είναι η αιώρηση από την ουρά), από το οποίο δεν μπορούν να διαφύγουν, θα παρουσιάσουν μια στάση κατά την οποία μένουν ακίνητα. Η διάρκεια της δοκιμασίας ανέρχεται στα 6 λεπτά και κατά το χρονικό διάστημα αυτό μετρούνται οι περίοδοι κίνησης (έντονη δραστηριότητα, ενεργητική συμπεριφορά) και οι περίοδοι απραξίας του μυός. Μέσα σε αυτό το διάστημα το ζώο επιδεικνύει και τις δύο συμπεριφορές σε εναλλαγή (Steru et al., 1985). Σημαντικό είναι να αξιολογείται και η κινητικότητα του μυός με άλλη δοκιμασία, σε περίπτωση που η αυξημένη περίοδος κίνησης του ζώου οφείλεται στη ψυχοδιεγερτική δράση ενός φαρμακολογικού παράγοντα.

Μελέτες με χορήγηση πιθανών αντικαταθλιπτικών ουσιών έχουν δείξει ότι ουσίες που εμφανίζουν αντικαταθλιπτική δράση ρυθμίζουν την ισορροπία μεταξύ κίνησης-απραξίας υπέρ της συμπεριφοράς κίνησης. Το ίδιο ισχύει και για τα ψυχοδιεγερτικά φάρμακα. Η μείωση της περιόδου ακινησίας σχετίζεται με την προσπάθεια διαφυγής από το στρεσογόνο ερέθισμα, ενώ η αύξηση της ακινησίας προσομοιάζει με την «συμπεριφορική απόγνωση», σύμπτωμα που εμφανίζουν και οι ασθενείς οι οποίοι πάσχουν από κατάθλιψη.

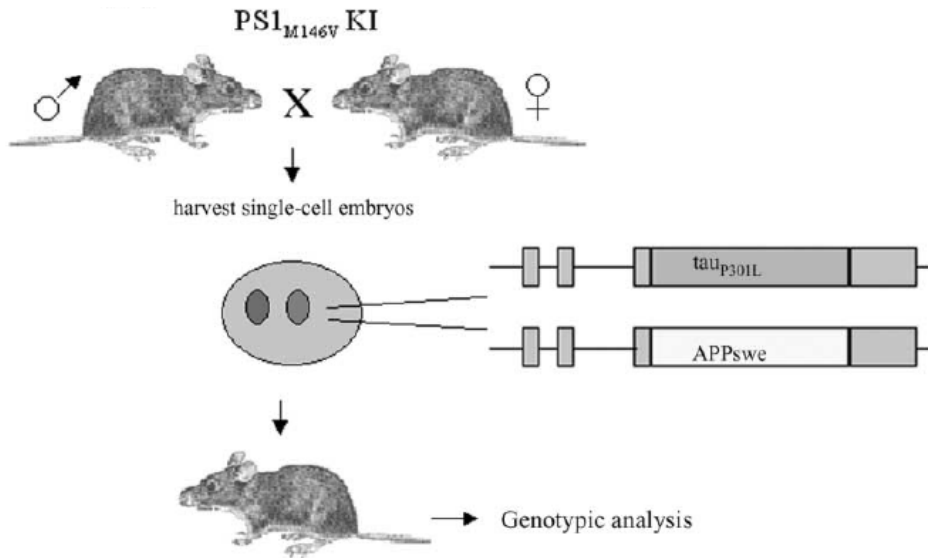
## **3. ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ 3xTg ΓΙΑ ΤΗ ΝΟΣΟ AD**

Τα διαγονιδιακά μοντέλα για τη νόσο AD αποτελούν ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο μέσο για τη μελέτη πολλαπλών πτυχών της παθολογίας του AD και συμβάλουν τόσο στην διαλεύκανση της παθοφυσιολογίας της νόσου, όσο και στην ανάπτυξη αποτελεσματικότερων φαρμακολογικών θεραπειών. Ένας σημαντικός αριθμός μοντέλων έχουν δημιουργηθεί την τελευταία εικοσαετία, με στόχο την προσομοίωση των κύριων νευροπαθολογικών χαρακτηριστικών της νόσου. Τα μοντέλα αυτά, συνιστώνται κυρίως από αυξημένη έκφραση των πλακών Αβ πεπτιδίου και τα νευροϊνιδιακά έγκλειστα αποτελούμενα από υπερφωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη Ταυ. Στα περισσότερα μοντέλα υπάρχει επαρκής χαρακτηρισμός των νευροπαθολογικών και συμπεριφορικών διαταραχών που παρουσιάζουν οι ασθενείς. Παρόλα αυτά υπάρχουν διαφοροποιήσεις μεταξύ των μοντέλων, ως προς το πόσα και ποια συμπτώματα της νόσου αναπαράγουν, γεγονός που οδηγεί σε ένα μεγάλο εύρος επιλογών για τον εκάστοτε ερευνητικό σχεδιασμό. Ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να θέτονται εξαρχής συγκεκριμένα ερωτήματα προς απάντηση έτσι ώστε να γίνεται η καταλληλότερη επιλογή μοντέλου για τη νόσο AD (Chin, 2011).

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο μύος 3xTg για τη νόσο του Αλτσχάιμερ, το οποίο παρουσιάζει σειρά από χαρακτηριστικά, κατάλληλα για τον παρόντα πειραματικό σχεδιασμό και τα οποία αναλύονται ακολούθως.

### **3.1. Δημιουργία μοντέλου 3xTg**

Το παρόν μοντέλο έχει δημιουργηθεί το 2003 από τον Oddo και τους συνεργάτες του, με τη χρήση της τεχνικής της προπυρηνικής μικροέγχυσης. Με τη συγκεκριμένη τεχνική έγινε ταυτόχρονη έγχυση δύο ανεξάρτητων διαγονιδίων που κωδικοποιούν την ανθρώπινη μεταλλαγμένη μορφή του APP<sub>swE</sub> και της Ταυ<sub>P301L</sub> και τα δύο με τη χρήση του προμότορα Thy1.2, σε ένα μονοκύτταρο έμβρυο, προερχόμενο από ομόζυγους knock-in μύες με μεταλλαγμένη PS1<sub>M146V</sub>. Τα έμβρυα στα οποία έγινε η έγχυση, εμφυτεύθηκαν σε θηλυκούς μύες. Οι απόγονοι γονοτυπήθηκαν ούτως ώστε να ταυτοποιηθούν οι 3xTg μύες (Εικόνα 3). Με ανοσοαποτύπωμα (immunoblot) φαίνεται ότι στους ομόζυγους μύες η έκφραση της Ταυ και του APP διπλασιάζεται σε σχέση με τους ημιζυγωτούς μύες (Oddo et al., 2003).



**Εικόνα 3: Δημιουργία διαγονιδιακού 3xTg μοντέλου μυός (Oddo et al., 2003)**

Ο προμώτορας Thy.1.2 είναι γνωστό ότι οδηγεί στην έκφραση των διαγονιδίων στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (Caroni, 1997). Με την ανάλυση Western Blot οι ερευνητές επιβεβαίωσαν ότι η έκφραση των διαγονιδίων της πρωτεΐνης Ταυ και του APP εντοπίζεται αποκλειστικά στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα.

Το γεγονός ότι τα διαγονίδια της πρωτεΐνης Ταυ και του APP συνεντοπίζονται στον ίδιο γενετικό τόπο (genetic locus) καθιστά απίθανο τον ανεξάρτητο διαχωρισμό τους σε επόμενες γενεές. Ως εκ τούτου, η αναπαραγωγή των 3xTg μυών και η δημιουργία μιας μεγάλης αποικίας καθίσταται εύκολη, γρήγορη, χαμηλού κόστους και δεν απαιτεί γονοτύπηση των απογόνων. Επίσης, το γεγονός ότι πολλαπλά διαγονίδια εισάγονται σε ένα πειραματόζωο χωρίς να μεταβάλλεται η σύσταση του γενετικού υπόβαθρου αποτελεί ένα ακόμη πλεονέκτημα, που αποκλείει μια «παρείσακτη» μεταβλητή σε πειράματα συμπεριφοράς και ηλεκτροφυσιολογίας (Oddo et al., 2003).

### **3.2. Νευροπαθολογικά χαρακτηριστικά του 3xTg μοντέλου**

Οι πρωτεΐνες των διαγονιδίων στο 3xTg μοντέλο μυός εκφράζονται κυρίως στις περιοχές του ιπποκάμπου και του μετωπιαίου φλοιού, εγκεφαλικές περιοχές που είναι γνωστό ότι σχετίζονται με την παθολογία της νόσου. Στο μοντέλο

παρουσιάζονται αυξημένα επίπεδα Αβ πεπτιδίου και συγκεκριμένα, σε διπλάσιο βαθμό σε σχέση με ημιζυγωτικούς 3xTg μύες. Φαίνεται επίσης να υπάρχει προοδευτική αύξηση των επιπέδων του πεπτιδίου Αβ<sub>42</sub> (Oddo et al., 2003).

Όσον αφορά στη χρονική πορεία εξέλιξης της νευροπαθολογίας της νόσου στο συγκεκριμένο μοντέλο, φαίνεται ότι το πεπτίδιο Αβ εντοπίζεται στον εγκέφαλο σε πρότερο χρόνο σε σχέση με τα νευροϊνιδιακά έγκλειστα που δημιουργούνται από την υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Tau. Ενδοκυττάρια εναποθέσεις του πεπτιδίου Αβ εμφανίζονται στην ηλικία των 3 με 4 μηνών και εξωκυττάρια εναποθέσεις γίνονται ορατές μετά την ηλικία των 6 μηνών. Η χρονική πορεία εξέλιξης της παθολογίας της πρωτεΐνης Tau δεν συμπίπτει με αυτή του πεπτιδίου Αβ. Οι 3xTg μύες αποκτούν ανοσοδραστικότητα στην ανθρώπινη Tau αρχικά στην ηλικία των 12 μηνών. Μεταξύ 12 και 15 μηνών γίνεται ορατή η λανθασμένη αναδίπλωση της πρωτεΐνης και φωσφορυλιώνεται η θρεονίνη 231, η σερίνη 202 και η θρεονίνη 205. Οι φωσφορυλιωμένες περιοχές της σερίνης 396 και 406 γίνονται ορατές μετά τους 18 μήνες ζωής των μυών. Κάποιοι από τους νευρώνες με αλλοιωμένη πρωτεΐνη Tau που συσσωρεύονται σταδιακά καταλήγουν να σχηματίζουν συσσωματώματα. Σε 3xTg μύες ηλικίας 18 μηνών και άνω εντοπίζονται δυστροφικοί νευρίτες με υπερφωσφορυλιωμένη Tau πρωτεΐνη, οι οποίοι περιβάλλουν σφαιρικές δομές θετικές στη θειοφλαβίνη (που συνιστούν πλάκες Αβ πεπτιδίου).

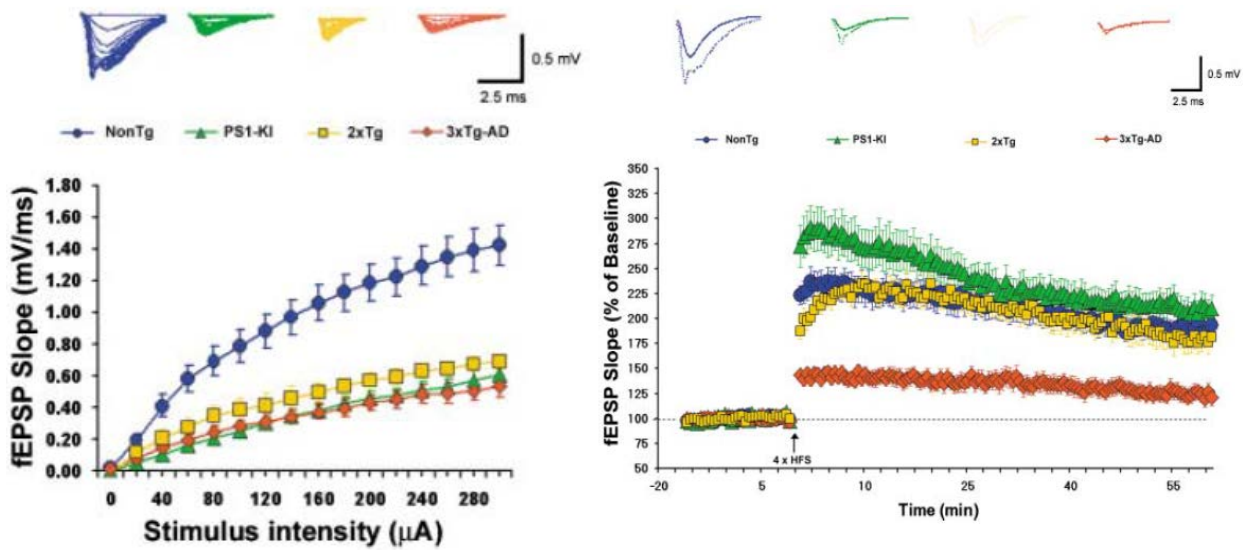
Όσον αφορά στο χωρικό μοτίβο εντοπισμού της Αβ και Tau παθολογίας, σε σχέση με το χρόνο, φαίνεται να υφίσταται μια αντίστροφη χωρο-χρονικά εξέλιξη της πορείας της παθολογίας. Ενώ οι ενδοκυττάρια εναποθέσεις Αβ πεπτιδίου εντοπίζονται αρχικά στις περιοχές του νεοφλοιού και μετά τους 6 μήνες ζωής στους πυραμιδικούς νευρώνες της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου, η Tau παθολογία γίνεται πρώτα ορατή στον ιππόκαμπο στην περιοχή CA1 και σε μετέπειτα στάδιο σε φλοιϊκές περιοχές. Συγκεκριμένα, ενδοκυττάρια Αβ παθολογία εντοπίζεται στον νεοφλοιό στους 3 με 4 μήνες ζωής, η εξωκυττάρια Αβ παθολογία στις στοιβάδες 4 και 5 του μετωπιαίου φλοιού στους 6 μήνες και μέχρι τους 12 μήνες ζωής γίνεται πλέον ορατή σε άλλες φλοιϊκές περιοχές και στον ιππόκαμπο. Αντιθέτως, παθολογικές μεταβολές στην πρωτεΐνη Tau γίνονται ορατές σε πρώτο στάδιο στον

ιππόκαμπο, κυρίως στα σωματοδενδριτικά διαμερίσματα των νευρώνων της CA1 περιοχής.

Τα διαγονίδια τόσο της Ταυ, όσο και του APP εκφράζονται σε παρόμοια επίπεδα σε κοινές εγκεφαλικές περιοχές. Το γεγονός αυτό καθιστά ικανή τη μελέτη της υπόθεσης του «καταρράκτη» του αμυλοειδούς, η οποία προτείνει ότι η έναρξη της παθολογίας του Αβ πεπτιδίου είναι αυτή που πυροδοτεί όλη την παθολογία της νόσου AD στις περισσότερες περιπτώσεις. Το γεγονός ότι στο συγκεκριμένο μοντέλο μύς η παθολογία του Αβ πεπτιδίου προηγείται χρονικά της Ταυ παθολογίας συγκλίνει με τη συγκεκριμένη υπόθεση. Πέραν αυτού, το γεγονός ότι τόσο η Ταυ όσο και το πεπτιδιο Αβ συνεντοπίζονται στους ίδιους νευρώνες, στηρίζει την υπόθεση ότι η Ταυ παθολογία επηρεάζεται από ενδοκυττάρια εναποθέσεις Αβ πεπτιδίου (Oddo et al., 2003).

Πέρα από τις πρωτεϊνικές διαταραχές, ένα δεύτερο κύριο νευροπαθολογικό χαρακτηριστικό της νόσου AD είναι η συναπτική δυσλειτουργία. Η εκδήλωση του συγκεκριμένου φαινότυπου, έχει την πιο δυνατή συσχέτιση με τις μνημονικές και γνωσιακές αλλαγές που χαρακτηρίζουν τη νόσο ( Scheff et al., 1991). Στο μοντέλο 3xTg μύς η δυσλειτουργία στο επίπεδο των συνάψεων ξεκινά να υφίσταται από τους 6 μήνες ζωής των μυών και όχι νωρίτερα, γεγονός που υποδηλώνει ότι πιθανότατα αυτή η δυσλειτουργία προκύπτει ως αποτέλεσμα των ενδοκυττάρια εναποθέσεων του Αβ πεπτιδίου. Οι 3xTg μύες δεν παρουσιάζουν διαφορά ως προς τα διεγερτικά μετασυναπτικά δυναμικά (EPSP's) στην περιοχή CA1 του ιπποκάμπου, σε σχέση με WT μύες κατά τους πρώτους μήνες ζωής. Η πτώση των επιπέδων των EPSP's γίνεται ορατή στους 6 μήνες ζωής (Εικόνα 4α). Η μακρόχρονη ενδυνάμωση (LTP), που αποτελεί την κύρια μορφή συναπτικής πλαστικότητας που επάγει τη μνήμη και τη μάθηση (Bliss & Collingridge, 1993) φαίνεται επίσης να διαταράσσεται έντονα στους 3xTg μύες στην ηλικία των 6 μηνών (Εικόνα 4β).





Εικόνα 4: Α. Απεικόνιση των EPSP's των WT, PS1-KI, 2xTg και 3xTg μύων στους 6 μήνες ζωής. Β. Επίπεδα του LTP σε WT, PS1-KI, 2xTg και 3xTg μύες στους 6 μήνες ζωής (Oddo et al., 2003)

### 3.3. Συμπεριφορικά χαρακτηριστικά μοντέλου 3xTg

Οι γνωσιακές διαταραχές των ασθενών με νόσο AD επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό την καθημερινή λειτουργικότητα των ασθενών και διαφέρουν από τις γνωσιακές αλλαγές που παρατηρούνται στο φυσιολογικό γήρας (Teri et al., 1997). Το μοντέλο μύς 3xTg φαίνεται να αναπαράγει σε μεγάλο βαθμό τις συμπεριφορικές και γνωσιακές αλλαγές που παρατηρούνται σε ασθενείς με νόσο AD. Ακολούθως παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά του μοντέλου.

#### 3.3.1. Βάρος, κινητικός συντονισμός και ισορροπία

Στους 3xTg μύες φαίνεται ότι μετά τους 6 μήνες ζωής αυξάνεται το σωματικό τους βάρος, σε σχέση με τους WT μύες (Gimenez-Llort et al., 2007). Στον κινητικό συντονισμό και στην ισορροπία δεν παρουσιάζουν διαταραχές, όπως φαίνεται από τις επιδόσεις τους στη δοκιμασία περιστρεφόμενης ράβδου και στη δοκιμασία αιώρησης από συρμάτινη ράβδο (Sterniczuk et al., 2010).

#### 3.3.2. Νευρολογική αξιολόγηση (Neuroassessment)

Σύμφωνα με τους Sterniczuk et al. (2010), οι 3xTg μύες παρουσιάζουν λιγότερη κόπωση, μεγαλύτερης έντασης αντανακλαστικά ως απόκριση σε ένα ξαφνικό

ηχητικό ερέθισμα, εντονότερη αντίδραση διαφυγής όταν κρατούνται από το δέρμα της κεφαλής κοντά στα αυτιά, πιο έντονη συμπεριφορά «παγώματος» και μειωμένη απόκριση σε τσίμπημα της ουράς.

### 3.3.3. Μνήμη και μάθηση

Η χωρική μνήμη και μάθηση αξιολογείται συχνά μέσω της δοκιμασίας Υδάτινου Λαβύρινθου κατά Morris (Morris water maze). Σύμφωνα με τους Billings et al. (2005), στην εν λόγω δοκιμασία οι 3xTg μύες 2 μηνών έχουν φυσιολογική επίδοση και δεν διαφέρουν από τους WT μύες. Στους 4 μήνες ζωής οι 3xTg μύες χρειάζονται περισσότερο χρόνο για να μάθουν να κολυμπάνε μέχρι την πλατφόρμα, αλλά τελικά μαθαίνουν που βρίσκονται. Συνεπώς φαίνεται να παρουσιάζουν δυσλειτουργία στη μακρόχρονη ανάκληση, αλλά παραμένει η ικανότητα μάθησης της δοκιμασίας. Στους 6 μήνες φαίνεται ότι η διαταραχή στην ανάκληση αφορά και στη βραχύχρονη μνήμη, πέρα από τη μακρόχρονη. Στους 18 μήνες οι 3xTg μύες δεν είναι πλέον ικανοί να μάθουν τη δοκιμασία, κατά τη διάρκεια της εκπαίδευσης για την προσέγγιση της πλατφόρμας.

Η Δοκιμασία Αναγνώρισης αντικειμένου είναι μια δοκιμασία μέσω της οποίας αξιολογείται η βραχύχρονη ή η μακρόχρονη μνήμη αναγνώρισης. Στην ηλικία των 4 μηνών οι 3xTg μύες δεν παρουσιάζουν διαφορά στην επίδοση τους σε σχέση με τους WT μύες, αλλά στους 6 μήνες ξεκινά να διαταράσσεται τόσο η μακρόχρονη όσο και η βραχύχρονη μνήμη αναγνώρισης του νέου αντικειμένου (Clinton et al., 2007).

### 3.3.4. Εξερευνητική συμπεριφορά

Η συμπεριφορά εξερεύνησης των πειραματοζώων αξιολογείται μέσω της Δοκιμασίας του ανοιχτού πεδίου, και λιγότερο συχνά μέσω της δοκιμασίας holeboard. Μειωμένη εξερευνητική συμπεριφορά στη δοκιμασία Ανοιχτού πεδίου, είναι ορατή από τους 2.5 μήνες ζωής των 3xTg μυών, ενώ είναι εμφανής σε όλες τις ηλικίες η καθυστέρηση στην έναρξη της εξερευνητικής συμπεριφοράς. Στους 6 μήνες ζωής τα επίπεδα της εξερευνητικότητας των 3xTg μυών συνεχίζουν να μειώνονται σταδιακά (Gimenez et al., 2007; Sterniczuk et al., 2010). Επίσης, σε μεγαλύτερες ηλικίες (12 μηνών και άνω) οι 3xTg μύες παρουσιάζουν μειωμένο

ενδιαφέρον και αργή εξοικείωση σε νέες περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς επίσης και νεοφοβία, όπως φαίνεται από το «corner test», στο οποίο τα πειραματόζωα τοποθετούνται στη γωνία ενός νέου κλωβού και αξιολογείται η εξερευνητική τους δραστηριότητα. Σε αυτή τη δοκιμασία, παρόλο που παρουσιάζουν παρόμοια επίπεδα κινητικότητας με WT μύες, τείνουν να έχουν μειωμένη εξερευνητική συμπεριφορά, η οποία όμως βελτιώνεται κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας (Gimenez et al., 2007). Στη δοκιμασία holeboard οι 3xTg μύες έχουν λιγότερα και μικρότερης διάρκειας head-dips, μεγαλύτερο λανθάνων χρόνο για το πρώτο head – dip και μειωμένη εξερευνητική συμπεριφορά (Gimenez et al., 2007).

### 3.3.5. Κινητικότητα

Στους 6 μήνες ζωής οι 3xTg μύες ξεκινούν να εμφανίζουν ελαττωμένη κινητικότητα, σε σχέση με WT μύες, όπως παρατηρείται στη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου. Η επίδοση συνεχίζει να μειώνεται μετά το 12<sup>ο</sup> μήνα ζωής (Gimenez et al., 2007). Δεν φαίνεται να παρουσιάζουν κάποια διαφορά στην απόσταση που διανύουν (Gimenez et al., 2007; Sterniczuk et al., 2010). Όσον αφορά στην ταχύτητα της περιπατητικής τους δραστηριότητας, κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, οι Sterniczuk et al. (2010), καθώς και οι Gimenez et al. (2007) δεν παρατήρησαν διαφορά μεταξύ 3xTg και WT μυών. Οι 3xTg μύες φαίνεται να εμφανίζουν απραξία για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, σε σχέση με τους WT μύες και να έχουν πρόωρη έναρξη αυτής της συμπεριφοράς (Filali et al., 2012).

### 3.3.6. Αγχώδης συμπεριφορά

Στη δοκιμασία Φωτός/Σκότους οι 3xTg μύες δείχνουν έντονη αποστροφή προς το φωτεινό διαμέρισμα μετά την ηλικία των 12 μηνών, γεγονός που υποδηλώνει υψηλά επίπεδα άγχους. Οι 3xTg μύες τείνουν να εμφανίζουν μειωμένο χρόνο παραμονής στο φωτεινό διαμέρισμα συγκριτικά με τους WT μύες και χρειάζονται πολύ περισσότερο χρόνο για να εισέλθουν ξανά στο φωτεινό διαμέρισμα, άπαξ και έχουν εισέλθει στο σκοτεινό (Gimenez et al., 2007).

Συμπερασματικά, οι 3xTg μύες τείνουν να έχουν ψηλότερα από το φυσιολογικό επίπεδα άγχους, που ίσως να οφείλονται σε μειωμένο κατώφλι απόκρισης στον φόβο. Αυτό οδηγεί σε μειωμένη εξερευνητική συμπεριφορά, χωρίς ελλείμματα στον

αισθητικοκινητικό συντονισμό (Sterniczuk et al., 2010). Μετά τους 6 μήνες ζωής γίνονται εμφανείς οι διαταραχές στις ικανότητες μάθησης και στη μακρόχρονη μνήμη, όπως φαίνεται από τις επιδόσεις των μυών στις δοκιμασίες του Υδάτινου λαβύρινθου κατά Morris και της Αναγνώρισης νέου αντικειμένου. Παρόλο που δεν έχει μελετηθεί στο συγκεκριμένο μοντέλο, είναι πιθανόν οι 3xTg μύες να εμφανίζουν «καταθλιπτικόμορφη» συμπεριφορά στη δοκιμασία αιώρησης από την ουρά, λόγω των νευροψυχιατρικών συμπτωμάτων που εμφανίζονται στη νόσο AD. Γι' αυτό και στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η «καταθλιπτικόμορφη» συμπεριφορά με την εν λόγω δοκιμασία.

#### **4. ΔΙΑΦΥΛΙΚΕΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΣΤΗ ΝΟΣΟ AD**

Όπως και σε άλλες διαταραχές του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος, έτσι και στη νόσο AD, υπάρχουν διαφορές του φύλου. Κατά την ανάπτυξη του εγκεφάλου υπάρχει διαφυλικός διμορφισμός, που έχει ως αποτέλεσμα τη διαφορετική δικτύωση του εγκεφάλου των αρσενικών και θηλυκών κατά την ενήλικη ζωή. Αυτό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση της ευαλωτότητας των δυο φύλων απέναντι στη νόσο AD (Cahill, 2006; Carroll et al., 2010).

Παρόλα αυτά επιδημιολογικές μελέτες των τελευταίων δεκαετιών δεν έχουν καταλήξει σε πλήρη ομοφωνία σχετικά με την επίδραση του φύλου στην νόσο AD, καθώς υπάρχουν ευρήματα που υποδηλώνουν διαφορές μεταξύ των δύο φύλων, με τις γυναίκες να έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου (Fratiglioni et al., 1997; Gao et al., 1998; Jorm et al., 1987), και αυξημένη συχνότητα (Andersen et al., 1999; Fratiglioni et al., 2001; Jorm & Jolley, 1998; Ruitenberg et al., 2001) αλλά και ευρήματα που υποστηρίζουν ότι τα δύο φύλα είναι εξίσου ευάλωτα στη νόσο (Barnes et al., 2003; Edland et al., 2002).

Συγκεκριμένα, οι γυναίκες φαίνεται να εμφανίζουν εντονότερη εναπόθεση πλακών στον εγκέφαλο, σε σχέση με τους άνδρες, σε πρώιμο στάδιο (Corder et al., 2004) και η παθολογία αυτή σχετίζεται εντονότερα με την κλινική εικόνα της άνοιας και την έκπτωση των γνωσιακών λειτουργιών (Barnes et al., 2005; Sinforiani et al., 2010). Επίσης, στις γυναίκες το αλλήλιο ε4 της Απολιποπρωτεΐνης E σχετίζεται εντονότερα

με εμφάνιση της νόσου και αυτό συσχετίζεται περαιτέρω με μεγαλύτερη ατροφία του ιπποκάμπου στις γυναίκες (Farrer et al., 1997, Fleisher et al., 2005). Ωστόσο, μεταθάνατον αναλύσεις δεν βρίσκουν διαφορές μεταξύ των δυο φύλων στον εγκέφαλο ασθενών όσον αφορά στα δυο κύρια νευροπαθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου, στις πλάκες Αβ πεπτιδίου και στα νευροϊνιδιακά έγκλειστα υπερφωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης Tau (Sandberg et al., 2001).

Σειρά ευρημάτων από κλινικές μελέτες φανερώνουν το ρόλο των ορμονών του φύλου στην ανάπτυξη της νόσου. Τα οιστρογόνα προάγουν προστατευτικούς παράγοντες, όπως είναι η προώθηση της ανθεκτικότητας των νευρώνων και η μείωση της συσσώρευσης του Αβ πεπτιδίου (Pike et al., 2009). Ως εκ τούτου η δραστική μείωση των οιστρογόνων κατά την εμμηνόπαυση θεωρείται ότι συνοδεύεται από ελλιπή νευροπροστασία και ενδεχομένως να αυξάνει την ευαλωτότητα των μεταεμμηνοπαυσιακών γυναικών στη νόσο AD, αλλά και σε άλλες διαταραχές (Carroll et al., 2010). Μελέτες στις οποίες πραγματοποιήθηκε θεραπεία με οιστρογόνα σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση, δείχνουν ότι η εν λόγω θεραπεία μείωσε τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου (Henderson et al., 1994; Kawas et al., 1997; Paganini-Hill & Henderson, 1996; Tang et al., 1996; Zandi et al., 2002). Παρόλα αυτά υπάρχουν ενδείξεις ότι η θεραπεία με ορμόνες έχει θετικά αποτελέσματα όταν ξεκινά στη μέση ηλικία, αλλά τείνει να επιδεινώνει τα συμπτώματα όταν ξεκινά σε γεροντική ηλικία (Whitmer et al., 2011). Στους άνδρες φαίνεται ότι η σταδιακή μείωση των επιπέδων της τεστοστερόνης σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα Αβ πεπτιδίου (Gillett et al., 2003; Rosario et al., 2009) και αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου (Hogervorst et al., 2001; Moffat et al., 2004; Rosario et al., 2004; Rosario et al., 2009). Το γεγονός ότι ο ρυθμός μείωσης των στεροειδών ορμονών του φύλου διαφέρει ανάμεσα σε άνδρες και γυναίκες, αφού στην πρώτη περίπτωση είναι σταδιακή ενώ στην δεύτερη απότομη, μπορεί να εξηγήει εν μέρει τα ευρήματα ορισμένων μελετών που φανερώνουν αυξημένη επίπτωση της νόσου AD στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες.

Οι παρατηρούμενες διαφυλικές διαφορές στη νόσο AD ενδεχομένως να αντανακλούν στις διαφορετικές δράσεις των στεροειδών ορμονών του φύλου σε άνδρες και γυναίκες, κατά τις κρίσιμες αναπτυξιακές περιόδους. Η έκθεση στα

οιστρογόνα και στην τεστοστερόνη κατά την ανάπτυξη επάγουν σημαντική διαφοροποίηση στο θηλυκό και αρσενικό εγκέφαλο, τόσο σε δομικό, όσο και σε λειτουργικό επίπεδο (Bowers et al., 2010; Cosgrove 2007; Gore, 2008; Krohmer & Baum, 1989; Slob et al., 1980; Weisz & Ward, 1980). Αυτό ίσως να σχετίζεται με το γεγονός ότι τα δύο φύλα παρουσιάζουν διαφορετική ευαλωτότητα σε νευρολογικές διαταραχές, όπως στη σχιζοφρένεια, στην σκλήρυνση κατά πλάκας, στον αυτισμό, στο σύνδρομο Turette και στη διαταραχή ελλειμματικής προσοχής (Cahill, 2006).

Εφόσον τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη δρουν προστατευτικά κατά της νόσου AD, τότε είναι πιθανό η μείωση των εν λόγω ορμονών να οδηγεί σε αυξημένο ρίσκο για τη νόσο. Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι γυναίκες ασθενείς με νόσο AD έχουν χαμηλότερη κυκλοφορία και επίπεδα οιστραδιόλης (E2) στον εγκέφαλο σε σχέση με υγιείς γυναίκες αντίστοιχης ηλικίας (Manly et al., 2010; Rosario et al., 2011; Yue et al., 2005).

Οι νευροπροστατευτικές δράσεις των οιστρογόνων φαίνεται να εμπίπτουν σε τρεις κατηγορίες: Α. βελτιωμένη γνωσιακή λειτουργία μέσω διαδικασιών που περιλαμβάνουν αύξηση της πυκνότητας των δενδριτικών ακάνθων (Cooke & Woolley, 2005), της μακρόχρονης ενδυνάμωσης (Foy et al., 2010) και της ρύθμισης των νευροδιαβιβαστών (Gibbs, 2010), Β. προστασία κατά του θανάτου νευρικών κυττάρων (Simpkins et al., 2010; Suzuki et al., 2009) και Γ. την αναστολή των δύο κύριων νευροπαθολογικών χαρακτηριστικών της νόσου AD (Pike et al., 2009).

Συγκεκριμένα, η E2 φαίνεται να ρυθμίζει την επεξεργασία του APP προωθώντας το μη αμυλοειδογενές μονοπάτι (Gandy, 2003). Σε κυτταρικά συστήματα η E2 προωθεί την παραγωγή του  $\alpha$ -APP, μειώνοντας τον αριθμό παραγόμενου Αβ πεπτιδίου (Amtul et al., 2010; Desdouits-Magnen et al., 1998; Jaffe et al., 1994; Manthey et al., 2001; Thakur & Mani, 2005), είτε μέσω ενεργοποίησης του μη αμυλοειδογενούς μονοπατιού, είτε μέσω αναστολής του αμυλοειδογενούς μονοπατιού (Greenfield et al., 2002). Πιο πρόσφατα ευρήματα στρέφονται προς τον ρόλο των οιστρογόνων και της προγεστερόνης στη μείωση της συσσώρευσης του Αβ μέσω της εκκαθάρισης του. Η E2 φαίνεται ότι αυξάνει τα επίπεδα ή την ενεργοποίηση του ενζύμου που αποικοδομεί το πεπτίδιο Αβ, της Νεπριλυσίνης (Liang et al., 2009; Xiao et al., 2009).

Επίσης τα οιστρογόνα φαίνεται ότι αυξάνουν την έκφραση της τρανσθυρετίνης, η οποία δημιουργεί σύμπλοκο με το Αβ πεπτιδίο, αποτρέποντας την συσσωμάτωση του σε νευροτοξικές πλάκες (Schwarzman et al., 1994).

Όσον αφορά στις επιδράσεις της τεστοστερόνης στον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου στους άνδρες, φαίνεται ότι η σχετιζόμενη με την ηλικία μείωση στα επίπεδα των ανδρογόνων οδηγεί σε αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Οι άνδρες ασθενείς με νόσο AD έχουν χαμηλότερα επίπεδα τεστοστερόνης στον εγκέφαλο (Moffat et al., 2004; Rosario et al., 2011), σε σχέση με υγιείς άνδρες αντίστοιχης ηλικίας. Επίσης, η απώλεια ανδρογόνων φαίνεται να προηγείται των κλινικών (Moffat et al., 2004) και νευροπαθολογικών συμπτωμάτων της νόσου (Rosario et al., 2011), γεγονός που υποδηλώνει ότι είναι συμμετοχος στην εξέλιξη αυτής, παρά αποτέλεσμα της. Τέλος, μια ακόμη μελέτη που συνδέει την τεστοστερόνη με τη νόσο AD, έχει δείξει ότι τα επίπεδα τεστοστερόνης στον εγκέφαλο των ανδρών που αναπτύσσουν ταχέως τη νευροπαθολογία της νόσου είναι αντιστρόφως ανάλογα των επιπέδων του Αβ πεπτιδίου (Rosario et al., 2011).

Όπως και τα οιστρογόνα, τα ανδρογόνα φαίνεται ότι επάγουν τη νευροπροστασία που πιθανώς να μειώνει το ρίσκο για την εμφάνιση της νόσου AD. Ερευνητικά δεδομένα δείχνουν ότι τα ανδρογόνα προωθούν την ανάπτυξη των νευρώνων, την αναδημιουργία των αξόνων και τη συναπτική λειτουργία (Brannvall et al., 2005; Brooks et al., 1998; Cooke et al., 1998; Garcia-Ovejero et al., 2002; Garcia-Segura et al., 1994; Gorski, 1985; Hajszan et al., 2008; Hatanaka et al., 2009; Huppenbauer et al., 2005; Kawashima & Takagi, 1994; Lustig, 1994, MacLusky et al., 2004; Marron et al., 2005; Matsumoto, 2001; Pouliot et al., 1996; Schulz & Korz, 2010). Επίσης φαίνεται να αποτελούν προστατευτικό παράγοντα κατά του κυτταρικού θανάτου και ρυθμίζουν την παθολογία του Αβ πεπτιδίου, επηρεάζοντας τόσο την παραγωγή του, όσο και την αποικοδόμηση του μέσω της Νεπριλυσίνης (μεμβρανική μεταλλο-ενδοπεπτιδάση) (Almeida et al., 2004; Gandy et al., 2001; Gouras et al., 2000; Yao et al., 2008).

#### 4.1. Διαφυλικές διαφορές στο μοντέλο 3xTg

Σε σύγκλιση με τα ευρήματα των κλινικών μελετών ως προς τις διαφυλικές διαφορές στη νόσο AD, που υποδεικνύουν ορισμένες διαφορές, έρχονται και τα αποτελέσματα των προκλινικών μελετών με πειραματικά μοντέλα της νόσου και συγκεκριμένα με το μοντέλο 3xTg μυών, το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη (Carroll et al., 2010; Clinton et al., 2007; Gimenez et al., 2007; Hirata-Fukae et al., 2008). Οι διαφορές μεταξύ αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων αφορούν τόσο στην ανάπτυξη της νευροπαθολογίας, όσο και στο επίπεδο γνωσιακής ικανότητας σε ορισμένες συμπεριφορικές παραμέτρους.

Σε ένα από τα δύο κύρια νευροπαθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου, την παθολογική εναπόθεση του Αβ πεπτιδίου, οι θηλυκοί 3xTg μύες, μετά την ηλικία των 12 μηνών, παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα Αβ πεπτιδίου στον ιππόκαμπο, σε σχέση με τους αρσενικούς μύες, τόσο στο υπόθεμα, όσο και στην περιοχή CA1. Στον μετωπιαίο φλοιό αυτή η διαφορά εντοπίζεται από τους 6 μήνες ζωής και μετά (Carroll et al., 2010). Όταν οι εξωκυττάριας πλάκες του Αβ πεπτιδίου γίνουν εμφανείς, γεγονός που λαμβάνει χώρα στους 12 με 14 μήνες ζωής, και πάλι οι θηλυκοί 3xTg μύες εμφανίζουν μεγαλύτερο αριθμό πλακών σε σχέση με τους αρσενικούς μύες της αντίστοιχης ηλικίας (Carroll et al., 2010). Οι θηλυκοί μύες φαίνεται επίσης να έχουν αυξημένη ενεργοποίηση της β-σεκρετάσης από τους 9 μήνες ζωής, ενώ σε μεγαλύτερη ηλικία εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα της νεπριλυσίνης, που οδηγεί σε μη αποτελεσματική αποικοδόμηση του Αβ πεπτιδίου (Hirata Fukae et al., 2008). Τα μέχρι στιγμής πειραματικά ευρήματα δεν εντοπίζουν διαφορές μεταξύ των αρσενικών και θηλυκών 3xTg μυών ως προς την παθολογία που σχετίζεται με την υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Tau (Hirata Fukae et al., 2008).

Αρσενικοί 3xTg μύες στους οποίους χορηγήθηκε αμέσως μετά τη γέννηση μέχρι τον απογαλακτισμό τους φλουταμίδη, ανταγωνιστής των υποδοχέων των ανδρογόνων, παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα Αβ πεπτιδίου στην περιοχή CA1 του ιπποκάμπου και στο υπόθεμα, αλλά όχι στον μετωπιαίο φλοιό. Όταν ανάλογος χειρισμός έγινε στα θηλυκά πειραματόζωα, με τη χορήγηση τεστοστερόνης κατά το διάστημα 1-7<sup>ης</sup>



ημερών ζωής, με στόχο την αρρενοποίησή τους, τα επίπεδα συσσώρευσης του Αβ πεπτιδίου αυξήθηκαν σημαντικά στην περιοχή CA1 του υποκάμπου, αλλά μειώθηκαν στο μετωπιαίο φλοιό (Carroll et al., 2010).

Η διαφοροποίηση μεταξύ των φύλων στη σοβαρότητα της παθολογίας του Αβ πεπτιδίου είναι ορατή σε συμπεριφορικές παραμέτρους, που σχετίζονται κυρίως με τη γνωσιακή λειτουργία. Στην συμπεριφορά αυθόρμητης εναλλαγής (Spontaneous Alternation Behavior), η οποία εξαρτάται από τη λειτουργία του υποκάμπου και απαιτεί ενεργοποίηση της μνήμης εργασίας και της οπτικής προσοχής, οι θηλυκοί 3xTg μύες έχουν χαμηλότερη επίδοση σε σχέση με τους αρσενικούς μύες, μετά τους 12 μήνες ζωής (Carroll et al., 2010). Στη δοκιμασία υδάτινου λαβύρινθου κατά Morris, που επίσης σχετίζεται με την λειτουργία του υποκάμπου, οι θηλυκοί μύες έχουν χειρότερη επίδοση μετά τους 6 μήνες, σε σχέση με τους αρσενικούς μύες. Σε αντίθεση όμως με αυτό που θα αναμενόταν με βάση τη δοκιμασία του Morris water maze, στη Δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου, τα δυο φύλα δεν παρουσιάζουν διαφορά στην επίδοσή τους, σε καμία χρονική περίοδο (Clinton et al., 2007). Αυτό, πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι οι θηλυκοί 3xTg μύες είναι πιο ευαίσθητοι στην υπερδραστηριότητα του HPA άξονα, έχοντας αυξημένα επίπεδα κορτικοστερόνης, σε σχέση με τους αρσενικούς μύες. Ως εκ τούτου είναι πιθανόν σε δοκιμασίες που επάγουν στρες, όπως είναι η δοκιμασία υδάτινου λαβυρίνθου κατά Morris να παρουσιάζουν χαμηλότερη επίδοση (Clinton et al., 2007).

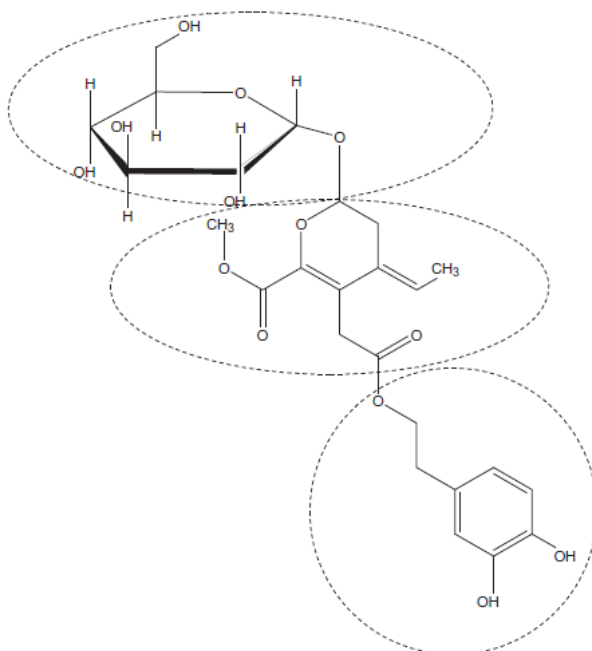
## **5. ΟΛΕΥΡΩΠΑΪΝΗ**

### **5.1. Περιγραφή**

Η Ολευρωπαΐνη είναι ένας σεκοϊριδοειδής γλυκοζίτης, χαρακτηριστικός των Ολεασών (Oleaceae), που αποτελεί το κύριο βιοενεργό συστατικό της ελιάς (*Olea Europaea*) και βρίσκεται σε υψηλή συγκέντρωση στους ακατέργαστους ανώριμους ελαιοκαρπούς, προσδίδοντας την έντονα πικρή τους γεύση στα φύλλα της ελιάς. Κατά την ωρίμανση των καρπών ή την επεξεργασία της ελιάς, λαμβάνουν χώρα χημικές και ενζυμικές αντιδράσεις, οι οποίες μειώνουν τη συγκέντρωση της

Ολευρωπαΐνης και αυξάνουν τη συγκέντρωση της υδροξυτυροσόλης, του παραγώγου που προκύπτει από την αποικοδόμηση της Ολευρωπαΐνης (Omar, 2010).

Οι πρώτοι που ανακάλυψαν την Ολευρωπαΐνη ως ξεχωριστή ουσία στο ελαιόλαδο ήταν οι Bourquelot και Vintilesco το 1908, ενώ το 1960 οι Panizzi, Scarpati και Oriente έδειξαν ότι το μόριο της Ολευρωπαΐνης αποτελείται από τρεις δομικές υπομονάδες: μια πολυφαινόλη, την υδροξυτυροσόλη (HT) ή β-3,4-διυδροξυφαινυλαιθανόλη, ένα σεκοϊριδοειδές, γνωστό ως ελενολικό οξύ και ένα μόριο γλυκόζης (Omar, 2010) (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Μοριακή δομή του μορίου της Ολευρωπαΐνης, που αποτελείται από την υδροξυτυροσόλη, το ελενολικό οξύ και γλυκόζη

Η βιοσύνθεση της Ολευρωπαΐνης στις Ολεάσες γίνεται μέσω του μονοπατιού του μεβαλονικού οξέως, από τον δεύτερο μεταβολισμό που καταλήγει στην δημιουργία των ολεοσιδών. Από τις ολεοσίδες προέρχονται τα σεκοϊριδοειδή (Damtoft et al., 1993). Η ανάπτυξη του ελαιοκαρπού μπορεί να διακριθεί σε τρεις φάσεις: στην πρώτη φάση ο καρπός αναπτύσσεται και υπάρχουν αυξημένα επίπεδα της Ολευρωπαΐνης. Σε δεύτερο στάδιο, κατά το οποίο ο καρπός ωριμάζει έχοντας ακόμη πράσινο χρώμα, μειώνονται τα επίπεδα της Ολευρωπαΐνης και της χλωροφύλλης και στο τελικό στάδιο ωρίμανσης, κατά το οποίο ο καρπός είναι πλέον ώριμος, με μαύρο χρώμα λόγω των ανθοκυανινών, η συγκέντρωση της Ολευρωπαΐνης

συνεχίζει να μειώνεται (Amiot et al., 1989). Ταυτόχρονα με την έναρξη της πτώσης των επιπέδων της Ολευρωπαΐνης, κατά την πράσινη φάση ωρίμανσης, αρχίζουν να εμφανίζονται γλυκοζυλιωμένα παράγωγα της Ολευρωπεΐνης, ο γλυκοζίτης του ελενολικού οξέος και η διμεθυλολευρωπαΐνη. Τα εν λόγω παράγωγα φτάνουν στο μέγιστο της συγκέντρωσης τους κατά την διάρκεια της μαύρης ωρίμανσης της ελιάς (Bianco et al. 1993). Ενώ ο καρπός της ελιάς περιέχει μόνο γλυκοζυλιωμένα παράγωγα της Ολευρωπαΐνης, τα φύλλα της περιέχουν 2-υδροξυτυροσόλη και μη γλυκοζυλιωμένα σεκοϊριδοειδή. (Amiot et al., 1990).

Η βιοδιαθεσιμότητα της Ολευρωπεΐνης, όπως και των υπόλοιπων φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου είναι υψηλή (Vissers et al 2002). Η απορρόφηση τους στον άνθρωπο φτάνει σε ποσοστό 55-60% (Vissers et al., 2002). Η μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα μετά από δια του στόματος χορήγηση εντοπίζεται στις 2 ώρες μετά την χορήγηση. Κύριος μεταβολίτης της Ολευρωπαΐνης είναι η υδροξυτυροσόλη (Boccio et al., 2003; Tan et al., 2003).

*In vitro* μελέτες δείχνουν ότι η Ολευρωπαΐνη απορροφάται από το έντερο σε αρουραίους και ότι έχει υψηλή σταθερότητα στο γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό υγρό (Corona et al., 2006; Edgecombe et al., 2002; Vissers et al., 2002). Ο μηχανισμός απορρόφησης της παραμένει ακόμη ασαφής, όμως είναι πιθανόν να περιλαμβάνει είτε ενδοκυττάρια μεταφορά, μέσω του συν-μεταφορέα SGLT1, είτε παρακυττάρια απορρόφηση ή ακόμη και παθητική διάχυση (Edgecombe et al., 2002; Manna et al., 2000). Η Ολευρωπαΐνη και η υδροξυτυροσόλη εντοπίζονται στο πλάσμα και τα ούρα (Bazoti et al., 2010; Del Boccio et al., 2003). Μετά την απορρόφηση της, η Ολευρωπαΐνη, καθώς και άλλα φαινολικά συστατικά της ελιάς, κατανέμεται σε όργανα, όπως στο συκώτι, στα νεφρά, στη σπλήνα και στον εγκέφαλο (Serra et al., 2012; Vissers et al., 2002). Τέλος, μια πρόσφατη μελέτη υποστηρίζει την συμμετοχή της Ολευρωπαΐνης στην φάση II του μεταβολισμού στους ανθρώπους (Garcia-Villalba et al., 2010).

## **5.2. Ιδιότητες της Ολευρωπαΐνης**

Η Ολευρωπαΐνη παρουσιάζει μια σειρά φαρμακολογικών ιδιοτήτων, όπως αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντιαθηρωματική και νευροπροστατευτική, οι

οποίες έχουν προταθεί ως αμυντικοί μηχανισμοί στην παθοφυσιολογία της νόσου AD (De la Puerta et al., 1999; Panza et al., 2004; Visioli et al., 2006; Visioli & Galli, 2001).

Συγκεκριμένα, η αντιοξειδωτική δράση της Ολευρωπαΐνης έχει μελετηθεί ευρέως. Έχει δειχθεί ότι αναστέλλει την οξειδωση λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας και απομακρύνει ελεύθερες ρίζες (Galli et al., 2002; Visioli et al., 2006). Σε κυτταρικό επίπεδο η Ολευρωπαΐνη αναστέλλει την παραγωγή ανιόντων υπεροξειδίου, τη συσσώρευση αιμοπεταλίων και την παραγωγή θρομβοξάνης και λευκοτριενίων B4 από τα βασεόφιλα (Galli et al., 2002; Visioli et al., 2006). Η Ολευρωπαΐνη επάγει, επίσης την απομάκρυνση του νιτρικού οξέως και αυξάνει την έκφραση της συνθετάσης του νιτρικού οξέως (De la Puerta et al., 2001). Σε *in vivo* μελέτες φαίνεται ότι μειώνει τα επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα, αυξάνει την ικανότητα των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας να προστατεύονται από την οξειδωση (Conni et al., 2000), μειώνει το μετα-ισχαιμικό οξειδωτικό στρες (Manna et al., 2004) και αποτρέπει την υπεροξείδωση των λιπιδίων της μεμβράνης (Manna et al., 2004, Visioli et al., 2000). Επίσης η Ολευρωπαΐνη σε χρόνια χορήγηση μπορεί να μειώσει τη συγκέντρωση τριγλυκεριδίων και χοληστερόλης στο αίμα και να μειώσει την έκταση του εμφράγματος του μυοκαρδίου (Andreadou et al., 2006).

Πέρα από τις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες, η Ολευρωπαΐνη αποτελεί προστατευτικό παράγοντα κατά της φλεγμονής (De la Puerta et al., 1999; Visioli et al., 1998). Η Ολευρωπαΐνη αυξάνει την παραγωγή του νιτρικού οξειδίου στα μακροφάγα, μέσω επίδρασης στη μορφή της συνθετάσης του νιτρικού οξειδίου που επάγει αύξηση της λειτουργικότητας των εν λόγω κυττάρων (Visioli et al., 1998). Εκτός αυτού, αναστέλλει τη δραστηριότητα του ενζύμου της λιποοξυγενάσης, επάγοντας και πάλι αντιφλεγμονώδη δράση (De la Puerta et al., 1999).

Οι αντι-αθηρωματικές επιδράσεις της Ολευρωπαΐνης, φαίνεται να προκύπτουν μέσω της μείωσης της δημιουργίας αλδεϋδών βραχείας αλύσου και υπεροξειδίων των λιπιδίων, μέσω της επαγωγής ψηλότερης συγκέντρωσης βιταμίνης E στα άκρα των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (που αποτελεί ένδειξη περίσσειας ενδογενών αντιοξειδωτικών) και μέσω προστασίας της στοιβάδας των

αποπρωτεϊνών (Visioli & Galli, 2001). Η Ολευρωπαΐνη μειώνει την προσκόλληση των μονοκυττωειδών μορίων στο ενδοθήλιο και την έκφραση του μορίου προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων (VCAM-1) που είναι γνωστό ότι παίζουν καθοριστικό ρόλο στο πρώιμο στάδιο της αθηρογένεσης. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η Ολευρωπαΐνη *in vivo* προστατεύει από αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων και μειώνει την εναπόθεση λίπους στον αορτικό χιτώνα, που προκύπτουν από δίαιτα αυξημένη σε λιπαρά (Wang et al., 2008).

Πέραν αυτών, έχει προταθεί ο προστατευτικός ρόλος της Ολευρωπαΐνης, απέναντι στην καρδιοτοξικότητα που προκαλεί η ανδριαμυκίνη (Doxorubicin). Αυτό επιτυγχάνεται μέσω αναστολής των προϊόντων της υπεροξειδωσής των λιπιδίων, της μείωσης του οξειδωτικού στρες και της μείωσης της συνθετάσης του νιτρικού οξειδίου στα καρδιομυοκύτταρα (Andreadou et al., 2007).

Οι παραπάνω ιδιότητες της Ολευρωπαΐνης αποτελούν τους κύριους μηχανισμούς μέσω των οποίων παρέχει, όπως προτείνουν τα πειραματικά ευρήματα, την καρδιοπροστατευτική της δράση. Πέραν αυτών, υπάρχουν ενδείξεις που φανερώνουν τις νευροπροστατευτικές επιδράσεις της Ολευρωπαΐνης, που βασίζονται κυρίως στη μείωση του οξειδωτικού στρες. Επιδημιολογικές (German & Walzem, 2000), αλλά και *in vitro* μελέτες (Moosmann & Behl, 1999) παρουσιάζουν τη θετική επίδραση των πολυφαινολών φυσικής προέλευσης στη συχνότητα εμφάνισης άνοιας και άλλων διαταραχών του γήρατος. Η Ολευρωπαΐνη συγκεκριμένα, είναι ικανή να μειώσει τη παθολογική συσσώρευση του Αβ πεπτιδίου (Panza et al., 2004) πιθανόν μέσω της αλληλεπίδρασης της με αυτό, με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να το συγκρατεί στη μη νευροτοξική μορφή του (Bazoti et al., 2006). Επίσης, αυξάνει το εκκρινόμενο νευροπροστατευτικό θραύσμα του μορίου του Αβ, μέσω αύξησης της έκφρασης της α-σεκρετάσης και ταυτόχρονη μείωση της β-σεκρετάσης, ενώ οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων των ενδογενών αναστολέων των μεταλλοπρωτεασών MMP-9, που είναι ένζυμα με δράση α-σεκρετάσης (Kostomoiri et al., 2013).

## 6. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση της φαρμακολογικής επίδρασης της ουσίας Ολευρωπαΐνης σε αρσενικούς και θηλυκούς 3xTg και WT μύες, που εμφανίζουν τους κύριους φαινότυπους της νόσου AD. Το μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε κρίθηκε κατάλληλο για τη συγκεκριμένη μελέτη, εφόσον αναπαράγει σε πολύ μεγάλο βαθμό, τόσο τα νευροπαθολογικά, όσο και τα συμπεριφορικά χαρακτηριστικά της νόσου AD. Η χρησιμότητα του συγκεκριμένου διαγονιδιακού μοντέλου έγκειται επίσης στο γεγονός ότι η αναπαραγωγή και εγκαθίδρυση αποικίας είναι οικονομική και οι απόγονοι είναι ομόζυγοι στις μεταλλάξεις. Σειρά ερευνητικών ευρημάτων υποστηρίζουν τον προστατευτικό ρόλο της Ολευρωπαΐνης σε παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι η αθηροσκλήρωση, η φλεγμονή, η οξειδωση και η συσσώρευση Αβ πεπτιδίου (Bazoti et al., 2006; Omar, 2010; Panza et al., 2004). Παρόλα αυτά η δράση της στα συμπεριφορικά χαρακτηριστικά της νόσου AD δεν έχει μελετηθεί σε προηγούμενες μελέτες *in vivo*, γι' αυτό και η παρούσα μελέτη στόχευε στην αξιολόγηση των επιδράσεων της σε ζωντανούς οργανισμούς που αναπαράγουν τους φαινότυπους της νόσου. Πέρα από την πιθανή δράση της Ολευρωπαΐνης, στην παρούσα εργασία αξιολογήθηκαν οι διαφυλικές διαφορές, καθώς και η επίδραση του γονότυπου στη συμπεριφορά των μυών. Όσον αφορά στις διαφυλικές διαφορές, η παρούσα μελέτη επιδίωξε τη συμπλήρωση της γνώσης που έχει προκύψει από τα αποτελέσματα προηγούμενων ερευνών σε αρσενικούς και θηλυκούς 3xTg μύες (Carroll et al., 2010; Clinton et al., 2007; Hirata-Fukae et al., et al., 2008).

## B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 1. ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 34 ενήλικοι αρσενικοί (N=16) και θηλυκοί (N=18) διαγονιδιακοί μύες B6;129-*Psen1*<sup>tm1Mpm</sup>Tg(APP<sup>Swe</sup>,tauP301L)1Lfa/Mmjax τριπλής μετάλλαξης καθώς και 36 ενήλικοι αρσενικοί (N=18) και θηλυκοί (N=18) μύες C57BL/6 χωρίς μετάλλαξη ως ομάδα ελέγχου, προερχόμενοι από το εργαστήριο Jackson των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής. Τα ζώα στεγάστηκαν και αναπαρήχθησαν στην πτέρυγα Πειραματικής Χειρουργικής της Ιατρικής σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και 15 μέρες πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας μεταφέρθηκαν στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας για εγκλιματισμό. Τα πειραματόζωα ήταν ηλικίας 10- 12 μηνών, με βάρος 30±5g κατά την έναρξη των πειραμάτων και διέμεναν σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας 22±2°C και εναλλασσόμενου κύκλου φωτός/σκότους ανά 12ωρο, με έναρξη της φωτεινής φάσης στις 07:00π.μ. Οι μύες στεγάζονταν σε κλωβούς τύπου Plexiglas και είχαν συνεχή και ελεύθερη πρόσβαση σε τυποποιημένη τροφή υπό μορφή κυλίνδρων και σε πόσιμο νερό μέσω υδροδοχείων.

Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν στους κλωβούς, σχηματίζοντας 8 ομάδες αναλόγως του γονότυπου, του φύλου και της φαρμακολογικής παρέμβασης (Πίνακας 2). Ως εκ τούτου οι έξι ομάδες είχαν ως εξής: Αρσενικοί WT μύες που λάμβαναν έκδοχο (N=9), αρσενικοί WT μύες που λάμβαναν Ολευρωπαΐνη (N=9), θηλυκοί WT μύες που λάμβαναν έκδοχο (N=9), θηλυκοί WT μύες που λάμβαναν Ολευρωπαΐνη (N=9), αρσενικοί 3xTg μύες που λάμβαναν έκδοχο (N=9), αρσενικοί 3xTg μύες που λάμβαναν Ολευρωπαΐνη (N=7), θηλυκοί 3xTg μύες που λάμβαναν έκδοχο (N=9) και θηλυκοί 3xTg μύες που λάμβαναν Ολευρωπαΐνη (N=9).

Ο χειρισμός των ζώων σε όλα τα πειράματα έγινε σύμφωνα με τον κώδικα δεοντολογίας του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας των ΗΠΑ και τις Ευρωπαϊκές οδηγίες για την φροντίδα και την χρησιμοποίηση των πειραματόζωων (EEC Council 86/609, 27/01/1992, No 116). Καταβλήθηκαν προσπάθειες με στόχο να μειωθεί, στο μέτρο του δυνατού, αφενός ο αριθμός των πειραματόζωων που θυσιάστηκαν και αφετέρου το σωματικό άλγος που υπέστησαν.

ΟΜΑΔΑ	ΧΟΡΗΓΗΣΗ	ΑΡΣΕΝΙΚΟΙ WT ΜΥΕΣ	ΘΗΛΥΚΟΙ WT ΜΥΕΣ	ΑΡΣΕΝΙΚΟΙ 3xTg ΜΥΕΣ	ΘΗΛΥΚΟΙ 3xTg ΜΥΕΣ
OLE	21 μέρες i.p	9	9	7	9
ΕΚΔΟΧΟ 10% ΕΤΟΗ ΣΕ ΝΕΡΟ	21 μέρες i.p.	9	9	9	9

**Πίνακας 2: Κατανομή μυών στις πειραματικές ομάδες**

## 2. ΑΓΩΓΗ

Πριν την έναρξη των συμπεριφορικών δοκιμασιών χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά στα πειραματόζωα, για χρονικό διάστημα 21 ημερών Ολευρωπαΐνη, σε δόση 100mg/Kg ή έκδοχο (10% ΕΤΟΗ σε νερό κατάλληλο για ενέσεις). Η επιλογή της δόσης βασίστηκε σε προηγούμενες μελέτες (Andreadou et al., 2007; Impellizzeri et al., 2012). Η απομόνωση της ουσίας έγινε στο εργαστήριο Φαρμακογνωσίας, της Φαρμακευτικής σχολής του ΕΚΠΑ, από την ομάδα εργασίας του Καθηγητή Λ. Σκαλτσούνη. Με το πέρας της χρόνιας χορήγησης του φαρμάκου, όλες οι ομάδες υποβλήθηκαν σε μια σειρά δοκιμασιών με στόχο την αξιολόγηση πολλαπλών παραμέτρων της συμπεριφοράς. Προς διευκόλυνση των πειραμάτων τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε 2 ομάδες, οι οποίες περιλάμβαναν ίσο αριθμό ζώων από όλες τις ομάδες. Και οι δύο ομάδες υποβλήθηκαν στις ίδιες συμπεριφορικές δοκιμασίες για 5 συνεχόμενες μέρες με την ίδια σειρά με μόνη διαφορά το ότι η έναρξη των δοκιμασιών στη δεύτερη ομάδα έγινε 3 μέρες μετά την έναρξη των δοκιμασιών στην πρώτη ομάδα. Η σειρά, όπως διαφαίνεται σχηματικά στο Διάγραμμα 1, έχει ως εξής: Την πρώτη μέρα υποβλήθηκαν στη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου, τη δεύτερη μέρα στη δοκιμασία φωτεινού/ σκοτεινού κλωβού, την τρίτη μέρα στη δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου, την τέταρτη μέρα στη δοκιμασία υπερυψωμένου λαβυρίνθου τύπου Υ και την πέμπτη μέρα στη δοκιμασία αιώρησης από την ουρά. Αμέσως μετά το πέρας της πειραματικής διαδικασίας τα ζώα θυσιάστηκαν με αποκεφαλισμό σε ξεχωριστό δωμάτιο και απομονώθηκαν οι εγκέφαλοι, οι οποίοι φυλάχθηκαν σε σωληνάρια στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .





Διάγραμμα 1: Ακολουθία συμπεριφορικών δοκιμασιών

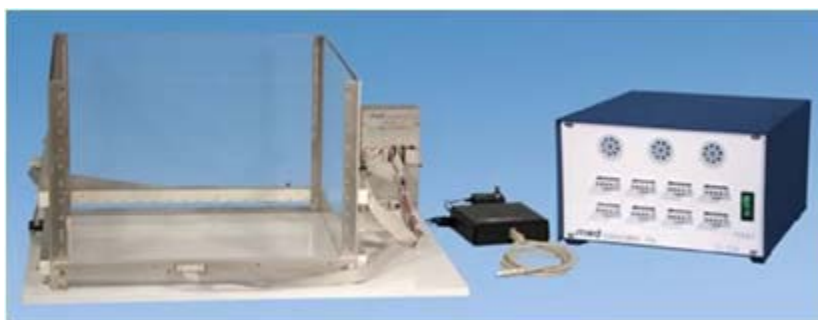
### 3. ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ

#### 3.1. Δοκιμασία Ανοιχτού Πεδίου

Όπως σε όλες τις συμπεριφορικές δοκιμασίες στις οποίες υποβλήθηκαν τα πειραματόζωα στον παρόντα πειραματικό σχεδιασμό, έτσι και στη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου, πριν από την έναρξη της συνεδρίας τα πειραματόζωα μεταφέρονταν στο χώρο διεξαγωγής των πειραμάτων τουλάχιστον μια ώρα πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας, με στόχο την εξοικείωση με το χώρο και την αποφυγή επαγωγής έντονου στρες που σχετίζεται με το νέο περιβάλλον. Παρόλα αυτά η εν λόγω δοκιμασία επάγει στους μύες ένα ήπιο στρες (novelty stress) που οφείλεται στο άγνωστο περιβάλλον. Η δραστηριότητα των μυών στους κλωβούς ανοιχτού πεδίου, με στόχο την εκτίμηση της επίδρασης της Ολευρωπαΐνης, καθώς και του φύλου και του γονοτύπου, μετρήθηκε για 10 λεπτά, όπως στο παρελθόν με κάποιες παραλλαγές (Antonίου et al., 2008; Dalla et al., 2005).

Κάθε πειραματόζωο τοποθετούνταν ξεχωριστά σε ένα καθαρό θάλαμο Plexiglas (Med Associates Inc., St Albans, VT) διαστάσεων 430 x 430 x 300 mm. Η οριζόντια καθώς και η κάθετη κινητικότητα των πειραματόζωων ανιχνεύονταν από ένα αισθητηριακό πλέγμα υπέρυθρων ακτινών, αποτελούμενο από δυο συστοιχίες 16 φωτοανιχνευτών που είχαν τοποθετηθεί 2.5 cm και 5cm πάνω από το δάπεδο του θαλάμου αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, η οριζόντια κίνηση (περιπατητική δραστηριότητα) του μυός ανιχνευόταν με διακοπή των παρακείμενων φωτεινών ακτινών της κατώτερης συστοιχίας των φωτοκυττάρων, ενώ η κάθετη κινητικότητα

(ανασηκώσεις με τα δύο μπροστινά άκρα είτε στο τοίχωμα του κλωβού, είτε χωρίς να ακουμπούν στον κλωβό) ανιχνευόταν μέσω της διακοπής της ανώτερης σειράς των φωτεινών ακτινών. Η πειραματική διάταξη ήταν συνδεδεμένη με Η/Υ και η ανάλυση της κινητικότητας επιτεύχθηκε αυτόματα μέσω ειδικού λογισμικού (Activity monitor version 5, Med Associates), που επιτρέπει τον υπολογισμό συγκεκριμένων δεικτών όπως τη συχνότητα εμφάνισης και διάρκειας κάθετης και οριζόντιας κινητικότητας, τη διάρκεια ακινησίας, τη διάρκεια στερεοτυπικής συμπεριφοράς, τη διάρκεια παραμονής στο κέντρο ή στην περιφέρεια του θαλάμου (δείκτης άγχους) κ.α. (Antonίου et al., 2004). Πριν την τοποθέτηση κάθε πειραματόζωου στον κλωβό αυτός καθαριζόταν με διάλυμα αιθανόλης 70%. Η δοκιμασία έλαβε χώρα σε συνθήκες ήπιου φωτισμού για αποφυγή επαγωγής στρες που εμφανίζεται στα τρωκτικά σε συνθήκες έντονου φωτισμού.



**Εικόνα 7:** Συσκευή ανοιχτού πεδίου που χρησιμοποιήθηκε για την δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (Activity monitor version 5, Med Associates)

### **3.2. Δοκιμασία φωτεινού/σκοτεινού κλωβού**

Ένα εικοσιτετράωρο μετά την ολοκλήρωση της δοκιμασίας του ανοιχτού πεδίου, αξιολογήθηκε η συμπεριφορική απόκριση των πειραματόζωων στη δοκιμασία φωτεινού/σκοτεινού κλωβού. Όπως έχει προαναφερθεί, με την εν λόγω δοκιμασία αξιολογείται η αγχώδης απόκριση του μύος ανάλογα με την φαρμακολογική παρέμβαση (Ολευρωπαΐνη ή έκδοχο), το φύλο και τον γονότυπο (3xTg ή WT)

Αφού τα πειραματόζωα μεταφέρθηκαν στο δωμάτιο Συμπεριφοράς, έλαβαν ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του φαρμάκου ή εκδόχου και η πειραματική διαδικασία ξεκίνησε μια ώρα μετά. Ο θάλαμος από Plexiglas (Med Associates Inc.) είχε διαστάσεις 430 x 430 x 300 και αποτελούνταν από δύο, ίσου εμβαδού

διαμερίσματα, ένα διαφανές στο οποίο εισερχόταν έντονος φωτισμός και ένα αδιαφανές το οποίο ήταν σκοτεινό. Τα δύο διαμερίσματα ήταν χωρισμένα με ένα διαχωριστικό τείχος από πλεξιγκλάς, το οποίο στην βάση του είχε ένα κενό διαστάσεων 105 mm x 85 mm μέσω του οποίου τα πειραματόζωα μπορούσαν να μεταβούν από το ένα διαμέρισμα στο άλλο. Τα πειραματόζωα τοποθετούνταν σε όλες τις συνεδρίες στο φωτεινό διαμέρισμα με το κεφάλι στραμμένο προς το εξωτερικό περιβάλλον, ώστε να απουσιάζει από το οπτικό τους πεδίο το άνοιγμα προς το σκοτεινό διαμέρισμα. Για 10 λεπτά επιτράπηκε στο κάθε πειραματόζωο να εξερευνήσει ελεύθερα όλο το χώρο του κλωβού και οι συνεδρίες μαγνητοσκοπήθηκαν με σκοπό να καταγραφούν και να αξιολογηθούν ο συνολικός αριθμός μεταβάσεων από το ένα διαμέρισμα στο άλλο, ο λανθάνων χρόνος διαφυγής από το φωτεινό διαμέρισμα και συνολικός χρόνος παραμονής στο φωτεινό διαμέρισμα, όπως στο παρελθόν (Kokras et al., 2012). Ως μετάβαση από το ένα διαμέρισμα στο άλλο θεωρούνταν μόνο οι περιπτώσεις κατά τις οποίες το πειραματόζωο περνούσε και τα τέσσερα πόδια στην άλλη πλευρά. Μετά το πέρας κάθε συνεδρίας ο κλωβός καθαριζόταν με διάλυμα αιθανόλης 70%.

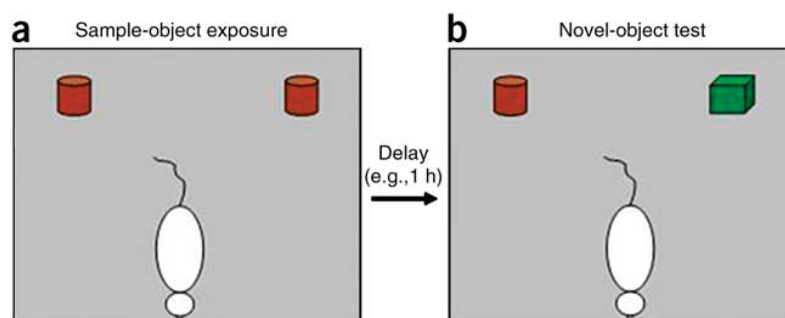


Εικόνα 8: Κλωβός που χρησιμοποιείται για τη δοκιμασία φωτεινού/σκοτεινού θαλάμου (MedAssociates).

### **3.3. Δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου**

24 ώρες μετά την δοκιμασία φωτός/σκότους έλαβε χώρα η δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου, με σκοπό την αξιολόγηση της επίδρασης της φαρμακολογικής παρέμβασης, του γονότυπου και του φύλου στη βραχύχρονη μνήμη αναγνώρισης των πειραματόζωων.

Τα πειραματόζωα εξοικειώθηκαν για 1 ώρα στο δωμάτιο συμπεριφοράς, μετά από τη χορήγηση Ολευρωπαΐνης ή εκδόχου. Η πειραματική διαδικασία έλαβε χώρα σε κλωβούς Plexiglas (Med Associates Inc., StAlbans, VT) διαστάσεων 430 x 430 x 300 mm στους οποίους είχε τοποθετηθεί ως υπόστρωμα μια ποσότητα από το ροκανίδι του εκάστοτε κλωβού από το οποίο προήλθε το κάθε πειραματόζωο έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί το στρες που προκύπτει από το νέο άγνωστο περιβάλλον (νεοφοβία). Όλες οι συνεδρίες έγιναν υπό συνθήκες χαμηλού φωτισμού. Η εν λόγω δοκιμασία έλαβε χώρα σε δύο συνεδρίες. Στην πρώτη συνεδρία το πειραματόζωο τοποθετήθηκε στον κλωβό και αφέθηκε ελεύθερο για 10 λεπτά να εξερευνήσει δύο πανομοιότυπα αντικείμενα τα οποία ήταν τοποθετημένα σε ίση απόσταση από τις δύο πίσω γωνίες του κλωβού. Κατόπιν, το ζώο επέστρεψε στον κλωβό στον οποίο διέμενε και μετά από 1 ώρα και 30 λεπτά έλαβε χώρα η δεύτερη 10λεπτη συνεδρία κατά την οποία το πειραματόζωο εξερεύνησε για 10 λεπτά στον ίδιο κλωβό τα αντικείμενα. Αυτή τη φορά τα αντικείμενα δεν ήταν πανομοιότυπα, εφόσον το ένα έχει αντικατασταθεί από ένα νέο αντικείμενο, με το οποίο το ζώο ερχόταν για πρώτη φορά σε επαφή. Ο χρόνος που αφιέρωσε το ζώο εξερευνώντας το καθένα από τα αντικείμενα καταγράφηκε. Ως εξερεύνηση θεωρήθηκε το να οσμίζεται το αντικείμενο, το να ανασηκώνεται πάνω στο αντικείμενο, καθώς και το να είναι στραμμένο προς το αντικείμενο παρατηρώντας το. Αφού καταγράφηκε ο χρόνος εξερεύνησης του νέου αντικειμένου ( $T_n$ ) και του παλιού αντικειμένου ( $T_f$ ) υπολογίστηκε ο Δείκτης Αναγνώρισης (Recognition Index) ως ακολούθως:  $T_n * 100 / (T_n + T_f)$  (Bevins & Besheer, 2006). Σημειώνεται ότι μετά το πέρας της κάθε συνεδρίας αφαιρούνταν το ροκανίδι και ο κλωβός, όπως και τα αντικείμενα καθαρίζονταν σχολαστικά με αιθανόλη 70% έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθούν επιδράσεις της όσφρησης.



Εικόνα 8: απεικόνιση δοκιμασίας αναγνώρισης νέου αντικειμένου (Nature Protocol, 2006). Α: πρώτη συνεδρία έκθεσης σε δύο πανομοιότυπα αντικείμενα, Β: δεύτερη συνεδρία έκθεσης σε δύο διαφορετικά αντικείμενα.

#### 3.4. Δοκιμασία λαβύρινθου τύπου Y

Ένα 24ωρο μετά την ολοκλήρωση της δοκιμασίας αναγνώρισης νέου αντικειμένου τα πειραματόζωα υποβλήθησαν στη δοκιμασία λαβυρίνθου τύπου Y με στόχο να διερευνηθεί η επίδραση του φαρμάκου, του φύλου και του γονοτύπου στην συμπεριφορική απόκριση των ζώων σε συνθήκες νέου περιβάλλοντος προς εξερεύνηση. Όπως έχει προαναφερθεί η δοκιμασία αυτή βασίζεται στην τάση που επιδεικνύουν τα τρωκτικά να εξερευνούν το νέο περιβάλλον, αφιερώνοντας περισσότερο χρόνο σε αυτό σε σχέση με τα ήδη γνωστά.

Τα πειραματόζωα εξοικειώθηκαν με τον περιβάλλοντα χώρο στο δωμάτιο συμπεριφοράς, για τουλάχιστον μια ώρα πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας και αφού έγινε η χορήγηση φαρμάκου ή εκδόχου. Για τη δοκιμασία χρησιμοποιήθηκε ένας λαβύρινθος σχήματος Y (με τρεις ίσων διαστάσεων διαδρόμους), από πλεξιγκλάς, αδιαφανής, χρώματος μαύρου. Ο κάθε διάδρομος απείχε ίση απόσταση από τους άλλους δύο, σχηματίζοντας γωνία 120°. Η δοκιμασία χωρίστηκε σε δύο συνεδρίες. Κατά την πρώτη συνεδρία οι μύες μπορούσαν να εξερευνήσουν μόνο τους δύο από τους τρεις διαδρόμους για 10 λεπτά, με τη χρήση ενός διαχωριστικού τοιχώματος που εμπόδιζε την είσοδο στον τρίτο διάδρομο και καταγράφονταν από τον ερευνητή ο αριθμός των μεταβάσεων από τον ένα διάδρομο στον άλλο και ο χρόνος παραμονής στον καθένα. Μετά το τέλος της πρώτης συνεδρίας το ζώο επέστρεφε στον κλωβό του και ο λαβύρινθος καθαριζόταν με διάλυμα αιθανόλης 70%. Στη δεύτερη 10λεπτη συνεδρία, η οποία με βάση το συγκεκριμένο πειραματικό σχεδιασμό έγινε 1 ώρα και 30 λεπτά μετά την ολοκλήρωση της πρώτης συνεδρίας, οι μύες αφήνονταν ελεύθεροι να εξερευνήσουν και τους τρεις διαδρόμους, αφού αφαιρούνταν το διαχωριστικό τοίχωμα που εμπόδιζε την είσοδο στον τρίτο διάδρομο και καταγράφηκαν οι μεταβάσεις από τον ένα διάδρομο στον άλλο, καθώς και ο χρόνος παραμονής τους στον καθένα. Σημειώνεται ότι τα πειραματόζωα τοποθετούνταν πάντα στον ίδιο διάδρομο κατά την έναρξη των δοκιμασιών, με το κεφάλι στραμμένο προς το τοίχωμα του διαδρόμου. Το ζώο θεωρείται ότι μεταβαίνει από τον ένα διάδρομο στον άλλο μόνο εφόσον έχουν περάσει και τα τέσσερα πόδια στον άλλο διάδρομο (Hughes, 2004).



Εικόνα 9: Συσκευή δοκιμασίας Λαβυρίνθου σχήματος Y

### 3.5. Δοκιμασία αιώρησης από την ουρά

Η τελευταία χρονικά πειραματική διαδικασία που έλαβε χώρα ήταν η δοκιμασία αιώρησης από την ουρά (Tail Suspension Test). Η συγκεκριμένη δοκιμασία άρχισε ένα 24ωρο μετά την ολοκλήρωση της δοκιμασίας λαβυρίνθου τύπου Y και μια ώρα μετά τη μεταφορά των πειραματόζων στο δωμάτιο συμπεριφοράς για εγκλιματισμό. Όπως και με τις προηγούμενες δοκιμασίες, είχε προηγηθεί η χορήγηση φαρμάκου ή εκδόχου.

Η παρούσα δοκιμασία χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση αντικαταθλιπτικής δράσης χορηγούμενων φαρμάκων και βασίζεται στην εγγενή τάση των ζώων να καταβάλλουν προσπάθεια αποφυγής ενός στρεσογόνου και αποστροφικού ερεθίσματος. Αν η διαφυγή είναι αδύνατη παρουσιάζεται η συμπεριφορά απόγνωσης (τερματισμός ενεργητικής προσπάθειας διαφυγής) (Steru et al., 1985).

Τα κάθε πειραματόζωο αφέθηκε για 6 λεπτά να αιωρηθεί από την ουρά, από την επιφάνεια του πάγκου στο δωμάτιο συμπεριφοράς ύψους 100 cm, με τη χρήση κολλητικής ταινίας. Η ταινία εφαρμόστηκε στα  $\frac{3}{4}$  της απόστασης από τη βάση της ουράς του κάθε πειραματόζωου. Κάθε ζώο είχε ουδέτερο οπτικό πεδίο και διαχωριστικά τοιχώματα λευκού χρώματος στην δεξιά και αριστερή πλευρά σε απόσταση 30 cm. Οι συνεδρίες οπτικογραφήθηκαν έτσι ώστε να καταγραφεί ο χρόνος κατά τον οποίο το ζώο κινούνταν (κίνηση των τεσσάρων ή των δύο ποδιών, της κεφαλής και του κορμού), καθώς και ο χρόνος κατά τον οποίο το πειραματόζωο

επιδείκνυε συμπεριφορά ακινησίας (“freezing”), δηλαδή παρέμενε εντελώς ακίνητος ο κορμός, το κεφάλι και τα άκρα (απουσία εκούσιας κίνησης).



**Εικόνα 10: Δοκιμασία αιώρησης από την ουρά (Tail suspension test)**

#### **4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**

Για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων διενεργήθηκαν στατιστικοί έλεγχοι με τη χρήση του λογισμικού SPSS. Στις περιπτώσεις όπου πληρούνταν οι προϋποθέσεις, διενεργήθηκε Ανάλυση Διακύμανσης τριπλής κατεύθυνσης (Three-way ANOVA), ενώ τα δεδομένα που δεν πληρούσαν τις προϋποθέσεις για τη χρήση ANOVA, αναλύθηκαν με τη χρήση μη παραμετρικών τεστ Kruskal Wallis και Mann Whitney. Συγκεκριμένα, σε αρκετές περιπτώσεις, η μόνη προϋπόθεση που δεν πληρούνταν για την χρήση ANOVA ήταν η ομοιογένεια των διακυμάνσεων μεταξύ των πειραματικών ομάδων, η οποία ελέγχθηκε με το τεστ Levene. Στην περίπτωση που το τεστ Levene ήταν στατιστικά σημαντικό ( $p \leq 0.05$ ) έγινε χρήση μη παραμετρικών τεστ. Ως ανεξάρτητοι παράγοντες θεωρήθηκαν η φαρμακολογική παρέμβαση (Ολευρωπαΐνη ή έκδοχο), ο γονότυπος (WT ή 3xTg) και το φύλο (αρσενικά ή θηλυκά). Επίπεδο σημαντικότητας για κάθε ανάλυση κρίθηκε η τιμή  $p \leq 0.05$ . Οι τιμές που παρουσιάζονται στα γραφήματα απεικονίζουν τις μέσες τιμές  $\pm$  SEM.

## Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

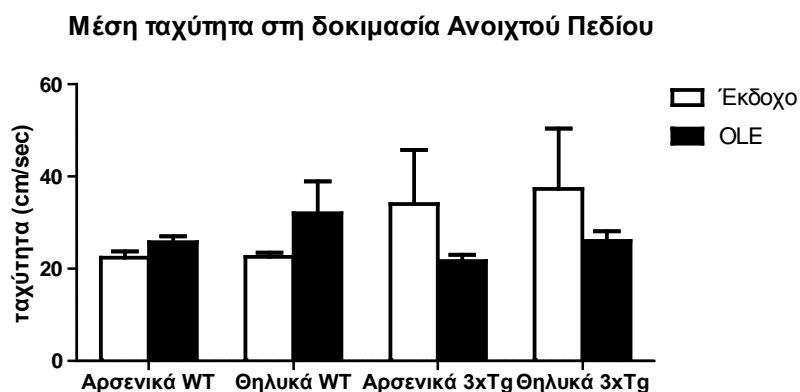
Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η επίδραση της ουσίας Ολευρωπαΐνης σε θηλυκούς και αρσενικούς WT ή 3xTg μύες, σε συμπεριφορικές παραμέτρους που σχετίζονται με τη μνήμη, τα επίπεδα στρες και «καταθλιπτικόμορφης» συμπεριφοράς. Μελετήθηκε επίσης, η επίδραση του φύλου και του γονότυπου στη συμπεριφορά των πειραματοζώων. Παρατίθενται τα αποτελέσματα των συμπεριφορικών δοκιμασιών 1. του Ανοιχτού Πεδίου, 2. Φωτός/σκότους, 3. Λαβυρίνθου σχήματος Υ, 4. αναγνώρισης νέου αντικειμένου και 5. Αιώρησης από την ουρά.

### 1. ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΟΙΧΤΟΥ ΠΕΔΙΟΥ

Η δοκιμασία Ανοιχτού πεδίου διενεργήθηκε με σκοπό την εκτίμηση της κινητικότητας των πειραματοζώων, τόσο της οριζόντιας, όσο και της κάθετης, καθώς και για τον προσδιορισμό των επιπέδων άγχους των μυών, όπως αυτή διαφαίνεται από το χρόνο παραμονής στο κέντρο και την περιφέρεια του κλωβού.

#### 1.1 Μέση ταχύτητα

Στη δοκιμασία Ανοιχτού πεδίου αξιολογήθηκαν πιθανές διαφορές μεταξύ των ομάδων στη μέση ταχύτητα των πειραματοζώων κατά την παραμονή τους στον πειραματικό κλωβό. Δεν διαφαίνονται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των πειραματικών ομάδων στην εν λόγω συμπεριφορική παράμετρο ( $\chi^2 (7, N= 69) = 8.467, p = .293$ ) (Γράφημα 1).

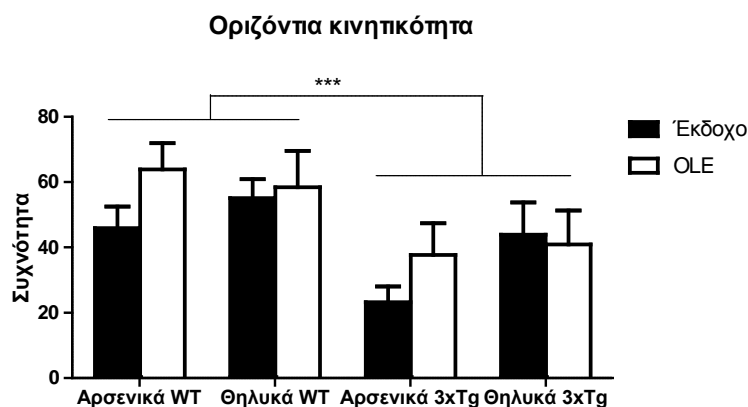


Γράφημα 1: Απεικόνιση των μέσων τιμών της μέσης ταχύτητας των πειραματοζώων στη δοκιμασία Ανοιχτού πεδίου. Δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των πειραματικών ομάδων



## 1.2. Οριζόντια κινητικότητα

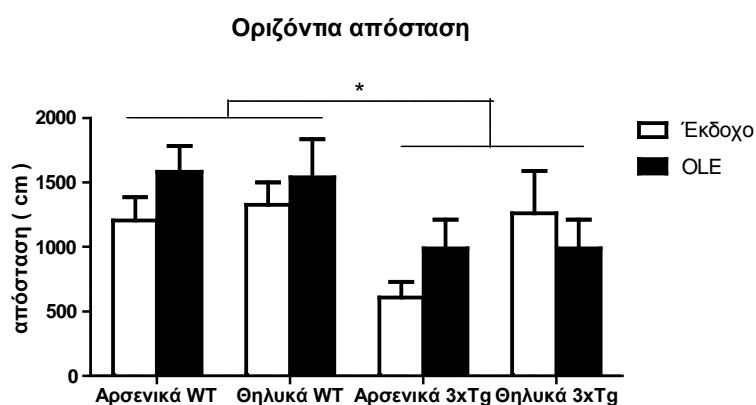
Όσον αφορά στην οριζόντια κινητικότητα των μυών η στατιστική ανάλυση έδειξε στατιστικά σημαντική επίδραση του γονότυπου ( $F(1, 66) = 7,74, p = 0.007$ ), χωρίς η Ολευρωπαΐνη ή το φύλο να διαφοροποιεί την επίδοση. Φαίνεται ότι οι 3xTg μύες εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα οριζόντιας κινητικότητας σε σχέση με τους WT μύες, ανεξαρτήτως της φαρμακολογικής παρέμβασης και του φύλου (Γράφημα 2).



Γράφημα 2: Επίδραση της Ολευρωπαΐνης στην αυθόρμητη οριζόντια κινητικότητα των αρσενικών και θηλυκών WT και 3xTg μυών. Ο αστερίσκος (\*) υποδηλώνει την κύρια επίδραση του γονότυπου με επίπεδο σημαντικότητας  $p < 0.05$ .

## 1.3. Οριζόντια απόσταση

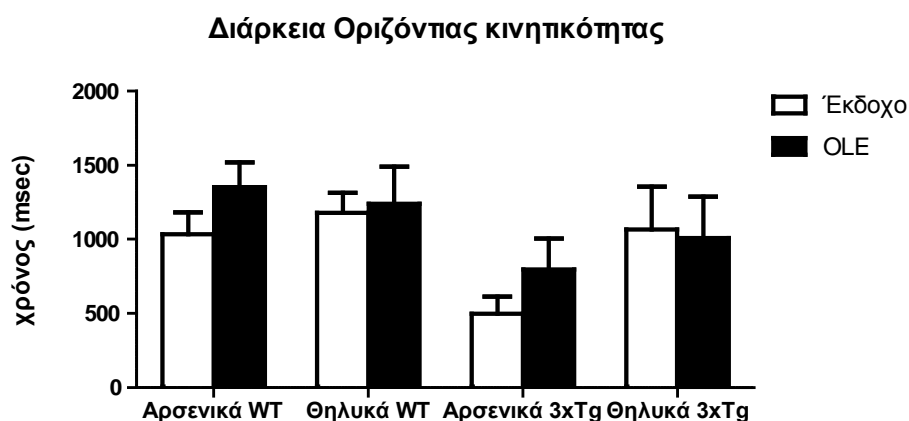
Διαφαίνεται επίσης, στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των WT και 3xTg μυών στην απόσταση που έχουν διανύσει μέσα στον κλωβό, όπως έχει δείξει η ανάλυση ANOVA ( $F(1, 66) = 4.497, p = 0.039$ ). Οι WT μύες διένυσαν μεγαλύτερη απόσταση κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας σε σχέση με τους 3xTg μύες (Γράφημα 3).



Γράφημα 3: Επίδραση του γονότυπου στην οριζόντια απόσταση που έχουν διανύσει η μύες στον κλωβό ανοιχτού πεδίου. Διαφαίνεται αυξημένη επίδοση των WT μυών σε σχέση με τους 3xTg μύες. Ο αστερίσκος (\*) υποδηλώνει την επίδραση του γονότυπου με επίπεδο σημαντικότητας  $p < 0.05$ . Η Ολευρωπαΐνη και το φύλο δεν φαίνεται να επηρεάζουν την κινητικότητα των μυών.

#### 1.4. Διάρκεια οριζόντιας κινητικότητας

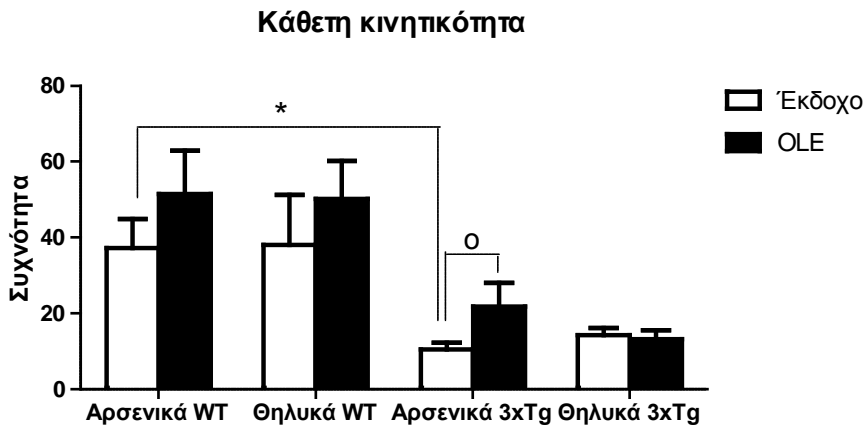
Στην δοκιμασία Ανοιχτού πεδίου αξιολογήθηκε επίσης ο χρόνος κατά τον οποίο τα πειραματόζωα επιδείκνυαν οριζόντια κίνηση. Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων δεν είναι στατιστικά σημαντικές ( $F(7, 66) = 1.072, p = 0.393$ ) (Γράφημα 4).



Γράφημα 4: Απεικόνιση των μέσων τιμών της διάρκειας της οριζόντιας κινητικότητας των πειραματόζωων στη δοκιμασία Ανοιχτού πεδίου. Δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των πειραματικών ομάδων.

#### 1.5. Κάθετη κινητικότητα

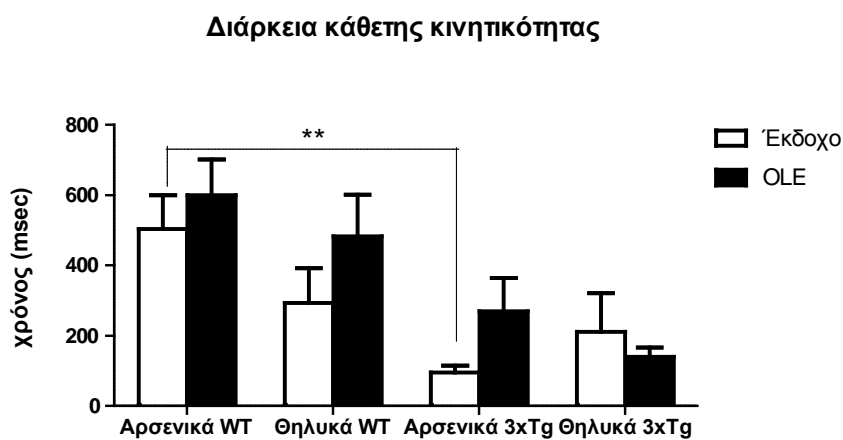
Στην κάθετη κινητικότητα (παράμετρος που υποδηλώνει εξερευνητική συμπεριφορά) έχουν διενεργηθεί μη παραμετρικά τεστ για την εύρεση των διαφορών μεταξύ των ομάδων. Η ανάλυση Kruskal Wallis έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων στην παράμετρο της κάθετης κινητικότητας ( $\chi^2(7, N=70) = 22.114, p = .002$ ). Η ανάλυση Mann Whitney έδειξε την επίδραση του γονότυπου σε αρσενικούς μύες που λάμβαναν έκδοχο ( $U = 13.0, p = .014$ ). Συγκεκριμένα, οι αρσενικοί WT μύες που λάμβαναν έκδοχο είχαν αυξημένη κάθετη κινητικότητα σε σχέση με τους 3xTg μύες που λάμβαναν έκδοχο. Ακολούθως η ανάλυση Mann Whitney επέδειξε στατιστικά σημαντική επίδραση της φαρμακολογικής παρέμβασης στους αρσενικούς 3xTg μύες ( $U = 10.0, p = .023$ ), με τους μύες που λάμβαναν Ολευρωπαΐνη να έχουν αυξημένη κάθετη κινητικότητα σε σχέση με τους μύες που λάμβαναν έκδοχο (Γράφημα 5).



Γράφημα 5: Επίδραση του γονότυπου και της φαρμακολογικής παρέμβασης στην αυθόρμητη κάθετη κινητικότητα των μυών στον κλωβό του Ανοιχτού πεδίου. Οι αρσενικοί WT μύες που λάμβαναν έκδοχο παρουσιάζουν αυξημένη κάθετη κινητικότητα σε σχέση τους αρσενικούς 3xTg μύες που λάμβαναν έκδοχο με επίπεδο σημαντικότητας  $p < 0.05$  (\*). Επίσης οι αρσενικοί 3xTg μύες που λάμβαναν Ολευρωπαΐνη εμφάνισαν αυξημένη κάθετη κινητικότητα σε σχέση με τους αρσενικούς 3xTg μύες που λάμβαναν έκδοχο, με επίπεδο σημαντικότητας  $p < 0.05$  (o).

#### 1.6. Διάρκεια κάθετης κινητικότητας

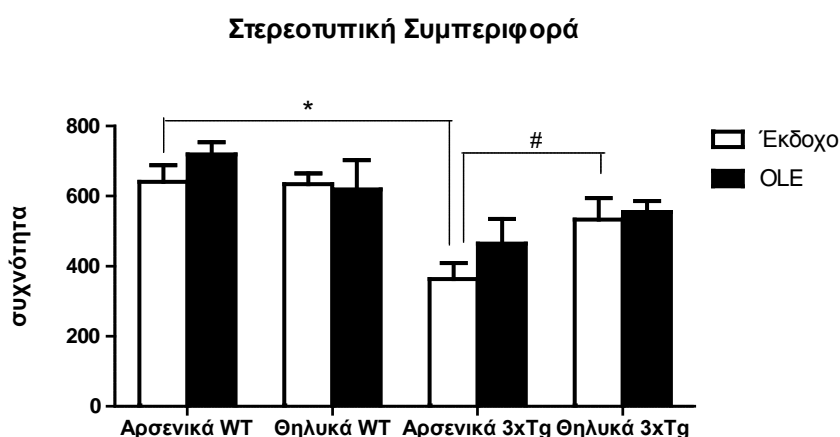
Όσον αφορά στην κάθετη κινητικότητα, υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων, όπως δείχνει η ανάλυση Kruskal Wallis ( $\chi^2 (7, N= 68) = 22.948, p = .002$ ). Συγκεκριμένα, οι αρσενικοί WT μύες που έλαβαν έκδοχο εμφάνισαν αυξημένη διάρκεια κάθετης κινητικότητας, σε σχέση με τους αρσενικούς 3xTg μύες που έλαβαν έκδοχο ( $U = 9.0, p = .008$ ) (Γράφημα 6).



Γράφημα 6: Απεικόνιση των μέσων τιμών της διάρκειας της κάθετης κίνησης των πειραματοζώων στη δοκιμασία Ανοιχτού πεδίου. Οι αρσενικοί WT μύες που έχουν λάβει έκδοχο εμφάνισαν αυξημένη διάρκεια κάθετης κινητικότητας σε σχέση με τους 3xTg μύες αντίστοιχης ομάδας.

### 1.7. Στερεοτυπική συμπεριφορά

Η μη παραμετρική ανάλυση Kruskal Wallis καταδεικνύει στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των πειραματικών ομάδων στον αριθμό των στερεοτυπικών κινήσεων που έκαναν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας Ανοιχτού Πεδίου ( $\chi^2 (7, N=63) = 24.543, p = .001$ ). Ακολούθως η ανάλυση Mann Whitney έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ αρσενικών και θηλυκών 3xTg μυών που λάμβαναν έκδοχο, με τους αρσενικούς μύες να εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα στερεοτυπικής συμπεριφοράς σε σχέση με τους θηλυκούς μύες ( $U = 18.0, p = .050$ ). Επίσης, στατιστικά σημαντική διαφορά υπήρξε και μεταξύ αρσενικών WT και 3xTg μυών που λάμβαναν έκδοχο και συγκεκριμένα οι WT μύες εμφάνισαν μεγαλύτερη συχνότητα στερεοτυπικών κινήσεων συγκριτικά με τους 3xTg μύες ( $U = 6.0, p = .001$ ) (Γράφημα 7).



Γράφημα 7: Απεικόνιση των μέσων τιμών στερεοτυπικής συμπεριφοράς στη δοκιμασία Ανοιχτού Πεδίου. Με το αστερίσκο (\*) απεικονίζεται η κύρια επίδραση του γονότυπου στους αρσενικούς μύες που λάμβαναν έκδοχο, με τους 3xTg μύες να έχουν μειωμένα επίπεδα στερεοτυπικής συμπεριφοράς σε σχέση με τους WT μύες. Το σύμβολο # υποδηλώνει την κύρια επίδραση του φύλου στους 3xTg που λάμβαναν έκδοχο, με τους θηλυκούς μύες να έχουν αυξημένη συχνότητα σε σχέση με τους αρσενικούς μύες της αντίστοιχης ομάδας.

### 1.8. Διάρκεια στερεοτυπικής συμπεριφοράς

Οι πειραματικές ομάδες διαφέρουν επίσης ως προς την διάρκεια κατά την οποία παρουσίαζαν στερεοτυπική συμπεριφορά, όπως δείχνει η μη παραμετρική ανάλυση Kruskal Wallis ( $\chi^2 (7, N=63) = 24.673, p = .001$ ). Συγκεκριμένα, οι αρσενικοί WT μύες που λάμβαναν έκδοχο εμφάνισαν αυξημένη διάρκεια στερεοτυπικής συμπεριφοράς σε σχέση με την αντίστοιχη ομάδα 3xTg μυών ( $U = 5.0, p = .002$ ) και οι θηλυκοί 3xTg μύες που λάμβαναν έκδοχο αφιέρωσαν επίσης περισσότερο χρόνο σε στερεοτυπική

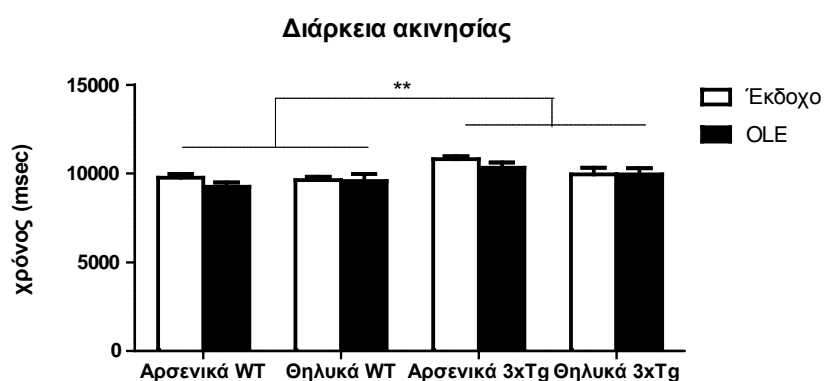
συμπεριφορά σε σχέση με τους αρσενικούς μύες της αντίστοιχης ομάδας ( $U = 12.0$ ,  $p = .021$ ) (Γράφημα 8).



Γράφημα 8: Απεικόνιση των μέσων τιμών διάρκειας της στερεοτυπικής συμπεριφοράς στη δοκιμασία Ανοιχτού Πεδίου. Με αστερίσκο (\*) υποδηλώνεται η στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους αρσενικούς WT και 3xTg μύων που έλαβαν έκδοχο. Με δίεση (#) υποδηλώνεται η στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ αρσενικών και θηλυκών 3xTg μύων που έλαβαν έκδοχο.

### 1.9. Διάρκεια ακινησίας

Η ανάλυση ANOVA έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων στο συνολικό χρόνο κατά τον οποίο τα πειραματόζωα παρέμειναν ακίνητα στον κλωβό Ανοιχτού πεδίου. Συγκεκριμένα, υπάρχει κύρια επίδραση του γονότυπου, με τους WT μύες να παρουσιάζουν μειωμένη διάρκεια ακινησίας, συγκριτικά με τους 3xTg μύες ( $F(1, 66) = 8.245$ ,  $p = 0.006$ ) (Γράφημα 9).

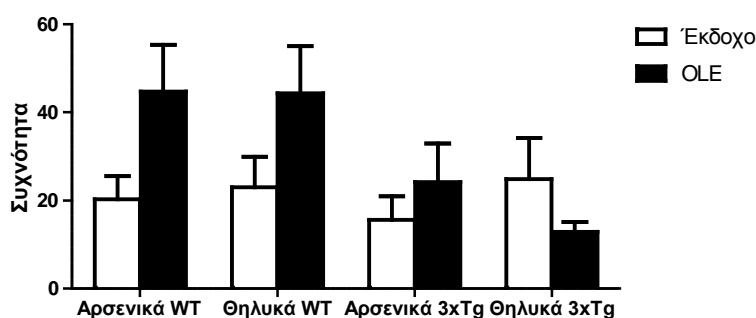


Γράφημα 9: Απεικόνιση των μέσων τιμών της διάρκειας της ακινησίας των πειραματοζώων στην δοκιμασία Ανοιχτού πεδίου. Όπως δείχνει η ανάλυση ANOVA, υπάρχει κύρια επίδραση του γονότυπου. Οι WT μύες έχουν μειωμένη διάρκεια ακινησίας σε σχέση με τους 3xTg μύες.

### 1.10. Αριθμός εισόδων στο κέντρο του κλωβού

Η ανάλυση Kruskal Wallis δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων στον αριθμό εισόδων στο κέντρο του κλωβού ανοιχτού πεδίου ( $\chi^2 (7, N= 70) = 12.569, p = .083$ ) (Γράφημα 10).

Αριθμός εισόδων στο κέντρο του κλωβού Ανοιχτού Πεδίου

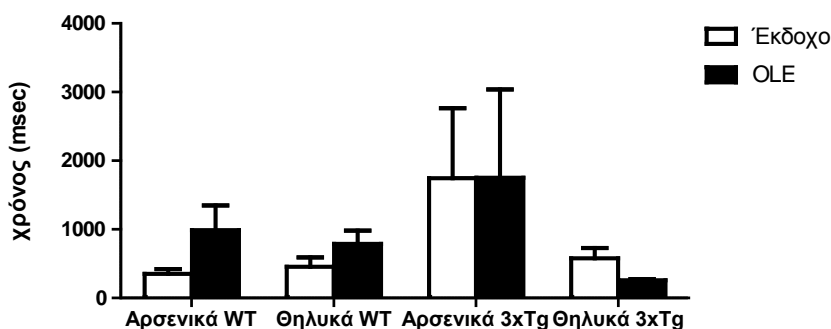


Γράφημα 10: Απεικόνιση των μέσων τιμών των ομάδων των αριθμών εισόδων στο κέντρο του κλωβού Ανοιχτού Πεδίου. Οι πειραματικές ομάδες δεν διαφέρουν ως προς τη συγκεκριμένη συμπεριφορική παράμετρο.

### 1.11. Χρόνος παραμονής στο κέντρο του κλωβού

Όπως διαφαίνεται από την ανάλυση Kruskal Wallis ο χρόνος παραμονής στο κέντρο του κλωβού δεν διέφερε μεταξύ των ομάδων ( $\chi^2 (7, N= 70) = 6.896, p = .552$ ) (Γράφημα 11).

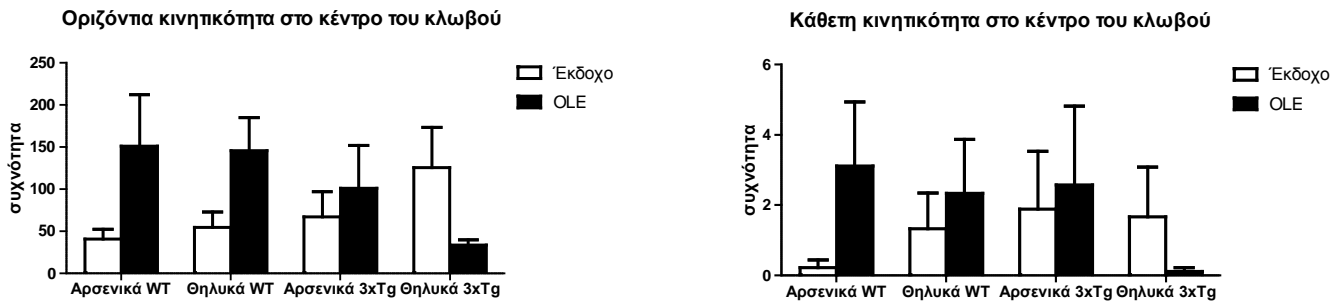
Χρόνος παραμονής στο κέντρο του κλωβού Ανοιχτού πεδίου



Γράφημα 11: Απεικόνιση συνολικού χρόνου κατά τον οποίο τα πειραματόζωα παρέμειναν στο κέντρο του κλωβού ανοιχτού Πεδίου. Δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων.

### 1.12. Κινητικότητα στο κέντρο του κλωβού

Οι πειραματικές ομάδες δεν διέφεραν στην οριζόντια κινητικότητα ( $\chi^2 (7, N= 70) = 9.265, p = .234$ ) ή στην κάθετη κινητικότητα ( $\chi^2 (7, N= 70) = 4.182, p = .759$ ) που παρουσίασαν στο κέντρο του κλωβού Ανοιχτού Πεδίου (Γράφημα 12).



Γράφημα 12: Απεικόνιση των μέσων τιμών των πειραματικών ομάδων Α. στην οριζόντια κινητικότητα στο κέντρο του κλωβού του Ανοιχτού πεδίου, Β. στην κάθετη κινητικότητα στο κέντρο του κλωβού. Δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων στις συμπεριφορικές παραμέτρους που παρουσιάζονται.

### 1.13. Στερεοτυπική συμπεριφορά στο κέντρο του κλωβού

Οι πειραματικές ομάδες δεν παρουσίασαν διαφορές στη συμπεριφορική παράμετρο της στερεοτυπικής συμπεριφοράς στο κέντρο του κλωβού Ανοιχτού Πεδίου, όπως έδειξε η μη παραμετρική ανάλυση Kruskal Wallis ( $\chi^2 (7, N= 70) = 7.015, p = .427$ ) (Γράφημα 13).



Γράφημα 13: Απεικόνιση των μέσων τιμών των πειραματικών ομάδων στην στερεοτυπική συμπεριφορά στο κέντρο του κλωβού κατά τη δοκιμασία Ανοιχτού πεδίου. Μη παραμετρικά τεστ δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων.

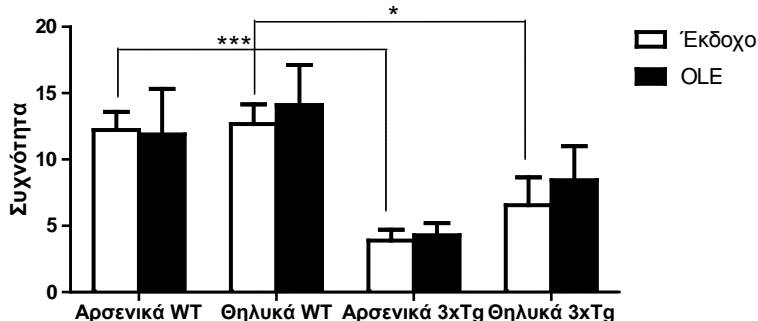
## 2. ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΦΩΤΟΣ/ΣΚΟΤΟΥΣ

Η δοκιμασία Φωτός/Σκότους διενεργήθηκε με στόχο την εξακρίβωση της πιθανής αγχολυτικής δράσης της Ολευρωπαΐνης σε αρσενικούς και θηλυκούς WT και 3xTg μύες. Επίσης ελέγχθηκαν οι διαφορές στα επίπεδα άγχους μεταξύ αρσενικών και θηλυκών μυών, καθώς και WT ή 3xTg μυών.

## 2.1. Συνολικές μεταπτώσεις στον κλωβό Φωτός/Σκότους

Ο συνολικός αριθμός μεταπτώσεων από το φωτεινό στο σκοτεινό διαμέρισμα και το αντίστροφο αξιολογήθηκε μέσω της χρήσης μη παραμετρικών τεστ. Η ανάλυση Kruskal Wallis επέδειξε τη στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων στις συνολικές μεταπτώσεις στον κλωβό Φωτός/Σκότους ( $\chi^2 (7, N= 70) = 19.190, p = .008$ ). Για την εξακρίβωση των διαφορών μεταξύ συγκεκριμένων πειραματικών ομάδων διενεργήθηκε ανάλυση Mann Whitney η οποία επέδειξε την κύρια επίδραση του γονότυπου στις συνολικές μεταπτώσεις μέσα στον κλωβό. Συγκεκριμένα οι αρσενικοί WT μύες που λάμβαναν έκδοχο είχαν περισσότερες συνολικές μεταπτώσεις σε σχέση με την αντίστοιχη ομάδα 3xTg μυών ( $U = 4.0, p \leq .001$ ). Στατιστικά σημαντική διαφορά υπήρχε και μεταξύ θηλυκών πειραματοζώων των αντίστοιχων ομάδων ( $U = 15.0, p = .024$ ) (Γράφημα 14).

Συνολικές μεταπτώσεις στον κλωβό φωτός/σκότους

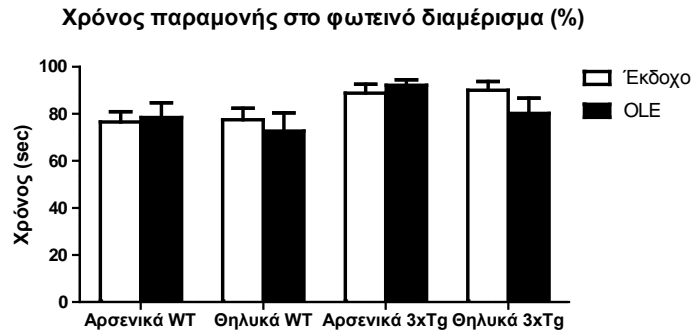


Γράφημα 14: Απεικόνιση του συνολικού αριθμού μεταπτώσεων μεταξύ των δύο διαμερισμάτων στην δοκιμασία Φωτός/Σκότους. Με αστερίσκο (\*) υποδηλώνεται η στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ θηλυκών WT και 3xTg μυών που λάμβαναν έκδοχο. Οι τρεις αστερίσκοι (\*\*\*) υποδηλώνουν την στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ αρσενικών WT και 3xTg μυών που λάμβαναν έκδοχο.

## 2.2. Χρόνος παραμονής στο Φωτεινό Διαμέρισμα

Με τη χρήση μη παραμετρικών τεστ μετρήθηκε επίσης το ποσοστό του χρόνου παραμονής στο φωτεινό διαμέρισμα του κλωβού. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων, όπως έδειξε η ανάλυση Kruskal Wallis ( $\chi^2 (7, N= 70) = 10.843, p = .146$ ). Η Ολεωρωπαϊνή δεν φαίνεται να έχει αγχολυτική δράση σε αρσενικούς και θηλυκούς WT και 3xTg μύες (Γράφημα 15).





Γράφημα 15: Απεικόνιση των μέσων τιμών παραμονής στο φωτεινό διαμέρισμα (%) των πειραματικών ομάδων. Δεν παρατηρείται επίδραση της Ολευρωπαΐνης, του φύλου ή του γονότυπου.

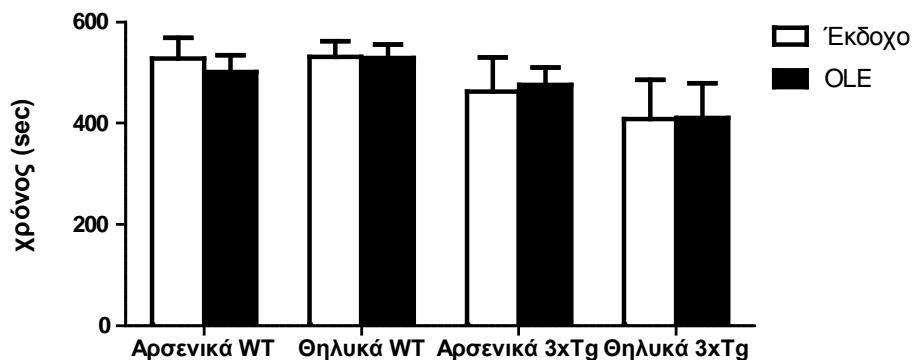
### 3. ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΛΑΒΥΡΙΝΘΟΥ Υ

Η επίδραση της Ολευρωπαΐνης, καθώς και του φύλου και του γονότυπου στην εξερευνητική συμπεριφορά των πειραματοζώων, αξιολογήθηκε με τη δοκιμασία λαβύρινθου σχήματος Υ. Τα αποτελέσματα τόσο της πρώτης, όσο και της δεύτερης συνεδρίας αναλύθηκαν και παρουσιάζονται παρακάτω.

#### 3.1. Χρόνος παραμονής στον εναρκτήριο βραχίονα στην πρώτη συνεδρία

Η μη παραμετρική ανάλυση Kruskal Wallis δεν έδειξε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων στο συνολικό χρόνο εξερεύνησης του εναρκτήριου διάδρομου, κατά την πρώτη συνεδρία της δοκιμασίας του Λαβύρινθου Υ ( $\chi^2 (7, N=63) = 7.226, p = .406$ ) (Γράφημα 16).

#### Χρόνος παραμονής στον εναρκτήριο διάδρομο στην πρώτη συνεδρία

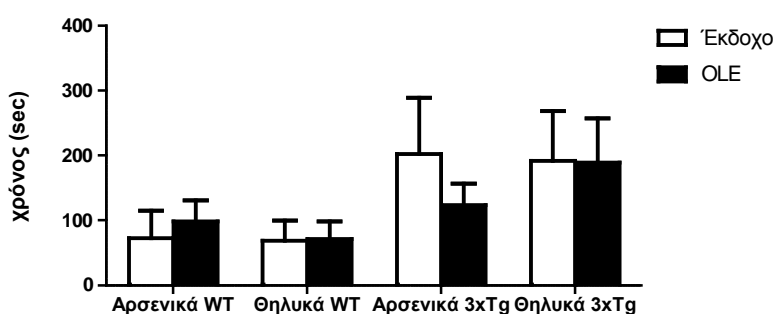


Γράφημα 16: Απεικόνιση των μέσων τιμών του χρόνου κατά τον οποίο παρέμειναν συνολικά στον εναρκτήριο διάδρομο κατά την πρώτη συνεδρία της δοκιμασίας Λαβύρινθου Υ. Οι πειραματικές ομάδες δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους.

### 3.2. Χρόνος παραμονής στον δεύτερο (μη εναρκτήριο βραχίονα) στην πρώτη συνεδρία

Οι ομάδες δεν διέφεραν ως προς τον χρόνο κατά τον οποίο εξερευνούσαν το δεύτερο βραχίονα στην πρώτη συνεδρία της δοκιμασίας Λαβύρινθου Υ ( $\chi^2 (7, N= 64) = 7.765, p = .354$ ) (Γράφημα 17).

Χρόνος παραμονής στον δεύτερο (μη εναρκτήριο) διάδρομο στην πρώτη συνεδρία

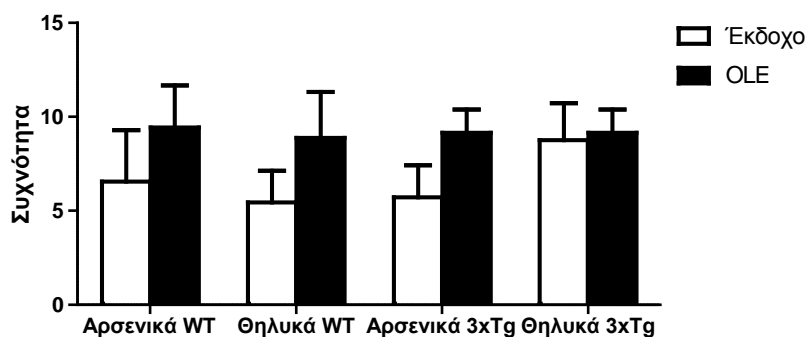


Γράφημα 17: Απεικόνιση των μέσων τιμών του χρόνου εξερεύνησης του μη εναρκτήριου βραχίονα στην πρώτη συνεδρία της Δοκιμασίας Λαβύρινθου Υ. Δεν παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των πειραματικών ομάδων, με βάση τη μη παραμετρική ανάλυση Kruskal Wallis.

### 3.3. Συνολικές μεταπτώσεις κατά την πρώτη συνεδρία της δοκιμασίας

Στην πρώτη συνεδρία της δοκιμασίας, κατά την οποία τα πειραματόζωα είχαν πρόσβαση μόνο στους δύο από τους τρεις βραχίονες του λαβύρινθου οι ομάδες δεν διαφοροποιούνταν ως προς τον αριθμό των συνολικών μεταπτώσεων ( $F (7, 52) = 1.172, p = 0.335$ ) (Γράφημα 18).

Συνολικές μεταπτώσεις πρώτης συνεδρίας Λαβύρινθου Υ

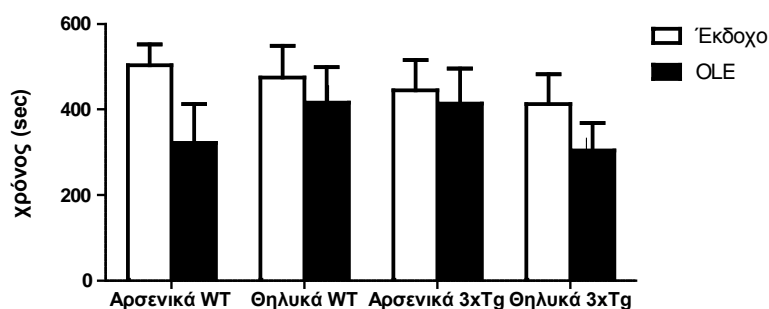


Γράφημα 18: Απεικόνιση των μέσων τιμών των συνολικών μεταπτώσεων στους δύο βραχίονες κατά την πρώτη συνεδρία της δοκιμασίας. Οι πειραματικές ομάδες δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς τη συγκεκριμένη συμπεριφορική παράμετρο

### 3.4. Χρόνος παραμονής στον εναρκτήριο βραχίονα στη δεύτερη συνεδρία

Ο χρόνος εξερεύνησης του εναρκτήριου διαδρόμου κατά την δεύτερη συνεδρία της δοκιμασίας δεν διέφερε με στατιστικά σημαντικό τρόπο μεταξύ των πειραματικών ομάδων, με βάση την ανάλυση Kruskal Wallis ( $\chi^2 (7, N= 64) = 8.581, p = .284$ ) (Γράφημα 19).

Χρόνος παραμονής στον εναρκτήριο διάδρομο στην δεύτερη συνεδρία

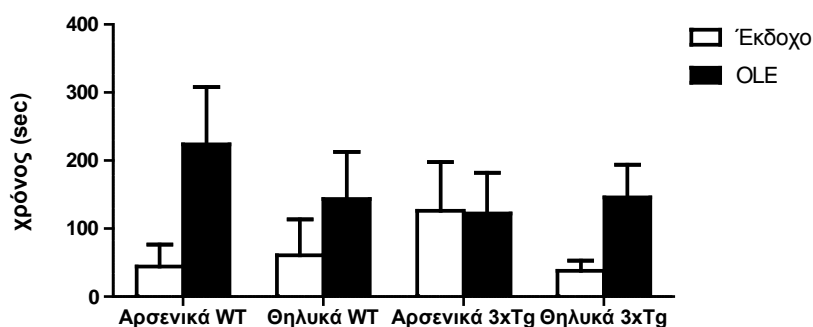


Γράφημα 19: Απεικόνιση των μέσων τιμών του χρόνου εξερεύνησης του εναρκτήριου βραχίονα στην δεύτερη συνεδρία της δοκιμασίας Λαβύρινθου Υ. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων στη συγκεκριμένη συμπεριφορική παράμετρο.

### 3.5. Χρόνος παραμονής στον γνωστό (μη εναρκτήριο) βραχίονα στην δεύτερη συνεδρία

Οι πειραματικές ομάδες δεν διάφεραν ως προς τον χρόνο κατά τον οποίο εξερεύνησαν τον γνωστό βραχίονα στη δοκιμασία Λαβύρινθου Υ ( $\chi^2 (7, N= 63) = 8.604, p = .282$ ) (Γράφημα 20).

Χρόνος παραμονής στον γνωστό (μη εναρκτήριο) διάδρομο στην δεύτερη συνεδρία

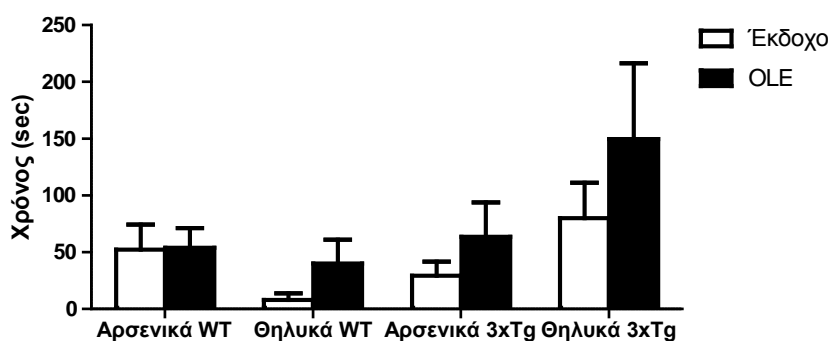


Γράφημα 20: Απεικόνιση των μέσων τιμών του χρόνου εξερεύνησης του γνωστού (μη εναρκτήριου) βραχίονα στην δεύτερη συνεδρία της δοκιμασίας Λαβύρινθου Υ. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων στη συγκεκριμένη συμπεριφορική παράμετρο.

### 3.6. Χρόνος εξερεύνησης νέου βραχίονα στη δεύτερη συνεδρία

Όταν τα πειραματόζωα απέκτησαν πρόσβαση στον τρίτο, νέο βραχίονα δεν διαφοροποιήθηκε, μεταξύ των ομάδων, ο χρόνος παραμονής σε αυτό τον βραχίονα ( $\chi^2 (7, N= 67) = 10.330, p = .171$ ). Η Ολευρωπαϊνή δεν είχε επίδραση στατιστικά σημαντική στη συγκεκριμένη συμπεριφορά (Γράφημα 21).

Χρόνος εξερεύνησης νέου βραχίονα Λαβύρινθου Υ

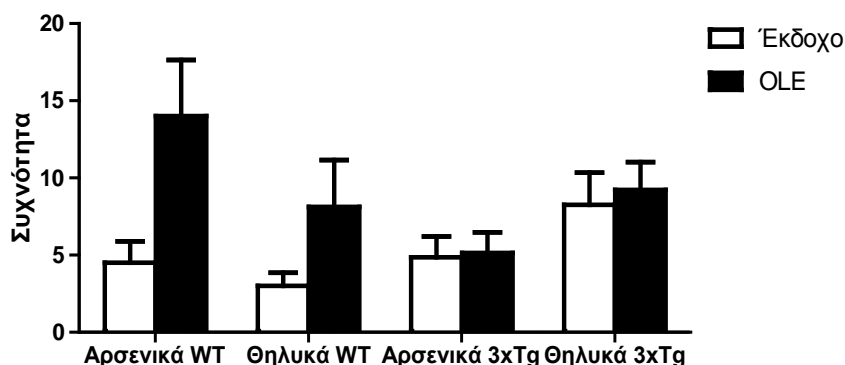


Γράφημα 21: Απεικόνιση των μέσων τιμών του χρόνου εξερεύνησης του νέου βραχίονα στη δεύτερη συνεδρία της δοκιμασίας Λαβύρινθου Υ. Δεν διαφαίνονται διαφορές μεταξύ των πειραματικών ομάδων.

### 3.7. Συνολικές μεταπτώσεις κατά τη δεύτερη συνεδρία της δοκιμασίας

Όταν τα πειραματόζωα απέκτησαν πρόσβαση στον τρίτο βραχίονα του λαβύρινθου η συμπεριφορά των ομάδων διαφοροποιήθηκε ως προς τον συνολικό αριθμό μεταπτώσεων. Συγκεκριμένα, η μη παραμετρική ανάλυση Kruskal Wallis δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων ( $\chi^2 (7, N= 69) = 11.668, p = .112$ ) (Γράφημα 22).

Συνολικές μεταπτώσεις δεύτερης συνεδρίας Λαβύρινθου Υ



Γράφημα 22: Απεικόνιση των μέσων τιμών του συνολικού αριθμού μεταπτώσεων στους τρεις βραχίονες. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων

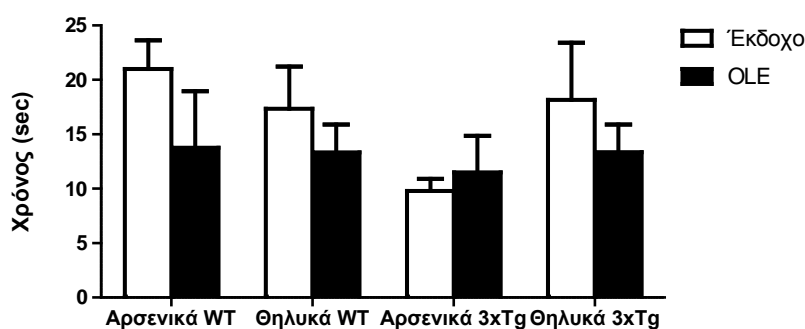
#### 4. ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ ΝΕΟΥ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟΥ

Η εξερευνητική δραστηριότητα και η βραχύχρονη μνήμη των πειραματοζώων αξιολογήθηκαν στη δοκιμασία αναγνώρισης νέου αντικειμένου. Παρουσιάζονται παρακάτω τα αποτελέσματα της επίδρασης των μεταβλητών του φαρμάκου, του φύλου και του γονότυπου στην εν λόγω δοκιμασία.

##### 4.1. Χρόνος εξερεύνησης όμοιων αντικειμένων

Κατά την πρώτη συνεδρία της δοκιμασίας τα πειραματόζωα ήρθαν σε επαφή με δύο πανομοιότυπα αντικείμενα και μετρήθηκε ο συνολικός χρόνος εξερεύνησης των δύο αντικειμένων. Οι πειραματικές ομάδες δεν διαφοροποιούνταν ως προς το συνολικό χρόνο εξερεύνησης ( $F(7, 67) = 1.021$ ,  $p = 0.426$ ) (Γράφημα 23).

Συνολικός χρόνος εξερεύνησης όμοιων αντικειμένων



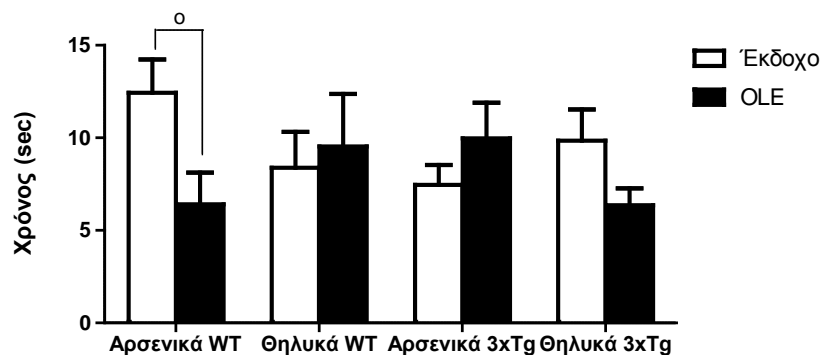
Γράφημα 23: Απεικόνιση μέσω τιμών του συνολικού χρόνου εξερεύνησης των δύο αντικειμένων στην πρώτη συνεδρία της δοκιμασίας αναγνώρισης νέου αντικειμένου. Δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική επίδραση του φαρμάκου, του φύλου ή του γονότυπου στη συμπεριφορά εξερεύνησης των αντικειμένων.

##### 4.2. Χρόνος εξερεύνησης ανόμοιων αντικειμένων

Κατά τη δεύτερη συνεδρία της δοκιμασίας, μετρήθηκε ο συνολικός χρόνος εξερεύνησης των δύο διαφορετικών αντικειμένων. Όπως διαφαίνεται από την ανάλυση ANOVA, υπάρχει αλληλεπίδραση των τριών μεταβλητών (Φύλο\*φάρμακο\*γονότυπος) ( $F(1, 67) = 6.493$ ,  $p = 0.013$ ). Οι post hoc αναλύσεις έδειξαν τα εξής: στα αρσενικά πειραματόζωα η Ολευρωπαΐνη μείωσε τον χρόνο εξερεύνησης μόνο στα WT πειραματόζωα και όχι στα 3xTg, ενώ στα θηλυκά WT και 3xTg πειραματόζωα η Ολευρωπαΐνη δεν είχε επίδραση (post hoc: Αρσενικά-WT-Έκδοχο Vs Αρσενικά-WT-OLE:  $p = 0.021$ ; Αρσενικά-3xTg-Έκδοχο Vs Αρσενικά-3xTg-

OLE:  $p = 0.359$ ; Θηλυκά-WT-Έκδοχο Vs Θηλυκά-WT-OLE:  $p = 0.651$ ; Θηλυκά-3xTg-Έκδοχο Vs Θηλυκά-3xTg-OLE:  $p = 0.175$ ; Αρσενικά-Έκδοχο-WT Vs Αρσενικά-Έκδοχο-3xTg:  $p = 0.055$ ; Αρσενικά-OLE-WT Vs Αρσενικά-OLE-3xTg:  $p = 0.195$ ; Θηλυκά-Έκδοχο-WT Vs Θηλυκά-Έκδοχο-3xTg:  $p = 0.567$ ; Θηλυκά-OLE-WT Vs Θηλυκά-OLE-3xTg:  $p = 0.215$ ; WT-Έκδοχο-Αρσενικά Vs WT-Έκδοχο-Θηλυκά:  $p = 0.116$ ; WT-OLE-Αρσενικά Vs WT-OLE-Θηλυκά:  $p = 0.223$ ; 3xTg-Έκδοχο-Αρσενικά Vs 3xTg-Έκδοχο-Θηλυκά:  $p = 0.350$ ; 3xTg-OLE-Αρσενικά Vs 3xTg-OLE-Θηλυκά:  $p = 0.189$ ) (Γράφημα 24).

**Συνολικός χρόνος εξερεύνησης ανόμοιων αντικειμένων**

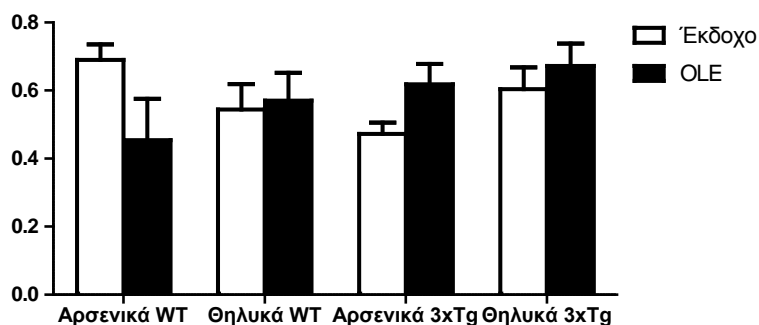


Γράφημα 24: Απεικόνιση των μέσων τιμών του συνολικού χρόνου εξερεύνησης των δύο ανόμοιων αντικειμένων στην δεύτερη συνεδρία της δοκιμασίας αναγνώρισης αντικειμένου. Υπήρχε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των τριών ανεξάρτητων μεταβλητών. Συγκεκριμένα η Ολευρωπαΐνη μείωσε τον συνολικό χρόνο εξερεύνησης μόνο στα αρσενικά WT πειραματόζωα, σε σχέση με αυτά που έλαβαν έκδοχο.

#### 4.3. Δείκτης προτίμησης νέου αντικειμένου

Η επίδραση των τριών ανεξάρτητων μεταβλητών (φύλου, γονότυπου και φαρμάκου) στη βραχύχρονη μνήμη των αντικειμένων αξιολογήθηκε με βάση το δείκτη προτίμησης του νέου αντικειμένου (Preference Index). Ο δείκτης αυτός αναφέρεται στο χρόνο που αφιέρωσε το κάθε ζώο στο νέο αντικείμενο, σε σχέση με το συνολικό χρόνο κατά τον οποίο εξερευνούσε τα αντικείμενα κατά τη διάρκεια της δεύτερης συνεδρίας της δοκιμασίας και υπολογίζεται με τον ακόλουθο τρόπο:  $PI = \frac{A}{A+B}$ . Όπου  $PI =$  Preference index,  $A =$  νέο αντικείμενο,  $B =$  Γνωστό αντικείμενο. Η μη παραμετρική ανάλυση Kruskal Wallis δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων στον δείκτη προτίμησης ( $\chi^2 (7, N = 70) = 10.709, p = .152$ ) (Γράφημα 25).

#### Δείκτης προτίμησης νέου αντικειμένου (Preference index)

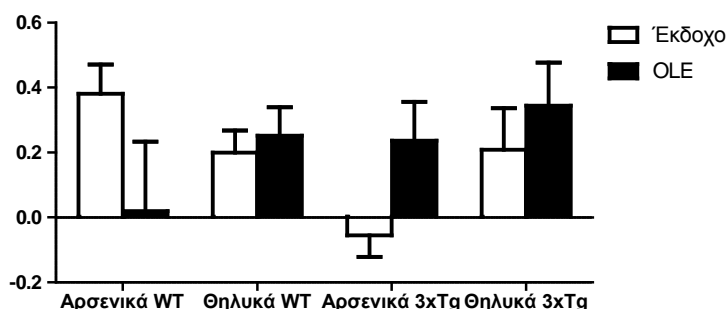


Γράφημα 25: Απεικόνιση των μέσων τιμών του δείκτη προτίμησης νέου αντικειμένου των πειραματικών ομάδων. Η Ολεωρωπαϊνή, το φύλο και ο γονότυπος δεν διαφοροποιούν την προτίμηση των πειραματοζώων στα δύο αντικείμενα.

#### 4.4. Δείκτης Διάκρισης Αντικειμένων

Ο δείκτης διάκρισης αντικειμένων αναφέρεται στη διαφορά του χρόνου εξερεύνησης του νέου αντικειμένου με τον χρόνο εξερεύνησης του γνωστού αντικειμένου, σε σχέση με τον συνολικό χρόνο εξερεύνησης των αντικειμένων και υπολογίζεται με τον ακόλουθο τύπο:  $DI = \frac{A-B}{A+B}$ , όπου DI= discrimination index, A= νέο αντικείμενο και B= γνωστό αντικείμενο. Η ANOVA έδειξε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση γονότυπου – φαρμάκου ( $F(1, 70) = 4.471, p = 0.039$ ). Ακολούθως, οι post hoc αναλύσεις έδειξαν ότι οι επιμέρους διαφορές μεταξύ των ομάδων δεν ήταν στατιστικά σημαντικές, αλλά υπήρχε μια τάση βελτίωσης στους 3xTg μύες που έλαβαν το φάρμακο σε σχέση με το έκδοχο (post-hoc: Έκδοχο-WT Vs Έκδοχο-3xTg:  $p=0.083$ ; OLE-WT Vs OLE-3xTg:  $p=0.221$ ; WT-Έκδοχο Vs WT-OLE:  $p=0.207$ ; 3xTg-Έκδοχο Vs 3xTg-OLE:  $p=0.093$ ) (Γράφημα 26).

#### Δείκτης Διάκρισης αντικειμένων (Discrimination index)



Γράφημα 26: Απεικόνιση του δείκτη Διάκρισης Αντικειμένων των πειραματικών ομάδων. Οι post-hoc αναλύσεις έδειξαν ότι οι διαφορές μεταξύ των ομάδων δεν είναι στατιστικά σημαντικές.

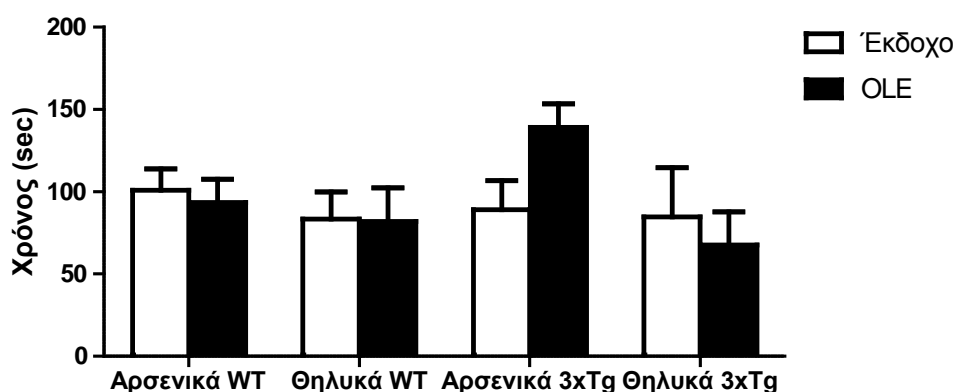
## 5. ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΙΩΡΗΣΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΟΥΡΑ

Η πιθανή αντικαταθλιπτική δράση της Ολευρωπαΐνης σε αρσενικούς και θηλυκούς WT και 3xTg μύες αξιολογήθηκε μέσω της δοκιμασίας αιώρησης από την ουρά. Επίσης, ελέχθησαν οι επιδράσεις του φύλου και του γονότυπου στην «καταθλιπτικόμορφη» συμπεριφορά των πειραματοζώων.

### 5.1. Χρόνος ακινησίας

Όπως επιδεικνύει η ανάλυση ANOVA, δεν υπάρχουν διαφορές μεταξύ των πειραματικών ομάδων στον χρόνο ακινησίας που επέδειξαν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας ( $F(7, 58) = 1.049, p = 0.408$ ). Μείωση του χρόνου ακινησίας στους μύες που έλαβαν το φάρμακο θα υποδήλωνε μια πιθανή αντικαταθλιπτική δράση του φαρμάκου, αυτό όμως δεν φαίνεται να ισχύει. (Γράφημα 27).

### Χρόνος ακινησίας στη δοκιμασία Αιώρησης από την ουρά



Γράφημα 27: Απεικόνιση των μέσων τιμών του χρόνου ακινησίας των πειραματοζώων κατά την δοκιμασία Αιώρησης από την ουρά. Η Ολευρωπαΐνη, το φύλο και ο γονότυπος δεν έχουν στατιστικά σημαντική επίδραση.

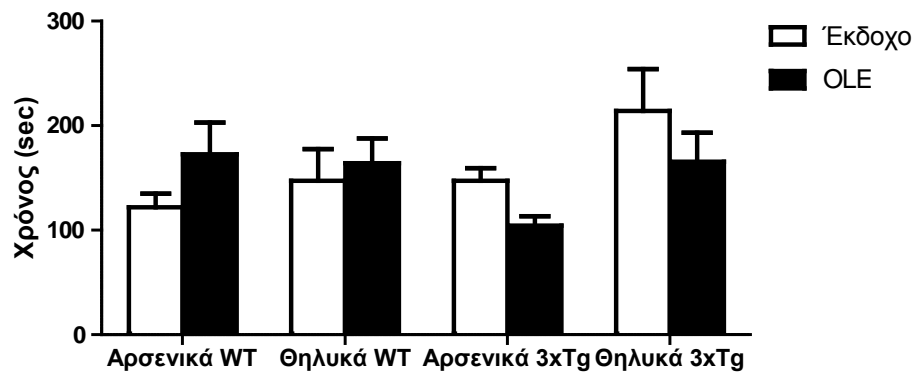
### 5.2. Χρόνος εμφάνισης ακινησίας

Η πιθανή αντικαταθλιπτική δράση μιας ουσίας μπορεί να ελεχθεί και από τον χρόνο εμφάνισης της ακινησίας (λανθάνων χρόνος) στη δοκιμασία αιώρησης από την ουρά. Χρησιμοποιήθηκαν μη παραμετρικά τεστ για την αξιολόγηση των διαφορών μεταξύ των ομάδων στο χρόνο που χρειάστηκε μέχρι την εμφάνιση της ακινησίας.



Η ανάλυση Kruskal Wallis δεν έδειξε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων ( $\chi^2(7, N=67) = 9.478, p = .220$ ) (Γράφημα 28).

### Χρόνος εμφάνισης ακινησίας στη δοκιμασία Αιώρησης από την ουρά



Γράφημα 28: Απεικόνιση των μέσων τιμών του χρόνου εμφάνισης της ακινησίας στις ομάδες πειραματοζώων. Δεν διαφαίνεται στατιστικά σημαντική επίδραση του φαρμάκου, γονότυπου ή φύλου στο συγκεκριμένο συμπεριφορικό δείκτη

## Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου αξιολογήθηκαν πολλαπλές συμπεριφορικές παράμετροι. Η κινητικότητα των πειραματόζων αξιολογήθηκε τόσο με τη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου, όσο και με τις δοκιμασίες λαβυρίνθου Υ και φωτός/σκότους. Οι 3xTg μύες παρουσιάζουν μειωμένη κινητικότητα σε σχέση με WT μύες, όπως φαίνεται από τις μετρήσεις της περιπατητικής τους κινητικότητας και της απόστασης που έχουν διανύσει. Σε προηγούμενες μελέτες υπάρχουν ενδείξεις υποκινητικότητας των 3xTg μυών (Gimenez et al., 2007). Όσον αφορά όμως συγκεκριμένα στην απόσταση που διανύουν οι μύες κατά τη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου άλλοι ερευνητές δεν έχουν βρει καμία διαφορά (Gimenez et al., 2007; Sterniczuk et al., 2010). Η Ολευρωπαΐνη δεν είχε καμία επίδραση στην οριζόντια κινητικότητα των πειραματόζων και δεν παρατηρήθηκαν διαφυλικές διαφορές ως προς τη συγκεκριμένη συμπεριφορική παράμετρο. Οι συνολικές μεταπτώσεις στη δοκιμασία λαβυρίνθου Υ και στη δοκιμασία Φωτός/Σκότους αποτελούν, επίσης, δείκτες κινητικότητας των πειραματόζων (Bourgin & Hascoet, 2003; Douglas, 1989). Στη δοκιμασία λαβύρινθου Υ, στην πρώτη συνεδρία, καθώς και στη δεύτερη συνεδρία οι ομάδες δεν διέφεραν μεταξύ τους στον αριθμό των μεταπτώσεων από τον ένα βραχίονα σε άλλο. Στη δοκιμασία Φωτός/Σκότους η Ολευρωπαΐνη δεν τροποποίησε τις συνολικές μεταπτώσεις από το ένα διαμέρισμα στο άλλο, όμως ο γονότυπος επηρέασε αυτή τη συμπεριφορά. Τόσο στα αρσενικά, όσο και στα θηλυκά πειραματόζωα που έλαβαν έκδοχο, υπάρχουν αυξημένες μεταπτώσεις στους WT μύες σε σχέση με τους 3xTg μύες. Όπως φαίνεται από τις παραπάνω συμπεριφορικές παράμετρους που αξιολογήθηκαν με πολλαπλές δοκιμασίες, είναι φανερό ότι η παθολογία των 3xTg μυών έχει αντίκτυπο στην κινητικότητα τους ελαττώνοντας τα επίπεδα της, χωρίς η Ολευρωπαΐνη να είναι ικανή να βελτιώσει αυτή την υποκινητικότητα.

Η κάθετη κινητικότητα στη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου, η διάρκεια απραξίας, καθώς και η συμπεριφορά αυθόρμητης εναλλαγής στην δοκιμασία λαβύρινθου Υ, αποτελούν δείκτες του ενδιαφέροντος του πειραματόζου για εξερεύνηση ενός νέου περιβάλλοντος. Στο μοντέλο 3xTg τα αρσενικά πειραματόζωα παρουσιάζουν ελαττωμένη σε συχνότητα κάθετη κινητικότητα, σε σχέση με τα αρσενικά WT πειραματόζωα. Στους αρσενικούς 3xTg μύες η Ολευρωπαΐνη βελτιώνει, σε κάποιο

βαθμό την εξερευνητική συμπεριφορά των μυών, χωρίς όμως να την ισοβαθμεί με αυτή των WT μυών. Όσον αφορά στη διάρκεια της κάθετης κινητικότητας, είναι σαφές ότι οι αρσενικοί 3xTg μύες έχουν σημαντικά μειωμένη επίδοση σε σχέση με αρσενικούς WT μύες. Η διάρκεια ακινησίας στη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου είναι αυξημένη στους 3xTg μύες, όπως ήταν αναμενόμενο, χωρίς η Ολευρωπαΐνη να αλλάζει αυτή την συμπεριφορά. Ο χρόνος ακινησίας υποδηλώνει μειωμένο ενδιαφέρον προς το νέο περιβάλλον, επηρεάζεται όμως και από τα επίπεδα άγχους, που πιθανόν να είναι αυξημένα στους 3xTg μύες, ως αποτέλεσμα της παθολογίας τους. Όσον αφορά στην αυθόρμητη εναλλαγή στη δοκιμασία Λαβύρινθου Υ, δεν βρέθηκαν διαφορές μεταξύ αρσενικών και θηλυκών WT και 3xTg μυών και η Ολευρωπαΐνη δεν τροποποίησε τη συμπεριφορά σε καμία ομάδα. Ο χρόνος παραμονής στον νέο βραχίονα δεν διαφοροποιείται μεταξύ των ομάδων. Κατά την πρώτη συνεδρία της δοκιμασίας οι μύες παρέμειναν για περισσότερη ώρα στον εναρκτήριο βραχίονα, παρά στον δεύτερο βραχίονα. Στη δεύτερη συνεδρία τα πειραματόζωα παρέμειναν περισσότερη ώρα στον εναρκτήριο βραχίονα σε σχέση με τους υπόλοιπους δύο, γεγονός μη αναμενόμενο, εφόσον τα WT πειραματόζωα υπό κανονικές συνθήκες τείνουν να περνούν περισσότερη ώρα στο νέο, άγνωστο βραχίονα. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω ευρήματα, φαίνεται ότι οι 3xTg μύες εκδηλώνουν μειωμένα επίπεδα εξερευνητικής συμπεριφοράς σε σχέση με WT μύες και αυτή η διαταραχή είναι εμφανέστερη στους αρσενικούς μύες.

Η αγχώδης συμπεριφορά, έχει μελετηθεί στο παρελθόν, τόσο σε ασθενείς με AD (Piccininni et al., 2005; Shimabukuro et al., 2005), όσο και στους 3xTg μύες (Gimenez et al., 2007). Φαίνεται ότι το άγχος εντάσσεται στα νευροψυχιατρικά συμπτώματα της νόσου, τα οποία προκύπτουν ως αποτέλεσμα του ανοϊκού συνδρόμου και η συχνότητα τους αυξάνεται καθώς αυξάνεται η σοβαρότητα και η διάρκεια της νόσου.

Στην παρούσα μελέτη τα επίπεδα άγχους των πειραματόζωων αξιολογήθηκαν μέσω συγκεκριμένων παραμέτρων στη δοκιμασία Ανοιχτού πεδίου και στη δοκιμασία φωτός/σκότους. Ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος δείκτης άγχους στη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου είναι ο δείκτης της θιγμοταξίας, ο οποίος καθορίζεται με βάση τη διάρκεια κατά την οποία το πειραματόζωο παραμένει στο κέντρο του πεδίου, τη συχνότητα εισόδων στο κέντρο του κλωβού και το λανθάνων χρόνο διαφυγής από

το κέντρο του κλωβού προς την περιφέρεια (Belzung & Griebel, 2001; Prut & Bezung, 2003; Rentesi et al., 2010; Simon et al., 1994). Η Ολευρωπαϊνή δεν τροποποίησε αυτό το συμπεριφορικό δείκτη, παρόλο που διαφαίνεται μια τάση αύξησης των εισόδων στο κέντρο του κλωβού μόνο στους WT μύες που έλαβαν Ολευρωπαϊνή, σε σχέση με αυτούς που έλαβαν έκδοχο. Πέρα από αυτή την τάση, η συμπεριφορική απόκριση αρσενικών και θηλυκών WT και 3xTg μυών δεν διαφοροποιήθηκε σε καμία από τις τρεις παραμέτρους. Τέλος, από τη δοκιμασία Φωτός/Σκότους φαίνεται ότι, πέρα από τις μειωμένες μεταπτώσεις που παρατηρούνται στους 3xTg μύες, ο χρόνος παραμονής στο φωτεινό διαμέρισμα δεν διέφερε μεταξύ των ομάδων. Ως εκ τούτου, με βάση τα αποτελέσματα στις παραπάνω συμπεριφορικές παραμέτρους, η Ολευρωπαϊνή δεν φαίνεται να έχει αγχολυτικές ιδιότητες και οι 3xTg μύες δεν εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα άγχους σε σχέση με τους WT μύες. Αυτό ίσως να σχετίζεται με την ηλικία των μυών, εφόσον σε αυτή τη μελέτη το ηλικιακό εύρος κυμαινόταν μεταξύ 9-12 μήνες ζωής, ενώ προηγούμενα ευρήματα υποδηλώνουν αυξημένα επίπεδα άγχους στη δοκιμασία φωτός/σκότους στο μοντέλο 3xTg μετά την ηλικία των 12 μηνών (Gimenez et al., 2007). Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι οι 3xTg μύες παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα εξαρτημένου και μη εξαρτημένου φόβου, ως αποτέλεσμα της συσσώρευσης Αβ πεπτιδίου στους γλουταμινεργικούς και γκαπαεργικούς νευρώνες του βασικού πλάγιου πυρήνα της αμυγδαλής. Έχει προταθεί ότι οι αποκρίσεις φόβου που παρατηρούνται στους 3xTg μύες, κυρίως μέσω παρατήρησης της συμπεριφοράς παγώματος (freezing) και που αξιολογείται σε δοκιμασίες εξαρτημένου και μη εξαρτημένου φόβου, σχετίζονται με υψηλά επίπεδα άγχους. Συγκεκριμένα, ορισμένοι αγχολυτικοί παράγοντες είναι ικανοί να μειώσουν τις εν λόγω αποκρίσεις φόβου σε αυτά τα πειραματόζωα (Esparna et al., 2010).

Η στερεοτυπική συμπεριφορά των τρωκτικών σχετίζεται με ψυχωσικά συμπτώματα και αξιολογείται στη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου. Ψυχοδιεγερτικά φάρμακα είναι ικανά να αυξήσουν τη συχνότητα και τη διάρκεια της στερεοτυπικής συμπεριφοράς (Mohn et al., 1999) και η συγκεκριμένη συμπεριφορά έχει συσχετισθεί με τα θετικά συμπτώματα της σχιζοφρένειας (Corbett et al., 1995; Moghaddam et al., 1998). Τόσο η υπερκινητικότητα, όσο και η στερεοτυπική συμπεριφορά φαίνεται να προκύπτουν από αυξημένο ντοπαμινεργικό τόνο (Caron, 1996; Gainetdinov et al., 1999). Από τα

ευρήματα της παρούσας μελέτης φαίνεται ότι οι αρσενικοί 3xTg είναι λιγότερο επιρρεπείς στο να παρουσιάσουν στερεοτυπική συμπεριφορά, τόσο σε συχνότητα όσο και σε διάρκεια, σε σχέση με τους WT αρσενικούς μύες και με τους θηλυκούς 3xTg μύες. Με βάση τη βιβλιογραφία, θα αναμένονταν οι 3xTg μύες να παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα στερεοτυπίας, ως αποτέλεσμα της παθολογίας τους, όπως προκύπτει από προηγούμενα ευρήματα (Baeta-Corral & Gimenez-Llort, 2014). Η Ολευρωπαΐνη δεν φαίνεται να επιδρά θετικά, μεταβάλλοντας τη συμπεριφορά στερεοτυπίας σε κάποια ομάδα.

Η έκπτωση των γνωσιακών λειτουργιών, με κυρίαρχο φαινότυπο τη διαταραχή της μνήμης, καθώς και των εκτελεστικών λειτουργιών, σε πρώιμα στάδια της νόσου αποτελούν τα εμφανέστερα σημάδια που γίνονται αντιληπτά από τους ασθενείς και το κοινωνικό τους περιβάλλον και είναι αυτά που συνεχίζουν να εκπίπτουν καθ' όλη τη διάρκεια εξέλιξης της νόσου, καθιστώντας τα άτομα ανάκανα να συντηρήσουν τον εαυτό τους και εξαρτημένα από άλλα φυσικά πρόσωπα. Ακόμα και πριν την έναρξη της νόσου, κατά το στάδιο της Ήπιας Γνωσιακής Διαταραχής, που συνιστά ένα διακριτό, πρόδρομο προ-ανοϊκό στάδιο από το οποίο περνάνε οι ασθενείς (Hwang et al., 2004), αρχίζει να διαφαίνεται μια δυσχέρεια στις λειτουργίες της μνήμης, αντίληψης, προσοχής και κρίσης. Όμως ο βαθμός σοβαρότητας κατά την έναρξη της νόσου δεν είναι αρκετός, έτσι ώστε να προκαλεί δυσλειτουργικότητα στο άτομο. Γι' αυτό και η νόσος AD δεν γίνεται πάντα αντιληπτή εγκαίρως, εφόσον αποδίδεται συχνά στα χαρακτηριστικά του φυσιολογικού γήρατος. Αυτή η πρώιμη έναρξη των γνωσιακών διαταραχών, που γίνεται ορατή πριν την εμφάνιση της νευροπαθολογίας, εγείρει ερωτήματα σχετικά με το τί είναι αυτό που πυροδοτεί αυτές τις αλλαγές. Φαίνεται, ότι ο σημαντικότερος παράγοντας που οδηγεί στα αρχικά στάδια των μνημονικών διαταραχών είναι η απώλεια και δυσλειτουργία των συνάψεων (Dickson et al., 1995; Flood et al., 1990; Masliah et al., 2001; Sze et al., 1997). Η συναπτική δυσλειτουργία και απώλεια αναπαράγεται σε μεγάλο βαθμό σε διαγονιδιακά μοντέλα για τη νόσο AD. Συγκεκριμένα στο μοντέλο 3xTg παρουσιάζονται διαταραχές στη συναπτική πλαστικότητα πριν την εξωκυττάρια συσσώρευση του Αβ πεπτιδίου και αυτές οι διαταραχές συμπίπτουν χρονικά με την εμφάνιση ενδοκυττάρια Αβ πεπτιδίου (Oddo et al., 2003). Αυτό γίνεται ορατό από τους 6 μήνες ζωής των μυών. Ως εκ τούτου θα αναμενόταν, με βάση το ηλικιακό

εύρος των μυών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, να παρατηρούνταν διαταραγμένες μνημονικές ικανότητες των 3xTg μυών στις συμπεριφορικές παράμετρους που αξιολογήθηκαν, καθώς και πιθανή βελτίωση τους μετά τη χρόνια χορήγηση Ολευρωπαΐνης.

Κατά την πρώτη συνεδρία της δοκιμασίας αναγνώρισης νέου αντικειμένου, ο συνολικός χρόνος εξερεύνησης των δύο όμοιων αντικειμένων ήταν ο ίδιος σε όλες τις πειραματικές ομάδες. Άλλωστε δεν αναμένονταν διαφοροποιήσεις μεταξύ αρσενικών και θηλυκών, WT και 3xTg μυών ως προς το χρόνο εξερεύνησης του κάθε αντικειμένου, εφόσον τα αντικείμενα ήταν όμοια. Κατά τη δεύτερη συνεδρία οι ομάδες διαφοροποιήθηκαν ως προς το συνολικό χρόνο κατά τον οποίο εξερευνούσαν τα δύο αντικείμενα, το γνωστό και το νέο. Στους WT μύες η Ολευρωπαΐνη μείωσε τον συνολικό χρόνο εξερεύνησης των αντικειμένων μόνο στους αρσενικούς και όχι στους θηλυκούς, ενώ στους 3xTg μύες δεν είχε καμία επίδραση. Ο συνολικός χρόνος εξερεύνησης των δύο ανόμοιων αντικειμένων ήταν μικρότερος σε σχέση με το συνολικό χρόνο εξερεύνησης των δύο όμοιων αντικειμένων. Ο δείκτης προτίμησης νέου αντικειμένου είναι θετικός σε όλες τις ομάδες, γεγονός που φανερώνει ότι τα πειραματόζωα εξερευνούσαν το νέο αντικείμενο περισσότερο. Όμως, δεν φάνηκε να υπάρχει διαφορά μεταξύ των ομάδων στο δείκτη προτίμησης του νέου αντικειμένου. Συνεπώς, τα WT και τα 3xTg πειραματόζωα δεν διέφεραν ως προς την εξερεύνηση του νέου αντικειμένου. Στο δείκτη διάκρισης των αντικειμένων οι τιμές σε όλες τις πειραματικές ομάδες ήταν θετικές, πλην της ομάδας των αρσενικών 3xTg μυών που έχουν λάβει έκδοχο, όπου ο δείκτης έχει αρνητική τιμή. Οι θετικές τιμές υποδηλώνουν ότι οι μύες εξερευνούσαν περισσότερο το νέο αντικείμενο σε σχέση με το γνωστό, ενώ οι αρνητικές το αντίθετο. Η Ολευρωπαΐνη δεν διαφοροποίησε ιδιαίτερα αυτή τη συμπεριφορά σε κάποια ομάδα, πέρα από μια τάση βελτίωσης του δείκτη διάκρισης των αντικειμένων στους 3xTg μύες. Διαφορές μεταξύ WT και 3xTg μυών, είχαν παρατηρηθεί σε προηγούμενες μελέτες. Συγκεκριμένα, 3xTg μύες 9 μέχρι 12 μηνών παρατηρήθηκε να έχουν μειωμένη επίδοση στο δείκτη αναγνώρισης του νέου αντικειμένου, σε σχέση με WT μύες αντίστοιχων ηλικιών, τόσο σε πειραματικό πρωτόκολλο που αξιολογεί βραχύχρονη μνήμη (με διάστημα 1,5 ώρων ανάμεσα στις δύο συνεδρίες), όσο και σε πρωτόκολλο με σκοπό την αξιολόγηση της

μακρόχρονης μνήμης αναγνώρισης (με διάστημα 24 ωρών μεταξύ συνεδριών) (Clinton et al., 2007). Επισημαίνεται ότι το πρωτόκολλο της δοκιμασίας Αναγνώρισης νέου αντικειμένου που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη είναι δείκτης της μνήμης αναγνώρισης και όχι χωρικής μνήμης. Η χωρική μνήμη και η ικανότητα προσανατολισμού και κίνησης στο περιβάλλον διαταράσσονται σε μεγάλο βαθμό από τα πρώιμα στάδια της νόσου AD, όπως φαίνεται τόσο από τις κλινικές μελέτες (Mapstone et al., 2003; Monacelli et al., 2003), από αναφορές φροντιστών των ασθενών με AD (Henderson et al., 1989), καθώς και από προκλινικές συμπεριφορικές μελέτες με μοντέλα AD στη δοκιμασία υδάτινου λαβύρινθου κατά Μόρρις (Billings et al., 2005). Στη δοκιμασία υδάτινου λαβύρινθου κατά Μόρρις, οι 3xTg μύες από τους 6 μήνες ζωής και μετά, παρουσιάζουν δυσκολία στο να μάθουν τη θέση της κρυμμένης πλατφόρμας, ενώ μετά τον ένα χρόνο ζωής χάνουν τελείως αυτή την ικανότητα (Billings et al., 2005). Αυτά τα ελλείμματα συμπίπτουν χρονικά με την έναρξη της νευροπαθολογίας της συσσώρευσης του Αβ πεπτιδίου στον ιππόκαμπο και της συναπτικής δυσλειτουργίας (Oddo et al., 2003). Η αξιολόγηση της χωρικής μνήμης και της ικανότητας προσανατολισμού μέσω της δοκιμασίας Υδάτινου Λαβύρινθου κατά Μόρρις, πιθανόν να υποδείκνυε ελλείμματα στους 3xTg μύες, ιδίως αν η ηλικία τους ξεπερνούσε τους 12 μήνες. Σε αυτή την ηλικία στην εν λόγω δοκιμασία η θετική επίδραση της Ολευρωπαΐνης ίσως δεν θα ήταν τόσο πιθανή λόγω της εκτεταμένης παθολογίας. Αντιθέτως, στην ηλικία των 6- 9 μηνών, κατά την οποία η παθολογία του Αβ πεπτιδίου εντοπίζεται κυρίως στον ιππόκαμπο, η Ολευρωπαΐνη πιθανόν να είχε προστατευτική δράση στη χωρική μνήμη και τον προσανατολισμό των 3xTg μυών.

Στα νευροψυχιατρικά συμπτώματα που παρουσιάζουν οι ασθενείς της νόσου AD συμπεριλαμβάνονται οι αλλαγές στο συναίσθημα, τα ψυχωτικά επεισόδια και η ευερεθιστότητα (Lyketsos et al., 2002; Mega & Cummings, 1996). Παρόλο που μελέτες με μοντέλα AD και συγκεκριμένα με το μοντέλο 3xTg έχουν μελετήσει ορισμένες από αυτές τις διαταραχές, η «καταθλιπτικόμορφη» συμπεριφορά μέσω της δοκιμασίας αιώρησης από την ουρά δεν έχει μελετηθεί προηγουμένως. Σε πρόσφατη μελέτη, αξιολογήθηκε η συμπεριφορά των 3xTg μυών στην δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης και παρατηρήθηκε ότι στη δεύτερη συνεδρία της

δοκιμασίας οι 3xTg μύες, ηλικίας 12 μηνών, εμφάνισαν μειωμένη διάρκεια ακινησίας και αυξημένη διάρκεια κολύμβησης, σε σχέση με WT μύες αντίστοιχης ηλικίας, χωρίς να έχουν παρατηρηθεί διαφορές στη συμπεριφορά διαφυγής (αναρρίχηση) (Torres-Lista & Gimenez-Llort, 2014). Αυτό το μοτίβο συμπεριφοράς αποδόθηκε από τους ερευνητές σε φτωχότερη γνωσιακή ευελιξία των 3xTg μυών και σε μειωμένη ικανότητα αντιμετώπισης στρεσογόνων ερεθισμάτων, παρά σε εμφάνιση «συμπεριφοράς απόγνωσης» των μυών, που σχετίζεται με την κατάθλιψη. Στην παρούσα μελέτη, αξιολογήθηκε η «καταθλιπτική μορφή» συμπεριφορά καθώς και η πιθανή αντικαταθλιπτική επίδραση της Ολευρωπαΐνης, μέσω της δοκιμασίας αιώρησης από την ουρά. Η δοκιμασία χρησιμοποιείται αποκλειστικά σε μύες, πολύ συχνά σε διαγονιδιακά μοντέλα και είναι πιο σύντομη και απλή σε σχέση με τη δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης που χρησιμοποιείται ευρέως για την αξιολόγηση πιθανών αντικαταθλιπτικών δράσεων χορηγούμενων ουσιών.

Η Ολευρωπαΐνη δεν φαίνεται να παρουσιάζει αντικαταθλιπτικές δράσεις στους αρσενικούς και θηλυκούς WT και 3xTg μύες. Επίσης, οι 3xTg μύες δεν παρουσιάζουν διαφορές στο χρόνο ακινησίας και στο λανθάνων χρόνο εμφάνισης ακινησίας σε σχέση με WT μύες, στη δοκιμασία αιώρησης από την ουρά. Αυτό ίσως να οφείλεται στην ηλικία των 3xTg μυών, που δεν ξεπερνούσε τους 12 μήνες ζωής. Η «καταθλιπτική μορφή» συμπεριφορά φαίνεται να διαταράσσεται σε ύστερη ηλικία, όταν η παθολογία επεκτείνεται πέρα από την περιοχή του υποκάμπου, στον μετωπιαίο φλοιό και στην αμυγδαλή, μετά τους 12 μήνες ζωής (Torres-Lista & Gimenez-Llort, 2014).

Η παρούσα μελέτη ρίχνει φώς τόσο στα συμπεριφορικά χαρακτηριστικά του νεότερου μοντέλου μύος για τη νόσο AD, όσο και στις διαφυλικές διαφορές που παρουσιάζονται σε αυτό το μοντέλο σε συμπεριφορικό επίπεδο. Η χρόνια χορήγηση της ουσίας Ολευρωπαΐνης έχει πραγματοποιηθεί για πρώτη φορά στο μοντέλο 3xTg, όμως δεν φαίνεται να έχει επίδραση στο φαινότυπο αυτών των πειραματοζώων, πέρα από μια βελτίωση της εξερευνητικής συμπεριφοράς των αρσενικών 3xTg μυών. Πιθανώς να μην αποτελεί δραστική ουσία *in vivo*, ικανή να παρέχει νευροπροστατευτική δράση σε μύες που έχουν αρχίσει να αναπτύσσουν την παθολογική συσσώρευση του Αβ πεπτιδίου, σε σχετιζόμενες με τη νόσο AD



εγκεφαλικές περιοχές, ως αποτέλεσμα των τριών μεταλλάξεων. Παρόλο που δεν ελέγχθηκε η δράση της σε μύες μεγαλύτερους των 12 μηνών, οι οποίοι αναπτύσσουν περαιτέρω παθολογία λόγω υπερφωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Ταυ, δεν θα αναμένονταν διαφορετικές επιδράσεις. Ο λόγος είναι ότι ο μηχανισμός δράσης της Ολευρωπαΐνης, για τις εν δυνάμει νευροπροστατευτικές της ιδιότητες στη νόσο του Αβ, οφείλονται στην αλληλεπίδραση της με το πεπτιδίο Αβ, πιθανόν μέσω σταθεροποίησης της δομής του έτσι ώστε το Αβ να μην καταστεί νευροτοξικό (Bazoti et al., 2006). Εναλλακτικά, η Ολευρωπαΐνη έχει δειχθεί ότι δρα μέσω αύξησης της έκφρασης της α-σεκρετάσης που αυξάνει το νευροπροστατευτικό θραύσμα του μορίου του Αβ (Kostomoiri et al., 2013).

Επίσης, είναι αξιοσημείωτο ότι στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τόσο αρσενικά όσο και θηλυκά πειραματόζωα. Είναι γνωστό ότι παρουσιάζονται σημαντικές διαφυλικές διαφορές σε συμπεριφορικές δοκιμασίες (Kokras & Dalla, 2014), αλλά μέχρι τώρα λίγες έρευνες, που προαναφέρθηκαν, εστίασαν στις διαφυλικές διαφορές που παρατηρούνται στο μοντέλο 3xTg. Είναι γνωστό ότι στη νόσο AD οι γυναίκες είναι πιο επιρρεπείς, αλλά δεν υπάρχουν δραματικές διαφοροποιήσεις στην εμφάνιση και εξέλιξη της νόσου ανάμεσα στα δύο φύλα. Το ίδιο φαίνεται να ισχύει και στο μοντέλο των 3xTg μυών. Πέρα από τη διαφοροποίηση μεταξύ αρσενικών και θηλυκών πειραματοζώων στην στερεοτυπική συμπεριφορά, δεν παρουσιάστηκαν άλλες διαφορές του φύλου στις υπόλοιπες συμπεριφορικές παραμέτρους.

Συμπερασματικά οι 3xTg μύες ηλικιακού εύρους 9 με 12 μηνών, παρουσιάζουν ελλείμματα στην κινητικότητα και στην εξερευνητική απόκριση σε νέο περιβάλλον, αυξημένη ακινησία και καθυστέρηση στην έναρξη ορισμένων συμπεριφορών, αλλά δεν εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα στρες ή «καταθλιπτικόμορφης» συμπεριφοράς. Οι 3xTg μύες ηλικιακού εύρους 9 με 12 μηνών, εμφανίζουν ήπια διαταραχή στη μνήμη αναγνώρισης, σε σχέση με WT μύες. Η Ολευρωπαΐνη έχει θετική επίδραση στην εξερευνητική συμπεριφορά των αρσενικών 3xTg μυών και τάση βελτίωσης της μνήμης. Διαφυλικές διαφορές παρατηρήθηκαν μόνο στη στερεοτυπική συμπεριφορά των 3xTg μυών που έλαβαν έκδοχο, με τους θηλυκούς μύες να εμφανίζουν αυξημένη συχνότητα και διάρκεια στερεοτυπικής συμπεριφοράς, σε σχέση με τους αρσενικούς 3xTg μύες.

Σε μελλοντικές μελέτες θα ήταν ενδιαφέρον να ελεγχθούν οι φαρμακολογικές επιδράσεις διαφορετικών δόσεων της Ολευρωπαΐνης σε 3xTg μύες. Πέραν αυτού, μελλοντικά θα μπορούσε να αξιολογηθεί περαιτέρω η αγχώδης συμπεριφορά και τα επίπεδα φόβου των πειραματοζώων, καθώς και η πιθανή δράση της Ολευρωπαΐνης σε αυτά, μέσω της δοκιμασίας εξαρτημένου φόβου. Επίσης, θα ήταν χρήσιμο να χρησιμοποιηθούν μεγαλύτερης ή μικρότερης ηλικίας 3xTg μύες, έτσι ώστε να αξιολογηθούν οι διαφορές σε συμπεριφορικές δοκιμασίες μεταξύ 3xTg και WT μυών. Η χορήγηση της ουσίας σε μικρότερη ηλικία ίσως θα ήταν ικανή να προλάβει την εμφάνιση ελλειμμάτων των 3xTg στην κινητικότητα και στην εξερευνητικότητα. Από την άλλη, σε μύες άνω του ενός έτους, που η παθολογία αναμένεται να είναι πιο σοβαρή και θα περιελάμβανε συσσωματώσεις της πρωτεΐνης Ταυ, πέρα από συσσώρευση του Αβ πεπτιδίου, πιθανόν να εμφανίζονταν περισσότερες διαφυλικές διαφορές και ίσως η Ολευρωπαΐνη να είχε διαφορετικές επιδράσεις. Άλλωστε, σε μεγαλύτερη ηλικία θα αναμένονταν εντονότερες διαταραχές, σχεδόν σε όλες τις συμπεριφορικές παραμέτρους που αξιολογήθηκαν, και κυρίως στις γνωσιακές και μνημονικές ικανότητες.

## E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- ADAPT Research Group 2006, "Cardiovascular and cerebrovascular events in the randomized, controlled Alzheimer's Disease Anti-Inflammatory Prevention Trial (ADAPT)", *PLoS clinical trials*, vol. 1, no. 7, pp. e33.
- Almeida, O.P., Waterreus, A., Spry, N., Flicker, L. & Martins, R.N. 2004, "One year follow-up study of the association between chemical castration, sex hormones, beta-amyloid, memory and depression in men", *Psychoneuroendocrinology*, vol. 29, no. 8, pp. 1071-1081.
- Amiot, M., Fleuriet, A. & Macheix, J. 1989, "Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation", *Phytochemistry*, vol. 28, no. 1, pp. 67-69.
- Amiot, M., Tacchini, M., Fleuriet, A. & Macheix, J. 1990, "The debittering process of olives: characterization of fruits before and during alkaline treatment.", *Sciences des Aliments*, vol. 10, no. 3, pp. 619-631.
- Amtul, Z., Wang, L., Westaway, D. & Rozmahel, R. 2010, "Neuroprotective mechanism conferred by 17 beta-estradiol on the biochemical basis of Alzheimer's disease", *Neuroscience*, vol. 169, no. 2, pp. 781-786.
- Andersen, J.K. 2004, "Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?", *Nature Reviews Neuroscience*, vol 5, pp 18-25.
- Andersen, K., Launer, L.J., Dewey, M.E., Letenneur, L., Ott, A., Copeland, J.R., Dartigues, J.F., Kragh-Sorensen, P., Baldereschi, M., Brayne, C., Lobo, A., Martinez-Lage, J.M., Stijnen, T. & Hofman, A. 1999, "Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia: The EURODEM Studies. EURODEM Incidence Research Group", *Neurology*, vol. 53, no. 9, pp. 1992-1997.
- Andreadou, I., Sigala, F., Iliodromitis, E.K., Papaefthimiou, M., Sigalas, C., Aligiannis, N., Savvari, P., Gorgoulis, V., Papalabros, E. & Kremastinos, D.T. 2007, "Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 42, no. 3, pp. 549-558.

- Andreadou, I., Iliodromitis, E.K., Mikros, E., Constantinou, M., Agalias, A., Magiatis, P., Skaltsounis, A.L., Kamber, E., Tsantili-Kakoulidou, A. & Kremastinos, D.T. 2006, "The olive constituent oleuropein exhibits anti-ischemic, antioxidative, and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits", *The Journal of nutrition*, vol. 136, no. 8, pp. 2213-2219.
- Antonioni, K., Papathanasiou, G., Papalexi, E., Hyphantis, T., Nomikos, G., Spyraiki, C. & Papadopoulou-Daifoti, Z. 2008, "Individual responses to novelty are associated with differences in behavioral and neurochemical profiles", *Behavioural brain research*, vol. 187, no. 2, pp. 462-472.
- Arriagada, P.V., Growdon, J.H., Hedley-Whyte, E.T. & Hyman, B.T. 1992, "Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease", *Neurology*, vol. 42, no. 3 Pt 1, pp. 631-639.
- Arriagada, P.V., Marzloff, K. & Hyman, B.T. 1992, "Distribution of Alzheimer-type pathologic changes in nondemented elderly individuals matches the pattern in Alzheimer's disease", *Neurology*, vol. 42, no. 9, pp. 1681-1688.
- Asuni, A.A., Boutajangout, A., Quartermain, D. & Sigurdsson, E.M. 2007, "Immunotherapy targeting pathological tau conformers in a tangle mouse model reduces brain pathology with associated functional improvements", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 27, no. 34, pp. 9115-9129.
- Baeta-Corral, R. & Giménez-Llort, L. 2014, "Bizarre behaviors and risk assessment in 3xTg-AD mice at early stages of the disease", *Behavioural brain research*, vol. 258, pp. 97-105.
- Bales, K., Du, Y., Holtzman, D., Cordell, B. & Paul, S. 2000, "Neuroinflammation and Alzheimer's disease: critical roles for cytokine/A $\beta$ -induced glial activation, NF- $\kappa$ B, and apolipoprotein E", *Neurobiology of aging*, vol. 21, no. 3, pp. 427-432.
- Bales, K.R., Verina, T., Cummins, D.J., Du, Y., Dodel, R.C., Saura, J., Fishman, C.E., DeLong, C.A., Piccardo, P., Petegnief, V., Ghetti, B. & Paul, S.M. 1999,

"Apolipoprotein E is essential for amyloid deposition in the APP(V717F) transgenic mouse model of Alzheimer's disease", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no. 26, pp. 15233-15238.

Ballatore, C., Lee, V.M. & Trojanowski, J.Q. 2007, "Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders", *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 8, no. 9, pp. 663-672.

Barnes, L.L., Wilson, R.S., Bienias, J.L., Schneider, J.A., Evans, D.A. & Bennett, D.A. 2005, "Sex differences in the clinical manifestations of Alzheimer disease pathology", *Archives of General Psychiatry*, vol. 62, no. 6, pp. 685-691.

Barnes, L.L., Wilson, R.S., Schneider, J.A., Bienias, J.L., Evans, D.A. & Bennett, D.A. 2003, "Gender, cognitive decline, and risk of AD in older persons", *Neurology*, vol. 60, no. 11, pp. 1777-1781.

Bazoti, F.N., Bergquist, J., Markides, K.E. & Tsiropoulos, A. 2006, "Noncovalent interaction between amyloid- $\beta$ -peptide (1-40) and oleuropein studied by electrospray ionization mass spectrometry", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, vol. 17, no. 4, pp. 568-575.

Bazoti, F.N., Gikas, E. & Tsiropoulos, A. 2010, "Simultaneous quantification of oleuropein and its metabolites in rat plasma by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry", *Biomedical Chromatography*, vol. 24, no. 5, pp. 506-515.

Belzung, C. & Griebel, G. 2001, "Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review", *Behavioural brain research*, vol. 125, no. 1, pp. 141-149.

Belzung, C., Misslin, R., Vogel, E., Dodd, R.H. & Chapouthier, G. 1987, "Anxiogenic effects of methyl- $\beta$ -carboline-3-carboxylate in a light/dark choice situation", *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, vol. 28, no. 1, pp. 29-33.

- Berlyne, D. 1950, "Novelty and curiosity as determinants of exploratory behaviour", *British Journal of Psychology. General Section*, vol. 41, no. 1-2, pp. 68-80.
- Bevins, R.A. & Besheer, J. 2006, "Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study recognition memory", *Nature protocols*, vol. 1, no. 3, pp. 1306-1311.
- Bianco, A., Scalzo, R.L. & Scarpati, M.L. 1993, "Isolation of cornoside from *Olea europaea* and its transformation into halleridone", *Phytochemistry*, vol. 32, no. 2, pp. 455-457.
- Biernat, J., Gustke, N., Drewes, G., Mandelkow, E. & Mandelkow, E. 1993, "Phosphorylation of Ser<sup>262</sup> strongly reduces binding of tau to microtubules: Distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding", *Neuron*, vol. 11, no. 1, pp. 153-163.
- Billings, L.M., Oddo, S., Green, K.N., McGaugh, J.L. & LaFerla, F.M. 2005, "Intraneuronal A $\beta$  causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice", *Neuron*, vol. 45, no. 5, pp. 675-688.
- Blacker, D., Wilcox, M.A., Laird, N.M., Rodes, L., Horvath, S.M., Go, R.C., Perry, R., Watson, B., Bassett, S.S. & McInnis, M.G. 1998, "Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease", *Nature genetics*, vol. 19, no. 4, pp. 357-360.
- Blass, J.P. 2001, "Brain metabolism and brain disease: is metabolic deficiency the proximate cause of Alzheimer dementia?", *Journal of neuroscience research*, vol. 66, no. 5, pp. 851-856.
- Bliss, T.V. & Collingridge, G.L. 1993, "A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus", *Nature*, vol. 361, no. 6407, pp. 31-39.
- Bourin, M. & Hascoet, M. 2003, "The mouse light/dark box test", *European journal of pharmacology*, vol. 463, no. 1, pp. 55-65.

- Bourin, M., Petit-Demoulière, B., Nic Dhonnchadha, B. & Hascöet, M. 2007, "Animal models of anxiety in mice", *Fundamental & clinical pharmacology*, vol. 21, no. 6, pp. 567-574.
- Bowers, J.M., Waddell, J. & McCarthy, M.M. 2010, "A developmental sex difference in hippocampal neurogenesis is mediated by endogenous oestradiol", *Biol Sex Differ*, vol. 1, no. 8, pp. 10.1186.
- Boyles, J.K., Pitas, R.E., Wilson, E., Mahley, R.W. & Taylor, J.M. 1985, "Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system", *The Journal of clinical investigation*, vol. 76, no. 4, pp. 1501-1513.
- Brännvall, K., Bogdanovic, N., Korhonen, L. & Lindholm, D. 2005, "19-Nortestosterone influences neural stem cell proliferation and neurogenesis in the rat brain", *European Journal of Neuroscience*, vol. 21, no. 4, pp. 871-878.
- Breitner, J.C., Gau, B.A., Welsh, K.A., Plassman, B.L., McDonald, W.M., Helms, M.J. & Anthony, J.C. 1994, "Inverse association of anti-inflammatory treatments and Alzheimer's disease: initial results of a co-twin control study", *Neurology*, vol. 44, no. 2, pp. 227-232.
- Brooks, B.P., Merry, D.E., Paulson, H.L., Lieberman, A.P., Kolson, D.L. & Fischbeck, K.H. 1998, "A cell culture model for androgen effects in motor neurons", *Journal of neurochemistry*, vol. 70, no. 3, pp. 1054-1060.
- Brunden, K.R., Trojanowski, J.Q. & Lee, V.M. 2009, "Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies", *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 8, no. 10, pp. 783-793.
- Büchner, M., Huber, R., Sturchler-Pierrat, C., Staufenbiel, M. & Riepe, M. 2002, "Impaired hypoxic tolerance and altered protein binding of NADH in presymptomatic APP23 transgenic mice", *Neuroscience*, vol. 114, no. 2, pp. 285-289.

- Butterfield, D.A., Drake, J., Pocernich, C. & Castegna, A. 2001, "Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid  $\beta$ -peptide", *Trends in molecular medicine*, vol. 7, no. 12, pp. 548-554.
- Caccamo, A., Oddo, S., Billings, L.M., Green, K.N., Martinez-Coria, H., Fisher, A. & LaFerla, F.M. 2006, "M1 receptors play a central role in modulating AD-like pathology in transgenic mice", *Neuron*, vol. 49, no. 5, pp. 671-682.
- Cahill, L. 2006, "Why sex matters for neuroscience", *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 7, no. 6, pp. 477-484.
- Caron, M.G. 1996, "Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter", *Nature*, vol. 379, pp. 15.
- Caroni, P. 1997, "Overexpression of growth-associated proteins in the neurons of adult transgenic mice", *Journal of neuroscience methods*, vol. 71, no. 1, pp. 3-9.
- Carroll, J.C., Rosario, E.R., Kreimer, S., Villamagna, A., Gentschein, E., Stanczyk, F.Z. & Pike, C.J. 2010, "Sex differences in  $\beta$ -amyloid accumulation in 3xTg-AD mice: Role of neonatal sex steroid hormone exposure", *Brain research*, vol. 1366, pp. 233-245.
- Chin, J. 2011, "Selecting a mouse model of Alzheimer's disease" in *Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia* Springer, , pp. 169-189.
- Churcher, I. 2006, "Tau therapeutic strategies for the treatment of Alzheimer's disease", *Current topics in medicinal chemistry*, vol. 6, no. 6, pp. 579-595.
- Citron, M. 2010, "Alzheimer's disease: strategies for disease modification", *Nature reviews Drug discovery*, vol. 9, no. 5, pp. 387-398.
- Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P. & Davis, A. 1997, "Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid  $\beta$ -protein in both transfected cells and transgenic mice", *Nature medicine*, vol. 3, no. 1, pp. 67-72.



- Clinton, L.K., Billings, L.M., Green, K.N., Caccamo, A., Ngo, J., Oddo, S., McGaugh, J.L. & LaFerla, F.M. 2007, "Age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice", *Neurobiology of disease*, vol. 28, no. 1, pp. 76-82.
- Coni, E., Di Benedetto, R., Di Pasquale, M., Masella, R., Modesti, D., Mattei, R. & Carlini, E. 2000, "Protective effect of oleuropein, an olive oil biophenol, on low density lipoprotein oxidizability in rabbits", *Lipids*, vol. 35, no. 1, pp. 45-54.
- Cooke, B.M. & Woolley, C.S. 2005, "Gonadal hormone modulation of dendrites in the mammalian CNS", *Journal of neurobiology*, vol. 64, no. 1, pp. 34-46.
- Cooke, B., Hegstrom, C.D., Villeneuve, L.S. & Breedlove, S.M. 1998, "Sexual differentiation of the vertebrate brain: principles and mechanisms", *Frontiers in neuroendocrinology*, vol. 19, no. 4, pp. 323-362.
- Corbett, R., Camacho, F., Woods, A., Kerman, L., Fishkin, R., Brooks, K. & Dunn, R. 1995, "Antipsychotic agents antagonize non-competitive N-methyl-D-aspartate antagonist-induced behaviors", *Psychopharmacology*, vol. 120, no. 1, pp. 67-74.
- Corder, E., Saunders, A., Risch, N., Strittmatter, W., Schmechel, D., Gaskell, P., Rimmler, J., Locke, P., Conneally, P. & Schmechel, K. 1994, "Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease", *Nature genetics*, vol. 7, no. 2, pp. 180-184.
- Corder, E.H., Ghebremedhin, E., Taylor, M.G., Thal, D.R., Ohm, T.G. & Braak, H. 2004, "The biphasic relationship between regional brain senile plaque and neurofibrillary tangle distributions: modification by age, sex, and APOE polymorphism", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1019, no. 1, pp. 24-28.
- Corona, G., Tzounis, X., Assunta Dessi, M., Deiana, M., Debnam, E.S., Visioli, F. & Spencer, J.P. 2006, "The fate of olive oil polyphenols in the gastrointestinal tract: implications of gastric and colonic microflora-dependent biotransformation", *Free radical research*, vol. 40, no. 6, pp. 647-658.

- Cosgrove, K.P., Mazure, C.M. & Staley, J.K. 2007, "Evolving knowledge of sex differences in brain structure, function, and chemistry", *Biological psychiatry*, vol. 62, no. 8, pp. 847-855.
- Crawley, J. 1981, "Neuropharmacologic specificity of a simple animal model for the behavioral actions of benzodiazepines", *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, vol. 15, no. 5, pp. 695-699.
- Cummings, J.L. 2004, "Alzheimer's Disease", *N Engl J Med*, vol. 351, no. 1, pp. 56-67.
- Dajas-Bailador, F.A., Lima, P.A. & Wonnacott, S. 2000, "The  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor subtype mediates nicotine protection against NMDA excitotoxicity in primary hippocampal cultures through a  $\text{Ca}^{2+}$  dependent mechanism", *Neuropharmacology*, vol. 39, no. 13, pp. 2799-2807.
- Dalla, C., Antoniou, K., Papadopoulou-Daifoti, Z., Balthazart, J. & Bakker, J. 2005, "Male aromatase-knockout mice exhibit normal levels of activity, anxiety and "depressive-like" symptomatology", *Behavioural brain research*, vol. 163, no. 2, pp. 186-193.
- Damtoft, S., Franzyk, H. & Jensen, S.R. 1992, "Excelsioside, a secoiridoid glucoside from *Fraxinus excelsior*", *Phytochemistry*, vol. 31, no. 12, pp. 4197-4201.
- De la Puerta, R., Domínguez, M., Ruíz-Gutiérrez, V., Flavill, J.A. & Houlst, J.R.S. 2001, "Effects of virgin olive oil phenolics on scavenging of reactive nitrogen species and upon nitrenergic neurotransmission", *Life Sciences*, vol. 69, no. 10, pp. 1213-1222.
- De la Puerta, R., Gutierrez, V.R. & Houlst, J.R.S. 1999, "Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil", *Biochemical pharmacology*, vol. 57, no. 4, pp. 445-449.
- De Strooper, B., Vassar, R. & Golde, T. 2010, "The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease", *Nature Reviews Neurology*, vol. 6, no. 2, pp. 99-107.

- De Strooper, B., Iwatsubo, T. & Wolfe, M.S. 2012, "Presenilins and gamma-secretase: structure, function, and role in Alzheimer Disease", *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, vol. 2, no. 1, pp. a006304.
- Decker, M.W. & McGaugh, J.L. 1991, "The role of interactions between the cholinergic system and other neuromodulatory systems in learning and memory", *Synapse*, vol. 7, no. 2, pp. 151-168.
- Del Boccio, P., Di Deo, A., De Curtis, A., Celli, N., Iacoviello, L. & Rotilio, D. 2003, "Liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis of oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol in rat plasma and urine after oral administration", *Journal of Chromatography B*, vol. 785, no. 1, pp. 47-56.
- Desdouits-Magnen, J., Desdouits, F., Takeda, S., Syu, L., Saltiel, A.R., Buxbaum, J.D., Czernik, A.J., Nairn, A.C. & Greengard, P. 1998, "Regulation of Secretion of Alzheimer Amyloid Precursor Protein by the Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade", *Journal of neurochemistry*, vol. 70, no. 2, pp. 524-530.
- Dewachter, I. & Van Leuven, F. 2002, "Secretases as targets for the treatment of Alzheimer's disease: the prospects", *The Lancet Neurology*, vol. 1, no. 7, pp. 409-416.
- Dickson, D.W., Crystal, H.A., Bevona, C., Honer, W., Vincent, I. & Davies, P. 1995, "Correlations of synaptic and pathological markers with cognition of the elderly", *Neurobiology of aging*, vol. 16, no. 3, pp. 285-298.
- Dickson, D.W., Lee, S.C., Mattiace, L.A., Yen, S.C. & Brosnan, C. 1993, "Microglia and cytokines in neurological disease, with special reference to AIDS and Alzheimer's disease", *Glia*, vol. 7, no. 1, pp. 75-83.
- Dodart, J., Mathis, C., Bales, K.R., Paul, S.M. & Ungerer, A. 1999, "Early regional cerebral glucose hypometabolism in transgenic mice overexpressing the V717F  $\beta$ -amyloid precursor protein", *Neuroscience letters*, vol. 277, no. 1, pp. 49-52.

- Doll, R., Peto, R., Boreham, J. & Sutherland, I. 2000, "Smoking and dementia in male British doctors: prospective study", *BMJ (Clinical research ed.)*, vol. 320, no. 7242, pp. 1097-1102.
- Douglas, R.J. 1989, "Spontaneous alternation behavior and the brain" in *Spontaneous alternation behavior* Springer, , pp. 73-108.
- Duff, K., Eckman, C., Zehr, C., Yu, X., Prada, C., Perez-Tur, J., Hutton, M., Buee, L., Harigaya, Y. & Yager, D. 1996, "Increased amyloid- $\beta$ 42 (43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1", *Nature*, vol. 383, no. 6602, pp. 710-713.
- Ebneth, A., Godemann, R., Stamer, K., Illenberger, S., Trinczek, B. & Mandelkow, E. 1998, "Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease", *The Journal of cell biology*, vol. 143, no. 3, pp. 777-794.
- Eckert, A., Schindowski, K., Leutner, S., Luckhaus, C., Touchet, N., Czech, C. & Müller, W.E. 2001, "Alzheimer's disease-like alterations in peripheral cells from presenilin-1 transgenic mice", *Neurobiology of disease*, vol. 8, no. 2, pp. 331-342.
- Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J.T., Pesold, B., Steiner, H. & Haass, C. 2003, "Reconstitution of  $\gamma$ -secretase activity", *Nature cell biology*, vol. 5, no. 5, pp. 486-488.
- Edgecombe, S.C., Stretch, G.L. & Hayball, P.J. 2000, "Oleuropein, an antioxidant polyphenol from olive oil, is poorly absorbed from isolated perfused rat intestine", *The Journal of nutrition*, vol. 130, no. 12, pp. 2996-3002.
- Edland, S.D., Rocca, W.A., Petersen, R.C., Cha, R.H. & Kokmen, E. 2002, "Dementia and Alzheimer disease incidence rates do not vary by sex in Rochester, Minn", *Archives of Neurology*, vol. 59, no. 10, pp. 1589-1593.
- España, J., Giménez-Llort, L., Valero, J., Miñano, A., Rábano, A., Rodríguez-Alvarez, J., LaFerla, F.M. & Saura, C.A. 2010, "Intraneuronal  $\beta$ -amyloid accumulation in the

amygdala enhances fear and anxiety in Alzheimer's disease transgenic mice", *Biological psychiatry*, vol. 67, no. 6, pp. 513-521.

Evans, K.C., Berger, E.P., Cho, C.G., Weisgraber, K.H. & Lansbury, P.T., Jr 1995, "Apolipoprotein E is a kinetic but not a thermodynamic inhibitor of amyloid formation: implications for the pathogenesis and treatment of Alzheimer disease", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 92, no. 3, pp. 763-767.

Farlow, M.R. & Evans, R.M. 1998, "Pharmacologic treatment of cognition in Alzheimer's dementia", *Neurology*, vol. 51, no. 1 Suppl 1, pp. S36-44; discussion S65-7.

Farrer, L.A., Cupples, L.A., Haines, J.L., Hyman, B., Kukull, W.A., Mayeux, R., Myers, R.H., Pericak-Vance, M.A., Risch, N. & van Duijn, C.M. 1997, "Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease: a meta-analysis", *Jama*, vol. 278, no. 16, pp. 1349-1356.

Fassbender, K., Simons, M., Bergmann, C., Stroick, M., Lutjohann, D., Keller, P., Runz, H., Kuhl, S., Bertsch, T., von Bergmann, K., Hennerici, M., Beyreuther, K. & Hartmann, T. 2001, "Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 10, pp. 5856-5861.

Ferri, C.P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H. & Huang, Y. 2006, "Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study", *The Lancet*, vol. 366, no. 9503, pp. 2112-2117.

Filali, M., Lalonde, R., Theriault, P., Julien, C., Calon, F. & Planel, E. 2012, "Cognitive and non-cognitive behaviors in the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease expressing mutated APP, PS1, and Mapt(3xTg-AD)", *Behavioural brain research*, vol. 234, no. 2, pp. 334-342.

- Fillenbaum, G.G., Kuchibhatla, M.N., Hanlon, J.T., Artz, M.B., Pieper, C.F., Schmader, K.E., Dysken, M.W. & Gray, S.L. 2005, "Dementia and Alzheimer's disease in community-dwelling elders taking vitamin C and/or vitamin E", *The Annals of Pharmacotherapy*, vol. 39, no. 12, pp. 2009-2014.
- Fisher, A. 2008, "Cholinergic treatments with emphasis on m1 muscarinic agonists as potential disease-modifying agents for Alzheimer's disease", *Neurotherapeutics*, vol. 5, no. 3, pp. 433-442.
- Fisher, A., Brandeis, R., Bar-Ner, R.H.N., Kliger-Spatz, M., Natan, N., Sonego, H., Marcovitch, I. & Pittel, Z. 2002, "AF150 (S) and AF267B", *Journal of Molecular Neuroscience*, vol. 19, no. 1-2, pp. 145-153.
- Fleisher, A., Grundman, M., Jack, C.R., Petersen, R.C., Taylor, C., Kim, H.T., Schiller, D.H., Bagwell, V., Sencakova, D. & Weiner, M.F. 2005, "Sex, apolipoprotein E  $\epsilon$ 4 status, and hippocampal volume in mild cognitive impairment", *Archives of Neurology*, vol. 62, no. 6, pp. 953-957.
- Flood, D.G. & Coleman, P.D. 1990, "Chapter Hippocampal plasticity in normal aging and decreased plasticity in Alzheimer's disease", *Progress in brain research*, vol. 83, pp. 435-443.
- Foy, M.R., Baudry, M., Akopian, G.K. & Thompson, R.F. 2010, "Regulation of hippocampal synaptic plasticity by estrogen and progesterone", *Vitamins & Hormones*, vol. 82, pp. 219-239.
- Francis, P.T., Nordberg, A. & Arnold, S.E. 2005, "A preclinical view of cholinesterase inhibitors in neuroprotection: do they provide more than symptomatic benefits in Alzheimer's disease?", *Trends in pharmacological sciences*, vol. 26, no. 2, pp. 104-111.
- Fratiglioni, L., Small, B., Winblad, B. & Bäckman, L. 2001, "The transition from normal functioning to dementia in the aging population", *Alzheimer's disease: Advances in etiology, pathogenesis and therapeutics*, , pp. 3-10.

- Fratiglioni, L., Viitanen, M., von Strauss, E., Tontodonati, V., Herlitz, A. & Winblad, B. 1997, "Very old women at highest risk of dementia and Alzheimer's disease: incidence data from the Kungsholmen Project, Stockholm", *Neurology*, vol. 48, no. 1, pp. 132-138.
- Fukumori, A., Fluhrer, R., Steiner, H. & Haass, C. 2010, "Three-amino acid spacing of presenilin endoproteolysis suggests a general stepwise cleavage of gamma-secretase-mediated intramembrane proteolysis", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 30, no. 23, pp. 7853-7862.
- Gabuzda, D., Busciglio, J., Chen, L.B., Matsudaira, P. & Yankner, B.A. 1994, "Inhibition of energy metabolism alters the processing of amyloid precursor protein and induces a potentially amyloidogenic derivative", *The Journal of biological chemistry*, vol. 269, no. 18, pp. 13623-13628.
- Gainetdinov, R.R., Wetsel, W.C., Jones, S.R., Levin, E.D., Jaber, M. & Caron, M.G. 1999, "Role of serotonin in the paradoxical calming effect of psychostimulants on hyperactivity", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 283, no. 5400, pp. 397-401.
- Galli, G. & Caruso, D. 2002, "Biological activities and metabolic fate of olive oil phenols", *Eur.J.Lipid Sci.Technol*, vol. 104, pp. 677-684.
- Galvan, M., David, J., Delacourte, A., Luna, J. & Mena, R. 2001, "Sequence of neurofibrillary changes in aging and Alzheimer's disease: A confocal study with phospho-tau antibody, AD2", *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 3, no. 4, pp. 417-425.
- Gandy, S. 2003, "Estrogen and neurodegeneration", *Neurochemical research*, vol. 28, no. 7, pp. 1003-1008.
- Gandy, S., Almeida, O.P., Fonte, J., Lim, D., Waterrus, A., Spry, N., Flicker, L. & Martins, R.N. 2001, "Chemical andropause and amyloid- $\beta$  peptide", *Jama*, vol. 285, no. 17, pp. 2195-2196.

- Gao, S., Hendrie, H.C., Hall, K.S. & Hui, S. 1998, "The relationships between age, sex, and the incidence of dementia and Alzheimer disease: a meta-analysis", *Archives of General Psychiatry*, vol. 55, no. 9, pp. 809-815.
- García-Ovejero, D., Veiga, S., García-Segura, L.M. & DonCarlos, L.L. 2002, "Glial expression of estrogen and androgen receptors after rat brain injury", *Journal of Comparative Neurology*, vol. 450, no. 3, pp. 256-271.
- García-Segura, L.M., Chowen, J., Parducz, A. & Naftolin, F. 1994, "Gonadal hormones as promoters of structural synaptic plasticity: cellular mechanisms", *Progress in neurobiology*, vol. 44, no. 3, pp. 279-307.
- García-Villalba, R., Carrasco-Pancorbo, A., Nevedomskaya, E., Mayboroda, O.A., Deelder, A.M., Segura-Carretero, A. & Fernández-Gutiérrez, A. 2010, "Exploratory analysis of human urine by LC–ESI-TOF MS after high intake of olive oil: understanding the metabolism of polyphenols", *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 398, no. 1, pp. 463-475.
- Gearing, M., Mori, H. & Mirra, S.S. 1996, "A $\beta$ -peptide length and apolipoprotein E genotype in Alzheimer's disease", *Annals of Neurology*, vol. 39, no. 3, pp. 395-399.
- Genis, I., Fisher, A. & Michaelson, D. 1999, "Site-Specific Dephosphorylation of Tau of Apolipoprotein E-Deficient and Control Mice by M1 Muscarinic Agonist Treatment", *Journal of neurochemistry*, vol. 72, no. 1, pp. 206-213.
- German, J.B. & Walzem, R.L. 2000, "The health benefits of wine", *Annual Review of Nutrition*, vol. 20, no. 1, pp. 561-593.
- Giacobini, E., Mori, F. & Lai, C. 1996, "The Effect of Cholinesterase Inhibitors on the Secretion of APPS from Rat Brain Cortex", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 777, no. 1, pp. 393-398.
- Gibbs, R.B. 2010, "Estrogen therapy and cognition: a review of the cholinergic hypothesis", *Endocrine reviews*, vol. 31, no. 2, pp. 224-253.



- Gillett, M., Martins, R., Clarnette, R., Chubb, S., Bruce, D. & Yeap, B. 2003, "Relationship between testosterone, sex hormone binding globulin and plasma amyloid beta peptide 40 in older men with subjective memory loss or dementia", *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 5, no. 4, pp. 267-269.
- Gilman, S., Koller, M., Black, R.S., Jenkins, L., Griffith, S.G., Fox, N.C., Eisner, L., Kirby, L., Rovira, M.B., Forette, F., Orgogozo, J.M. & AN1792(QS-21)-201 Study Team 2005, "Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial", *Neurology*, vol. 64, no. 9, pp. 1553-1562.
- Gimenez-Llort, L., Blazquez, G., Canete, T., Johansson, B., Oddo, S., Tobena, A., LaFerla, F. & Fernandez-Teruel, A. 2007, "Modeling behavioral and neuronal symptoms of Alzheimer's disease in mice: a role for intraneuronal amyloid", *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, vol. 31, no. 1, pp. 125-147.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N. & James, L. 1991, "Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease", *Nature*, vol. 349, no. 6311, pp. 704-706.
- Goedert, M. & Jakes, R. 2005, "Mutations causing neurodegenerative tauopathies", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, vol. 1739, no. 2, pp. 240-250.
- Golde, T.E., Schneider, L.S. & Koo, E.H. 2011, "Anti-a $\beta$  therapeutics in Alzheimer's disease: the need for a paradigm shift", *Neuron*, vol. 69, no. 2, pp. 203-213.
- Gong, C., Liu, F., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. 2005, "Post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease", *Journal of neural transmission*, vol. 112, no. 6, pp. 813-838.
- Gore, A.C. 2008, "Developmental programming and endocrine disruptor effects on reproductive neuroendocrine systems", *Frontiers in neuroendocrinology*, vol. 29, no. 3, pp. 358-374.

- Gorski, R.A. 1985, "Sexual dimorphisms of the brain", *Journal of animal science*, vol. 61 Suppl 3, pp. 38-61.
- Gouras, G.K., Xu, H., Gross, R.S., Greenfield, J.P., Hai, B., Wang, R. & Greengard, P. 2000, "Testosterone reduces neuronal secretion of Alzheimer's beta-amyloid peptides", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 3, pp. 1202-1205.
- Green, R.C., Schneider, L.S., Amato, D.A., Beelen, A.P., Wilcock, G., Swabb, E.A., Zavitz, K.H. & Tarenflur bil Phase 3 Study Group 2009, "Effect of tarenflur bil on cognitive decline and activities of daily living in patients with mild Alzheimer disease: a randomized controlled trial", *Jama*, vol. 302, no. 23, pp. 2557-2564.
- Greenfield, J.P., Leung, L.W., Cai, D., Kaasik, K., Gross, R.S., Rodriguez-Boulan, E., Greengard, P. & Xu, H. 2002, "Estrogen lowers Alzheimer beta-amyloid generation by stimulating trans-Golgi network vesicle biogenesis", *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 14, pp. 12128-12136.
- Griffin, W.S., Stanley, L.C., Ling, C., White, L., MacLeod, V., Perrot, L.J., White, C.L., 3rd & Araoz, C. 1989, "Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 86, no. 19, pp. 7611-7615.
- Gura, T. 2008, "Hope in Alzheimer's fight emerges from unexpected places", *Nature medicine*, vol. 14, no. 9, pp. 894-894.
- Hajszan, T., MacLusky, N.J. & Leranth, C. 2008, "Role of androgens and the androgen receptor in remodeling of spine synapses in limbic brain areas", *Hormones and behavior*, vol. 53, no. 5, pp. 638-646.
- Hall, C.S. 1934, "Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality.", *Journal of Comparative Psychology*, vol. 18, no. 3, pp. 385.

- Hardy, J. 1997, "The Alzheimer family of diseases: many etiologies, one pathogenesis?", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 6, pp. 2095-2097.
- Hardy, J. & Selkoe, D.J. 2002, "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 297, no. 5580, pp. 353-356.
- Hascoët, M. & Bourin, M. 1998, "A new approach to the light/dark test procedure in mice", *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, vol. 60, no. 3, pp. 645-653.
- Hatanaka, Y., Mukai, H., Mitsuhashi, K., Hojo, Y., Murakami, G., Komatsuzaki, Y., Sato, R. & Kawato, S. 2009, "Androgen rapidly increases dendritic thorns of CA3 neurons in male rat hippocampus", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 381, no. 4, pp. 728-732.
- Hauss-Wegrzyniak, B., Dobrzanski, P., Stoehr, J.D. & Wenk, G.L. 1998, "Chronic neuroinflammation in rats reproduces components of the neurobiology of Alzheimer's disease", *Brain research*, vol. 780, no. 2, pp. 294-303.
- Henderson, V.W., Paganini-Hill, A., Emanuel, C.K., Dunn, M.E. & Buckwalter, J.G. 1994, "Estrogen replacement therapy in older women: comparisons between Alzheimer's disease cases and nondemented control subjects", *Archives of Neurology*, vol. 51, no. 9, pp. 896-900.
- Henderson, V.W., Mack, W. & Williams, B.W. 1989, "Spatial disorientation in Alzheimer's disease", *Archives of Neurology*, vol. 46, no. 4, pp. 391-394.
- Hirata-Fukae, C., Li, H., Hoe, H., Gray, A.J., Minami, S.S., Hamada, K., Niikura, T., Hua, F., Tsukagoshi-Nagai, H. & Horikoshi-Sakuraba, Y. 2008, "Females exhibit more extensive amyloid, but not tau, pathology in an Alzheimer transgenic model", *Brain research*, vol. 1216, pp. 92-103.
- Hock, C., Konietzko, U., Streffer, J.R., Tracy, J., Signorell, A., Müller-Tillmanns, B., Lemke, U., Henke, K., Moritz, E. & Garcia, E. 2003, "Antibodies against  $\beta$ -amyloid

slow cognitive decline in Alzheimer's disease", *Neuron*, vol. 38, no. 4, pp. 547-554.

Hogervorst, E., Williams, J., Budge, M., Barnetson, L., Combrinck, M. & Smith, A.D. 2001, "Serum total testosterone is lower in men with Alzheimer's disease", *Neuroendocrinology letters*, vol. 22, no. 3, pp. 163-168.

Holtzman, D.M., Bales, K.R., Wu, S., Bhat, P., Parsadanian, M., Fagan, A.M., Chang, L.K., Sun, Y. & Paul, S.M. 1999, "Expression of human apolipoprotein E reduces amyloid-beta deposition in a mouse model of Alzheimer's disease", *The Journal of clinical investigation*, vol. 103, no. 6, pp. R15-R21.

Hooper, N., Fraser, C. & Stone, T.W. 1996, "Effects of purine analogues on spontaneous alternation in mice", *Psychopharmacology*, vol. 123, no. 3, pp. 250-257.

Hoover, B.R., Reed, M.N., Su, J., Penrod, R.D., Kotilinek, L.A., Grant, M.K., Pitstick, R., Carlson, G.A., Lanier, L.M. & Yuan, L. 2010, "Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration", *Neuron*, vol. 68, no. 6, pp. 1067-1081.

Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F. & Cole, G. 1996, "Correlative memory deficits, A $\beta$  elevation, and amyloid plaques in transgenic mice", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 274, no. 5284, pp. 99-102.

Huang, Y. & Mucke, L. 2012, "Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies", *Cell*, vol. 148, no. 6, pp. 1204-1222.

Hughes, R. 1982, "A review of atropinic drug effects on exploratory choice behavior in laboratory rodents", *Behavioral and neural biology*, vol. 34, no. 1, pp. 5-41.

Hughes, R.N. 2004, "The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory", *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, vol. 28, no. 5, pp. 497-505.

- Huppenbauer, C.B., Tanzer, L., DonCarlos, L.L. & Jones, K.J. 2005, "Gonadal steroid attenuation of developing hamster facial motoneuron loss by axotomy: equal efficacy of testosterone, dihydrotestosterone, and 17-beta estradiol", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 25, no. 16, pp. 4004-4013.
- Hwang, T.J., Masterman, D.L., Ortiz, F., Fairbanks, L.A. & Cummings, J.L. 2004, "Mild cognitive impairment is associated with characteristic neuropsychiatric symptoms", *Alzheimer Disease & Associated Disorders*, vol. 18, no. 1, pp. 17-21.
- Impellizzeri, D., Esposito, E., Mazzon, E., Paterniti, I., Di Paola, R., Bramanti, P., Morittu, V.M., Procopio, A., Perri, E. & Britti, D. 2012, "The effects of a polyphenol present in olive oil, oleuropein aglycone, in an experimental model of spinal cord injury in mice", *Biochemical pharmacology*, vol. 83, no. 10, pp. 1413-1426.
- Jaffe, A.B., Toran-Allerand, C.D., Greengard, P. & Gandy, S.E. 1994, "Estrogen regulates metabolism of Alzheimer amyloid beta precursor protein", *The Journal of biological chemistry*, vol. 269, no. 18, pp. 13065-13068.
- Jama, J.W., Launer, L.J., Witteman, J.C., den Breeijen, J.H., Breteler, M.M., Grobbee, D.E. & Hofman, A. 1996, "Dietary antioxidants and cognitive function in a population-based sample of older persons. The Rotterdam Study", *American Journal of Epidemiology*, vol. 144, no. 3, pp. 275-280.
- Jick, H., Zornberg, G.L., Jick, S.S., Seshadri, S. & Drachman, D.A. 2000, "Statins and the risk of dementia", *The Lancet*, vol. 356, no. 9242, pp. 1627-1631.
- John, V., Beck, J.P., Bienkowski, M.J., Sinha, S. & Heinrikson, R.L. 2003, "Human  $\beta$ -secretase (BACE) and BACE inhibitors", *Journal of medicinal chemistry*, vol. 46, no. 22, pp. 4625-4630.
- Jonnala, R.R., Terry Jr, A.V. & Buccafusco, J.J. 2002, "Nicotine increases the expression of high affinity nerve growth factor receptors in both in vitro and in vivo", *Life Sciences*, vol. 70, no. 13, pp. 1543-1554.

- Jorm, A., Korten, A. & Henderson, A. 1987, "The prevalence of dementia: a quantitative integration of the literature", *Acta Psychiatrica Scandinavica*, vol. 76, no. 5, pp. 465-479.
- Jorm, A.F. & Jolley, D. 1998, "The incidence of dementia: a meta-analysis", *Neurology*, vol. 51, no. 3, pp. 728-733.
- Karran, E., Mercken, M. & De Strooper, B. 2011, "The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics", *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 10, no. 9, pp. 698-712.
- Kawas, C., Resnick, S., Morrison, A., Brookmeyer, R., Corrada, M., Zonderman, A., Bacal, C., Lingle, D.D. & Metter, E. 1997, "A prospective study of estrogen replacement therapy and the risk of developing Alzheimer's disease: the Baltimore Longitudinal Study of Aging", *Neurology*, vol. 48, no. 6, pp. 1517-1521.
- Kawashima, S. & Takagi, K. 1994, "Role of sex steroids on the survival, neuritic outgrowth of neurons, and dopamine neurons in cultured preoptic area and hypothalamus", *Hormones and behavior*, vol. 28, no. 4, pp. 305-312.
- Kilander, L., Nyman, H., Boberg, M. & Lithell, H. 2000, "The association between low diastolic blood pressure in middle age and cognitive function in old age. A population-based study", *Age and Ageing*, vol. 29, no. 3, pp. 243-248.
- Kimberly, W.T., LaVoie, M.J., Ostaszewski, B.L., Ye, W., Wolfe, M.S. & Selkoe, D.J. 2003, "Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 11, pp. 6382-6387.
- Kimura, T., Whitcomb, D.J., Jo, J., Regan, P., Piers, T., Heo, S., Brown, C., Hashikawa, T., Murayama, M., Seok, H., Sotiropoulos, I., Kim, E., Collingridge, G.L., Takashima, A. & Cho, K. 2013, "Microtubule-associated protein tau is essential for long-term depression in the hippocampus", *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, vol. 369, no. 1633, pp. 20130144.

- King, M.E., Kan, H.M., Baas, P.W., Erisir, A., Glabe, C.G. & Bloom, G.S. 2006, "Tau-dependent microtubule disassembly initiated by prefibrillar beta-amyloid", *The Journal of cell biology*, vol. 175, no. 4, pp. 541-546.
- Kokras, N. & Dalla, C. 2014, "Sex Differences in Animal Models of Psychiatric Disorders", *British journal of pharmacology*, vol. 171, no. 20, pp. 4595-4619.
- Kokras, N., Dalla, C., Sideris, A.C., Dendi, A., Mikail, H.G., Antoniou, K. & Papadopoulou-Daifoti, Z. 2012, "Behavioral sexual dimorphism in models of anxiety and depression due to changes in HPA axis activity", *Neuropharmacology*, vol. 62, no. 1, pp. 436-445.
- Kopan, R. & Ilagan, M.X.G. 2004, " $\gamma$ -secretase: proteasome of the membrane?", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 5, no. 6, pp. 499-504.
- Koponen, S., Taiminen, T., Kairisto, V., Portin, R., Isoniemi, H., Hinkka, S. & Tenovuo, O. 2004, "APOE-epsilon4 predicts dementia but not other psychiatric disorders after traumatic brain injury", *Neurology*, vol. 63, no. 4, pp. 749-750.
- Kornhuber, J., Bormann, J., Retz, W., Hübers, M. & Riederer, P. 1989, "Memantine displaces [<sup>3</sup>H] MK-801 at therapeutic concentrations in postmortem human frontal cortex", *European journal of pharmacology*, vol. 166, no. 3, pp. 589-590.
- Kostomoiri, M., Fragkouli, A., Sagnou, M., Skaltsounis, L.A., Pelecanou, M., Tsilibary, E.C. & Tzinia, A.K. 2013, "Oleuropein, an anti-oxidant polyphenol constituent of olive promotes  $\alpha$ -secretase cleavage of the amyloid precursor protein (A $\beta$ PP)", *Cellular and molecular neurobiology*, vol. 33, no. 1, pp. 147-154.
- Kotilinek, L.A., Bacskai, B., Westerman, M., Kawarabayashi, T., Younkin, L., Hyman, B.T., Younkin, S. & Ashe, K.H. 2002, "Reversible memory loss in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 22, no. 15, pp. 6331-6335.

- Kowall, N.W. & Kosik, K.S. 1987, "Axonal disruption and aberrant localization of tau protein characterize the neuropil pathology of Alzheimer's disease", *Annals of Neurology*, vol. 22, no. 5, pp. 639-643.
- Krishnan, K.R.R., Charles, H.C., Doraiswamy, P.M., Mintzer, J., Weisler, R., Yu, X., Perdomo, C., Ieni, J.R. & Rogers, S. 2003, "Randomized, placebo-controlled trial of the effects of donepezil on neuronal markers and hippocampal volumes in Alzheimer's disease", *American Journal of Psychiatry*, vol. 160, no. 11.
- Krohmer, R.W. & Baum, M.J. 1989, "Effect of sex, intrauterine position and androgen manipulation on the development of brain aromatase activity in fetal ferrets", *Journal of neuroendocrinology*, vol. 1, no. 4, pp. 265-271.
- Kuret, J., Congdon, E.E., Li, G., Yin, H., Yu, X. & Zhong, Q. 2005, "Evaluating triggers and enhancers of tau fibrillization", *Microscopy research and technique*, vol. 67, no. 3-4, pp. 141-155.
- Kuret, J., Congdon, E.E., Li, G., Yin, H., Yu, X. & Zhong, Q. 2005, "Evaluating triggers and enhancers of tau fibrillization", *Microscopy research and technique*, vol. 67, no. 3-4, pp. 141-155.
- Le, Y., Gong, W., Tiffany, H.L., Tumanov, A., Nedospasov, S., Shen, W., Dunlop, N.M., Gao, J.L., Murphy, P.M., Oppenheim, J.J. & Wang, J.M. 2001, "Amyloid (beta)42 activates a G-protein-coupled chemoattractant receptor, FPR-like-1", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 21, no. 2, pp. RC123.
- Ledesma, M.D., Bonay, P., Colaco, C. & Avila, J. 1994, "Analysis of microtubule-associated protein tau glycation in paired helical filaments", *The Journal of biological chemistry*, vol. 269, no. 34, pp. 21614-21619.
- Lee, H., Perry, G., Moreira, P.I., Garrett, M.R., Liu, Q., Zhu, X., Takeda, A., Nunomura, A. & Smith, M.A. 2005, "Tau phosphorylation in Alzheimer's disease: pathogen or protector?", *Trends in molecular medicine*, vol. 11, no. 4, pp. 164-169.



- Liang, K., Yang, L., Yin, C., Xiao, Z., Zhang, J., Liu, Y. & Huang, J. 2010, "Estrogen stimulates degradation of beta-amyloid peptide by up-regulating neprilysin", *The Journal of biological chemistry*, vol. 285, no. 2, pp. 935-942.
- Lindwall, G. & Cole, R.D. 1984, "Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly", *The Journal of biological chemistry*, vol. 259, no. 8, pp. 5301-5305.
- Lopez, O.L., Becker, J.T., Wahed, A.S., Saxton, J., Sweet, R.A., Wolk, D.A., Klunk, W. & Dekosky, S.T. 2009, "Long-term effects of the concomitant use of memantine with cholinesterase inhibition in Alzheimer disease", *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, vol. 80, no. 6, pp. 600-607.
- Lopez, O.L., Becker, J.T., Wisniewski, S., Saxton, J., Kaufer, D.I. & DeKosky, S.T. 2002, "Cholinesterase inhibitor treatment alters the natural history of Alzheimer's disease", *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, vol. 72, no. 3, pp. 310-314.
- Luchsinger, J.A., Tang, M.X., Stern, Y., Shea, S. & Mayeux, R. 2001, "Diabetes mellitus and risk of Alzheimer's disease and dementia with stroke in a multiethnic cohort", *American Journal of Epidemiology*, vol. 154, no. 7, pp. 635-641.
- Lustig, R.H. 1994, "Sex hormone modulation of neural development in vitro", *Hormones and behavior*, vol. 28, no. 4, pp. 383-395.
- Lyketsos, C.G., Lopez, O., Jones, B., Fitzpatrick, A.L., Breitner, J. & DeKosky, S. 2002, "Prevalence of neuropsychiatric symptoms in dementia and mild cognitive impairment: results from the cardiovascular health study", *Jama*, vol. 288, no. 12, pp. 1475-1483.
- Ma, J., Yee, A., Brewer, H.B., Das, S. & Potter, H. 1994, "Amyloid-associated proteins  $\alpha$ 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer  $\beta$ -protein into filaments", .
- MacLusky, N.J., Hajszan, T. & Leranath, C. 2004, "Effects of dehydroepiandrosterone and flutamide on hippocampal CA1 spine synapse density in male and female

rats: implications for the role of androgens in maintenance of hippocampal structure", *Endocrinology*, vol. 145, no. 9, pp. 4154-4161.

Mahley, R.W. 1988, "Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 240, no. 4852, pp. 622-630.

Manly, J.J., Merchant, C.A., Jacobs, D.M., Small, S.A., Bell, K., Ferin, M. & Mayeux, R. 2000, "Endogenous estrogen levels and Alzheimer's disease among postmenopausal women", *Neurology*, vol. 54, no. 4, pp. 833-837.

Manna, C., Galletti, P., Maisto, G., Cucciolla, V., D'Angelo, S. & Zappia, V. 2000, "Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol in Caco-2 cells", *FEBS letters*, vol. 470, no. 3, pp. 341-344.

Manna, C., Migliardi, V., Golino, P., Scognamiglio, A., Galletti, P., Chiariello, M. & Zappia, V. 2004, "Oleuropein prevents oxidative myocardial injury induced by ischemia and reperfusion", *The Journal of nutritional biochemistry*, vol. 15, no. 8, pp. 461-466.

Manthey, D., Heck, S., Engert, S. & Behl, C. 2001, "Estrogen induces a rapid secretion of amyloid  $\beta$  precursor protein via the mitogen-activated protein kinase pathway", *European Journal of Biochemistry*, vol. 268, no. 15, pp. 4285-4291.

Mapstone, M., Steffenella, T.M. & Duffy, C.J. 2003, "A visuospatial variant of mild cognitive impairment: getting lost between aging and AD", *Neurology*, vol. 60, no. 5, pp. 802-808.

Marron, T., Guerini, V., Rusmini, P., Sau, D., Brevini, T., Martini, L. & Poletti, A. 2005, "Androgen-induced neurite outgrowth is mediated by neuritin in motor neurones", *Journal of neurochemistry*, vol. 92, no. 1, pp. 10-20.

Masliah, E., Mallory, M., Alford, M., DeTeresa, R., Hansen, L.A., McKeel, D.W., Jr & Morris, J.C. 2001, "Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease", *Neurology*, vol. 56, no. 1, pp. 127-129.

- Matsumoto, A. 2001, "Androgen stimulates neuronal plasticity in the perineal motoneurons of aged male rats", *Journal of Comparative Neurology*, vol. 430, no. 3, pp. 389-395.
- Mattson, M.P. 2004, "Pathways towards and away from Alzheimer's disease", *Nature*, vol. 430, no. 7000, pp. 631-639.
- Mattson, M.P. & Chan, S.L. 2003, "Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease", *Cell calcium*, vol. 34, no. 4, pp. 385-397.
- Maurice, T., Lockhart, B.P., Su, T. & Privat, A. 1996, "Reversion of  $\beta$ -25-35-amyloid peptide-induced amnesia by NMDA receptor-associated glycine site agonists", *Brain research*, vol. 731, no. 1, pp. 249-253.
- Mayeux, R. & Stern, Y. 2012, "Epidemiology of Alzheimer disease", *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, vol. 2, no. 8, pp. 10.1101/cshperspect.a006239.
- Mazanetz, M.P. & Fischer, P.M. 2007, "Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases", *Nature reviews Drug discovery*, vol. 6, no. 6, pp. 464-479.
- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D. & Stadlan, E.M. 1984, "Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease", *Neurology*, vol. 34, no. 7, pp. 939-944.
- McLaurin, J., Cecal, R., Kierstead, M., Tian, X., Phinney, A., Manea, M., French, J., Lambermon, M., Darabie, A. & Brown, M. 2002, "Therapeutically effective antibodies against amyloid- $\beta$  peptide target amyloid- $\beta$  residues 4-10 and inhibit cytotoxicity and fibrillogenesis", *Nature medicine*, vol. 8, no. 11, pp. 1263-1269.
- Mega, M.S., Cummings, J.L., Fiorello, T. & Gornbein, J. 1996, "The spectrum of behavioral changes in Alzheimer's disease", *Neurology*, vol. 46, no. 1, pp. 130-135.

- Misztal, M., Frankiewicz, T., Parsons, C.G. & Danysz, W. 1996, "Learning deficits induced by chronic intraventricular infusion of quinolinic acid—protection by MK-801 and memantine", *European journal of pharmacology*, vol. 296, no. 1, pp. 1-8.
- Mitchell, T.W., Nissanov, J., Han, L.Y., Mufson, E.J., Schneider, J.A., Cochran, E.J., Bennett, D.A., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q. & Arnold, S.E. 2000, "Novel method to quantify neuropil threads in brains from elders with or without cognitive impairment", *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, vol. 48, no. 12, pp. 1627-1638.
- Moffat, S.D., Zonderman, A.B., Metter, E.J., Kawas, C., Blackman, M.R., Harman, S.M. & Resnick, S.M. 2004, "Free testosterone and risk for Alzheimer disease in older men", *Neurology*, vol. 62, no. 2, pp. 188-193.
- Moghaddam, B. & Adams, B.W. 1998, "Reversal of phencyclidine effects by a group II metabotropic glutamate receptor agonist in rats", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 281, no. 5381, pp. 1349-1352.
- Mohn, A.R., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G. & Koller, B.H. 1999, "Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia", *Cell*, vol. 98, no. 4, pp. 427-436.
- Mölsä, P.K., Marttila, R.J. & Rinne, U.K. 1982, "Epidemiology of dementia in a Finnish population", *Acta Neurologica Scandinavica*, vol. 65, no. 6, pp. 541-552.
- Monacelli, A.M., Cushman, L.A., Kavcic, V. & Duffy, C.J. 2003, "Spatial disorientation in Alzheimer's disease: the remembrance of things passed", *Neurology*, vol. 61, no. 11, pp. 1491-1497.
- Mondragon-Rodriguez, S., Trillaud-Doppia, E., Dudilot, A., Bourgeois, C., Lauzon, M., Leclerc, N. & Boehm, J. 2012, "Interaction of endogenous tau protein with synaptic proteins is regulated by N-methyl-D-aspartate receptor-dependent tau phosphorylation", *The Journal of biological chemistry*, vol. 287, no. 38, pp. 32040-32053.

- Moosmann, B. & Behl, C. 1999, "The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no. 16, pp. 8867-8872.
- Moreira, P.I., Smith, M.A., Zhu, X., Nunomura, A., Castellani, R.J. & Perry, G. 2005, "Oxidative stress and neurodegeneration", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1043, no. 1, pp. 545-552.
- Mori, F., Lai, C., Fusi, F. & Giacobini, E. 1995, "Cholinesterase inhibitors increase secretion of APPs in rat brain cortex", *Neuroreport*, vol. 6, no. 4, pp. 633-636.
- Mori, E., Hashimoto, M., Krishnan, K.R. & Doraiswamy, P.M. 2006, "What constitutes clinical evidence for neuroprotection in Alzheimer disease: support for the cholinesterase inhibitors?", *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, vol. 20, no. 2 Suppl 1, pp. S19-26.
- Mori, H., Kondo, J. & Ihara, Y. 1987, "Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 235, no. 4796, pp. 1641-1644.
- Morris, M.C., Evans, D.A., Bienias, J.L., Tangney, C.C., Bennett, D.A., Aggarwal, N., Schneider, J. & Wilson, R.S. 2003, "Dietary fats and the risk of incident Alzheimer disease", *Archives of Neurology*, vol. 60, no. 2, pp. 194-200.
- Morris, M., Maeda, S., Vessel, K. & Mucke, L. 2011, "The many faces of tau", *Neuron*, vol. 70, no. 3, pp. 410-426.
- Müller, D.M., Mendla, K., Farber, S.A. & Nitsch, R.M. 1997, "Muscarinic M1 receptor agonists increase the secretion of the amyloid precursor protein ectodomain", *Life Sciences*, vol. 60, no. 13, pp. 985-991.
- Mulugeta, E., Karlsson, E., Islam, A., Kalaria, R., Mangat, H., Winblad, B. & Adem, A. 2003, "Loss of muscarinic M<sub>4</sub> receptors in hippocampus of Alzheimer patients", *Brain research*, vol. 960, no. 1, pp. 259-262.

- Nacharaju, P., Lewis, J., Easson, C., Yen, S., Hackett, J., Hutton, M. & Yen, S. 1999, "Accelerated filament formation from tau protein with specific FTDP-17 missense mutations", *FEBS letters*, vol. 447, no. 2, pp. 195-199.
- Nakai, M., Kawamata, T., Taniguchi, T., Maeda, K. & Tanaka, C. 1996, "Expression of apolipoprotein E mRNA in rat microglia", *Neuroscience letters*, vol. 211, no. 1, pp. 41-44.
- Nathan, B.P., Bellosta, S., Sanan, D.A., Weisgraber, K.H., Mahley, R.W. & Pitas, R.E. 1994, "Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 264, no. 5160, pp. 850-852.
- Nordberg, A. 2006, "Mechanisms behind the neuroprotective actions of cholinesterase inhibitors in Alzheimer disease", *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, vol. 20, no. 2 Suppl 1, pp. S12-8.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y. & LaFerla, F.M. 2003, "Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A $\beta$  and synaptic dysfunction", *Neuron*, vol. 39, no. 3, pp. 409-421.
- Omar, S.H. 2010, "Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive", *Saudi Pharmaceutical Journal*, vol. 18, no. 3, pp. 111-121.
- Paganini-Hill, A. & Henderson, V.W. 1996, "Estrogen replacement therapy and risk of Alzheimer disease", *Archives of Internal Medicine*, vol. 156, no. 19, pp. 2213-2217.
- Panza, F., Solfrizzi, V., Colacicco, A., D'introno, A., Capurso, C., Torres, F., Del Parigi, A., Capurso, S. & Capurso, A. 2004, "Mediterranean diet and cognitive decline", *Public health nutrition*, vol. 7, no. 07, pp. 959-963.
- Parsons, C., Danysz, W. & Quack, G. 1999, "Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor antagonist—a review of preclinical data", *Neuropharmacology*, vol. 38, no. 6, pp. 735-767.

- Pendlebury, S.T. & Rothwell, P.M. 2009, "Prevalence, incidence, and factors associated with pre-stroke and post-stroke dementia: a systematic review and meta-analysis", *The Lancet Neurology*, vol. 8, no. 11, pp. 1006-1018.
- Perrig, W.J., Perrig, P. & Stahelin, H.B. 1997, "The relation between antioxidants and memory performance in the old and very old", *Journal of the American Geriatrics Society*, vol. 45, no. 6, pp. 718-724.
- Perry, E., Walker, M., Grace, J. & Perry, R. 1999, "Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness?", *Trends in neurosciences*, vol. 22, no. 6, pp. 273-280.
- Petersen, R.C., Thomas, R.G., Grundman, M., Bennett, D., Doody, R., Ferris, S., Galasko, D., Jin, S., Kaye, J. & Levey, A. 2005, "Vitamin E and donepezil for the treatment of mild cognitive impairment", *New England Journal of Medicine*, vol. 352, no. 23, pp. 2379-2388.
- Pike, C.J., Carroll, J.C., Rosario, E.R. & Barron, A.M. 2009, "Protective actions of sex steroid hormones in Alzheimer's disease", *Frontiers in neuroendocrinology*, vol. 30, no. 2, pp. 239-258.
- Plump, A.S. & Breslow, J.L. 1995, "Apolipoprotein E and the apolipoprotein E-deficient mouse", *Annual Review of Nutrition*, vol. 15, no. 1, pp. 495-518.
- Pooler, A.M., Noble, W. & Hanger, D.P. 2014, "A role for tau at the synapse in Alzheimer's disease pathogenesis", *Neuropharmacology*, vol. 76, pp. 1-8.
- Pouliot, W.A., Handa, R.J. & Beck, S.G. 1996, "Androgen modulates N-methyl-D-aspartate-mediated depolarization in CA1 hippocampal pyramidal cells", *Synapse*, vol. 23, no. 1, pp. 10-19.
- Profenno, L.A., Porsteinsson, A.P. & Faraone, S.V. 2010, "Meta-analysis of Alzheimer's disease risk with obesity, diabetes, and related disorders", *Biological psychiatry*, vol. 67, no. 6, pp. 505-512.

- Prut, L. & Belzung, C. 2003, "The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review", *European journal of pharmacology*, vol. 463, no. 1, pp. 3-33.
- Puglielli, L., Konopka, G., Pack-Chung, E., Ingano, L.A.M., Berezovska, O., Hyman, B.T., Chang, T.Y., Tanzi, R.E. & Kovacs, D.M. 2001, "Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase modulates the generation of the amyloid  $\beta$ -peptide", *Nature cell biology*, vol. 3, no. 10, pp. 905-912.
- Racchi, M., Mazzucchelli, M., Porrello, E., Lanni, C. & Govoni, S. 2004, "Acetylcholinesterase inhibitors: novel activities of old molecules", *Pharmacological Research*, vol. 50, no. 4, pp. 441-451.
- Ragozzino, M.E., Unick, K.E. & Gold, P.E. 1996, "Hippocampal acetylcholine release during memory testing in rats: augmentation by glucose", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, no. 10, pp. 4693-4698.
- Reisberg, B., Doody, R., Stöffler, A., Schmitt, F., Ferris, S. & Möbius, H.J. 2003, "Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease", *New England Journal of Medicine*, vol. 348, no. 14, pp. 1333-1341.
- Rentesi, G., Antoniou, K., Marselos, M., Fotopoulos, A., Alboycharali, J. & Konstandi, M. 2010, "Long-term consequences of early maternal deprivation in serotonergic activity and HPA function in adult rat", *Neuroscience letters*, vol. 480, no. 1, pp. 7-11.
- Roberds, S.L., Anderson, J., Basi, G., Bienkowski, M.J., Branstetter, D.G., Chen, K.S., Freedman, S.B., Frigon, N.L., Games, D., Hu, K., Johnson-Wood, K., Kappenman, K.E., Kawabe, T.T., Kola, I., Kuehn, R., Lee, M., Liu, W., Motter, R., Nichols, N.F., Power, M., Robertson, D.W., Schenk, D., Schoor, M., Shopp, G.M., Shuck, M.E., Sinha, S., Svensson, K.A., Tatsuno, G., Tintrup, H., Wijsman, J., Wright, S. & McConlogue, L. 2001, "BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics", *Human molecular genetics*, vol. 10, no. 12, pp. 1317-1324.



- Roberts, W.W., Dember, W.N. & Brodwick, M. 1962, "Alternation and exploration in rats with hippocampal lesions.", *Journal of comparative and physiological psychology*, vol. 55, no. 5, pp. 695.
- Rosario, E.R., Chang, L., Head, E.H., Stanczyk, F.Z. & Pike, C.J. 2011, "Brain levels of sex steroid hormones in men and women during normal aging and in Alzheimer's disease", *Neurobiology of aging*, vol. 32, no. 4, pp. 604-613.
- Rosario, E.R., Chang, L., Stanczyk, F.Z. & Pike, C.J. 2004, "Age-related testosterone depletion and the development of Alzheimer disease", *Jama*, vol. 292, no. 12, pp. 1431-1432.
- Rottkamp, C.A., Nunomura, A., Hirai, K., Sayre, L.M., Perry, G. & Smith, M.A. 2000, "Will antioxidants fulfill their expectations for the treatment of Alzheimer disease?", *Mechanisms of ageing and development*, vol. 116, no. 2, pp. 169-179.
- Rovio, S., Kåreholt, I., Helkala, E., Viitanen, M., Winblad, B., Tuomilehto, J., Soininen, H., Nissinen, A. & Kivipelto, M. 2005, "Leisure-time physical activity at midlife and the risk of dementia and Alzheimer's disease", *The Lancet Neurology*, vol. 4, no. 11, pp. 705-711.
- Ruitenbergh, A., Ott, A., van Swieten, J.C., Hofman, A. & Breteler, M. 2001, "Incidence of dementia: does gender make a difference?", *Neurobiology of aging*, vol. 22, no. 4, pp. 575-580.
- Sabbagh, M.N., Farlow, M.R., Relkin, N. & Beach, T.G. 2006, "Do cholinergic therapies have disease-modifying effects in Alzheimer's disease?", *Alzheimer's & Dementia*, vol. 2, no. 2, pp. 118-125.
- Sadot, E., Gurwitz, D., Barg, J., Behar, L., Ginzburg, I. & Fisher, A. 1996, "Activation of m1 muscarinic acetylcholine receptor regulates  $\tau$  phosphorylation in transfected PC12 cells", *Journal of neurochemistry*, vol. 66, no. 2, pp. 877-880.
- Saito, K., Elce, J.S., Hamos, J.E. & Nixon, R.A. 1993, "Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: a potential molecular basis for neuronal degeneration", *Proceedings of the*

*National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 90, no. 7, pp. 2628-2632.

Sandberg, G., Stewart, W., Smialek, J. & Troncoso, J.C. 2001, "The prevalence of the neuropathological lesions of Alzheimer's disease is independent of race and gender", *Neurobiology of aging*, vol. 22, no. 2, pp. 169-175.

Scarmeas, N., Stern, Y., Mayeux, R. & Luchsinger, J.A. 2006, "Mediterranean diet, Alzheimer disease, and vascular mediation", *Archives of Neurology*, vol. 63, no. 12, pp. 1709-1717.

Scheff, S.W., Scott, S.A. & DeKosky, S.T. 1991, "Quantitation of synaptic density in the septal nuclei of young and aged Fischer 344 rats", *Neurobiology of aging*, vol. 12, no. 1, pp. 3-12.

Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K. & Khan, K. 1999, "Immunization with amyloid- $\beta$  attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse", *Nature*, vol. 400, no. 6740, pp. 173-177.

Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T., Hardy, J., Hutton, M. & Kukull, W. 1996, "Secreted amyloid b-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease", *Nature medicine*, vol. 2, no. 8, pp. 864-870.

Schirmer, R.H., Adler, H., Pickhardt, M. & Mandelkow, E. 2011, "Lest we forget you—methylene blue...", *Neurobiology of aging*, vol. 32, no. 12, pp. 2325. e7-2325. e16.

Schmechel, D.E., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Crain, B.J., Hulette, C.M., Joo, S.H., Pericak-Vance, M.A., Goldgaber, D. & Roses, A.D. 1993, "Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease", *Proceedings of the National*

*Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 90, no. 20, pp. 9649-9653.

Schor, N.F. 2011, "What the halted phase III  $\gamma$ -secretase inhibitor trial may (or may not) be telling us", *Annals of Neurology*, vol. 69, no. 2, pp. 237-239.

Schulz, K. & Korz, V. 2010, "Hippocampal testosterone relates to reference memory performance and synaptic plasticity in male rats", *Frontiers in behavioral neuroscience*, vol. 4, pp. 187.

Schwarzman, A.L., Gregori, L., Vitek, M.P., Lyubski, S., Strittmatter, W.J., Enghilde, J.J., Bhasin, R., Silverman, J., Weisgraber, K.H. & Coyle, P.K. 1994, "Transthyretin sequesters amyloid beta protein and prevents amyloid formation", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 91, no. 18, pp. 8368-8372.

Schweers, O., Mandelkow, E.M., Biernat, J. & Mandelkow, E. 1995, "Oxidation of cysteine-322 in the repeat domain of microtubule-associated protein tau controls the in vitro assembly of paired helical filaments", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 92, no. 18, pp. 8463-8467.

Selkoe, D.J. 2001, "Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy", *Physiological Reviews*, vol. 81, no. 2, pp. 741-766.

Serra, A., Rubió, L., Borràs, X., Macià, A., Romero, M. & Motilva, M. 2012, "Distribution of olive oil phenolic compounds in rat tissues after administration of a phenolic extract from olive cake", *Molecular nutrition & food research*, vol. 56, no. 3, pp. 486-496.

Shah, R.S., Lee, H., Xiongwei, Z., Perry, G., Smith, M.A. & Castellani, R.J. 2008, "Current approaches in the treatment of Alzheimer's disease", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 62, no. 4, pp. 199-207.

Shepherd, J., Blauw, G.J., Murphy, M.B., Bollen, E.L., Buckley, B.M., Cobbe, S.M., Ford, I., Gaw, A., Hyland, M. & Jukema, J.W. 2002, "Pravastatin in elderly

individuals at risk of vascular disease (PROSPER): a randomised controlled trial", *The Lancet*, vol. 360, no. 9346, pp. 1623-1630.

Shimabukuro, J., Awata, S. & Matsuoka, H. 2005, "Behavioral and psychological symptoms of dementia characteristic of mild Alzheimer patients", *Psychiatry and clinical neurosciences*, vol. 59, no. 3, pp. 274-279.

Simon, P., Dupuis, R. & Costentin, J. 1994, "Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions", *Behavioural brain research*, vol. 61, no. 1, pp. 59-64.

Simons, M., Keller, P., De Strooper, B., Beyreuther, K., Dotti, C.G. & Simons, K. 1998, "Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 11, pp. 6460-6464.

Simpkins, J.W. & Dykens, J.A. 2008, "Mitochondrial mechanisms of estrogen neuroprotection", *Brain Research Reviews*, vol. 57, no. 2, pp. 421-430.

Sinforiani, E., Citterio, A., Zucchell, C., Bono, G., Corbetta, S., Merlo, P. & Mauri, M. 2010, "Impact of Gender Differences on the Outcome of Alzheimer's Disease", *Dementia and geriatric cognitive disorders*, vol. 30, no. 2, pp. 147-154.

Slob, A.K., Ooms, M.P. & Vreeburg, J.T. 1980, "Prenatal and early postnatal sex differences in plasma and gonadal testosterone and plasma luteinizing hormone in female and male rats", *The Journal of endocrinology*, vol. 87, no. 1, pp. 81-87.

Sparks, D.L., Sabbagh, M.N., Connor, D.J., Lopez, J., Launer, L.J., Browne, P., Wasser, D., Johnson-Traver, S., Lochhead, J. & Ziolkowski, C. 2005, "Atorvastatin for the treatment of mild to moderate Alzheimer disease: preliminary results", *Archives of Neurology*, vol. 62, no. 5, pp. 753-757.

Sperling, R.A., Jack Jr, C.R., Black, S.E., Frosch, M.P., Greenberg, S.M., Hyman, B.T., Scheltens, P., Carrillo, M.C., Thies, W. & Bednar, M.M. 2011, "Amyloid-related imaging abnormalities in amyloid-modifying therapeutic trials:

recommendations from the Alzheimer's Association Research Roundtable Workgroup", *Alzheimer's & Dementia*, vol. 7, no. 4, pp. 367-385.

Sterniczuk, R., Antle, M.C., LaFerla, F.M. & Dyck, R.H. 2010, "Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: part 2. Behavioral and cognitive changes", *Brain research*, vol. 1348, pp. 149-155.

Steru, L., Chermat, R., Thierry, B. & Simon, P. 1985, "The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice", *Psychopharmacology*, vol. 85, no. 3, pp. 367-370.

Stone, D.J., Rozovsky, I., Morgan, T.E., Anderson, C.P., Hajian, H. & Finch, C.E. 1997, "Astrocytes and Microglia Respond to Estrogen with Increased apoE mRNA<sup>in Vivo</sup> and<sup>in Vitro</sup>", *Experimental neurology*, vol. 143, no. 2, pp. 313-318.

Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S. & Roses, A.D. 1993, "Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 90, no. 5, pp. 1977-1981.

Suzuki, S., Brown, C.M. & Wise, P.M. 2009, "Neuroprotective effects of estrogens following ischemic stroke", *Frontiers in neuroendocrinology*, vol. 30, no. 2, pp. 201-211.

Sydow, A., Van der Jeugd, A., Zheng, F., Ahmed, T., Balschun, D., Petrova, O., Drexler, D., Zhou, L., Rune, G., Mandelkow, E., D'Hooge, R., Alzheimer, C. & Mandelkow, E.M. 2011, "Tau-induced defects in synaptic plasticity, learning, and memory are reversible in transgenic mice after switching off the toxic Tau mutant", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 31, no. 7, pp. 2511-2525.

Sze, C., Troncoso, J.C., Kawas, C., Mouton, P., Price, D.L. & Martin, L.J. 1997, "Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with

cognitive decline in Alzheimer disease", *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, vol. 56, no. 8, pp. 933-944.

Takasugi, N., Tomita, T., Hayashi, I., Tsuruoka, M., Niimura, M., Takahashi, Y., Thinakaran, G. & Iwatsubo, T. 2003, "The role of presenilin cofactors in the  $\gamma$ -secretase complex", *Nature*, vol. 422, no. 6930, pp. 438-441.

Tan, H., Tuck, K.L., Stupans, I. & Hayball, P.J. 2003, "Simultaneous determination of oleuropein and hydroxytyrosol in rat plasma using liquid chromatography with fluorescence detection", *Journal of Chromatography B*, vol. 785, no. 1, pp. 187-191.

Tang, M., Jacobs, D., Stern, Y., Marder, K., Schofield, P., Gurland, B., Andrews, H. & Mayeux, R. 1997, "Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease", *Obstetrical & gynecological survey*, vol. 52, no. 1, pp. 37-39.

Tariot, P.N., Farlow, M.R., Grossberg, G.T., Graham, S.M., McDonald, S., Gergel, I. & Memantine Study Group 2004, "Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving donepezil: a randomized controlled trial", *Jama*, vol. 291, no. 3, pp. 317-324.

Teri, L., McCurry, S.M. & Logsdon, R.G. 1997, "Memory, thinking, and aging. What we know about what we know", *The Western journal of medicine*, vol. 167, no. 4, pp. 269-275.

Terry, R.D., Masliah, E., Salmon, D.P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L.A. & Katzman, R. 1991, "Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment", *Annals of Neurology*, vol. 30, no. 4, pp. 572-580.

Terry, A.V., Jr & Buccafusco, J.J. 2003, "The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development", *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, vol. 306, no. 3, pp. 821-827.

- Thakur, M. & Mani, S. 2005, "Estradiol regulates APP mRNA alternative splicing in the mice brain cortex", *Neuroscience letters*, vol. 381, no. 1, pp. 154-157.
- Torres-Lista, V. & Giménez-Llort, L. 2014, "Persistence of behaviours in the Forced Swim Test in 3xTg-AD mice at advanced stages of disease", *Behavioural processes*, vol. 106, pp. 118-121 .
- Visioli, F., Bellosta, S. & Galli, C. 1998, "Oleuropein, the bitter principle of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages", *Life Sciences*, vol. 62, no. 6, pp. 541-546.
- Visioli, F., Caruso, D., Galli, C., Viappiani, S., Galli, G. & Sala, A. 2000, "Olive oils rich in natural catecholic phenols decrease isoprostane excretion in humans", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 278, no. 3, pp. 797-799.
- Visioli, F. & Galli, C. 2001, "Antiatherogenic components of olive oil", *Current atherosclerosis reports*, vol. 3, no. 1, pp. 64-67.
- Visser, M.N., Zock, P.L., Roodenburg, A.J., Leenen, R. & Katan, M.B. 2002, "Olive oil phenols are absorbed in humans", *The Journal of nutrition*, vol. 132, no. 3, pp. 409-417.
- Vulih-Shultzman, I., Pinhasov, A., Mandel, S., Grigoriadis, N., Touloumi, O., Pittel, Z. & Gozes, I. 2007, "Activity-dependent neuroprotective protein snippet NAP reduces tau hyperphosphorylation and enhances learning in a novel transgenic mouse model", *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, vol. 323, no. 2, pp. 438-449.
- Walsh, R.N. & Cummins, R.A. 1976, "The open-field test: A critical review.", *Psychological bulletin*, vol. 83, no. 3, pp. 482.
- Wang, L., Geng, C., Jiang, L., Gong, D., Liu, D., Yoshimura, H. & Zhong, L. 2008, "The anti-atherosclerotic effect of olive leaf extract is related to suppressed inflammatory response in rabbits with experimental atherosclerosis", *European journal of nutrition*, vol. 47, no. 5, pp. 235-243.

- Weisz, J. & Ward, I.L. 1980, "Plasma Testosterone and Progesterone Titters of Pregnant Rats, Their Male and Female Fetuses, and Neonatal Offspring\*", *Endocrinology*, vol. 106, no. 1, pp. 306-316.
- Wenk, G.L., Danysz, W. & Roice, D.D. 1996, "The effects of mitochondrial failure upon cholinergic toxicity in the nucleus basalis.", *Neuroreport*, vol. 7, no. 9, pp. 1453-1456.
- Whitmer, R.A., Quesenberry, C.P., Zhou, J. & Yaffe, K. 2011, "Timing of hormone therapy and dementia: the critical window theory revisited", *Annals of Neurology*, vol. 69, no. 1, pp. 163-169.
- William Rebeck, G., Reiter, J.S., Strickland, D.K. & Hyman, B.T. 1993, "Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions", *Neuron*, vol. 11, no. 4, pp. 575-580.
- Wolozin, B., Kellman, W., Ruosseau, P., Celesia, G.G. & Siegel, G. 2000, "Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors", *Archives of Neurology*, vol. 57, no. 10, pp. 1439-1443.
- Xiao, Z., Sun, L., Liu, Y., Zhang, J. & Huang, J. 2009, "Estrogen regulation of the neprilysin gene through a hormone-responsive element", *Journal of molecular neuroscience*, vol. 39, no. 1-2, pp. 22-26.
- Yan, S.D., Chen, X., Schmidt, A.M., Brett, J., Godman, G., Zou, Y.S., Scott, C.W., Caputo, C., Frappier, T. & Smith, M.A. 1994, "Glycated tau protein in Alzheimer disease: a mechanism for induction of oxidant stress", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 91, no. 16, pp. 7787-7791.
- Yao, M., Nguyen, T.V., Rosario, E.R., Ramsden, M. & Pike, C.J. 2008, "Androgens regulate neprilysin expression: role in reducing  $\beta$ -amyloid levels", *Journal of neurochemistry*, vol. 105, no. 6, pp. 2477-2488.



- Yue, X., Lu, M., Lancaster, T., Cao, P., Honda, S., Staufenbiel, M., Harada, N., Zhong, Z., Shen, Y. & Li, R. 2005, "Brain estrogen deficiency accelerates Abeta plaque formation in an Alzheimer's disease animal model", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 52, pp. 19198-19203.
- Zajackowski, W., Quack, G. & Danysz, W. 1996, "Infusion of ( )-MK-801 and memantine—contrasting effects on radial maze learning in rats with entorhinal cortex lesion", *European journal of pharmacology*, vol. 296, no. 3, pp. 239-246.
- Zandi, P.P., Anthony, J.C., Khachaturian, A.S., Stone, S.V., Gustafson, D., Tschanz, J.T., Norton, M.C., Welsh-Bohmer, K.A. & Breitner, J.C. 2004, "Reduced risk of Alzheimer disease in users of antioxidant vitamin supplements: the Cache County Study", *Archives of Neurology*, vol. 61, no. 1, pp. 82-88.
- Zandi, P.P., Carlson, M.C., Plassman, B.L., Welsh-Bohmer, K.A., Mayer, L.S., Steffens, D.C., Breitner, J.C. & Cache County Memory Study Investigators 2002, "Hormone replacement therapy and incidence of Alzheimer disease in older women: the Cache County Study", *Jama*, vol. 288, no. 17, pp. 2123-2129.
- Zandi, P.P., Sparks, D.L., Khachaturian, A.S., Tschanz, J., Norton, M., Steinberg, M., Welsh-Bohmer, K.A. & Breitner, J.C. 2005, "Do statins reduce risk of incident dementia and Alzheimer disease?: The Cache County Study", *Archives of General Psychiatry*, vol. 62, no. 2, pp. 217-224.
- Zhang, B., Maiti, A., Shively, S., Lakhani, F., McDonald-Jones, G., Bruce, J., Lee, E.B., Xie, S.X., Joyce, S., Li, C., Toleikis, P.M., Lee, V.M. & Trojanowski, J.Q. 2005, "Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 1, pp. 227-231.